



Ana Margarida Oliveira e Silva

**Infusões e decocções de frutos desidratados de
Actinidia arguta: Comparação com *Actinidia
deliciosa***

**Dissertação do 2º Ciclo de Estudos conducente ao Grau de
Mestre em Controlo de Qualidade**

Especialidade Água e Alimentos

Trabalho realizado sob a orientação de

Doutora Francisca Rodrigues

Professora Doutora M. Beatriz P.P. Oliveira

Junho 2018

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA DISSERTAÇÃO/TESE.

Agradecimentos

À Doutora Francisca Rodrigues, por me ter acolhido com grande amizade e dedicação. Agradeço por me ter guiado ao longo deste percurso, a ultrapassar os obstáculos e alcançar com profissionalismo e ambição várias metas. Não posso deixar de lado, que sempre acreditou no meu trabalho desenvolvido e no trabalho a desenvolver, nas minhas potencialidades e, por isso, tornou-se possível a realização desta dissertação. A minha gratidão pela orientação, atenção, compreensão, dedicação e disponibilidade cedidas, bem como, por todos os ensinamentos que foram essenciais para este trabalho e que levarei comigo para o futuro.

À professora Doutora Beatriz Oliveira pela oportunidade de integrar o seu grupo de investigação, onde pude desenvolver este projeto de dissertação com elevada qualidade. Agradeço ainda toda a disponibilidade, a atenção, a transmissão de conhecimentos e de experiência.

À Diana Pinto por todos os ensinamentos transmitidos. Pela integração, o companheirismo, a paciência e a disponibilidade. Agradeço todos os momentos partilhados, a amizade e o apoio constante.

À Dr.^a Tânia Albuquerque pela disponibilidade e pela colaboração nos ensaios de determinação de Vitamina C por HPLC.

À Doutora Iva Fernandes pela cedência dos resultados obtidos por HPLC-MS.

À empresa Mini-Kiwi Farm pelas amostras cedidas para a realização deste estudo e por toda a disponibilidade cedidas.

À minha família, em particular, aos meus pais pela presença constante, a confiança, a dedicação, a amizade, o carinho e o amor. Por me ajudarem incansavelmente a atingir novos objetivos. Obrigada por serem únicos e de fazerem de mim a pessoa que sou hoje e que serei no futuro de amanhã. Estou muito grata por tudo!

Ao César pelo companheirismo, a compreensão, o carinho e o amor. Pela sua singularidade, por estar sempre ao meu lado e por todo o apoio e coragem.

Resumo

Os frutos silvestres fizeram desde sempre parte da alimentação das populações, sendo uma opção sustentável de uma dieta rica e variada. Com efeito, a produção e comercialização de frutos silvestres tem crescido exponencialmente, quer a nível mundial quer a nível nacional. Dado o seu valor elevado, quando os frutos não reúnem as condições necessárias para comercialização (por exemplo, devido a calibre inadequado, estado de maturação impróprio ou danos físicos) são normalmente retirados do circuito comercial, sendo na maior parte dos casos deixados no solo. Exemplos do referido são os casos da *Actinidia arguta* (baby kiwi) e *A. deliciosa* (kiwi), cuja produção nacional cresceu consideravelmente na última década. A *A. arguta* dá um fruto silvestre que se distingue de *A. deliciosa* pela sua morfologia, sabor, composição nutricional e teor em bioativos. Para minimizar perdas de produção, têm sido desenvolvidas algumas aplicações, tais como sumos, compotas, gelados e bebidas alcoólicas. Contudo, até ao momento, não existe nenhuma referência à sua utilização em infusões e decocções. O objetivo deste trabalho foi assim preparar, caracterizar e comparar infusões e decocções de frutos desidratados de *A. arguta* e de *A. deliciosa*.

A determinação dos compostos bioativos, nomeadamente do teor de polifenóis e de flavonoides totais (TPT e TFT, respetivamente) em *A. arguta*, foi superior comparativamente a *A. deliciosa*. Os TPT apresentaram valores compreendidos entre 93,81 e 146,35 mg EAG/L amostra para a decocção e a infusão de *A. arguta* e entre 60,50 e 77,06 mg EAG/L (equivalentes de ácido gálico por litro de amostra) para a decocção e a infusão de *A. deliciosa*. Por seu lado, os TFT variaram entre 17,77 e 32,39 mg ECA/L (equivalentes de catequina por litro de amostra) para *A. arguta* e entre 7,84 e 9,89 mg ECA/L para *A. deliciosa*. A decocção de *A. arguta* foi a que exibiu uma maior atividade antioxidante para ambos os ensaios efetuados, nomeadamente, 56,65 % de inibição e 1292,45 $\mu\text{mol ESF/L}$ (equivalentes de sulfato ferroso por litro de amostra) para o ensaio do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo e para o poder antioxidante por redução do ião férrico, respetivamente. Quanto aos ensaios de determinação da capacidade de captação de espécies reativas, foi possível calcular o IC_{50} apenas para o ensaio do ácido hipocloroso (HOCl) e do óxido nítrico (NO^*), verificando-se que a decocção de *A. arguta* apresentou uma maior capacidade de captação do HOCl ($\text{IC}_{50} = 15,50 \mu\text{g/mL}$) enquanto a infusão de *A. deliciosa* foi a mais eficaz no ensaio do NO^* ($\text{IC}_{50} = 18,96 \mu\text{g/mL}$). Relativamente à determinação do teor em vitamina C, verificou-se que a infusão de *A. deliciosa* exibiu um teor superior às restantes amostras em estudo.

A determinação dos compostos fenólicos presentes nas diferentes amostras com recurso a HPLC-DAD-MS permitiu constatar que as decocções e as infusões de *A. arguta* apresentaram uma maior variedade de compostos fenólicos, nomeadamente a presença de ácido quínico, ácido *cis*-caftárico, ácido cafeico e seus derivados, cafeoil hexosídeo, luteolina glucurónido, derivados de quercetina e miricetina. Por sua vez, as infusões e as decocções de *A. deliciosa* caracterizaram-se essencialmente pela presença de ácido quínico e ácido cafeico e seus derivados.

Os resultados de viabilidade celular comprovaram que os vários extratos em estudo não têm efeitos adversos nas linhas celulares intestinais avaliadas (Caco-2 e HT29-MTX).

Com efeito, os resultados desta dissertação revestem-se de importância no âmbito nacional, propondo uma nova aplicação para a elevada taxa de desperdícios verificadas para estes frutos.

Palavras-chave: *Actinidia arguta*; *Actinidia deliciosa*; Infusões; Decocções; Compostos bioativos; Sustentabilidade.

Abstract

Wild fruits have always been part of the population's diet, ensuring a sustainable option for a rich and diverse diet. In the last years, its production and marketing has grown exponentially worldwide. Nevertheless, when fruits do not meet the defined criteria to be commercialized (e.g. inadequate size, improper ripeness or physical damage), they are usually considered as waste, being discarded. A clear example of this situation is *Actinidia arguta* (baby kiwi) and *A. deliciosa* (kiwi), whose production has grown considerably in the last decade, particularly in Portugal. *A. arguta* is a wild fruit that is distinguished from *A. deliciosa* by its morphology and taste, as well as by its nutritional composition and bioactive content. Some applications have been developed to minimize these production losses, such as juices, jams, ice creams and alcoholic beverages. However, to the date, no infusions and decoctions were developed. The aim of this work was to prepare, characterize and compare infusions and decoctions of dehydrated fruits of *A. arguta* and *A. deliciosa*.

The total phenolic and flavonoid contents (TPC and TFC, respectively) showed that the different extracts of *A. arguta* presented higher amounts when compared to *A. deliciosa* extracts. The TPC ranged between 93.81 and 146.35 mg GAE/L (gallic acid equivalents per liter) for the decoction and infusion of *A. arguta* and from 60.50 to 77.06 mg GAE/L for the decoction and infusion of *A. deliciosa*. In what concerns to TFC, *A. arguta* extracts ranged between 17.77 to 32.39 mg CAE/L (catechin equivalents per liter) sample, while *A. deliciosa* showed values from 7.84 to 9.89 mg CAE/L. The highest antioxidant activity were obtained for *A. arguta* decoction (56.65 % inhibition for DPPH[•] (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl); 1292.45 μ mol FSE/L for FRAP (ferric-reducing antioxidant power)). A good scavenging activity against reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS, respectively) was determined by the assays of superoxide anion radical (O₂^{•-}), hydrogen peroxide (H₂O₂), hypochlorous acid (HOCl), nitric oxide ([•]NO) and peroxy radical (ROO[•]). Particularly, the *A. arguta* decoction (IC₅₀ = 15.50 μ g/mL) showed the best scavenging activity for HOCl, while *A. deliciosa* infusion (IC₅₀ = 18.96 μ g/mL) presented the best result for [•]NO.

Regarding vitamin C content, *A. deliciosa* infusion exhibited a superior content (770.5 mg/100 g dw). The phenolic profile of the different extracts was determined by HPLC-DAD-MS. The *A. arguta* decoctions and infusions showed a greater variety of phenolic compounds, namely quinic acid, cis-caftaric acid, caffeic acid and its derivatives, caffeoyl hexoside, luteolin glucuronide, quercetin derivatives and myricitrinin. In turn, the infusions and decoctions of *A. deliciosa* were essentially characterized by the presence of quinic acid

and caffeic acid and its derivatives. No adverse effects on Caco-2 and HT29-MTX cells in concentrations below 1000 µg/mL were observed for all extracts.

These results highlight the potentialities of *A. arguta* and *A. deliciosa* fruits that cannot be commercialized and are considered as wastes, proposing a new application to valorize them.

Keywords: *Actinidia arguta*; *Actinidia deliciosa*; Infusions; Decoctions; Bioactive compounds; Sustainability.

Comunicações

1. **Silva, Ana Margarida**; Pinto, Diana; Rodrigues, Francisca; Oliveira, Maria Beatriz P.P. Sustainable and promising beverages from hardy kiwi: Infusions and decoctions. XVII Congresso de Nutrição e Alimentação/I Congresso Internacional de Nutrição e Alimentação, Lisboa; 10-11 Maio 2018.
2. **Silva, Ana Margarida**; Pinto, Diana; Rodrigues, Francisca; Oliveira, Maria Beatriz P.P. Bioactive compounds, antioxidant activity and cell viability of *Actinidia arguta* infusions and decoctions. 9th Meeting of the Analytical Chemistry Division - Analytic 2018, Porto; 26-27 Março 2018.
3. **Silva, Ana Margarida**; Pinto, Diana; Rodrigues, Francisca; Oliveira, Maria Beatriz P.P. Infusions and decoctions of *Actinidia arguta*: A preliminary study. IJUP'18 – Encontro de Jovens Investigadores, Porto; 7-9 Fevereiro 2018.
4. **Silva, Ana Margarida**; Santos, Joana; Oliveira, Maria Beatriz P.P. Wild plants and food security: Alternative and traditional sources of bioactive compounds. IJUP'17 – Encontro de Jovens Investigadores, Porto; 8-10 Fevereiro 2017.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract.....	vi
Comunicações	viii
Índice.....	ix
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tabelas	xiii
Lista de abreviaturas	xiv
1. Introdução.....	1
1.1 Sustentabilidade.....	2
1.1.1 Desperdício alimentar	4
1.2 O papel dos alimentos silvestres	5
1.3 <i>Actinidia arguta</i>	6
1.3.1 Composição nutricional e química	7
1.3.2 Atividades biológicas	11
1.3.2.1 Atividade antioxidante	11
1.3.3 Compostos bioativos	14
1.3.3.1 Compostos fenólicos.....	16
1.4 Chás, infusões e decocções	18
2. Materiais e Métodos	20
2.1 Reagentes e Padrões	21
2.2 Recolha e tratamento das amostras	22
2.3 Preparação de infusões e decocções.....	22
2.4 Avaliação das características físicas das infusões e decocções	23
2.4.1 Avaliação da cor.....	23
2.4.2 Avaliação do pH	24
2.5 Determinação de compostos bioativos das infusões e das decocções.....	25

