

Caracterização da bioatividade de folhas de diferentes castas de videira quando sujeitas a processamento alimentar

Adriano Freitas Lima

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

Orientado por
Prof. Dr. Albino António Bento
Prof. Dr. Ilton José Baraldi

**Bragança
2015**

Aos meus pais
Aos meus irmãos



O presente trabalho foi realizado com financiamento do projeto “Proteção da videira contra pragas e doenças em modo de produção biológico para obtenção de vinho biológico” (nº 47476), financiado pelo ProDeR (Programa de Desenvolvimento Rural).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e àqueles que se fazem presente dele, meus avós, que de alguma forma participaram na minha vida e me auxiliaram em princípios únicos. Vocês foram minha inspiração desde a infância.

Aos meus orientadores Professor Doutor Albino Bento, da Escola Superior Agrária, do Instituto Politécnico de Bragança, Professor Doutor Ilton José Baraldi, da Universidade Tecnológica Federa do Paraná (UTFPR) – Brasil, pela orientação deste trabalho, disposição da sua atenção, pela capacidade científica, sanção das dúvidas que surgiram assim como por toda a força e incentivo ao longo da realização deste. Todas essas disposições fazem fortalecer o vosso profissionalismo.

Ao Professor Doutor José Alberto, pois sua colaboração me trouxe até onde estou. Sou eternamente grato pela sua disposição, profissionalismo, pela amizade construída e pela ajuda prestada nos momentos mais difíceis.

A Professora Doutora Susana Casal, do Serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pela ajuda prestada e todo auxílio na transmissão do seu conhecimento.

Ao Doutor Ricardo Malheiro pela presença e auxílio em todas as ocasiões. Obrigado pela sua amizade, disposição, acompanhamento e ânimo em todos os dias de laboratório, não existiram tempos ruins. O aprendizado repassado por ti foi excepcional, seu companheirismo fez os dias de realização deste trabalho se tornarem únicos, volto a casa com a certeza de que conheci uma boa pessoa, com foco e determinação.

Aos meus colegas de laboratório, em especial ao Mestre Nuno Rodrigues, a sua ajuda foi de grande importância. Só tenho a agradecer pelo tempo em que disponibilizou, muitas das vezes, para auxiliar com seu conhecimento ou até mesmo para ter conosco, colegas, em ocasiões de diversão.

Aos meus professores da UTFPR, em especial a todo o núcleo de Engenharia de Alimentos, que deram base e auxiliaram, nos fornecendo a grande oportunidade de estudar em um ótimo instituto. Obrigado por todo o apoio, de muito valeu todo o empenho de vocês e é por isso que buscamos sempre o melhor.

Aos meus amigos que fizeram dos meus dias, dias mais claros, muitas das vezes dias de ânimo, dias de sentir saudade, dias de se sentir especial por ter alguém com quem pudéssemos contar. Com toda certeza vocês fizeram a maior diferença, tanto aqueles que estão no Brasil dando força e incentivo como aqueles que fizeram parte, intimamente, da minha caminhada por Portugal. Deixo esse agradecimento em especial a minha família UTFPR, pois é assim que considero vocês, uma grande família onde abrigamos nossos corações.

A toda minha família, vocês me deram sustento, base para esse sonho, sempre me apoiando e dando votos de confiança. Agradeço em especial aos meus tios Fernando Gonçalves e Rosana Lima, pelo auxílio que me deram ao longo de toda essa jornada e pelos conselhos, e a minha tia Clari Gonzaga, por fazer todas minhas manhãs serem mais felizes, por seu apoio e pelas lindas mensagens.

Aos meus pais, irmãos e avó pelo amor, carinho, felicidade e aconchego repassado, mesmo a distância. O meu eterno agradecimento a todos, em especial a minha mãe Clair Frassão que sempre me apoiou. Mesmo quando tudo parecia loucura, ela me deu inspiração para continuar, para tentar sempre mais ao longo de toda a minha vida. Se sou forte, hoje, é por você ter mostrado como é que a vida “funciona”, afinal é como você sempre diz *“a escola da vida é que ensina”*. Eu amo vocês incondicionalmente e sou eternamente grato pela confiança de todos.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”

(Marthin Luther King)

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
1.1. INTRODUÇÃO.....	3
1.2. OBJETIVOS.....	4
CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. FOLHAS DE VIDEIRA COMO SUBPRODUTO	7
2.2. FOLHAS DE VIDEIRA E SUAS PROPRIEDADES	8
2.2.1. Composição fenólica.....	9
2.2.1.1. <i>Compostos fenólicos de folhas frescas</i>	12
2.2.1.2. <i>Compostos fenólicos de folhas processadas</i>	13
2.2.2. Fatores que afetam a composição fenólica	14
2.2.2.1. <i>Fatores bióticos</i>	15
2.2.2.2. <i>Fatores abióticos</i>	16
2.2.2.3. <i>Modo de produção</i>	17
2.2.2.4. <i>Efeito da casta</i>	18
2.3. O USO DE FOLHAS DE VIDEIRA COMO ALIMENTO.....	19
2.3.1. Uso em fresco	20
2.3.2. Em conserva.....	20
CAPÍTULO 3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. ESTUDO PRELIMINAR PARA SELEÇÃO DE CASTAS PARA PROCESSAMENTO ALIMENTAR.....	25
3.1.1. Amostras em estudo.....	25
3.1.2. Preparação de extratos aquosos	26

3.1.3. Atividade antioxidante	26
3.1.3.1. Atividade sequestradora de radicais livres	27
<u>3.1.3.1.1. Atividade sequestradora do radical DPPH.....</u>	<u>27</u>
<u>3.1.3.1.2. Atividade sequestradora do radical ABTS (ABTS⁺)..</u>	<u>28</u>
3.1.3.2. Capacidade redutora total pelo método Folin-Ciocalteau	28
3.1.3.3. Determinação do poder redutor	29
3.1.4. Avaliação de diferentes grupos fenólicos	30
3.1.5. Análise estatística	30
3.1.5.1. Análise de variâncias.....	30
3.1.5.2. Análise de componentes principais	31
3.2. PROCESSAMENTO ALIMENTAR EM FOLHAS DE VIDEIRA....	31
3.2.1. Amostras selecionadas e condições do processamento alimentar ...	31
3.2.2. Determinação da cor	32
3.2.3. Preparação de extratos aquosos	33
3.2.4. Atividade antioxidante e avaliação de diferentes grupos fenólicos .	33
3.2.5. Composição centesimal	33
3.2.5.1. <i>Humidade</i>	33
3.2.5.2. <i>Gordura</i>	33
3.2.5.3. <i>Proteína Bruta</i>	34
3.2.5.4. <i>Cinzas</i>	34
3.2.5.5. <i>Hidratos de Carbono e Valor Energético</i>	34
3.2.6. Composição química.....	35
3.2.6.1. <i>Clorofilas e carotenóides</i>	35
3.2.6.2. <i>Perfil em ácidos gordos</i>	35
3.2.6.3. <i>Composição em tocoferóis e tocotrienóis</i>	36
3.2.6.4. <i>Avaliação da fração volátil</i>	37
3.2.7. Análise estatística	38
3.2.7.1. <i>Análise de variância</i>	38

CAPÍTULO 4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	39
4.1.	ESTUDO PRELIMINAR.....	41
4.1.1.	Rendimentos da extração.....	41
4.1.2.	Atividade antioxidante.....	42
4.1.3.	Diferentes grupos fenólicos.....	45
4.2.	PROCESSAMENTO ALIMENTAR.....	48
4.2.1.	Determinação da cor.....	48
4.2.2.	Rendimento da extração.....	52
4.2.3.	Atividade antioxidante.....	53
4.2.4.	Composição centesimal.....	60
4.2.5.	Composição química.....	64
4.2.5.1.	<i>Clorofilas e carotenoides.....</i>	<i>64</i>
4.2.5.2.	<i>Perfil em ácidos gordos.....</i>	<i>67</i>
4.2.5.3.	<i>Composição em tocoferóis e tocotrienóis.....</i>	<i>72</i>
4.2.5.4.	<i>Composição em diferentes grupos fenólicos.....</i>	<i>75</i>
4.2.5.5.	<i>Composição da fração volátil.....</i>	<i>78</i>
CAPÍTULO 5.	CONCLUSÕES.....	87
5.1.	CONCLUSÕES.....	89
CAPÍTULO 6.	REFERÊNCIAS.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Videiras das castas Tinta Amarela (a) e Tinta Roriz (b) durante a fase de crescimento.....	3
Figura 2 – Estrutura tipo de uma folha de videira.....	8
Figura 3 – Estrutura de algumas antocianinas, flavonas e flavonóis presentes nas folhas de videira (Adaptado de Monagas et al., 2006a).....	11
Figura 4 – Fatores que podem afetar a composição fenólica dos produtos da videira..	15
Figura 5 – Folhas de videira utilizadas para produção do Sarma.....	19
Figura 6 – Principais etapas na obtenção dos extratos aquosos.....	26
Figura 7 – Visualização da solução de DPPH após 1 hora no escuro com concentrações crescentes de extrato (da esquerda para a direita).....	27
Figura 8 – Visualização da solução de ABTS com concentrações crescentes de extrato (da esquerda para a direita).....	28
Figura 9 – Capacidade redutora total de duas amostras às concentrações de 0,5 e 1 mg mL ⁻¹ .	29
Figura 10 – Amostra submetida a análise do Poder Redutor	30
Figura 11 – Rendimento de extração obtidos a partir de extrações aquosas aplicadas às folhas das 10 castas em estudo.....	41
Figura 12 – Relação entre a concentração de extrato testada e a atividade antioxidante para os métodos DPPH (a), ABTS (b) e poder redutor (c) em duas castas brancas (Gouveio e Malvasia Fina) e duas castas tintas (Touriga Nacional e Touriga Franca)..	44
Figura 13 – Composição em fenóis totais (mg AG g extrato ⁻¹), flavonóis (mg Q g extrato ⁻¹) e derivados do ácido hidroxicinâmico (DAH) (mg AC g extrato ⁻¹) nos extratos aquosos das folhas das 10 castas de videira.....	46
Figura 14 – Análise de Componentes Principais obtida a partir dos dados da atividade antioxidante e composição em compostos bioativos de folhas de videira de 10 castas diferentes. As componentes principais explicam 67,32% da variância total dos dados.	47
Figura 15 – Diferenças de cor (ΔE) (a) e índice de amarelidade (YI) (b) entre os tratamentos térmicos aplicados nas folhas de videira.....	51
Figura 16 – Rendimentos dos extratos aquosos entre os tratamentos utilizados com as folhas de videira.....	53

Figura 17 – Valores de EC ₅₀ das análises de DPPH*, ABTS* e poder redutor (P.R.)** para as folhas de videira das castas Malvasia Fina (a) e Touriga Franca (b).	54
Figura 18 – Relação entre a concentração de extrato testada e a atividade antioxidante para o método DPPH para as duas castas estudadas.	55
Figura 19 – Relação entre a concentração de extrato testada e a atividade antioxidante para o método ABTS para as duas castas estudadas.	56
Figura 20 – Relação entre a concentração de extrato testada e a absorvência a 700 nm, indicadora do poder redutor das amostras.	57
Figura 21 – Capacidade redutora total dos extratos aquosos das folhas de videira submetidas ao processamento alimentar.....	59
Figura 22 – Frações do perfil em ácidos gordos presentes nas folhas de videira das castas Malvasia Fina (a) e Touriga Franca (b) submetidas a diferentes tratamentos térmicos.	68
Figura 23 – Perfil cromatográfico das castas Malvasia Fina e Touriga Franca submetidos a diferentes tratamentos térmicos, obtidos por HS-SPME e GC-MS.	79

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros físicos das folhas de videira frescas.	32
Tabela 2 – Valores obtidos das análises da atividade antiradicalar e capacidade redutora dos extratos aquosos obtidos das folhas de 10 castas de videira.	43
Tabela 3 – Colorimetria das faces adaxial e abaxial das folhas de videira das castas Malvasia Fina e Touriga Franca antes e após cozimento.	49
Tabela 4 – Composição centesimal das folhas de videira de Malvasia Fina e Touriga Franca submetidas a diferentes tratamentos térmicos.	61
Tabela 5 – Teor em clorofila a, clorofila b, clorofila total e carotenoides (mg 100 g de folhas ⁻¹) das folhas de Malvasia Fina e Touriga Franca após diferentes tratamentos térmicos....	65
Tabela 6 – Composição detalhada do perfil em ácidos gordos (g de AcGo 100 g AcGo ⁻¹) das folhas de videira utilizadas para estudo em diferentes tratamentos térmicos.	70
Tabela 7 – Composição em tocoferóis, tocotrienóis, e vitamina E livre (mg kg ⁻¹) nas folhas de videira das castas Malvasia Fina e Touriga Franca submetidas a diferentes tratamentos térmicos.	73
Tabela 8 – Composição em fenóis totais (mg AG g extrato ⁻¹), flavonóis (mg Q g extrato ⁻¹) e derivados do ácido hidroxicinâmico (DAH) (mg AC g extrato ⁻¹) nos extratos aquosos das folhas Malvasia Fina e Touriga Franca submetidas a tratamento térmico.	76
Tabela 9 – Composição detalhada do perfil volátil (µg 100 g de folhas ⁻¹) das folhas de videira utilizadas para estudo em diferentes tratamentos térmicos.	81

RESUMO

O consumo de alguns subprodutos da vinha e do vinho, como sejam as folhas da videira, é conhecido desde longa data na região do Mediterrâneo. As folhas de videira já estão presentes na dieta humana e animal em vários países do mundo, sendo completamente desvalorizadas como sub-produtos em outras regiões. Neste sentido, os principais objetivos deste trabalho foram avaliar entre diversas castas brancas (Côdega do Larinho, Fernão Pires, Gouveio, Malvasia Fina, Rabigato e Viosinho) e tintas (Tinta Amarela, Tinta Roriz, Touriga Franca e Touriga Nacional) do Planalto Mirandês, quais as mais adequadas para processamento alimentar, tendo em vista o seu potencial antioxidante e componentes bioativos. O segundo objetivo principal foi avaliar o comportamento de duas castas selecionadas no potencial antioxidante, composição química e composição centesimal e valor energético em diferentes tratamentos térmicos (branqueamento, cozimento durante 60, 75 e 90 minutos em panela de pressão).

Verificou-se que as castas brancas apresentaram maior atividade antioxidante e compostos bioativos em relação às castas tintas, tendo-se verificado um efeito da casta nos resultados obtidos. A partir destes resultados verificou-se que a casta mais antioxidante foi a Malvasia Fina, e a Touriga Franca a casta com menor potencial antioxidante. Ambas as castas foram selecionadas para serem submetidas aos tratamentos térmicos.

O processamento térmico causou mudanças significativas na cor de ambas as castas, passando de verdes para acastanhadas, muito devido à redução do teor em clorofilas e carotenoides presentes em ambas as castas. A atividade antioxidante foi reduzida com o tempo de aquecimento, tendo-se mesmo assim verificado, de uma maneira geral, maior atividade na Malvasia Fina em relação à Touriga Franca, tendo-se verificado o mesmo no teor de fenóis totais, flavonóis e derivados do ácido hidroxicinâmico. O valor energético das folhas é reduzido durante o aquecimento, muito pela perda de hidratos de carbono para a água de cozedura. A gordura das folhas de videira é maioritariamente polinsaturada e rica em ácido linolénico, verificando um aumento dos ácidos gordos polinsaturados com o aquecimento das folhas e uma diminuição dos ácidos monoinsaturados e saturados. No que respeita ao teor em vitamina E livre, esta aumentou com o aquecimento em ambas as castas, especialmente na Touriga Franca, sendo o α -tocoferol o vitâmero mais abundante, chegando a ultrapassar os 1000 mg kg⁻¹ com aquecimentos prolongados. A fração volátil das folhas

de videira é altamente influenciada pelo tratamento térmico em ambas as castas. Com o aquecimento aldeídos, álcoois e ésteres responsáveis por aromas verdes e herbáceos [(Z)-3-hexenal; (Z)-3-hexen-1-ol; e (Z)-3-hexenil acetato)] são completamente eliminados, provocando o aparecimento de cetonas características de processos térmicos (6-metil-5-hepten-2-ona) e sesquiterpenos responsáveis por aromas a madeira (cariofileno).

Dos resultados obtidos, verifica-se que a casta Malvasia Fina é a mais adequada para processamento térmicos moderados. No entanto para processamentos mais longos as diferenças entre as castas desvanece-se, sendo desencorajado processamentos alimentares longos, devido à perda de valor nutricional, componentes importantes responsáveis por propriedades funcionais e bioativas, bem como a perda de componentes responsáveis pelo aroma, entre outras características importantes para o consumidor, como a cor.

Palavras-chave: Folhas de videira; subproduto; ingrediente alimentar; processamento alimentar; compostos fenólicos; atividade antioxidante.

ABSTRACT

The consumption of some vine and wine sub-products, such as grape leaves, is known a long time ago in the Mediterranean region. Grape leaves are already present in the animal and human diet in several countries around the world, being completely devalued as sub-products in some other regions. In this sense, the principal objectives of this work were to evaluate among diverse white grape varieties (Côdega do Larinho, Fernão Pires, Gouveio, Malvasia Fina, Rabigato e Viosinho) and red varieties (Tinta Amarela, Tinta Roriz, Touriga Franca e Touriga Nacional) from Planalto Mirandês, the most adequate for food processing, taking in account their bioactive potential and bioactive components. The second main objective was to evaluate the behavior of two selected grape leaves varieties in the antioxidant potential, chemical and centesimal composition, energetic value at different thermal treatments (bleaching, boiling for 60, 75 and 90 minutes in a pressure pan).

It was verified that white grape leaves present higher antioxidant activity and bioactive components in relation to red grape leaves, being verified a varietal effect in the obtained results. From these results it was verified that the most antioxidant variety was Malvasia Fina, and Touriga Franca was the variety with lower antioxidant properties. Both varieties were selected to be submitted to thermal treatments.

The thermal processing caused significant changes in the color of both varieties, passing from green to brown coloration, much due to the reduction in chlorophylls and carotenoids present in both varieties. The antioxidant activity was reduced with the heating time, being verified in a general way higher antioxidant activity in Malvasia Fina in relation to Touriga Franca. The same was checked in total phenols content, flavonols, and derivatives of hydroxycinnamic acid. The energetic value of the leaves was reduced with the thermal process increase, mainly due to the loss of carbohydrates to the boiling water. The fat of grape leaves is mainly polyunsaturated and rich in linolenic acid, being verified an increase in the polyunsaturated fatty acids with the increase of boiling time and a reduction in the monounsaturated and saturated fatty acids. Respecting the vitamin E content, it increased with the boiling time in both varieties, especially in Touriga Franca, being α -tocopherol the most abundant vitamin, passing the 1000 mg kg⁻¹ with long boiling periods. The volatile fraction of the grape leaves is highly influenced by the thermal treatment in both varieties. With heating aldehydes, alcohols and esters responsible for the green and herbaceous aromas [(Z)-3-

hexenal; (*Z*-3-hexen-1-ol; e (*Z*-3-hexenyl acetate)] are completely eliminated, inducing the appearance of ketones characteristic of thermal processing (6-methyl-5-hepten-2-one) and sesquiterpenes responsible for wood aromas (caryophyllene).

From the results obtained, is verified that Malvasia Fina variety is the most adequate fro moderate thermal processes. Meanwhile for longer processing periods the difference between the varieties are reduced, being discouraged the application of longer thermal processes, due to the loss of nutritional value, important compounds responsible for the functional and bioactive properties, as well as the loss of components responsible for the aroma, as well as other important characteristics for the consumer, as the color.

Keywords: grape leaves; sub-product; food ingredient; food processing; fenolic compounds, antioxidant activity.

Capítulo 1

Introdução e Objetivos

1.1. INTRODUÇÃO

A videira, do Latim *Vitis*, composta por muitas espécies distribuídas mundialmente, é um género que pertence à família *Vitaceae*, sendo ela a principal representante da família devido à produção de uva que se usa em grande escala para consumo “*in natura*” ou até para elaboração de diferentes matérias-primas (Teixeira et al., 2002).

A *Vitis vinífera*, oriunda da região Mediterrânea (Fernandes et al., 2013), apresenta enorme diversidade genética e varietal resultante da seleção durante séculos, adaptando-se bem em diferentes climas (Riaz et al., 2007).

A produção de uva à escala mundial ultrapassa os 77 milhões de toneladas. O continente Europeu é responsável por 26,5 milhões de toneladas. Portugal produz 828 mil toneladas de uva em 179,5 mil hectares, ou seja 4,94% da área agrícola nacional (FAO, 2013). Embora a videira seja uma cultura muito importante em Portugal, os seus subprodutos, como é o caso da folha, são desvalorizados, tendo a videira uma grande representatividade de produção foliar (Figura 1), seria importante fomentar novas maneiras de valorizar este subproduto.



Figura 1 – Videiras das castas Tinta Amarela (a) e Tinta Roriz (b) durante a fase de crescimento.

Fonte: Arquivo Pessoal

Uma das maneiras de aproveitar a folha da videira e lhe atribuir valor comercial é o seu uso para fins dietéticos e nutricionais. Em alguns países do mundo, a inclusão da folha de videira na dieta humana já é uma realidade, dotando o consumidor de propriedades benéficas para a saúde. Desta forma, torna-se viável o estudo da utilização das folhas de videira como produto alimentar, de modo a valorizar este subproduto.

1.2. OBJETIVOS

No presente estudo objetiva-se:

- Realizar um estudo preliminar para a seleção de castas mais adequadas para o processamento alimentar tendo em vista o potencial fitoquímico e antioxidante.
- A partir da seleção, submeter a diferentes tratamentos térmicos as castas com maior e menor potencial fitoquímico, avaliando diferentes parâmetros do ponto de vista físico-químicos, composição e propriedades:
 - Cor a partir dos diferentes tratamentos, tomando assim conhecimento da alteração causada por cada processo térmico;
 - Atividade antioxidante (DPPH, ABTS, poder redutor, capacidade redutora total), avaliando a capacidade em resposta dos aquecimentos em que as folhas são submetidas, dando então maior informação sobre o tempo ideal de processamento;
 - Composição centesimal (humidade, cinzas, proteína bruta, gordura, hidratos de carbono, valor energético), fornecendo informações ideais para a composição nutricional;
 - Composição química (pigmentos, ácido gordos, vitamina E livre, diferentes grupos fenólicos, e composição volátil), permitindo identificar melhor os constituintes presentes de forma a possibilitar uma relação entre estes e as atividades biológicas correspondentes das folhas nos diferentes estados submetidos.

Capítulo 2



Revisão Bibliográfica

2.1. FOLHAS DE Videira COMO SUBPRODUTO

Os produtos obtidos a partir de diversas espécies de videira, nomeadamente o bagaço, pele, grainhas, engaço, folhas, vêm sendo alvo de estudos desde antigamente, demonstrando a importância da utilização como subprodutos pelos comprovados efeitos benéficos na saúde, principalmente na prevenção de doenças cardiovasculares e do cancro, a partir dos compostos que retardam ou promovem inibição da oxidação de substratos, antioxidantes, que podem ser oxidados (Dani et al., 2010; Monagas et al., 2006a). A partir das pesquisas, surgiram várias respostas a tratamentos em que o produto auxilia, como as tensões arteriais elevadas, o qual contribui para a vasodilatação, diabetes, pois diminui os níveis de glicose no sangue, diarreia, desordens inflamatórias, varicosas, hemorragia, até mesmo atuando como agente antimicrobiano, hepatoprotetor, e principalmente antioxidante (Deliorman Orhan et al., 2009; Fernandes et al., 2013; Orhan et al., 2006).

Alguns subprodutos já são explorados por vários setores industriais, como é o caso das grainhas que já são utilizadas nas indústrias cosméticas para a obtenção de óleo, sendo este incorporado em diversos produtos (Dresch et al., 2014). Essa utilização, quase na sua totalidade, também contribui para a diminuição dos resíduos que se geram na indústria vitivinícola (Monagas et al., 2006a).

As folhas de videira têm vindo a ser utilizadas em alguns países da Europa, Norte de África e Médio-Oriente como um alimento rico em vitaminas, minerais e compostos fenólicos. A sua utilização dá-se sob diversas formas, sendo o uso em fresco e em salmoura as mais utilizadas (Dani et al., 2010; Güler & Candemir, 2014). Na Turquia, a utilização das folhas é elevada, sendo encontrado até mesmo produtos embalados em condições que não utilizam solução salina ou agentes de salga, os quais têm propriedade de proteção durante o armazenamento. A grande vantagem deste modo de conservação é que se torna viável o consumo por pessoas com hipertensão. Para além disso, as folhas frescas que estão em salmoura ou fermentadas servem de alimento principalmente durante o inverno (Kosar et al., 2007; Ünver et al., 2007). A utilização como prato principal em alguns países do Mediterrâneo é feita a partir do cozimento da folha enrolada, com algum recheio. Para a utilização das folhas nesta guarnição, são utilizadas duas espécies mais adequadas para o uso, como a casta Agrazaki, que possui folhas sem lobos (Figura 2).

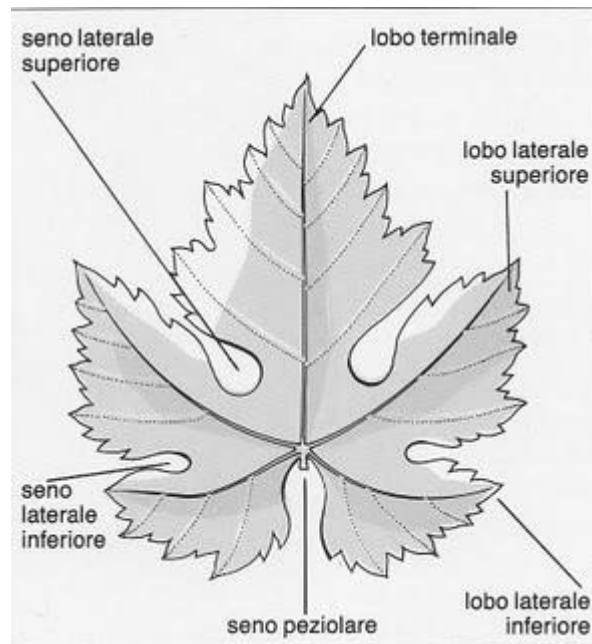


Figura 2 – Estrutura tipo de uma folha de videira.

Fonte: www.vinalia.com.br – “A Uva”.

A alimentação à base de legumes e vegetais traz uma rica fonte de vitaminas, incluindo as vitaminas A, C e E, minerais e fibras, sendo pobres em gordura. Tal facto atribui um grande valor nutricional e bioativo ao produto, visto que ao consumir outros alimentos a dieta encontrar-se-á equilibrada e o suprimento dos nutrientes necessários é garantido (Dogan et al., 2015; El et al., 1997; Romero et al., 2000).

2.2. FOLHAS DE VIDEIRA E SUAS PROPRIEDADES

Alguns compostos têm sido identificados nas películas e folhas da videira, podendo citar os flavonóides, as antocianinas, aminoácidos, alguns ácidos orgânicos, vitaminas, carboidratos, gorduras, procianidinas, terpenos, enzimas e carotenóides (Deliorman Orhan et al., 2009; Kosar et al., 2007). As atividades biológicas importantes contidas nas folhas provêm destes diferentes tipos de compostos fenólicos, propriamente dito, dos seus ácidos fenólicos, dos taninos, flavonóides, procianidinas e antocianinas (Dani et al., 2010; Güler & Candemir, 2014; Kosar et al., 2007).

A presença de ácido hidroxicinâmico e seus derivados nas folhas de plantas é evidenciada, uma vez que estes são encontrados na parede celular dos vegetais. O ácido cafeico é um dos compostos derivados deste grupo, mostrando que as folhas de videira têm como principais compostos estes derivados fenólicos e flavonóides (Kosar et al., 2007).

O ácido cítrico, succínico, tartárico e palmítico, estão presentes em folhas de videira com condições de stresse. O ácido málico é reduzido nestas condições, de modo que na evolução do ciclo vegetativo da videira já se ocorre um decréscimo deste ácido. A insolação que a videira é submetida, promove a redução deste composto pois seu precursor, fosfoenolpiruvato, é sensível a altas temperaturas (Griesser et al., 2015).

As propriedades da videira são originadas, também, a partir de vários fatores bióticos e abióticos, logo após o seu repouso vegetativo. Tal facto é associado às atividades do metabolismo primário e secundário das plantas, que logo modificam a qualidade e produtividade da planta. Uma deficiência hídrica, pouco grave, provoca implicações na troca gasosa e na fotossíntese da videira. Esse fator ativa parte da defesa celular da planta, o qual provém dos metabolismos secundários, como compostos fenólicos e compostos orgânicos voláteis. De um modo geral, a influência do ecossistema apresenta uma maneira eficaz para o controlo da qualidade, visto que o aroma, a capacidade antioxidante, síntese de compostos, são geridos a partir desses metabolismos secundários (Alonso et al., 2015; Ferrandino & Lovisolo, 2014).

As investigações bioquímicas dos flavonóides têm mostrado a sua grande eficiência na inibição enzimática de vários sistemas. Estes compostos e os ácidos hidroxicinâmicos, encontrados em abundância nas folhas, têm a sua propriedade antioxidante ligada a atividades de eliminação dos radicais livres e peroxidação lipídica, onde esta última promove a degradação oxidativa dos alimentos suscetíveis e ainda causa danos nos organelos celulares dentro do corpo humano a partir da perda da sua função fisiológica (Kosar et al., 2007). A apresentação destes fatos reforça que as folhas de videira auxiliam na prevenção e desenvolvimento de doenças ligadas ao stresse oxidativo.

2.2.1. Composição fenólica

O metabolismo das plantas é dividido em dois grandes grupos, primário e secundário. O metabolismo primário é aquele responsável pela fotossíntese, respiração e pelos caminhos para o metabolismo secundário, este último é presente principalmente em plantas superiores e engloba uma vasta gama de compostos intermédios. Os compostos fenólicos são provenientes desse metabolismo secundário (Seigler, 2012). De um modo geral, os compostos fenólicos são um forte fator na área alimentar relacionado com saúde e medicina. Estes compostos apresentam diversas atividades biológicas, muito funcionais do ponto de vista nutricional. Parte dessas funções se

atribuem às funções anti-inflamatórias, anti-carcinogénica, anti-mutagénica, entre outras, das quais a atividade antioxidante é a mais importante associada a estes compostos (Güler & Candemir, 2014).

Vários são os compostos que se encontram nos subprodutos da videira. Os taninos são compostos fenólicos que surgem naturalmente e apresentam elevada adstringência quando presente em elevadas concentrações, diminuindo a palatabilidade dos alimentos que os contém. A capacidade de formação de complexos com proteínas, aminoácidos, polissacarídeos, ácidos gordos e nucleicos, está diretamente relacionada com a composição e a extensão da polimerização destes taninos assim como com a baixa palatabilidade (Monteiro et al., 2005; Romero et al., 2000).

Junto da parede celular das folhas de videira, as fitoalexinas protegem as plantas de microrganismos. Os estilbenos são uma classe de fitoalexinas mais relevante na videira. Este composto varia o seu conteúdo a partir de vários fatores, entre eles o clima e a exposição às diferentes variações, a composição genética das plantas e às infeções. Estas fitoalexinas são formadas pela via da fenilalanina/polimanolato, como produtos secundários produzidos a partir da planta, formando o resveratrol. Nas videiras, o resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno) e seus derivados, como pterostilbeno, *δ-viniferina*, *ε-viniferina* e o glicosídeo piceid, são os principais estilbenos (Ali, Maltese, Choi, & Verpoorte, 2010; Jeandet et al., 2002). O resveratrol e alguns dos seus derivados encontram-se presentes em vários extratos de folhas de videira, independentemente da casta. A época do ciclo vegetativo da planta é, também, um fator determinante da concentração destes compostos. O *trans*- e *cis*- resveratrol e a astringina, são os estilbenos que podem ser citados por estar presentes em algumas castas tintas como Syrah, Merlot, Vranac, e brancas como Marastina e Posip (Katalinic et al., 2013).

