



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Rita Lopes Poeira

A ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS FRAMBOESAS

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar orientada pelo Professor Doutor Fernando Jorge dos Ramos, e pela Professora Doutora Maria Eduardo Costa Morgado Figueira e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2020



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Rita Lopes Poeira

A ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS FRAMBOESAS

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar orientada pelo Professor Doutor Fernando Jorge dos Ramos e pela Professora Doutora Maria Eduardo Costa Morgado Figueira e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2020

Agradecimentos

Desejo exprimir os meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que esta tese se concretizasse. Agradeço em particular:

Aos meus orientadores Professor Doutor Fernando Ramos, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, e à Professora Doutora Maria Eduardo Figueira, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, por terem aceite este desafio e terem contribuído para este trabalho. Agradeço ainda o trato simples, correto e científico, com que sempre abordaram as nossas reuniões de trabalho.

Ao laboratório da Faculdade de Farmácia de Lisboa, nomeadamente à Professora Doutora Maria Eduardo Figueira, em particular à Doutora Rosa Direito. À Cátia, pelo companheirismo e ajuda no trabalho experimental desenvolvido.

Às minhas amigas e amigos agradeço as longas conversas, os telefonemas e preocupação, assim como o incentivo ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais e irmãos, pelo suporte incondicional e encorajamento nos momentos mais desafiantes. À minha avó, pelas palavras reconfortantes.

E aos meus avós, que decerto teriam ficado felizes por este momento.

A todos, os meus mais sinceros agradecimentos.

Nota introdutória

Este trabalho começou por ter como objetivo a avaliação da influência da framboesa vermelha (*Rubus Idaeus* L.) em humanos, em marcadores de oxidação e inflamação. Assim, queríamos caracterizar o fruto relativamente ao seu conteúdo em vitamina C e compostos fenólicos, descritos como responsáveis por atividade antioxidante e anti-inflamatória. Posteriormente seria avaliado o stress oxidativo e inflamatório provocado por uma refeição muito calórica, rica em açúcar e gordura, e, em seguida, o efeito da ingestão de framboesas durante 30 dias pelos mesmos voluntários. Este trabalho seria feito em colaboração com a Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, sob orientação da Senhora Professora Doutora Maria Eduardo Figueira e do Senhor Professor Doutor Fernando Ramos.

Infelizmente, pouco após o início do trabalho experimental o estado de emergência foi declarado a 19 de março e prolongou-se até maio. As atividades letivas das Faculdades foram suspensas até ao final do ano letivo 2019-20. Mesmo com a reabertura dos laboratórios para terminar alguns trabalhos, estava posto fora de questão fazer ensaios clínicos com voluntários e, por isso, não foi possível realizar esse capítulo importante desta tese tendo sido somente realizado a determinação dos compostos fenólicos da framboesa e alguns ensaios de capacidade antioxidante.

Pelo exposto, resolvemos dar um rumo diferente à tese que dividimos em 2 capítulos:

Capítulo I – Revisão da literatura dos efeitos biológicos das framboesas

Capítulo II – Fenóis totais e capacidade antioxidante da framboesa

Neste Capítulo II apresentamos o trabalho laboratorial que desenvolvemos até ser declarada a pandemia.

Resumo

Uma das estratégias no combate a doenças crônicas não transmissíveis, nomeadamente doenças cardiovasculares, passa pela introdução de frutas, como a framboesa, na alimentação diária. Estudos *in vitro* e *in vivo* revelaram vários mecanismos através dos quais antocianinas e elagitaninos, compostos fenólicos presentes em extratos de framboesa vermelha (ou o fruto inteiro) poderiam reduzir o risco de desenvolvimento precoce destas doenças.

Os compostos fenólicos ou polifenóis são compostos bioativos que possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Têm sido referidos pelo efeito inibitório no desenvolvimento de doenças crônicas. O consumo regular de polifenóis, pode contribuir para efeitos benéficos na saúde, através da sua capacidade de inibir o stress oxidativo e também pela sua ação anti-inflamatória, duas ações importantes na prevenção do desenvolvimento de doenças cardiovasculares e de cancro.

Os frutos vermelhos, onde se incluem as framboesas, são ricos em compostos fenólicos e, consequentemente lhe estão atribuídas propriedades muito importantes para a saúde, para além das nutricionais. No entanto, um dos problemas da sua atividade nos humanos é a pouca biodisponibilidade dos compostos fenólicos.

Embora existam várias evidências para o benefício do consumo destes frutos na saúde humana, ainda existe a necessidade de serem feitos mais estudos que consolidem dados e clarifiquem as doses e os mecanismos de ação.

O objetivo deste trabalho é fazer uma revisão bibliográfica sobre o conteúdo fenólico da framboesa vermelha, nomeadamente a espécie *Rubus Idaeus sp*, e relacioná-lo com a atividade antioxidante e anti-inflamatória deste fruto e a sua ação na promoção da saúde e na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis e também de outras doenças.

É também objetivo mostrar os resultados preliminares de conteúdo em fenóis totais e capacidade antioxidante de extrato fenólico de framboesa.

Palavras-chave: Framboesas Vermelhas, compostos fenólicos, atividade antioxidante e efeitos biológicos, alimento funcional.

Abstract

One of the strategies in the fight against chronic non-communicable diseases, namely cardiovascular diseases, is the introduction of fruits, such as raspberries, in the daily diet. *In vitro* and *in vivo* studies have revealed several mechanisms through which anthocyanins and ellagitannins, phenolic compounds present in red raspberry extracts (or the whole fruit) could reduce the risk of early development of these diseases.

Phenolic compounds or polyphenols are bioactive compounds that have antioxidant and anti-inflammatory properties. They have been reported to have an inhibitory effect on the development of chronic diseases. Regular consumption of polyphenols can contribute to beneficial effects on health, through its ability to inhibit oxidative stress and also by its anti-inflammatory action, two important actions in preventing the development of cardiovascular diseases and cancer.

The red fruits, where raspberries are included, are rich in phenolic compounds and, consequently, are attributed to them very important properties for health, in addition to nutritional. However, one of the problems with its activity in humans is the low bioavailability of phenolic compounds.

Although there is ample evidence for the benefit of consuming these fruits on human health, there is still a need for further studies to consolidate data and clarify doses and mechanisms of action.

The objective of this work is to make a bibliographic review on the phenolic content of red raspberry, namely the species *Rubus Idaeus sp*, and to relate it to the antioxidant and anti-inflammatory activity of this fruit and its action in promoting health and preventing chronic non-communicable diseases and also other diseases.

It is also an objective to show the preliminary results of content in total phenols and antioxidant capacity of raspberry phenolic extract.

Keywords: Red Raspberries, phenolic compounds, antioxidant activity and biological effects, functional food.

LISTA DE ABREVIATURAS

Aβ	Proteína beta amilóide
ACh	Acetilcolina
AChE	Enzima acetilcolinesterase
AChEIs	Inibidores da AChE
AGEs	Produtos finais de glicação avançada
ASP	Proteína estimuladora de acilação, Aspartato-aminotransferase
DA	Doença de Alzheimer
DCV	Doenças cardiovasculares
DEN	Dietilnitrosamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês deoxyribonucleic acid
DPPH	Composto químico orgânico 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EAG	Equivalente de ácido gálico
ECMs	Proteínas da matriz extracelular
EGCG	Galato de epigallocatequina
FF	Fruto fresco
FRAP	Poder antioxidante de redução do ferro, do inglês Fer Reduction Antioxidant Power method
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reductase
HDL	Lipoproteína de alta densidade, do inglês high density lipoproteins
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho
HPLC-PDA-MS/MS	Cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a matriz de diodos e detectores de espectrometria de massa
IL-6	Interleucina 6
JNK	C-Jun N-terminal kinase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade, do inglês Low density lipoproteins
NFκB	Fator nuclear kappaB
MAPK	Proteína quinases ativadas por mitógeno
MDA	Grupos de malondialdeído

MGO	Metilglioxal
MMPs	Metaloproteinases da matriz
PAI	Inibidor do ativador do plasminogénio
PGE2	Prostaglandina E2
RAGE	Recetores de ages
ROS	Espécies reativas de oxigénio
SOD	Superóxido dismutase
TAC	Capacidade total antioxidante
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TPC	Conteúdo fenólico total
TLR	Toll like receptor
UV	Radiação ultravioleta
UVB	Radiação ultravioleta B

Índice

1.	Introdução.....	9
1.1.	Stress oxidativo e inflamatório.....	10
1.2.	Produção de framboesa em Portugal.....	11
1.3.	A Framboesa.....	12
1.4.	Caracterização nutricional.....	13
1.5.	Fitoquímicos da Framboesa vermelha.....	15
1.5.1.	Compostos fenólicos.....	16
1.6.	Vitamina C.....	17
1.7.	Framboesa e saúde.....	17
2.	Objetivo.....	21
3.	Capítulo I – Revisão da literatura dos efeitos biológicos das framboesas.....	21
3.1.	Metodologia.....	21
3.2.	Capacidade antioxidante.....	21
3.3.	Biodisponibilidade de compostos fenólicos e a sua atividade antioxidante.....	23
3.4.	Benefícios para a saúde de framboesas vermelhas e seus componentes polifenólicos predominantes.....	26
3.4.1.	Obesidade.....	27
3.4.2.	Doenças Cardiovasculares.....	28
3.4.3.	Efeitos anticancerígenos.....	31
3.4.4.	Litíase renal.....	32
3.4.5.	Efeitos anti-glicação e neuroprotetores em frutos ricos em polifenóis (alzheimer).....	33
3.4.6.	Doença de Alzheimer e influência das framboesas.....	34
3.4.7.	Inflamação cutânea.....	36
3.4.7.1.	Ácidos gordos das framboesas vermelhas.....	37
3.4.7.2.	Uso cosmético.....	38
3.5.	Infusões de folhas de framboesas.....	39
4.	Capítulo II – Fenóis totais e capacidade antioxidante da framboesa.....	42
4.1.	Introdução.....	42
4.2.	Materiais e Métodos.....	42
4.2.1.	Amostras.....	42
4.2.2.	Reagentes e Padrões.....	42
4.2.3.	Equipamentos.....	43
4.2.4.	Preparação dos extratos de <i>Rubus Idaeus L.</i>	43

4.2.5. Determinação do Teor em Fenóis Totais.....	43
4.2.6. Determinação da atividade antioxidante	44
4.3. Resultados e discussão	44
5. Conclusão.....	50
6. Bibliografia	52
7. Anexo	63

I. Introdução

De acordo com o Instituto Nacional de Estatística, a esperança média de vida sofreu um aumento. Assim, embora vivamos mais, ainda estamos longe da viabilidade biológica da espécie (Jakobsdottir *et al.*, 2013). Estudos recentes apontam que a longevidade depende muito do cenário ambiental (hábitos alimentares, sedentarismo, consumo de tabaco e bebidas alcoólicas, entre outros), enquanto a genética é responsável por apenas 30% dela.

Nos últimos anos segundo a Organização Mundial de Saúde, as doenças crónicas não transmissíveis (DCNT) são a principal causa de morte em todo o mundo (OMS, 2003). Os estilos de vida pouco saudáveis dos tempos modernos, como a falta de exercício físico e uma má dieta, o consumo de refrigerantes com elevados teores de açúcar e de refeições pré-cozinhadas, tal como o baixo consumo de legumes e fruta são dos fatores que mais têm contribuído para o desenvolvimento precoce das DCNT no mundo inteiro, como a obesidade, diabetes *mellitus*, doenças cardiovasculares (DCV) e alguns tipos de cancro (OMS, 2003). Uma alimentação rica em vegetais e frutos, nomeadamente os pequenos frutos vermelhos é associada a uma redução acentuada do risco (Burton-Freeman, Sandhu e Edirisinghe, 2016).

Os frutos vermelhos, nomeadamente a framboesa, têm sido fortemente associados a benefícios para a saúde dos consumidores.

Os padrões de qualidade para o consumidor são limites de aceitabilidade por vezes difíceis de quantificar, variando ao longo do tempo e podendo ser influenciados por fatores culturais e sociais. Os atributos de qualidade assumem importância distinta, consoante a ótica como são perspetivados. Assim nas opções de compra os parâmetros de qualidade que assumem maior importância são o aspeto, cor, tamanho, forma, ausência de defeitos, firmeza ao toque e aroma, e nem sempre a qualidade funcional é tida em linha de conta. No entanto, o conceito de que os frutos vermelhos são alimentos muito bons para a saúde e prevenção de doenças está já bastante disseminada pela população, mas o seu consumo não é muito grande, por motivos económicos. Os frutos vermelhos como a framboesa, são caros sendo a sua comercialização limitada por muitos fatores tais como perda de firmeza, escurecimento, podridão pós-colheita, excesso de maturação, fruto deficiente ou atacado por alguma praga que altera a apresentação e erros de colheita.

1.1. *Stress* oxidativo e inflamatório

Processos oxidativos e inflamatórios têm sido implicados na etiologia de doenças crónicas não transmissíveis. No organismo inflamado gera-se *stress* oxidativo, suscetível de promover a libertação de mediadores inflamatórios e de espécies reativas adicionais, capaz de amplificar os efeitos pró inflamatórios (Hsieh e Yang, 2013).

Por outro lado, o próprio *stress* oxidativo está diretamente relacionado com o desenvolvimento de inflamação.

O endotélio está entre os tecidos mais vulneráveis ao *stress* oxidativo e às suas consequências. A disfunção endotelial e o seu papel de (des)regulação da pressão e desenvolvimento da aterosclerose no sangue, foi avaliado como um fator de risco emergente para DCV e promoveu uma pesquisa focada para formas de a controlar/regular (EFSA, 2011). Dislipidemia é um termo usado para designar todas as anomalias quantitativas ou qualitativas dos lípidos (gorduras) no sangue, no desenvolvimento e progressão de DCV, esta permanece um alvo central para intervenção e controlo em grupos de risco (Robinson *et al.*, 2014). O *stress* oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigénio e os compostos antioxidantes. O *stress* oxidativo aumenta o risco de danos oxidativos aos componentes das células, como o DNA, proteínas e lípidos, afetando a função celular, provocando mutações e/ou causando a morte celular. Tem sido demonstrado que o aumento do *stress* oxidativo que leva a danos oxidativos, tem um papel importante no início e no agravamento de DCV (Zhang, 2013) e também do cancro por mutações de DNA provocadas por oxidações das bases do DNA.

O *stress* oxidativo é fruto do desequilíbrio entre a formação exagerada de espécies reativas e a impossibilidade das enzimas antioxidantes endógenas as neutralizarem.

O *stress* oxidativo está na base do envelhecimento e das doenças a ele associadas como as DCV, neurodegenerativas e cancro. Assim, a ingestão de antioxidantes via alimentar é de primordial importância na prevenção do desenvolvimento destas doenças.

O mecanismo de inflamação é benéfico para a defesa do organismo a agressões desde que seja auto limitado. Contudo, quando a inflamação se torna persistente e exagerada está associada ao desenvolvimento de diversas doenças crónicas. (Minihane *et al.*, 2015).

Atualmente, a incidência de doenças associadas ao estilo de vida e ao meio envolvente, está a aumentar, isto pode ser derivado da nutrição inadequada e do constante aumento da poluição

ambiental. Para prevenir essas doenças, são necessários vários grupos de compostos bioativos com um amplo espectro de ação e que não manifestem efeitos secundários adversos.

É muito vantajoso para a saúde humana o consumo de alimentos ricos em compostos com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias para a prevenção das doenças crônicas não transmissíveis.

Dentro da lista dos alimentos com estas propriedades temos a framboesa.

1.2. Produção de framboesa em Portugal

A produção de framboesa é uma indústria de mão-de-obra intensiva com altos custos. Nos últimos anos, a cultura de framboesa estagnou/diminuiu nos países desenvolvidos, como os da Europa e os Estados Unidos. Muitos países da Europa Ocidental estão a desistir da produção de framboesa, dando lugar a outras produções mais lucrativas. No entanto, atualmente, a produção de framboesa está a crescer exponencialmente em alguns países em desenvolvimento (Esta informação foi retirada do site: <http://www.agronegocios.eu/noticias/cultura-da-framboesa-e-da-amora/> - consultado em março de 2020)

Na região do Algarve tem havido esforços e incentivos para aumentar a cultura de pequenos frutos numa perspetiva de diversificação da produção frutícola. Dentro das explorações de pequenos frutos, a framboesa é a espécie mais cultivada. No entanto, para o consumidor português, este pequeno fruto continua a ser pouco conhecido e ausente das mesas dos portugueses. O que pode ser justificado pelo seu preço e pelos hábitos alimentares tradicionais.

A produção destes frutos exige uma colheita manual minuciosa, refrigeração e transporte no mesmo dia, sendo assim um produto bem pago. É um fruto muito perecível que aos olhos do consumidor, tem de estar em perfeitas condições para ser adquirido. Como os custos de produção são elevados, para que a colheita tenha o maior lucro possível, as entidades exploradoras, apostam em mão-de-obra barata.

A cultura da framboesa em Portugal tem sido encarada apenas numa perspetiva de exportação dado o baixo consumo no mercado português. Em 2017 a exportação de framboesas atingiu quase as 20 000 toneladas em que o principal destino é a União Europeia (GLOBALAGRIMAR, 2017).

1.3.A Framboesa

A planta da framboesa pertence à família das *Rosaceae*, género *Rubus*, e subgénero *Idaeobatus*. A espécie mais comum no continente europeu é *Rubus idaeus* L. sendo que as cultivares mais generalizadas e cultivadas em Portugal são as de fruto vermelho, de sabor agridoce, aroma agradável, polpa com pequenas sementes e textura granulada.