2.5.1 Determinação do Teor de Polifenóis Totais.....	25
2.5.2 Determinação do Teor de Flavonoides Totais.....	26
2.6 Atividade antioxidante das infusões e das decocções.....	26
2.6.1 Avaliação da capacidade de inibição do radical DPPH*.....	27
2.6.2 Avaliação da capacidade antioxidante por redução do ião férrico (FRAP).....	27
2.7 Avaliação da capacidade de captação de espécies reativas	28
2.7.1 Determinação da capacidade de captação do O ₂ *.....	28
2.7.2 Determinação da capacidade de captação de H ₂ O ₂	29
2.7.3 Determinação da capacidade de captação do HOCl	29
2.7.4 Determinação da capacidade de captação do ROO*.....	29
2.7.5 Determinação da capacidade de captação do NO*	30
2.8 Análise da vitamina C por HPLC	30
2.9 Análise dos compostos fenólicos por HPLC-MS	32
2.10 Viabilidade celular e Citotoxicidade.....	33
2.10.1 Ensaio de MTT	33
2.10.2 Ensaio de LDH	34
2.11 Análise estatística	34
3. Resultados e Discussão	35
3.1 Características físicas das infusões e decocções	36
3.2 Compostos bioativos presentes nas decocções e infusões	38
3.2.1 Teor de polifenóis totais (TPT).....	38
3.2.2 Teor de flavonoides totais (TFT).....	41
3.3 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	41
3.3.1 Avaliação da capacidade de inibição do radical DPPH*	42
3.3.2 Capacidade antioxidante por redução do ião férrico (FRAP)	42
3.4 Correlação entre os compostos bioativos e a atividade antioxidante.....	43
3.5 Capacidade de captação de espécies reativas	44
3.6 Determinação do teor de vitamina C.....	48
3.7 Determinação dos compostos fenólicos.....	50
3.8 Viabilidade celular	57
4. Conclusão.....	62
5. Referências bibliográficas	64

Lista de Figuras

Figura 1 – Pilares interdependentes e mutuamente relacionados para o Desenvolvimento sustentável: Economia sustentável, meio ambiente local e igualdade social. Adaptado de Hyperion Fund [2].	2
Figura 2 – Principais causas das perdas e dos desperdícios alimentares ao longo da cadeia de aprovisionamento, desde o produtor até ao consumidor, passando pelo processamento e pela distribuição. Adaptado de Baptista et al. [14].	4
Figura 3 – <i>Actinidia deliciosa</i> e <i>Actinidia arguta</i> .	6
Figura 4 – Algumas variedades de <i>A. arguta</i> .	7
Figura 5 – Principais causas e doenças originadas a partir do stresse oxidativo [33].	12
Figura 6 – Principais classes de fitoquímicos naturais [33].	14
Figura 7 – Efeitos bioativos das plantas silvestres [32].	15
Figura 8 – Vendas de infusões (em toneladas) em vários mercados de países da União Europeia, entre o ano de 2006 e 2015. Adaptado de THIE [58].	19
Figura 9 – Processo de preparação: A) Decocção – as amostras foram trituradas, adicionou-se água e procedeu-se ao aquecimento; quando atingiu os 100° C, retirou-se do calor e filtrou-se após 5 min; B) Infusão – as amostras foram trituradas e adicionou-se água a 100° C; após 5 min filtrou-se.	23
Figura 10 – Colorímetro utilizado para as medições da cor das diferentes amostras.	24
Figura 11 – pHmeter para medição do pH das várias amostras.	24
Figura 12 – Placa de 96 poços referente ao ensaio de TPT no término da reação de oxidação-redução.	25
Figura 13 – Placa de 96 poços onde ocorreu o ensaio de TFT, baseando-se na formação de compostos de flavonoide-alumínio.	26
Figura 14 – Preparação das amostras para a determinação do teor de vitamina C por HPLC.	31
Figura 15 – Variação da cor (L^* , a^* e b^*) das decocções e das infusões de <i>A. arguta</i> (DAa e IAa, respetivamente) e de <i>A. deliciosa</i> (DAd e IAd, respetivamente).	36
Figura 16 – pH das decocções e infusões de <i>A. arguta</i> e de <i>A. deliciosa</i> .	37
Figura 17 – Cromatogramas obtidos por HPLC para a decocção (a) e a infusão (b) de <i>A. deliciosa</i> .	49

- Figura 18** – Perfil cromatográfico dos compostos fenólicos obtidos por HPLC-MS (280 nm) de (a) decocções de *A. arguta*; (b) infusão de *A. arguta*; (c) decocções de *A. deliciosa*; (d) infusão de *A. deliciosa*. Condições cromatográficas: ver Tabela 4. A identificação e informação de pico está apresentada nas Tabelas 8 e 9. 54
- Figura 19** – Esquematização de um enterócito. Barreira física do epitélio intestinal onde se dá a passagem dos produtos desde o lumén intestinal até à lâmina própria, passando pela membrana basal. Adaptado de Lozoya-Agullo [101]. 58
- Figura 20** – Efeito da exposição às decocções e infusões de *A. arguta* e *A. deliciosa* em diferentes concentrações na viabilidade celular de Caco-2, através do ensaio de MTT. Os valores expressam a média $\pm$ DP. Diferentes letras (a, b, c, d) na mesma amostra representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos nas diferentes concentrações. * exprime diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes amostras para a mesma concentração..... 59
- Figura 21** – Efeito da exposição às decocções e infusões de *A. arguta* e *A. deliciosa* em diferentes concentrações na viabilidade celular de HT29-MTX, através do ensaio de MTT. Os valores expressam a média $\pm$ DP. Diferentes letras (a, b, c, d) na mesma amostra representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos nas diferentes concentrações. * exprime diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes amostras para a mesma concentração..... 60

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Concentrações de diferentes compostos químicos em diversas variedades do fruto de <i>A. arguta</i> (24,29).....	9
Tabela 2 – Exemplos de sistemas de defesa antioxidante: Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (34).	13
Tabela 3 – Principais compostos fenólicos encontrados nas plantas, estrutura química básica e exemplos (47,52).....	16
Tabela 4 – Gradiente de eluição utilizado na análise dos compostos fenólicos.	32
Tabela 5 – Teor de polifenóis totais (TPT), teor de flavonoides totais (TFT), avaliação da capacidade antioxidante por redução do íão férrico (FRAP) e por inibição do radical DPPH• de infusões e decocções de <i>A. arguta</i> e <i>A. deliciosa</i>	40
Tabela 6 – Capacidade de captação do anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), peróxido (ROO•) e óxido nítrico (NO•) pelas decocções e infusões de <i>A. arguta</i> e <i>A. deliciosa</i>	46
Tabela 7 – Teores de vitamina C (total), ácido ascórbico e ácido desidroascórbico para a decocção e infusão de <i>A. deliciosa</i>	49
Tabela 8 – Compostos fenólicos identificados por HPLC-DAD-MS nas decocções e infusões de <i>A. arguta</i>	55
Tabela 9 – Compostos fenólicos identificados por HPLC-DAD-MS nas decocções e infusões de <i>A. deliciosa</i>	56

Lista de abreviaturas

AAPH	2,2'-Azobis(2-metilpropionamidina) dihidroclorato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
API	<i>Atmospheric Pressure Ionization</i>
DAa	Decocção de <i>Actinidia arguta</i>
DAd	Decocção de <i>Actinidia deliciosa</i>
DAF	Triazolo fluoresceína fluorescente
DHR	Dihidrorodamina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH[•]	Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo
EAG	Equivalentes de ácido gálico
ECA	Equivalentes de catequina
ER	Equivalentes de rutina
ERA	Espécies reativas de azoto
ERO	Espécies reativas de oxigénio
ESF	Equivalentes de sulfato ferroso
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
ET	Equivalentes de Trolox
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
ff	fruto fresco
FRAP	Poder antioxidante por redução do ião férrico
fs	fruto seco
GSH	Glutathione
GSH-Px	Glutathione peroxidase
IAa	Infusão de <i>Actinidia arguta</i>
IAd	Infusão de <i>Actinidia deliciosa</i>
LDH	Lactato desidrogenase
LOD	Limite de deteção
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
NBT	Cloreto de azul nitrotetrazólio
NOC-5	3-(Aminopropil)-1-hidroxi-3-isopropil-2-oxo-1-triazeno
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
PBS	Phosphate-buffered saline solution (Solução salina tamponada com fosfato)
PMS	Metossulfato de fenazina
SOD	Superóxido dismutase
TFT	Teor de Flavonoides Totais
THIE	<i>Tea & Herbal Infusions Europe</i>
TPT	Teor de Polifenóis Totais
TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
UNEP	<i>United Nations Environment Programme</i>
UV	Ultravioleta
WSSD	<i>World Summit for Sustainable Development</i>
WWF	<i>World Wildlife Fund for Nature</i>

1. Introdução

1.1 Sustentabilidade

A sustentabilidade é um conceito multidimensional que abrange várias vertentes, nomeadamente, a integridade ambiental, o bem-estar social, a resiliência económica e a governação por excelência (Figura 1) (1).



Figura 1 – Pilares interdependentes e mutuamente relacionados para o Desenvolvimento sustentável: Economia sustentável, meio ambiente local e igualdade social. Adaptado de Hyperion Fund (2).

Existem inúmeras definições associadas ao desenvolvimento sustentável e à sustentabilidade descritas por diferentes organizações:

- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) – “o desenvolvimento sustentável consiste na gestão e conservação dos recursos naturais, e nas orientações das mudanças tecnológicas e institucionais de forma a garantir a realização e a satisfação contínua das necessidades humanas das gerações atuais e futuras. Este desenvolvimento sustentável conserva recursos genéticos terrestres, hídricos, vegetais e animais e não é degradante para o ambiente, assim como tecnologicamente apropriado, economicamente viável e socialmente aceitável” (3).
- United Nations Environment Programme (UNEP) – define desenvolvimento sustentável como um desenvolvimento que garanta o uso dos recursos e do meio ambiente atual e que não comprometa a sua utilização no futuro (3).

- World Wildlife Fund for Nature (WWF) – descreve o desenvolvimento sustentável como uma atividade económica que atende às necessidades das gerações atuais sem comprometer as capacidades necessárias para gerações futuras. A sustentabilidade baseia-se em três componentes essenciais: crescimento económico, progresso social e proteção ambiental (3).
- World Summit for Sustainable Development (WSSD) – realizada em Joanesburgo, em 2002, declarou que o desenvolvimento sustentável se fundamenta em três pilares interdependentes e mutuamente reforçados - desenvolvimento económico, desenvolvimento social e proteção social – os quais devem ser estabelecidos a nível local, nacional, regional e global. Assim, estabelece as ligações necessárias para a diminuição da pobreza, implementação dos direitos humanos, biodiversidade, água pura e saneamento, energia renovável e uso sustentável dos recursos naturais (3).

Com efeito, percebe-se que a sustentabilidade é um objetivo ambicioso e importante para o bem-estar universal. De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO), estima-se que até 2050 o crescimento da população mundial atinja os 9 biliões, gerando uma enorme preocupação em relação aos recursos alimentares disponíveis (4). É por isso urgente reestruturar o atual sistema alimentar global e promover o consumo de alimentos produzidos de acordo com os princípios defendidos para uma economia sustentável. Esta reestruturação é ainda mais evidente quando os meios de subsistência existentes e os agroecossistemas atuais estão ameaçados pelas alterações climáticas globais (5). O futuro da sociedade está assim dependente de uma nova escolha de fontes alimentares nutritivas e de baixo custo, que sejam classificadas como “*amigas*” do ambiente, resilientes e adaptáveis a novos meios (6,7), passando indubitavelmente pelo desenvolvimento de um novo sistema agrícola que cumpra com todos os pressupostos da sustentabilidade (5).

Os alimentos silvestres comestíveis poderão ser uma opção para garantir o acesso a alimentos seguros e nutricionalmente ricos, produzidos de forma sustentável (8,9). De facto, os alimentos provenientes da floresta, obtidos através de uma produção de baixo custo e sustentável, podem aumentar a disponibilidade de alimentos (10), contribuir para uma melhoria da qualidade de vida e diversificar as dietas, muito devido à sua composição rica em micronutrientes e compostos bioativos (9,11).

Segundo a FAO, “*a nutrição e a biodiversidade convergem num ponto comum conducente à disponibilidade alimentar e ao desenvolvimento sustentável*” e “*as espécies silvestres e a sua biodiversidade intraespecífica desempenham um papel fulcral na*

disponibilidade alimentar global”, uma vez que são simultaneamente benéficas para a saúde e para a economia dos países em desenvolvimento (12).