A distribuição dos compostos nas folhas não se dá de maneira semelhante em todas as amostras. Podem assim ocorrer variações no mesmo lote, o qual se pode atribuir às cultivares utilizadas, cor das folhas, nomeadamente a avaliação de compostos fenólicos, ciclo vegetativo e os processamentos que o produto sofreu para a sua utilização como alimento. Diferentes produtos da videira, utilizados na alimentação, nomeadamente folhas e película da uva, apresentam variação considerável da concentração, localizada e dispersa, das antocianinas e uma menor diferença nos compostos fenólicos não antociánicos (Fernandes et al., 2013; Monagas et al., 2006a). As antocianinas são derivadas das antocianidinas, da qual não apresenta grupos

glicosilados. Alguns compostos encontrados nas uvas são encontrados nas folhas de videira, como a antocianidina-3-glicosídeo, que é o pigmento mais abundante nos produtos alimentares à base das folhas (Ali et al., 2010). A Figura 3 mostra possíveis antocianinas, entre outros grupos de compostos fenólicos, presentes em folhas de videira utilizadas como ingrediente alimentar.

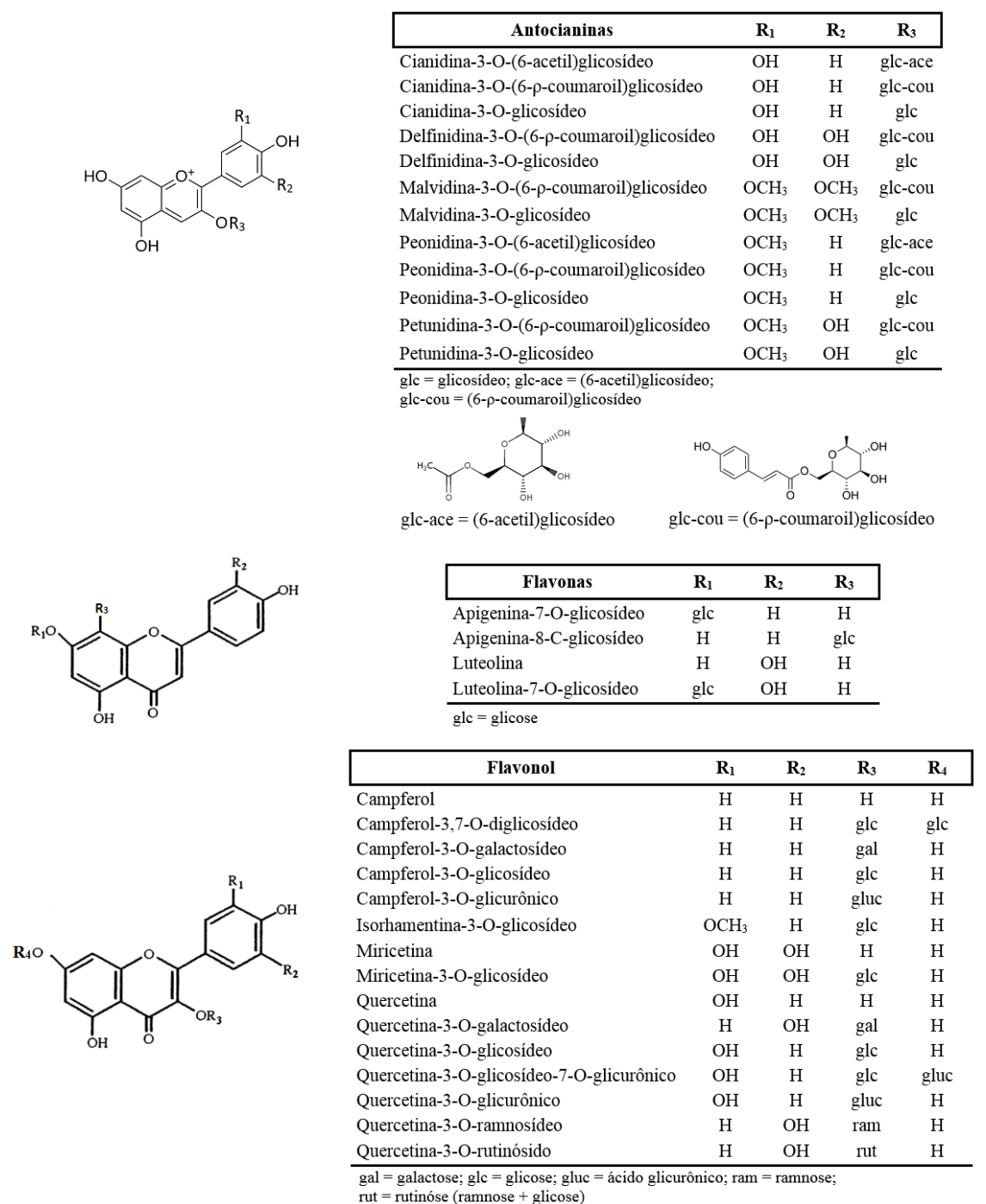


Figura 3 – Estrutura de algumas antocianinas, flavonas e flavonóis presentes nas folhas de videira (Adaptado de Monagas et al., 2006a).

Através do mesmo precursor, dihidroflavanóis, as antocianinas e os flavonóides são sintetizados, onde a diferença entre ambos se encontra nas vias enzimáticas utilizadas. Com este facto surge uma relação inversa entre as concentrações de compostos não antociânicos, flavonóis e ácido *trans*-caftárico, e os antociânicos. De tal forma, a presença de derivados hidroxicinâmicos se restringe a formação de poucos compostos, como o ácido *trans*-caftárico (Monagas et al., 2006a).

Monagas et al. (2006b) analisou compostos presentes na película e folha de videira e relatou que as antocianinas encontram-se nas formas de 3-*O*-monoglicosídeos e 3-*O*-acilado monoglicosídeo ligados à cianidina, delfina, malvidina, peonidina e petunidina, que são as cinco principais antocianidinas. Tal acilação da antocianina ocorre por esterificação com ácido acético, *p*-cúmarico e ácido cafeico, na posição C-6 da molécula de glucose, como representado na Figura 3. A mesma autora ainda refere que os flavonóis existem na forma de miricetina-, quercetina-, campferol- e isorhamentina-3-*O*-glicosídeo.

Em complemento dos compostos citados acima, ainda foram encontrados nas folhas de videira agliconas de campferol, miricetina e quercetina, peonidina-3-*O*-glicosídeo, campferol-3,7-*O*-diglicosídeo, derivados da quercetina, nomeadamente quercetina-3-*O*-rutinósido, 3-*O*-ramnosídeo, 3-*O*-glicurónico, 3-*O*-ramnogalactosídeo, 3-*O*-glicosídeo-7-*O*-glicurónico, 3-*O*-galactosídeo, entre outros que são representados na Figura 3 (Katalinic et al., 2013; Monagas et al., 2006a; Orhan et al., 2006).

2.2.1.1. *Compostos fenólicos de folhas frescas*

Entre alguns dos compostos encontrados nas folhas, em complemento daqueles já citados acima, os ácidos fenólicos, gálico, vanílico e cafeico, foram encontrados em folhas de videira de casta branca (Güler & Candemir, 2014). Para além destes, os ácidos ferúlico e *p*-cumárico também foram relatados em folhas de *V. vinífera* (Weber et al., 1995).

Durante as fases de vegetação das folhas de videira, entre maio e setembro, o teor em fenóis totais cresce significativamente. Katalinic et al. (2013) estudou a evolução após a época de repouso da videira. Os flavonóis e flavonóides aumentaram os seus teores em quatro vezes comparativamente com o início do ciclo vegetativo, apresentando 2,34% de ácido gálico equivalente a cada quilograma de folhas secas. Uma boa relação do composto confirma o potencial fenólico que o produto apresenta. Para além disso, os monómeros de flavanol, (+)-catequina, e o seu epímero (-)-

epicatequina, foram encontrados nas folhas de videira, destacando-se mais nas castas tintas. Nos extratos de folhas de videira, a epicatequina encontra-se em pequenas quantidades, possivelmente pela sua complexidade polimérica.

Castas como Merlot, Syrah, Vranac, apresentam variações entre 10-35 mg/kg de quercetina, apigenina, miricetina e campferol, com base em folhas secas. Com a evolução vegetativa, propriamente no fim do amadurecimento da uva, ocorre um incremento dos glicosilados da quercetina, chegando até mesmo a 3% em cada quilograma de folhas secas. Com essa significativa modificação, os flavonóis conseguem totalizar 90% do total de compostos fenólicos nas folhas (Katalinic et al., 2013).

Com o corte da disponibilidade energética das folhas, quando colhidas, as mesmas tendem a iniciar a decomposição, perdendo parte dos compostos principais. Essa decomposição ocorre em um pequeno intervalo de tempo durante o armazenamento, e devido a esse fato tem-se preservado este subproduto da videira dentro de salmouras, para consumo futuro. A Grécia, Turquia, países do Médio Oriente, da Europa e EUA, são países onde o consumo de folhas de videira faz parte das suas dietas, com principal ênfase nos três primeiros países (El et al., 1997; Kosar et al., 2007).

2.2.1.2. *Compostos fenólicos de folhas processadas*

A utilização das folhas de videira em fermentação, sem salmoura, promove o aumento de flavonóides totais, assim como uma diminuição de flavonóis, demonstrando ser mais ricas em compostos fenólicos, quando comparado com folhas de videira em fresco e fermentadas em salmoura. Junto dos flavonóides, o ácido hidroxicinâmico também é encontrado em abundância. Com a fermentação, a quercetina aumenta os seus teores, já o ácido cafeico varia entre as formas de utilização das folhas (Kosar et al., 2007).

Alguns estudos com outros vegetais verdes apresentam uma boa relação dos fenóis totais em alguns tipos de tratamentos térmicos (Turkmen et al., 2005). Deste modo, pode-se observar que os compostos fenólicos variam entre as diferentes partes das plantas e até mesmo entre diferentes castas (Seigler, 2012).

2.2.2. Fatores que afetam a composição fenólica

A composição fenólica, como já citado, provém dos metabolismos secundários, dos quais estes metabolismos podem ser alterados através de stress que podem ocorrer no campo. Essa injúria pode causar tanto a depreciação como um acúmulo destes compostos nas plantas (Seigler, 2012).

Folhas colhidas em setembro, fim da maturação da uva, têm uma composição favorecida de flavonóis e estilbenos. O fator indica uma proteção contínua da videira e uma agregação económica importante, com as suas propriedades mantidas para produção de extratos antioxidantes e antimicrobianos, após a colheita da uva (Katalinic et al., 2013).

As doenças foliares aumentam significativamente o seu teor de fenóis totais. Grupo de flavonóis, como hidratos de rutina e quercetina, de flavanóis, catequina, epicatequina e galato de epicatequina, e estilbenos acumulam-se significativamente em folhas doentes, com oídio, quando comparados a folhas saudáveis. Esse fato pode ainda estar relacionado diretamente com o stress promovido bioticamente na planta, o qual se concentrou na sua defesa e produziu maior quantidade de compostos (Taware et al., 2010).

Alguns produtos mostram diferenças na sua composição fenólica quando comparado aos processos de produção tradicionais com a produção livre de qualquer tipo de produto fitofarmacêutico. Sabe-se que a ausência destes produtos faria com que a planta se submetesse a maiores condições de stress através do ataque por pragas, participando então na síntese dos metabolismos secundários de forma benéfica ou não. Porém, ainda existem poucos resultados de potenciais diferenças entre as produções, além das diferenças apresentadas em relação aos processos e terroir (Dani et al., 2010; Monagas et al., 2006a).

A Figura 4 mostra os principais fatores responsáveis por uma modificação na composição fenólica nas folhas de videira.

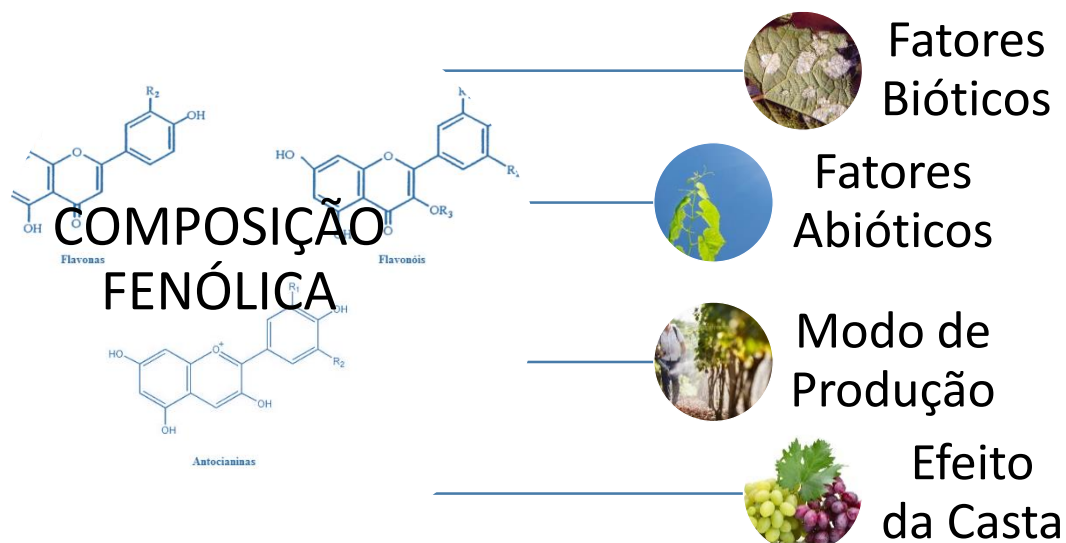


Figura 4 – Fatores que podem afetar a composição fenólica dos produtos da videira.

De seguida, os fatores que afetam a composição fenólica dos produtos da videira são apresentados.

2.2.2.1. *Fatores bióticos*

Os fatores bióticos estão relacionados com elementos que possuem vida, daqueles organismos em um ecossistema. As plantas, organismos sedentários, ficam condicionadas a esta população presente no ecossistema, sofrendo ataques e stress a partir do ambiente, tendo de se adaptar ao longo do seu ciclo vegetativo (Niinemets et al., 2013). Vale ressaltar que o stress abiótico afeta a planta inteira, já os aspetos bióticos começa por partes distintas das folhas, como os herbívoros, que normalmente começam a atuar nas extremidades da folha.

Os patógenos, presentes no ar, solo, água, são carregados pelo vento e acumulam-se no estoma das plantas. Essa invasão estomática varia conforme a propagação desse patógeno. Conforme a evolução da doença e a intensidade de ataque, os estragos vão-se tornando maiores, caracterizando uma maior gravidade ao avançar do tempo e ao nível em que os causadores se multiplicam na planta (Niinemets et al., 2013).

Alguns metabolitos secundários das plantas possuem atividade antimicrobiana para além de atuar como antioxidantes. Derivados do ácido cinâmico, como ácido

cafeico e rosmarínico conseguem atuar de modo a inibir a germinação de zoósporos (Widmer & Laurent, 2006).

A conformação *cis*- do estilbenóide resveratrol, é consequente da bioprodução da videira. A sua presença, pode ser vista como uma maior possibilidade de impacto de stresse, produzido por *Botrytis cinerea* ou por *Phomopsis viticola*. A produção da videira sem químicos pode ser a resposta dessa atuação dos fungos e do distúrbio que a planta sofre (Steimetz et al., 2012; Tříska et al., 2012).

Com a preocupação em reduzir a utilização de fitofarmacêuticos, a utilização de elicitores pode ser uma boa alternativa. Estes são compostos orgânicos produzidos pela própria planta, o qual tem característica de defesa quando atacado por predadores ou infecções. Com uma indução desses elicitores, a planta reconhece um ataque e promove vários sinais para o seu metabolismo promover reações de defesa, que neutralizaria o patógeno.

Em resposta ao stresse que a videira se submete, associados também aos patogênicos, o estilbeno e seus derivados começam a acumular-se. Com a utilização deste composto derivados o estímulo de defesa das plantas ativa-se e contribui para a formação destas fitoalexinas importantes para o ciclo vegetativo da planta, sendo então tóxico para microrganismos (Steimetz et al., 2012).

Um acúmulo de ácidos hidroxibenzóicos, hidroxicinâmicos, derivados da catequina e estilbeno, ocorre após a infecção das folhas e frutos da videira. Esse fato comprova que a resposta de defesa da videira consegue sintetizar muitos compostos benéficos à proteção e ao consumo (Taware et al., 2010).

2.2.2.2. *Fatores abióticos*

Fatores abióticos são causados a partir de todas as influências que os seres vivos possam sofrer em um ecossistema, dentre eles diversos aspetos do meio ambiente, como a luz, temperatura, chuva, solo, radiações UV e outros. Sabendo da necessidade das plantas nestes aspetos do ambiente, pode-se relacionar o excesso ou escassez de alguns fatores abióticos com o stress que a planta sofrerá, modificando então o metabolismo e diretamente o crescimento e desenvolvimento dos órgãos da planta (Ferrandino & Lovisolo, 2014).

Usualmente as videiras são mantidas no seu ciclo vegetativo sem qualquer tipo de rega, passando por períodos de reduzida disponibilidade de água no verão. Com a reduzida disponibilidade de água, a planta entra em stresse e passa a concentrar-se em

produzir os seus subprodutos com uma enorme qualidade e concentração dos compostos que sintetiza, como os compostos 3-*O*-glicosídeos do campferol e da quercetina que apresentam maior correlação entre os compostos fenólicos após um tratamento com stresse (Griesser et al., 2015). Assim, vê-se que uma forma de elevar a qualidade dos compostos da planta é promover uma deficiência hídrica moderada após a fase do pintor das uvas, etapa na qual os bagos começam a adquirir coloração, crescer e amadurecer (Alonso et al., 2015).

Também, a alta incidência de UV-B, proveniente da luz solar, promove uma acumulação de metabolitos secundários como forma de resposta à proteção contra estes raios. Os compostos fenólicos e os terpenos têm propriedades antioxidantes protetoras a esse efeito. Com uma alta gama deste raio contra a videira, ela irá aumentar o teor de compostos fenólicos presentes na pele da baga da uva, com resposta a isso diminuirá o tamanho e quantidade de frutos produzidos (Alonso et al., 2015; Berli et al., 2011).

Diretamente em relação ao stresse abiótico da videira, o ácido abscísico, normalmente sintetizado nas folhas, é uma fitohormona que tem a função reguladora de vários aspetos ligados aos processos fisiológicos e bioquímicos da planta (Alonso et al., 2015; Ferrandino & Lovisolo, 2014). Uma aplicação de ácido abscísico nas folhas, semanalmente, poderá promover evoluções na atividade enzimática dos antioxidantes, na membrana dos esteróis defensores, o qual são precursores de vários compostos com atividade biológica como vitamina D e sais biliares, e na acumulação dos compostos fenólicos, promovendo então uma melhor tolerância a fatores abióticos (Berli et al., 2011).

2.2.2.3. *Modo de produção*

O conceito de modos de produção é muito amplo. De acordo com a IFOAM (2014), a agricultura biológica é aquela que se deve evitar uso de fertilizantes, pesticidas, drogas animais e aditivos alimentares que possuam ou venha a ter efeitos adversos a saúde.

Existem poucos estudos com videiras, em relação ao método de produção, biológico ou convencional, utilizados no seu ciclo vegetativo. Sabe-se que os produtos fitofarmacêuticos utilizados deixam resíduos. Dani et al. (2010) dedicou parte do seu trabalho a estudar diferenças nessas produções, baseando-se no conceito de agricultura biológica determinada pela IFOAM. Extratos de folhas de videira, independentemente de produção biológica ou convencional, apresentam teor de fenóis totais muito

semelhantes. Na produção biológica, combinada com outros fatores, como a humidade, temperatura, o resveratrol é o composto que se encontra, aproximadamente, dez vezes maior frente à sua concentração no método convencional. Diretamente com a potencialidade do resveratrol, neste tipo de tratamento, a catequina e a quercetina têm menores concentrações. Um método de produção convencional pode acarretar um certo incremento em alguns compostos fenólicos, como a naringina, que não se encontra nas videiras de produção biológica estudadas pela autora.

2.2.2.4. *Efeito da casta*

Sabe-se que as castas possuem concentrações e diferentes compostos presentes, sendo um fator muito importante. Tal facto é observado quando outras castas aparentam ter maior vigor no ciclo vegetativo, na representação foliar e na quantidade de produção, no mesmo solo e condições (Riaz et al., 2007).

As castas tinta e branca apresentam semelhança entre si quando comparados aos compostos presentes. Estas duas variações têm em comum na sua composição, derivados do ácido hidroxicinâmico (ácido *trans*-cafeoil tartárico e *trans*-cumaroil tartárico) e flavonóides glicosilados (miricetina-, quercetina-, e campferol-3-*O*-glicosídeo e quercetina-3-*O*-galactosídeo) (Fernandes et al., 2013). Dentre as variedades, as castas tintas são as que têm maiores concentrações, no qual a quercetina-3-*O*-glicosídeo e -3-*O*-galactosídeo, juntos, representam em média 70% do total dos compostos fenólicos estudados. Estes dados indicam uma maior concentração dos flavonóides nas folhas quando comparados com as uvas. Ainda, as diferentes variedades das castas brancas, apesar de se assemelharem na composição fenólica, apresentam diferenças significativas entre si na atividade antioxidante. Esse resultado pode ser interpretado de maneira que outros compostos químicos podem estar envolvidos nas reações, contribuindo para os diversos efeitos entre as variedades (Fernandes et al., 2013).

Algumas condições tornam compostos que tinham atividade antioxidante como compostos pró-oxidantes (Halliwell, 2008), fator que pode ser a causa das variações entre a análise das castas.

2.3. O USO DE FOLHAS DE VIDEIRA COMO ALIMENTO

Com a exigência dos consumidores por produtos com qualidade nutricional e possíveis efeitos benéficos para a saúde, surgem novos estudos em diversos alimentos, na perspectiva de satisfazer a procura da população. A folha de videira é um destes alimentos, que apresenta uma quantia significativa de vitaminas, minerais e teor de fibra bruta, que podem diferenciar-se entre as diversas variedades de *V. vinifera*, mas apresentam valores representativos (Sat et al., 2002).

Como a folha de videira contém muitos compostos benéficos, como citado anteriormente, o seu consumo tem vindo a crescer com o passar dos anos, e com isso surgem novas pesquisas para o desenvolvimento de melhorias ao nível da saúde pública. No Mediterrâneo, o Sarma, como demonstrado na Figura 5, é o prato popular à base de folhas de videira que se enrola com algum enchimento, normalmente carne ou arroz, e estufado (Dogan et al., 2015; Sat et al., 2002).



Figura 5 – Folhas de videira utilizadas para produção do Sarma.

Fonte: kitchenpress.wordpress.com – “Vine Leaf Rolls Stuffed with Flavored Rice” (2011).

Além de se pensar no consumo, as folhas devem estar em conformações adequadas à aceitabilidade do consumidor. A época de colheita destes produtos devem ser controlados, pois uma colheita muito tardia poderá afetar qualitativamente a folha, diretamente nos compostos presentes. Folhas velhas podem sofrer muitos ataques, gerando muitas perdas e rejeição por parte dos consumidores. É um facto que folhas grossas, muito encorpadas fisicamente, com lobos não são bem aceites, pois surge uma grande dificuldade na utilização, quando enroladas. Assim, faz-se a escolha de folhas

mais jovens e de castas com poucos lobos para o processamento e comercialização (Sat et al., 2002).

De fato, as indústrias evoluíram conforme o desejo dos consumidores. Comercialmente os produtos já são encontrados enlatados e prontos para consumo. As folhas de videira têm uma rápida decomposição, isso faz com que se criem diferentes formas para a sua conservação. As salmouras são então utilizadas para que o produto se mantenha estável durante mais tempo e possa ser consumido em várias épocas do ano. Essa disposição dá-se de maneira a suprir o consumo elevado nos países do Mediterrâneo (Dogan et al., 2015; Kosar et al., 2007). A estabilidade e preservação do produto são métodos pouco estudados, normalmente sendo feitos os convencionais como salga seca, utilização de ácidos e fermentação em salmoura. Após tratados, são enlatados para a disponibilização ao consumidor.

2.3.1. Uso em fresco

O objetivo da utilização em fresco das folhas de videira não se concentra na ingestão destas, pois sabe-se que alguns compostos presentes nas folhas apresentam uma baixa palatabilidade e digestibilidade (Romero et al., 2000). De fato, essas características causariam uma rejeição pelos consumidores. O foco da utilização em fresco é destinado para alimentação animal, utilização na composição de alguns produtos industrializados tanto para complemento alimentar como para a área da medicina (Pari & Suresh, 2008).

2.3.2. Em conserva

A conservação dos produtos na atualidade é apresentada através de vasta escolha dos métodos, dos quais podem ser em gordura ou até mesmo por filmes e revestimentos comestíveis. Alguns compostos utilizados para a conservação criam um ambiente com uma atmosfera modificada, das quais os deteriorantes não conseguem promover suas atividades. O sal cria um ambiente osmótico que é desfavorável para o crescimento e reprodução dos microrganismos nos alimentos, logo a vida de prateleira passa a ser mais longa quando os produtos são submetidos a esse meio.

A salmoura das folhas de videira pode ser realizada de diferentes maneiras. A preservação com quantias consideráveis de sal e pequena quantidade de ácido láctico mostra uma boa fermentação em poucas semanas (Ünver et al., 2007).

As folhas de videira cozinhadas têm uma diminuição no teor dos compostos. A vitamina C e o cálcio são perdidos durante a salga e processamento térmico. O ferro, β -caroteno e as fibras também sofrem essa redução quando submetidos aos tratamentos para preparação alimentícia (El et al., 1997). A vitamina C é um composto que apresenta maior estabilidade em meios ácidos. A utilização de conservas de folhas de videira promove uma redução considerável, caracterizado como perda deste composto. A adição de ácido cítrico no branqueamento e um aquecimento a alta temperatura, aproximadamente 90 °C, promove uma menor perda de vitamina C comparado a outras temperaturas mais baixas e branqueamentos sem ácido cítrico (Sat et al., 2002).

Com o branqueamento das folhas, as cores verdes características tendem a ser perdidas. É durante o tratamento térmico que ocorre uma degradação das clorofilas, gerando as feofitinas, compostos de tonalidade amarelada. Para o branqueamento e salmoura de folhas enlatadas, a utilização de sal cria um ambiente osmótico. Um branqueamento com adição de sal e ácido cítrico aumenta o conteúdo de matéria seca nas folhas, quando comparado a um branqueamento somente com água. Contudo, o processamento aumenta a humidade das folhas durante o armazenamento e logo reduz o conteúdo de matéria seca. O teor de cinzas é elevado nos produtos que sofrem tratamento salino, devido a essa interação do sal com a matéria (Sat et al., 2002).

Capítulo 3









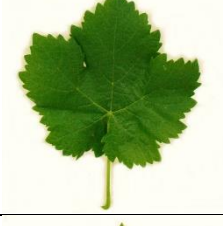
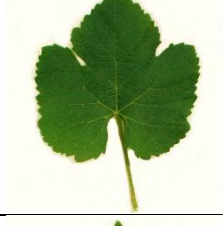
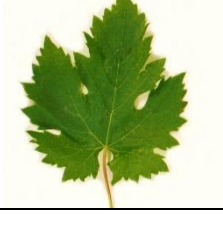
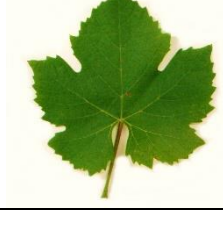
Materiais e Métodos

3.1. ESTUDO PRELIMINAR PARA SELEÇÃO DE CASTAS PARA PROCESSAMENTO ALIMENTAR

3.1.1. Amostras em estudo

De modo a efetuar um estudo preliminar para verificar as folhas de castas de videira mais interessantes do ponto de vista fitoquímico e bioativo para processamento alimentar, foram selecionadas 10 castas (6 brancas e 4 tintas), apresentadas na Tabela 1. Todas as castas do estudo foram provenientes do Planalto Mirandês, obtidas no mês de julho, tendo sido colhidas três amostras independentes por casta, totalizando 30 amostras. Todas as folhas utilizadas para o estudo encontravam-se sãs.

Tabela 1 – Folhas de castas de videira em estudo provenientes do Planalto Mirandês.

Casta	Nome	Folha	Nome	Folha
Castas brancas	Códega do Larinho		Malvasia Fina	
	Fernão Pires		Rabigato	
	Gouveio		Viosinho	
Castas tintas	Tinta Amarela		Touriga Franca	
	Tinta Roriz		Touriga Nacional	

3.1.2. Preparação de extratos aquosos

Após colhidas as amostras, estas foram imediatamente transportadas para laboratório e congeladas para posterior liofilização (ScanVac CoolSafe - Figura 6A), onde permaneceram por aproximadamente 72 horas até completar o processo de liofilização. Em cada amostra, as folhas liofilizadas (Figura 6B) foram trituradas (Figura 6C) e 5 g foram adicionadas a 250 mL de água destilada (Figura 6D) para preparação dos extratos aquosos. A mistura foi levada a ebulição durante 45 minutos (Figure 6E), onde ao fim deste tempo a mistura foi filtrada com papel de filtro Whatman nº 4 (Figura 6F). Após filtração a solução de água mais o extrato foi congelada e posteriormente liofilizada, para obtenção do extrato, tendo-se calculado o rendimento de extração.

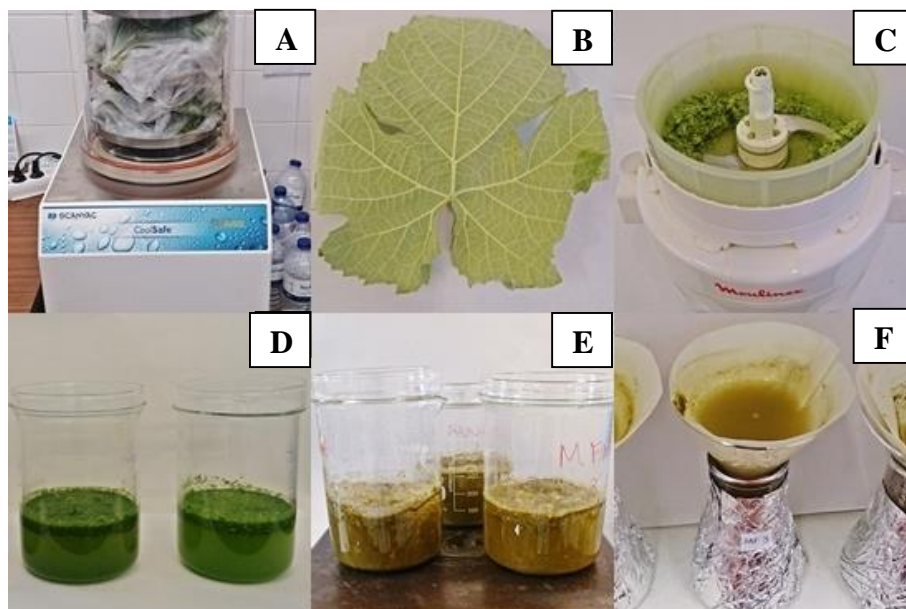


Figura 6 – Principais etapas na obtenção dos extratos aquosos.

Fonte – Arquivo pessoal.

3.1.3. Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante dos extratos aquosos foi estabelecida por diferentes metodologias (capacidade antiradicalar e potencial redutor) para obter uma maior informação sobre cada casta em estudo.

Uma vez obtido o extrato, este foi redissolvido em água destilada a uma concentração de 50 mg mL⁻¹. A partir desta solução mãe, foram preparadas concentrações que variaram entre 0,01 e 2 mg mL⁻¹ e foram aplicadas em todos os métodos em estudo, salvo exposto o contrário.

3.1.3.1. *Atividade sequestradora de radicais livres*

3.1.3.1.1. *Atividade sequestradora do radical DPPH*

A análise de avaliação da atividade sequestradora realizada pelo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) foi verificada de acordo com o procedimento de Hatano et al. (1988).

A 0,3 mL de cada concentração testada foram adicionados 2,7 mL de uma solução metanólica de DPPH ($6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Após agitação, as amostras foram submetidas ao escuro durante 1 hora para que os valores da absorvância se tornassem estáveis. A monitorização da redução dos radicais de DPPH foi medida por espectrofotometria (GENESYS 10 UV, Thermo Scientific) a um comprimento de onda (λ) de 517 nm. A Figura 7 mostra as diferentes concentrações de uma amostra sujeita ao método do DPPH antes da leitura em espectrofotómetro.

Em cada amostra foi feita uma amostra branca, utilizando água destilada em vez de extrato, para calcular a absorvância pura da solução. A percentagem de inibição foi calculada pela descoloração da solução com DPPH, a partir da equação:

$$\% \text{ Inibição} = \left(\frac{Abs_{branco} - Abs_{amostra}}{Abs_{branco}} \right) \times 100$$

Onde: Abs_{branco} corresponde à absorvância da solução de DPPH; $Abs_{amostra}$ à absorvância da solução com o extrato da amostra. A concentração de extrato que promove 50% de inibição (EC_{50}) foi calculada por percentagem do efeito bloqueador em função da concentração de extrato da análise, analisada por representação gráfica.