A framboesa é um fruto múltiplo de pequenas drupas (drupéolas), formado pela união de vários ovários da mesma flor à volta do recetáculo. Geralmente, apresenta uma forma cónica e arredonda, sendo cada drupa ou drupéola, constituída por uma semente dura envolvida por polpa. Após a colheita do fruto maduro, o recetáculo permanece ligado à planta e consequentemente o fruto fica oco, e com uma estrutura frágil que o torna perecível e que, por conseguinte, condiciona a sua conservação em fresco.

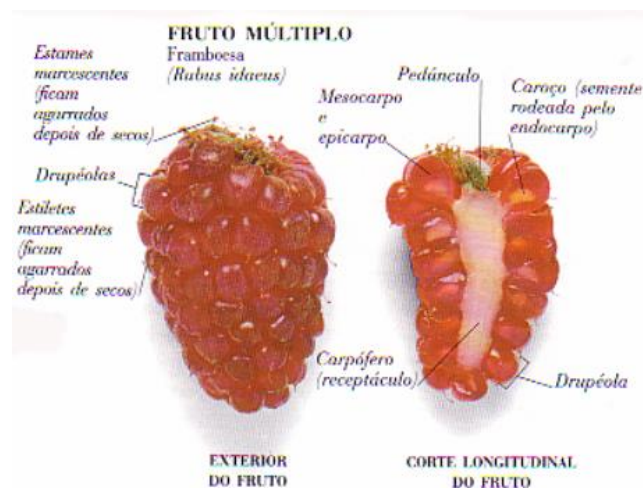


Figura 1- (Dicionário Visual das Plantas 1993, Editorial Verbo)

De acordo com alguns autores as framboesas vermelhas, apresentam características de um alimento funcional que pode ajudar a diminuir e reduzir o risco de DCV (Burton-Freeman, Sandhu e Edirisinghe, 2016). Designa-se por alimento funcional, um alimento em relação ao qual está demonstrado possuir um efeito benéfico relevante na melhoria do estado de saúde, bem-estar e na redução do risco de doenças.

Vários estudos indicam que as propriedades que promovem a saúde, tanto dos extratos do fruto como dos extratos das folhas resultam da presença de diversos compostos ativos, principalmente fenólicos, que apresentam amplo espectro de atividade. Os flavonoides têm atividade anti aterosclerótica e inibem a formação da aterosclerose em vários estágios de

patogênese (Tripoli *et al.*, 2007). Estudos mostraram que os flavonoides reduzem os níveis de colesterol no sangue (Jae sue Choi, 1991). Também foi observado que a maioria dos compostos fenólicos tem efeito antidiabético, embora os mecanismos de ação sejam diferentes (Jung *et al.*, 2004).

O extrato lipossolúvel de folhas de framboesas vermelhas (*Rubus idaeus*) tem várias aplicações potenciais em cosméticos para a pele: pode ser usado como ingrediente hidratante e hidratante em loções faciais e corporais e como produto anti envelhecimento em cremes faciais projetado especificamente para combater a formação de rugas (Tito *et al.*, 2015).

1.4. Caracterização nutricional

As framboesas vermelhas contribuem para o valor nutricional de uma dieta. Elas estão entre as maiores fontes alimentares de fibra alimentar nomeadamente a pectina, um tipo de fibra que favorece o trânsito intestinal e ajuda a expulsar toxinas. As framboesas vermelhas também contêm vitamina C, maioritariamente, magnésio e uma variedade de outros nutrientes, como potássio, vitamina K, cálcio e ferro. Pode ver-se na Tabela I a composição em macro e micronutrientes das framboesas.

Tabela I - Valor nutricional da framboesa. Composition of foods agricultural handbook n° 89.

Nutrientes

QUANTIDADE EM 100G

Água	85.75	g
Energia	52	kcal
Proteína	1.2	g
Lípidos	0.65	g
Fibra Total	6.5	g
Açúcares	4.42	g
Cálcio (Ca)	25	mg
Ferro (Fe)	0.69	mg
Magnésio (Mg)	22	mg
Fósforo (P)	29	mg
Potássio (K)	151	mg
Sódio (Na)	1	mg
Zinco (Zn)	0.42	mg

<i>Cobre (Cu)</i>	0.09	mg
<i>Selénio (Se)</i>	0.2	µg
<i>Vitamina C (ácido ascórbico)</i>	26.2	mg
<i>Tiamina</i>	0.032	mg
<i>Riboflavina</i>	0.038	mg
<i>Niacina</i>	0.598	mg
<i>Vitamina B-6</i>	0.055	mg
<i>Folato</i>	21	µg
<i>Colina</i>	12.3	mg
<i>Vitamina A</i>	2	µg
<i>Caroteno, beta</i>	12	µg
<i>Caroteno, alfa</i>	16	µg
<i>Luteína + zeaxantina</i>	136	µg
<i>Vitamina E (alfa-tocoferol)</i>	0.87	mg
<i>Vitamina K (filoquinona)</i>	7.8	µg
<i>Ácidos gordos, total saturados</i>	0.019	g
<i>Ácidos gordos, total monoinsaturado</i>	0.064	g
<i>Ácidos gordos, total poliinsaturado</i>	0.375	g
<i>Colesterol</i>	0	mg

Fonte: U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2020. USDA Food and Nutrient Database for Dietary Studies 2017-2018. Food Surveys Research Group Home Page, <http://www.ars.usda.gov/nea/bhnrc/fsrg>

1.5. Fitoquímicos da Framboesa vermelha

Para além do valor nutricional as framboesas são ricas em fitoquímicos, especialmente compostos fenólicos que são compostos bioativos a que são atribuídos, conjuntamente com a vitamina C, muitos dos benefícios para a saúde associados a este fruto.

A composição e o conteúdo de compostos bioativos em framboesas e nos frutos vermelhos em geral, são variáveis dependendo da cultivar, local de cultivo, condições ambientais, nutrição da planta, estado de maturação e época de colheita, bem como condições de armazenamento ou métodos de processamento subsequentes.

Os compostos bioativos são de grande interesse como ingredientes alimentares funcionais (Skrovankova *et al.*, 2015).

As folhas de framboesa são uma valiosa fonte de compostos bioativos (Ponder e Hallmann, 2019) mas o fruto é também rico em compostos fenólicos bioativos como por exemplo do grupos dos não flavonoides, nomeadamente antocianinas os elagitaninos como a lambertianina C, e do grupo dos flavonoides, flavanóides como a cianidina-3-glucósido.

Na Tabela II podem ver-se os teores em fenóis totais, flavonoides e antocianinas da framboesa.

Tabela II - Teores totais em fenóis, flavonoides e antocianinas de frutos *Rubus Idaeus* L.

PARÂMETRO	Teor
Fenóis Totais (mg EAG/100g FF)	57,5 - 2062,3
Flavonoides Totais (mg EC/100g FF)	9,6 - 279,3
Antocianinas Totais (mg EC3G/100g FF)	2,1 - 325,5

EAG – equivalentes de ácido gálico; EC – equivalentes de (+) - catequina; EC3G – equivalentes de cianidina- 3-glucósido; EAT – equivalentes de ácido tânico.

Fonte: (Correia, 2016)

1.5.1. Compostos fenólicos

Compostos fenólicos ou polifenóis são metabolitos secundários das plantas e, portanto, que existem em quantidades razoáveis nelas, mas os seus teores e a sua classe dependem de muitos fatores, incluindo o tipo de planta, as condições climáticas e a data de colheita. Os compostos fenólicos encontram-se disseminados em muitos alimentos, mas em maiores quantidades em vegetais e frutos.

Os compostos fenólicos pertencem a um grupo amplo e heterogêneo, de componentes químicos que possuem um ou mais anéis aromáticos com um sistema aromático conjugado e um ou mais grupos hidroxilos. Estes ou doam um eletrão ou um átomo de hidrogénio a um radical livre, que por sua vez se converte numa molécula inofensiva. Portanto, os compostos fenólicos têm atividades antioxidantes relevantes *in vitro* e *in vivo*. Os compostos fenólicos existem em formas livres ou conjugadas com açúcares, ácidos e outras biomoléculas solúveis em água (ácidos fenólicos, flavonoides e quinonas) ou compostos insolúveis em água (taninos condensados).

Os compostos fenólicos são geralmente divididos em dois grupos: não flavonoides e flavonoides, que se subdividem em várias subclasses (Quideau *et al.*, 2011).

No grupo dos não flavonoides incluem-se os ácidos fenólicos os estilbenos (resveratrol). Dentro dos ácidos fenólicos temos os derivados do ácido hidroxibenzóico (ácido gálico), do ácido hidrocínâmico (ácido cafeico) e ainda os taninos hidrolisáveis como os galhotaninos e elagitaninos.

Os flavonoides subdividem-se em flavonas, flavonois, flavanonas, flavanonóis, flavanóis, isoflavonas e antocianidinas (Falcone Ferreyra, Rius e Casati, 2012).

Os compostos fenólicos são pouco solúveis em água e, por isso, a maioria destes compostos ocorre na natureza como formas combinadas ligadas com açúcares, ácidos orgânicos e ésteres, embora alguns compostos fenólicos ocorram como agliconas. Os ácidos fenólicos são encontrados nos tecidos vegetais principalmente como derivados, grupos hidroxilos dos ácidos benzóico e cinâmico. Estes compostos produzem o gosto amargo e azedo dos frutos e têm propriedades adstringentes (Soares, 2002). Estes são substratos em reações de biossíntese (por exemplo, o ácido cafeico é um precursor da lignina) (Quideau *et al.*, 2011). Além de ácidos fenólicos, os flavonoides constituem o maior grupo de compostos fenólicos.

A maioria dos flavonoides contém um sistema heterocíclico entre os anéis aromáticos A e B (Falcone Ferreyra, Rius e Casati, 2012). Flavonoides individuais diferem no número, tipo e localização dos substituintes na molécula, que determinam as suas propriedades químicas e físicas e afetam o metabolismo individual e atividade biológica de cada composto. Os flavonoides estão presentes nas plantas em duas formas: agliconas livres e formas ligadas como O- e C-glicosídeos (Falcone Ferreyra, Rius e Casati, 2012; Quideau *et al.*, 2011).

Vários estudos têm mostrado que os fenóis desempenham um papel importante como antioxidantes contra os radicais livres e contra outras espécies reativas de oxigénio, estes que são a principal causa de muitas doenças crónicas do ser humano (Feresin *et al.*, 2016).

Os compostos fenólicos também têm mostrado outro tipo de atividades como anti-inflamatórios e antimutagénicos (Robards *et al.*, 2002),

1.6. Vitamina C

Frutas e vegetais contêm muitas moléculas bioativas diferentes, muitas das quais com propriedades antioxidantes. Fortes evidências, demonstradas no livro *Phytochemical Interactions: B-carotene, tocopherol and ascorbic acid. In Phytochemicals, a new paradigm* de Omaye e Zang de 1998, apoiam o facto de o ácido ascórbico (vitamina C) ser o antioxidante mais importante e tradicional. Além das conhecidas vitaminas C e E, ou compostos carotenóides, frutas e vegetais possuem outros compostos que contribuem significativamente para sua capacidade antioxidante.

O ácido ascórbico é uma vitamina essencial solúvel em água com excelentes propriedades redutoras, bem conhecidas pela sua alta atividade antioxidante devido à neutralização de radicais e outras espécies reativas de oxigénio, formados via metabolismo celular, que estão associados a várias formas de doenças e danos aos tecidos. Também é considerado como o indicador de qualidade de nutrientes durante o processamento e armazenamento, pois é sabido que se o ácido ascórbico for bem retido, os outros nutrientes permanecem nos alimentos também com perdas mínimas (Skrovankova *et al.*, 2015).

1.7. Framboesa e saúde

As framboesas, são conhecidas pela sua potencialidade na promoção da saúde, pois tem uma vasta quantidade de nutrientes e compostos com forte atividade antioxidante.

O interesse em compostos fenólicos alimentares aumentou devido às suas propriedades antioxidantes e anti-mutagénicas juntamente com sua capacidade de reagir com os radicais livres (Robards *et al.*, 1999), portanto, esses compostos não nutrientes, são considerados protetores devido à sua relação de ingestão com efeitos protetores contra várias doenças degenerativas, como cancro e DCV (Hertog *et al.*, 1993, 1994). As frutas vermelhas são ricas em flavonoides e ácidos fenólicos que apresentam atividade antioxidante (Heinonen *et al.*, 1998).

Os frutos pequenos são uma fonte de compostos fenólicos, fibras e ácido ascórbico. A atividade antioxidante varia muito entre os cultivares de frutos silvestres e é altamente correlacionada com os seus conteúdos de compostos fenólicos (Pantelidis *et al.*, 2007).

É o caso da framboesa, fruto vermelho, rico em compostos fenólicos e vitamina C.

Vários estudos sugeriram que, embora os conteúdos fenólicos variassem entre a maioria das variedades de framboesa estudadas, são esses compostos que contribuem significativamente para a sua ação antioxidante e capacidade de eliminação das atividades de espécies reativas de oxigénio intracelulares (Wang *et al.*, 2019).

O potencial anti-inflamatório dos compostos fenólicos de framboesas vermelhas portuguesas foi relatado num modelo animal de artrite reumatóide induzida por colagénio de tipo II (Figueira *et al.*, 2014). Chen *et al.* também relataram num modelo *in vivo* em que o extrato de framboesa vermelha, uma fonte de compostos fenólicos, inibiu a proliferação celular e induziu a apoptose num modelo de indução de lesões hepáticas de dietilnitrosamina, apesar de não ter uma análise profunda das vias de sinalização envolvidas (Chen *et al.*, 2011).

Framboesas vermelhas contêm componentes fitoquímicos com atividade biológica documentada, muitos das quais foram inicialmente investigadas com base nas suas propriedades antioxidantes *in vitro*. Alguns desses compostos são agora reconhecidos pela sua capacidade de influenciar as vias de sinalização celular que afetam os recetores, transportadores, expressão genética e outros eventos celulares. O pacote de nutrientes e componentes bioativos que as framboesas vermelhas fornecem, sugerem que existe um importante papel protetor na saúde humana.

Antocianinas e elagitaninos são considerados os principais compostos, individualmente ou combinados, responsáveis por efeitos benéficos na saúde como a prevenção de distúrbios inflamatórios, DCV ou efeitos protetores para reduzir o risco de vários tipos de cancro (Gao

et al., 2018). Além desses componentes, o ácido ascórbico ou vitamina C pode ser um antioxidante muito potente que ocorre em quantidades significativas na framboesa.

Os principais componentes ativos de *Rubus idaeus* L. são os fenóis, sobretudo flavonoides e nomeadamente antocianinas (Pantelidis *et al.*, 2007). As antocianinas são uma classe de antioxidantes importantes com atividades farmacológicas extensas, como a redução do *stress* oxidativo associado à idade e efeitos anti-inflamatórios. Alguns estudos relataram que *Rubus idaeus* L. (framboesas vermelhas) possuem excelentes resultados no que toca à atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, mas há conhecimento limitado sobre a sua atividade biológica em doenças de pele (Skrovankova *et al.*, 2015). Extratos de polifenóis de frutos vermelhos aumentam a expressão de enzimas antioxidantes (Feresin *et al.*, 2016).