1.1.1 Desperdício alimentar

O conceito de desperdício alimentar refere-se à diminuição de alimentos comestíveis podendo ocorrer antes, durante ou depois da confeção de alimentos e, principalmente, na fase de distribuição e consumo (13). Segundo Baptista *et al.*, a maior parte dos alimentos são desperdiçados na fase de distribuição e no consumo final (14). Esta situação ocorre devido à distância entre o produtor e o consumidor, exigindo etapas intermédias e um percurso mais demorado, bem como uma melhor conservação e acondicionamento dos alimentos (14). A cadeia produtor-consumidor e as suas consequências no desperdício alimentar encontram-se resumidas na Figura 2.

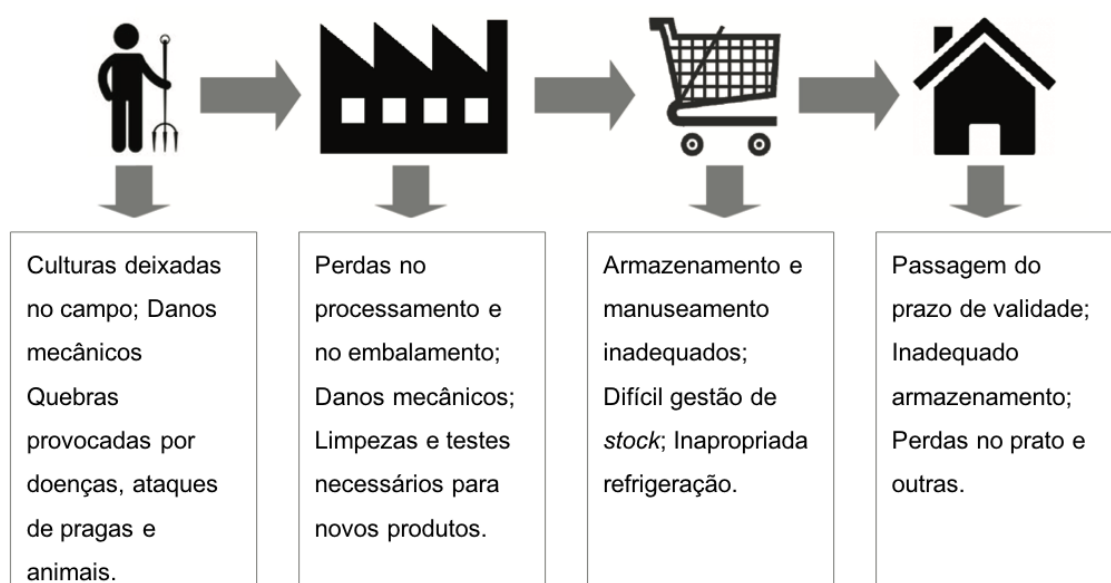


Figura 2 – Principais causas das perdas e dos desperdícios alimentares ao longo da cadeia de aprovisionamento, desde o produtor até ao consumidor, passando pelo processamento e pela distribuição. Adaptado de Baptista *et al.* (14).

Segundo um estudo da FAO, cerca de um terço da produção alimentar mundial é desperdiçada (13). Em Portugal, aproximadamente 17% dos alimentos são desperdiçados e perdidos durante a cadeia de aprovisionamento (a qual engloba toda a cadeia agroalimentar com início na produção), representando 1 milhão de toneladas de alimentos por ano (14). Este desperdício não se deve aos alimentos estarem impróprios para consumo, mas sim ao facto de não cumprirem os requisitos necessários à comercialização aplicados a frutas e hortícolas pelo Regulamento de Execução (UE) n.º 543/2011 da

Comissão, de 7 de Junho, que estabelece normas para o peso mínimo e máximo, a cor e o calibre permitidos para os produtos frescos (15).

É notório que existe uma grande perda alimentar nas fases de produção e de colheita, provocada pelos ataques de pragas, por processos de colheita deficientes, bem como pelo armazenamento ou transporte inadequados (14). Já o termo desperdício aponta para as perdas que acontecem ao longo da distribuição e durante o consumo (14).

1.2 O papel dos alimentos silvestres

Os alimentos silvestres são componentes essenciais da dieta mundial (16). O seu consumo esteve sempre presente na alimentação humana, primeiramente como item essencial e, posteriormente, como ingrediente das dietas normais ou como alternativa durante a escassez de alimentos (17). O homem, em algumas culturas, recolhia também estas plantas para o tratamento de algumas enfermidades, para a produção de materiais e para o uso em diversos rituais pagãos (18).

A modernização das dietas, com o desenvolvimento da indústria, conduziu a alterações da nutrição, com consequentes mudanças na saúde pública mundial (19). Os alimentos silvestres foram sendo abandonados em prol de produtos adquiridos em superfícies comerciais, de fácil acesso e de uso mais cómodo. Contudo, esta alteração está interligada com a redução da diversidade alimentar e com o aumento de diversas patologias, como a obesidade e a diabetes, a desnutrição e a carência de micronutrientes (20).

As plantas silvestres são atualmente reconhecidas como sendo ricas em micronutrientes e metabolitos secundários (6), apresentando elevadas concentrações de minerais, proteínas, vitaminas e fibra (21,22). Entre os seus metabolitos secundários podem ser identificados inúmeros polifenóis e polissacarídeos, entre outros compostos bioativos, que as rotulam como alimentos funcionais e promotores de saúde (6). A composição das plantas silvestres é ainda passível de ser alvo de exploração económica, como por exemplo em suplementos alimentares, devido às propriedades benéficas atribuídas a muitos dos seus compostos (6).

Por outro lado, estas plantas representam, por si só, um grande reservatório genético de diversidade biológica (6). Tanto as espécies como as variedades silvestres, apresentam uma enorme diversidade genética, possuindo resistência a mudanças climáticas, a pragas e a doenças, capacidade essa que não foi preservada no processo de

domesticação genética (7). São, por isso, cruciais para o melhoramento de culturas e para o aumento da adaptabilidade e da resiliência das variedades a cultivar (6).

O consumo de plantas silvestres e/ou dos seus frutos depende também do clima e da estação do ano. Devido à sua sazonalidade, estes podem ser consumidos de diferentes formas em épocas distintas. A parte edível pode ser variada e consumida de diferentes maneiras, como por exemplo, fresca, desidratada (cereais de pequeno almoço), em sumos, doces (compotas, gelados, aplicados à pastelaria), infusões, bebidas alcoólicas fermentadas (licores e vinho), cozinhados, ou mesmo processada para o fabrico de farinhas, óleos, aromatizantes, corantes, entre outros produtos que comprovam o valor cultural e comercial muito associado ao consumo e preservação das espécies silvestres.

1.3 *Actinidia arguta*

Dentro dos frutos silvestres disponíveis em Portugal, a espécie *Actinidia arguta*, do género *Actinidia*, tem-se destacado. Este género é composto por mais de 60 espécies, sendo a *A. deliciosa*, vulgarmente conhecida por kiwi, a principal representante do género (23). O kiwi teve origem na Ásia, mas é apreciado mundialmente pelo sabor e pelos benefícios nutricionais (24). A *A. arguta*, também designado por kiwi bebé, *baby kiwi* e *kiwiberry*, é diferente da *A. deliciosa* (Figura 3), nomeadamente pelo seu tamanho (semelhante a uma uva) e pela sua forma, cor, pele sem pelos, aroma e sabor (24).

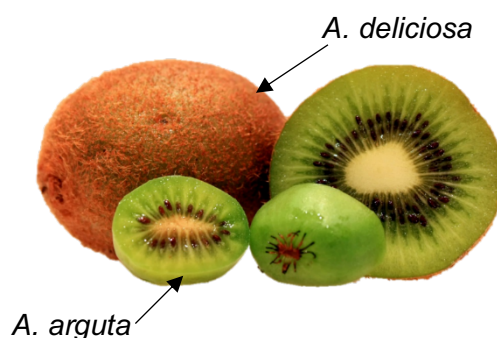


Figura 3 – *Actinidia deliciosa* e *Actinidia arguta*.

A *A. arguta* apresenta algumas variedades, sendo as mais conhecidas em Portugal a Anansnaja, a Genewa, a Weiki, a Issai, a Jumbo, a Ken's Red e a Maki (Figura 4). O seu sabor, bastante aromático e doce, é uma das principais características, sendo comparado ao sabor da banana, ananás, morango, pera, melão e outros frutos tropicais (25,26).

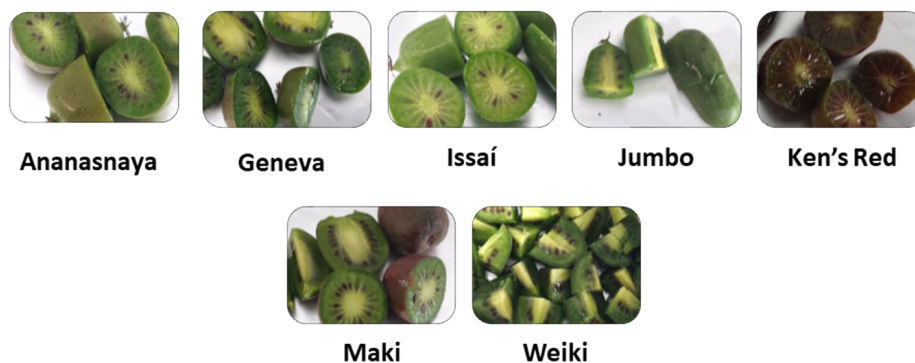


Figura 4 – Algumas variedades de *A. arguta*.

Apesar da origem do *kiwiberry* estar referenciada no continente asiático, este fruto tem atualmente uma disseminação à escala global, sendo comercialmente cultivado em países do continente Americano (Estados Unidos da América e Chile), da Europa (França, Itália, Suíça, Polónia, Holanda, Alemanha e Portugal), da Ásia (China e Japão) e da Austrália (Nova Zelândia) (23,24).

A forma de consumo deste fruto mostra a sua versatilidade e potencialidades, uma vez que pode ser consumido fresco ou processado, em sumos, bebidas alcoólicas, compotas e gelados (24). Contudo, percebe-se que ainda existe um grande nicho de comercialização e valorização e que poderiam existir ainda mais formas de consumo desta espécie, muito devido à sua riqueza nutricional e química.

1.3.1 Composição nutricional e química

O kiwi é um fruto com grande importância comercial, pela sua composição nutricionalmente rica, bem como por ser um alimento saudável e promotor de saúde e bem-estar (27). Tanto o *baby kiwi* como o kiwi são ricos em vários fitoquímicos, como ácidos fenólicos, vitaminas (principalmente a C), carotenoides (luteína e β -caroteno), açúcares, ácidos orgânicos e minerais (16,27,28).

Os principais açúcares quantificados em *A. arguta* foram a glucose, a frutose e a sacarose (Tabela 1). Através dos vários estudos já realizados nas diferentes variedades, é possível comprovar que o açúcar presente em maior quantidade é a sacarose, variando entre 2,41 e 7,80 g/100 g fruto fresco (ff) (24,29). Quanto à composição em glucose e frutose, a variedade Issai e Weiki são as que apresentam valores mais elevados, enquanto que a Mistuko apresenta concentrações inferiores (24,29).

Os ácidos oxálico, cítrico, málico, quínico e succínico foram os principais ácidos orgânicos detetados e quantificados nos vários genótipos do *kiwiberry* (Tabela 1). O ácido

cítrico é o ácido orgânico predominante, seguindo-se o quínico, o málico, o oxálico e o succínico (24,29). As variedades Genewa e Issai são as mais ricas em ácidos orgânicos (24). Os teores de ácidos têm impacto nos níveis de acidez do fruto (24). Deste modo, o *kiwiberry* apresenta valores de pH compreendidos entre 3,1 e 3,6, o qual permite a sua classificação como fruto ácido (23)

Tabela 1 – Concentrações de diferentes compostos químicos em diversas variedades do fruto de *A. arguta* (24,29).