Figura 7 – Visualização da solução de DPPH após 1 hora no escuro com concentrações crescentes de extrato (da esquerda para a direita).

Fonte: Arquivo Pessoal

3.1.3.1.2. Atividade sequestradora do radical ABTS (ABTS^{•+})

De acordo com o método descrito por Sánchez et al. (2007), a formação dos radicais ABTS surge da reação do ABTS^{•+} com persulfato de sódio (K₂S₂O₈). A 25 mL de ABTS (7 mmol L⁻¹) foram adicionados 440 µL de K₂S₂O₈ (140 mmol L⁻¹), permanecendo a solução, em temperatura ambiente, no escuro entre 12 a 16 horas. Após esse período, um volume definido dessa solução é dissolvida em etanol até a obtenção de uma solução ajustada com absorvância 0,70 ± 0,02 a λ = 734 nm. A cada 2 mL da solução ajustada de ABTS adicionaram-se 100 µL de extrato das várias concentrações testadas.

A percentagem de inibição dos radicais de ABTS foi calculada pela descoloração da solução a partir da equação:

$$\% \text{ Inibição} = \left(\frac{Abs_{\text{solução ajustada}} - Abs_{\text{amostra}}}{Abs_{\text{solução ajustada}}} \right) \times 100$$

Onde: Abs_{solução ajustada} corresponde ao valor de absorvância 0,70 ± 0,02; Abs_{amostra} ao valor da amostra em solução ABTS. A concentração de extrato que promove 50% de inibição (EC₅₀) foi calculada por percentagem do efeito bloqueador em função da concentração de extrato da análise, analisada por representação gráfica. A Figura 78 mostra as diferentes concentrações de uma amostra sujeita ao método do ABTS antes da leitura em espectrofotómetro.



Figura 8 – Visualização da solução de ABTS com concentrações crescentes de extrato (da esquerda para a direita).

Fonte: Arquivo Pessoal

3.1.3.2. Capacidade redutora total pelo método Folin-Ciocalteu

A capacidade redutora total foi avaliada com base no procedimento de Singleton e Rossi (1965). Fez-se a mistura de 1 mL de extrato, com duas concentrações pré-estabelecidas (0,5 e 1 mg mL⁻¹), onde utilizou-se de água para proceder com uma

amostra em branco, em 1 mL de Folin-Ciocalteu, com ligeiro repouso. Em seguida, adicionou-se 1 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e 7 mL de água destilada. Toda a mistura permaneceu 90 minutos ao abrigo de luz, logo procedeu-se com a leitura da absorvância em $\lambda = 725 \text{ nm}$. Na Figura 9 é possível visualizar a diferença de coloração para as concentrações utilizadas, onde a cor verde intenso representa uma maior capacidade redutora total.

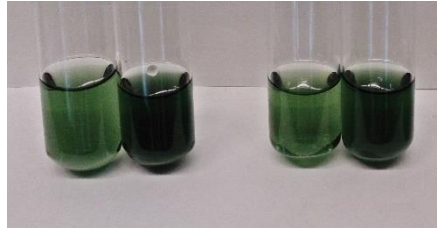


Figura 9 – Capacidade redutora total de duas amostras às concentrações de 0,5 e 1 mg mL^{-1} .
Fonte: Arquivo Pessoal

O ácido gálico foi usado para a construção de uma reta de calibração (concentrações que variaram entre 0,001 e 1 mM), sendo os resultados expressos em mg miliequivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg AG g^{-1}).

3.1.3.3. *Determinação do poder redutor*

A determinação da capacidade do agente redutor (antioxidante), foi baseada na metodologia descrita por Berker et al. (2007). Foram misturados 1 mL de cada concentração do extrato em 2,5 mL de solução tampão (fosfato de sódio a 200 mmol L^{-1}) com $\text{pH} = 6,6$ e 2,5 mL de ferricianeto de potássio (1%). Toda essa mistura foi agitada vigorosamente e incubada a 50 °C por 20 minutos. Após arrefecidas, foram adicionados 2,5 mL de ácido tricloroacético (10%) nas amostras e submetidas a outra agitação vigorosa. Em seguida retirou-se 2,5 mL de sobrenadante e misturou-se com 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico (0,1%). A absorvância foi lida a $\lambda = 700 \text{ nm}$ após 2 minutos de repouso da última agitação.

A concentração de extrato a que corresponde uma absorvância de 0,5 é definida como EC_{50} e foi calculada em função da concentração de extrato testada. Na Figura 10 é possível verificar o poder redutor de concentrações crescentes de extrato testado.



Figura 10 – Amostra submetida a análise do Poder Redutor

Fonte: Arquivo Pessoal

3.1.4. Avaliação de diferentes grupos fenólicos

Com este parâmetro pretendeu-se determinar a composição das folhas de videira em fenóis totais, derivados do ácido hidroxicinâmico e flavonóis. A partir da metodologia descrita por Boulanouar et al. (2013), foram adicionados 1 mL de uma solução de etanol a 96% contendo 0,1% de ácido clorídrico a 2% em 1 mL das concentrações do extrato (0,5 e 1 mg mL⁻¹). Ácido Clorídrico a 2% foi adicionado às amostra até se obter um volume total de 10 mL, sendo, em seguida, agitado vigorosamente. Os valores da absorvância foram lidos a $\lambda = 280$ nm para a determinação dos fenóis totais, utilizando ácido gálico (AG) como padrão (0,001 e 1 mM), $\lambda = 320$ nm para determinar os derivados do ácido hidroxicinâmico (DAH), usando do ácido cafeico (AC) como padrão (0,001 e 1 mM), e a $\lambda = 360$ nm para definir os flavonóis, usando a quercetina (Q) como padrão (0,001 e 0,5 mM). Os resultados foram expressos em mg equivalentes do respetivo padrão usado por grama de extrato: mg AG g⁻¹; mg AC g⁻¹; e mg Q g⁻¹.

3.1.5. Análise estatística

3.1.5.1. Análise de variâncias

Uma análise de variância (ANOVA) com uma soma dos quadrados Tipo III foi realizada usando o GLM (procedimento General Linear Model) do software SPSS, versão 22.0 (IBM Corporation, Nova Iorque, E.U.A.). O cumprimento dos requisitos da ANOVA, nomeadamente a distribuição normal dos resíduos e a homogeneidade de variâncias, foram avaliados através do teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors (se $n > 50$) ou pelo teste de Shapiro-Wilk's (se $n < 50$), e pelos testes de Levene, respetivamente. Todas as variáveis dependentes foram analisadas através de uma análise de variâncias univariada (one-way ANOVA) com ou sem a correção de Welch, dependendo se o requisito da homogeneidade de variâncias foi cumprido ou não. O principal fator estudado foi a composição em compostos bioativos e atividade

antioxidante de folhas de 10 castas diferentes de videira. Se um efeito estatístico significativo foi encontrado, as médias foram comparadas usando o teste de Tukey de comparações múltiplas ou o teste de Dunnett T3 também dependendo se a igualdade de variâncias pôde ser assumida ou não. Todos os testes foram realizados com um nível de significância de 5%.

3.1.5.2. *Análise de componentes principais*

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada usando o software SPSS, versão 22.0 (IBM Corporation, Nova Iorque, E.U.A.). Foi aplicada como uma técnica não-supervisionada para reduzir o número de variáveis (7 variáveis correspondendo aos valores de EC₅₀ do DPPH, ABTS e poder redutor; capacidade redutora total e composição em compostos fenólicos totais, derivados do ácido hidroxicinâmico e flavonóis) a um número inferior de novas variáveis derivadas (componentes principais ou fatores) que resumem adequadamente a informação original, ou seja, a atividade antioxidante e composição em compostos bioativos de diferentes folhas de videira agrupadas em castas brancas e tintas. Além disso, a PCA permite reconhecer padrões nos dados colocando-os num espaço multidimensional, usando para esse feito as novas variáveis derivadas como dimensões.

O objetivo da PCA é produzir componentes capazes de serem usadas como predições ou variáveis de resposta em análises subsequentes. O número de fatores a manter no tratamento dos dados foi avaliado pelo Screen plot, tomando em consideração os eigenvalues e a consistência interna através do valor do α de Cronbach's (Rencher, 1995).

3.2. PROCESSAMENTO ALIMENTAR EM FOLHAS DE VIDEIRA

3.2.1. Amostras selecionadas e condições do processamento alimentar

Com base nos estudos realizados na secção 3.1, foram selecionadas as castas Malvasia Fina (Malvasia Fina) e Touriga Franca (Touriga Franca) como as responsáveis por uma maior e menor atividade antioxidante e composição em compostos bioativos, respetivamente. As folhas das castas selecionadas foram colhidas na mesma vinha descrita na secção 3.1.1. em setembro de 2015, utilizando somente folhas saudáveis para as análises. Os parâmetros físicos das castas das folhas selecionadas encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros físicos das folhas de videira frescas.

Casta	Peso da Folha (g)	Comprimento (cm)	Largura (cm)
Malvasia Fina	4,00 ± 0,79	12,13 ± 1,55	16,59 ± 1,87
Touriga Franca	3,95 ± 0,49	11,75 ± 0,62	16,90 ± 0,75

Todas as análises foram feitas nas amostras nas condições fresca (MFF e TFF) branqueada (MFB e TFB), cozida por 60 (MFC1 e TFC1), 75 (MFC2 e TFC2) e 90 minutos (MFC3 e TFC3). O processo de branqueamento consistiu em mergulhar as folhas em água a ferver (50 mL por folha) durante 5 minutos. As amostras destinadas para cozimento foram previamente branqueadas tendo sido os cozimentos realizados em panela de pressão (100 mL de água por folha), na máxima capacidade de aquecimento, e o tempo contabilizado somente após a temperatura máxima ter sido alcançada, logo sendo reduzido a capacidade de aquecimento a ponto de deixar o sistema em ebulição. Após cada processamento culinário, cada amostra foi separada em duas sub-amostras, uma para a determinação da atividade antioxidante e composição em compostos bioativos e a outra sub-amostra para as restantes determinações.

Os tempos de cozimento foram estabelecidos após um pré-ensaio com as folhas de videira, do qual se realizou diversos tempos de cozedura e foram analisados a consistência, aspecto e palatibilidade das folhas.

3.2.2. Determinação da cor

Para a análise de evolução da cor nos diferentes tratamentos das folhas de videira, utilizou-se um colorímetro Konica Minolta modelo CR-400. Foram selecionados os parâmetros CIELAB (L^* , a^* e b^*), onde a partir destes calculou-se a diferença de cor (ΔE) e o índice de amarelidade (YI), como descrito por Zamora et al. (2004).

Para determinação da diferença de cor e índice de amarelidade de óleos, o autor recorreu a utilização das seguintes equações:

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

$$YI = \frac{142,86 \cdot b^*}{L^*}$$

Onde L* fornece a luminosidade, variando de 0 a 100 (preto a branco); a* indica coloração do verde (valores negativos) ao vermelho (valores positivos) e b* indica a coloração do azul (valores negativos) ao amarelo (valores positivos).

3.2.3. Preparação de extratos aquosos

Após liofilizadas, as amostras fresca, branqueada, cozida por 60, 75 e 90 minutos, foram submetidas ao mesmo método indicado no tópico 3.1.2.

3.2.4. Atividade antioxidante e avaliação de diferentes grupos fenólicos

Todas as análises da atividade antioxidante e determinação dos diferentes grupos fenólicos realizadas foram aquelas descritas na sessão 3.1.3 e 3.1.4.

3.2.5. Composição centesimal

3.2.5.1. *Humidade*

Para a análise de humidade foi seguida a norma AOAC 925.40 (1995) com algumas modificações. Brevemente, 1,0 g de folhas frescas foram colocadas em cadinhos devidamente pesados e identificados. As amostras foram inseridas em estufa a 105 ± 2 °C, onde permaneceram até obter peso constante. Todos os resultados foram expressos em percentagem de humidade em matéria fresca.

3.2.5.2. *Gordura*

A metodologia de extração de gordura foi realizada a partir daquela descrita na AOAC 948.22 (2000), por extração em Soxhlet com refrigeração de refluxo, com éter de petróleo com adição de 0,01% de hidroxitolueno butilado (BHT), por um tempo de extração de 24 horas.

Em um almofariz, 7,5 g de amostra foram adicionadas a sulfato de sódio anidro para desidratar e auxiliar na maceração. Após o preparo, a amostra foi inserida em cartucho feito de papel filtro, colocada no Soxhlet e adicionada de solvente para que pudesse dar início ao processo de extração. Finalizado o tempo de 24 horas, o solvente foi removido e foi quantificada a gordura. A gordura obtida foi posteriormente congelada a -20 °C para análise do perfil em ácidos gordos e vitamina E (secções 3.2.6.2 e 3.2.6.3 respectivamente). Os resultados foram expressos em percentagem de gordura em matéria fresca.

3.2.5.3. *Proteína Bruta*

A metodologia de quantificação da proteína bruta envolve o método de Kjeldahl, como descrito na IS/ISO 5983-1 (2005), o qual determina o teor de azoto na amostra a partir da mineralização da matéria orgânica por ácido sulfúrico, com presença de um catalisador, fazendo a transformação do azoto em sal de amónio. O amoníaco passa por libertação em meio alcalino e logo por destilação, seguido de uma recolha em meio ácido e titulação.

Foram pesados 1,0 g de amostra desidratada e inseridas no tubo de digestão, sendo adicionadas duas pastilhas de catalisador (3,5 g de selénio) e 15 mL de ácido sulfúrico concentrado. A digestão foi feita a 400 °C durante 45-50 minutos. O tubo de digestão foi colocado no aparelho de Kjeldahl, o qual faz titulação automaticamente com ácido clorídrico 0,5 N. O aparelho fornece automaticamente o teor de azoto, sendo necessário multiplicar este valor obtido pelo fator de conversão de 6,25 para obter o teor em proteínas.

3.2.5.4. *Cinzas*

Foram pesados, em cadinhos calcinados, em média 0,350 g de amostra após ser submetida a análise de humidade, sendo estes colocados na mufla a 550 °C. As amostras permaneceram no equipamento até a obtenção das cinzas. Alcançada a conformação, os cadinhos foram arrefecidos no dessecador e em seguida, pesados. Os resultados obtidos foram expressos em percentagem de cinzas em matéria fresca.

3.2.5.5. *Hidratos de Carbono e Valor Energético*

Os hidratos de carbono foram determinados, em percentagem, por diferença, pelo seguinte cálculo: $HC (\%) = 100 - (\% \text{ água} + \% \text{ cinzas} + \% \text{ lípidos} + \% \text{ proteínas})$.

O valor energético foi calculado a partir dos fatores de conversão estipulados no Decreto-Lei nº 167/2004 de 7 de Julho do Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas. O valor de cada nutriente foi multiplicado por seu equivalente calórico e o somatório expressou a quantia de calorias na amostra. Os fatores utilizados foram relativos aos hidratos de carbono (4 kcal/g), proteínas (4 kcal/g) e lípidos (9 kcal/g).

3.2.6. Composição química

3.2.6.1. *Clorofilas e carotenóides*

Nas diferentes amostras em estudo foi determinada a quantificação de pigmentos (clorofila a, b e clorofila total, bem como carotenoides) por uma técnica espectrofotométrica após extração metanólica de acordo com o exposto por Ozerol & Titus (1965). Brevemente, em 0,1 g de folhas de videira cortadas em pequenos pedaços foram adicionados 10 mL de metanol, sendo a mistura deixada durante 24 horas a 4 °C e ao abrigo da luz. Após esse tempo, numa cuvete de quartzo foi lida a absorvância da solução metanólica a 470, 651 e 664 nm. Os teores de clorofila a (Cl a), clorofila b (Cl b), clorofila total (Cl T) e carotenoides foi obtida pelas seguintes fórmulas:

$$Cl\ a\ (\mu g\ mL^{-1}) = 16,5\ Abs_{664} - 8,3\ Abs_{651}$$

$$Cl\ b\ (\mu g\ mL^{-1}) = 33,8\ Abs_{651} - 12,5\ Abs_{664}$$

$$Cl\ T\ (\mu g\ mL^{-1}) = 25,5\ Abs_{651} + 4\ Abs_{664}$$

$$Carotenóides\ (\mu g\ mL^{-1}) = \frac{(1000\ Abs_{470} - 1,62\ Cl\ a - 104,69\ Cl\ b)}{221}$$

Os teores finais foram reportados em mg 100g de folha fresca⁻¹.

3.2.6.2. *Perfil em ácidos gordos*

A determinação da composição em ácidos gordos foi realizada de acordo com o procedimento descrito em Cruz et al. (2013), baseado numa saponificação a quente com KOH 0,5M (10 min.; 100°C), seguida de metilação com trifluoreto de boro (BF₃) a 14% em metanol (30 min.; 100°C), para garantir a hidrólise e metilação de ácidos gordos ligados estruturalmente a moléculas mais complexas e ácidos gordos livres. Para quantificar o teor em massa de ácidos gordos totais foi previamente adicionada uma quantidade rigorosa de triundecanoína (Sigma) como padrão interno. Assim, o extrato lipídico obtido após extração em Soxhlet (ver 3.2.5.2) foi retomado com um volume rigoroso de hexano, ao qual se adicionou o padrão interno. Deste extrato, cerca de 1 ml foi utilizado na saponificação/derivatização acima descrita. No final da derivatização transferiu-se cerca de 1 ml do extrato em heptano para *vial* adaptável ao injetor automático do cromatógrafo gasoso (GC).

O perfil dos ácidos gordos foi analisado num cromatógrafo gasoso com injetor

automático e detecção por ionização em chama (GC/FID). Foi utilizada uma coluna capilar CP-Sil- 88 de 50 m de comprimento, 0,25 µm de diâmetro interno e 0,19 µm de espessura de filme (J&W). Para uma separação efetiva dos diversos ácidos gordos utilizou-se inicialmente uma temperatura de 140 °C, com aumentos de 4 °C/min até 220 °C, sempre a uma pressão constante de 120 kPa de hélio, estando o injetor a 230°C e o detetor a 250°C.

A identificação dos ácidos gordos e cálculo dos fatores de correção cromatográficos foi feita com uma mistura padrão (Supelco 37 – Fame Mix). A quantificação foi feita por percentagem relativa das áreas cromatográficas (g ácidos gordo/100g de ácidos gordos), bem como em massa de amostra extraída, levando em conta a massa de padrão interno adicionada (mg kg^{-1})

3.2.6.3. *Composição em tocoferóis e tocotrienóis*

A partir das amostras de gordura retomadas em hexano, foi feita uma diluição rigorosa (1:40) em hexano. Retirou-se um volume rigoroso de extrato, ao qual se adicionou um volume igualmente rigoroso de solução de tocol (padrão interno, 20 microlitros a 1,0 mg/10 ml, preparada em hexano). Após diluição a 1 ml com hexano e homogeneização, os resíduos insolúveis foram depositados por centrifugação a 13000 rpm, durante 3 minutos. Transferiu-se cerca de 800 µL para tubo de vidro do injetor automático.

O sistema de HPLC era composto por um injetor automático (AS-950), uma bomba (PU-980) e um detetor de fluorescência (FP-920), programado para 290/330 nm (ganho 10), todo da Jasco Integrated System (Japão). Os dados cromatográficos foram analisados pelo software Borwin-PDA Controller Software (JMBS, França). A separação cromatográfica foi realizada numa coluna Supelcosil™ LC-SI (3 µm) 75 × 3,0 mm (Supelco, Bellefonte, PA, USA), com uma mistura de n-hexano e 1,4-dioxano (98:2), em isocrático, a 0,7 mL min⁻¹.

A quantificação foi feita com base nas áreas cromatográficas de cada composto, dividida pela área do PI, recorrendo a curvas de calibração para todos os compostos em estudo. As soluções mãe dos padrões de tocoferóis e tocotrienóis foram previamente aferidas por medição no UV. Os resultados foram expressos em mg kg^{-1} de amostra.

3.2.6.4. *Avaliação da fração volátil*

O perfil em compostos voláteis foi avaliado nas diferentes amostras de folhas de videira por HS-SPME (microextração da fase sólida pelo espaço de cabeça) e GC-MS (cromatografia líquida com detetor de massas).

A extração dos compostos voláteis por HS-SPME realizou-se da seguinte maneira:

Os compostos voláteis foram extraídos do espaço de cabeça de *vials* de 50 mL contendo aproximadamente 0,5 g de de folhas de videira às quais foram adicionados 10 µL de padrão interno (4-metil-2-pentanol a 100 ppm) com uma fibra de SPME cotada com divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS 50/30 µm) (Supelco, Bellefonte, EUA). Em cada amostra os voláteis foram libertados para o espaço de cabeça durante 5 minutos a 40 °C sendo posteriormente absorvidos pela fibra de SPME durante 30 minutos à mesma temperatura. Após a extração a fibra de SPME foi recolhida e inserida no injetor de um sistema de cromatografia líquida. O procedimento de HS-SPME foi realizado em duplicado para cada amostra em estudo. O mesmo procedimento foi efetuado num ensaio sem amostra (branco).

As condições cromatográficas (GC-MS) foram as seguintes:

Os compostos retidos na fibra de SPME foram eluídos por dessorção térmica durante 1 minuto. Para limpeza e acondicionamento da fibra de SPME para futuras determinações, a fibra foi mantida no injetor do cromatógrafo durante 10 minutos a 220 °C. A deteção e quantificação dos compostos voláteis foram feitas num cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010 Plus equipado com um detetor de massas Shimadzu GC/MS-QP2010 SE. Uma coluna TRB-5MS (30 m × 0.25mm × 0.25µm) (Teknokroma, Spain) foi usada. O injetor foi programado para 220 °C e as injeções manuais foram feitas no modo de splitless. A fase móvel usada foi hélio (Praxair, Portugal) a uma velocidade linear de 30 cm/s e um fluxo total de 24,4 mL/min. A temperatura do forno foi fixada a 40 °C durante o primeiro minuto, com um aumento posterior de 2 °C por minuto até aos 220 °C, e mantida a esta temperatura durante 30 minutos. A fonte de ionização foi mantida a 250 °C com uma energia de ionização de 70 eV e uma corrente de ionização de 0.1 kV. Todos os espetros de massa foram adquiridos por ionização eletrónica. A ionização foi desligada durante os dois primeiros minutos de cada corrida cromatográfica. Os espetros de massa foram comparados com compostos padrão e com os obtidos na base de dados (NIST 11). Os compostos identificados foram quantificados

através da integração dos seus cromatogramas reconstruídos a partir do cromatograma full scan usando o íon de base de cada composto (m/z 100% de intensidade). A quantificação foi feita através da razão da área de cada composto com a área do padrão interno e convertida em equivalentes massa de acordo com a massa de padrão interno adicionado. Os resultados foram expressos em μg de composto volátil 100 g de folha fresca⁻¹.

3.2.7. Análise estatística

3.2.7.1. *Análise de variância*

A análise de variância foi efetuada de acordo com o procedimento descrito na secção 3.1.5.1. No entanto o principal fator estudado foi o efeito dos diferentes tipos de processamento alimentar em cada casta, e qual o efeito de um tratamento em concreto entre as castas analisadas. Este tratamento foi aplicado em todos os parâmetros analisados nas amostras sujeitas a processamento alimentar.

Capítulo 4



Resultados e Discussões

4.1. ESTUDO PRELIMINAR

4.1.1. Rendimentos da extração

O rendimento de extração é um parâmetro importante, uma vez que define a quantidade de extrato obtido, sendo posteriormente avaliado o seu potencial antioxidante e sua composição. O rendimento de extração mostrou diferenças significativas nas folhas das 10 castas de videira em estudo ($P = 0,001$). Na Figura 11 estão representados os rendimentos de extração das folhas das 10 castas de videira. O rendimento de extração variou entre 26,6 e 34,6%, respetivamente nas castas Malvasia Fina e Fernão Pires (Figura 11), ambas castas brancas.

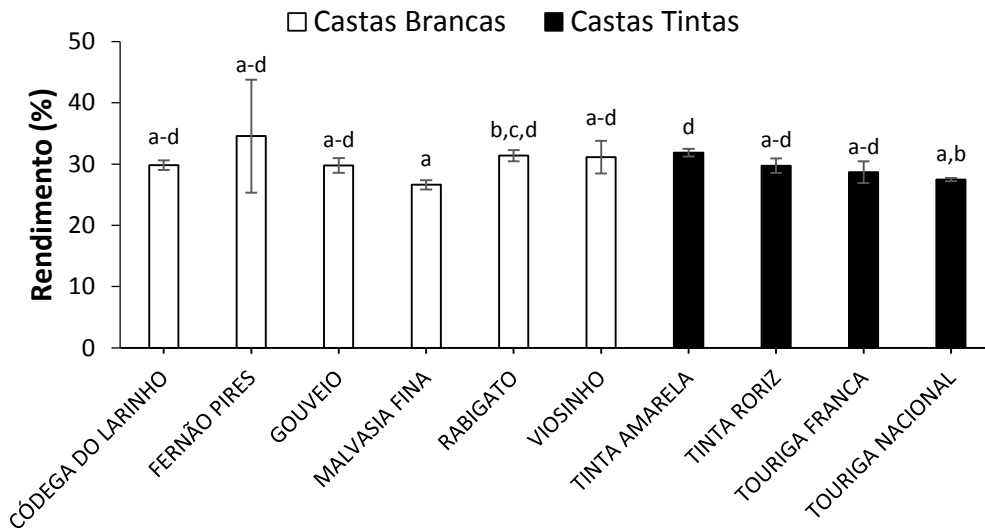


Figura 11 – Rendimento de extração obtidos a partir de extrações aquosas aplicadas às folhas das 10 castas em estudo ($n = 3$; média \pm desvio padrão). Entre as castas estudadas, valores médios com letras diferentes, diferem significativamente ($P < 0,05$).

No que refere a castas tintas, a casta Tinta Amarela foi aquela que apresentou maior rendimento de extração, 31,8%, sendo estatisticamente superior ($P < 0,001$) à Touriga Nacional, que apresentou o menor rendimento de extração entre as castas tintas, 27,5% (Figura 11).

O baixo rendimento da variedade Malvasia Fina vai de encontro ao apresentado no trabalho de Fernandes et al. (2013), assim como um menor rendimento da Touriga Nacional frente a Tinta Amarela, também conhecida como Trincadeira, apesar de diferenças mínimas.

4.1.2. Atividade antioxidante

A avaliação da capacidade antioxidante é um importante fator associado às propriedades bioativas de diversos produtos. O DPPH é uma das análises que compõem essa atividade e visa avaliar a capacidade dos compostos em sequestrar radicais livres, responsáveis por vários processos oxidativos (Roidaki et al., 2015).

Diversos métodos que avaliam a atividade antioxidante se baseiam na reação entre um cromogéneo e um antioxidante, após a reação este cromogéneo é lido por espectrofotometria. O DPPH e o ABTS são cromogéneos utilizados para avaliação rápida e direta da atividade antioxidante, onde a coloração varia de acordo com a disponibilidade da substância em doar um átomo de hidrogénio, no qual os valores da espectrofotometria geram resultados com base no EC_{50} (Milardović et al., 2006).

No método do poder redutor pretende-se verificar a capacidade redutora dos antioxidantes presentes nos extratos aquosos das folhas de videira, reduzindo o complexo Fe^{3+} /ferricianeto à sua forma ferrosa (Pereira et al., 2006). Sendo assim, nas presença de redutores, a solução amarela muda de coloração para verde e azul, dependendo da concentração testada.

A capacidade redutora total (CRT) é um método analisado a partir do método de Folin-Ciocalteu. O foco dessa metodologia é analisar a quantia de fenóis totais presentes nas amostras, porém vários estudos realizados mostram que a forma correta de avaliação seria por capacidade redutora total, uma vez que outros compostos orgânicos e até mesmo inorgânicos são reativos com o reagente Folin (Huang et al., 2005; Ikawa et al., 2003). Isso pode indicar uma diferença entre resultados de fenóis totais em análises mais sensíveis quando comparados a CRT.

Sendo assim, os métodos testados na atividade antioxidante foram separados em dois grupos: métodos de atividade antiradicalar (DPPH e ABTS) e métodos de capacidade redutora (poder redutor e CRT).

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores obtidos das análises da atividade antiradicalar e capacidade redutora dos extratos aquosos obtidos das folhas de 10 castas de videira (n = 3; média ± desvio padrão).

	Castas	DPPH (EC₅₀)¹	ABTS (EC₅₀)¹	PR (EC₅₀)²	CRT (mg AG g⁻¹)
Branças	Códega do Larinho	0,161 ± 0,026 ^a	0,297 ± 0,046 ^{a,b}	0,385 ± 0,034 ^a	90,6 ± 15,3 ^a
	Fernão Pires	0,178 ± 0,030 ^a	0,304 ± 0,039 ^{a,b}	0,413 ± 0,031 ^{a,b}	102 ± 25,1 ^a
	Gouveio	0,214 ± 0,038 ^a	0,345 ± 0,017 ^{a,b}	0,506 ± 0,040 ^{b,c}	79,5 ± 9,08 ^a
	Malvasia Fina	0,163 ± 0,021 ^a	0,258 ± 0,013 ^a	0,371 ± 0,024 ^a	113 ± 15,7 ^a
	Rabigato	0,133 ± 0,021 ^a	0,284 ± 0,031 ^{a,b}	0,385 ± 0,049 ^a	107 ± 6,42 ^a
	Viosinho	0,203 ± 0,025 ^a	0,380 ± 0,021 ^{a,b}	0,467 ± 0,023 ^{a,c}	81,9 ± 14,9 ^a
Tintas	Tinta Amarela	0,196 ± 0,020 ^a	0,342 ± 0,047 ^{a,b}	0,420 ± 0,028 ^{a,c}	92,5 ± 11,3 ^a
	Tinta Roriz	0,234 ± 0,007 ^a	0,376 ± 0,045 ^{a,b}	0,481 ± 0,024 ^{a,c}	82,1 ± 16,5 ^a
	Touriga Franca	0,219 ± 0,042 ^a	0,402 ± 0,042 ^b	0,534 ± 0,066 ^c	68,6 ± 7,87 ^a
	Touriga Nacional	0,203 ± 0,022 ^a	0,328 ± 0,055 ^{a,b}	0,427 ± 0,027 ^{a,c}	91,5 ± 15,2 ^a
	Valor de P	0,254**	0,010*	< 0,001*	0,076*

¹ EC₅₀ (mg mL⁻¹): Concentração efetiva capaz de inibir 50% dos radicais livres; ² EC₅₀ (mg mL⁻¹): Concentração efetiva cuja absorvência a 700 nm é 0,5;

* $P > 0,05$ através do teste de Levene. Os valores de P são aqueles obtivos através da análise de variâncias univariada (one-way ANOVA). As médias foram comparadas usando o teste de Tukey pois uma igualdade de variâncias pôde ser assumida. ** $P < 0,05$ através do teste de Levene. Os valores de P são aqueles obtivos através da análise de variâncias univariada (one-way ANOVA) com correção de Welch. As médias foram comparadas usando o teste de Dunnett T3 pois uma igualdade de variâncias não pôde ser assumida. ^{a-c} Para cada método estudado, dentro de uma mesma coluna, valores médios com letras diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$).

Para todos os métodos de atividade antioxidante (DPPH, ABTS e poder redutor), verificou-se uma relação direta entre a concentração de extrato testada e o potencial antioxidante observado, de acordo com o exposto na Figura 12.

De acordo com a Figura 12, é visível imediatamente algumas diferenças nos potenciais antioxidantes das castas em estudo. No entanto, na análise de DPPH, não houve diferenças significativas entre as amostras ($P = 0,254$). Os valores de EC₅₀ variaram entre 0,161 e 0,234 mg mL⁻¹, respetivamente nas castas Côdega do Larinho e Tinta Roriz. Na generalidade observou-se que as castas brancas necessitam de uma menor concentração de extrato para promover 50% de inibição dos radicais livres de DPPH (Tabela 2), o que indica uma maior atividade antioxidante.

Na análise de ABTS, verificou-se que as amostras apresentaram-se estatisticamente diferentes ($P = 0,010$), das quais a Malvasia Fina e a Touriga Franca foram as castas com menor (0,258 mg mL⁻¹) e maior (0,402 mg mL⁻¹) EC₅₀, respetivamente, e as responsáveis pela diferença analisada. Quando avaliado o poder redutor de cada casta, notou-se significância entre as amostras ($P < 0,001$). A casta Touriga Franca foi a casta tinta que se diferenciou de todas as outras variedades analisadas, apresentando elevado valor de concentração que promove 50% de inibição (0,534 mg

mL⁻¹), enquanto mais uma vez a casta Malvasia Fina foi a que apresentou maior atividade antioxidante com um EC₅₀ de 0,371 mg mL⁻¹ (Tabela 2).