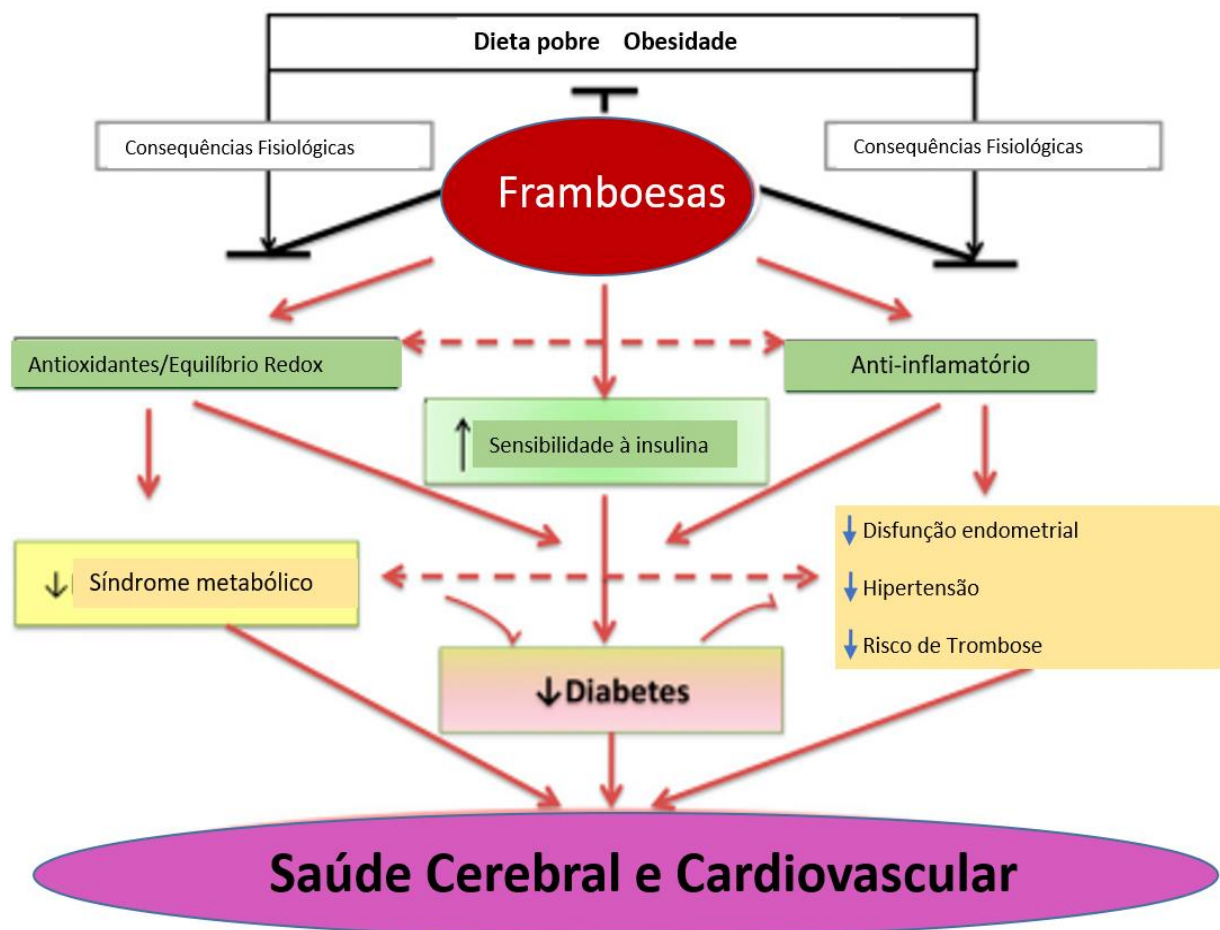


Figura 3 - Consequências fisiológicas da má alimentação e da obesidade promovem desequilíbrios do metabolismo, sistema oxidativo e imunológico, resultando em mudanças clinicamente relevantes que afetam processos periféricos e centrais que ao longo do tempo levam a doenças crônicas, como DCV, diabetes *mellitus* e doença de Alzheimer. As framboesas vermelhas e os seus polifenóis predominantes têm sido estudados numa variedade de modelos pelo seu potencial direto e indireto de efeitos em doenças crônicas. O aumento de estudos científicos sugere que a framboesa vermelha, incluindo vários extratos e componentes individuais, tem anti-inflamatórios, antioxidantes e atividade de estabilização metabólica. Esses efeitos estão associados a melhorias na pressão arterial e perfis lipídicos, diminuição do desenvolvimento aterosclerótico, melhoramento na função vascular, estabilização de sintomas diabéticos não controlados (por exemplo, glicemia) e melhora a recuperação funcional de lesão cerebral em modelos pré-clínicos. Esquema adaptado (Burton-Freeman, Sandhu e Edirisinghe, 2016).

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho é fazer uma revisão bibliográfica sobre o conteúdo fenólico da framboesa vermelha, nomeadamente a espécie *Rubus Idaeus sp*, e relaciona-lo com a atividade antioxidante e anti-inflamatória deste fruto e a sua ação na promoção da saúde e na prevenção de doenças crónicas não transmissíveis e também de outras doenças.

É também objetivo mostrar os resultados preliminares de conteúdo em fenóis totais e capacidade antioxidante de extrato fenólico de framboesa.

3. Capítulo I – Revisão da literatura dos efeitos biológicos das framboesas

3.1. Metodologia

Este estudo compreendeu a realização de pesquisas nos sítios eletrónicos seguintes: Pub med da Medline, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>); Organização Mundial de Saúde (OMS) (<https://www.who.int/activities/preventing-noncommunicable-diseases/>) consultado no ano de 2020; EFSA (<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5136>) consultado em junho de 2020. Foram utilizadas combinações entre as seguintes palavras-chave: “Red Raspberries”, “phenolic compounds”, “ellagitannins”, “anthocyanins” e em associação com “functional food”, “antioxidant activity”, “chronic disease” e “biological effects”.

3.2. Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante das framboesas, à semelhança de outros frutos vermelhos, está relacionada com vários compostos bioativos que possuem propriedades antioxidantes. Antocianinas, taninos, compostos fenólicos totais e o ácido ascórbico foram amplamente estudados devido à sua possível correlação. No entanto, a capacidade antioxidante pode ser esclarecida pela compreensão da conexão de diferentes compostos bioativos, trabalhando aditivamente ou sinergicamente em relação à capacidade antioxidante total da framboesa. Framboesas com teores mais elevados de fitoquímicos mostraram maior capacidade antioxidante (Chen *et al.*, 2012).

Vários estudos sugeriram que o conteúdo de compostos fenólicos e a atividade antioxidante estão intimamente relacionadas entre si (Panić *et al.*, 2019; Shahidi e Ambigaipalan, 2015). A investigação da atividade antioxidante de produtos naturais é o primeiro passo na busca de

substâncias bioativas em extratos vegetais. Existem muitos métodos disponíveis para determinar a atividade antioxidante, mas o mais comumente usado é o ensaio de captura de radical livre por DPPH.

A capacidade antioxidante dos frutos vermelhos, está fortemente relacionada com compostos que promovem a eliminação de radicais livres e de espécies reativas de oxigênio intracelulares. A esses compostos pertencem os fenólicos, a maioria dos quais expressa atividade antioxidante e ácido ascórbico, relevante *in vitro* e *in vivo*. A capacidade total antioxidante (TAC) pode ser influenciada pela Silvicultura, uma ciência que se dedica ao estudo de métodos naturais e artificiais de regenerar e melhorar povoamentos florestais, como sistemas culturais orgânicos. Morangos cultivados organicamente exibiram atividades mais elevadas capacidade antioxidante, níveis mais elevados de enzimas antioxidantes, e níveis mais elevados de antioxidantes, como o conteúdo de flavonoides (Jin *et al.*, 2011). A capacidade antioxidante diminui com o processamento contínuo, exceto processamento térmico, que causa parcialmente um aumento devido à formação de produtos que são eficazes como antioxidantes (Oszmiański e Wojdyło, 2009). Prensagem e pasteurização são os processos mais problemáticos para a degradação dos compostos bioativos nos frutos vermelhos (Artmann *et al.*, 2008).

A capacidade antioxidante total das espécies de framboesas e morangos são semelhantes entre si, mas é cerca de três vezes menor do que nos mirtilos. Durante o armazenamento, pode haver um aumento de TAC em temperaturas superiores a 0° C (seguido pelo aumento do conteúdo de antocianinas e conteúdo fenólico total (TPC)) (Kalt *et al.*, 1999).

A capacidade antioxidante das framboesas é influenciada por vários fatores, em comparação com outras frutas, são mais influenciadas pelo tipo de armazenamento. Mudanças devido ao tempo de armazenamento e temperatura podem ser examinadas em todas as suas variedades. No entanto, os fenólicos da framboesa aumentaram cerca de 1,5 vezes após o armazenamento de uma semana. Além disso, o conteúdo de antocianinas de framboesa pode aumentar cerca de 2,5 vezes após uma semana de armazenamento a 20° C. Alterações são menores após armazenamento a 10 e 30° C e praticamente nulas a 0° C. Estas são seguidas por um aumento de quase duas vezes na capacidade antioxidante (Kalt *et al.*, 1999). As framboesas podem ser consumidas frescas, mas devido ao seu curto tempo de armazenamento, são limitadas pelo crescimento de microrganismos e perda de firmeza. Mais frequentemente, são utilizados como produtos processados, como compotas, geleias, purés, gelados ou usados como ingredientes ou para dar sabor a vários produtos alimentares (iogurtes, bolachas, *smoothies*). O processo

de congelamento não tem efeitos significativos nos valores de TPC (Begoña de Ancos, Eva M. González, 2000).

3.3. Biodisponibilidade de compostos fenólicos e a sua atividade antioxidante

A biodisponibilidade pode ser definida como uma fração da ingestão de compostos que atingem o sistema circulatório, tecidos e órgãos específicos para exercer efeitos biológicos na saúde humana (McDougall *et al.*, 2005). No geral, é o resultado da absorção, distribuição, metabolismo e excreção dos compostos ingeridos.

Os efeitos biológicos dos compostos polifenólicos são limitados pela sua baixa absorção do trato digestivo (Călinoiu e Vodnar, 2018; Ştefanescu *et al.*, 2019). Foi demonstrado que a estrutura química determinou a taxa e extensão da sua absorção intestinal. Por exemplo, os ácidos ferúlico e sinápico são absorvidos como formas livres e solúveis, enquanto moléculas maiores devem ser primeiro hidrolisadas por enzimas entéricas ou enzimas bacterianas da microflora do cólon (Ştefanescu *et al.*, 2019).

A biodisponibilidade dos compostos fenólicos e a sua atividade antioxidante foram determinadas em polpas congeladas de açaí, cupuaçu, amora-preta, mirtilo, jabuticaba, framboesa, cajá e graviola, utilizando um modelo de digestão acoplado a um simulador de uma barreira intestinal. Este estudo avaliou polpas congeladas de frutas cultivadas no Brasil, nomeadamente a framboesa vermelha (*Rubus idaeus*) cultivada na Mata Atlântica. O procedimento de digestão *in vitro* (mimetizando condições gastrointestinais fisiológicas), que foi utilizado neste estudo seguiu os procedimentos descritos anteriormente por Dutra *et al.* (Dutra *et al.*, 2017). O sistema incluiu três fases sequenciais (oral, gástrica e intestino delgado, que incluiu diálise).

A exposição a condições que simulam a digestão gastrointestinal, causa uma redução significativa no conteúdo de antocianinas em polpas congeladas vermelho-púrpura (açaí, amora, mirtilo, jabuticaba e framboesa). Só o mirtilo e as polpas congeladas de framboesa exibiram antocianinas biodisponíveis. A biodisponibilidade mais alta foi observada para cianidina 3-glucosídeo (6,56%) e pelargonidina 3-glicosídeo (28,33%) nas polpas congeladas de framboesa. Curiosamente, no presente estudo, quantidades semelhantes de cianidina 3-glicosídeo foram encontradas nas polpas congeladas de açaí e framboesa. O alto teor dessa antocianina no açaí e na framboesa está bem documentado (McDougall *et al.*, 2005); no entanto, esta é a primeira vez que quantidades semelhantes de cianidina 3-glicosídeo são

detetadas em produtos derivados de açaí e framboesa. Os resultados deste estudo mostram que as antocianinas apresentam baixa bioacessibilidade nas polpas congeladas vermelho-púrpura estudadas; apenas cianidina 3-glicosídeo (6,56%) e pelargonidina 3-glicosídeo (28,33%) foram bioacessíveis em polpas congeladas de mirtilo e framboesa. Em relação aos flavonoides não antocianínicos, a biodisponibilidade variou nas polpas congeladas testadas. Os compostos com a maior biodisponibilidade foi quercetina 3-glicosídeo, caempferol glucosídeo, procianidina B1 e cis-resveratrol na polpa congelada de amora e procianidina B1, catequina e cis-resveratrol na polpa congelada de cajá. Estes compostos foram fortemente correlacionados com a atividade antioxidante observada nos ensaios DPPH e FRAP. Os resultados mostram que há biodisponibilidade de antocianinas, flavonoides e ácidos fenólicos em polpas congeladas distintas.

A bioacessibilidade e biodisponibilidade dos polifenóis de framboesas vermelhas foram, também, estudadas em modelos *in vivo* e *in vitro* (Elaine M. Daniel, Sunil Ratnayake, Thomas Kinstle, 1991; McDougall *et al.*, 2005) modelos animais (Borges *et al.*, 2007) e ensaios clínicos em humanos (Erda *et al.*, 2005; Rocío González-Barrio, Christine A. Edwards e Joseph, 2011; Tewart *et al.*, 2010). Em geral, os componentes polifenólicos sofrem modificações estruturais antes de serem absorvidos. A exceção é com as antocianinas, que podem ser absorvidas intactas na sua forma glicada (Cao *et al.*, 2018). Estruturas que escapam da absorção do intestino delgado seguem para o cólon, onde são convertidas em ácidos fenólicos por microrganismos presentes no intestino grosso, após esse processo são excretadas nas fezes ou absorvidos pela circulação mesentérica.

Os produtos metabólicos do cólon e os fenólicos não conjugados e estruturas de aglicona do trato digestivo superior sofrem metabolismo de fase I e fase II no intestino, fígado e rim, resultando em metabolitos metilados, glicuronídeos e sulfoconjugados (Wu, Cao e Prior, 2018; Zquierdo, Amaison e Emesy, 2005). Os metabolitos resultantes circulam no sangue e são transportados para vários tecidos e órgãos do corpo. Apesar de que alguns metabolitos, podem nunca chegar à circulação geral devido ao efluxo de volta para o lúmen do intestino após a absorção inicial dos enterócitos ou devido à recirculação entero-hepática, a maioria dos metabolitos é excretada pelos rins (Duynhoven *et al.*, 2011).

O percurso das antocianinas e elagitaninos em ratos foi monitorizado após a ingestão de sumo de framboesa (Borges *et al.*, 2007). Em estudos *in vivo*, com animais e humanos, 0,1% das quantidades ingeridas, e às vezes menos, foram detetados no plasma e na urina (Milbury *et al.*, 2002) mostrando um baixo nível de absorção em comparação com outros flavonoides

(Palafox-carlos, Ayala-zavala e Gonz, 2011). A baixa concentração de antocianinas no plasma pode, portanto, ser uma consequência da sua rápida remoção do sistema circulatório. A análise HPLC-PDA-MS/MS do sumo de framboesa resultou na identificação e quantificação de nove antocianinas, dois elagitaninos e ácido elágico.

Num estudo, ratos foram alimentados por alimentação forçada uma única vez com uma dose de 2,77 mL de sumo de framboesa, contendo antocianinas e elagitaninos, uma dose equivalente a um ser humano de 70 kg beber 700 mL de sumo. Uma hora depois de os alimentar, os elagitaninos, sanguina H-6 e lambertianina C desapareceram com apenas vestígios de ácido elágico detetado no estômago. Até duas horas após suplementação, houve uma recuperação muito alta de antocianinas não metabolizadas, principalmente cianidina-3-O-soforosídeo, cianidina-3-O- (2G-O-glucosilrutinsido) e cianidina-3-O-glucosídeo, conforme passavam do estômago para o duodeno/jejuno e íleo. Após três horas, menos de 50% era recuperado, após quatro horas caiu para 11% da quantidade ingerida e após seis horas apenas 2% era detetável. Apenas foram detetados vestígios de antocianinas no cego, cólon e fezes e não em extratos de fígado, rins e cérebro. Após uma hora, concentrações baixas de nM de cianidina-3-O-soforosídeo, cianidina-3-O- (2G-O-glucosilrutinsido) e cianidina-3-O-glucosídeo foram detetadas no plasma, mas estes diminuíram em duas horas e não apresentavam quantidades detetáveis quatro horas após a ingestão. A excreção das três principais antocianinas de framboesa vermelha, na urina ao longo de um período de vinte e quatro horas, após a ingestão do sumo de framboesa, foi equivalente a 1,2% das quantidades ingeridas.

Estas descobertas mostram que as antocianinas são mal absorvidas e que isso ocorre antes de atingirem o íleo, de acordo com as evidências que indicam que o estômago (Felgines *et al.*, 2018; Passamonti *et al.*, 2003) e o jejuno (Kalt, 2019) são locais de absorção de antocianinas em murganhos e ratos. Algumas bactérias coliformes fecais degradam rapidamente, quantidades substanciais de antocianinas quando estas passam pelo intestino delgado até ao intestino grosso, dado que estas não são absorvidas.

Informações mais completas sobre o que acontece às antocianinas e elagitaninos após a ingestão, seriam possíveis com o auxílio e com a disponibilidade de derivados radiomarcados o que permitiria que o destino desses compostos fosse monitorizado em sistemas de teste com animais, da mesma maneira que este composto [2-¹⁴C] quercetina-49-O-glucosídeo têm sido usado para fornecer uma visão detalhada da biodisponibilidade do glucosídeo de flavanol em ratos (MULLEN *et al.*, 2002).

González-Barrio *et al.* (Rocío González-Barrio, Christine A. Edwards e Joseph, 2011) estudaram o destino de antocianinas, ácido elágico e elagitaninos, em indivíduos voluntários saudáveis e indivíduos com ileostomia que consumiram 300 g de framboesas vermelhas. Os resultados deste estudo sugeriram que aproximadamente 40% das antocianinas ingeridas chegam ao intestino grosso, com base em antocianinas encontradas nos indivíduos saudáveis no líquido ileal, obtido por ileostomia. Esses dados sugerem que aproximadamente 60% das antocianinas são absorvidas, degradadas ou não detectáveis a nível do intestino delgado. Da mesma forma, aproximadamente 23% da quantidade ingerida de elagitaninos foram encontrados no líquido ileal, no entanto, uma quantidade significativa de elagitaninos foi hidrolisada em ácido elágico (aproximadamente 241% da ingestão). No intestino grosso, o ácido elágico e os elagitaninos são principalmente convertidos em metabolitos de urolitina (urolitina A e B). As urolitinas sofrem metabolismo de fase II na parede do intestino grosso e no fígado, um processo que produz glucuronídeos de urolitina (Rocío González-Barrio, Christine A. Edwards e Joseph, 2011). A síntese de urolitinas é mediada pelo microbiota do intestino e estirpes bacterianas muito específicas (*Gordonibacter urolithinfaciens* sp. nov.) (María V. Selma, Francisco A. Tomás-Barberán, David Beltrán, 2014). Portanto, foi relatada alta variabilidade interindividual na produção de urolitina (Rocío González-Barrio, Christine A. Edwards e Joseph, 2011; Rocio González-Barrio, Gina Borges, 2010).