Variedade	Concentração (g/100g ff)								Vit. C (mg/100g ff)	Ref.
	Glucose	Frutose	Sacarose	Ácido oxálico	Ácido cítrico	Ácido málico	Ácido quínico	Ácido succínico		
Hirano	1,01	1,15	4,11	-	0,60	0,22	0,70	-	-	(29)
Gassan	0,75	0,91	7,34	-	0,85	0,18	0,54	-	-	(29)
Issai	0,85 – 2,99	0,97 – 2,14	2,41 – 7,80	1,75	1,37 – 7,97	0,14 – 4,34	0,73 – 7,98	0,07	282,56	(24,29)
Mistuko	0,72	0,85	6,02	-	0,95	0,25	0,62	-	-	(29)
Kochi	0,89	0,91	5,76	-	0,70	0,10	0,63	-	-	(29)
Shimane	0,83	1,11	4,29	-	0,75	0,20	0,64	-	-	(29)
Nagano	0,78	0,88	4,86	-	0,82	0,30	0,68	-	-	(29)
Ananasnaya	1,57 – 1,68	1,21 – 1,78	3,35 – 5,59	3,67	0,54 – 6,82	0,18 – 2,75	0,51 – 5,52	0,10	102,15	(24,29)
Genewa	1,57	1,16	3,49	1,70	9,25	1,82	8,20	0,07	132,60	(24)
Weiki	2,11	1,50	5,94	2,54	5,75	3,03	6,08	0,07	100,74	(24)
Jumbo	2,08	1,38	3,63	2,45	8,37	1,47	4,17	0,28	76,09	(24)

As diferentes espécies de *Actinidia* são similares nos teores de fibra, quer solúvel quer insolúvel, sendo que *A. arguta* tem um teor de fibra solúvel de 3,1% e de fibra insolúvel de 2,1% (23).

No que diz respeito aos minerais, já foram detetados e quantificados os macroelementos (K>Ca>P>Mg>Na) e os microelementos (Fe>Zn>B>Mn>Cu) (23).

A vitamina C, como mencionado anteriormente, é um dos principais constituintes de *Actinidia*. Segundo Wojdyło *et al.*, os valores de vitamina C estão compreendidos entre 76,09 e 282,56 mg/100g ff nas várias variedades do kiwi bebé (Tabela 1), tendo o valor mais elevado sido detetado na variedade Issai (24). Além da vitamina C, foram igualmente quantificadas a vitamina A, E e algumas vitaminas do complexo B (23).

Os compostos fenólicos são um dos grupos maioritários na composição do *baby kiwi*. No estudo realizado por Wojdyło *et al.*, foram determinados os valores de flavonóis, nomeadamente de quercetina e de kaempferol, sendo a quercetina-3-O-rutinósido (variando entre 1,09 e 49,25 mg/100g fruto seco (fs) para a Jumbo e a Weiki, respetivamente) e a quercetina-3-O-glucosido (variando entre 0,36 e 14,12 mg/100g fs para a Jumbo e a Issai, respetivamente) as predominantes (24). Quanto ao kaempferol, o derivado dominante foi o kaempferol-3-O-galactosido. A maior composição em flavonóis foi quantificada na variedade Weiki e a menor na Jumbo (91,22 e 9,53 mg/100g fs, respetivamente). Nesse mesmo estudo, os autores quantificaram os ácidos fenólicos, como os ácidos cafeico e clorogénico, e a variedade Issai apresentou uma maior concentração de ácido clorogénico (33,42 mg/100g fs). A maior concentração de ácido cafeico foi determinada na variedade Genewa (24). Foi igualmente analisada a composição em polímeros de flavan-3-ols. As variedades Ananasnaya e a Issai caracterizam-se pela maior constituição em proantocianidinas (taninos condensados), o que explica a leve adstringência e amargor do *baby kiwi* (24).

O kiwi bebé, quanto à composição em carotenoides, é rico em luteína e β -caroteno, apresentando baixas concentrações de zeaxantina, violaxantina e α -caroteno (23,28). Por sua vez, foram detetadas elevadas concentrações de clorofila a e b (1,89 e 1,38 mg/100g ff, respetivamente) (28).

Além desta riqueza nutricional e química, já foram associadas várias atividades biológicas a este fruto, nomeadamente, atividade antioxidante, antidiabética e anticancerígena (24).

1.3.2 Atividades biológicas

Como mencionado anteriormente, o género *Actinidia* sempre foi utilizado para o tratamento de várias doenças, como problemas associados ao sistema digestivo, reumatismo, hemorroidas, entre outras desordens (23). Contudo, para o *kiwiberry* ainda existem poucos estudos sobre as suas potencialidades no homem.

Um estudo realizado por Leontowicz *et al.* analisou o impacto de extratos de *A. arguta* no colesterol da artéria aorta e no fígado de ratinhos, concluindo que a atividade antioxidante exibida pelos extratos proporcionava efeitos de hipolipidemia e de hipocolesterolemia (30). Além disso, a atividade anti-inflamatória exibida protegeu a artéria aorta e o fígado da acumulação de colesterol. Esta potencialidade deve-se à presença de vitaminas C e E, bem como aos compostos fenólicos, pelo que este fruto pode ser uma mais valia no tratamento de doenças cardiovasculares.

Nishimura *et al.* avaliaram o efeito inibitório do sumo de *A. arguta* na mutagénese e na inflamação de duas linhas cancerígenas de ratinhos, constatando que este tinha a potencialidade de inibir a mutagenicidade de amins heterocíclicas, aflatoxina B₁ e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (31). Este facto pode dever-se à sua composição rica em vitamina C e polifenóis, que lhe permitiu uma atividade anticancerígena superior à exibida por *A. deliciosa*.

Além do mais, de acordo com Latocha *et al.*, *A. arguta* pode ter um efeito positivo na prevenção de determinadas patologias, como por exemplo diabetes tipo I, alguns tipos de cancro e doenças do foro gastrointestinal, pelo que é muitas vezes apelidado de superalimento (23). Segundo os mesmos autores, a atividade antioxidante de *A. arguta* está dependente da concentração de ácidos fenólicos, de vitamina C e de alguns carotenoides (16). Contudo, não existe ainda um perfil nutricional e químico estudado para os extratos da *A. arguta* aplicados, principalmente, em infusões e decocções.

1.3.2.1 Atividade antioxidante

Os radicais livres resultam do metabolismo celular, sendo constantemente produzidos durante o normal funcionamento das células (32,33). Existem duas classes de radicais livres: as espécies reativas de oxigénio e as espécies reativas de azoto (ERO e ERA, respetivamente) (32). A maioria dos radicais livres produzidos são eliminados eficazmente por mecanismos celulares que envolvem enzimas e moléculas não enzimáticas (33). Os radicais livres são conhecidos pelo seu papel duplo nos sistemas biológicos, uma vez que em concentrações baixas ou moderadas têm efeitos benéficos (nomeadamente em processos de sinalização e de regulação celular), enquanto em

concentrações elevadas podem desencadear danos no organismo devido a um desequilíbrio entre a sua produção e a defesa por parte dos antioxidantes (33,34). Quando ocorre este desequilíbrio gera-se um fenómeno designado de stresse oxidativo (34).

Uma produção excessiva de espécies reativas pode desencadear danos nos lípidos membranares, proteínas e ácido desoxirribonucleico (ADN), diminuindo o seu normal funcionamento (34). Além disso, estas espécies têm a capacidade de matar bactérias, danificar biomoléculas, provocar respostas imunológicas, ativar oncogenes, bem como estimular o processo de envelhecimento (32). Diferentes autores demonstraram que uma produção excessiva de espécies reativas pode desencadear o desenvolvimento de diversas doenças crónicas, incluindo aterosclerose, diabetes mellitus, cancro, artrite reumatoide, cataratas ou até mesmo doença de Parkinson (35–37). Deste modo, o equilíbrio entre a produção de radicais livres e a atuação dos antioxidantes é importante para o normal funcionamento do organismo (34). Este mecanismo tem a capacidade de proteger o organismo do stresse oxidativo, conseguindo manter a homeostasia *redox* (38).

O stresse oxidativo pode advir de causas naturais, como é o caso do exercício físico excessivo ou dos processos inflamatórios, bem como de causas não naturais, como por exemplo fármacos ou radiação ultravioleta (UV) e poluentes ambientais (33) (Figura 5).

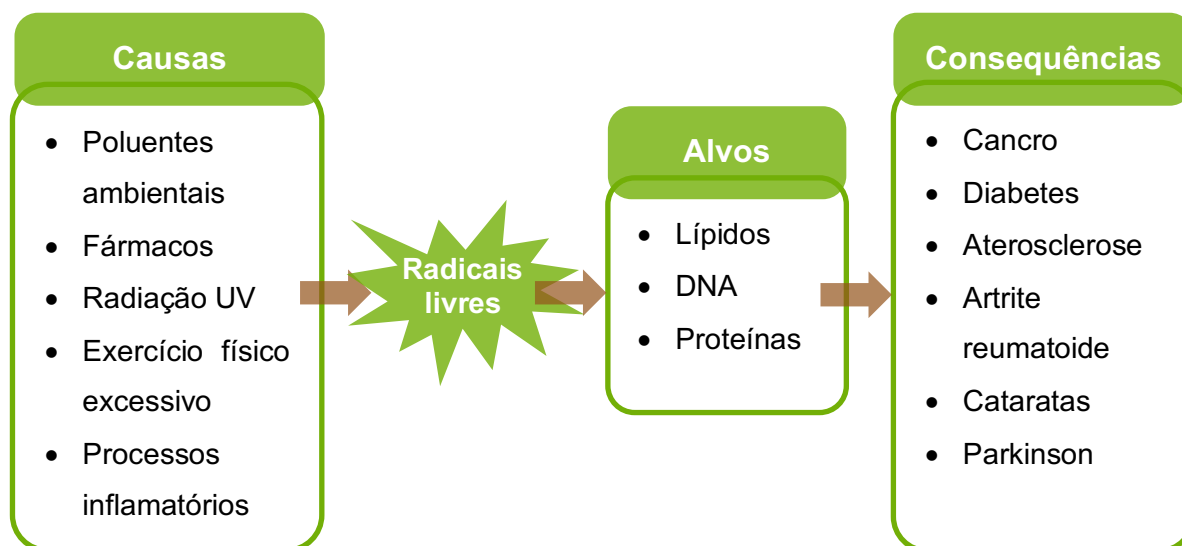


Figura 5 – Principais causas e doenças originadas a partir do stresse oxidativo (33).

A exposição aos radicais livres leva o organismo a desenvolver mecanismos de defesa (39), os quais incluem mecanismos preventivos e reparadores bem como defesas físicas e antioxidantes (34). Os antioxidantes encontram-se divididos em enzimáticos e não enzimáticos (Tabela 2) (33).

Tabela 2 – Exemplos de sistemas de defesa antioxidante: Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (34).

Antioxidantes enzimáticos	Antioxidantes não enzimáticos
Superóxido dismutase (SOD)	Vitamina C (ácido ascórbico)
Catalase	Vitamina E (α -tocoferol)
Glutathione peroxidase (GSH-Px)	Glutathione (GSH)
	Carotenoides
	Flavonoides

No que toca aos antioxidantes enzimáticos, a SOD tem a capacidade de converter o anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o qual é rapidamente transformado em água nos lisossomas pela enzima catalase ou pela GSH-Px nas mitocôndrias (33). A GSH é um tripéptido de baixa massa molecular que atua como agente quelante de radicais livres, como o radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$) ou o peroxinitrito ($ONOO^-$), podendo reagir diretamente com estes ou indiretamente como cofator de outras enzimas como a GSH-Px (33). Do mesmo modo, esta enzima é utilizada para regenerar outras moléculas, como a vitamina C e E, ao seu estado ativo (33).

A vitamina C é eficaz na eliminação do radical $O_2^{\bullet-}$, do H_2O_2 , do oxigénio singlete (1O_2) e do óxido nítrico (NO) (37). Por seu lado, a vitamina E suspende a peroxidação lipídica ao doar o hidrogénio aos radicais peroxilo ($ROO^{\bullet}$), formando o radical tocoferoxilo, o qual não é reativo, e bloqueando a cadeia oxidativa (37). Os carotenoides são, por norma, não reativos mas têm a capacidade de eliminar o oxigénio singlete (1O_2), exibindo assim atividade antioxidante (37).

Aos flavonoides é atribuída uma grande capacidade antioxidante devido à existência de ligações dos grupos $^{\bullet}OH$ a anéis aromáticos na sua estrutura, permitindo-lhes atuar como agentes redutores, dadores de hidrogénios e como agentes quelantes de metais. Têm ainda a capacidade de ativar enzimas antioxidantes, reduzir os radicais de α -tocoferol, inibir as oxidases, mitigar as ERA e aumentar os níveis de ácido úrico (37). Os ácidos fenólicos também atuam como agentes eliminadores e quelantes de radicais livres, como por exemplo $^{\bullet}OH$ e $ROO^{\bullet}$, $O_2^{\bullet-}$ e $ONOO^-$ (37).