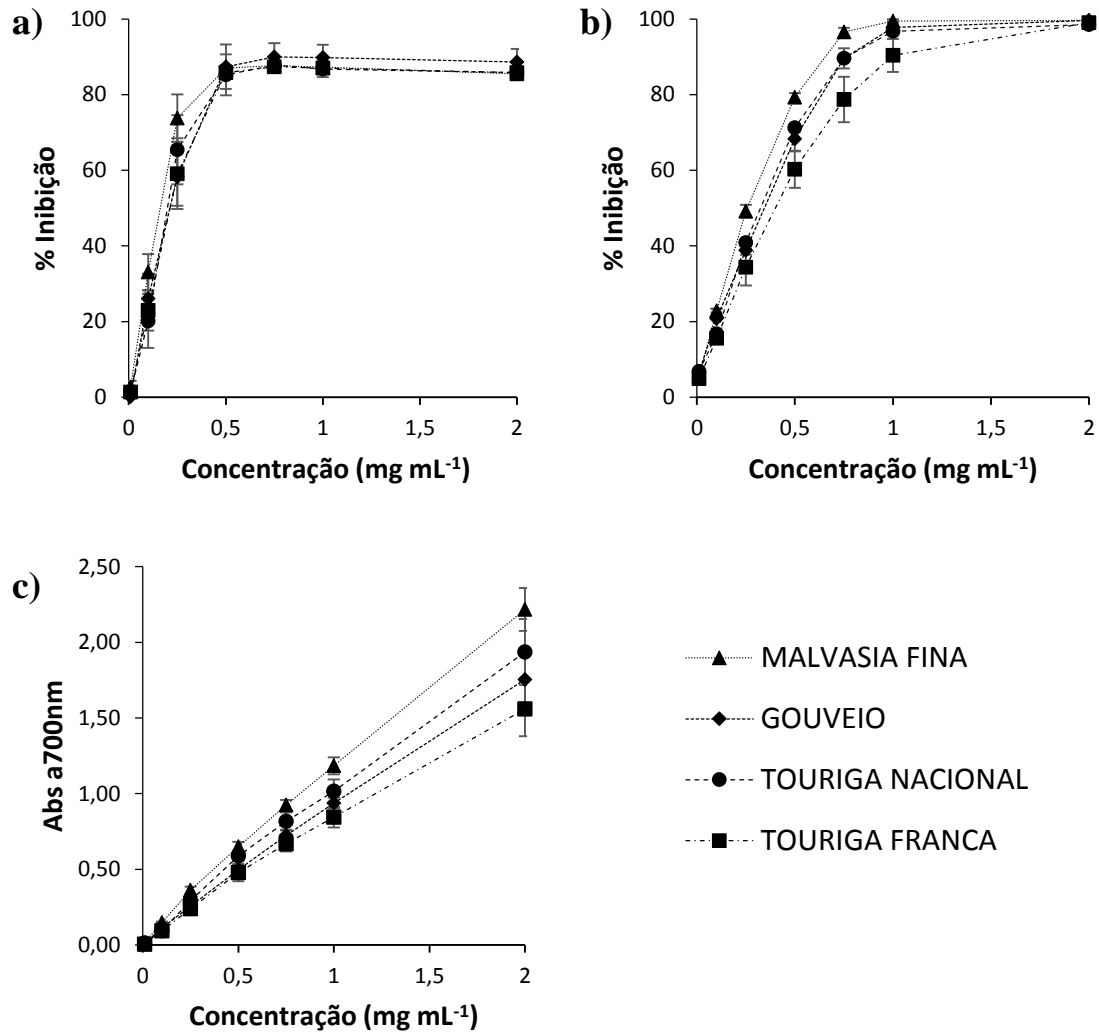


Figura 12 – Relação entre a concentração de extrato testada e a atividade antioxidante para os métodos DPPH (a), ABTS (b) e poder redutor (c) em duas castas brancas (Gouveio e Malvasia Fina) e duas castas tintas (Touriga Nacional e Touriga Franca) (n = 3; média ± desvio padrão).

Na CRT também não se verificaram diferenças significativas entre os extratos aquosos das 10 castas ($P = 0,076$). No entanto, a casta Malvasia Fina apresentou maior CRT, com 112,8 mg AG g⁻¹, enquanto a casta Touriga Franca apresentou menor CRT com 68,6 mg AG g⁻¹ (Tabela 2).

Os resultados obtidos na atividade antioxidante, nomeadamente nos valores de EC₅₀ do DPPH e poder redutor estão em consonância com os resultados obtidos em outras castas Portuguesas avaliadas através do mesmo tipo de extração (Fernandes et al.,

2013). No entanto os resultados obtidos na CRT foram abaixo do obtido por Fernandes et al. (2013), mesmo comparando as mesmas castas. Vários fatores poderão explicar esta diferença, como fatores edafoclimáticos, práticas culturais, origem geográfica e época de colheita (Katalinić et al., 2009). Na generalidade, os nossos resultados demonstraram que as castas brancas estudadas têm uma maior atividade antioxidante relativamente às tintas, observação também constatada por Fernandes et al. (2013).

Neste estudo preliminar, com vista a selecionar as castas com maior potencial bioativo para processamento alimentar, tomou-se em consideração, além da atividade antioxidante, a composição em componentes bioativos, como os compostos fenólicos.

4.1.3. Diferentes grupos fenólicos

A metodologia para diferentes grupos fenólicos, permite obter resultados, a partir do extrato aquoso, dos fenóis totais e alguns dos seus diferentes grupos, nomeadamente derivados do ácido hidroxicinâmico e flavonóis. As proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos são compostos que podem acarretar em alteração na absorção UV do espectro e estimar resultados na presença de substâncias não fenólicas (Boulanouar et al., 2013). Para a estimativa, o valor da somatória dos grupos analisados não pode ser superior ao valor obtido dos fenóis totais, o que foi verdadeiro para todas as amostras submetidas à análise. Deste modo, nas folhas das 10 castas de videira, avaliou-se o teor nestes compostos para ajudar na seleção das castas candidatas a processamento alimentar.

De modo a expressar os resultados obtidos, a Figura 13 ilustra todas as castas analisadas. Pode-se observar que não houve diferenças significativas para os valores de fenóis totais ($P = 0,210$), tal como já se tinha verificado para a capacidade redutora total (Tabela 2).

O teor em fenóis totais variou entre 114-115 mg AG g⁻¹ nas castas Gouveio e Touriga Franca, e 145 mg AG g⁻¹ na casta Malvasia Fina (Figura 13). No que respeita ao teor em flavonóis, as castas Malvasia Fina, Rabigato e Touriga Nacional foram as que apresentaram semelhança quando comparadas as demais apresentando uma diferença significativa ($P = 0,002$). Estas foram as castas que mostraram conter maior teor neste grupo fenólico. A variação dos derivados do ácido hidroxicinâmico mostrou-se ser também significativa ($P = 0,027$), apenas diferindo as castas brancas Gouveio, com teor reduzido desse grupo, enquanto as castas Malvasia Fina e Viosinho reportaram

valores mais elevados destes compostos. Todas as outras amostras se mostraram semelhantes e próximas umas das outras.

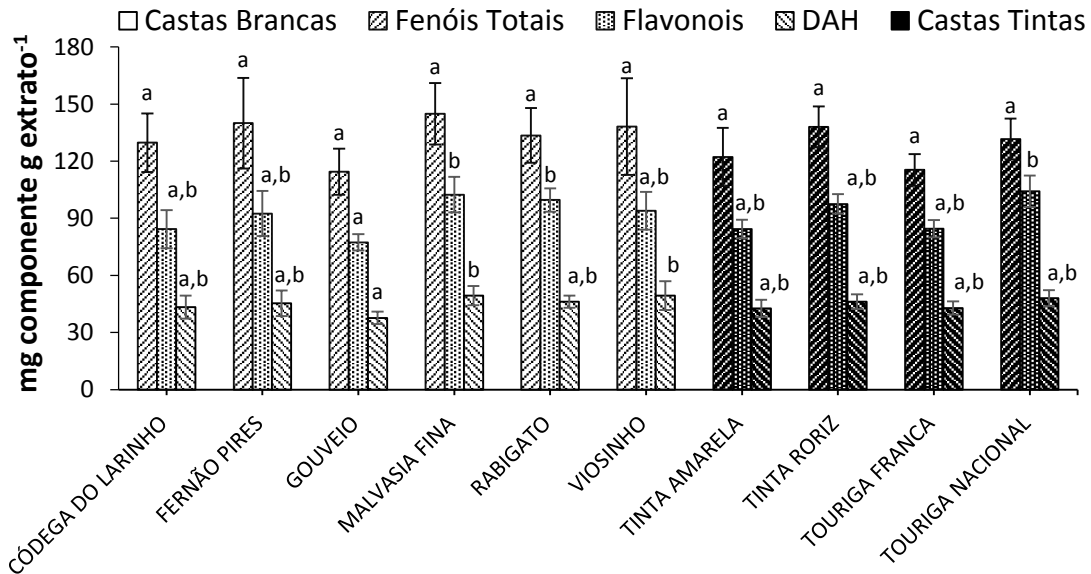


Figura 13 – Composição em fenóis totais (mg AG g extrato⁻¹), flavonóis (mg Q g extrato⁻¹) e derivados do ácido hidroxicinâmico (DAH) (mg AC g extrato⁻¹) nos extratos aquosos das folhas das 10 castas de videira (n = 3; média ± desvio padrão). Dentro de cada componente estudado, valores médios com letras diferentes, diferem significativamente ($P < 0,05$).

Os nossos valores de fenóis totais estão acima daqueles reportados por Fernandes et al. (2013), onde avaliou o perfil fenólico de folhas de videira de castas brancas e tintas por cromatografia líquida. Estes autores verificaram valores entre os 15 e os 68 mg de fenóis totais por g de extrato (Fernandes et al., 2013), onde os compostos maioritários eram a soma da quercetina-3-*O*-glucósido e quercetina-3-*O*-galactósido.

Através da avaliação destes grupos de compostos bioativos, juntamente com os dados obtidos na atividade antioxidante, verificamos correlações significativas. Quando avaliada a correlação entre os valores de fenóis totais obtidos e a análise de DPPH não houve correlação significativa ($R^2 = 0,023$; $P = 0,422$; $y = -246,3x + 165,5$). Tal facto já tinha sido constatado por Fernandes et al. (2013). No entanto, quando analisado a correlação com as análises de ABTS e poder redutor, houve uma correlação muito significativa ($R^2 = 0,271$; $P = 0,003$; $y = -143,7x + 178,4$ e $R^2 = 0,290$; $P = 0,002$; $y = -135,6x + 190,3$ respetivamente), mostrando que os fenóis poderão ser responsáveis por parte da atividade antioxidante nas folhas. Deste modo, conforme diminuição do teor

em fenóis totais, maior será a necessidade de extrato para atingir o EC₅₀ nas análises com correlação significativa, o que implica uma menor atividade antioxidante.

Com base nos resultados obtidos na atividade antioxidante e no teor em compostos bioativos, nomeadamente fenóis, verificou-se de uma maneira geral que as castas brancas possuem um maior potencial antioxidante e um maior teor em compostos bioativos. À partida, esta constatação além de estar relacionada com o maior teor em fenóis presente nas castas brancas poderá ser devida à composição em outros componentes como flavonóis (apigenina, epicatequina, quercetina, quercetina-4'-O-glucósido, rutina) e estilbenos (astringina), em folhas colhidas em agosto e setembro (Katalinic et al., 2013). Balík et al. (2008) também mostraram que as folhas das castas brancas são as dominantes em trans-resveratrol, trans-piceid (derivado do resveratrol) e no ácido caftárico, quando comparados às castas tintas.

Esta diferenciação entre castas brancas e tintas também foi observada quando os dados obtidos foram usados numa Análise de Componentes Principais (ACP) (Figura 14).

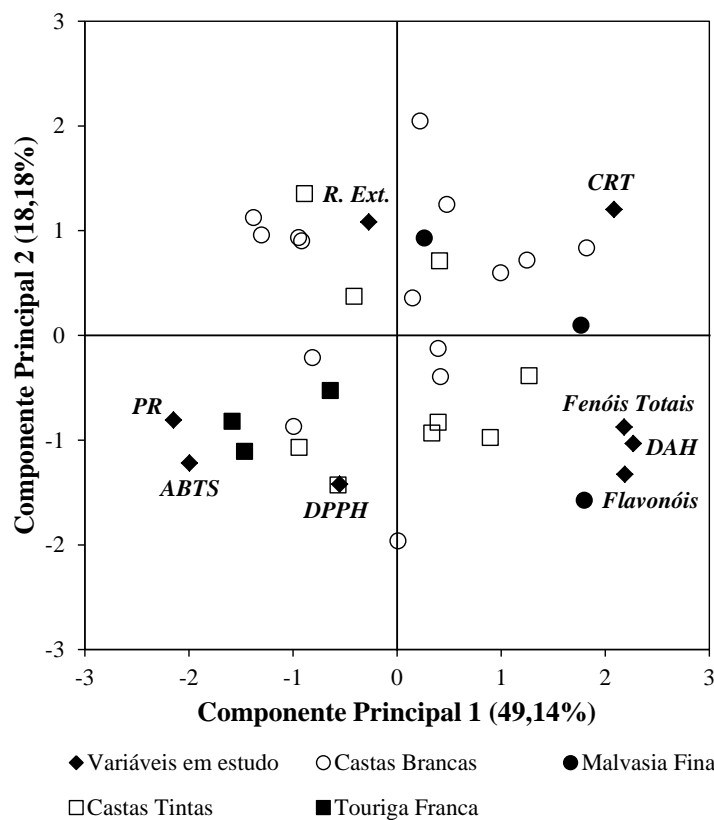


Figura 14 – Análise de Componentes Principais obtida a partir dos dados da atividade antioxidante e composição em compostos bioativos de folhas de videira de 10 castas diferentes. As componentes principais explicam 67,32% da variância total dos dados.

Na ACP, na generalidade é visível a formação de dois grupos, divididos em castas brancas e castas tintas. Dentro de cada tipo de casta, há uma casta que se evidencia, devido à sua atividade antioxidante e composição em compostos bioativos. Na região positiva da componente principal 1 está representada a casta Malvasia Fina (casta branca) uma vez que apresentou elevados teores de fenóis totais, derivados do ácido hidroxicinâmico e flavonóis. No extremo oposto está representada a casta Touriga Franca, que apresentou na generalidade valores mais elevados de EC_{50} principalmente no ABTS e poder redutor. Isto implica que esta casta foi a que apresentou menor atividade antioxidante e está representada no extremo oposto da casta Malvasia Fina, porque também apresenta o menor valor médio de fenóis totais, derivados do ácido hidroxicinâmico e flavonóis.

Através da interpretação dos dados obtidos na atividade antioxidante e da composição em compostos bioativos, juntamente com a interpretação dos dados obtidos na ACP, chegamos à seleção de duas castas candidatas a processamento alimentar. A casta Malvasia Fina (casta branca) foi selecionada como potencialmente a melhor casta do ponto de vista bioativo, enquanto a casta Touriga Franca também foi selecionada, visto ter revelado valores menos apreciáveis dos mesmos parâmetros, sendo usada como termo de comparação.

4.2. PROCESSAMENTO ALIMENTAR

Após avaliação da atividade antioxidante e da composição em compostos bioativos de folhas de 10 castas de videira, as castas Malvasia Fina e Touriga Franca foram selecionadas. Ambas as castas foram de novo avaliadas em fresco, e submetidas a tratamento térmico (branqueamento, cozidas em panela de pressão durante 60, 75 e 90 minutos).

4.2.1. Determinação da cor

A cor é um dos parâmetros mais envolvidos com a escolha de um produto pelo consumidor, é a partir dela que se gera a primeira impressão sobre a integridade daquilo que se está a comprar (Spence et al., 2010). Desta forma avaliou-se a cor das faces adaxial e abaxial das folhas das duas castas submetidas aos diferentes processamentos térmicos.

Na Tabela 3 são apresentados os valores dos eixos principais do CIELAB, L*, a* e b* obtidos dos diferentes tratamentos com as folhas de videira. Para as duas variedades, notou-se forte impacto no que diz a redução da coloração verde, analisada pelo parâmetro a*.

Tabela 3 – Colorimetria das faces adaxial e abaxial das folhas de videira das castas Malvasia Fina e Touriga Franca antes e após cozimento (n = 3; média ± desvio padrão).

Amostra	Colorimetria face adaxial			Colorimetria face abaxial		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
MFF	40,1 ± 1,50 ^{a,A}	-14,6 ± 1,41 ^{a,A}	21,6 ± 3,06 ^{a,A}	53,3 ± 2,65 ^{c,A}	-12,8 ± 1,73 ^{a,A}	25,7 ± 3,38 ^{b,A}
MFB	44,2 ± 1,49 ^{c,A}	-5,20 ± 1,61 ^{b,A}	25,4 ± 3,05 ^{b,B}	51,1 ± 3,13 ^{b,c,A}	-6,11 ± 1,93 ^{b,A}	26,1 ± 4,62 ^{a,b,A}
MFC1	41,9 ± 1,77 ^{b,A}	1,78 ± 0,25 ^{c,A}	22,2 ± 2,57 ^{a-b,A}	44,8 ± 1,43 ^{a,A}	0,62 ± 0,37 ^{c,d,A}	24,4 ± 1,78 ^{b,B}
MFC2	42,4 ± 1,43 ^{b,c,A}	2,16 ± 0,23 ^{d,B}	23,7 ± 2,65 ^{a-b,B}	45,9 ± 1,98 ^{a,b,A}	0,84 ± 0,38 ^{d,B}	24,5 ± 2,72 ^{b,B}
MFC3	41,9 ± 1,38 ^{b,B}	2,39 ± 0,21 ^{d,B}	23,6 ± 2,16 ^{a-b,B}	51,7 ± 1,30 ^{c,B}	0,36 ± 0,14 ^{c,A}	18,1 ± 1,45 ^{a,A}
Valor de P	< 0,001*	< 0,001**	0,050*	< 0,001**	< 0,001**	< 0,001**
TFF	40,7 ± 0,90 ^{a,A}	-14,1 ± 0,88 ^{a,A}	19,9 ± 1,49 ^{a,A}	53,2 ± 1,05 ^{d,A}	-12,9 ± 0,44 ^{a,A}	22,5 ± 0,99 ^{b,A}
TFB	44,4 ± 1,51 ^{c,A}	-4,62 ± 1,86 ^{b,A}	21,0 ± 1,71 ^{a-b,A}	48,8 ± 2,03 ^{c,A}	-5,66 ± 1,83 ^{b,A}	25,1 ± 1,98 ^{c,A}
TFC1	42,8 ± 1,86 ^{b,A}	1,83 ± 0,27 ^{c,A}	23,0 ± 2,72 ^{b,A}	47,5 ± 2,02 ^{b,c,B}	0,41 ± 0,21 ^{c,A}	21,3 ± 2,31 ^{a,b,A}
TFC2	41,8 ± 1,22 ^{a,b,A}	1,87 ± 0,31 ^{c,A}	21,2 ± 2,01 ^{a-b,A}	46,0 ± 1,92 ^{a,b,A}	0,45 ± 0,33 ^{c,A}	21,5 ± 2,98 ^{a,b,A}
TFC3	40,4 ± 1,54 ^{a,A}	1,96 ± 0,28 ^{c,A}	19,8 ± 2,34 ^{a,A}	44,7 ± 1,84 ^{a,A}	0,61 ± 0,24 ^{c,B}	19,5 ± 2,36 ^{a,A}
Valor de P	< 0,001*	< 0,001**	0,003*	< 0,001**	< 0,001*	< 0,001**

* $P > 0,05$ através do teste de Levene. Os valores de P são aqueles obtivos através da análise de variâncias univariada (one-way ANOVA). As médias foram comparadas usando o teste de Tukey pois uma igualdade de variâncias pôde ser assumida; ** $P < 0,05$ através do teste de Levene. Os valores de P são aqueles obtivos através da análise de variâncias univariada (one-way ANOVA) com correção de Welch. As médias foram comparadas usando o teste de Dunnett T3 pois uma igualdade de variâncias não pôde ser assumida; ^{a-d} Para cada parâmetro analisado, dentro de uma mesma coluna e na mesma variedade, valores médios com letras diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$); ^{A-B} Para cada parâmetro analisado, dentro de uma mesma coluna e entre as variedades, valores médios com letras diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$).

O parâmetro L*, responsável pela luminosidade em uma escala que varia de 0 a 100 (preto a branco), variou de forma irregular em todas as amostras. Na colorimetria da face adaxial, notou-se que o estado branqueado das folhas foi aquele responsável pelo maior valor da luminosidade, com valores de 44,17 e 44,44 respetivamente para MFB e TFB. Quando visualizado entre as castas, pode-se notar uma diferença significativa ($P = 0,042$) entre MFC3 e TFC3.

A partir da coloração da face abaxial, a luminosidade apresentou os maiores valores para o estado fresco, sendo eles 53,31 para MFF e 53,18 para TFF. As únicas amostras significativas entre si ($P < 0,001$ em ambas), quando comparadas entre as variedades, foram MFC1 (44,85) e TFC1 (47,53) e MFC3 (51,72) e TFC3 (44,67). Em uma vista geral, todos os valores foram menores aos apresentados na conformação fresca das castas, o que é relativamente inverso na parte adaxial das folhas, onde se

obtiveram maiores resultados quando comparado às conformações fresca, em exceção a TFC3.

Houve uma correlação extremamente significativa para a parte adaxial de Malvasia Fina e Touriga Franca ($R^2 = 0,804$; $P < 0,001$; $y = -0,024x + 0,221$ e $R^2 = 0,895$; $P < 0,001$; $y = -0,033x + 0,203$, respetivamente) quando comparado o parâmetro a^* do método do CIELAB com as clorofilas totais, mostrando que quanto maior forem os valores obtidos em a^* , menor será o teor das clorofilas nas folhas, intensificando o fato de o aquecimento degradar estes compostos e modificar a coloração das folhas. Essa mesma correlação extremamente significativa é verificada na parte abaxial de Malvasia Fina e Touriga Franca ($R^2 = 0,804$; $P < 0,001$; $y = -0,029x + 0,186$ e $R^2 = 0,903$; $P < 0,001$; $y = -0,039x + 0,156$, respetivamente), provando fortemente que como um todo, a redução da coloração das folhas está ligado com a composição em clorofilas.

O aumento identificado, no estado branqueado das duas castas, no parâmetro b^* da parte abaxial das folhas, responsável pela coloração entre azul (valores negativos) a amarelo (valores positivos), se associa a degradação dos carotenoides, uma vez que os valores obtidos deste ultimo composto acompanha os valores de b^* . Nota-se, a partida, pelo maior (26,09) e menor (18,11) valor de b^* , assim como para carotenoides (0,474 e 0,326 mg kg⁻¹), respetivamente para MFB e MFC3. O mesmo fato repete-se para Touriga Franca, com valores de b^* de 25,10 a 19,48 e carotenoides de 0,486 e 0,306 mg kg⁻¹ para TFB e TFC3, respetivamente. A discussão sobre esse aumento da disponibilidade dos carotenoides e posterior diminuição com os tratamentos térmicos pode ser mais bem entendida na secção 4.2.5.

A redução dos valores responsáveis pela coloração verde é acompanhada de uma forte alteração na coloração das folhas (Figura 15), ao qual a conversão das clorofilas em feofitinas, pigmentos amarelados, são as responsáveis (Weemaes et al., 1999). Sat et al. (2002) realizaram estudos com folhas de videira para produção de comida enlatada, avaliando vários tipos de branqueamento, que quando comparado ao mesmo tipo de processo realizado no presente trabalho, também promove redução brusca nos valores de a^* e um ligeiro aumento do parâmetro b^* .

A confirmação das mudanças na cor das folhas pode ser visualizada a partir do parâmetro ΔE (Figura 15a), que dá as diferenças de cor baseado em um controle, no qual foram as folhas de videira frescas. Os valores de ΔE para as faces adaxial e abaxial das folhas aumentam significativamente ($P < 0,001$) nas duas castas. Isso mostra que

com qualquer processamento térmico excessivo, causa uma degradação da coloração inicial das folhas.

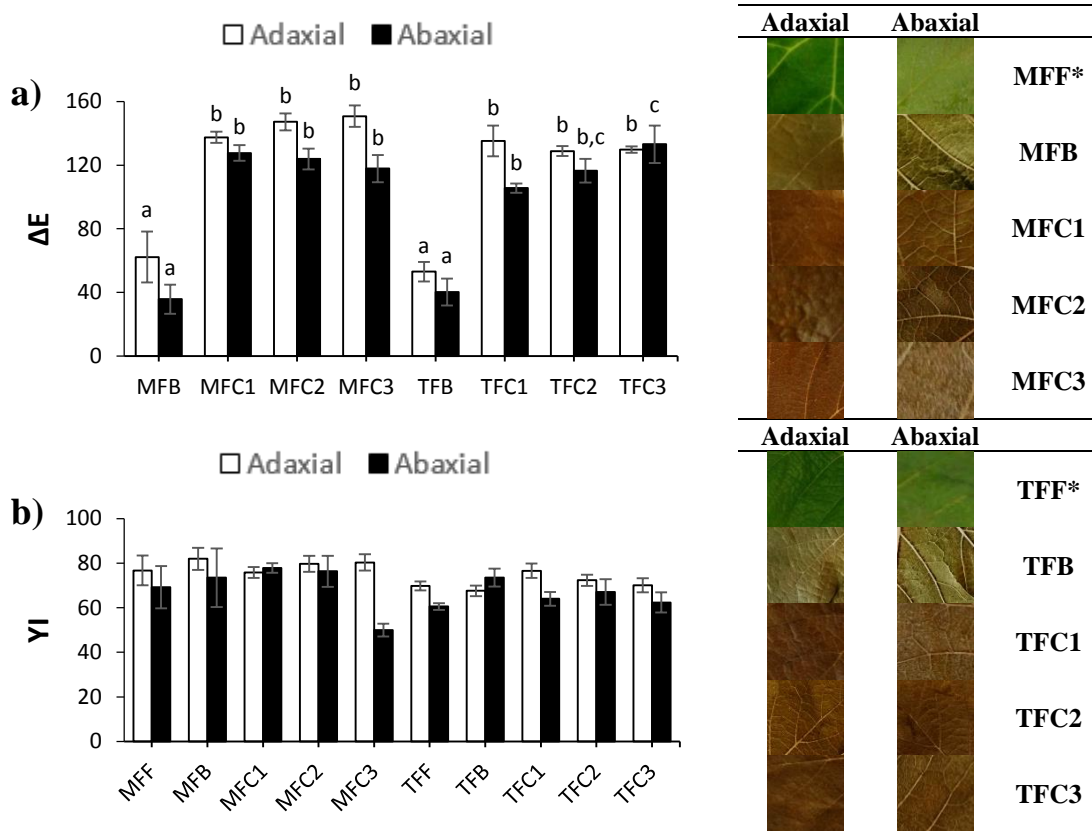


Figura 15 – Diferenças de cor (ΔE) (a) e índice de amarelidade (YI) (b) entre os tratamentos térmicos aplicados nas folhas de videira ($n = 3$; média \pm desvio padrão). Entre os tratamentos, na mesma variedade, valores médios com letras minúsculas diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$).

A partir da Figura 15 é possível analisar o índice de amarelidade (YI) dos diferentes tipos de tratamento das folhas. Para a face adaxial da Malvasia Fina, não houve valores estatisticamente diferentes ($P = 0,310$), estes variando de 75,86 (MFC1) a 81,98 (MFB). Quando analisado a mesma parte para a Touriga Franca, os dados obtidos foram significativamente diferentes ($P = 0,002$), e TFC1 foi a conformação que apresentou maior destaque neste parâmetro (YI = 76,60) contrariamente à TFB (YI = 67,61). Este fato comprova o fato de que após o branqueamento, as folhas apresentam um índice de amarelidade superior às conformações anteriores. Os índices de amarelidade da face abaxial das folhas mostraram comportamento estatisticamente diferente nas castas Malvasia Fina ($P < 0,001$), que variaram entre 50,01 (MFC3) a 77,82 (MFC1), e Touriga Franca ($P = 0,002$), com valores mínimos e máximos de 62,37 no C3 e 73,50 no estado B, respetivamente. Na análise da conformação entre as castas,

nota-se que somente MFC1 (75,86) quando comparada a TFC1 (76,60) e MFC3 (80,34) comparada a TFC3 (70,06) são significativamente diferentes ($P < 0,001$ e $P = 0,002$, respectivamente). A coloração amarelada se ressalta na Malvasia Fina no C1, frente a casta Touriga Franca. No C3 essa relação se torna inversa, onde Touriga Franca passa a apresentar os maiores valores nesse parâmetro. Na Figura 15, a imagem de MFC3 deixa claro a atribuição desta diferença e dos valores baixos quando comparados entre e na mesma variedade, pois apresentam coloração mais esbranquiçada frente a todas as outras amostras.

O ocorrido em nosso trabalho foi observado por Kirca et al. (2006) que armazenaram folhas de videira, a temperatura de 20 °C, em diferentes tempos para avaliar a evolução da cor e das clorofilas, e os resultados do estudo mostraram uma excelente correlação de a^* com a concentração de clorofilas. De fato, essa perda da clorofila promove a modificação da cor de verde intenso a um castanho esverdeado.

4.2.2. Rendimento da extração

Para as folhas de videira colhidas em setembro, os rendimentos da extração (Figura 16), no seu estado fresco, apresentaram-se maiores quando comparados à extração da secção 4.1.1. Este resultado já era esperado, quando relacionado com os extratos das folhas colhidas em julho, uma vez que enquanto o metabolismo secundário da videira permanece ativo, ela continuará produzindo alguns constituintes, principalmente compostos bioativos, como é o caso da existência de condições de stress. Katalinić et al. (2009) mostraram que as folhas de videira colhidas em setembro são potencialmente mais ricas em compostos fenólicos quando comparado àquelas colhidas em maio.

Em exceção ao cozimento 3 (C3), todas as outras amostras não apresentaram diferenças estatísticas entre si em cada tratamento estudado. A utilização de folhas com tamanhos não uniformes pode ter sido responsável pela diferença encontrada entre as castas no estado C3. O longo período de permanência das folhas nas videiras, promove um maior stress e morte celular, diminuindo assim a disponibilidade de folhas saudáveis e conseqüentemente uniformes para os estudos.

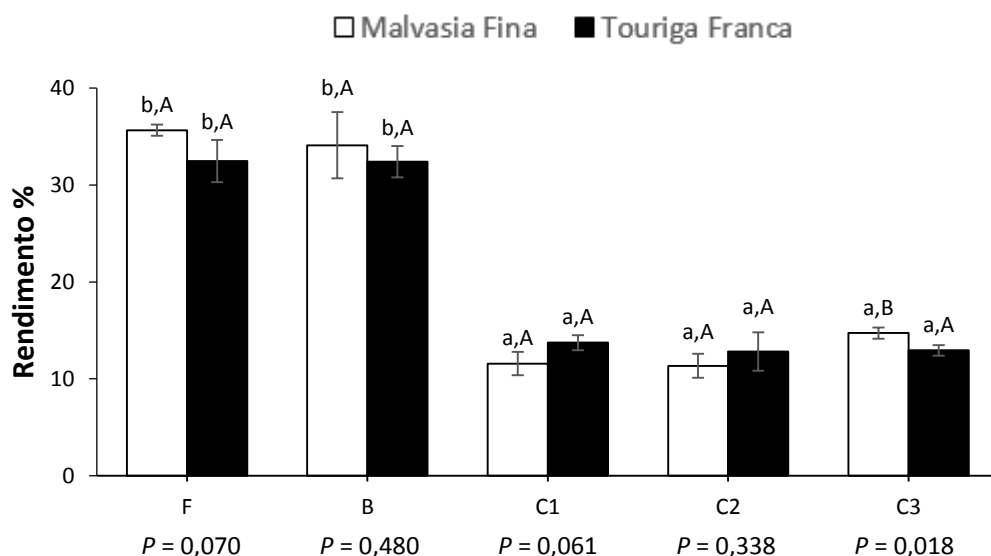


Figura 16 – Rendimentos dos extratos aquosos entre os tratamentos utilizados com as folhas de videira ($n = 3$; média \pm desvio padrão). Entre os tratamentos, na mesma variedade, valores médios com letras minúsculas diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$). Entre as variedades, no mesmo tratamento, valores médios com letras maiúsculas diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$).