As folhas da framboesa também são ricas em compostos fenólicos. Os principais fenólicos detectados em extratos de folhas são pequenos compostos, como ácido gálico na groselha preta, ácido elágico na framboesa e ácido clorogénico nas folhas de arónia (Materska, 2020). Com base nisso, pode-se dizer que compostos fenólicos de folhas de arbustos de frutas podem apresentar uma taxa significativa de biodisponibilidade, mas investigações adicionais são necessárias para comprovar esta afirmação. No entanto, estas não são apropriadas pelo que é necessário extrair esses compostos através de infusões.

3.4. Benefícios para a saúde de framboesas vermelhas e seus componentes polifenólicos predominantes

Há muito tempo que as framboesas são utilizadas na medicina tradicional em alternativa para curar feridas, cólicas, diarreia e doenças renais. As framboesas são úteis, também na dieta voltada para controlo de estados iniciais de diabetes tipo II e hipertensão (Skrovankova *et al.*, 2015). O perfil nutricional das framboesas vermelhas e os seus componentes polifenólicos

(antocianinas e elagitaninos/metabolitos) tornam as framboesas vermelhas, um bom candidato para inclusão regular em dietas destinadas a reduzir o risco de diabetes.

3.4.1. Obesidade

Obesidade e diabetes são fatores de risco que ativam mecanismos subjacentes que levam ao desenvolvimento de DCV.

A obesidade é caracterizada pelo aumento de tecido adiposo, que como um órgão endócrino ativo, secreta adipocitocinas (leptina, adiponectina, resistina, proteína estimuladora de acilação (ASP), inibidor do ativador do plasminogênio (PAI), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e angiotensinogênio), estas constituem um perigo no desenvolvimento de DCV, devido aos seus efeitos na homeostasia energética, no metabolismo de hidratos de carbono e lípidos, na homeostasia vascular e na resposta imune. Na obesidade, o tecido adiposo pode cobrir o coração completamente (conhecido como tecido adiposo perivascular) até 2 cm de espessura. O tecido adiposo perivascular tem tido cada vez mais reconhecimento como um importante produtor de fatores que apresentam efeitos vasculares periféricos, pulmonares ou cardíacos, e de citocinas que podem ter um efeito parácrino direto na vasculatura devido à sua inerente proximidade. A este respeito, a interação tecido adiposo perivascular-vaso pode ser identificada como um novo alvo terapêutico de doenças vasculares (Dias-Neto *et al.*, 2018).

A obesidade, associada a um desequilíbrio calórico no corpo, tornou-se um problema de saúde público internacional em todo o mundo (El-shiekh *et al.*, 2019). A relação etiológica entre obesidade e doenças metabólicas foi estabelecido por vários estudos experimentais e clínicos (Silva *et al.*, 2020). O tecido adiposo humano pode ser dividido em dois subconjuntos: tecido adiposo multilocular e tecido adiposo unilocular.

Resumidamente, a expansão massiva de tecido adiposo unilocular, uma característica marcante na obesidade, resulta num aumento do risco de doenças, incluindo diabetes tipo 2, doenças cardíacas, hipertensão sistêmica, hiperlipemia e arteriosclerose (Hong *et al.*, 2019).

Morimoto *et al.* relataram que uma dose de 1% de cetona de framboesa foi suficiente para prevenir aumentos no peso corporal induzidos por uma dieta rica em gordura; também foi demonstrado que 1% de cetona de framboesa afetou remediavelmente os aumentos no peso corporal, peso dos tecidos adiposos viscerais e conteúdo de triglicerídeos hepático em camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura (Morimoto *et al.*, 2005). Esses

resultados sugerem que a cetona de framboesa previne a obesidade e esteatose hepática (fígado gordo) induzidos por uma alimentação rica em gordura. Meng *et al.* mostraram que a cetona de framboesa pode reduzir o peso de ratos obesos induzidos por dieta rica em gordura, sugerindo que a cetona de framboesa exerce funções anti-obesidade mediando distúrbios lipídicos, melhorando a resistência à insulina e resistência à leptina (Wang, Meng e Zhang, 2012).

A framboesa preta que pertence ao gênero *Rubus* (*Rosaceae*) possui um mecanismo anti obesidade, mas que não está totalmente elucidado (Park *et al.*, 2019). No entanto é utilizada como medicamentos tradicionais usado para o tratamento de impotência, espermatorreia, enurese e asma no Nordeste da Ásia (Lim, Jeong e Shin, 2012). Estudos recentes têm mostrado que as propriedades farmacológicas da framboesa preta incluem anti carcinogénica, antioxidante e anti-inflamatório (Jeong *et al.*, 2013).

3.4.2. Doenças Cardiovasculares

As DCV são uma das principais complicações da Diabetes. A diabetes tipo II é uma doença crescente em todo o mundo resultante da interação entre a composição genética e o estilo de vida de um indivíduo. Em indivíduos geneticamente predispostos, a combinação da ingestão calórica excessiva e atividade física reduzida induz um estado de resistência à insulina (Ceriello e Motz, 2004).

Os níveis de colesterol não têm grandes variações só pelo facto de se ingerir uma refeição, seja ela calórica ou não. Apenas 1/3 do colesterol sérico é dependente da alimentação sendo que os outros 2/3 são sintetizados no fígado. Daí que nem sempre seja fácil baixar os níveis altos de colesterol no soro só com o controlo da alimentação.

Quando as células beta não são mais capazes de compensar a resistência à insulina aumentando adequadamente a produção de insulina, surge a diminuição da tolerância à glicose, caracterizada por hiperglicemia pós-prandial excessiva. A diminuição da tolerância à glicose pode evoluir para diabetes. Essas três condições, isto é, resistência à insulina, diminuição da tolerância à glicose e diabetes, estão associadas a um risco aumentado de doença cardiovascular (Ceriello e Motz, 2004).

O colesterol sérico elevado, é considerado um dos fatores de risco das DCV, mas, nos dias de hoje, já é assumido que só este parâmetro, por si só, não é suficiente para fazer uma avaliação do risco do desenvolvimento destas doenças. Assim, o seu valor deve ser

correlacionado com os valores de LDL (Lipoproteína de baixa densidade, do inglês Low density lipoproteins) já que é esta a lipoproteína que transporta o colesterol para as células e tecidos, e também com os valores de HDL (Lipoproteína de alta densidade, do inglês high density lipoproteins) por ser a lipoproteína responsável pelo transporte do colesterol para o fígado onde, o mesmo, será processado para que seja excretado. Em resumo, níveis de colesterol e LDL elevados bem como níveis de HDL baixos, serão as condições que favorecem o fenómeno de aterosclerose e, portanto, o desenvolvimento de DCV (Correia, 2016).

Na realidade, para além dos valores de colesterol, LDL e HDL a oxidação das LDL é um fator de grande relevância na deposição dos esteres de colesterol nas paredes arteriais e, conseqüentemente, na formação das estrias adiposas no interior dos vasos. As LDL oxidadas não são reconhecidas pelos recetores hepáticos e periféricos, sendo sim reconhecidas pelos monócitos diferenciados a macrófagos do espaço subendotelial do vaso sanguíneo. Os macrófagos infiltrados de LDL contendo ácidos gordos, colesterol e proteínas oxidadas (células espumosas) originam, numa primeira etapa, a estria gorda e, depois, por estímulo da proliferação da musculatura lisa do vaso sanguíneo, o ateroma. Podemos então concluir que qualquer composto ou alimento que evite a oxidação das LDL pode ter uma ação muito importante na prevenção da aterosclerose e, portanto, no desenvolvimento das DCV.

Como todas essas condições também são acompanhadas pela presença de *stress* oxidativo, entende-se o *stress* oxidativo como o mecanismo patogénico, que leva à diabetes e conseqüentemente às DCV (Ceriello e Motz, 2004).

O organismo tem defesas endógenas para combater os radicais livres, tais como as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione redutase (GSH), glutathione peroxidase (GPx) e outras, mas quando estes radicais são libertados em excesso é necessário ajuda veiculada por alguns alimentos ricos em antioxidantes.

Estudos *in vitro* confirmaram que os extratos de framboesa vermelha exercem atividade anti-inflamatória ao reduzir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), peroxidação lipídica e produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), aumentando a atividade das enzimas antioxidantes, como a catalase e a superóxido dismutase, e reduzir os indicadores de inflamação, como a produção de citocinas, fator de transcrição do fator nuclear kappaB (NF-kB), proteína quinases ativadas por mitógeno (MAPK)/ atividade da c-Jun N-terminal quinase (JNK), Toll like receptor (TLR) 2 e TLR4, atividade de cicloxigenase e produção de prostaglandina E2 (PGE2) (Burton-Freeman, Sandhu e Edirisinghe, 2016).

No entanto, a maioria dos estudos em animais *in vitro* e *in vivo*, relatados, avaliaram os efeitos dos extratos polifenólicos da framboesa ou fenólicos individuais, em vez da fruta inteira.

Noratto *et. al.*, avaliou, *in vivo* os potenciais efeitos cardioprotetores da framboesa liofilizada num modelo de camundongo diabético obeso por suplementação dietética com doses que podem ser traduzidas em consumo humano (Noratto, Chew e Ivanov, 2016).

A absorção limitada de compostos polifenólicos de frutas através do intestino, é seguida por uma transformação no fígado e uma eliminação rápida. Metabolitos polifenólicos foram identificados apenas nos tecidos intestinal, hepático e renal e diminuem rapidamente com uma meia-vida inferior a 30 min (Rahman, Biswas e Kirkham, 2006). No entanto, apesar do facto dos derivados polifenólicos metilados, glucoronidados ou sulfatados serem detetados no plasma em frações nano molares; estes demonstram ter benefícios para a saúde por meio da modulação das vias de sinalização celular em concentrações mais baixas do que as necessárias para exercer atividades antioxidantes.

A análise proteómica dos tecidos do coração revelou proteínas-chave ligadas à resposta ao stress oxidativo e inflamatório no coração com regulação negativa, para consumidores regulares de framboesa. A regulação positiva dessas proteínas como parte dos mecanismos de defesa homeostática durante o stress oxidativo e inflamatório crónico em indivíduos obesos e diabéticos pode ser sobrecarregada, resultando num aumento da peroxidação dos lípidos no coração e em alterações morfológicas que levam à insuficiência cardíaca. Os resultados deste estudo sugerem que o consumo de framboesa em idade precoce tem o potencial de proteger contra o aparecimento de doenças cardíacas na idade avançada (Noratto, Chew e Ivanov, 2016).

No geral, os efeitos do consumo da framboesa reduzem a expressão de proteínas ligadas ao stress oxidativo e inflamatório. Os efeitos protetores da framboesa, tem um papel fundamental, no adiamento e/ou prevenção da inflamação, stress oxidativo, anormalidades da função do coração e alterações morfológicas no coração (Noratto, Chew e Ivanov, 2016).

A hipercolesterolemia é um dos fatores de risco no desenvolvimento das DCV e os valores de LDL, HDL e colesterol total têm sido relacionados com o risco cardiovascular.

Maria Correia, *et al.*, num estudo em humanos, verificou um aumento estatisticamente significativo da LDL oxidada 4h após o consumo de uma refeição hipercalórica, havendo, no entanto, uma regressão dos resultados às 6h, que voltou a igualar os basais. Podemos dizer

que a ingestão de framboesas não evitou a oxidação da LDL pela refeição, mas o valor basal dos voluntários era estatisticamente menor depois da ingestão das framboesas. Assim, os resultados sugerem um poder antioxidante grande das framboesas o que pode ser um dado muito importante num possível papel de prevenção do fenómeno de aterosclerose (Correia, 2016).

Na realidade, para além dos valores de colesterol, LDL e HDL a oxidação das LDL é um fator de grande relevância na deposição dos esteres de colesterol nas paredes arteriais e, conseqüentemente, na formação das estrias adiposas no interior dos vasos. As LDL oxidadas não são reconhecidas pelos recetores hepáticos e periféricos, sendo sim reconhecidas pelos monócitos diferenciados a macrófagos do espaço subendotelial do vaso sanguíneo (Correia, 2016).

É reconhecida a importância da dieta no risco cardiovascular. O papel benéfico de frutas e vegetais na prevenção de doenças tem sido atribuído à grande variedade de antioxidantes (polifenóis e vitaminas) contidos nestes alimentos (Correia, 2016).

As framboesas vermelhas contêm compostos polifenólicos antioxidantes e fibra dietética que pode ajudar a diminuir o *stress* oxidativo e reduzir o risco de DCV (Burton-Freeman, Sandhu e Edirisinghe, 2016).

3.4.3. Efeitos anticancerígenos

Nas últimas décadas tem havido um aumento constante da popularidade e interesse por pesquisa de todos os tipos de frutas. Os Frutos vermelhos, especialmente membros de várias famílias, como *Rosaceae* (morango, framboesa, amora) têm tido um destaque substancial por serem ótimas fontes dietéticas de compostos bioativos e possuírem um sabor agradável. Compostos bioativos (compostos fenólicos, como ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, elagitaninos, taninos e ácido ascórbico) estão contidos nos frutos vermelhos em grande quantidade e podem agir como antioxidantes fortes e, assim, ajudar na prevenção de distúrbios inflamatórios, DCV ou ter efeitos protetores para reduzir o risco de vários tipos de cancro.

As antocianinas pertencem a uma classe de compostos naturais conhecidos como flavonoides e constituem o maior grupo de pigmentos solúveis em água do reino vegetal estão presentes nos tecidos superiores das plantas, como folhas, caules, raízes, flores e frutos. Elas são responsáveis por muitas cores naturais atraentes, desde o escarlata ao azul. A cor que estes pigmentos apresentam nas plantas depende de vários fatores como o pH, a presença de metais

pesados e outros compostos incolores que atuam como co-pigmentos. Estruturalmente as antocianinas são glicósidos de antocianidinas (aglicona, estrutura química dos compostos resultantes da substituição de um ou vários grupos de açúcares por hidrogénios), e são um dos principais subgrupos dos flavonoides por apresentarem um esqueleto base constituído por 15 carbonos (C15) distribuídos por vários anéis condensados formando uma estrutura do tipo C6-C3-C6 (Freitas, 2019).

Chen *et al.*, teve como objetivo determinar se o extrato de framboesa vermelha afetou o ciclo celular, angiogénese e apoptose, num modelo de rato, em tecidos de lesão hepática induzida por dietilnitrosamina (DEN), bem como alterações nas proteínas do soro. Os ratos foram tratados com extrato de framboesa vermelha (0,75, 1,5 ou 3,0 g/kg de peso corporal) por alimentação forçada, começando 2h após administração de DEN e continuou por 20 semanas. O extrato de framboesa vermelha inibiu a proliferação celular, a expressão do fator *crescimento endotelial vascular* VEGF e induziu apoptose nos tecidos da lesão hepática. Em resumo, os dados obtidos por Chen *et al.* indicaram que o extrato fresco de framboesa vermelha inibiu de forma potente a proliferação celular, a angiogénese e induziu a apoptose em tecidos com lesão hepática de ratos tratados com DEN.

Assim, a framboesa vermelha pode ser uma fonte potencial de compostos químicos que têm um efeito anti proliferação de células cancerígenas e seu(s) mecanismo(s) exato(s) por isso, justifica um estudo mais aprofundado. Estes resultados sugerem que um suplemento dietético com framboesa vermelha protege eficazmente contra lesões hepáticas induzidas em ratos (Chen *et al.*, 2011).

3.4.4. Litíase renal

Pedras nos rins ou cálculos renais, é uma das doenças mais antigas, conhecidas e comuns no sistema urinário. Várias plantas medicinais com atividades diurética, antiespasmódica e antioxidante exercem efeitos inibitórios na cristalização, nucleação e agregação de cristais, tornando-os úteis para o tratamento de urolitíase. O objetivo do artigo foi fornecer uma revisão crítica do papel das plantas dietéticas como suplementos naturais na prevenção ou gestão de pedras nos rins e elaborar mecanismos farmacológicos subjacentes, bem como os seus constituintes fitoquímicos responsáveis por esta atividade. O efeito profilático da framboesa no oxalato de cálcio renal e a formação de cálculos renais foi relatado (Ghalayini, Al-ghazo e Harfeil, 2011). O seu extrato exerceu efeitos preventivos significativos na deposição e precipitação de oxalato de cálcio no rim e eliminou a matriz de oxalato de cálcio.

Grupos de malondialdeído (MDA) e carbonilos (grupos funcionais de proteínas) foram suprimidos em animais tratados com extratos de framboesa com níveis reduzidos de cálcio e fósforo urinários. A presença de polifenóis e alteração no nível de inibidores da formação de pedras (como citrato, magnésio, e glicosaminoglicanos) podem estar envolvidos no mecanismo pelo qual a framboesa inibiu o crescimento de "pedras" (Ghalayini, Al-ghazo e Harfeil, 2011). O extrato metanólico da framboesa foi descrito por ser um diurético potente, pela via de inibição da atividade da hormona aldosterona ou dos canais epiteliais de sódio (Zhang *et al.*, 2011).