Os antioxidantes têm igualmente potencial para prevenir e tratar doenças relacionadas com o stresse oxidativo, podendo ser classificados como artificiais ou naturais (40). Os suplementos antioxidantes, ou os alimentos contendo antioxidantes, podem ser

usados para ajudar o organismo a reduzir os danos oxidativos, bem como a proteger a qualidade dos alimentos, impedindo a deterioração oxidativa (41).

Atualmente, os antioxidantes naturais de frutos, flores e plantas, são alvo de grande interesse por parte da indústria farmacêutica, cosmética, e, especialmente, alimentar. Na realidade, têm enorme potencial como substituintes dos antioxidantes artificiais (42). Alguns estudos epidemiológicos já realizados demonstraram uma relação entre o aumento do consumo de frutos e vegetais e a redução de doenças associadas ao stresse oxidativo, como as doenças cardiovasculares (43,44) e certos tipos de cancro (44). Esta atividade antioxidante presente nas plantas deve-se à presença de fitoquímicos na sua constituição, como por exemplo ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, taninos e carotenoides (Figura 6) (45).



Figura 6 – Principais classes de fitoquímicos naturais (33).

1.3.3 Compostos bioativos

Os compostos bioativos podem ser classificados em essenciais e não essenciais. Estes compostos são constituintes naturais dos alimentos, proporcionando benefícios para a saúde, além do valor nutricional que conferem ao alimento (46).

As plantas sintetizam uma vasta gama de compostos orgânicos que podem ser classificados em metabolitos primários e secundários. Os metabolitos primários (fitosteróis, lípidos, ácidos orgânicos e aminoácidos) são compostos essenciais que intervêm em

processos fundamentais como a fotossíntese, a respiração, o crescimento e o desenvolvimento (47). Por sua vez, os metabolitos secundários encontram-se em elevadas concentrações, apresentando estruturas distintas e tendo a função de proteger e ajudar a planta a reagir a fatores adversos, como a poluição, a seca, a radiação UV e ataques de microrganismos (48,49). Deste modo, os metabolitos secundários representam uma interface química dinâmica entre as plantas e o meio ambiente envolvente, estando a produção correlacionada com fatores como a temperatura, a disponibilidade hídrica, a radiação UV, o acesso a nutrientes, a altitude e a poluição (50).

Nos últimos anos, a investigação tem-se focado na pesquisa de metabolitos secundários pelos seus efeitos protetores contra algumas patologias. Os seus efeitos não se visualizam a curto prazo, mas a sua ingestão a longo prazo pode ser importante para a diminuição de certas doenças crónicas, como o Alzheimer ou o Parkinson (47). Desta forma, as plantas silvestres já comprovaram ser uma importante fonte de diversos metabolitos secundários, sendo-lhes atribuídos vários efeitos bioativos (Figura 7), nomeadamente propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias e anticancerígenas (32).



Figura 7 – Efeitos bioativos das plantas silvestres (32).

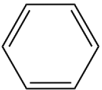
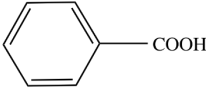
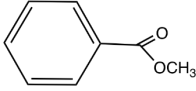
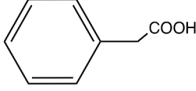
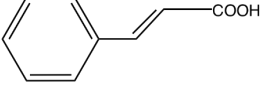
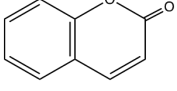
De acordo com a origem biossintética dos metabolitos secundários das plantas, estes podem ser agrupados em três grupos principais: compostos fenólicos, terpenos e alcaloides (47).

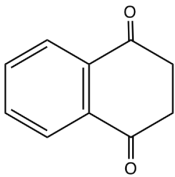
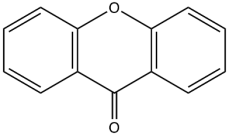
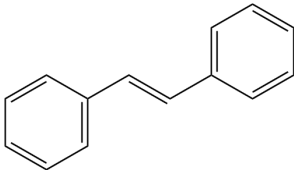
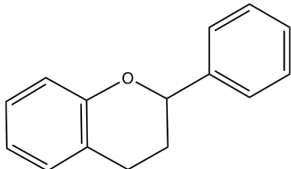
1.3.3.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos presentes nas plantas resultam do seu metabolismo secundário, exercendo importantes funções na defesa contra microrganismos e insetos e sendo responsáveis pela pigmentação e pelas características sensoriais (51).

A principal característica dos compostos fenólicos é a presença de pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilo ligados (47). São classificados de acordo com o número e a disposição dos átomos de carbono e, normalmente, surgem conjugados com açúcares ou ácidos orgânicos (Tabela 3) (47). Estes compostos podem ser moléculas simples, de baixa massa molecular e com um único anel aromático ligado (como é o caso dos ácidos fenólicos), ou moléculas mais complexas (como flavonoides, proantocianidinas ou taninos, entre outros) (44,47).

Tabela 3 – Principais compostos fenólicos encontrados nas plantas, estrutura química básica e exemplos (47,52).

Nº C	Estrutura química	Classe	Exemplo
6		Fenólicos simples	Catecol e hidroquinona
7		Hidroxibenzoatos	Ácido gálico
8		Acetofenona	4-Hidroxi-acetofenona
8		Ácido fenilacético	Ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético
9		Ácidos hidroxicinâmicos	Ácido <i>p</i> -cumárico
9		Cumarinas	Esculetina

10		Naftoquinona	Juglona
13		Xantonas	Mangiferina
14		Estilbenos	Resveratrol
15		Flavonoides	Quercetina

- Flavonoides

Os flavonoides inserem-se na subclasse dos polifenóis e são os compostos mais abundantes no Reino *Plantae* (47). São constituídos por 15 carbonos e 2 ou mais anéis aromáticos, cada um com um hidroxilo aromático que se liga por uma ponte de carbono (47,53). Podem ser subdivididos em cinco categorias estruturais: flavonas, flavonóis, flavononas, flavan-3-ols (catequinas) e antocianinas (54).

Nas plantas, estes metabolitos encontram-se, principalmente, na epiderme das folhas e na casca dos frutos (47). Também intervêm na coloração das flores e dos frutos, uma vez que as antocianinas, as flavonas e os flavonóis têm função de pigmentos, sendo importantes para atrair os animais para a polinização e para a dispersão das sementes (52). Além disso, estão envolvidos em inúmeros processos, como na proteção contra os danos da radiação UV, na pigmentação, na reprodução sexual da planta, nas interações simbióticas plantas-microrganismos, na proteção face a agentes patogénicos ou na resistência a doenças e pragas, contribuindo assim para a estrutura da planta (55). Na alimentação humana são também os compostos fenólicos mais frequentes, cujos efeitos biológicos mais conhecidos são a atividade antioxidante, anti-inflamatória e antialérgica (51).

1.4 Chás, infusões e decocções

A população, em geral, conhece e utiliza no quotidiano pelo menos um dos mais importantes métodos naturais extrativos, muito embora não o considere como tal: o chá (56). O consumo de extratos aquosos feitos à base de folhas secas é uma prática mundial, estando documentada há séculos no Extremo Oriente (56). O termo chá refere-se à bebida feita com as folhas da planta *Camellia sinensis* e foi descoberto no ano 2700 a.C. (57). Nos tempos modernos, outros extratos tornaram-se familiares e são comumente conhecidos como “chá de ervas” (56). São, igualmente, baseados na extração simples de compostos de origem vegetal solúveis em água (56).

As infusões de plantas e de frutos são concebidas a partir de plantas ou de partes dessas, não originárias da planta do chá (*C. sinensis*), e são destinadas ao uso alimentar quando preparadas com água a ferver (58). As partes selecionadas para a utilização em infusões dependem das substâncias aromáticas que possuem e da sua localização na própria planta (58).

Existem atualmente cerca de 300 plantas diferentes e 400 partes de plantas utilizadas em infusões de ervas e de frutos, podendo ser folhas (de menta e laranjeira), frutas/pedaços de frutos (pedaços de maçã) ou flores (de limoeiro e camomila) (58). A infusão consiste em verter água quente sobre as raízes, as flores, as folhas, as sementes, os frutos ou outra parte da planta da qual se pretenda extrair os seus compostos químicos, deixando repousar durante alguns minutos (59–61). Já a decocção compreende a fervura da parte da planta com interesse, deixando em ebulição durante alguns minutos (59,61). Normalmente, a infusão está indicada para preparações com partes moles da planta, como folhas, flores e frutos, enquanto a decocção é sugerida para raízes, caules e frutos secos (59).

As infusões, segundo a associação *Tea & Herbal Infusions Europe (THIE)*, tem ganho relevância no mercado mundial de consumo (58). Esta associação estudou o volume de vendas em diferentes mercados de 11 países associados da União Europeia (Áustria, Croácia, França, Alemanha, Itália, Holanda, Roménia, Eslováquia, Espanha, Suíça e Reino Unido) entre os anos de 2006 e 2015 (Figura 8). De acordo com o estudo, foi perceptível que as vendas aumentaram gradualmente, atingindo em 2015 as 60 384 toneladas (Figura 8) (58). Conjuntamente, os países com maior volume de vendas foram a Alemanha, o Reino Unido e a França, enquanto no extremo oposto se situaram a Croácia e a Eslováquia (58).

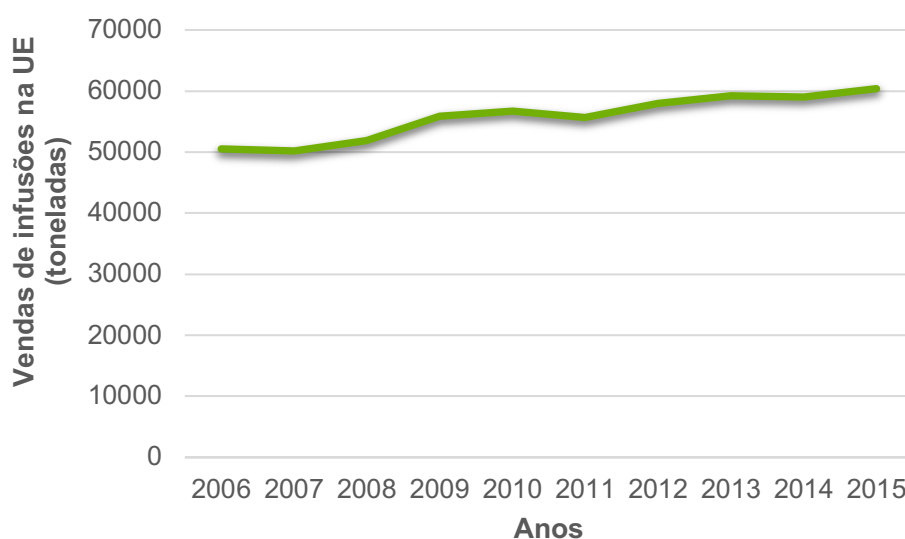


Figura 8 – Vendas de infusões (em toneladas) em vários mercados de países da União Europeia, entre o ano de 2006 e 2015. Adaptado de THIE (58).

Assim, dada a elevada preferência do consumidor por infusões e decocções, e visto não existir disponível no mercado qualquer produto à base de kiwi ou de baby kiwi com estas finalidades, o objetivo deste trabalho foi preparar e caracterizar, sob o ponto de vista químico, infusões e decocções de *A. arguta* e *A. deliciosa*, bem como avaliar as suas propriedades bioativas.