Quando comparados os diferentes tipos de tratamentos das castas, os rendimentos de extração mostraram ser estatisticamente diferentes, Malvasia Fina ($P < 0,001$) e Touriga Franca ($P < 0,001$). Houve variações entre 35,65% e 11,35% para os extratos de MFF e MFC2, respetivamente. É visível que os diferentes tratamentos térmicos promovem redução nas percentagens de rendimento das extrações, tal fato está associado com a sensibilidade térmica e a solubilidade em água que muitos compostos têm (Kotovicz & Zanoelo, 2013), sendo perdidos na água de cozedura.

4.2.3. Atividade antioxidante

Visto a importância da atividade antiradicalar e composição bioativa das folhas de videira (secção 4.1.2), realizou-se o mesmo procedimento para assim avaliar a influência dos tratamentos realizados frente a essa composição e consequente atividade.

Na Figura 17 estão apresentados para as castas Malvasia Fina (Figura 17a) e Touriga Franca (Figura 17b) os valores obtidos nas análises de DPPH, ABTS e poder redutor, expressos em EC_{50} . Visivelmente nota-se um grande aumento do valor de EC_{50} para o estado C3 quando comparado à conformação das folhas frescas.

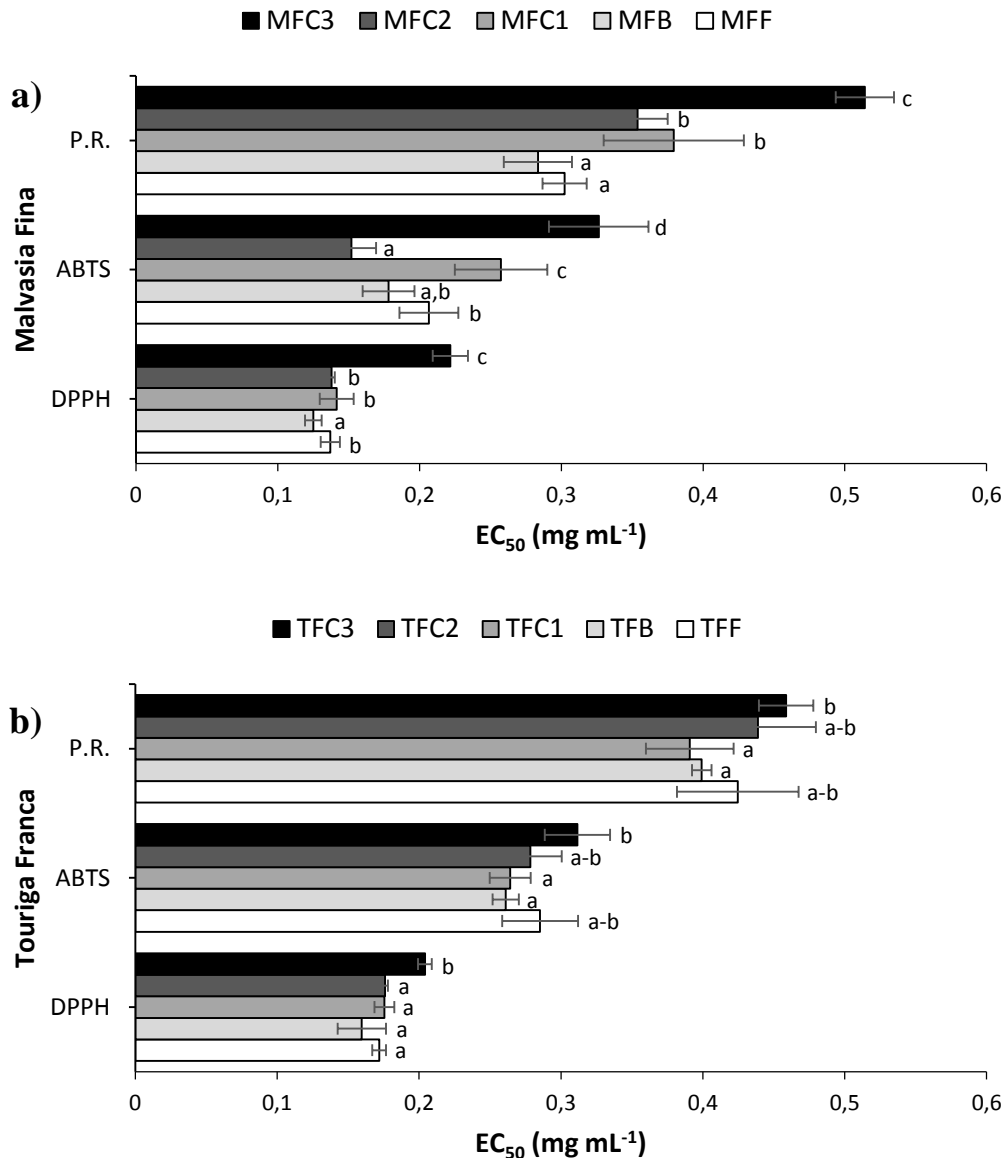


Figura 17 – Valores de EC_{50} das análises de DPPH*, ABTS* e poder redutor (P.R.)** para as folhas de videira das castas Malvasia Fina (a) e Touriga Franca (b) ($n = 3$; média \pm desvio padrão). Para cada componente estudado, dentro de uma mesma análise, valores médios com letras diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$). * EC_{50} (mg mL⁻¹): Concentração efetiva capaz de inibir 50% dos radicais livres; ** EC_{50} (mg mL⁻¹): Concentração efetiva cuja absorvência a 700 nm é 0,5.

Relativamente em avaliação direta da Figura 17b, observa-se que os valores de EC_{50} na casta tinta, permanecem superiores aos valores obtidos na casta branca. Isso mostra que mesmo com uma evolução das folhas de videira no campo, entre o mês de julho a setembro, estas não alteraram sua atividade antioxidante de modo a torná-las superior às variedades brancas.

A variação entre os valores de EC_{50} para os diferentes tratamentos em que foi submetida a casta tinta, se mostraram mais estáveis quando comparados à casta branca. Isto pode ser um ponto característico interessante desta casta apesar de necessitar valores relativamente maiores de concentração de extrato do que os expostos na casta branca. Nas Figuras 18, 19 e 20 consegue-se observar uma maior linearidade e uniformidade dos resultados obtidos para a Touriga Franca.

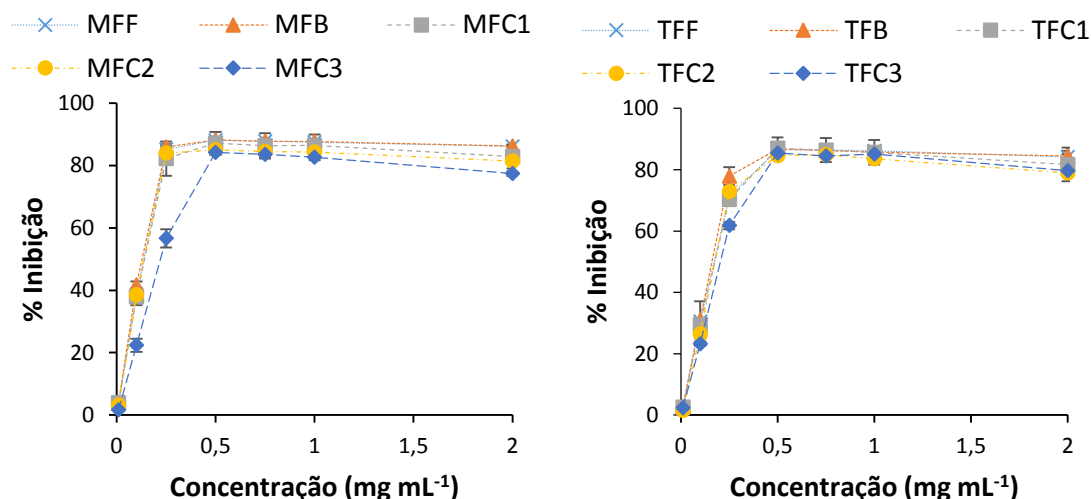


Figura 18 – Relação entre a concentração de extrato testada e a atividade antioxidante para o método DPPH para as duas castas estudadas ($n = 3$; média \pm desvio padrão).

Dentro da Malvasia Fina, para a análise de DPPH e para o poder redutor (Figura 20), o estado branqueado das folhas apresentou um menor valor de EC_{50} quando visto aos restantes tratamentos. Este fato leva a consideração de que uma menor concentração do extrato aquoso das folhas branqueadas, a partir dessas metodologias, é eficaz para inibir radicais livres.

Na análise de DPPH para Malvasia Fina, houve diferenças estatísticas significativas ($P < 0,001$) entre as amostras. O valor mínimo de EC_{50} foi registado para MFB ($0,125 \text{ mg mL}^{-1}$) enquanto o máximo foi para MFC3 ($0,222 \text{ mg mL}^{-1}$). Uma visão superficial, a partir da Figura 17, mostra que mesmo com diferentes tratamentos térmicos, a folha de videira mantém valores de concentração de extrato para promover 50% de inibição dos radicais livres relativamente baixas, indicando uma alta atividade antioxidante mesmo sendo submetida a um tratamento térmico excessivo.

A atividade antiradicalar a partir da análise de DPPH é significativamente diferente para as amostras de Touriga Franca ($P < 0,001$), onde a TFC3 ($0,204 \text{ mg mL}^{-1}$)

¹⁾ é aquela que necessita de maior concentração efetiva que seja capaz de inibir 50% dos radicais livres do DPPH frente a TFB (0,175 mg mL⁻¹) com menor necessidade dessa concentração. A diferença entre os tratamentos é muito pequena, mostrando uma boa atividade antioxidante de todos os estados em que se submeteram as amostras.

Quando feito comparações entre as castas, nos mesmos tratamentos, os valores de DPPH variaram significativamente ($P < 0,001$) com maiores valores de EC₅₀ obtidos para a casta Touriga Franca, em exceção ao estado C3 da casta Malvasia Fina que mostrou uma maior diferença significativa ($P = 0,002$) à casta tinta, necessitando de uma maior concentração efetiva de extrato para promover 50% de inibição dos radicais livres de DPPH.

Na casta Touriga Franca, acompanhando o resultado da análise de DPPH, o método de ABTS (Figura 19) também mostrou diferenças significativas ($P < 0,001$) e apresentou uma variação nos valores de EC₅₀ entre 0,264 a 0,312 mg mL⁻¹, onde TFB e TFC3 foram aquelas responsáveis pelo menor e maior valor, respetivamente. Igualmente a análise de DPPH para Touriga Franca, é evidenciado a diferença mínima entre os valores obtidos como resultado, dando maior confiabilidade da atuação dos extratos no que diz respeito à capacidade antioxidante.

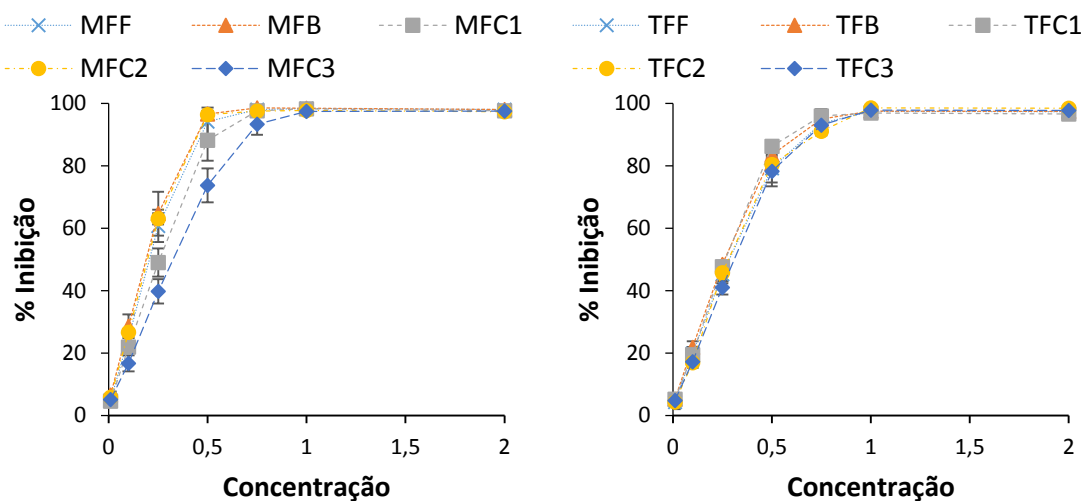


Figura 19 – Relação entre a concentração de extrato testada e a atividade antioxidante para o método ABTS para as duas castas estudadas (n = 3; média ± desvio padrão).

Com um grande destaque, a MFC2 foi o estado em que se destacou entre os diferentes cozimentos e entre as análises, com menores valores de EC₅₀. Para a análise de ABTS, esses valores, significativamente diferentes ($P < 0,001$), variaram entre 0,152

e $0,326 \text{ mg mL}^{-1}$ para MFC2 e MFC3, respetivamente. Do mesmo modo, MFB é um dos estados que se aproxima do valor mínimo obtido a partir do método de ABTS, mantendo assim uma ênfase em um geral das análises, como pode ser visto também a partir do poder redutor (Figura 20), que diferiu estatisticamente ($P < 0,001$) suas amostras e manteve a MFB como a variedade com menor EC_{50} ($0,283 \text{ mg mL}^{-1}$) contra o maior valor para MFC3 ($0,514 \text{ mg mL}^{-1}$).

Os valores obtidos da análise de ABTS mostraram que houveram diferenças significativas ($P < 0,001$) somente dentro dos tratamentos F, B e C2, entre as castas, onde Touriga Franca foi aquela que apresentou os maiores valores de EC_{50} . Entre os estados C1 e C3 não ocorreram diferenças consideradas estatisticamente significativas ($P = 0,580$ e $P = 0,305$, respetivamente). Estas diferenças mostram a boa atividade da casta Malvasia Fina para os métodos de DPPH e ABTS, pois mostra a necessidade de utilização de menores valores para concentração efetiva de extrato promover 50% de inibição dos radicais livres destes métodos.

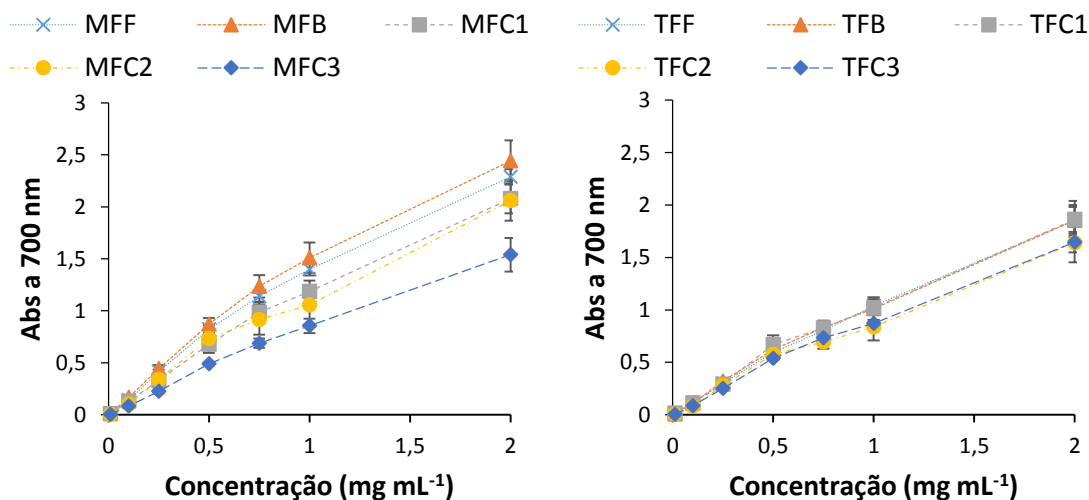


Figura 20 – Relação entre a concentração de extrato testada e a absorvência a 700 nm, indicadora do poder redutor das amostras ($n = 3$; média \pm desvio padrão).

O método de poder redutor, dentro das análises realizadas para a Touriga Franca, foi aquele que apresentou uma maior diferenciação dos valores médios para o EC_{50} , onde $0,391$ e $0,459 \text{ mg mL}^{-1}$ foram as variações do menor e maior valor para TFC1 e TFC3, respetivamente, mostrando que estatisticamente as amostras são diferentes entre si ($P < 0,001$). O menor valor obtido no tratamento C1 da casta Touriga Franca não mostrou uma diferença estatística ($P = 0,568$) no mesmo tratamento, entre as

castas. Todos os outros estados diferiram significativamente entre si ($P < 0,001$), onde apenas o C3 da Malvasia Fina apresentou maiores valores, estatisticamente diferentes, de EC_{50} frente à casta Touriga Franca. Visto a partir da análise de DPPH e poder redutor, nota-se que o tratamento C3 da casta Malvasia Fina pode resultar em uma forte redução da sua atividade antioxidante, conseguindo superar os baixos valores obtidos nessas análises para a mesma conformação de Touriga Franca.

Os resultados obtidos no estudo anterior (secção 4.1.2) mostraram que as castas colhidas em setembro, no propósito do processamento alimentar, tiveram valores de EC_{50} inferiores. Em primeira instância para a análise de DPPH, Malvasia Fina e Touriga Franca apresentaram valores de 0,163 e 0,219 mg mL⁻¹, respetivamente. No processamento alimentar, as mesmas castas, na sua forma fresca, obtiveram valores de EC_{50} de 0,137 e 0,172 mg mL⁻¹, nessa mesma ordem. Os resultados, em datas distintas, continuaram a confirmar uma maior atividade antioxidante da casta branca, frente à tinta, para a metodologia de DPPH. Em todos os tipos de processamento que a Touriga Franca foi submetida, os valores do EC_{50} foram inferiores àqueles obtidos nos extratos aquosos das folhas de videira colhidas no mês de julho, mostrando que o C3 (0,204 mg mL⁻¹) tem uma menor concentração de extrato para promover 50% de inibição dos radicais livres de DPPH frente a folha fresca do estudo anterior. Para a casta Malvasia Fina, o maior cozimento, C3, supera os valores obtidos nas folhas frescas do estudo anterior, apresentando valores de 0,222 mg mL⁻¹ frente a 0,163 mg mL⁻¹, nesta mesma ordem. Para MFC2, o valor de EC_{50} apresentado foi 0,138 mg mL⁻¹, relativamente menor ao extrato das folhas frescas do *estudo preliminar*.

Para as análises de ABTS e poder redutor, a TFC3 apresentou a mesma atividade referida acima, mostrando necessitar de menores valores de EC_{50} . MFC2 foi o único tratamento que conseguiu apresentar valores, para estas duas metodologias, inferiores aos EC_{50} obtidos anteriormente, contrariamente ao ocorrido com MFC3, que superaram os valores obtidos nos extratos aquosos das folhas frescas do estudo anterior.

Pela análise da CRT (Figura 21), a casta Malvasia Fina foi a única com valores inferiores àqueles estabelecidos nos estudos para seleção das castas a serem submetidas ao processamento alimentar. Como citado anteriormente (ver 4.1.2), a CRT pode traduzir os valores em concentrações não reais dos compostos fenólicos totais, o que levaria a uma subestimação sobre estes constituintes.

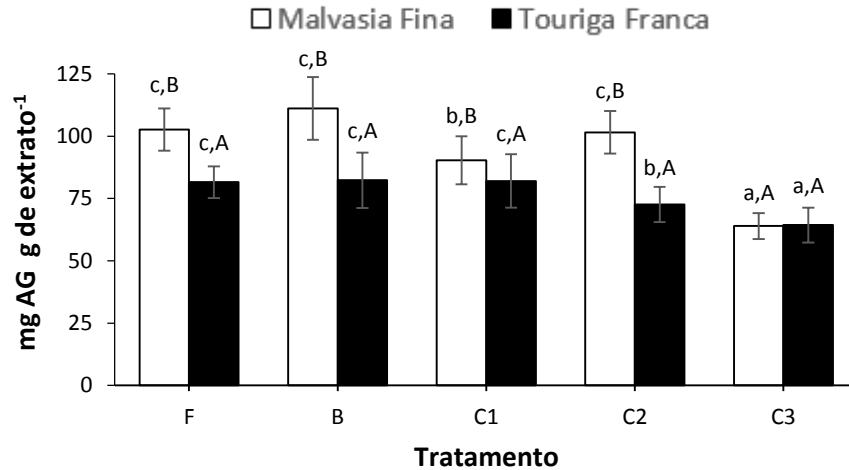


Figura 21 – Capacidade redutora total dos extratos aquosos das folhas de videira submetidas ao processamento alimentar ($n = 3$; média \pm desvio padrão). Entre tratamentos e na mesma variedade, valores médios com letras minúsculas diferem significativamente ($P < 0,05$). Entre as variedades, no mesmo tratamento, valores médios com letras maiúsculas diferem significativamente ($P < 0,05$).

A persistência da MFC2 como o destaque entre os diferentes tipos de cozimentos, na análise da CRT, faz concordância com os valores obtidos nas outras metodologias. A casta Malvasia Fina apresentou diferenças estatísticas ($P < 0,001$) entre os tratamentos avaliados, destacando MFB como o estado com elevado teor de CRT (111,1 mg AG g de extrato⁻¹) e MFC3 a menor CRT (63,9 mg AG g de extrato⁻¹). A partir do gráfico, não é notável uma relação direta dos diferentes tratamentos, na Malvasia Fina, com uma possível redução dos teores do composto, o que não é semelhante para Touriga Franca. Os dados da Touriga Franca, na CRT, permitem visualizar de forma clara uma certa estabilidade e posterior redução dos compostos. A partir das diferenças significativas ($P < 0,001$) entre os tratamentos, pode-se confirmar que TFC3 é o estado em que se tem menor CRT (64,3 mg AG g de extrato⁻¹). TFB é o tratamento responsável pela maior concentração (82,3 mg AG g de extrato⁻¹). Avaliando o mesmo tratamento entre as castas, observa-se diferenças estatísticas ($P < 0,05$), com exceção do estado C3 que não se mostrou significativo ($P > 0,05$). No *estudo preliminar* a CRT realizada mostrou valores menores para Touriga Franca no seu estado fresco quando comparados aos dados obtidos do processamento alimentar. Em exceção a TFC3, todos os outros tratamentos resultaram em elevadas CRT para o método realizado, sendo superiores ao estudo anterior.

Todos os dados que mostraram uma maior atividade antioxidante e composição bioativa das folhas ficam condicionados à evolução dos compostos nas folhas que é maior no mês de setembro, como uma maior concentração dos compostos fenólicos, acompanhando assim uma maior atividade antioxidante das folhas colhidas nesta época (Katalinić et al., 2009).

Os bons resultados encontrados para MFC2, frente aos outros tipos de conformação desta mesma casta, podem ir de encontro ao estudado por Monagas et al. (2006), onde os autores falam sobre a disponibilidade dos compostos nas folhas de videira, das quais pode haver diferenças entre a coloração, lotes, ciclos vegetativos, tamanhos e outros que fariam a determinação dos constituintes da amostra apresentarem concentrações mais reduzidas ou mais elevadas numa mesma vinha.

Ismail et al. (2004), que trabalhou com vegetais folhosos verdes, relatou uma significativa diminuição da atividade antioxidante com o tratamento térmico. Essa redução vai de encontro ao apresentado em nosso trabalho. De um mesmo modo, os autores referidos verificaram uma perda considerável nos teores de fenóis nas folhas de couve, espinafre, e outras. Algumas atividades, tanto antioxidantes como pró-oxidantes podem estar relacionadas com o tipo do tratamento térmico e a variedade do vegetal (Arabshahi-Delouee & Urooj, 2007).

Alguns processamentos podem fazer com que melhore, ou não tenha diferenciação, o potencial antioxidante das frutas e legumes. Isso ocorre pela melhoria das propriedades antioxidantes ou a formação de novos compostos, como do grupo dos fenólicos ou até mesmo a partir de reações que formem compostos com atividade antioxidante natural, como os produtos da reação de Maillard a qual ocorre no processamento de alimentos que contêm proteínas e açúcares redutores (Turkmen et al., 2005).

4.2.4. Composição centesimal

A composição centesimal de produtos, no geral, é algo relativamente importante pois estabelece alguns parâmetros que o consumidor presa no momento da compra. As próprias indústrias estão utilizando uma série de sub produtos da videira para a formulação de suplementos dietéticos, pois estes produtos apresentam propriedades benéficas a partir dos compostos existentes, como os fenóis (Monagas et al., 2006).

A Tabela 4 mostra a composição centesimal, relativamente à percentagem em humidade, cinzas, proteína bruta, gordura e hidratos de carbono das folhas de videira nos diferentes tratamentos térmicos estudados e conseqüentemente o valor energético correspondente. É claramente observada uma maior humidade de todas as folhas nos diferentes tratamentos térmicos em que estas foram submetidas. Em geral, as folhas no estado fresco já apresentam elevados valores de humidade, não apresentando alguma diferença significativa ($P > 0,05$) nesta e em todos os tratamentos, quando vista entre as variedades.

Tabela 4 – Composição centesimal das folhas de videira de Malvasia Fina e Touriga Franca submetidas a diferentes tratamentos térmicos (n = 3; média ± desvio padrão).

Amostra	Humidade (%)	Cinzas (%)	Proteína bruta (%)	Gordura (%)	Hidratos de carbono (%)	Valor energético (kcal 100 g ⁻¹)
MFF	64,4 ± 0,70 ^{a,A}	1,84 ± 0,10 ^{b,c,A}	15,8 ± 0,26 ^{a,A}	4,59 ± 1,01 ^{a,A}	13,4 ± 1,84 ^{a,A}	158 ± 2,5 ^{b,A}
MFB	60,0 ± 4,56 ^{a-b,A}	2,17 ± 0,23 ^{c,A}	16,8 ± 0,29 ^{a,A}	4,54 ± 0,20 ^{a,A}	16,4 ± 4,07 ^{a,A}	174 ± 18,2 ^{a-b,A}
MFC1	75,9 ± 1,60 ^{b,A}	1,34 ± 0,07 ^{a,A}	22,3 ± 0,28 ^{b,c,A}	6,00 ± 0,13 ^{a,b,A}	tr.	143 ± 2,1 ^{a,A}
MFC2	74,7 ± 3,24 ^{a-b,A}	1,26 ± 0,12 ^{a,A}	23,0 ± 0,79 ^{c,A}	6,26 ± 0,42 ^{b,A}	tr.	148 ± 4,2 ^{a-b,A}
MFC3	70,8 ± 0,88 ^{b,A}	1,46 ± 0,04 ^{a,b,A}	20,8 ± 0,43 ^{b,A}	6,32 ± 0,16 ^{b,A}	tr.	140 ± 0,3 ^{a,A}
Valor de P	0,002**	< 0,001*	< 0,001*	0,008*	0,388*	0,006*
TFF	63,7 ± 1,93 ^{a,A}	2,13 ± 0,25 ^{b,A}	17,5 ± 0,74 ^{a,B}	5,00 ± 0,61 ^{a,A}	11,7 ± 1,70 ^{a,A}	162 ± 6,3 ^{a,A}
TFB	66,7 ± 2,17 ^{a,b,A}	1,79 ± 0,23 ^{a-b,A}	17,8 ± 0,12 ^{a,B}	5,34 ± 0,85 ^{a-b,A}	8,4 ± 1,61 ^{a,A}	153 ± 11,0 ^{a,A}
TFC1	76,8 ± 0,40 ^{b,A}	1,34 ± 0,07 ^{a,A}	22,7 ± 0,25 ^{b,A}	5,87 ± 0,21 ^{a-b,A}	tr.	144 ± 2,6 ^{a,A}
TFC2	73,5 ± 3,03 ^{b,A}	1,43 ± 0,21 ^{a,A}	21,6 ± 0,41 ^{b,A}	6,36 ± 0,44 ^{a-b,A}	tr.	144 ± 4,0 ^{a,A}
TFC3	73,8 ± 2,39 ^{b,A}	1,45 ± 0,20 ^{a,A}	22,3 ± 0,68 ^{b,A}	7,04 ± 0,37 ^{b,A}	tr.	153 ± 2,3 ^{a,B}
Valor de P	0,001*	0,016*	< 0,001*	0,025*	0,119*	0,073**

tr. – Traços; * $P > 0,05$ através do teste de Levene. Os valores de P são aqueles obtivos através da análise de variâncias univariada (one-way ANOVA). As médias foram comparadas usando o teste de Tukey pois uma igualdade de variâncias pôde ser assumida.; ** $P < 0,05$ através do teste de Levene. Os valores de P são aqueles obtivos através da análise de variâncias univariada (one-way ANOVA) com correção de Welch. As médias foram comparadas usando o teste de Dunnett T3 pois uma igualdade de variâncias não pôde ser assumida; ^{a-c} Para cada método analisado, dentro de uma mesma coluna e na mesma variedade, valores médios com letras diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$); ^{A-B} Para cada método analisado, dentro de uma mesma coluna e entre as variedades, valores médios com letras diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$).

O teor de humidade na casta Malvasia Fina variou de 60,01% a 75,88%, respetivamente no B e C1. Uma interpretação desses valores levaria a crer uma menor humidade da folha branqueada, mas a partir de diferenças significativas nota-se que MFF é o estado com menor valor de humidade contra MFC1 e MFC3 com os maiores valores. Esta ação já era esperada entre as castas, pois todos os tratamentos foram realizados com as folhas em contato com água em ebulição, que faria aumentar essas percentagens de retenção de água.

Uma melhor visualização do aumento evidente da humidade está nas amostras de Touriga Franca, que após o branqueamento resultaram em valores maiores àqueles realizados anteriormente ao C1. A estatística para essa casta mostrou uma menor percentagem para TFF (63,74%) e maiores valores para os 3 cozimentos, destacando-se TFC1 (76,85%). Para o branqueamento, ambas as castas mostraram que as folhas submetidas a este tratamento estão entre a maior e menor percentagem de humidade, claramente pelo contato em curto espaço de tempo (5 min) com a água após sua temperatura de ebulição.

As estatísticas realizadas nos dados das cinzas relataram valores mais altos, em percentagem, para as amostras que não foram submetidas ao tratamento térmico e àquelas que foram submetidas ao branqueamento, como exemplo da TFF (2,13%) frente a TFC3 (1,45%) e da casta Malvasia Fina, com valores variando de 1,26% (MFC2) a 2,17% (MFB). Isso, de fato, ocorre nas duas castas estudadas, uma vez que entre ambas, em cada tipo de tratamento analisado, não ocorreu diferenças significativas ($P > 0,05$), como ocorrido na análise da humidade.

Observa-se, também, que os maiores valores de humidade corresponderam aos menores valores das cinzas para as duas castas, sendo o inverso verdadeiro. Através de uma regressão, pode-se observar que há uma correlação extremamente significativa para Malvasia Fina ($R^2 = 0,904$; $P < 0,001$; $y = -0,052x + 5,240$) e Touriga Franca ($R^2 = 0,878$; $P < 0,001$; $y = -0,063x + 6,066$) entre o aumento da humidade com os valores obtidos para a análise de cinzas. Isso leva a mostrar que com maiores teores de humidade, em maiores aquecimentos, maior será a perda em cinzas. Sat et al. (2002) analisaram quatro variedades de folhas de videira em diferentes tipos de branqueamento, e naqueles onde só foi utilizada água a 100 °C, ocorreu uma diminuição no teor das cinzas, fazendo referência aos dados aqui obtidos. A partir deste fato, reforça-se a ideia de que com o aquecimento, parte dos constituintes se dissolvem em água.

O aquecimento ainda promoveu um incremento em proteínas das amostras. Os valores são crescentes, 15,8% - 16,8% - 22,3% - 23% (MFF – MFB – MFC1 – MFC2, nesta ordem) como exemplo, mostrando um comportamento estável até os diferentes tipos de cozimento, que fizeram estes valores variarem de forma distinta. Houve uma diferença significativa para os estados F ($P = 0,039$) e B ($P = 0,013$) quando comparadas entre as castas e no mesmo tipo de conformação, com valores de 15,8% e 17,5% para o estado fresco de Malvasia Fina e Touriga Franca, respetivamente e 16,8%

e 17,8% para as folhas branqueadas, na mesma ordem anterior. Em um modo geral, a Touriga Franca foi aquela que apresentou maiores valores de proteína nestas duas conformações. A partir do C1, os valores já não apresentaram uma relação estatística ($P > 0,05$). Tal relação é constatada para os tratamentos, entre as variedades, na análise de gordura. O aumento da percentagem de gordura, nas duas castas, foi incrementado conforme as folhas foram sendo processadas, acarretando em valores menores em F e superiores em C3. Entre as castas, nenhum dos valores obtidos apresentou uma relação significativa ($P > 0,005$) para o mesmo tratamento.