As plantas dietéticas, incluindo suplementos alimentares, frutas e vegetais, têm um papel fundamental na vida humana saúde e prevenção de doenças, incluindo nas pedras nos rins. No entanto, as evidências farmacológicas de plantas dietéticas e seus fitonutrientes na prevenção de cálculos renais não foram esclarecidas ainda. A literatura atual mostrou que um grande número de estudos *in vitro* e em animais, foram desenvolvidos para avaliar os efeitos preventivos de plantas dietéticas e seus fitoquímicos como suplementos preventivos no desenvolvimento de urolitíase. No entanto, estudos realizados em humanos, são limitados acerca da eficácia de plantas medicinais e dietéticas na gestão de cálculos renais. *A. repens* (L.), *D. biflorus* L., *H. sabdariffa* L., *P. granatum* L. e *Phyllanthus niruri* L. estão entre as plantas cuja a eficácia foi confirmada por ensaios clínicos. Nutracêuticos (principalmente polifenóis dietéticos), incluindo catequina, epicatequina, EGCG, diosmina, rutina, quercetina, hiperosídeo e curcumina podem ser propostos como suplementos dietéticos promissores para a prevenção da urolitíase. Para concluir, os resultados obtidos na literatura disponível revelaram que as plantas dietéticas e os seus fitonutrientes podem ser úteis na prevenção e intervenção da urolitíase. É essencial que os médicos tenham conhecimento sobre a eficácia, sobre mecanismos farmacológicos e sobre efeitos colaterais da administração de um regime alimentar protetor. Mais estudos com ensaios clínicos são necessários para confirmar a eficácia e segurança destes agentes dietéticos em pacientes com pedras renais. Além disso, para conseguir mais resultados conclusivos na prevenção da urolitíase, estudos pré-clínicos e humanos são obrigatórios para revelar mecanismos celulares, e os fitonutrientes bioativos dessas plantas dietéticas (Nirumand *et al.*, 2018).

3.4.5. Efeitos anti-glicação e neuroprotetores em frutos ricos em polifenóis (alzheimer)

A glicação é um processo não enzimático, que começa com uma reação entre as moléculas de açúcar e grupos amina, livres de proteínas, que origina estruturas instáveis de aldimina e ceto-

amina. Ao longo do tempo, essas estruturas podem, então, se transformar num grupo heterogêneo de compostos conhecidos coletivamente como produtos finais de glicação avançada (AGEs). Recentemente, foi proposto que os AGEs podem contribuir para a patogênese de várias doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer (DA) (Miranda, El-agnaf e Outeiro, 2016). Estudos clínicos demonstraram que indivíduos com maior nível circulatório níveis de AGEs têm uma taxa mais rápida de declínio cognitivo (Beeri *et al.*, 2012).

AGEs acumulados podem ampliar a produção de espécies reativas de oxigênio por ligação a receptores transmembranares conhecidos como RAGE (receptor para AGEs), desencadeando vias de sinalização intracelulares e estimulando a produção de citocinas, o que leva a *stress* oxidativo neuronal, inflamação e apoptose celular. Além disso, espécies carbonil reativas, como o intermediário metabólico ativo, metilglioxal (MGO), podem reagir rapidamente com proteínas para produzir AGEs. Esses precursores de AGEs exercem citotoxicidade direta em células neuronais induzindo a reticulação da proteína beta amiloide ($A\beta$) e aumentando a formação de depósitos insolúveis de $A\beta$, um marcador patológico de DA. Além disso, espécies reativas de oxigênio e espécies carbonil reativas pode, também, interferir no *stress* oxidativo e inflamatório celular, levando à disfunção de células neuronais, o que contribui muito para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas incluindo DA (Angeloni, Zamboni e Hrelia, 2014).

A glicação potencializa a agregação e toxicidade de proteínas, como β -amilóide ($A\beta$).

Estudos publicados suportam os efeitos anti-glicação e neuroprotetores de várias frutas ricas em polifenóis, incluindo frutos vermelhos, que são ricas em antocianinas. Foi relatado que os frutos vermelhos mostram anti-glicação e potenciais propriedades neuroprotetoras. Esses dados sugerem que essas frutas comestíveis comuns podem ter potenciais efeitos neuroprotetores microgliais e que suas antocianinas contribuem, em parte, para esses efeitos biológicos. No entanto, dado que esses estudos foram realizados utilizando métodos biofísicos e ensaios *in vitro*, que não são traduzíveis para a situação *in vivo*, estudos adicionais usando modelos *in vivo* são necessários para avaliar os efeitos potenciais dos frutos vermelhos contra DA (Ma *et al.*, 2018).

3.4.6. Doença de Alzheimer e influência das framboesas

A doença de Alzheimer (DA) é uma das mais complexas doenças neurodegenerativas do cérebro. Afeta principalmente a população idosa e leva a processos de disfunção cognitiva

progressiva, distúrbios comportamentais e dificuldades na vida cotidiana. A DA está neuropatologicamente associada à degeneração dos neurónios colinérgicos do prosencéfalo basal, distúrbios do sistema nervoso central, distúrbios das placas amiloide corticais e emaranhados neurofibrilares que contêm proteína tau hiperfosforilada (Auld *et al.*, 2002; Chopra, Misra e Kuhad, 2011). Com base na hipótese colinérgica de DA, estas manifestações resultam em deficiência de aprendizagem e comprometimentos de memória. Na fenda sináptica de sinapses colinérgicas, o neurotransmissor acetilcolina (ACh) é dividido em colina e ácido acético pela enzima acetilcolinesterase (AChE). A diminuição dos níveis sinápticos de ACh foi observada em pacientes com DA, e causa a falta de neuro transmissão colinérgica (Auld *et al.*, 2002; DeKosky, Scheff e Styren, 1996; Francis *et al.*, 1999). Muitos estudos indicaram que uma diminuição na atividade da enzima AChE melhora a função cognitiva, elevando os níveis de ACh (Schliebs e Arendt, 2011).

Os inibidores da AChE (AChEIs), como tacrina, donepezil e fisostigmina, têm sido usados como tratamento sintomático de longo prazo para pacientes com DA. No entanto, embora estes inibidores possam reverter défices cognitivos, eles também têm efeitos colaterais graves, problemas de biodisponibilidade e custos elevados. Portanto, é necessário encontrar AChEIs paliativos mais seguros e duradouros (Auld *et al.*, 2002; Winslow *et al.*, 2005).

De acordo com um estudo recente, vários fitoquímicos bioativos são eficazes na prevenção de doenças por terem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antivirais e anticancerígenos (Slavin e Lloyd, 2012). Alguns fitoquímicos, como polifenóis, carotenóides e flavonoides são potenciais agentes preventivos contra distúrbios cognitivos, incluindo várias alterações neurodegenerativas e DA (Singh *et al.*, 2008; Uriarte-Pueyo e I. Calvo, 2011).

A framboesa preta *Rubus coreanus*, que pertence à família *Rosaceae*, é cultivada em países do sudeste asiático. Estas frutas contêm ácidos orgânicos, como ácido málico e ácido tartárico, bem como flavonoides naturais como astragalina, isoquercitrina e citroneno, e há muito tempo que são usadas na medicina tradicional coreana (Lee *et al.*, 2011). Constituintes de *R. coreanus* foram relatados anteriormente como tendo ações medicinais tais como antioxidantes, analgésicos, anti-inflamatórios e efeitos anti-úlceras (Choi *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011).

O extrato de *R. coreanus* tem uma atividade inibidora de AChE potente. Esta atividade deve-se à presença do ácido gálico. Este tem um efeito inibitório na AChE, ou seja, tanto *R. coreanus*

quanto o ácido gálico são inibidores enzima acetilcolinesterase eficazes contra a DA (Kim et al, 2013).

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa associada a danos oxidativos e inflamação e apesar da pesquisa considerável para compreender a patologia desta doença, ainda não há medicamentos que possam reverter a sua progressão. Produtos naturais, incluindo extratos de alimentos funcionais enriquecidos com polifenóis, são promissores como agentes dietéticos para a prevenção e potencial gestão de DA (Ma et al., 2018).

3.4.7. Inflamação cutânea

A exposição crónica à radiação ultravioleta (UV) causa foto-oxidação, que por sua vez resulta na regulação positiva de metaloproteinases da matriz (MMPs) e perda de colágeno. O fotoenvelhecimento é um processo cumulativo de longo prazo que ocorre principalmente no tecido conjuntivo dérmico da pele. Estudos anteriores mostraram que as metaloproteinases de matriz (MMPs) participam nesse processo (Pittayapruek et al., 2016; Quan et al., 2009). MMPs são uma família de hidrolases peptídicas contendo zinco que podem levar à degradação de proteínas da matriz extracelular (ECMs).

Os compostos fenólicos têm uma alta capacidade de absorver a radiação UV, o que indica que estes oferecem proteção contra os efeitos nocivos da radiação UV. Os flavonoides também fornecem como função protetora a capacidade de eliminar espécies reativas de oxigénio produzidas em plantas em maiores quantidades sob condições de *stress*. Os flavonoides regulam a atividade de muitas enzimas, incluindo as envolvidas na formação de espécies reativas de oxigénio, por exemplo, peroxidase, lipoxigenases e xantina oxidase (Falcone Ferreyra, Rius e Casati, 2012).

Duncan et al. descobriram que o tratamento tópico com framboesa preta pode reduzir a inflamação cutânea induzida por UVB e a carcinogénese, mas o efeito da framboesa vermelha contra o fotoenvelhecimento induzido por UVB não foi investigado. O fotoenvelhecimento é um processo cumulativo de longo prazo que ocorre principalmente no tecido conjuntivo dérmico da pele, com perda de colágeno e outros fatores importantes para a elasticidade da mesma. Neste artigo foram investigados os efeitos anti-envelhecimento do extrato de *Rubus idaeus L.* e do mecanismo interno em fibroblastos dérmicos humanos normais irradiados com UVB. Foi então descoberto que o extrato de framboesa vermelha (*Rubus idaeus L.*), reduziu notavelmente a metaloproteinase secretada da matriz induzida por UVB e a produção de mediadores pró-inflamatórios, e suprimiu significativamente a ativação induzida por UVB de

proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK), fator nuclear $\kappa\beta$, bem como proteína ativadora I. Em suma, os resultados indicaram que a framboesa vermelha (*Rubus idaeus* L.) possuía uma grande eficácia na redução de perda de colagênio induzida por UVB, sendo que esta foi potencialmente eficaz na prevenção do fotoenvelhecimento da pele induzido por UVB (Gao *et al.*, 2018).

Descobriu-se, no início do século XX, que a exposição à luz solar era benéfica e prevenia algumas doenças. A parte ultravioleta do espectro solar (UV) desempenha um papel determinante em muitos processos na biosfera, possuindo muitos efeitos benéficos, poderá, no entanto, ser bastante prejudicial para a saúde e até mesmo, causar danos irreversíveis se o nível de UV exceder os limites de “segurança”. A exposição crônica a raios UV-B pode provocar um foto-envelhecimento precoce, e até mesmo melanomas que podem evoluir para cancro da pele (F. J. Duncan, Jason R. Martin, Brian C. Wulff, Gary D. Stoner, Kathleen L. Tober, Tatiana M. Oberyszyn, 2009).

Tito *et al.* (Tito *et al.*, 2015) mostrou que o extrato lipossolúvel obtido através das folhas de *Rubus Idaeus*, foi eficaz na promoção de hidratação da pele e na proteção das células do excesso de perda de água. Graças a essas atividades, o extrato tem boas potencialidades para ser usado em produtos para a pele, em particular aqueles especificamente formulados para peles secas e envelhecidas. Conforme a pele envelhece, ela progressivamente perde a capacidade de reter água, principalmente devido a alterações do conteúdo de ácidos gordos essenciais no filme hidrolipídico (Kim *et al.*, 2010), e uma capacidade reduzida de sintetizar as proteínas epidérmicas responsáveis pela manutenção de uma pele hidratada, como a aquaporina (Li *et al.*, 2010). Foi descrito que existe uma extensa gama de aplicações potenciais dos produtos derivados da framboesa preta no mercado de cuidados com a pele (Tito *et al.*, 2015).

3.4.7.1. Ácidos gordos das framboesas vermelhas

Os frutos e as folhas da espécie de framboesa *Rubus idaeus* contêm vários tipos de compostos bioativos com propriedades benéficas para a saúde humana; assim, esta espécie tem sido usada durante séculos em todo o mundo como alimento e remédio. A espécie *Rubus idaeus* tem compostos solúveis em água, tais como aminoácidos, glúcidos, oligoelementos e diferentes classes de compostos fenólicos (flavonoides, antocianinas e ácidos fenólicos), que têm alta capacidade antioxidante e propriedades consideravelmente terapêuticas na proteção das células por danos induzidos por stress oxidativo (Mumper, 2010).

Os ácidos gordos, presentes nas folhas de framboesa vermelha, juntamente com ceramidas e colesterol, formam a película hidrolipídica da pele, que é necessário para garantir a integridade de toda a epiderme e para manter as propriedades de impermeabilização da pele. Além disso, os ácidos gordos são muito importantes para garantir a troca correta de eletrólitos entre as células da epiderme, para promover a cicatrização de feridas e por induzir a maturação da camada mais externa da pele (estrato córneo) (Feingold, 2007). De facto, a deficiência de ácidos gordos essenciais leva à formação de um estrato córneo defeituoso, caracterizado por uma capacidade de barreira reduzida e uma descamação aberrante (Levin, 2011). Além disso, o elevado teor de ácidos gordos benéficos e a existência de uma grande variedade dos mesmos presentes no extrato, tornaram este produto potencialmente adequado para peles afetadas por problemas mais sérios, tais como, por exemplo, aqueles associados à psoríase e à rosácea (Tito *et al.*, 2015). Isto mostra que há efeitos benéficos em extratos lipossolúveis de folhas de framboesa vermelha.

3.4.7.2. *Uso cosmético*

Além de seu alto teor de compostos fenólicos, as plantas *Rubus* são ricas em compostos solúveis em óleo, que também são componentes primários do filme hidrolipídico, a barreira da pele. Como as culturas de células vegetais representam um sistema valioso para produzir compostos interessantes e ingredientes para aplicações cosméticas, foram desenvolvidas culturas em suspensão líquida de folhas de *Rubus idaeus* e, então, utilizadas para obter um ingrediente ativo destinado a melhorar a hidratação e a capacidade de hidratação da pele. As células de *Rubus idaeus*, cultivadas em laboratório sob condições estéreis e controladas como culturas em suspensão líquida, foram processadas para obter um extrato solúvel em óleo (lipossolúvel), contendo compostos fenólicos e uma ampla gama de ácidos gordos. O extrato foi testado em queratinócitos e fibroblastos cultivados e depois em pele *in vivo*, para avaliar as suas atividades cosméticas.

Usando culturas de suspensão de células de *Rubus idaeus*, foi desenvolvido um extrato solúvel em óleo (lipossolúvel) particularmente rico em ácidos gordos essenciais, que induziu a expressão dos genes mais importantes envolvidos na hidratação da pele quando testado em cultura queratinócitos e fibroblastos.

Tito *et al.* (Tito *et al.*, 2015) descobriu que o extrato lipossolúvel derivado das células de cultura, de framboesa foi capaz de não só estimular a expressão da aquaporina nos queratinócitos, mas também induzir outros genes importantes responsáveis por manter a integridade da pele e evitar a evaporação em massa da água das camadas superiores da

epiderme. A supra regulação das sintases do ácido hialurônico e das proteínas envolvidas na formação da matriz extracelular da pele induzida pelo extrato lipossolúvel pode contribuir para um aumento na capacidade de retenção de água da pele. Ao validar os dados obtidos do estudo *in vitro* com os testes *in vivo*, Tito *et al.* demonstrou que o extrato lipídico de folhas de framboesas *Rubus idaeus* foi capaz de exercer a sua atividade hidratante na pele real; assim, seria particularmente indicado para combater o processo de envelhecimento e para restaurar as propriedades de aparência jovem de uma pele envelhecida.

Extratos de folhas, frutas e sementes de framboesa têm sido amplamente utilizados como ingredientes para produtos cosméticos, mas esses extratos têm sido variáveis em termos de qualidade e quantidade de compostos bioativos contidos nas diferentes preparações de extratos. As quantidades relativas de metabólitos secundários produzidos pelas plantas podem mudar de acordo com o órgão específico da planta onde são sintetizados, e são principalmente dependentes da época em que as plantas ou frutos são colhidos. Para superar essas dificuldades, as culturas de células vegetais em suspensão tornaram-se uma alternativa válida para a produção de compostos comercialmente interessantes para aplicações cosméticas (Tito *et al.*, 2015), como apresentam várias vantagens em comparação com as plantas cultivadas no campo: padronização, versatilidade, segurança e bio-sustentabilidade (Mulabagal e Tsay, 2004).

Quando testado em culturas de células da pele, o extrato induziu os genes responsáveis pela hidratação da pele, como aquaporina 3, filagrina, involucrina e ácido hialurônico sintase, e estimulado a expressão e a atividade da enzima glucocerebrosidase, envolvidos na produção de ceramida. Além disso, o extrato lipossolúvel aumentou a síntese dos componentes da matriz extracelular em fibroblastos cultivados e mostraram uma notável hidratação da pele capacidade quando testado em pele humana *in vivo*.

Graças a essas atividades, o extrato lipossolúvel de *Rubus idaeus* tem várias aplicações potenciais em cosméticos para a pele, podendo ser usado como hidratante em loções faciais e corporais e como produto anti-envelhecimento em cremes faciais projetados especificamente para combater a formação de rugas.

3.5. Infusões de folhas de framboesas

O espectro de bioatividade dos compostos fenólicos é determinado pela sua estrutura química, concentração e interação com outros compostos. Receitas tradicionais foram estudadas para pesquisar compostos bioativos vegetais. Folhas de arbustos e árvores frutíferas

eram usadas na medicina popular como uma panaceia para muitas doenças e foram esquecidas com o tempo, mas os seus efeitos benéficos estão agora a ser redescobertos (Materska, 2020).