2. Materiais e Métodos

2.1 Reagentes e Padrões

Para a elaboração do trabalho experimental e para a realização das diversas metodologias foi necessário a utilização de diferentes reagentes de grau analítico, os quais se apresentam na seguinte lista:

- 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH^{*}) (Sigma-Aldrich, Alemanha)
- 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (Tris) (Sigma-Aldrich, EUA)
- 2,2'-Azobis(2-metilpropionamidina) dihidroclorato (AAPH) (Sigma-Aldrich, EUA)
- 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (Sigma-Aldrich, Suíça)
- 3-(Aminopropil)-1-hidroxi-3-isopropil-2-oxo-1-triazeno (NOC-5) (Sigma-Aldrich, EUA)
- Acetato de sódio (Sigma Chemical Co., EUA)
- Ácido 4,5-Dihidroxi-1,3-benzenodissulfónico (Tiron)
- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (Sigma-Aldrich, Suíça)
- Ácido ascórbico (Sigma Aldrich, China)
- Ácido gálgico (Sigma, China)
- Carbonato de sódio (NaCO₃) (Sigma-Aldrich, Alemanha)
- Catequina (Sigma-Aldrich, Alemanha)
- Cloreto de alumínio (AlCl₃) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha)
- Cloreto de azul nitrotetrazólio (NBT) (Sigma-Aldrich, EUA)
- Cloreto férrico (FeCl₃) (Merck, Alemanha)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck KGaA, Alemanha)
- Dinucleótido β-nicotinamida adenina (NADH) (Sigma Aldrich, EUA)
- *Dulbecco's modified Eagle's médium* (DMEM) (Gibco, Reino Unido)
- Etanol absoluto anidro (Carlo Erba Reagents, França)
- Fosfato mossódico anidro (NaH₂PO₄) (VWR Chemicals, Bélgica)
- Fosfato monopotássico (KH₂PO₄) (Merck, Alemanha)
- Hidrato de catequina (Sigma-Aldrich, Índia)
- Hidrogenofosfato dissódico anidro (Na₂HPO₄) (Merck, Alemanha)
- Hidróxido de sódio (NaOH) 1M (VWR Chemicals, França)
- Lucigenina (Cayman Chemical Company, EUA)
- Metosulfato de fenazina (PMS) (Sigma-Aldrich, EUA)

- Nitrito de sódio (NaNO_2) (Sigma-Aldrich, Alemanha)
- Peróxido de Hidrogénio (H_2O_2) (Merck, Alemanha)
- Quercetina (Sigma-Aldrich, Alemanha)
- Reagente de fenol segundo *Folin-Ciocalteu* (Folin) (Merck, Alemanha)
- Sulfato ferroso (Sigma-Aldrich, Índia)
- Tripsina (Hyclone, EUA)
- Triton X-100 (Amresco, EUA)

2.2 Recolha e tratamento das amostras

Os frutos de *A. arguta* foram colhidos durante o mês de Setembro de 2017 no produtor Mini-Kiwi Farm, sediado em Landim, concelho de Vila Nova de Famalicão, Portugal (N 41°22'36.393" W 8°28'11.704").

Os frutos de *A. deliciosa* utilizados foram de origem biológica e obtidos num mercado tradicional do Porto, em Novembro de 2017.

Todos os frutos foram desidratados (Lacor, Espanha) e triturados (Flama, Portugal), tendo sido posteriormente armazenados a 4 °C até serem realizadas infusões e decocções para posteriores ensaio.

2.3 Preparação de infusões e decocções

Para a infusão, adicionaram-se 100 mL de água a ferver a 2 g de amostra (62). Após 5 minutos, a solução foi filtrada com papel de filtro Whatman nº 4 (Figura 9). Para a decocção, adicionaram-se 2 g de amostra a 100 mL de água, tendo-se colocado a aquecer numa placa de aquecimento (Thermolyne, EUA) até ebulição (62). Após ebulição, a solução foi retirada do calor e 5 minutos depois filtrada com papel de filtro Whatman nº 4, sendo armazenada a 4 °C até posteriores análises (Figura 9). Foram preparadas decocções e infusões de *A. arguta* (DAa e IAa, respetivamente) e de *A. deliciosa* (DAd e IAd).

No caso da determinação do teor de polifenóis e de flavonóides totais (TPT e TFT, respetivamente), bem como da atividade antioxidante (através da inibição do radical 1,1-

difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH[•]) e do poder antioxidante por redução do ião férrico (FRAP)) as soluções foram diretamente utilizadas após preparação. Para os restantes ensaios, depois de filtradas, as soluções foram congeladas a -80°C para posterior liofilização (Telstar, Cryodos, Espanha). Após liofilização as amostras foram conservadas a 4°C até análise.

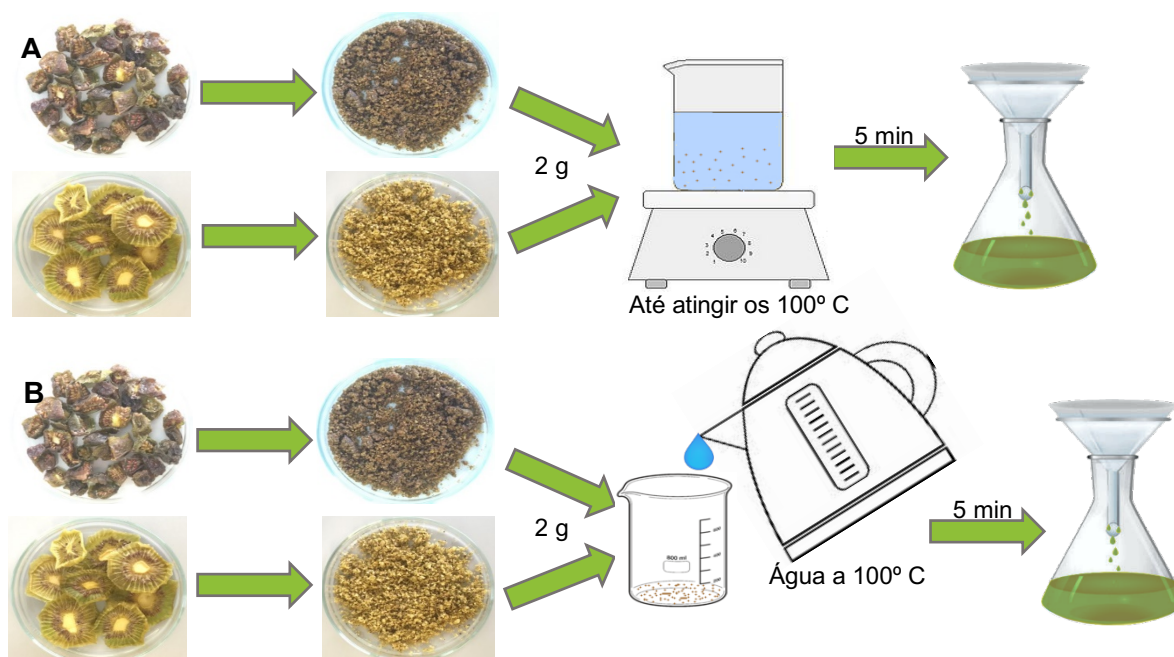


Figura 9 – Processo de preparação: A) Decocção – as amostras foram trituradas, adicionou-se água e procedeu-se ao aquecimento; quando atingiu os 100°C , retirou-se do calor e filtrou-se após 5 min; B) Infusão – as amostras foram trituradas e adicionou-se água a 100°C ; após 5 min filtrou-se.

2.4 Avaliação das características físicas das infusões e decocções

2.4.1 Avaliação da cor

A cor das infusões e das decocções foi avaliada com um colorímetro (Chroma Meter CR-410, Konica Minolta, Tóquio, Japão), previamente calibrado com uma superfície branca de referência (Figura 10). As diferentes amostras foram colocadas em placas de Petri. Os resultados obtidos foram expressos de acordo com o *CIE 1976 $L^*a^*b^*$* , definido pela *Comission Internationale de l'Éclairage (CIE)*. As três coordenadas representam a luminosidade (L^*), a posição entre o vermelho e o verde (a^*) e a posição entre o amarelo

e o azul (b^*). As medições foram realizadas em triplicado para cada uma das amostras em estudo.



Figura 10 – Colorímetro utilizado para as medições da cor das diferentes amostras.

2.4.2 Avaliação do pH

O pH foi determinado com um pHmeter (Basic 20+, Crison, Barcelona, Espanha) equipado com um eletrodo de vidro previamente calibrado (Figura 11). As medições foram realizadas em triplicado para cada uma das amostras em estudo.



Figura 11 – pHmeter para medição do pH das várias amostras.

2.5 Determinação de compostos bioativos das infusões e das decocções

2.5.1 Determinação do Teor de Polifenóis Totais

O Teor de Polifenóis Totais (TPT) foi determinado por um método espectrofotométrico, utilizando o reagente *Folin-Ciocalteu*, de acordo com o procedimento utilizado por Pinto *et al.* (63). Esta metodologia foi realizada em microplacas de 96 poços, onde foram colocados 30 μL de amostra/padrão/branco e se adicionaram 150 μL de reagente *Folin-Ciocalteu* (1:10). De seguida, adicionaram-se 120 μL de Na_2CO_3 a 7,5%. De forma a ocorrer a reação, a microplaca foi colocada na estufa (WTC Binder, Alemanha) a 45 °C durante 15 minutos. No final deste tempo, a placa foi colocada à temperatura ambiente durante 30 minutos ao abrigo da luz e procedeu-se à leitura da absorvência a 765 nm num leitor de microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT, EUA). Uma vez que na presença do reagente *Folin-Ciocalteu* os polifenóis atuam como agentes redutores, verifica-se a ocorrência de reações de oxidação-redução as quais resultam na formação de complexos com coloração azulada (Figura 12) (64).

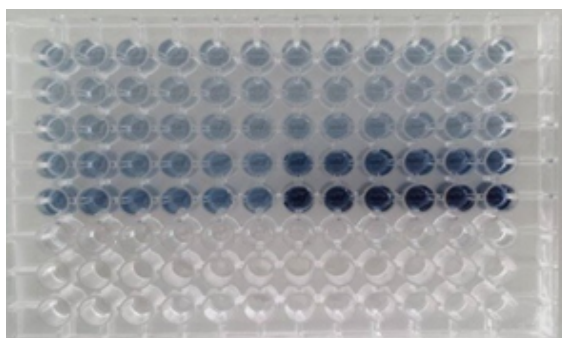


Figura 12 – Placa de 96 poços referente ao ensaio de TPT no término da reação de oxidação-redução.

Utilizou-se uma solução de ácido gálico como padrão, obtendo-se uma curva de calibração (gama de linearidade = 0,625–100 $\mu\text{g/mL}$, $R^2 = 0,999$) que permitiu correlacionar as absorvências das amostras com as absorvências das soluções de padrão. Os resultados do TPT foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por litro de amostra (mg EAG/L), tendo o ensaio sido realizado em triplicado.

2.5.2 Determinação do Teor de Flavonoides Totais

De acordo com o método descrito por Pinto *et al.* (63), o Teor de Flavonoides Totais (TFT) foi determinado por um ensaio colorimétrico que se baseia na formação de compostos de flavonoide-alumínio com coloração rosa (Figura 13).

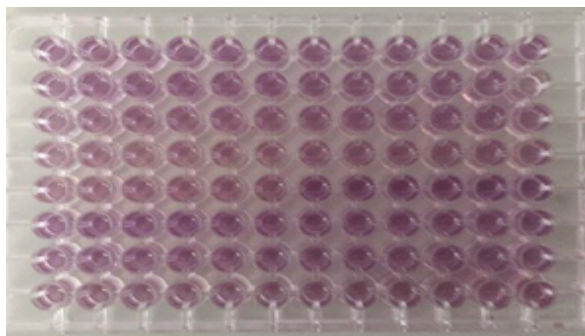


Figura 13 – Placa de 96 poços onde ocorreu o ensaio de TFT, baseando-se na formação de compostos de flavonoide-alumínio.

Este ensaio foi realizado diretamente em microplaca de 96 poços. Aos 30 μL de amostra/padrão/branco adicionaram-se 75 μL de água destilada e 45 μL de NaNO_2 a 1% (m/v). Após 5 minutos, colocaram-se 45 μL de solução de AlCl_3 a 5% (m/v). Terminado esse tempo, adicionaram-se 60 μL de NaOH (1M) e 45 μL de água destilada. De seguida, homogeneizaram-se as soluções nos poços da microplaca e procedeu-se à leitura da absorvência a 510 nm num leitor de microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT, EUA).

De forma a obter uma correlação entre as concentrações de padrão e as absorvências das amostras, utilizou-se como padrão uma solução de catequina (gama de linearidade = 2,5–200 $\mu\text{g/mL}$, $R^2 = 0,999$). Os resultados de TFT foram expressos em miligramas de equivalentes de catequina por litro de amostra (mg ECA/L), tendo o ensaio sido realizado em triplicado.

2.6 Atividade antioxidante das infusões e das decocções

A atividade antioxidante das amostras foi determinada através da capacidade de neutralização do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH $^{\bullet}$) e pelo método do poder antioxidante por redução do ião férrico (FRAP).