Ao referir-se dos hidratos de carbono, nota-se que todos os aquecimentos reduziram estes compostos a nível residual. Os valores, para as duas castas, tanto quando comparado entre as variedades e entre os mesmos tipos de tratamento, não foram estatisticamente diferentes ($P > 0,05$). Assim, a partir destes fatos, vê-se uma igualdade, através das estatísticas realizadas, para a composição de gorduras, hidratos de carbono, cinzas e humidade entre as duas castas estudadas. A única análise que apresentou diferenças, quando comparada entre as variedades, foi a proteína bruta.

O valor energético entre as castas não apresentou diferenças significativas ($P > 0,05$) nos tipos de tratamento, em exceção à conformação C3, com valores de 140 kcal $100g^{-1}$ e 153 kcal $100g^{-1}$ para a casta branca e tinta, respetivamente. Essa diferença estatística ($P = 0,001$) apresentada por C3, entre as variedades, se deu a partir dos maiores valores de proteína bruta e gorduras que a Touriga Franca obteve neste estado. Nos cozimentos a permanência dos hidratos de carbono como traços fez com que os valores energéticos fossem reduzidos consideravelmente, em exceção à TFC3 que forneceu tal valor pelos motivos citados acima.

Quando avaliado as castas, individualmente, Touriga Franca não apresentou significância nos dados obtidos ($P > 0,05$). Avaliando a casta Malvasia Fina, a sua forma fresca foi responsável pelo maior valor energético (157,9 kcal $100 g^{-1}$), estatisticamente. No oposto ao apresentado, MFC3 resultou em 139,9 kcal $100 g^{-1}$.

Kosar et al. (2007) também relataram a presença de gorduras, vitaminas, hidratos de carbono, e outros constituintes em folhas frescas e frutos da videira. Alguns polifenóis, existentes na forma livre ou ligada, como os taninos, são encontrados nas folhas de videira fresca e apresentam características adstringentes e de baixa palatibilidade através da capacidade de formação de complexos com proteínas, aminoácidos, ácidos gordos (Romero et al., 2000). Através deste último vê-se que as folhas na forma fresca não seriam aceitáveis ao nível do consumo humano. De fato, os

tratamentos térmicos poderiam reduzir os níveis destes compostos através da dissolução em água ou por alguns deles serem termolábeis. Provou-se, nos nossos estudos, que os tratamentos térmicos promovem uma redução no valor energético das folhas cozidas, o que é considerado ótimo visto ao nível dos consumidores, que buscam alimentações saudáveis e equilibradas, além de possibilitar uma boa palatibilidade pela redução de características possivelmente adstringentes. Apesar desses valores energéticos terem sido reduzidos, os teores de gordura aumentaram significativamente. Ao nível global isso seria um ponto possivelmente negativo. Na secção 4.2.5.2 irá ser traçado o perfil dos ácidos gordos e a partir disto vamos fazer uma relação entre o perfil em ácidos gordos e a dieta humana.

4.2.5. Composição química

4.2.5.1. *Clorofilas e carotenoides*

A partir da análise das clorofilas e carotenoides podemos obter resultados não só importantes na composição química das folhas mas também na coloração destas. Sabe-se que as clorofilas são pigmentos responsáveis pela coloração das plantas que vai do verde ao castanho esverdeado (Arnold, Schwarzenbolz, & Böhm, 2014). Esse composto é degradado quimicamente e enzimaticamente, por aquecimento ou ação ácida. As indústrias alimentares tentam minimizar ou evitar as degradações da clorofila durante o processamento térmico pois nas características sensoriais dos produtos, a cor é um dos parâmetros importantes para determinação da aceitabilidade (Weemaes et al., 1999). Os carotenoides são compostos lipossolúveis encontrados em vegetais, a sua coloração vai do amarelo ao vermelho. Todos os padrões de carotenoides podem ser modificados após a colheita (Maiani et al., 2009).

Na Tabela 5 encontramos os valores em clorofilas e carotenoides correspondentes das folhas de videira em seus diferentes tratamentos. A clorofila total é determinada a partir do somatório da clorofila *a* e *b*, e pode-se observar que todos os valores tiveram decréscimos consideráveis conforme evolução dos tempos em que as folhas permaneceram em tratamento térmico.

Os valores de clorofila *a*, *b* e total foram maiores na casta Malvasia Fina frente à Touriga Franca, nos tratamentos excluído fresco. Para a clorofila *a*, o maior valor apresentado pela Malvasia Fina foi 23,5 mg 100 g⁻¹ para a forma fresca e no oposto MFC3 com valores de 6,5 mg 100 g⁻¹. As diferenças significativas apresentadas entre as

conformações de Malvasia Fina foram claras e objetivas. No mesmo parâmetro, Touriga Franca teve valores significativamente diferentes variando de 0,259 a 0,062 mg 100 g⁻¹ para os tratamentos F e C3, respetivamente. Estes máximos valores entre as castas, não se mostraram diferentes estatisticamente ($P > 0,05$), de mesmo modo para os outros tratamentos em exceção a C1 (8,80 mg 100 g de folhas⁻¹ da casta branca frente a 7,75 mg 100 g de folhas⁻¹ da casta oposta), que mostrou diferenças significativas ($P = 0,015$) caracterizando MFC1 como a casta, neste tratamento, com maior teor em clorofila *a*.

Tabela 5 – Teor em clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenoides (mg 100 g de folhas⁻¹) das folhas de Malvasia Fina e Touriga Franca após diferentes tratamentos térmicos (n = 3; média ± desvio padrão).

Amostra	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila total	Carotenoides
MFF	23,5 ± 1,73 ^{c,A}	29,3 ± 2,43 ^{d,A}	52,8 ± 4,16 ^{c,A}	38,1 ± 4,19 ^{a-b,A}
MFB	21,1 ± 6,69 ^{c,A}	20,8 ± 5,74 ^{c,A}	42,0 ± 12,3 ^{c,A}	47,4 ± 12,7 ^{a-b,A}
MFC1	8,80 ± 0,57 ^{b,B}	8,31 ± 0,63 ^{b,A}	17,1 ± 1,06 ^{b,A}	42,9 ± 2,87 ^{b,B}
MFC2	8,06 ± 1,25 ^{a,b,A}	7,61 ± 1,61 ^{a,b,A}	15,7 ± 2,86 ^{a,b,A}	40,5 ± 2,71 ^{b,A}
MFC3	6,55 ± 0,70 ^{a,A}	5,77 ± 0,70 ^{a,A}	12,4 ± 1,39 ^{a,A}	32,6 ± 4,64 ^{a,A}
Valor de <i>P</i>	< 0,001**	< 0,001**	< 0,001**	0,003**
TFF	25,9 ± 5,82 ^{b,A}	35,17 ± 8,40 ^{d,A}	63,7 ± 12,0 ^{c,B}	38,8 ± 6,74 ^{a,A}
TFB	19,6 ± 4,05 ^{b,A}	19,40 ± 4,90 ^{c,A}	38,8 ± 9,19 ^{b,A}	48,6 ± 2,89 ^{b,A}
TFC1	7,75 ± 0,89 ^{a,A}	7,93 ± 1,23 ^{b,A}	15,7 ± 2,13 ^{a,A}	33,9 ± 3,86 ^{a,A}
TFC2	7,95 ± 1,91 ^{a,A}	6,99 ± 1,78 ^{a,b,A}	15,0 ± 3,66 ^{a,A}	35,3 ± 9,43 ^{a,A}
TFC3	6,16 ± 1,46 ^{a,A}	5,68 ± 1,24 ^{a,A}	11,9 ± 2,71 ^{a,A}	30,6 ± 5,73 ^{a,A}
Valor de <i>P</i>	< 0,001**	< 0,001**	< 0,001**	< 0,001**

* $P > 0,05$ através do teste de Levene. Os valores de *P* são aqueles obtivos através da análise de variâncias univariada (one-way ANOVA). As médias foram comparadas usando o teste de Tukey pois uma igualdade de variâncias pôde ser assumida; ** $P < 0,05$ através do teste de Levene. Os valores de *P* são aqueles obtivos através da análise de variâncias univariada (one-way ANOVA) com correção de Welch. As médias foram comparadas usando o teste de Dunnett T3 pois uma igualdade de variâncias não pôde ser assumida; ^{a-c} Para cada pigmento analisado, dentro de uma mesma coluna e na mesma variedade, valores médios com letras minúsculas diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$); ^{A-B} Para cada pigmento analisado, num mesmo tratamento e entre as variedades, valores médios com letras maiúsculas diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$).

Não ocorreram variações estatisticamente consideráveis ($P > 0,05$) quando avaliamos a mesma conformação entre as castas. Porém, em análise individual dos tratamentos em cada casta, pode-se observar que os valores do estado fresco para Touriga Franca são maiores quando comparado àquele obtido na Malvasia Fina na mesma conformação (35,2 mg 100 g de folhas⁻¹ e 29,3 mg 100 g de folhas⁻¹ respetivamente). É visível que a casta Touriga Franca se destaca em clorofila *b* para o estado fresco assim como na clorofila *a*, o que irá refletir em um maior teor em clorofila total. Mesmo que obtidos estes máximos valores, os mínimos de Malvasia Fina (5,8 mg 100 g⁻¹) se apresentaram muito próximos daqueles obtidos na Touriga Franca (5,7 mg

100 g⁻¹). Isso mostra que a casta Malvasia Fina, que apresentou os menores valores entre as castas para a forma fresca, pode ter uma maior estabilidade da clorofila no maior cozimento frente a Touriga Franca.

Em influência direta, o valor de clorofila total na conformação fresca, entre as castas, se apresentou estatisticamente diferente ($P = 0,041$), e como era esperado pelos maiores valores das clorofilas *a* e *b* entre as castas, Touriga Franca foi aquela que obteve um maior destaque. Inversamente, os menores valores para clorofila total, apesar de não apresentarem diferenças significativas ($P > 0,05$), foram atribuídos ao último cozimento desta mesma casta. Se avaliados entre a forma fresca e branqueada, de um estado para outro, perdem-se 20,4% da clorofila para Malvasia Fina e 39,1% para Touriga Franca. Logo, esta última casta tem uma maior sensibilidade dos seus constituintes frente aos tratamentos térmicos.

A biodisponibilidade dos carotenoides está condicionada a forma em que ela se encontra na folha. Todos os resultados obtidos para Malvasia Fina mostraram que após tratar termicamente as folhas, o valor em carotenoides tendeu a um ligeiro aumento até o C2, quando comparado a forma fresca, e logo o C3 apresenta o menor valor entre todos os tratamentos. O maior valor, estatisticamente considerado, em carotenoides é observado entre MFC1 e MFC2 (0,429 e 0,405 mg 100 g⁻¹, respetivamente). A diferença estatística, e até de interpretação direta, para a casta Touriga Franca mostrou que a forma branqueada das folhas avaliadas é aquela responsável pelos maiores teores deste composto. Tendencialmente, após o branqueamento todos os valores foram reduzidos a medida de se apresentarem tão quanto menores às folhas frescas. Entre todas estas diferenças citadas em cada casta, uma avaliação entre as variedades, no mesmo tratamento, só se mostrou significativamente diferente ($P < 0,001$) para C1, que revelou ter maiores valores de carotenoides, neste estado, para Malvasia Fina (0,429 mg 100 g⁻¹).

De fato, os dados apresentados mostram uma relação direta entre os aquecimentos com a perda das clorofilas. Weemaes et al. (1999) mostraram, em estudo com sumo de brócolos, que as clorofilas se degradaram em feofitina em temperaturas superiores a 60 °C, mostrando que estas são muito sensíveis ao aquecimento. Na avaliação dos carotenoides, Maiani et al. (2009) realizaram estudos sobre as funções destes compostos e então afirmaram que o tratamento térmico apesar de poder diminuir o conteúdo em carotenoides, também pode auxiliar na biodisponibilidade deste composto através da libertação da sua forma ligada e de sua solubilização.

4.2.5.2. *Perfil em ácidos gordos*

A composição dos ácidos gordos (AcGo) é de grande relevância para os alimentos por ser considerados nutrientes essenciais, e é a partir destes dados que o consumidor busca uma relação de proximidade do bem-estar com a alimentação. Os ácidos gordos podem apresentar papel funcional na prevenção e tratamento de doenças e até mesmo na prevenção de cancro (Simopoulos, 1999).

A composição química das folhas de videira relata a presença de lípidos e outros constituintes (Fernandes et al., 2013). Os lípidos possuem ácidos gordos na sua estrutura molecular, logo a auto-oxidação desses compostos, como os ácidos gordos polinsaturados (AGP), promove uma redução do valor nutritivo e cria meios de produção de radicais livres (Arabshahi-Delouee & Urooj, 2007), que podem ser revertidos a partir da ingestão de frutas e legumes ricas em compostos bioativos (Dani et al., 2010).

Com a necessidade de determinação do perfil em ácidos gordos, a Figura 22 mostra os níveis em ácidos gordos saturados (AGS), monoinsaturados (AGM) e polinsaturados (AGP) nas folhas de videira das castas em diferentes tipos de tratamento. Visivelmente nota-se uma maior composição em AGS e AGM para as conformações frescas. Diferentemente, para AGP a folha fresca tem menores valores apresentados frente aos outros tratamentos.

As estatísticas descrevem uma redução na saturação dos ácidos gordos para os diferentes tratamentos térmicos. Os valores da forma fresca variaram entre 31,46% para Malvasia Fina e 39,54% para Touriga Franca, sendo eles os maiores para esse grupo de lípidos. Os AGS apresentaram diferenças estatísticas ($P = 0,002$ e $P = 0,005$), respetivamente, entre os tratamentos, com menor valor representado pelo estado C3 (27,82%) na Malvasia Fina e em C1 (29,06%) para Touriga Franca. Apesar de uma semelhança do ocorrido entre as conformações, uma avaliação dos tratamentos, entre as variedades, mostrou uma diferença significativa ($P = 0,003$) apenas para a forma fresca das variedades. Estes lípidos na forma saturada são possivelmente prejudiciais ao consumo elevado, pois quanto mais saturada é esta gordura, mais sólida ela se torna, aumentando assim os níveis de colesterol no sangue e o risco de contração de doenças cardiovasculares (Ali et al., 2010).

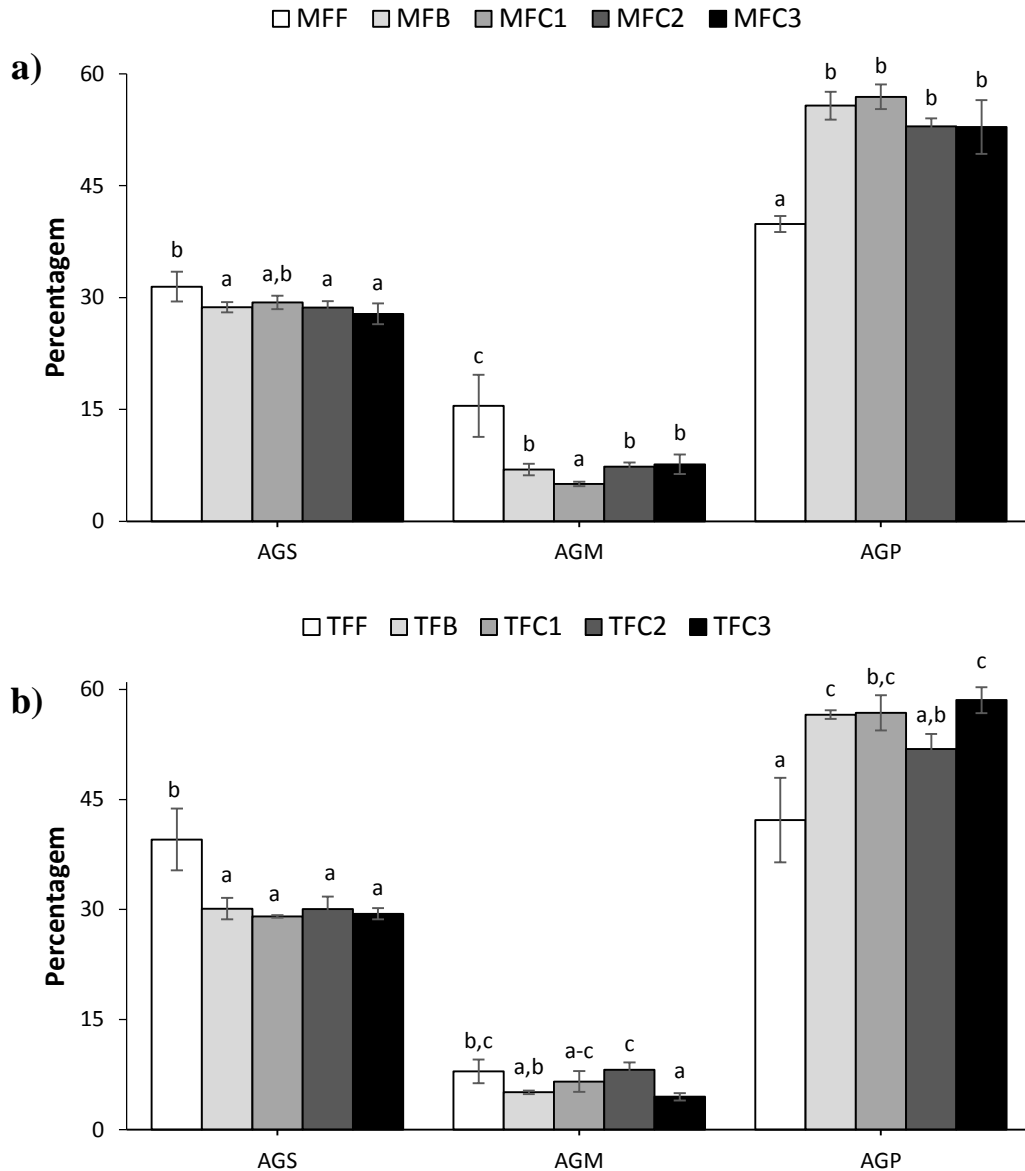


Figura 22 – Frações do perfil em ácidos gordos presentes nas folhas de videira das castas Malvasia Fina (a) e Touriga Franca (b) submetidas a diferentes tratamentos térmicos (n = 3; média ± desvio padrão). Entre tratamentos e na mesma variedade, valores médios com letras minúsculas diferem significativamente ($P < 0,05$).

Como já referido, as folhas frescas apresentaram elevados valores de AGM em ambas as castas, no qual Malvasia Fina (15,49%) resultou em valores aproximadamente duas vezes maior à Touriga Franca (7,94%). Os menores valores relatados para este perfil de ácido gordo foi para o C1 (5,01%) da Malvasia Fina e C3 (4,48%) da Touriga Franca. Em uma comparação relativamente ao estado fresco observa-se que a casta tinta apresentou variações menores, até mesmo constatando a maior percentagem deste ácido gordo em C2 (8,14%). Estas informações são fornecidas a partir das diferenças

estatísticas das castas ($P < 0,001$ em ambas), dentre os tratamentos. Em concordância com os dados expostos aqui, uma análise mais criteriosa permitiu avaliar a existência de significativas diferenças no mesmo tratamento, entre as castas, para as formas F ($P = 0,004$), B ($P = 0,002$) e C3 ($P = 0,002$), sendo todos eles superiores na Malvasia Fina frente a Touriga Franca. Em função das propriedades, os AGM mostram um bom perfil metabólico em pacientes com diabetes, mostrando a importância da dieta enriquecida com estes compostos (Simopoulos, 1999).

As concentrações em AGP foram relativamente elevadas para as folhas de videira processadas com algum tipo de aquecimento. Esses lípidos apresentam boas funções para os seres humanos. Relativamente àquelas conformações que apresentaram valores ínfimos para os AGM, agora se mostraram diferentes, sendo C1 da Malvasia Fina (56,92%) e C3 da Touriga Franca (58,54%) as percentagens obtidas, que antes eram as menores, mais relevantes dentro deste grupo dos AGP. Dentro destes, as menores percentagens obtidas foram nas conformações frescas da Malvasia Fina (39,85%) e Touriga Franca (42,20%), onde todos os outros tratamentos com aquecimento apresentaram bons valores. Todos os dados relatados obtiveram diferenças estatísticas ($P < 0,001$ em ambas as castas). Relativamente em uma comparação entre as castas, na mesma conformação, o único tratamento que se mostrou diferente significativamente ($P = 0,014$) e superior foi o C3 da Touriga Franca frente a Malvasia Fina.

Uma observação mais detalhada pode ser vista através da Tabela 6, a qual mostra os ácidos gordos individuais encontrados nas folhas de videira em seus diferentes tratamentos térmicos. Foi a partir desta tabela que se calcularam as diferentes frações dos ácidos gordos.

Os ácidos gordos saturados são aqueles compostos ausentes de ligação dupla em sua conformação, como é o caso do ácido laurico ($C_{12:0}$), mirístico ($C_{14:0}$). Já aqueles considerados monoinsaturados apresentam uma única ligação dupla na sua cadeia, como o ácido palmitoleico ($C_{16:1}$), oleico ($C_{18:1}$). Os AGP são os que possuem mais que uma ligação dupla na sua estrutura, como o ácido linoleico ($C_{18:2}$), e o ácido linolénico ($C_{18:3}$) (Poppitt et al., 2005).

Tabela 6 – Composição detalhada do perfil em ácidos gordos (g de AcGo 100 g AcGo⁻¹) das folhas de videira utilizadas para estudo em diferentes tratamentos térmicos (n = 3; média ± desvio padrão).

AcGo	MFF	MFB	MFC1	MFC2	MFC3	Valor de P	TFF	TFB	TFC1	TFC2	TFC3	Valor de P
C_{12:0}	1,16 ± 0,11 ^{b,A}	0,87 ± 0,11 ^{a,A}	0,98 ± 0,10 ^{a-b,A}	0,85 ± 0,07 ^{a,A}	0,91 ± 0,04 ^{a,A}	0,012**	1,79 ± 0,70 ^{a-b,A}	1,20 ± 0,09 ^{b,B}	0,82 ± 0,15 ^{a,A}	1,26 ± 0,05 ^{b,B}	1,23 ± 0,10 ^{b,B}	0,006**
C_{14:0}	3,47 ± 0,32 ^{c,A}	3,07 ± 0,17 ^{b,A}	2,93 ± 0,16 ^{a,b,A}	2,95 ± 0,14 ^{a,b,A}	2,61 ± 0,19 ^{a,A}	< 0,001*	4,49 ± 0,93 ^{a,A}	2,80 ± 0,24 ^{a,A}	2,90 ± 0,18 ^{a,A}	3,00 ± 0,27 ^{a,A}	3,03 ± 0,14 ^{a,B}	0,037**
C_{15:0}	0,45 ± 0,08 ^{c,B}	0,27 ± 0,02 ^{a-b,B}	0,18 ± 0,03 ^{a,A}	0,32 ± 0,05 ^{b,B}	0,28 ± 0,04 ^{a,b,B}	< 0,001*	0,26 ± 0,02 ^{b,A}	0,23 ± 0,18 ^{a-b,A}	0,26 ± 0,04 ^{a-b,B}	0,21 ± 0,02 ^{a,A}	0,16 ± 0,08 ^{a-b,A}	0,032**
C_{16:0}	18,4 ± 1,22 ^{a-b,A}	18,0 ± 0,55 ^{a-b,A}	18,8 ± 0,16 ^{b,B}	18,6 ± 0,42 ^{a-b,B}	17,1 ± 0,81 ^{a,A}	0,011**	21,5 ± 2,12 ^{b,B}	17,1 ± 0,35 ^{a,A}	17,4 ± 0,10 ^{a,A}	17,6 ± 0,75 ^{a-b,A}	17,6 ± 0,63 ^{a-b,A}	0,018**
C_{16:1}	1,25 ± 0,36 ^{a,A}	1,33 ± 0,15 ^{a,B}	1,23 ± 0,10 ^{a,A}	1,17 ± 0,19 ^{a,A}	1,35 ± 0,11 ^{a,A}	0,626**	1,26 ± 0,31 ^{a,A}	1,29 ± 0,08 ^{a,A}	1,10 ± 0,07 ^{a,A}	1,22 ± 0,17 ^{a,A}	1,13 ± 0,24 ^{a,A}	0,224**
C_{17:0}	0,56 ± 0,07 ^{a,A}	0,48 ± 0,01 ^{a,B}	0,49 ± 0,04 ^{a,B}	0,53 ± 0,04 ^{a,B}	0,49 ± 0,01 ^{a,B}	0,129**	0,44 ± 0,11 ^{a-b,A}	0,34 ± 0,05 ^{a-b,A}	0,36 ± 0,03 ^{b,A}	0,33 ± 0,03 ^{a-b,A}	0,29 ± 0,023 ^{a,A}	0,030**
C_{17:1}	0,62 ± 0,27 ^{b,A}	0,59 ± 0,23 ^{b,B}	0,16 ± 0,09 ^{a,A}	0,06 ± 0,01 ^{a,A}	0,07 ± 0,01 ^{a,A}	< 0,001**	0,57 ± 0,15 ^{a,A}	0,34 ± 0,13 ^{a,A}	0,48 ± 0,13 ^{a,B}	0,43 ± 0,14 ^{a,B}	0,27 ± 0,16 ^{a,B}	0,050**
C_{18:0}	3,17 ± 0,12 ^{b,A}	2,72 ± 0,05 ^{a,A}	2,65 ± 0,11 ^{a,A}	2,63 ± 0,04 ^{a,A}	3,10 ± 0,13 ^{b,A}	< 0,001*	3,99 ± 0,31 ^{c,B}	3,50 ± 0,16 ^{b,c,B}	3,12 ± 0,08 ^{a,B}	3,20 ± 0,15 ^{a,b,B}	3,11 ± 0,11 ^{a,A}	< 0,001**
C_{18:1}	13,6 ± 4,58 ^{b,B}	5,02 ± 0,82 ^{a-b,B}	3,62 ± 0,24 ^{a,A}	6,13 ± 0,60 ^{b,A}	6,24 ± 1,29 ^{b,B}	< 0,001**	6,11 ± 1,68 ^{a-b,A}	3,44 ± 0,22 ^{a,A}	4,96 ± 1,47 ^{a-b,A}	6,49 ± 1,14 ^{b,A}	3,08 ± 0,57 ^{a,A}	0,001**
C_{18:2}	5,68 ± 1,76 ^{a,A}	4,38 ± 0,33 ^{a,A}	4,60 ± 0,29 ^{a,A}	4,39 ± 0,12 ^{a,A}	4,62 ± 0,14 ^{a,A}	0,158**	4,62 ± 0,38 ^{a,A}	4,21 ± 0,31 ^{a,A}	5,78 ± 1,66 ^{a,A}	4,56 ± 0,69 ^{a,A}	4,29 ± 0,30 ^{a,A}	0,227**
C_{18:3}	33,9 ± 2,42 ^{a,A}	51,0 ± 1,90 ^{b,A}	51,9 ± 1,58 ^{b,A}	48,2 ± 0,96 ^{b,A}	47,9 ± 3,46 ^{b,A}	< 0,001*	37,3 ± 5,85 ^{a,A}	52,0 ± 0,28 ^{b,c,A}	50,7 ± 3,02 ^{b,c,A}	47,0 ± 2,71 ^{a,b,A}	53,9 ± 1,47 ^{c,B}	0,001**
C_{20:0}	1,11 ± 0,15 ^{c,A}	0,88 ± 0,08 ^{b,c,A}	0,69 ± 0,06 ^{a,b,A}	0,58 ± 0,09 ^{a,A}	0,85 ± 0,16 ^{b,A}	< 0,001*	3,85 ± 0,07 ^{b,B}	2,64 ± 0,75 ^{a,b,B}	1,94 ± 0,40 ^{a,B}	2,20 ± 0,69 ^{a,B}	1,84 ± 0,59 ^{a,A}	0,005*
C_{22:0}	1,57 ± 0,13 ^{c,A}	1,30 ± 0,09 ^{a,b,A}	1,22 ± 0,04 ^{a,A}	1,22 ± 0,09 ^{a,b,A}	1,40 ± 0,07 ^{b,c,A}	< 0,001*	2,01 ± 0,17 ^{b,B}	1,49 ± 0,07 ^{a,B}	1,45 ± 0,06 ^{a,B}	1,49 ± 0,17 ^{a,B}	1,35 ± 0,04 ^{a,A}	< 0,001**
C_{24:0}	1,63 ± 0,08 ^{b,B}	1,08 ± 0,11 ^{a,B}	1,38 ± 0,60 ^{a-b,A}	0,94 ± 0,08 ^{a,B}	1,09 ± 0,09 ^{a,B}	< 0,001**	1,21 ± 0,03 ^{b,A}	0,78 ± 0,04 ^{a,A}	0,81 ± 0,02 ^{a,A}	0,78 ± 0,04 ^{a,A}	0,77 ± 0,06 ^{a,A}	< 0,001*

* $P > 0,05$ através do teste de Levene. Os valores de P são aqueles obtivos através da análise de variâncias univariada (one-way ANOVA). As médias foram comparadas usando o teste de Tukey pois uma igualdade de variâncias pôde ser assumida.

** $P < 0,05$ através do teste de Levene. Os valores de P são aqueles obtivos através da análise de variâncias univariada (one-way ANOVA) com correção de Welch. As médias foram comparadas usando o teste de Dunnett T3 pois uma igualdade de variâncias não pôde ser assumida.

^{a-d} Para cada ácido gordo, dentro de uma mesma linha e na mesma variedade, valores médios com letras minúsculas diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$).

^{A-B} Para cada ácido gordo, dentro de uma mesma linha e entre as variedades, valores médios com letras maiúsculas diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$).

Dentre todos os tratamentos, entre as castas, o único parâmetro que não se mostrou diferente significativamente ($P > 0,05$) foi o ácido linoleico. Na análise individual a cada casta, esse composto também apresentou a mesma característica, onde os valores se mantiveram entre 4,38 a 5,68 g de AcGo 100 g AcGo⁻¹ para Malvasia Fina e 4,21 a 5,78 g de AcGo 100 g AcGo⁻¹ para Touriga Franca. Para além dele, o ácido palmitoleico total não mostrou variações significativas entre os dados obtidos para a análise individual em ambas as castas. O ácido margárico (C_{17:0}) seguiu de mesmo modo para a casta Malvasia Fina, que apresentou valores variando de 0,48 a 0,56 g de AcGo 100 g AcGo⁻¹, diferentemente de Touriga Franca que mostrou ter diferenças significativas entre os tratamentos. Os valores reportados para a casta tinta foram de 0,29 a 0,44 g de AcGo 100 g AcGo⁻¹, para a maior e menor percentagem, respetivamente.

Tratando somente daqueles ácidos gordos que apresentaram percentagens relativamente significativas, observa-se que os ácidos gordos mirístico, palmítico (C_{16:0}) e esteárico (C_{18:0}) foram os que obtiveram maiores percentagens para Malvasia Fina, com variações de 2,61 a 3,47, 17,1 a 18,8 e 2,63 a 3,17 g de AG 100 g AG⁻¹, respetivamente.

Estes ácidos gordos saturados mostraram algumas variações com o tratamento térmico das folhas de videira, muitas das vezes promovendo redução dos teores. Quando avaliado a casta Touriga Franca, observa-se maiores percentagens para mirístico, palmítico, esteárico, eicosanoico (C_{20:0}) e beénico (C_{22:0}), que atuam de mesmo modo àqueles ácidos gordos submetidos ao tratamento térmico na Malvasia Fina. Ambas as castas apresentaram valores semelhantes para os ácidos gordos mirístico, palmítico e esteárico. Essa maior quantia de AGS, na casta tinta, reflete em uma maior concentração dos ácidos gordos para esta variedade na sua forma fresca, como foi relatado através das diferenças estatísticas.

Em referência àqueles ácidos gordos com uma ligação dupla na sua cadeia, os ácidos palmitoleico e oleico são os que dão maior representatividade a esse tipo de lípidos. Entre esses dois AGM, o oleico, com valores entre 13,6 a 3,62 g de AcGo 100 g AcGo⁻¹ para Malvasia Fina e 6,11 a 3,08 g de AcGo 100 g AcGo⁻¹ para Touriga Franca, é o único que sofre variações significativas com os diferentes tratamentos térmicos, chegando a reduzir sua percentagem em até aproximadamente quatro vezes, entre algumas amostras.

Essa redução nos ácidos gordos monoinsaturados é compensada com uma maior relação de AGP. Os ácidos linoleico e linolénico são os dois ácidos gordos mais relevantes dentro destes compostos com varias ligações duplas na cadeia. Em ambas as castas, o ácido linolénico aumenta suas percentagens de forma significativa, fazendo com que os diferentes tratamentos térmicos se destaquem dentro dos AGP, como exemplo da TFF (37,3 g de AcGo 100 g AcGo⁻¹) frente a TFC3 (53,9 g de AcGo 100 g AcGo⁻¹).