Na medicina popular tradicional, as infusões das folhas dos arbustos de frutos vermelhos eram usadas para muitos fins terapêuticos. Infusões de folhas de groselha preta foram usadas para acelerar o processo de excreção de toxinas do corpo e para regular a função renal (Declume, 1989). Esses extratos foram usados como diaforéticos e agentes diuréticos, bem como para o tratamento de doenças inflamatórias, como doenças reumáticas (Nour, Trandafir e Cosmulescu, 2014; Tabart *et al.*, 2006). O chá de folhas de *R. idaeus* L. (framboesa) tem sido usado há séculos na medicina popular como uma panaceia para diarreia e cólica. A infusão de folhas de framboesa foi usada em compressas e cataplasmas para pele doenças (Costea *et al.*, 2016; Ferlemi e Lamari, 2016).

Folhas de framboesa vermelha são uma fonte de carotenoides e polifenóis, incluindo ácido elágico e ácido salicílico. Os resultados da pesquisa científica de Ponder *et al.* (Ponder e Hallmann, 2019) sugerem que as folhas têm propriedades potenciais pró-saúde que contribuem para a saúde humana. Este estudo determinou o teor polifenólico e perfis de carotenóides em folhas de cultivares de framboesa selecionadas e a sua atividade *in vitro*.

Normalmente, o teor de compostos fenólicos é maior nas folhas do que nos frutos da planta. Tabart *et al.* (Tabart *et al.*, 2006) encontraram este padrão para folhas de groselha negra e observaram que as folhas tinham um perfil diferente de compostos bioativos do perfil de compostos ativos do fruto. Esses resultados também foram confirmados pela Teleszko e Wojdyło (Teleszko e Wojdyło, 2015) em plantas de framboesa e aronia. Cvetanović *et al.* (Cvetanović *et al.*, 2018) comparou o potencial biológico e composição química dos extratos dos caules, folhas e frutos de *Aronia melanocarpa*, e mostrou que a maior concentração de compostos fenólicos totais e flavonoides estava presente nas folhas, seguido por caules e frutos.

Paunović *et al.* (Paunović *et al.*, 2017) mostrou que os sistemas de manipulação do solo tiveram efeitos positivos sobre a síntese e acumular de flavonóis e flavonoides 3-ols em frutos e folhas de groselha preta e uma influência positiva no acumular de antocianinas nas folhas, mas não nos frutos. Nour *et al.* (Nour, Trandafir e Cosmulescu, 2014) examinaram as mudanças no conteúdo de compostos fenólicos em folhas de groselha preta recolhidas em várias datas do período de crescimento e observou um maior conteúdo fenólico total e capacidade antioxidante em folhas de seis cultivares de groselha-preta coletadas em meados de junho.

Além disso, Cvetković *et al.* (Cvetković *et al.*, 2018) investigou a possibilidade de utilização de folhas de arónia quando são consideradas um resíduo agrícola, na fase vegetativa de senescência, como uma fonte potencial de compostos bioativos. Foi descoberto que nas folhas de arónia colhidas em novembro, o valor do teor total de compostos fenólicos era inferior aos valores do teor total das folhas de arónia colhidas em junho, no entanto significativos. Esses resultados comprovam que a síntese de compostos fenólicos ocorre ao longo de todo o crescimento da planta estação, e o tempo de acumulação varia entre as espécies de plantas. Frutos de groselha preta e alguns de diferentes variedades de framboesa, geralmente são colhidos na primeira quinzena de julho. Esta data também pode ser considerada como um momento conveniente para a colheita de folhas. Porém, no caso de colheita em escala industrial (colheita total, incluindo a folha), deve-se levar em conta que este tratamento terá um efeito significativo sobre a planta e no seu rendimento no próximo ano.

Extratos de folhas de framboesa inibem o crescimento bacteriano, reduzem a glicose no sangue e os níveis de lípidos, e mostram atividade anticoagulante (Han *et al.*, 2012). Extratos de folhas de framboesa secas preparados com diferentes solventes (n-hexano, acetato de etilo, clorofórmio e metanol) foram testados *in vitro* para a produção de um efeito relaxante no íleo estimulado de uma cobaia. A maior atividade foi encontrada para extratos de metanol, o que demonstrou a natureza polar dos compostos bioativos (Rojas-Vera, Patel e Dacke, 2002). Investigações conduzidas por Han *et al.* (Han *et al.*, 2012) sobre a atividade anti trombótica de compostos derivados de extratos de folhas de framboesa, confirmaram a atividade anticoagulante dos extratos em testes *in vitro* e *in vivo*. Outros estudos revelaram que os ingredientes ativos dos extratos de folhas de framboesa eram quercetina e tilirosídeo (Han *et al.*, 2012).

As substâncias contidas nas folhas dos arbustos de frutos vermelhos, principalmente os compostos polifenólicos, têm propriedades que são benéficas para a saúde. Essas substâncias têm um potencial uso na prevenção doenças modernas. Os efeitos biológicos dos extratos das folhas de groselha preta, framboesa e arónia são associados à sua alta atividade antioxidante, que foi confirmada em muitas análises *in vitro* e *in vivo*. Portanto, as folhas dos arbustos de frutos vermelhos são uma fonte promissora de substâncias bioativas que pode ser usado como substituto de agentes sintéticos no tratamento e prevenção de doenças relacionadas com o estilo de vida. Estes frutos vermelhos podem, também, ser usados como aditivos alimentares valiosos, aumentando assim as qualidades funcionais dos alimentos (Materska, 2020).

4. Capítulo II – Fenóis totais e capacidade antioxidante da framboesa

4.1. Introdução

A ingestão diária deste fruto rico em antioxidantes pela sua composição não só em compostos fenólicos como também vitamina C, demonstrou alterações benéficas em voluntários saudáveis após o consumo de uma dieta rica em gordura e açúcares (Correia, 2016).

As framboesas são frutos ricos em vitamina C e compostos fenólicos, como já foi referido anteriormente.

Assim preparámos extrato fenólico de framboesa e determinámos o teor de fenóis totais bem como a capacidade antioxidante do extrato.

O trabalho desenvolvido no âmbito desta tese pretende comparar os valores de fenóis totais e da atividade antioxidante com a bibliografia disponível.

Como foi referido na nota introdutória, não foi possível concluir o trabalho, no entanto foram feitas algumas análises apresentadas abaixo.

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. Amostras

Os frutos de *Rubus idaeus* L. utilizados neste trabalho foram produzidos no Algarve, em Mar e Guerra- Faro, e apresentavam-se sãos, inteiros e maduros. Foram congelados após a sua colheita. Os frutos foram colhidos em janeiro de 2020 eram de uma cultivar cuja variedade não foi revelada pelo produtor, foram produzidos no Inverno e cedidos por um produtor local, João Bento.

4.2.2. Reagentes e Padrões

Preparação de extratos de framboesa: metanol absoluto da Honeywell | Riedel-de Haën™ (França), água destilada e ácido fórmico 98-100% da ACS MERCK (Darmstadt, Alemanha).

Doseamento do teor em Fenóis Totais: reagente de Folin-Ciocalteu, carbonato de sódio anidro da PanReac AppliChem (Barcelona, Espanha); ácido gálico a 98% da Fluka - SigmaAldrich (St. Louis, MO, US).

Determinação da capacidade antioxidante: Catequina da Fluka - SigmaAldrich (St. Louis, MO, US), etanol (70%), DPPH da PanReac AppliChem (Barcelona, Espanha), solução extratante e água destilada.

4.2.3. Equipamentos

Os equipamentos utilizados nos ensaios de caracterização química das amostras foram os seguintes:

Preparação de Extratos de *Rubus idaeus* L.: Homogeneizador Ultra-Turrax T25 Janke & Kunkel (IKA Labortechnik, DE); centrífuga 2K15 Sigma Laborzentrifugen.

Determinação dos teores em Fenóis Totais: Evaporador rotativo Centrivap® (Labconco Corporation, Kansas, US), ultrassons, espectrofotómetro HITACHI U-2000 e células de vidro com um percurso ótico de 1cm.

4.2.4. Preparação dos extratos de *Rubus Idaeus* L.

Tendo em conta estes objetivos, foi preparado um extrato de framboesa rico em compostos fenólicos. O trabalho começou pela preparação do extrato da framboesa vermelha (*Rubus Idaeus* sp.), estas foram adquiridas numa produção algarvia. No procedimento pesou-se 40 g de framboesa ao qual se adicionou 90 mL de solução extratante. Nos extratos acidificados de metanol e água $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_2\text{O}_2$, (79,9:20:0,1 v/v/v) homogeneizou-se a mistura durante 1 minuto, a 9500 rpm/min, e procedeu-se à sua centrifugação, 20 minutos a 7000 r.p.m., à temperatura de 4°C.

De seguida, iniciou-se a separação e filtração do sobrenadante. As massas residuais foram sujeitas a uma nova extração com 70 mL de solução extratante e os dois extratos foram misturados. Finalmente, todos os extratos foram acondicionados em tubos falcon de 15 mL, congelados à temperatura de -20°C até ao momento da realização dos ensaios.

4.2.5. Determinação do Teor em Fenóis Totais

Posteriormente à extração, procedeu-se à determinação dos fenóis totais. Uma alíquota de 1 µl da amostra (diluído em água 1:100), foi adicionada a 200 µl de reagente de Folin-Ciocalteau (diluído em água 1:10). Após 3 min, foram adicionados 1 mL de carbonato de sódio (15% p/v) e 2 mL de água. Após 1 hora de incubação no escuro, mediu-se a absorvência das amostras no espectrofotómetro UV-visível a um comprimento de onda de 765 nm em células de vidro

com um percurso ótico. A amostra foi analisada em triplicado, pelo que o resultado é apresentado como média \pm desvio padrão em mg de equivalente de ácido gálico /100g de fruto fresco (mg EAG/100g FF). O ácido gálico foi utilizado como padrão externo. Todas as amostras e soluções-padrão foram preparadas e analisadas em triplicado.

Para o tratamento de dados, foi utilizado o método da reta de calibração. A reta de calibração do ácido gálico foi obtida através do método de regressão linear dos dados obtidos experimentalmente dos padrões externos. Este ensaio possibilitou uma estimativa do teor dos fenóis totais da framboesa em estudo. Esta metodologia baseia-se na capacidade redutora dos fenóis, no entanto, como é inespecífica, apresenta vários interferentes como compostos antioxidantes e compostos redutores nomeadamente ácido ascórbico, açúcares e sulfito. Considerando a abundância da framboesa em vitamina C, o teor em compostos fenólicos totais obtidos por este método constitui uma sobrestimação do seu conteúdo em compostos fenólicos real.

4.2.6. Determinação da atividade antioxidante

O uso do ensaio DPPH fornece uma hipótese fácil e rápida de avaliar antioxidantes por espectrofotometria, portanto, pode ser útil para avaliar vários produtos ao mesmo tempo.

Resumidamente, alíquotas de 10 microlitros de cada amostra foram misturadas com 990 microlitros de solução de DPPH (0,002% em metanol). A mistura de reação foi incubada à temperatura ambiente por 30 min no escuro. O controlo positivo foi quercetina a 10 mg/ml e diluído a 1:10 (concentração final: 1 mg / ml).

4.3. Resultados e discussão

A quantificação dos fenóis totais foi estimada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, 1999) com algumas modificações. O ensaio Folin-Ciocalteu (Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, 1999) é um dos mais antigos métodos de quantificação de fenóis presentes numa amostra, e é também conhecido como ensaio de fenóis totais. A química do Folin-Ciocalteu ainda não está bem definida, no entanto os ensaios de fenóis totais por esse método têm uma grande popularidade. São ensaios convenientes, simples e reprodutíveis. Como resultado, está se a tornar num ensaio rotineiro no estudo de antioxidantes fenólicos, uma vez que se estabeleceu uma correlação entre o conteúdo fenólico e a capacidade antioxidante de produtos naturais (Chemistry, 2009; Duralija

e Ercisli, 2012).

A comprimento de onda de 765 nm, foram medidos os valores de absorvância. Obteve-se a Tabela XI (Anexo), em que relaciona a concentração, variável independente, com a absorvância, variável dependente. Foi, então, construída a reta de calibração, abaixo apresentada.

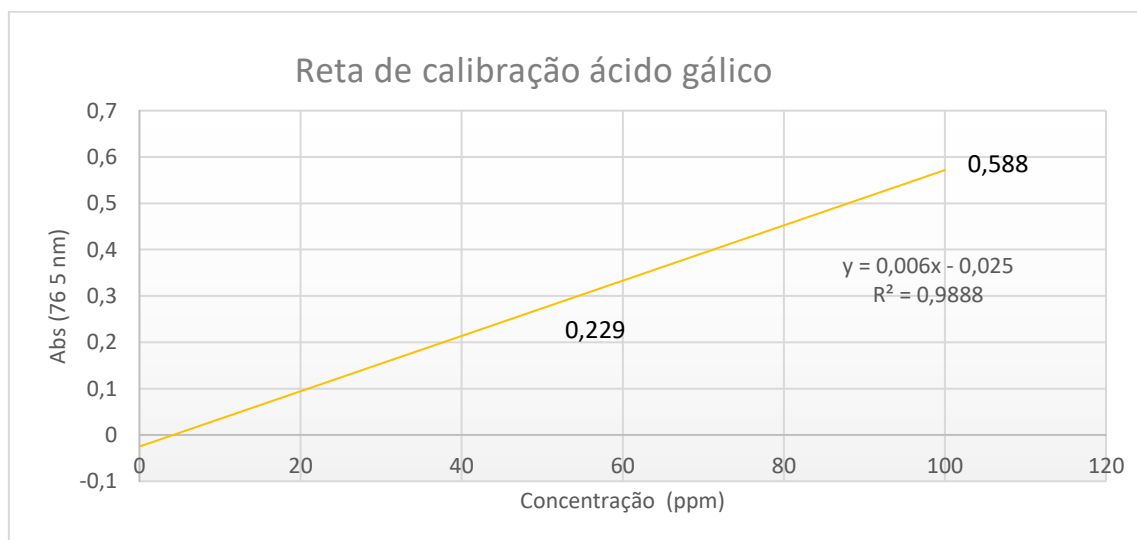


Gráfico I - Curva de calibração do ácido gálico.

Para a obtenção dos valores de concentração de fenóis totais nas amostras, foi substituído o valor de absorvância obtido experimentalmente, na equação da reta de calibração. E obtiveram-se, os resultados apresentados na Tabela III.

Tabela III - Relação entre os valores obtidos na absorvância, através da curva de calibração.

	Abs (y)	□ (x)	□ mg EAG/L *100	mg EAG/mL	□ mg EAG/g FF	□ mg EAG/100g FF
A100	0,496	86,833	8683,33	8,683	1,737	173,67
A'100	0,503	88	8800	8,8	1,76	176
A"100	0,496	86,833	8683,33	8,683	1,737	173,67

As amostras foram analisadas em triplicado e os resultados são apresentados como média ± desvio-padrão. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico/100g de fruto fresco (mg EAG/100g FF).

Tabela IV - Média e desvio padrão.

	Mg EAG/mL	□ mg EAG/g FF	□ mg EAG/100g FF
Média (mg EAG/L)	8722,2	1,744	174,44
Desvio Padrão	0,0673	0,0134	1,3471

A mistura metanol acidificado com ácido fórmico (79,9:20:0,1 v/v/v), foi a que possibilitou um extrato mais abundante em compostos fenólicos maioritários da framboesa (Correia, 2016). Sendo assim, o método de extração escolhido foi Metanol/água/ácido Fórmico (79,9:20:0,1). Para diferentes métodos de extração, foram obtidos diferentes valores de fenóis totais. O valor obtido foi de $174,4 \pm 1,34$ mg EAG/100g FF. Em comparação com a bibliografia apresentada na Tabela V, a amostra apresenta um valor mais baixo.

Tabela V - teores fenóis totais (média \pm DP) de frutos de *Rubus idaeus* L.

Metanol/água/ác. Fórmico (79,9:20:0,1) $174,4 \pm 1,34$ mg EAG/100g FF

Dados da Bibliografia

Metanol/água/ác. Fórmico (79,9:20:0,1) $234,2 \pm 1,14$ mg EAG/100g FF ⁽¹⁾

Metanol/água/ác. Fórmico (60:39:1) 216,9 - 233,9 mg EAG/100g FF ⁽²⁾

Acetona (80%) 227.35 ± 21.62 mg EAG/100g FF ⁽³⁾

⁽¹⁾ Correia, M. M., CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA FRAMBOESA (*Rubus idaeus* L.). CONTRIBUIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DE UMA ALEGAÇÃO DE SAÚDE. Tese (grau de Doutor em FARMÁCIA, especialidade Bromatologia) - Faculdade Farmácia da Universidade de Lisboa. Lisboa, p.276, 2016; ⁽²⁾ Bradish, C. M., Perkins-Veazie, P., Fernandez, G. E., Xie, G., & Jia, W. (2011). Comparison of Flavonoid Composition of Red Raspberries (*Rubus idaeus* L.) Grown in the Southern United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), 5779–5786. doi:10.1021/jf203474e; ⁽³⁾ B. Song, B. Zheng, T. Li and R. Liu, *Food Funct.*, 2020, DOI: 10.1039/C9FO02845E.

Na Tabela V podemos ver a negrito o valor obtido. É de notar que comparado com a bibliografia o resultado obtido é mais baixo. A variabilidade nos resultados descritos na bibliografia, pode ser atribuída ao genótipo, condições edafo-climáticas, práticas culturais, condições de conservação e de armazenamento dos frutos frescos, entre outros fatores.

O método de extração pode, também, fazer variar o conteúdo em compostos fenólicos presentes em extratos de frutos de *Rubus idaeus* L., como podemos ver na Tabela V.