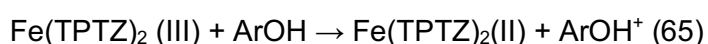
2.6.1 Avaliação da capacidade de inibição do radical DPPH•

O DPPH• é um radical estável que possui absorção máxima entre 515 e 517 nm (65). Este radical, na presença de compostos com capacidade antioxidante, é reduzido a hidrazina quando reage com dadores de H⁺. Assim, valores baixos de absorvência indicam uma maior inibição de radicais livres (65).

Esta metodologia é eficaz na determinação da atividade antiradicalar das amostras e foi executada de acordo com os procedimentos descritos por Pinto *et al.* (63). A mistura de reação foi realizada em microplacas de 96 poços, onde se colocaram 30 µL de amostra/padrão/branco e 270 µL de uma solução etanólica de radicais de DPPH• (6×10⁵ M). Após um período de incubação de 40 minutos, à temperatura ambiente e no escuro, mediu-se a absorvência a 517 nm num leitor de microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT, EUA). Foi feito um controlo positivo com uma solução de Trolox. O potencial antioxidante baseado na avaliação da capacidade de inibição do radical DPPH• das amostras de infusões e decocções foi expresso em percentagem de inibição (% inibição) para a maior concentração testada de amostra.

2.6.2 Avaliação da capacidade antioxidante por redução do ião férrico (FRAP)

A reação química do FRAP envolve uma única reação entre o Fe(TPTZ)₂ (III) e o ArOH (estrutura química presente nos compostos fenólicos) como dador de eletrões:



A metodologia utilizada baseou-se num ensaio previamente descrito por Pinto *et al.* (63). Os ensaios decorreram em microplacas de 96 poços em triplicado. A 35 µL de amostra/padrão/branco foram adicionados 265 µL de reagente FRAP (composto por 10 partes de tampão acetato a 300 mM de pH 3,6, 1 parte de uma solução de TPTZ a 10 mM e 1 parte de uma solução de cloreto férrico (FeCl₃) a 20 mM). De modo a ocorrer a reação, a microplaca foi colocada na estufa (WTC Binder, Alemanha) a 37 °C durante 30 minutos. Seguidamente, leu-se a absorvência a 595 nm num leitor de microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT, EUA). O padrão utilizado foi uma solução de sulfato ferroso (Fe₂SO₄) a 1 mM. Pela correlação entre as absorvências das amostras e do padrão obteve-se uma curva de calibração (gama de linearidade = 25–500 µmol/L, R² = 0,999). Os

resultados foram expressos em μmol de equivalentes de sulfato ferroso (ESF) por litro de amostra (μmol ESF/L).

2.7 Avaliação da capacidade de captação de espécies reativas

A capacidade de eliminação de espécies reativas de oxigénio (ERO) e de azoto (ERA) foi avaliada nas diferentes amostras de infusões e decocções de *A. arguta* e *A. deliciosa*. Foram utilizados vários ensaios, nomeadamente, a determinação da capacidade de captação do radical anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), radical peroxilo ($\text{ROO}^{\bullet}$) e óxido nítrico ($\text{NO}^{\bullet}$).

De acordo com o procedimento realizado por Pistón *et al.*, todos os ensaios foram realizados num leitor de microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT, EUA), equipado com um termostato, permitindo a deteção colorimétrica, fluorimétrica e quimiluminométrica (66). Os ensaios foram realizados a uma temperatura de 37 °C. As diferentes amostras liofilizadas foram dissolvidas em tampão fosfato e foram testadas diferentes concentrações em triplicado. Os valores de IC_{50} foram calculados a partir das curvas de percentagem de inibição em função da concentração de antioxidante (66).

2.7.1 Determinação da capacidade de captação do $\text{O}_2^{\bullet-}$

O radical anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) avaliado nas amostras foi criado por um sistema NADH/PMS/ O_2 (66). A capacidade de captação deste radical foi determinada espectralmente, pela monitorização do efeito das amostras em estudo na redução do NBT, induzida pelo $\text{O}_2^{\bullet-}$, a *diformazan*, de coloração roxa (67).

Os ensaios decorreram em microplacas de 96 poços em triplicado. Para a mistura reacional, adicionaram-se 50 μL de NADH 166 μM , 150 μL de NBT 43 μM , 50 μL de amostras, ou solvente no caso do branco e do controlo, e, por fim, 50 μL de PMS 2,7 μM . Procedeu-se à leitura da absorvência a 560 nm, a cada 2 minutos durante 6 minutos, a 37 °C. Os diferentes reagentes, NADH, NBT e PMS e as amostras, foram dissolvidos em tampão fosfato 19 mM, e pH 7,4. Utilizou-se uma solução de ácido ascórbico como controlo positivo. Os efeitos observados foram expressos em percentagem de inibição da redução

do NBT a *diformazan*. Por último, calculou-se o IC₅₀ da atividade antioxidante, de modo a expressar os resultados nessa ordem de grandeza.

2.7.2 Determinação da capacidade de captação de H₂O₂

A capacidade de captação do H₂O₂ foi determinada por uma metodologia quimioluminescente, onde se monitorizou o efeito das amostras na oxidação da lucigenina pela indução do H₂O₂ (68). Para esse efeito, o H₂O₂ foi diluído a 30%. A mistura reacional foi realizada em microplaca de 96 poços em triplicado. Os comprimentos de onda utilizados para a excitação e emissão foram de 530 e 590 nm, respetivamente. De modo a obter um volume final de 250 µL adicionaram-se 91,5 µL de tampão Tris 50 mM (com um pH de 7,4) a 50 µL de solvente (tampão fosfato) para o branco e controlo ou de amostra a diferentes concentrações. De seguida, juntaram-se 100 µL de lucigenina a 800 µM (que foi previamente dissolvida em tampão Tris-HCl 50 mM) e 8,5 µL de H₂O₂ 1%. O controlo positivo utilizado neste ensaio foi uma solução de ácido ascórbico. O sinal quimioluminescente foi detetado no leitor de microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT, EUA) logo após a mistura reacional estar completa, durante 5 minutos. Os resultados obtidos foram expressos como percentagem de inibição.

2.7.3 Determinação da capacidade de captação do HOCl

A capacidade de captação do HOCl foi determinada por um método espectrofotométrico a 235 nm, monitorizando a capacidade do HOCl induzir a oxidação do DHR a rodamina 123 (68). O HOCl foi preparado ajustando o pH de uma solução de 1% (m/v) de NaCl a 6,2, com a adição gota a gota de H₂SO₄ a 10% (v/v). Esta metodologia foi realizada em triplicado em microplaca de 96 poços, onde se adicionaram 150 µL de tampão fosfato 100 mM, 50 µL de solvente (tampão fosfato) ou de amostra, 50 µL de DHR 5 µM e 50 µL de HOCl 5 µM. A fluorescência foi lida a um comprimento de onda de 485 ± 20 nm e de 528 ± 20 nm, a 37 °C durante 5 minutos. Os padrões utilizados neste ensaio foram a quercetina e o ácido ascórbico. Por fim, calculou-se o IC₅₀ da atividade antioxidante, de modo a expressar os resultados nessa ordem de grandeza.

2.7.4 Determinação da capacidade de captação do ROO•

O radical ROO• foi produzido por decomposição térmica do AAPH a 37 °C. Monitorizou-se a capacidade de captação do ROO• pelas infusões e decocções no

decréscimo da fluorescência resultante da oxidação da fluoresceína por indução do ROO[•], sendo expresso como ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) (69).

A mistura da reação foi realizada em microplaca de 96 poços e continha os seguintes reagentes, de modo a obter um volume final de 200 µL: 150 µL de fluoresceína 61,2 nM, 25 µL de amostra ou de tampão fosfato (branco e controlo) e 25 µL de AAPH 19,1 mM. As amostras foram previamente preparadas em tampão fosfato 7,5 mM com um pH de 7,4. De modo a detetar o sinal de fluorescência da mistura reacional, procedeu-se à leitura num leitor de microplacas a 37 °C durante 2 horas, onde o decréscimo foi monitorizado minuto a minuto. Utilizou-se como comprimento de onda para emissão 485 ± 20 nm e para excitação 528 ± 20 nm. A solução de Trolox foi utilizada como controlo e os resultados foram expressos em rácio, ou seja, razão entre o declive de cada uma das amostras em estudo e o declive obtido pelo Trolox.

2.7.5 Determinação da capacidade de captação do NO[•]

A capacidade de captação do NO[•] foi monitorizada pelo efeito das amostras, através da inibição da formação de triazolofluoresceína fluorescente (DAF-2T) pelo DAF-2 não fluorescente (70). O NO[•] foi produzido pela decomposição do NOC-5.

Esta metodologia foi realizada em microplacas de 96 poços, onde se adicionaram 200 µL de DAF-2 5 µM, 50 µL de amostra ou 50 µL de tampão fosfato (no branco e controlo). No final adicionaram-se 50 µL de NOC-5 10 µM. Os reagentes DAF-2 e NOC-5 foram previamente preparados em tampão fosfato 50 mM a pH 7,4, bem como as amostras em análise. O sinal de fluorescência ocorreu a um comprimento de onda de 528 ± 20 nm e de 485 ± 20 nm para a emissão e excitação, respetivamente, ao fim de 30 minutos de incubação a 37 °C. A capacidade de inibição do DAF-2 pela oxidação induzida pelo NO[•] foi expressa em percentagem de inibição.

2.8 Análise da vitamina C por HPLC

Atualmente, a metodologia de HPLC é um dos métodos mais utilizados para a determinação do ácido ascórbico, apresentando como vantagens a sensibilidade e a precisão (71). As amostras para a determinação do teor de vitamina C (ácido L-ascórbico e desidroascórbico) foram preparadas de acordo com o descrito por Valente *et al.* (71), com ligeiras modificações (Figura 14).



Figura 14 – Preparação das amostras para a determinação do teor de vitamina C por HPLC.

Com efeito, pesaram-se entre 50 e 75 mg de amostra seca, os quais foram adicionados a uma solução de 10 % (v/v) de ácido perclórico e a 1 % (m/v) de ácido metafosfórico em água ultrapura. Seguidamente, filtraram-se as amostras (Macherey-Nalgel GmbH & Co. KG, Alemanha). Adicionou-se 1 mL de Tris (2-carboxietil) hipoclorito fosfina (5 mM) a 1 mL da solução preparada anteriormente e filtrou-se através de um filtro *PVDF Millipore* de 0,45 μm (Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA), de acordo com o procedimento descrito por Albuquerque *et al.* (72). Todo o procedimento decorreu a temperatura controlada e ao abrigo da luz.

A metodologia utilizada para a determinação quantitativa do ácido L-ascórbico foi previamente validada por Valente *et al.* (71). As análises foram feitas num sistema de HPLC *Alliance 2695* (Waters, Milford, MA, EUA), equipado com um detetor de fotodiodos *Waters 2996* e uma coluna analítica (*Synergi™ Hydro-RP*, com 150 mm $\times$ 4,6 mm ID, 4,0 μm de tamanho de partícula) protegida com um *SecurityGuard Cartridge AQ C18* (phenomenex, Torrance, Califórnia - EUA) (40 mm $\times$ 2,0 mm ID, 5 μm de tamanho de partícula). A temperatura da coluna foi mantida a 30 °C e o injetor automático a 4 °C. Utilizou-se um fluxo de 0,6 mL/min e um volume de injeção de 20 μL . O tempo total de cada corrida foi de 10 minutos. As amostras foram analisadas no intervalo entre 200 e 400 nm e monitorizadas a um comprimento de onda de 245 nm. A identificação do ácido L-ascórbico foi realizada por comparação dos tempos de retenção e o espectro de absorção com os picos dos padrões de referência. As áreas dos picos obtidos foram quantificadas e processadas com o software *Empower™* versão 2.0 (Waters, Milford, MA, EUA).