Consideravelmente, em ambas as castas, os valores de AGP foi superior às restantes frações dos ácidos gordos. Essas elevadas concentrações são benéficas a saúde, porém devem ser associados a ingestão de outros ácidos gordos, reduzindo assim o risco de doenças coronárias e cardíacas (Simopoulos, 1999). Esse fato mostra que as folhas de videira estudadas têm potencialidade na atuação da prevenção destas doenças.

4.2.5.3. *Composição em tocoferóis e tocotrienóis*

Os tocoferóis e tocotrienóis são constituintes da vitamina E, a qual possui uma ótima atividade antioxidante, sendo esta lipossolúvel (Middleton Jr. et al., 2000). Algumas folhas de videira madura apresentam elevada concentração de α -tocoferol e γ -tocoferol quando expostas a radiações UV (Gil et al., 2012).

Dessa forma, o conhecimento da composição em vitamina E nas folhas pode tornar mais compreensível uma possível interpretação da sua função quando relacionada com a atividade antioxidante das folhas de videira. A Tabela 7 especifica os teores detalhados dos quatro tocoferóis (α , β , γ e δ) e de um tocotrienol (β), de forma a expressar a vitamina E livre total.

O α -tocoferol é um dos constituintes da vitamina E que mais é retratado em estudos da atividade antioxidante. Em nosso trabalho, todos os valores desse composto vão se elevando conforme maior o tempo de duração do tratamento térmico, variando entre 551 e 1032 mg kg⁻¹, para a Malvasia Fina e entre 553 e 1276 mg kg⁻¹ para a Touriga Franca. O tratamento térmico C3, entre as variedades, é o que se difere significativamente ($P = 0,024$). Para além deste, ocorreram diferenças estatísticas nas folhas branqueadas ($P = 0,002$) e C2 ($P = 0,004$), das quais todas essas diferenças tendenciaram a classificar a Touriga Franca como a casta com maior concentração nos tratamentos que ocorreu as diferenças.

Tabela 7 – Composição em tocoferóis, tocotrienóis, e vitamina E livre (mg kg⁻¹) nas folhas de videira das castas Malvasia Fina e Touriga Franca submetidas a diferentes tratamentos térmicos (n = 3; média ± desvio padrão).

Amostra	α -tocoferol	β -tocoferol	γ -tocoferol	δ -tocoferol	β -tocotrienol	Vitamina E livre total
MFF	550 ± 34,9 ^{a,A}	0,56 ± 0,84 ^{a,A}	5,08 ± 1,33 ^{b,B}	n.d.	248 ± 16,2 ^{a,B}	804 ± 50,3 ^{a,A}
MFB	674 ± 44,0 ^{b,A}	0,50 ± 0,37 ^{a,A}	1,72 ± 0,27 ^{a,A}	37,6 ± 26,2 ^{a,A}	314 ± 21,8 ^{b,B}	1028 ± 53,0 ^{b,A}
MFC1	995 ± 55,0 ^{c,A}	5,13 ± 2,53 ^{a-c,A}	6,21 ± 1,62 ^{b,A}	71,0 ± 23,5 ^{a,A}	535 ± 49,2 ^{c,A}	1613 ± 120 ^{c,A}
MFC2	960 ± 30,1 ^{c,A}	5,64 ± 0,69 ^{c,A}	6,31 ± 1,34 ^{b,A}	171 ± 27,3 ^{b,A}	564 ± 64,2 ^{c,B}	1707 ± 58,9 ^{c,A}
MFC3	1032 ± 97,8 ^{c,A}	3,05 ± 1,03 ^{b,A}	4,92 ± 1,43 ^{b,A}	233 ± 56,3 ^{b,A}	556 ± 18,1 ^{c,A}	1829 ± 129 ^{c,A}
Valor de P	< 0,001**	< 0,001**	< 0,001*	< 0,001**	< 0,001**	< 0,001**
TFF	553 ± 129,4 ^{a,A}	2,20 ± 1,15 ^{a,B}	2,20 ± 1,06 ^{a,A}	n.d.	159 ± 57,3 ^{a,A}	717 ± 162 ^{a,A}
TFB	786 ± 9,6 ^{a,B}	3,00 ± 0,23 ^{a,B}	2,98 ± 0,39 ^{a,B}	56,3 ± 13,5 ^{a,A}	279 ± 24,2 ^{b,A}	1127 ± 36,3 ^{b,B}
TFC1	1061 ± 138 ^{b,A}	7,23 ± 0,86 ^{b,A}	6,26 ± 1,54 ^{b,A}	200 ± 43,8 ^{b,B}	465 ± 60,1 ^{c,A}	1740 ± 205 ^{c,A}
TFC2	1246 ± 130 ^{b,B}	7,43 ± 3,19 ^{a-b,A}	5,45 ± 2,91 ^{a-b,A}	240 ± 62,4 ^{b,A}	473 ± 62,4 ^{c,A}	1972 ± 259 ^{c,A}
TFC3	1276 ± 170 ^{b,B}	9,71 ± 2,24 ^{b,B}	4,85 ± 3,21 ^{a-b,A}	233 ± 79,4 ^{b,A}	521 ± 73,0 ^{c,A}	2045 ± 314 ^{c,A}
Valor de P	< 0,001**	< 0,001**	0,007**	< 0,001**	< 0,001*	< 0,001**

n.d. – não detetado; * $P > 0,05$ através do teste de Levene. Os valores de P são aqueles obtivos através da análise de variâncias univariada (one-way ANOVA). As médias foram comparadas usando o teste de Tukey pois uma igualdade de variâncias pôde ser assumida; ** $P < 0,05$ através do teste de Levene. Os valores de P são aqueles obtivos através da análise de variâncias univariada (one-way ANOVA) com correção de Welch. As médias foram comparadas usando o teste de Dunnett T3 pois uma igualdade de variâncias não pôde ser assumida; ^{a-c} Para cada vitâmero, dentro de uma mesma coluna e na mesma variedade, valores médios com letras minúsculas diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$); ^{A-B} Para cada vitâmero, dentro de uma mesma coluna e entre as variedades, valores médios com letras maiúsculas diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$).

Um salto de aproximadamente 10 vezes o valor obtido nas conformações fresca e branqueada foi identificado em todos os cozimentos para Malvasia Fina na composição em β -tocoferol, notavelmente por MFF (0,56 mg kg⁻¹) em comparação a MFC2 (5,64 mg kg⁻¹). Já para folhas da Touriga Franca, o aumento foi de aproximadamente 4 vezes os valores iniciais obtidos no estado fresco e branqueado, como pode ser observado para TFF (2,20 mg kg⁻¹) em relação a TFC3 (9,71 mg kg⁻¹). Estatisticamente observou-se uma maior concentração destes compostos para MFC2 frente a todos os outros tratamentos de Malvasia Fina e para C3, na Touriga Franca, em relação a todas as amostras dentro desta casta. A diferença estatística nos tratamentos, entre as castas, ocorreu para o estado fresco ($P = 0,028$), branqueado ($P < 0,001$) e C3 ($P < 0,001$).

Analisando os dados obtidos no γ -tocoferol, visivelmente os dois primeiros cozimentos, em ambas as variedades, se apresentam com as maiores concentrações frente a todos os outros tratamentos. A estatística mostrou que na Malvasia Fina somente a forma branqueada (1,72 mg kg⁻¹) é a que tem menores concentrações e todos os outros tratamentos, por exemplo C3 (4,92 mg kg⁻¹), se enquadram com bons teores

neste tocoferol. Na Touriga Franca, somente TFC1 (6,26 mg kg⁻¹) está com a maior concentração significativa entre os tratamentos, que demonstraram TFC2 (5,45 mg kg⁻¹) e TFC3 (4,85 mg kg⁻¹) tratamentos com valores intermédios a TFF (2,20 mg kg⁻¹) e TFB (2,98 mg kg⁻¹), responsáveis pelos menores valores. Observou-se uma diferença significativa apenas para as folhas em fresco ($P = 0,004$) e branqueadas ($P < 0,001$) entre as castas.

As formas frescas das duas castas avaliadas mostraram valores nulos para δ -tocoferol, do qual esteve presente somente nas folhas de videira que foram submetidas a algum tipo de tratamento térmico. Os valores obtidos do branqueamento, nas duas castas, já foram representativos e mantiveram uma tendência em aumentar as concentrações conforme maior fosse o tempo de cozimento. Entre as castas, ocorreu diferença significativa ($P < 0,001$) somente para a conformação C1, considerando a Touriga Franca (200 mg kg⁻¹) aquela com o maior teor frente a Malvasia Fina (71,0 mg kg⁻¹).

Do ponto de vista da composição em tocotrienóis, a Malvasia Fina foi a casta que obteve maiores valores, estatisticamente significativos, para o estado fresco ($P = 0,016$) (248 mg kg⁻¹) e branqueado ($P = 0,036$) (314 mg kg⁻¹) quando comparado a Touriga Franca nos mesmos tipos de tratamento, com valores de 159 e 279 mg kg⁻¹, respetivamente. Como ocorrido em todos os outros constituintes da vitamina E, os valores tiveram tendências a aumentar conforme o tipo de tratamento térmico a que foi submetido. A partir da Tabela 7, nota-se que nas duas castas os maiores valores de β -tocotrienol, são para os estados C1, C2 e C3, os menores valores correspondentes são para a forma fresca e os intermédios ficam no branqueamento. Esse fato reflete diretamente na composição total da vitamina E livre, uma vez que os valores são determinados a partir do somatório de todos os tocoferóis e tocotrienóis avaliados e as maiores concentrações detetadas nas análises foram para o α -tocoferol e β -tocotrienol. Assim colocados, a avaliação estatística da composição em vitamina E livre mostrou que somente a conformação branqueada é que tem diferença significativa ($P = 0,006$) e que a Touriga Franca é quem apresenta essa maior concentração frente ao mesmo estado da Malvasia Fina, com valores que variaram entre 1127 e 1028 mg kg⁻¹ nesta mesma ordem. Visualmente, após o estado branqueado, todos os valores obtidos para os cozimentos pareceram ser maiores na Touriga Franca, como exemplo do C3 da Malvasia Fina (1829 mg kg⁻¹) em relação ao mesmo tratamento da casta oposta (2045 mg kg⁻¹), reportando a casta tinta como candidata a maior teor de vitamina E livre.

Dentre as formas existentes dos tocoferóis, o α -tocoferol é aquele mais comum nas folhas das plantas, assim como os tocotrienóis podem estar presentes nos tecidos ativos fotossinteticamente (Horvath et al., 2006). Gil et al., (2012) mostraram relações entre α e γ tocoferol, associando-as maioritariamente com folhas maduras. Para além disto, os autores apresentaram que os tocoferóis conferem uma proteção ao aparelho fotossintético das folhas de videira em condições térmicas e de estresse oxidativo, interpretando que sua acumulação se dá pela proteção dos tecidos da videira contra elevadas radiações UV-B.

De todos os modos, as duas castas apresentaram bons resultados para a análise de vitamina E, refletindo então em bons coadjuvantes para a atividade antioxidante das folhas de videira, visto que estes tocoferóis e tocotrienóis possuem uma boa capacidade de doar átomos de hidrogénio para radicais livres, como ocorre com o α -tocoferol (Rice-Evans et al., 1996).

4.2.5.4. *Composição em diferentes grupos fenólicos*

Os valores obtidos da análise dos diferentes grupos fenólicos são apresentados na Tabela 8. As duas variedades variaram os fenóis totais, entre as castas, de modo semelhante a CRT (ver 4.2.3).

Todas as amostras, no somatório dos dois grupos fenólicos, apresentaram-se significativamente diferentes entre as variedades nos estados fresco e branqueado ($P = 0,004$ e $P = 0,001$, respetivamente). Entre os cozimentos não foram observadas diferenças estatísticas ($P > 0,05$).

A partir do somatório presente na Tabela 8 observa-se uma melhor definição estatística dos valores obtidos, mostrando que em ambas as castas nas formas frescas e branqueadas são aquelas com maior somatório dos flavonóis e DAH. Individualmente observado, os fenóis totais oscilam as diferenças estatísticas entre as amostras, assim como ocorre visualizando os valores e seus respetivos desvios padrões. Na casta Malvasia Fina, a estatística definiu MFF como aquela com maior e MFC3 com menor concentração (167 e 140 mg AG g extrato⁻¹, respetivamente). Diferentemente, na casta Touriga Franca, que registou valores entre 139 a 157 mg AG g extrato⁻¹, a significância dos dados relatou uma maior concentração para TFB, que se destacou entre os outros tratamentos. A partir dos valores obtidos é que se pode supor uma menor concentração para TFC3, visto que é dificultado a interpretação para suposição dos menores ou maiores valores, em fenóis totais, uma vez que os desvios padrões são elevados.

Tabela 8 – Composição em fenóis totais (mg AG g extrato⁻¹), flavonóis (mg Q g extrato⁻¹) e derivados do ácido hidroxicinâmico (DAH) (mg AC g extrato⁻¹) nos extratos aquosos das folhas Malvasia Fina e Touriga Franca submetidas a tratamento térmico (n = 3; média ± desvio padrão).

Amostra	Fenóis Totais	1	2	Σ (1+2)
		Flavonóis	DAH	
MF	167 ± 10,8 ^{d,B}	105 ± 6,82 ^{b,B}	48,9 ± 4,36 ^{b,B}	153 ± 11,1 ^{b,B}
MFB	170 ± 20,0 ^{c,d,B}	109 ± 11,8 ^{b,B}	54,6 ± 5,29 ^{c,B}	164 ± 13,7 ^{b,B}
MFC1	153 ± 15,8 ^{a,b,c,B}	77,3 ± 7,45 ^{a,A}	47,0 ± 4,33 ^{b,A}	124 ± 10,9 ^{a,A}
MFC2	152 ± 9,70 ^{b,B}	75,5 ± 5,23 ^{a,A}	42,5 ± 3,79 ^{a,A}	118 ± 8,83 ^{a,A}
MFC3	140 ± 12,7 ^{a,A}	75,7 ± 7,07 ^{a,A}	45,5 ± 4,99 ^{a,b,A}	121 ± 11,9 ^{a,A}
Valor de P	< 0,001**	< 0,001**	< 0,001*	< 0,001*
TFF	144 ± 10,2 ^{a,A}	95,5 ± 8,22 ^{b,A}	45,5 ± 5,13 ^{a-b,A}	141 ± 12,7 ^{b,A}
TFB	157 ± 8,80 ^{b,A}	100 ± 5,69 ^{b,A}	49,2 ± 4,80 ^{b,A}	149 ± 10,2 ^{b,A}
TFC1	142 ± 14,3 ^{a,A}	79,4 ± 9,98 ^{a,A}	48,4 ± 4,95 ^{b,A}	128 ± 13,3 ^{a,A}
TFC2	145 ± 13,5 ^{a,A}	77,6 ± 4,92 ^{a,A}	45,6 ± 5,27 ^{a-b,B}	123 ± 9,82 ^{a,A}
TFC3	139 ± 13,9 ^{a,A}	73,8 ± 7,35 ^{a,A}	43,5 ± 4,99 ^{a,A}	117 ± 12,2 ^{a,A}
Valor de P	0,001*	< 0,001**	0,006*	< 0,001*

* $P > 0,05$ através do teste de Levene. Os valores de P são aqueles obtivos através da análise de variâncias univariada (one-way ANOVA). As médias foram comparadas usando o teste de Tukey pois uma igualdade de variâncias pôde ser assumida; ** $P < 0,05$ através do teste de Levene. Os valores de P são aqueles obtivos através da análise de variâncias univariada (one-way ANOVA) com correção de Welch. As médias foram comparadas usando o teste de Dunnett T3 pois uma igualdade de variâncias não pôde ser assumida; ^{a-d} Para cada parâmetro analisado, dentro de uma mesma coluna e na mesma variedade, valores médios com letras minúsculas diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$); ^{A-B} Para cada parâmetro analisado, dentro de uma mesma coluna e entre as variedades, valores médios com letras maiúsculas diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$).

Diferenças estatísticas entre as variedades, para os mesmos tratamentos, são significantes apenas nos estados fresco ($P < 0,001$), branqueado ($P = 0,014$), C1 ($P = 0,043$), tendencialmente caracterizando Malvasia Fina como a casta com maior teor em fenóis totais nestes tratamentos. Para C2 e C3 não foram relatadas significância nos dados ($P > 0,05$).

Uma redução dos flavonóis, em aproximadamente 30%, é observada com tratamentos térmicos excessivos. Visivelmente, o branqueamento pareceu elevar a concentração deste composto. Logo com essas afirmações, ficaria claro observar que as maiores diferenças se encontrariam nas formas fresca e branqueada frente aos tratamentos térmicos. De fato, houve diferenças estatísticas que, para as duas variedades, identificaram os cozimentos como sendo aqueles com menores concentrações de flavonóis. Para este parâmetro da análise, quando avaliado entre as variedades no mesmo estado de conformação, aqueles que se diferiram significativamente foram as folhas frescas ($P = 0,001$) e branqueadas ($P = 0,007$), provando maiores teores na Malvasia Fina.

Relativamente, dentro da análise, os DAH foram aqueles com menores variações nos valores obtidos, mas de mesmo modo apresentaram-se significativos nas diferenças dentro de cada casta e entre elas para o mesmo tipo de tratamento. A casta Malvasia Fina destaca, visivelmente e estatisticamente, as folhas branqueadas como aquelas com altos valores em DAH, com 54,6 mg AC g extrato⁻¹. Diferentemente dos outros parâmetros, neste a estatística definiu MFC2 (42,5 mg AC g extrato⁻¹) como o responsável pelo menor valor entre os tratamentos desta casta. De um modo relativamente semelhante, a casta Touriga Franca relatou, nas diferenças estatísticas, que TFB e TFC1 são as candidatas a maiores concentrações dos DAH, com valores de 49,2 e 48,4 mg AC g extrato⁻¹, respetivamente. Para esta variedade tinta, o menor teor deste composto foi relatado em TFC3 (43,5 mg AC g extrato⁻¹), que acompanhou os dados obtidos nos outros parâmetros dentro dessa análise. Em observação aos mesmos tratamentos, entre as castas, a estatística define que existem diferenças significativas nas formas fresca ($P = 0,039$), branqueada ($P = 0,003$) e C2 ($P = 0,045$), onde as duas primeiras atribuem a Malvasia Fina o destaque na maior concentração em DAH e à última forma, a casta Touriga Franca.

Sabendo que os fenóis são compostos que apresentam propriedades antioxidantes, fez-se correlações entre os fenóis totais e essas propriedades presentes nas folhas de videira. Individualmente, Malvasia Fina apresentou correlação extremamente significativa ao DPPH e poder redutor ($R^2 = 0,233$; $P < 0,001$; $y = -225,0x + 190,7$ e $R^2 = 0,258$; $P < 0,001$; $y = -99,2x + 192,7$, respetivamente) e uma correlação muito significativa para ABTS ($R^2 = 0,166$; $P = 0,005$; $y = -102,6x + 179,4$). De fato isso comprova que os fenóis possuem propriedades antioxidantes e que os resultados das análises são dependentes das concentrações destes, onde tão quão menor for a existência dos fenóis nas folhas, maior será a necessidade de altas concentrações para corresponder ao EC₅₀. A Touriga Franca foi a casta em que apresentou menores relações com os fenóis, mostrando correlação significativa apenas para DPPH e ABTS ($R^2 = 0,207$; $P = 0,002$; $y = -322,1x + 202,4$ e $R^2 = 0,096$; $P = 0,037$; $y = -140,5x + 184,6$, respetivamente). O poder redutor não apresentou correlação significativa ($R^2 = 0,258$; $P > 0,05$; $y = -99,2x + 192,7$), fazendo acreditar que a composição dos fenóis, nomeadamente em outros grupos que o compõem, são mais relevantes na atividade antioxidante e podem estar presentes na Malvasia Fina em maiores valores. Torna-se necessário uma identificação mais detalhada dos fenóis e do conhecimento sobre a atividade antioxidante que estas têm.

Ismail et al. (2004) estudaram a atividade antioxidante de diferentes vegetais nas formas frescas e com tratamentos térmicos e mostraram que essa atividade fica condicionada a cada tipo de vegetal, como mostrou que para espinafre e repolho os valores de α -tocoferol, β -caroteno e o ácido ferúlico, composto da família do ácido hidroxicinâmico, mostraram maiores atividades antioxidantes. O resultado por eles encontrado, nos vegetais, é semelhante às nossas folhas de videira tratadas termicamente, que tiveram redução dos fenóis totais, visível de forma mais clara pela somatória dos flavonóis e DAH na Tabela 8. O autor ainda cita que a eficácia da atividade antioxidante difere ao grau de variação dos fenólicos, como exemplo surge o fato dos flavonóides possuírem mais grupos hidroxilos quando comparados ao ácido ferúlico. Soares (2002) referencia que dentro dos ácidos hidroxicinâmicos, o ácido cafeico apresenta uma maior atividade antioxidante frente ao ácido ferúlico, quando testado *in vitro*.

4.2.5.5. *Composição da fração volátil*

A fração volátil dos produtos alimentares tem uma influência na preferência do consumidor (López et al., 2007) sendo preponderante na fidelização do mesmo, levando à sua aceitação ou rejeição. Durante os processamentos tecnológico e/ou culinário a composição volátil é tremendamente afetada, levando à perda de alguns componentes de elevada importância e à aparição de novos compostos característicos do tipo de processamento aplicado (Kebede et al., 2014; Kleist et al., 2012). Tal facto foi observado nas castas em estudo como se pode verificar na Figura 23.

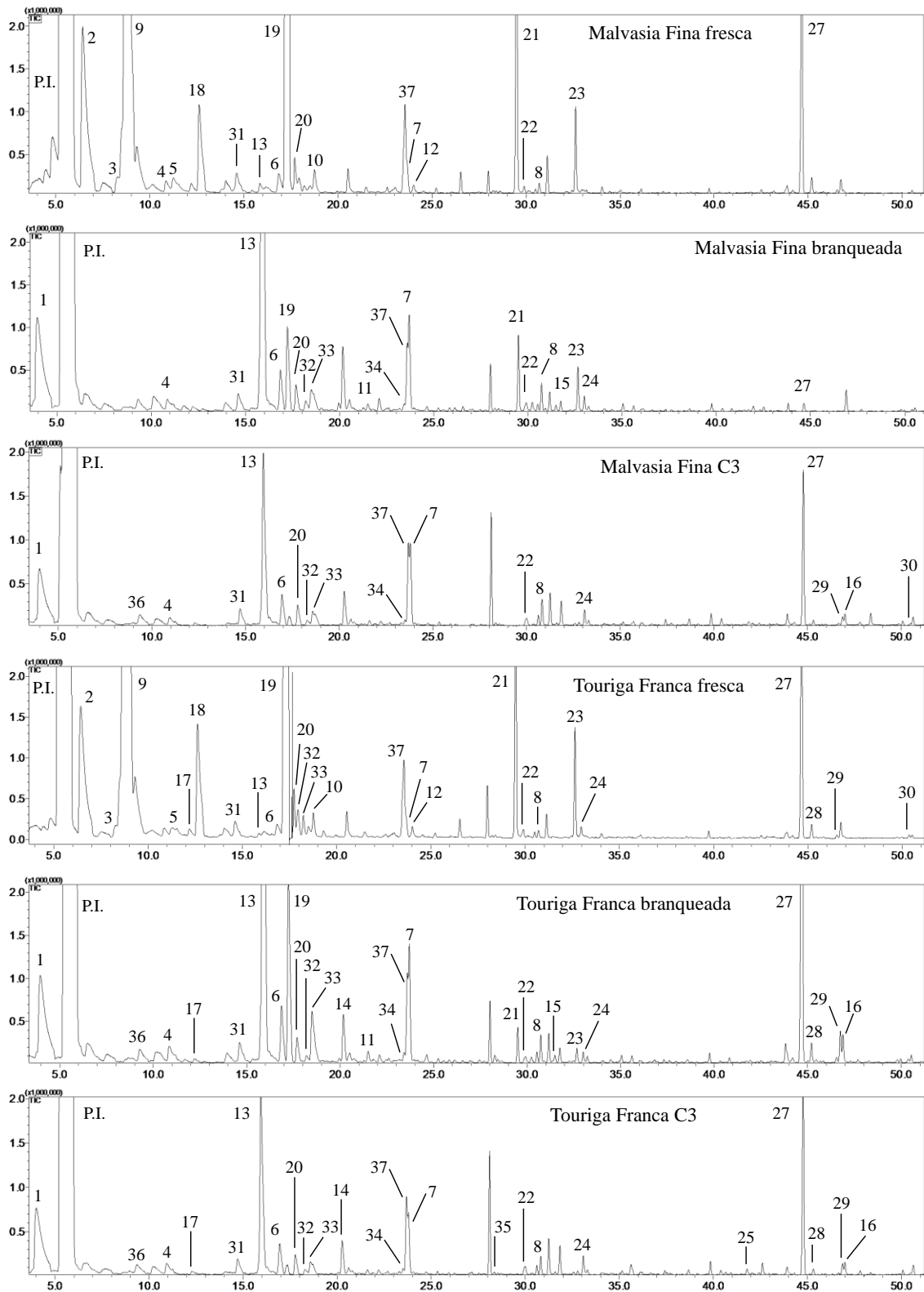


Figura 23 – Perfil cromatográfico das castas Malvasia Fina e Touriga Franca submetidos a diferentes tratamentos térmicos, obtidos por HS-SPME e GC-MS (os números representados correspondem aos compostos listados na Tabela 9; P.I. – padrão interno, 2-metil-4-pentanol).

Em ambas as castas é visível a diminuição progressiva de alguns compostos, e o aparecimento de outros assim que as folhas passam pelo processo de branqueamento ou cozimento. Na Tabela 9 é apresentada em detalhe a composição da fração volátil das folhas das castas Malvasia Fina e Touriga Franca submetidas a diferentes tratamentos térmicos. Na globalidade, entre todas as amostras analisadas, 37 compostos voláteis foram identificados e quantificados, divididos por 8 classes: oito aldeídos (compostos 1 ao 8); quatro alcoóis (9 ao 12); uma cetona (13); três derivados de norisoprenóides (14 ao 16); oito ésteres (17 ao 24); seis sesquiterpenos (25 ao 30); cinco terpenos (25 ao 30); e dois outros compostos (um hidrocarboneto aromático (36) e um alceno (37)). Dentro da casta Malvasia Fina 35 compostos foram identificados e na Touriga Franca foram identificados 36 compostos (Tabela 9). Nas folhas frescas os principais compostos voláteis encontrados em ambas as castas dizem respeito a GLV's ("green leaf volatiles", ou, "voláteis de folhas verdes"). São exemplos de GLV's o (Z)-3-hexenal, o (Z)-3-hexen-1-ol, o (Z)-3-hexenil acetato e o ácido butanóico (Z)-3-hexenil éster (Matsui, 2006). Estes quatro GLV's foram os compostos maioritários em ambas as castas quando frescas, sendo o (Z)-3-hexenil acetato o composto maioritário com 8672 e 10353 $\mu\text{g } 100 \text{ g de folhas}^{-1}$, respetivamente nas castas Malvasia Fina e Touriga Franca, que apresentou diferenças estatísticas ($P < 0,001$, em ambas) dentro dos próprios tratamentos. Essa mesma diferença ($P = 0,010$) é encontrada quando avaliado teor do composto nas folhas branqueadas, entre as castas. Estes compostos são responsáveis por odores agradáveis como sensações a verde, erva cortada e frutos cítricos (Iyer et al., 2010). Formam-se a partir do mecanismo da lipoxigenase (LOX), onde os ácidos gordos (linoleico e linolénico) são oxidados pela LOX dando origem a hidroperóxidos. Por sua vez e devido à sua instabilidade, os hidroperóxidos são convertidos a aldeídos através da ação da hidroperóxido liase. Os aldeídos por sua vez são reduzidos a alcóóis pela ação da álcool desidrogenase. Estes alcóóis podem ser esterificados pela álcool acetiltransferase, dando origem a ésteres (Matsui et al., 2006). No entanto o tipo de compostos voláteis produzidos depende do ácido gordo intervencionado, e no caso das folhas da videira, de acordo com os compostos em maior quantidade, o ácido gordo intervencionado foi o ácido linolénico. Estes resultados podem ser justificados pela composição da gordura das folhas, que são maioritariamente formadas pelo ácido linolénico (Tabela 6), logo os principais voláteis formados seriam o (Z)-3-hexen-1-ol e o seu acetato, o (Z)-3-hexenil acetato (Tabela 9).

Tabela 9 – Composição detalhada do perfil volátil ($\mu\text{g } 100 \text{ g de folhas}^{-1}$) das folhas de videira utilizadas para estudo em diferentes tratamentos térmicos ($n = 3$; média \pm desvio padrão).