Capacidade antioxidante

A atividade antioxidante dos compostos antioxidantes foi medida pela capacidade de doar um hidrogênio ou eliminar radicais livres, usando um radical estável, DPPH. DPPH é uma abreviatura comum para o composto químico orgânico 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil. O método do radical livre com DPPH é um ensaio antioxidante baseado na transferência de elétrons que apresenta uma solução violeta em etanol. Esse radical livre, estável à temperatura ambiente, é reduzido na presença de uma molécula antioxidante, dando origem a uma solução de etanol incolor.

Quanto maior a descoloração; maior é a capacidade de redução. Ou seja, é uma característica que permite o monitoramento visual da reação.

A Capacidade antioxidante foi medida através de análises espectrofotométricas. E calculado através da seguinte equação:

$$(\% \text{ AA}) = ((\text{Abs } 1 - [\text{Abs}2;3 \text{ ou } 4 -5]) / \text{Abs } 1) \times 100 \rightarrow \text{Equação do ensaio de DPPH}$$

Na Tabela VI estão descritos os resultados obtidos da medição em triplicado tanto da amostra como do padrão (Quercetina).

Tabela VI - Relação entre a concentração e a absorvância.

Concentração	Absorvância (517nm)
10µl SE + 990 µl DPPH	0,811
10µl SE + 990 µl DPPH	0,696
10µl SE + 990 µl DPPH	0,71
10µl EXT + 990 µl DPPH	0,48
10µl EXT + 990 µl DPPH	0,453
10µl EXT + 990 µl DPPH	0,469
10µl EXT + 990 µl Etanol 70%	0,317
10µl EXT + 990 µl Etanol 70%	0,312
10µl EXT + 990 µl Etanol 70%	0,327
10µl Quercetina + 990 µl DPPH	0,322
10µl Quercetina + 990 µl DPPH	0,35
10µl Quercetina + 990 µl DPPH	0,357
10µl Quercetina + 990 µl Etanol 70%	0,177
10µl Quercetina + 990 µl Etanol 70%	0,183
10µl Quercetina + 990 µl Etanol 70%	0,196
10µl DPPH + 990 µl H ₂ O	0,777
10µl DPPH + 990 µl H ₂ O	0,707
10µl DPPH + 990 µl H ₂ O	0,88

(SE – Solução extratante; EXT – Extrato-amostra)

Este trabalho divide-se em duas partes. A 1ª é a obtenção da percentagem da capacidade antioxidante da amostra, e a 2ª a obtenção da percentagem da capacidade antioxidante do padrão, neste caso a quercetina.

Para facilitar o entendimento dos cálculos efetuados denominou-se de Solução I é a média das soluções H₂O + DPPH, Solução 2,3 e 4 às soluções EXT (amostra) + DPPH e por fim, Solução 5 às soluções do EXT (amostra) + etanol 70%. Na Tabela VII, estão apresentados na coluna “ABS” os valores da média de absorvância das soluções I e 5, e os valores de absorvância das soluções 2,3, e 4. Na coluna seguinte, “AA” estão representados os valores da Atividade Antioxidante, estes valores foram obtidos através da equação do ensaio de DPPH.

Tabela VII - Médias obtidas Absorvância (ABS) da solução I e solução 5; valores de Atividade antioxidante (AA) das soluções 2, 3 e 4.

EXTRACTO	ABS	AA
ABS1	0,777	
ABS2	0,556	0,64
ABS3	0,442	0,79
ABS4	0,38	0,87
ABS5	0,277	

O resultado foi expresso em média e \pm desvio padrão de aproximadamente de $79,00 \pm 0,11$ % (Tabela VIII).

Tabela VIII - Resultado obtido da percentagem da atividade antioxidante da amostra.

Média	SD	Média %
0,79	0,11	78,76

No Padrão, para facilitar o entendimento dos cálculos efetuados denominou-se de Solução I às soluções H₂O + DPPH, Solução 6,7 e 8 às soluções Quercetina (padrão) + DPPH e por fim, Solução 5 às soluções Quercetina (padrão) + etanol 70%.

Na Tabela IX, estão apresentados na coluna “ABS” os valores da média de absorvância das soluções I e 5, e os valores de absorvância das soluções 6,7, e 8. Na coluna seguinte, “AA” estão representados os valores da Atividade Antioxidante, estes valores foram obtidos através da equação do ensaio de DPPH.

Tabela IX - Médias obtidas Absorvância (ABS) da solução I e solução 5; valores de Atividade

antioxidante (AA) das soluções 6, 7 e 8.

QUERCETINA	ABS	AA
ABS1	0,78	
ABS6	0,32	0,82
ABS7	0,35	0,79
ABS8	0,36	0,78
ABS5	0,185	

O resultado foi expresso em média e \pm desvio padrão de aproximadamente $80 \pm 0,02\%$.

Tabela X - Resultado obtido da percentagem da atividade antioxidante do padrão.

Média	SD	Média %
0,80	0,02	79.62

A % da atividade antioxidante em diferentes concentrações foi determinada e o valor IC_{50} dos extratos foi comparado com o da quercetina que foi usada como padrão. IC significa concentração de inibição e IC_{50} é a metade da concentração de inibição, significa a concentração de antioxidante que inibe o radical livre.

O valor de IC_{50} é inversamente proporcional à capacidade antioxidante da amostra.

5. Conclusão

Na base da prevenção e controlo de doenças crónicas e degenerativas, existem padrões de estilo de vida a seguir, incluindo perder peso (tanto sobrepeso como obesidade), praticar atividade física regular e adotar uma dieta que permita controlar a hiperglicemia e reduzir os fatores de risco de DCV, como níveis elevados de tensão arterial e dislipidemia (Gonzalez-campoy *et al.*, 2013). Uma recomendação dietética importante da American Association of Clinical Endocrinologists é consumir uma dieta baseada em vegetais rica em fibras, poucas calorias e hidratos de carbono e rica em fitoquímicos/antioxidantes (Gonzalez-campoy *et al.*, 2013).

O diagnóstico precoce dos sintomas de doença cardíaca é fulcral para combater as DCV associadas à obesidade e diabetes e para a adoção de planos nutricionais. A capacidade potencial de certos alimentos e seus compostos bioativos para reverter ou impedir a progressão de mecanismos subjacentes a essas doenças tem sido o centro de vários estudos.

Neste estudo foram reportadas as evidências descritas na bibliografia de que a framboesa vermelha possui efeitos anticancerígenos, efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. Os resultados obtidos na literatura disponível revelaram que as framboesas vermelhas, têm efeitos neuro protetores, podem ser úteis na prevenção e intervenção da urolitíase, efeitos protetores contra os efeitos nocivos da radiação UV.

Os ensaios clínicos com alimentos geralmente são realizados para avaliar o efeito dos produtos alimentícios na prevenção ou mitigação dos sintomas, e não no tratamento ou cura de uma doença, o que se entende facilmente pelo fato de alimentos e alimentações adequadas poderem ser preventivas do desenvolvimento precoce de algumas doenças e manutenção de um bom estado de saúde e os alimentos não poderem ser entendidos como medicamentos.

Os estudos nem sempre foram conclusivos e há também que referir a não existência de muitos estudos em humanos. Assim, a pesquisa nesta área deve continuar para que se possa constatar, a relação entre a composição em compostos fenólicos, quantidades ingeridas, absorção, metabolismo e cinética dos compostos fenólicos de framboesas vermelhas, com a saúde e na prevenção de doenças.

Relativamente aos resultados do trabalho realizado no laboratório, permitem-nos concluir que o extrato fenólico da framboesa tem uma quantidade elevada de fenóis totais embora

ligeiramente mais baixos do que alguns descritos na literatura, mas pode dever-se a vários fatores como genótipo, condições edafo-climáticas, práticas culturais, condições de conservação e de armazenamento dos frutos frescos.

A capacidade antioxidante do extrato medida por DPPH é elevada.

Gostaríamos de ter determinado a capacidade antioxidante do extrato por outros métodos e caracterizar e quantificar os compostos fenólicos no fruto por HPLC.

Isto não foi possível pelas razões já anteriormente referidas como também não foi possível realizar o ensaio clínico programado.

Quando possível e como trabalho futuro pensamos poder completar o trabalho como que estava programado para esta tese, cujos resultados, esperamos que possam ser mais uma pequena contribuição para o entendimento do poder antioxidante e anti-inflamatório da framboesa *in vivo*, em humanos.

6. Bibliografia

ANGELONI, Cristina et al. "Role of methylglyoxal in Alzheimer's disease." *BioMed research international* vol. 2014 (2014): 238485. doi:10.1155/2014/238485

ARTMANN, A. Nnetta H. et al. - Influence of Processing on Quality Parameters of Strawberries. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 20, 9484–9489 Publication Date:September 27, 2008 doi: 10.1021/jf801555q

AULD, D. S. et al. - Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system. **Progress in Neurobiology.** 2002 Oct; 68 (3): 209-45. doi: 10.1016 / s0301-0082 (02) 00079-5

BEERI, Michal Schnaider et al. - Serum concentration of an inflammatory glycotoxin, methylglyoxal, is associated with increased cognitive decline in elderly individuals. doi: 10.1016/j.mad.2011.10.007.Serum.

BEGOÑA DE ANCOS, Eva M. GONZÁLEZ, And M. Pilar Cano - Ellagic Acid , Vitamin C , and Total Phenolic Contents and Radical. (2000).

BORGES G, Roowi S, Rouanet JM, Duthie GG, Lean ME, Crozier A. The bioavailability of raspberry anthocyanins and ellagitannins in rats. **Mol Nutr Food Res.** 2007;51(6):714-725. doi:10.1002/mnfr.200700024

BURTON-FREEMAN, Britt M.; SANDHU, Amandeep K.; EDIRISINGHE, Indika - Red Raspberries and Their Bioactive Polyphenols: Cardiometabolic and Neuronal Health Links. **Advances in Nutrition.** . ISSN 2156-5376. 7:1 (2016) 44–65. doi: 10.3945/an.115.009639.

CĂLINOIU, Lavinia Florina; VODNAR, Dan Cristian - Whole grains and phenolic acids: A review on bioactivity, functionality, health benefits and bioavailability. **Nutrients.** . ISSN 20726643. 10:11 (2018). doi: 10.3390/nu10111615.

CAO, Guohua et al. - Anthocyanins are absorbed in glycated forms in elderly women : a pharmacokinetic study I – 4. March (2018) 920–926.

CERIELLO, Antonio; MOTZ, Enrico - Is Oxidative Stress the Pathogenic Mechanism Underlying Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Disease? The Common Soil Hypothesis Revisited. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.** . ISSN 10795642. 24:5 (2004) 816–823. doi: 10.1161/01.ATV.0000122852.22604.78.

CHEMISTRY, Food - Characterization of Red Raspberry (*Rubus idaeus* L .) Genotypes for Their Physicochemical Properties. 2009). doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01297.x.

CHEN, Hong Sheng *et al.* - Effects of Raspberry Phytochemical Extract on Cell Proliferation, Apoptosis, and Serum Proteomics in a Rat Model. **Journal of Food Science**. . ISSN 00221147. 76:8 (2011) 192–198. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02373.x.

CHEN, Liang *et al.* - Phytochemical properties and antioxidant capacities of commercial raspberry varieties. **Journal of Functional Foods**. . ISSN 1756-4646. 5:1 (2012) 508–515. doi: 10.1016/j.jff.2012.10.009.

KIM, Cho Rong *et al.* Dong-Hoon Shin - Rubus coreanus Miquel Inhibits Acetylcholinesterase Activity and Prevents Cognitive Impairment in a Mouse Model of Dementia. 16:9 (2013) 785–792. doi: 10.1089/jmf.2012.2663.

CHOI, Jongwon *et al.* - Antinociceptive and antiinflammatory effects of niga-ichigoside F I and 23-hydroxytormentonic acid obtained from Rubus coreanus. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. 26:10 (2003) 1436–1441. doi: 10.1248/bpb.26.1436.

CHOPRA K, Misra S, Kuhad A. Neurobiological aspects of Alzheimer's disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2011 May;15(5):535-55. doi: 10.1517/14728222.2011.557363.

CORREIA, Maria Madalena Morais Bettencourt Da Câmara - Caracterização química e avaliação da atividade biológica da framboesa (*rubus idaeus* L.). contribuição para o desenvolvimento de uma alegação de saúde

COSTEA, Teodora *et al.* - Phenolic content and antioxidant activity of a raspberry leaf dry extract. **Romanian Biotechnological Letters**. . ISSN 12245984. 21:2 (2016) 11346–11356.

CVETANOVIĆ, Aleksandra *et al.* - Comparative in vitro studies of the biological potential and chemical composition of stems, leaves and berries Aronia melanocarpa's extracts obtained by subcritical water extraction. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 18736351. 121:2018) 458–466. doi: 10.1016/j.fct.2018.09.045.

CVETKOVIĆ, Dragan *et al.* - Aronia leaves at the end of harvest season — Promising source of phenolic compounds, macro- and microelements. **Scientia Horticulturae**. . ISSN 03044238. 239:October 2017 (2018) 17–25. doi: 10.1016/j.scienta.2018.05.015.

DECLUME, C. - Anti-inflammatory evaluation of a hydroalcoholic extract of black currant leaves (*Ribes nigrum*). **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 03788741. 27:1–2 (1989) 91–98. doi: 10.1016/0378-8741(89)90081-0.

DEKOSKY, Steven T.; SCHEFF, Stephen W.; STYREN, Scot D. - Structural correlates of cognition in dementia: Quantification and assessment of synapse change.

Neurodegeneration. . ISSN 10558330. 5:4 (1996) 417–421. doi: 10.1006/neur.1996.0056.

DIAS-NETO, Marina *et al.* - Novos conceitos sobre adiposidade na patologia da aorta abdominal. **Angiologia e Cirurgia Vascular**. . ISSN 1646-706X. 14:2 (2018) 48–53.

DURALIJA, Boris; ERCISLI, Sezai - A Comparison of Fruit Chemical Characteristics of Two Wild Grown. (2012). doi: 10.3390/molecules170910390.

DUTRA, Rodrigo Luiz Targino *et al.* - Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds in frozen pulps of Brazilian exotic fruits exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**. (2017) 650–657. doi: 10.1016/j.foodres.2017.07.047.

VAN DUYNHOVEN J *et al.* - Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 15;108 Suppl 1(Suppl 1):4531-8. doi: 10.1073/pnas.1000098107.

EFSA - Guidance on the scientific requirements for health claims related to antioxidants , oxidative damage and cardiovascular health. **EFSA Journal** 2011;9(12):2474 SCIENTIFIC. (2011). 9:12 1–13.

EL-SHIEKH, Riham A. *et al.* - Anti-obesity effect of argel (*Solenostemma argel*) on obese rats fed a high fat diet. **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 18727573. 238:2019) 111893. doi: 10.1016/j.jep.2019.111893.

ELAINE M. DANIEL, SUNIL RATNAYAKE, THOMAS KINSTLE, And Gary D. Stoner - The effects of ph and rat intestinal contents on the liberation of ellagic acid from purified and crude ellagitannins. **Journal of Natural Products**. 4 (1991) 946–952.

ERDA, A. C. *et al.* - Identification of Urolithin A as a Metabolite Produced by Human Colon Microflora from Ellagic Acid and Related Compounds. (2005).

F J. DUNCAN, JASON R. MARTIN, BRIAN C. WULFF, GARY D. STONER, KATHLEEN L. TOBER, TATIANA M. OBERYSZYN, Donna F. Kusewitt And Anne M. Van Buskirk - Topical Treatment with Black Raspberry Extract Reduces Cutaneous UVB-Induced Carcinogenesis and Inflammation. 2:7 (2009) 1–18. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-08-0193.Topical.

FALCONE FERREYRA, María L.; RIUS, Sebastián P.; CASATI, Paula - Flavonoids: Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**. . ISSN 1664462X. 3:SEP (2012) 1–16. doi: 10.3389/fpls.2012.00222.

FEINGOLD, Kenneth R. - The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. 48:2007). doi: 10.1194/jlr.R700013-JLR200.

FELGINES, Catherine *et al.* - Anthocyanins Are Efficiently Absorbed from the Stomach in Anesthetized Rats *Se. March* (2018) 4178–4182.

FERESIN, Rafaela G. *et al.* - Blackberry, raspberry and black raspberry polyphenol extracts attenuate angiotensin II-induced senescence in vascular smooth muscle cells. **Food and Function**. . ISSN 2042650X. 7:10 (2016) 4175–4187. doi: 10.1039/c6fo00743k.

FERLEMI, Anastasia Varvara; LAMARI, Fotini N. - Berry leaves: An alternative source of bioactive natural products of nutritional and medicinal value. **Antioxidants**. . ISSN 20763921. 5:2 (2016). doi: 10.3390/antiox5020017.

FIGUEIRA, M. E. *et al.* - Chemical characterization of a red raspberry fruit extract and evaluation of its pharmacological effects in experimental models of acute inflammation and collagen-induced arthritis. **Food and Function**. . ISSN 2042650X. 5:12 (2014) 3241–3251. doi: 10.1039/c4fo00376d.

FRANCIS, Paul T. *et al.* - The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: A review of progress. **Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry**. . ISSN 00223050. 66:2 (1999) 137–147. doi: 10.1136/jnnp.66.2.137.

FREITAS, Victor - REVISTA DE CIÊNCIA ELEMENTAR O mundo colorido das antocianinas. 2019) 1–6. doi: 10.24927/rce2019.017.

GAO, Wei *et al.* - *Rubus idaeus* L. (red raspberry) blocks UVB-induced MMP production and promotes type I procollagen synthesis via inhibition of MAPK / AP-1 , NF- κ β and stimulation of TGF- β / Smad , Nrf2 in normal human dermal fibroblasts. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**. . ISSN 1011-1344. 185:May (2018) 241–253. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.06.007.

GHALAYINI, Ibrahim F.; AL-GHAZO, Mohammed A.; HARFEIL, Mohammad N. A. - Prophylaxis and Therapeutic Effects of Raspberry (*Rubus idaeus*) on Renal Stone Formation in Balb / c mice. 37:2 (2011) 259–267. doi: 10.1590/S1677-55382011000200013.

Gonzalez-campoy, j. Michael *et al.* - clinical practice guidelines for healthy eating for the prevention and treatment of metabolic and endocrine diseases in adults : cosponsored by the american association of clinical endocrinologists / the american college of endocrinology and the obesity s. 19:October 2013 ([s.d.]) 1–82.

HAN, Na *et al.* - Antithrombotic activity of fractions and components obtained from raspberry leaves (*Rubus chingii*). **Food Chemistry**. . ISSN 18737072. 132:1 (2012) 181–185. doi:

10.1016/j.foodchem.2011.10.051.

HONG, Yilian *et al.* - Ginsenoside Rb2 alleviates obesity by activation of brown fat and induction of browning of white fat. **Frontiers in Endocrinology**. . ISSN 16642392. 10:MAR (2019) 1–11. doi: 10.3389/fendo.2019.00153.

HSIEH, Hsi-Lung; YANG, Chuen-Mao - Role of Redox Signaling in Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases. 2013:2013).

JAE SUE CHOI, Takako Yokozawa And Hikokichi Oura - Antihyperlipidemic effect of flavonoids from davidiana. 54:1 (1991) 218–224.

JAKOBSDOTTIR, Greta *et al.* - Formation of Short-Chain Fatty Acids, Excretion of Anthocyanins, and Microbial Diversity in Rats Fed Blackcurrants, Blackberries, and Raspberries. **Journal of Nutrition and Metabolism**. . ISSN 2090-0724. 2013:2013) 1–12. doi: 10.1155/2013/202534.

JEONG, Mi Young *et al.* - Rubi fructus (*rubus coreanus*) inhibits differentiation to adipocytes in 3T3-L1 cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. . ISSN 1741427X. 2013:2013). doi: 10.1155/2013/475386.

JIN, Peng *et al.* - Effect of cultural system and storage temperature on antioxidant capacity and phenolic compounds in strawberries. **Food Chemistry**. . ISSN 0308-8146. 124:1 (2011) 262–270. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.06.029.

KALT, Wilhelmina *et al.* - Antioxidant Capacity , Vitamin C , Phenolics , and Anthocyanins after Fresh Storage of Small Fruits. 1999) 4638–4644.

KALT, Wilhelmina - Anthocyanins and Their C₆-C₃-C₆ Metabolites in Humans and Animals. 2019).

KIM, Eun Ju *et al.* - Skin aging and photoaging alter fatty acids composition, including 11,14,17-icosatrienoic acid, in the epidermis of human skin. **Journal of Korean Medical Science**. . ISSN 10118934. 25:6 (2010) 980–983. doi: 10.3346/jkms.2010.25.6.980.

KIM, Sun Joong *et al.* - Antiulcer activity of anthocyanins from *Rubus coreanus* via association with regulation of the activity of matrix metalloproteinase-2. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. . ISSN 00218561. 59:21 (2011) 11786–11793. doi: 10.1021/jf104192a.

LEE, Ji Eun *et al.* - Effects of a *Rubus coreanus* Miquel supplement on plasma antioxidant capacity in healthy Korean men. **Nutrition Research and Practice**. . ISSN 19761457. 5:5 (2011) 429–434. doi: 10.4162/nrp.2011.5.5.429.

LEE, Somi *et al.* - Fatigue-alleviating effect on mice of an ethanolic extract from *Rubus coreanus*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. . ISSN 09168451. 75:2 (2011) 349–351. doi: 10.1271/bbb.100592.

LEVIN, James Q. Del Rosso; Jacquelyn - The Clinical Relevance of Maintaining the Functional Integrity of the Stratum Corneum in both Healthy and Disease-affected Skin. 4:9 (2011) 22–42.

LI, Ji *et al.* - Aquaporin-3 gene and protein expression in sun-protected human skin decreases with skin ageing. **Australasian Journal of Dermatology**. . ISSN 00048380. 51:2 (2010) 106–112. doi: 10.1111/j.1440-0960.2010.00629.x.

LIM, Jae W.; JEONG, Jong T.; SHIN, Chul S. - Component analysis and sensory evaluation of Korean black raspberry (*Rubus coreanus* Mique) wines. **International Journal of Food Science and Technology**. . ISSN 09505423. 47:5 (2012) 918–926. doi: 10.1111/j.1365-2621.2011.02922.x.

MA, Hang *et al.* - Evaluation of Polyphenol Anthocyanin-Enriched Extracts of Blackberry , Black Raspberry , Blueberry , Cranberry , Red Raspberry , and Strawberry for Free Radical Scavenging , Reactive Carbonyl Species Aggregation , and Microglial Neuroprotective Effects. **International journal of Molecular sciences**. 2018) 19. doi: 10.3390/ijms19020461.

MARÍA V. SELMA, FRANCISCO A. TOMÁS-BARBERÁN, DAVID BELTRÁN, Rocio García-Villalba And Juan C. Espín - *Gordonibacter urolithinifaciens* sp. nov., a urolithin-producing bacterium isolated from the human gut. 2014) 2346–2352. doi: 10.1099/ij.s.0.055095-0.

MATERSKA, Monika Staszowska-Karku; Małgorzata - Phenolic Composition, Mineral Content, and Beneficial Bioactivities of Leaf Extracts from Black Currant (*Ribes nigrum* L.), Raspberry (*Rubus idaeus*), and Aronia (*Aronia melanocarpa*). 2020).

MCDOUGALL, Gordon J. *et al.* - Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. . ISSN 00218561. 53:15 (2005) 5896–5904. doi: 10.1021/jf050131p.

MILBURY, Paul E. *et al.* - Bioavailability of elderberry anthocyanins. 123:2002) 997–1006.

MIRANDA, Hugo Vicente; EL-AGNAF, Omar M. A.; OUTEIRO, Tiago Fleming - Glycation in Parkinson ' s Disease and Alzheimer ' s Disease Protein Glycation : An Age-Dependent Posttranslational Modification Parkinson ' s and Alzheimer ' s Disease : Different Disorders With Common Features. 31:6 (2016) 782–790. doi: 10.1002/mds.26566.

MORIMOTO, Chie *et al.* - Anti-obese action of raspberry ketone. **Life Sciences**. . ISSN 00243205. 77:2 (2005) 194–204. doi: 10.1016/j.lfs.2004.12.029.

MULABAGAL, Vanisree; TSAY, Hsin-Sheng - Plant Cell Cultures - An Alternative and Efficient Source for.pdf. **International Journal of Applied Science and Engineering Int . J . Appl . Sci . Eng**. 2:2 (2004) 29–48.

MULLEN, WILLIAM *et al.* - Determination of Flavonol Metabolites in Plasma and Tissues of Rats by HPLC – Radiocounting and Tandem Mass Spectrometry Following Oral Ingestion of [2- 14 C] Quercetin-4 ' -glucoside. 2002) 6902–6909.

MUMPER, Jin Dai And Russell J. - Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. 2010) 7313–7352. doi: 10.3390/molecules15107313.

NIRUMAND, Mina Cheraghi *et al.* - Dietary Plants for the Prevention and Management of Kidney Stones : Preclinical and Clinical Evidence and Molecular Mechanisms. 2018). doi: 10.3390/ijms19030765.

NORATTO, Giuliana; CHEW, Boon P.; IVANOV, Ivan - Red raspberry decreases heart biomarkers of cardiac remodeling associated with oxidative and inflammatory stress in obese diabetic db/db mice. **Food and Function**. . ISSN 2042650X. 7:12 (2016) 4944–4955. doi: 10.1039/c6fo01330a.

NOUR, Violeta; TRANDAFIR, Ion; COSMULESCU, Sina - Antioxidant capacity, phenolic compounds and minerals content of blackcurrant (*ribes nigrum* L.) leaves as influenced by harvesting date and extraction method. **Industrial Crops and Products**. . ISSN 09266690. 53:2014) 133–139. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.12.022.

OMS - Introduction. **DIET , NUTRITION AND THE PREVENTION OF Chronic diseases: Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation**. . ISSN 0512-3054. 2003) 1–3. doi: 0512-3054.

OSZMIANŃSKI, Jan; WOJDYŁO, Aneta - Comparative study of phenolic content and antioxidant activity of strawberry puree, clear, and cloudy juices. **European Food Research and Technology**. . ISSN 14382377. 228:4 (2009) 623–631. doi: 10.1007/s00217-008-0971-2.

PALAFIX-CARLOS, Hugo; AYALA-ZAVALA, Fernando; GONZ, Gustavo A. - The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. 76:1 (2011) 6–15. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01957.x.

PANIĆ, Manuela *et al.* - Ready-to-use green polyphenolic extracts from food by-products.

Food Chemistry. . ISSN 18737072. 283:2019) 628–636. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.061.

PANTELIDIS, G. E. *et al.* - Food Chemistry Antioxidant capacity , phenol , anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries , blackberries , red currants , gooseberries and Cornelian cherries. 102:2007) 777–783. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.06.021.

PARK, Woo Yong *et al.* - Black Raspberry (*Rubus coreanus* Miquel) Promotes Browning of Preadipocytes and Inguinal White Adipose Tissue in Cold-Induced Mice. 1:2019) 1–15.

PASSAMONTI, Sabina *et al.* - The stomach as a site for anthocyanins absorption from food I. 544:March (2003) 210–213. doi: 10.1016/S0014-5793(03)00504-0.

PAUNOVIĆ, Svetlana M. *et al.* - Bioactive compounds and antimicrobial activity of black currant (*Ribes nigrum* L.) berries and leaves extract obtained by different soil management system. **Scientia Horticulturae**. . ISSN 03044238. 222:May (2017) 69–75. doi: 10.1016/j.scienta.2017.05.015.

PITTAYAPRUEK, Pavida *et al.* - Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. 2016). doi: 10.3390/ijms17060868.

PONDER, Alicja; HALLMANN, Ewelina - Phenolics and carotenoid contents in the leaves of different organic and conventional raspberry (*Rubus idaeus* L.) cultivars and their in vitro activity. **Antioxidants**. . ISSN 20763921. 8:10 (2019). doi: 10.3390/antiox8100458.

QUAN, Taihao *et al.* - Matrix-Degrading Metalloproteinases in Photoaging. **Journal of Investigative Dermatology**. . ISSN 1087-0024. 14:1 (2009) 20–24. doi: 10.1038/jidsymp.2009.8.

QUIDEAU, Stéphane *et al.* - Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie - International Edition**. . ISSN 14337851. 50:3 (2011) 586–621. doi: 10.1002/anie.201000044.

RAHMAN, Irfan; BISWAS, Saibal K.; KIRKHAM, Paul A. - Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochemical Pharmacology**. . ISSN 00062952. 72:11 (2006) 1439–1452. doi: 10.1016/j.bcp.2006.07.004.

ROBINSON, Jennifer G. *et al.* - 2013 ACC / AHA Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults. **Journal of the American College of Cardiology**. 63:25 (2014). doi: 10.1016/j.jacc.2013.11.002.

ROCÍO GONZÁLEZ-BARRIO, CHRISTINE A. EDWARDS, And Alan Crozier; JOSEPH -

Colonic Catabolism of Ellagitannins, Ellagic Acid, and Raspberry Anthocyanins: In Vivo and In Vitro Studies. 39:9 (2011) 1680–1688. doi: 10.1124/dmd.111.039651.

ROCIO GONZÁLEZ-BARRIO, GINA BORGES, William Mullen And Alan Crozier - Bioavailability of Anthocyanins and Ellagitannins Following Consumption of Raspberries by Healthy Humans and Subjects. 2010) 3933–3939. doi: 10.1021/jf100315d.

ROJAS-VERA, Janne; PATEL, Asmita V.; DACKE, Christopher G. - Relaxant activity of raspberry (*Rubus idaeus*) leaf extract in guinea-pig ileum in vitro. **Phytotherapy Research**. . ISSN 0951418X. 16:7 (2002) 665–668. doi: 10.1002/ptr.1040.

SCHLIEBS, Reinhard; ARENDT, Thomas - The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. **Behavioural Brain Research**. . ISSN 01664328. 221:2 (2011) 555–563. doi: 10.1016/j.bbr.2010.11.058.

SHAHIDI, Fereidoon; AMBIGAIPALAN, Priyatharini - Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. **Journal of Functional Foods**. . ISSN 17564646. 18:2015) 820–897. doi: 10.1016/j.jff.2015.06.018.

SILVA, Carolina *et al.* - Recording of overweight and obesity as a health problem by primary care pediatricians in an electronic medical record. **Archivos Argentinos de Pediatría**. . ISSN 16683501. 118:2 (2020) 132–135. doi: 10.5546/aap.2020.eng.132.

SINGH, Manjeet *et al.* - Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: Bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. . ISSN 00218561. 56:13 (2008) 4855–4873. doi: 10.1021/jf0735073.

SINGLETON, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. - Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. (1999) doi: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1

SKROVANKOVA, Sona *et al.* - Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. 2015) 24673–24706. doi: 10.3390/ijms161024673.

SLAVIN, Joanne L.; LLOYD, Beate - Health Benefits of Fruits and Vegetables. 2012) 506–516. doi: 10.3945/an.112.002154.506.

SOARES, Sergio Eduardo - Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutricao**. . ISSN 14155273. 15:1 (2002) 71–81. doi: 10.1590/s1415-52732002000100008.

ȘTEFANESCU, Bianca Eugenia *et al.* - Phenolic compounds from five ericaceae species leaves

and their related bioavailability and health benefits. **Molecules**. . ISSN 14203049. 24:11 (2019). doi: 10.3390/molecules24112046.

TABART, Jessica *et al.* - Antioxidant capacity of black currant varies with organ, season, and cultivar. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. . ISSN 00218561. 54:17 (2006) 6271–6276. doi: 10.1021/jf061112y.

TELESZKO, Mirosława; WOJDYŁO, Aneta - Comparison of phenolic compounds and antioxidant potential between selected edible fruits and their leaves. **Journal of Functional Foods**. . ISSN 17564646. 14:2015) 736–746. doi: 10.1016/j.jff.2015.02.041.

TEWART, D. Ereik S. *et al.* - Profiling of Phenols in Human Fecal Water after Raspberry Supplementation. 2010) 10389–10395. doi: 10.1021/jf1017143.

TITO, A. *et al.* - An oil-soluble extract of *Rubus idaeus* cells enhances hydration and water homeostasis in skin cells. 2015) 588–594. doi: 10.1111/ics.12236.

TRIPOLI, Elisa *et al.* - Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. **Food Chemistry**. . ISSN 03088146. 104:2 (2007) 466–479. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.11.054.

URIARTE-PUEYO, I.; CALVO, M. - Flavonoids as Acetylcholinesterase Inhibitors. **Current Medicinal Chemistry**. . ISSN 09298673. 18:34 (2011) 5289–5302. doi: 10.2174/092986711798184325.

WANG, Lili; MENG, Xianjun; ZHANG, Fengqing - Raspberry Ketone Protects Rats Fed High-Fat Diets Against Nonalcoholic Steatohepatitis. **Journal of Medicinal Food**. . ISSN 1096-620X. 15:5 (2012) 495–503. doi: 10.1089/jmf.2011.1717.

WANG, Yuwei *et al.* - Quantitative Analyses of Nine Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activities from Thirty-Seven Varieties of Raspberry Grown in the Qinghai-Tibetan. 2019) 1–15.

WINSLOW, Bradford T. *et al.* - Treatment of Alzheimer's disease. **Neurodegenerative Diseases: Neurobiology, Pathogenesis and Therapeutics**. . ISSN 1532-0650. 2005) 459–470. doi: 10.1017/CBO9780511544873.033.

WU, Xianli; CAO, Guohua; PRIOR, Ronald L. - Human Nutrition and Metabolism Absorption and Metabolism of Anthocyanins in Elderly Women after Consumption of Elderberry or Blueberry. February (2018) 1865–1871.

ZHANG, Ying *et al.* - Diuretic Activity of *Rubus idaeus* L (Rosaceae) in Rats. (2011) 243–248.

doi: 10.4314/tjpr.v10i3.15.

ZHANG, Zhi-Jiang - Systematic review on the association between F2-isoprostanes and cardiovascular disease. (2013). doi: 10.1258/acb.2012.011263.

ZQUIERDO, A. Ngel G. I. L.; AMAISON, J. E. A. N. Ouis L.; EMESY, C. Hristian R. - Blackberry Anthocyanins Are Mainly Recovered from Urine as Methylated and Glucuronidated Conjugates in Humans. (2005).

7. Anexo

Tabela XI - Valores obtidos por espectroscopia, dos extratos+ácido gálico.

Concentração em ppm (x)	Absorvância (y)
0	0
0	0
0	0
3	0,004
3	0,002
3	0,003
5	0,006
5	0,005
5	0,007
6	0,01
6	0,013
6	0,014
7	0,017
7	0,015
7	0,016
9	0,02
9	0,019
9	0,018
10	0,028
10	0,0267
10	0,032
50	0,229
50	0,224
50	0,232
100	0,588
100	0,609
100	0,589