Nº	Composto	MFF	MFB	MFC1	MFC2	MFC3	Valor de P	TFF	TFB	TFC1	TFC2	TFC3	Valor De P
Aldeídos													
1	Pentanal	n.d.	502 \pm 161 ^{a,A}	472 \pm 215 ^{a,A}	350 \pm 80 ^{a,A}	324 \pm 40 ^{a,A}	0,106*	n.d.	630 \pm 163 ^{a,A}	493 \pm 125 ^{a,A}	516 \pm 87 ^{a,B}	464 \pm 53 ^{a,B}	0,096*
2	(Z)-3-hexenal	1528 \pm 608 ^A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	922 \pm 281 ^A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
3	(E)-2-hexenal	166 \pm 78 ^A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	160 \pm 70 ^A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
4	Heptanal	54 \pm 12 ^c	41 \pm 18 ^{b,c,A}	25 \pm 7 ^{a,b,A}	n.d.	22 \pm 2 ^a	< 0,001*	n.d.	93 \pm 57 ^{a,A}	27 \pm 3 ^{a,A}	31 \pm 10 ^a	36 \pm 8 ^a	0,040**
5	(E,E)-2,4-hexadienal	86 \pm 11 ^A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	77 \pm 15 ^A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
6	Octanal	62 \pm 20 ^{a,A}	128 \pm 26 ^{b,A}	83 \pm 17 ^{a,A}	74 \pm 14 ^{a,A}	67 \pm 6 ^{a,A}	< 0,001*	85 \pm 17 ^{a,A}	170 \pm 61 ^{a,A}	81 \pm 10 ^{a,A}	89 \pm 13 ^{a,A}	77 \pm 18 ^{a,A}	0,056**
7	Nonanal	41 \pm 7 ^{a,A}	196 \pm 23 ^{c,A}	161 \pm 51 ^{b,c,A}	108 \pm 22 ^{b,A}	107 \pm 21 ^{b,A}	< 0,001**	49 \pm 16 ^{a,A}	201 \pm 45 ^{c,A}	134 \pm 3 ^{b,c,A}	143 \pm 23 ^{b,c,B}	107 \pm 29 ^{b,A}	< 0,001**
8	Decanal	17 \pm 4 ^{a,A}	42 \pm 11 ^{b,A}	32 \pm 10 ^{a,b,A}	31 \pm 12 ^{a,b,A}	31 \pm 5 ^{a,b,A}	0,002*	16 \pm 2 ^{a,A}	41 \pm 16 ^{b,c,A}	36 \pm 7 ^{b,c,A}	55 \pm 16 ^{c,B}	33 \pm 10 ^{a,b,A}	< 0,001*
	Σ aldeídos	1954\pm669^{c,A}	908\pm136^{b,c,A}	772\pm233^{a,b,A}	563\pm100^{a,A}	551\pm58^{a,A}	< 0,001**	1308\pm373^{a,A}	1135\pm278^{a,A}	771\pm127^{a,A}	835\pm89^{a,B}	716\pm113^{a,B}	0,012**
Alcoóis													
9	(Z)-3-hexen-1-ol	3383 \pm 961 ^A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	4514 \pm 981 ^A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
10	Alcool benzílico	57 \pm 12 ^A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	73 \pm 21 ^A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
11	1-Octanol	n.d.	16 \pm 3 ^A	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	22 \pm 1 ^{b,B}	n.d.	16 \pm 4 ^a	n.d.	0,018*
12	Feniletíl álcool	35 \pm 18 ^A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	22 \pm 9 ^A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
	Σ alcoóis	3475\pm983^{b,A}	16\pm3^{a,A}	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,001**	4609\pm1004^{b,A}	22\pm3^{a,B}	n.d.	16\pm4^a	n.d.	< 0,001**
Cetonas													
13	6-Metil-5-hepten-2-ona	20 \pm 6 ^{a,A}	1499 \pm 569 ^{c,A}	358 \pm 177 ^{b,A}	318 \pm 182 ^{a,b,A}	265 \pm 108 ^{b,A}	< 0,001**	15 \pm 3 ^{a,A}	1173 \pm 409 ^{b,A}	559 \pm 90 ^{b,B}	689 \pm 180 ^{b,B}	548 \pm 242 ^{b,B}	< 0,001**
	Σ cetonas	20\pm6^{a,A}	1499\pm569^{c,A}	358\pm177^{b,A}	318\pm182^{a,b,A}	265\pm108^{b,A}	< 0,001**	15\pm3^{a,A}	1173\pm409^{b,A}	559\pm90^{b,B}	689\pm180^{b,B}	548\pm242^{b,B}	< 0,001**
Derivados de norisoprenóides													
14	β -Citral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	67 \pm 28 ^a	74 \pm 20 ^a	97 \pm 32 ^a	104 \pm 46 ^a	0,183*

15	β-Ciclocitral	n.d.	9±1 ^A	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	10±2 ^A	n.d.	n.d.	n.d.	-
16	(Z)-Geranilacetona	n.d.	n.d.	11±6 ^{a,A}	7±1 ^{a,A}	9±3 ^{a,A}	0,439*	n.d.	25±12 ^{a-b}	17±5 ^{a-b,A}	21±3 ^{b,B}	14±3 ^{a,B}	0,014**
Σ derivados de norisoprenóides		n.d.	9±1^{a,A}	11±6^{a,A}	7±1^{a,A}	9±3^{a,A}	0,539*	n.d.	102±41^{a,B}	90±18^{a,B}	118±34^{a,B}	118±48^{a,B}	0,501*
<hr/>													
Ésteres													
17	Ácido hexanóico metil éster	n.d.	n.d.	17±4 ^{a,A}	14±3 ^{a,A}	n.d.	0,120*	27±6 ^b	13±1 ^a	15±3 ^{a,A}	12±3 ^{a,A}	13±3 ^a	< 0,001*
18	(Z)-3-ácido hexenóico metil éster	647±376 ^A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	612±237 ^A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
19	(Z)-3-hexenil acetato	8672±2184 ^{b,A}	202±19 ^{a,A}	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,001*	10353±1429 ^{b,A}	627±257 ^{a,B}	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,001*
20	Ácido acético hexil éster	57±21 ^{a,A}	84±45 ^{a,A}	61±15 ^{a,A}	53±14 ^{a,A}	51±11 ^{a,A}	0,475**	61±8 ^{a,A}	51±10 ^{a,A}	61±9 ^{a,A}	55±8 ^{a,A}	53±10 ^{a,A}	0,207*
21	Ácido butanóico, (Z)-3-hexenil éster	878±584 ^{b,A}	66±27 ^{a,A}	n.d.	n.d.	n.d.	0,019*	368±113 ^{b,A}	73±26 ^{a,A}	n.d.	n.d.	n.d.	0,001**
22	Ácido butanóico hexil éster	13±3 ^{a,A}	27±11 ^{a,A}	15±1 ^{a,A}	15±5 ^{a,A}	17±2 ^{a,A}	0,020**	28±14 ^{b,B}	16±3 ^{a,A}	19±2 ^{a,b,B}	21±3 ^{a,b,B}	20±2 ^{a,b,B}	0,035*
23	(Z)-3-hexenil isovalerato	150±93 ^{b,A}	47±30 ^{a,A}	n.d.	n.d.	n.d.	0,041*	94±49 ^{b,A}	28±15 ^{a,A}	n.d.	n.d.	n.d.	0,011*
24	Ácido butanóico 2-metil hexil éster	n.d.	25±10 ^{b,A}	13±1 ^{a,A}	16±4 ^{a-b,A}	19±2 ^{a-b,A}	0,008*	16±3 ^a	16±4 ^{a,A}	19±4 ^{a,A}	19±5 ^{a,A}	22±4 ^{a,A}	0,137*
Σ ésteres		10416±2995^{c,A}	450±73^{b,A}	105±21^{a,A}	98±24^{a,A}	87±12^{a,A}	< 0,001**	11561±1700^{c,A}	824±261^{b,B}	113±16^{a,A}	107±15^{a,A}	108±12^{a,B}	< 0,001**
<hr/>													
Sesquiterpenos													
25	α-Ilangeno	n.d.	n.d.	n.d.	10±3	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7±1	-
26	Copaeno	n.d.	n.d.	n.d.	6±2	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
27	Cariofileno	390±74 ^{b,A}	10±4 ^{a,A}	12±9 ^{a,A}	13±4 ^{a,A}	356±130 ^{b,A}	< 0,001**	548±332 ^{a,A}	719±309 ^{a,B}	544±198 ^{a,B}	489±189 ^{a,B}	397±71 ^{a,A}	0,248*
28	Sesquiterpeno 1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	21±5 ^{a,b}	24±10 ^b	17±6 ^{a,b}	14±4 ^{a,b}	13±4 ^a	0,018*
29	α-Cariofileno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	18±6 ^A	-	25±16 ^a	31±14 ^a	26±10 ^a	24±10 ^a	22±8 ^{a,A}	0,701*
30	α-Farnesene	n.d.	n.d.	n.d.	4±1 ^a	5±2 ^a	0,188*	4±1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
Σ sesquiterpenos		390±74^{c,A}	10±4^{a,A}	12±9^{a,A}	32±7^{b,A}	378±138^{c,A}	< 0,001**	599±352^{a,A}	775±332^{a,B}	587±214^{a,B}	527±203^{a,B}	440±77^{a,A}	0,264*
<hr/>													
Terpenos													
31	psi-Cumeno	86±13 ^{c,B}	57±6 ^{b,A}	46±3 ^{a,b,A}	44±5 ^{a,A}	44±3 ^{a,A}	< 0,001*	70±10 ^{c,A}	63±13 ^{b,c,A}	53±10 ^{a,b,A}	51±5 ^{a,b,A}	47±4 ^{a,A}	0,001*
32	β-Cimeno	n.d.	30±14 ^{b,B}	26±8 ^{a-b,A}	21±5 ^{a-b,A}	13±2 ^{a,A}	0,019*	44±6 ^b	15±2 ^{a,A}	19±3 ^{a,A}	17±4 ^{a,A}	17±4 ^{a,A}	< 0,001*
33	Limoneno	n.d.	37±10 ^{a-b,A}	24±9 ^{a,A}	43±18 ^{b,B}	25±5 ^{a-b,A}	0,024*	25±15 ^a	215±52 ^{b,B}	19±5 ^{a,A}	19±7 ^{a,A}	26±7 ^{a,A}	< 0,001**

34	Linalol	n.d.	12±4 ^{b,A}	7±2 ^{a,A}	6±2 ^{a,A}	5±1 ^{a,A}	0,001*	n.d.	11±1 ^{b,A}	8±1 ^{a,A}	12±6 ^{a-b,A}	11±4 ^{a-b,B}	0,007**
35	L-Mentol	n.d.	n.d.	6±2 ^a	5±1 ^{a,A}	n.d.	0,198*	n.d.	n.d.	n.d.	7±2 ^{b,B}	5±1 ^a	0,041*
Σ terpenos		86±13^{a,A}	135±9^{b,A}	108±17^{a,b,A}	119±27^{b,A}	88±9^{a,A}	< 0,001*	139±30^{a,B}	304±64^{b,B}	100±9^{a,A}	106±16^{a,A}	106±12^{a,B}	< 0,001**
Outros compostos													
36	p-Xileno	n.d.	n.d.	70±10 ^{a,A}	59±14 ^{a,A}	64±22 ^{a,A}	0,484*	n.d.	53±7 ^a	68±15 ^{a,A}	73±17 ^{a,A}	66±24 ^{a,A}	0,256*
37	Undecano	240±49 ^{b,A}	91±29 ^{a,A}	79±9 ^{a,A}	100±22 ^{a,A}	108±19 ^{a,A}	< 0,001**	205±32 ^{b,A}	128±44 ^{a,A}	102±43 ^{a,A}	99±14 ^{a,A}	107±21 ^{a,A}	< 0,001*
Σ outros compostos		240±49^{c,A}	91±29^{a,A}	149±6^{b,A}	159±15^{b,c,A}	172±13^{c,A}	< 0,001**	205±32^{a,A}	181±49^{a,B}	170±49^{a,A}	172±13^{a,A}	174±9^{a,A}	0,414*
Voláteis totais		16580±4422^{c,A}	3119±663^{b,A}	1515±421^{a,A}	1296±288^{a,A}	1550±154^{a,A}	< 0,001**	18435±3272^{c,A}	4516±1036^{b,B}	2391±286^{a,B}	2570±437^{a,B}	2210±397^{a,B}	< 0,001**

n.d. – não detetado;

* $P > 0,05$ através do teste de Levene. Os valores de P são aqueles obtivos através da análise de variâncias univariada (one-way ANOVA). As médias foram comparadas usando o teste de Tukey pois uma igualdade de variâncias pôde ser assumida.

** $P < 0,05$ através do teste de Levene. Os valores de P são aqueles obtivos através da análise de variâncias univariada (one-way ANOVA) com correção de Welch. As médias foram comparadas usando o teste de Dunnett T3 pois uma igualdade de variâncias não pôde ser assumida.

^{a-c} Para cada composto, dentro de uma mesma linha e na mesma variedade, valores médios com letras minúsculas diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$).

^{A-B} Para cada composto, dentro de uma mesma linha e entre as variedades, valores médios com letras maiúsculas diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$).

Quando as folhas foram submetidas a branqueamento os GLV's maioritários referidos anteriormente são praticamente excluídos do perfil volátil (Tabela 9), apenas o (Z)-3-hexenil acetato e o ácido butanóico (Z)-3-hexenil éster é que se mantém. Entre 97,7% e 93,9% dos teores do (Z)-3-hexenil acetato foram perdidos respetivamente nas castas Malvasia Fina e Touriga Franca, e entre 92,5% e 80,2% do ácido butanóico (Z)-3-hexenil éster foi perdido nas mesmas castas. Esta redução poderá dever-se à inativação das enzimas que intervém no mecanismo da LOX devido à imersão das folhas em água quente, provocando a desnaturação das enzimas (Salas & Sánchez, 1999).

Em sentido contrário aos GLV's, há um aumento abrupto no teor da única cetona identificada, a 6-metil-5-hepten-2-ona (Tabela 9). Esta cetona, que apresentou valores com diferenças significativas ($P < 0,001$) semelhante nas duas castas, sobe de 20 para 1499 $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ na Malvasia Fina e de 15 para 1173 $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ na Touriga Franca quando as folhas são branqueadas. Após o branqueamento, todos os cozimentos mantiveram valores inferiores a este tipo de processamento, que por diferenças estatísticas entre as castas, no mesmo tratamento, C1 ($P = 0,032$), C2 ($P = 0,005$) e C3 ($P = 0,026$) foram maiores para a casta tinta. Este aumento deveu-se ao branqueamento das folhas, visto a cetona 6-metil-5-hepten-2-ona ser característica em produtos de origem vegetal em processos de branqueamento (Mir et al., 1999; Whitaker & Saftner, 2000) com vista à sua conservação. Em pimento vermelho em pó, Cremer & Eichner (2000) verificaram teores de 6-metil-5-hepten-2-ona a rondar os 400-600 $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ após 60 minutos de aquecimento a 90 °C, bem superior aos 200 $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ verificados nas amostras frescas.

A partir do momento em que as folhas de videira foram submetidas a branqueamento também se verificou o aparecimento de pentanal em quantidades apreciáveis (Tabela 9), do qual não reportou diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos, em ambas as castas. Todavia os tratamentos C2 e C3 da casta tinta obtiveram valores superiores, deste composto, frente a casta branca, o qual é comprovado pela diferença estatística destes cozimentos ($P = 0,006$ e $P < 0,001$, respetivamente). Este aldeído foi o mais abundante nesta classe química nas amostras processadas (branqueamento e cozimento) reportando para Malvasia Fina e Touriga Franca 502 e 630 $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ respetivamente nas amostras branqueadas (Tabela 9). Este aldeído foi também um dos principais voláteis resultantes do cozimento de outros vegetais, como brócolos e espinafres (Hansen et al., 1997; Kebede et al., 2013).

No que refere às amostras cozidas, a cetona 6-metil-5-hepten-2-ona e o pentanal, os principais produtos do aquecimento das folhas de videira, de uma maneira geral vão-se reduzindo com o tempo de aquecimento, muito provavelmente devido à degradação dos mesmos. Um composto volátil que se mantém em todas as amostras e em que se conserva com o tratamento térmico, especialmente na Touriga Franca, é o sesquiterpeno cariofileno. Este composto variou entre 10 e 390 $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ na Malvasia Fina (amostras branqueadas e frescas respetivamente), a qual diferiu estatisticamente ($P < 0,001$) dentre os tratamentos, e entre 397 e 719 $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ na Touriga Franca (C3 e folhas branqueadas respetivamente), casta da qual não apresentou diferenças estatísticas ($P > 0,05$) entre as amostras. Na Malvasia Fina, o cariofileno foi mesmo o composto volátil mais abundante em C3 (Tabela 9). Este sesquiterpeno é responsável pelo odor característico a madeira (Acree & Arn, 2015), um odor que se notava em todas as amostras em estudo, significativamente mais notável na Touriga Franca no branqueamento, C1 e C2, comprovadamente a partir das diferenças estatísticas ($P = 0,002$; $P < 0,001$ e $P = 0,002$, respetivamente) dos tratamentos entre as castas.

Através de uma observação geral verifica-se que a Touriga Franca tem um maior teor em compostos voláteis totais comparativamente com Malvasia Fina em todas as amostras estudadas. Os teores de voláteis totais variaram entre 1296 e 16580 $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ em C2 e nas folhas frescas na Malvasia Fina, enquanto na Touriga Franca variaram entre 2210 e 18435 $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ no C3 e nas folhas frescas respetivamente. A comprovação deste fato é visível a partir das diferenças estatísticas entre os tratamentos como o branqueamento ($P = 0,019$), C1 ($P = 0,002$), C2 ($P < 0,001$) e C3 ($P = 0,004$), onde somente as folhas frescas é que não apresentaram tais diferenças ($P > 0,05$).

Capítulo 5



Conclusões

5.1. CONCLUSÕES

No presente trabalho, uma avaliação entre diversas variedades, as castas brancas avaliadas foram aquelas que apresentaram melhores respostas à atividade antioxidante e composição em compostos bioativos. Deste modo, a melhor casta selecionada para processamento alimentar foi a Malvasia Fina, juntamente com uma casta tinta, Touriga Franca, que apresentou os resultados mais baixos.

Com as diferentes condições em que as folhas foram submetidas, pode-se avaliar que a Malvasia Fina foi a casta que apresentou melhores resultados para a atividade antioxidante e compostos fenólicos. A Touriga Franca, apesar de ter demonstrado os mais baixos resultados, foi a casta que obteve uma maior estabilidade dos compostos nos cozimentos, do qual o C3 apresentou valores próximos e algumas vezes superior, ao mesmo tratamento, na casta branca.

Em análise à colorimetria, clorofilas e carotenoides, a casta branca obteve melhores resultados. Apesar de diferenças mínimas entre os valores obtidos, a casta tinta teve uma maior perda no teor de clorofilas totais, do qual foi diretamente refletido na colorimetria das folhas. Com o aquecimento, os pigmentos sofrem uma redução acentuada nos seus teores.

A Touriga Franca é a casta com maiores valores no total em ácidos gordos, do qual pode ter refletido nos maiores valores em voláteis totais após o branqueamento. Esta mesma relação foi encontrada com os tofoceróis e tocotrienóis, resultando em maiores teores de vitamina E livre total para esta casta, incrementando os seus teores com o aquecimento.

Com excessivos cozimentos, pode-se concluir que a Touriga Franca é a casta mais aconselhável para este processamento, visto que sua atividade antioxidante e composição química e em compostos bioativos, em combinação, têm maior destaque frente a Malvasia Fina. Quando analisado do branqueamento a cozimentos moderados, a casta branca é a mais adequada. Podemos também concluir que o cozimento a 60 minutos poderia ser um bom tratamento, visto que as folhas se tornam edíveis e com apreciáveis teores em muitos componentes presentes nas folhas.

Capítulo 6

Referências

- A Uva. (n.d.). Retrieved June 28, 2015, from <http://vinalia.com.br/Artigos/artigos.painel.asp?tp=181>
- Acree, T., & Arn, H. (2015). Flavornet and human odor space. Retrieved November 13, 2015, from <http://www.flavornet.org/index.html>
- Ali, K., Maltese, F., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochemistry Reviews*, 9, 357–378.
- Alonso, R., Berli, F. J., Bottini, R., & Piccoli, P. (2015). Acclimation mechanisms elicited by sprayed abscisic acid, solar UV-B and water deficit in leaf tissues of field-grown grapevines. *Plant Physiology and Biochemistry*, 91, 56–60.
- AOAC. (1995). *Official methods of analysis* (16th ed.). Arlington: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. (W. Horwitz, Ed.) (17th ed., Vol. II). Arlington: Association of Official Analytical Chemists.
- Arabshahi-Delouee, S., & Urooj, A. (2007). Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry*, 102, 1233–1240.
- Arnold, C., Schwarzenbolz, U., & Böhm, V. (2014). Carotenoids and chlorophylls in processed xanthophyll-rich food. *LWT - Food Science and Technology*, 57, 442–445.
- Balík, J., Kyseláková, M., Vrchotová, N., Tříška, J., Kumšta, M., Veverka, J., Híc, P., Totušek, J., Lefnerová, D. (2008) Relations between Polyphenols Content and Antioxidant Activity in Vine Grapes and Leaves. *Czech Journal of Food Sciences*, 26, 25–32.
- Berker, K. I., Güçlü, K., Tor, I., & Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72, 1157–1165.
- Berli, F. J., Fanzone, M., Piccoli, P., & Bottini, R. (2011). Solar UV-B and ABA are involved in phenol metabolism of *Vitis vinifera* L. Increasing biosynthesis of berry skin polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 4874–4884.
- Boulanouar, B., Abdelaziz, G., Aazza, S., Gago, C., & Miguel, M. G. (2013). Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products*, 46, 85–96.
- Cremer, D. R., & Eichner, K. (2000). Formation of volatile compounds during heating of spice paprika (*Capsicum annuum*) powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2454–60.
- Cruz, R., Casal, S., Mendes, E., Costa, A., Santos, C., & Morais, S. (2013). Validation of a Single-Extraction Procedure for Sequential Analysis of Vitamin E, Cholesterol, Fatty Acids, and Total Fat in Seafood. *Food Analytical Methods*, 6, 1196–1204.

- Dani, C., Oliboni, L. S., Agostini, F., Funchal, C., Serafini, L., Henriques, J. a., & Salvador, M. (2010). Phenolic content of grapevine leaves (*Vitis labrusca* var. Bordo) and its neuroprotective effect against peroxide damage. *Toxicology in Vitro*, *24*, 148–153.
- Decreto-Lei nº 167/2004 de 7 de Julho do Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas, Pub. L. No. Diário da República : I Série-A, n.º158 (2004).
- Deliorman Orhan, D., Orhan, N., Özçelik, B., & Ergun, F. (2009). Biological activities of *Vitis vinifera* L. leaves. *Turkish Journal of Biology*, *33*, 341–348.
- Dogan, Y., Nedelcheva, A., Łuczaj, Ł., Drăgulescu, C., Stefkov, G., Maglajlić, A., Ferrier, J., Papp, N., Hajdari, A., Mustafa, B., Dajić-Stevanović, Z., Pieroni, A. (2015). Of the importance of a leaf: the ethnobotany of sarma in Turkey and the Balkans. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, *11*, 26.
- Dresch, R. R., Dresch, M. K., Guerreiro, A. F., Biegelmeier, R., Holzschuh, M. H., Rambo, D. F., & Henriques, A. T. (2014). Phenolic Compounds from the Leaves of *Vitis labrusca* and *Vitis vinifera* L. as a Source of Waste Byproducts: Development and Validation of LC Method and Antichemotactic Activity. *Food Analytical Methods*, *7*, 527–539.
- El, S. N., Kavas, A., & Karakaya, S. (1997). Nutrient Composition of Stuffed Vine Leaves: A Mediteranean Dietary. *Journal of Food Quality*, *20*, 337–341.
- FAO. (2013). FaoStat Database. Retrieved June 29, 2015, from <http://faostat3.fao.org/>
- Fernandes, F., Ramalhosa, E., Pires, P., Verdial, J., Valentão, P., Andrade, P., Bento, A., Pereira, J. A. (2013). *Vitis vinifera* leaves towards bioactivity. *Industrial Crops and Products*, *43*, 434–440.
- Ferrandino, A., & Lovisolo, C. (2014). Abiotic stress effects on grapevine (*Vitis vinifera* L.): Focus on abscisic acid-mediated consequences on secondary metabolism and berry quality. *Environmental and Experimental Botany*, *103*, 138–147.
- Gil, M., Pontin, M., Berli, F., Bottini, R., & Piccoli, P. (2012). Metabolism of terpenes in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) leaf tissues to UV-B radiation. *Phytochemistry*, *77*, 89–98.
- Griesser, M., Weingart, G., Schoedl-Hummel, K., Neumann, N., Becker, M., Varmuza, K., Liebner, F., Schuhmacher, R., Forneck, A. (2015). Severe drought stress is affecting selected primary metabolites, polyphenols, and volatile metabolites in grapevine leaves (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir). *Plant Physiology and Biochemistry*, *88*, 17–26.
- Güler, A., & Candemir, A. (2014). Total Phenolic and Flavonoid Contents , Phenolic Compositions and Color Properties of Fresh Grape Leaves. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*, *6*, 778–782.

- Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *476*, 107–112.
- Hansen, M., Laustsen, A., Olsen, C., Poll, L., & Sorensen, H. (1997). Chemical and sensory quality of broccoli (*Brassica oleracea* L. var *Italica*). *Journal of Food Quality*, *20*, 441–459.
- Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., & Okuda, T. (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, *36*, 2090–2097.
- Horvath, G., Wessjohann, L., Bigirimana, J., Jansen, M., Guisez, Y., Caubergs, R., & Horemans, N. (2006). Differential distribution of tocopherols and tocotrienols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Phytochemistry*, *67*, 1185–1195.
- Huang, D., Boxin, O. U., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 1841–1856.
- IFOAM. (2014). The IFOAM norms for organic production and processing. Retrieved November 9, 2015, from <http://www.ifoam.bio/en/ifoam-norms>
- Ikawa, M., Schaper, T. D., Dollard, C. a., & Sasner, J. J. (2003). Utilization of folin-ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 1811–1815.
- Ismail, A., Marjan, Z., & Foong, C. (2004). Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry*, *87*, 581–586.
- ISO 5983-1. (2005). Animal feeding stuff - Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content - Part 1 Kjeldahl method. *International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland*.
- Iyer, M. M., Sacks, G. L., & Padilla-Zakour, O. I. (2010). Impact of Harvesting and Processing Conditions on Green Leaf Volatile Development and Phenolics in Concord Grape Juice. *Journal of Food Science*, *75*, 297–304.
- Jeandet, P., Douillet-Breuil, A. C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., & Adrian, M. (2002). Phytoalexins from the vitaceae: Biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 2731–2741.
- Katalinić, V., Generalić, I., Skroza, D., Ljubenković, I., Teskera, A., Konta, I., & Boban, M. (2009). Insight in the phenolic composition and antioxidative properties of *Vitis vinifera* leaves extracts. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, *1*, 7–15.
- Katalinic, V., Mozina, S. S., Generalic, I., Skroza, D., Ljubenković, I., & Klancnik, A. (2013). Phenolic Profile, Antioxidant Capacity, and Antimicrobial Activity of Leaf Extracts from Six *Vitis vinifera* L. Varieties. *International Journal of Food Properties*, *16*, 45–60.

- Kebede, B. T., Grauwet, T., Palmers, S., Vervoort, L., Carle, R., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2014). Effect of high pressure high temperature processing on the volatile fraction of differently coloured carrots. *Food Chemistry*, *153*, 340–352.
- Kebede, B. T., Grauwet, T., Tabilo-Munizaga, G., Palmers, S., Vervoort, L., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2013). Headspace components that discriminate between thermal and high pressure high temperature treated green vegetables: Identification and linkage to possible process-induced chemical changes. *Food Chemistry*, *141*, 1603–1613.
- Kirca, A., Yemiş, O., & Özkan, M. (2006). Chlorophyll and colour changes in grapevine leaves preserved by passive modification. *European Food Research and Technology*, *223*, 387–393.
- Kleist, E., Mentel, T. F., Andres, S., Bohne, A., Folkers, A., Kiendler-Scharr, A., Rudich, Y., Springer, M., Tillmann, R., Wildt, J. (2012). Irreversible impacts of heat on the emissions of monoterpenes, sesquiterpenes, phenolic BVOC and green leaf volatiles from several tree species. *Biogeosciences*, *9*, 5111–5123.
- Kosar, M., Küpeli, E., Malyer, H., Uylaser, V., Türkben, C., & Baser, K. H. C. (2007). Effect of Brining on Biological Activity of Leaves of *Vitis vinifera* L. (Cv. Sultani Cekirdeksiz) from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 4596–4603.
- Kotovicz, V., & Zanoelo, E. F. (2013). Hydrostatic pressure cycling extraction of soluble matter from mate leaves. *Journal of Food Engineering*, *116*, 656–665.
- López, M. L., Villatoro, C., Fuentes, T., Graell, J., Lara, I., & Echeverría, G. (2007). Volatile compounds, quality parameters and consumer acceptance of “Pink Lady®” apples stored in different conditions. *Postharvest Biology and Technology*, *43*, 55–66.
- Maiani, G., Castón, M. J. P., Catasta, G., Toti, E., Cambrodón, I. G., Bysted, A., Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., Böhm, V., Mayer-Miebach, E., Behnlian, D., Schlemmer, U. (2009). Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, *53*, S194–S218.
- Matsui, K. (2006). Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, *9*, 274–280.
- Middleton Jr., E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacological Reviews*, *52*, 673–751.
- Milardović, S., Iveković, D., & Grabarić, B. S. (2006). A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, *68*, 175–180.

- Mir, N., Perez, R., & Beaudry, R. M. (1999). A poststorage burst of 6-methyl-5-hepten-2-one (MHO) may be related to superficial scald development in “Cortland” apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *124*, 173–176.
- Monagas, M., Garrido, I., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2006). Chemical characterization of commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. *Analytica Chimica Acta*, *563*, 401–410.
- Monagas, M., Hernández-Ledesma, B., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2006). Commercial Dietary Ingredients from *Vitis vinifera* L. Leaves and Grape Skins: Antioxidant and Chemical Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 319–327.
- Monteiro, J. M., Albuquerque, U. P. de, Araújo, E. de L., & Amorim, E. L. C. de. (2005). Taninos: Uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, *28*, 892–896.
- Niinemets, U., Kännaste, A., & Copolovici, L. (2013). Quantitative patterns between plant volatile emissions induced by biotic stresses and the degree of damage. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 262.
- Orhan, N., Aslan, M., Orhan, D. D., Ergun, F., & Yeşilada, E. (2006). In-vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of grapevine leaves (*Vitis vinifera*) in diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *108*, 280–286.
- Ozerol, N. H., & Titus, J. F. (1965). The determination of total chlorophyll in methanol extracts. *Transactions Illinois State Academy of Sciences*, *58*, 15–19.
- Pari, L., & Suresh, A. (2008). Effect of grape (*Vitis vinifera* L.) leaf extract on alcohol induced oxidative stress in rats. *Food and Chemical Toxicology*, *46*, 1627–1634.
- Pereira, J. A., Pereira, A. P. G., Ferreira, I. C. F. R., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A. (2006). Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential, and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 8425–31.
- Poppitt, S. D., Kilmartin, P., Butler, P., & Keogh, G. F. (2005). Assessment of erythrocyte phospholipid fatty acid composition as a biomarker for dietary MUFA, PUFA or saturated fatty acid intake in a controlled cross-over intervention trial. *Lipids in Health and Disease*, *4*, 30.
- Rencher, A. C. (1995). *Methods of Multivariate Analysis*. Nova Iorque, E.U.A: John Willey.
- Riaz, S., Doligez, A., Henry, R. J., & Walker, M. A. (2007). *Fruits and Nuts*. (C. Kole, Ed.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Rice-Evans, C. a., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radical Biology and Medicine*, *20*, 933–956.

- Roidaki, A., Zoumpoulakis, P., & Proestos, C. (2015). Comparison of extraction methods for the determination of antioxidant activity in extracts of *hippophae rhamnoides* L. and *Lippia Citriodora*. The effect of seasonal collection. *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3, 1–8.
- Romero, M. J., Madrid, J., Hernández, F., & Cerón, J. J. (2000). Digestibility and voluntary intake of vine leaves (*Vitis vinifera* L.) by sheep. *Small Ruminant Research*, 38, 191–195.
- Salas, J. J., & Sánchez, J. (1999). The decrease of virgin olive oil flavor produced by high malaxation temperature is due to inactivation of hydroperoxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 809–812.
- Samaniego Sánchez, C., Troncoso González, A. M., García-Parrilla, M. C., Quesada Granados, J. J., López García de la Serrana, H., & López Martínez, M. C. (2007). Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta*, 593, 103–107.
- Sat, I. G., Sengul, M., & Keles, F. (2002). Use of Grape Leaves in Canned Food. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1, 257–262.
- Seigler, D. S. (2012). *Plant Secondary Metabolism*.
- Simopoulos, A. P. (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 560–569.
- Singleton, V. L., & Rossi, Joseph A., J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Soares, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, 15, 71–81.
- Spence, C., Levitan, C. A., Shankar, M. U., & Zampini, M. (2010). Does Food Color Influence Taste and Flavor Perception in Humans? *Chemosensory Perception*, 3, 68–84.
- Steimetz, E., Trouvelot, S., Gindro, K., Bordier, A., Poinssot, B., Adrian, M., & Daire, X. (2012). Influence of leaf age on induced resistance in grapevine against *Plasmopara viticola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 79, 89–96.
- Taware, P. B., Dhumal, K. N., Oulkar, D. P., Patil, S. H., & Banerjee, K. (2010). Phenolic Alterations in Gape Leaves, Berries and Wines Due to Foliar and Cluster Powdery Mildew Infections. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1, 1–10.
- Teixeira, A. H. D. C., Souza, R. A. De, Ribeiro, P. H. B., Reis, V. C. da S., & Santos, M. das G. L. dos. (2002). Aptidão agroclimática da cultura da videira no Estado da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola E Ambiental*, 6, 107–111.

- Tříška, J., Vrchotová, N., Olejníčková, J., Jílek, R., & Sotolář, R. (2012). Separation and Identification of Highly Fluorescent Compounds Derived from trans-Resveratrol in the Leaves of *Vitis vinifera* Infected by *Plasmopara viticola*. *Molecules*, *17*, 2773–2783.
- Turkmen, N., Sari, F., & Velioglu, Y. S. (2005). The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry*, *93*, 713–718.
- Ünver, A., Özcan, M., Arslan, D., & Akin, A. (2007). The Lactic Acid Fermentation of Three Different Grape Leaves Grown in Turkey. *Journal of Food Processing and Preservation*, *31*, 73–82.
- Vine Leaf Rolls Stuffed with Flavored Rice. (2011). Retrieved June 28, 2015, from <https://kitchenpress.wordpress.com/2011/02/26/vine-leaf-rolls-stuffed-with-flavored-rice/>
- Weber, B., Hoesch, L., & Rast, D. M. (1995). Protocatechualdehyde and other phenols as cell wall components of grapevine leaves. *Phytochemistry*, *40*, 433–437.
- Weemaes, C. a., Ooms, V., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (1999). Kinetics of chlorophyll degradation and color loss in heated broccoli juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 2404–2409.
- Whitaker, B. D., & Saftner, R. a. (2000). Temperature-dependent autoxidation of conjugated trienols from apple peel yields 6-methyl-5-hepten-2-one, a volatile implicated in induction of scald. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 2040–2043.
- Widmer, T. L., & Laurent, N. (2006). Plant extracts containing caffeic acid and rosmarinic acid inhibit zoospore germination of *Phytophthora* spp. pathogenic to *Theobroma cacao*. *European Journal of Plant Pathology*, *115*, 377–388.
- Zamora, R., Olmo, C., Navarro, J. L., & Hidalgo, F. J. (2004). Contribution of phospholipid pyrrolization to the color reversion produced during deodorization of poorly degummed vegetable oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 4166–4171.