2.9 Análise dos compostos fenólicos por HPLC-MS

Para a determinação dos compostos fenólicos por HPLC-DAD-MS procedeu-se previamente à limpeza da mucilagem, de acordo com o procedimento descrito por Henriques *et al.* (73). Com efeito, pesou-se o extrato, adicionou-se 1 mL de água e, seguidamente, 4 mL de etanol (96%). Colocou-se esta solução no frio durante 15 horas e, após esse período, centrifugou-se durante 30 minutos a uma velocidade de 4500 g e uma temperatura de 4 °C. O *pellet* foi rejeitado e a fração etanólica no sobrenadante evaporada. As amostras foram liofilizadas e, posteriormente, reconstituídas em água *Milli-Q*. Depois deste tratamento prévio, as amostras foram injetadas no HPLC-DAD-MS, tendo sido utilizada a metodologia descrita na literatura por Fernandes *et al.* (74). As amostras foram analisadas por LC-MS num cromatógrafo líquido da série *Finnigan Surveyor*, equipado com uma coluna de fase reversa (Thermo Finnigan, Hypersil Gold®) (150 mm × 4,6 mm, 5 µm, C18) e um termostato a 25 °C. O volume de injeção foi de 20 µL. As amostras foram detetadas a um comprimento de onda de 280 nm por um detetor de fotodiodos (Merck® Hitachi Diode Array Detector L-2455). Utilizaram-se dois solventes: (A) H₂O/CH₃COOH (99:1; v/v) e (B) CH₃COOH/CH₃CN/H₂O (1:20:79; v/v/v). A eluição ocorreu a um fluxo de 0,3 mL/min e com o gradiente descrito na Tabela 4.

Tabela 4 – Gradiente de eluição utilizado na análise dos compostos fenólicos.

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	80	20
55	20	80
70	10	90
90	0	100

A deteção de massa foi feita através de um detetor *Finnigan LCQ DECA XP MAX* (Finnigan Corp., San José, EUA) com uma fonte de ionização API (*Atmospheric Pressure Ionization*) e uma interface ESI (*Electrospray Ionization*). A voltagem do vaporizador e do capilar foram de 5 kV e de 4 V, respetivamente. O capilar esteve a uma temperatura de 325 °C. Os espectros foram obtidos no modo de ião negativo entre *m/z* 120 e 2000. O espectrómetro de massa foi programado para fazer uma série de 3 *scans*: um da massa completa, zoom do ião mais intenso do primeiro *scan* e um MS-MS do ião mais intenso

usando energias de colisão relativas de 30 e 60. As amostras foram diretamente injetadas no espectrómetro MS com uma bomba a fluxo de 0,3 mL/min. A temperatura e a voltagem do capilar foram de 275 °C e de 15 V, respetivamente, e os espectros foram obtidos no modo de ião positivo entre m/z 120 e 2000.

2.10 Viabilidade celular e Citotoxicidade

De modo a simular *in vitro* as características intestinais humanas, recorreu-se a duas linhas celulares: Caco-2 e HT29-MTX. A linha celular Caco-2, apesar de derivar do cancro do colón, mimetiza as propriedades dos enterócitos localizados no intestino delgado, sendo atualmente bastante utilizada como modelo da barreira epitelial intestinal (75). A linha celular HT29-MTX provém da cultura celular de adenocarcinoma do colón humano e expressa características semelhantes às células intestinais (76).

Ambas as linhas celulares foram cultivadas em meio DMEM, previamente suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 1% de aminoácidos essenciais e 1% de antibiótico. As células foram mantidas numa incubadora (Panasonic, CO₂ Incubator MCO-18AC, Japão) com 5% de CO₂ a uma temperatura de 37 °C e o meio de cultura mudado de dois em dois dias até atingirem a confluência.

2.10.1 Ensaio de MTT

O ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é amplamente utilizado para determinar a interrupção crítica de uma função bioquímica (77), avaliando deste modo a viabilidade celular. Este ensaio baseia-se na monitorização da atividade mitocondrial através da medição da formação de um produto de *formazan* azul escuro pela redução do anel de tetrazólio de MTT, sendo considerado um ensaio fiável na avaliação da proliferação celular *in vitro* (77).

De acordo com o descrito por Rodrigues *et al.* (65), o ensaio de MTT foi realizado em microplaca de 96 poços. Em cada poço sedimentou-se a linhagem celular numa concentração de $2,5 \times 10^4$ células/mL e incubou-se durante 24 horas a 37 °C com 5% de CO₂, de modo a propiciar um crescimento exponencial. Após esse período de incubação, o qual permitiu a multiplicação e a adesão celular, retirou-se o meio e lavaram-se as células com 200 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS). Seguidamente, a linha celular foi incubada com diferentes concentrações de amostra (0,1 – 1000 µg/mL), dissolvidas no

respetivo meio, durante 24 horas a 37 °C. Após este período, removeram-se os extratos, lavaram-se as células novamente com PBS e adicionaram-se 120 µL de reagente MTT a cada um dos poços, tendo sido colocado a incubar durante 4 horas a 37 °C com 5% de CO₂. No final desse período, adicionaram-se 120 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e colocou-se a agitar durante 10 minutos para solubilizar os cristais de MTT. A leitura de absorvência foi realizada num leitor de microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT, EUA) a 490 nm e a 630 nm para obter um *background*. O controlo positivo utilizado foi o meio DMEM e o negativo foi o reagente Triton X-100. Os resultados obtidos foram expressos em percentagem de viabilidade celular.

2.10.2 Ensaio de LDH

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* mais utilizado é o da lactato desidrogenase (LDH), onde se avalia a perda da integridade da membrana plasmática através da quantidade de proteína existente no meio extracelular (77–79).

Cada linha celular foi sedimentada em microplaca, numa concentração de $2,5 \times 10^4$ células/mL, durante 24 horas. As diferentes concentrações das infusões e das decocções das duas espécies (0,1 – 1000 µg/mL) foram preparadas em meio DMEM e adicionadas aos poços que continham as células. Após incubação, a 37 °C com 5% de CO₂ durante 24 horas, as células foram lavadas com 200 µL de PBS e, posteriormente, utilizou-se o *kit* de LDH segundo as instruções fornecidas pelo fabricante. Cada concentração foi testada em triplicado, em três ensaios independentes. O controlo máximo do LDH foi determinado usando Triton X-100 e no mínimo utilizou-se apenas meio DMEM. A absorvência foi medida a 490 nm com *background* a 690 nm (79).

2.11 Análise estatística

Todos os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. A análise estatística dos resultados foi realizada recorrendo ao programa informático Microsoft Office Excel® 2013, SPSS® versão 24 (Testes de Homogeneidade de Variância, Teste *One Way* ANOVA e Tukey) e GraphPad Prism 7.

3. Resultados e Discussão

3.1 Características físicas das infusões e decocções

A avaliação da cor é uma metodologia complementar utilizada para verificar a aceitação dos produtos pelos consumidores (63). Os resultados da avaliação da cor para as diferentes infusões e decocções preparadas estão representados na Figura 15. Como anteriormente referido, as três coordenadas representam a luminosidade da cor (L^*), a posição entre o vermelho e o verde (a^*) e a posição entre o amarelo e o azul (b^*).



Figura 15 – Variação da cor (L^* , a^* e b^*) das decocções e das infusões de *A. arguta* (DAa e IAa, respetivamente) e de *A. deliciosa* (DAd e IAd, respetivamente).

No que toca ao parâmetro L^* , tanto as decocções como as infusões de ambas as espécies apresentaram baixa luminosidade, estando os valores compreendidos entre 24,983 e 26,103 para a infusão de *A. arguta* e decocção de *A. deliciosa*, respetivamente.

Para ambas as espécies observaram-se valores negativos para o parâmetro a^* , o qual está associado à coloração esverdeada, tendo os resultados oscilado entre -2,213 para a decocção de *A. arguta* e -2,457 para a decocção de *A. deliciosa*.

Relativamente ao parâmetro b^* , houve notoriamente uma tendência para o amarelo, uma vez que os resultados obtidos foram positivos.

No que diz respeito à avaliação do pH (Figura 16), as amostras em estudo mostraram valores muito similares, sendo todos pH ácidos. Contudo, os valores obtidos para *A. arguta* foram ligeiramente superiores aos de *A. deliciosa*, sem que se verifiquem

diferenças significativas entre as amostras ($p>0,05$). A decocção de *A. arguta* apresentou um valor de 3,76 e a infusão de 3,81. No caso de *A. deliciosa*, os valores foram de 3,70 quer para a decocção quer para a infusão.

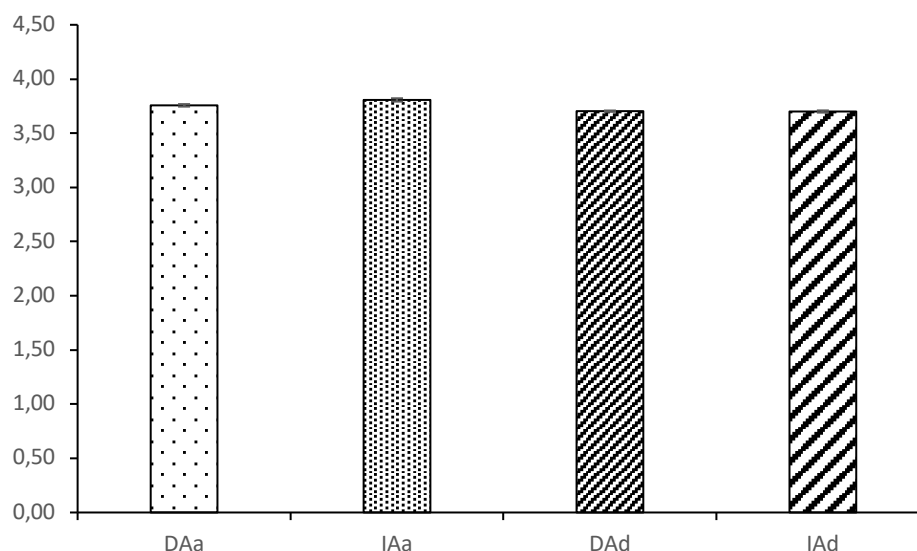


Figura 16 – pH das decocções e infusões de *A. arguta* e de *A. deliciosa*.

Reddy *et al.* analisaram o pH de várias bebidas consumidas nos Estados Unidos da América (80). De acordo com os autores, a maioria das bebidas tinham pH ácido: o sumo de limão um pH de 2,25; o *Minute Maid* de laranja um pH de 3,82; uma *Fanta* de Laranja um pH de 2,82; uma *Coca-cola* 2,37; uma *7UP* um pH de 3,24 e um *Iced tea* de limão da *Nestea* 2,94 (80). Comparativamente aos resultados obtidos é compreensível que as infusões e as decocções desenvolvidas sejam muito semelhantes em termos de acidez e sabor às bebidas analisadas neste estudo, pelo que se presume que haja uma forte aceitação por parte do consumidor.

3.2 Compostos bioativos presentes nas decocções e infusões

3.2.1 Teor de polifenóis totais (TPT)

Os polifenóis são um vasto grupo de compostos que ao longo dos últimos anos têm vindo a adquirir muita importância na dieta. A estes compostos são atribuídas várias características como a cor, o amargo, a adstringência ou a atividade antioxidante (81). No presente estudo, o TPT foi determinado por um método espectrofotométrico simples e reprodutível que utiliza o *Folin-Ciocalteu* como reagente principal. Como anteriormente referido, na presença deste reagente os polifenóis atuam como agentes redutores ocorrendo a formação de um complexo com coloração azulada, cuja absorção máxima ocorre a 765 nm (64). Contudo, devido à composição química do reagente, podem ocorrer interferências de algumas substâncias, como açúcares, ácido ascórbico, dióxido de enxofre e aminas aromáticas (16,82). Os resultados obtidos na determinação do TPT foram expressos em mg EAG/L de amostra e encontram-se resumidos na Tabela 5.

De acordo com a Tabela 5, os resultados de TPT variaram entre 146,35 e 60,50 mg EAG/L amostra, correspondendo o valor mais elevado à decocção de *A. arguta* e o valor mais baixo à infusão de *A. deliciosa* ($p < 0,05$). As amostras de *A. arguta* mostraram um teor em polifenóis superior aos de *A. deliciosa*, sendo a decocção *A. arguta* > infusão *A. arguta* > decocção *A. deliciosa* > infusão *A. deliciosa*. A análise dos resultados revelou uma diferença significativa entre as diferentes amostras analisadas, bem como diferenças entre infusões e decocções de cada uma das espécies. Este facto pode dever-se ao tempo de contacto e à temperatura à qual as decocções são preparadas, permitindo deste modo uma maior e melhor extração dos compostos fenólicos.

Devido à importância das infusões e decocções na dieta humana, bem como à sua aceitação por parte do consumidor, cada vez mais esta temática tem sido estudada por diversos autores. Por exemplo, Pereira *et al.* fizeram a caracterização dos grupos fenólicos de infusões e decocções de diferentes partes da planta *Crithmum maritimum* (83). No que toca aos TPT, os valores obtidos para as decocções foram sempre superiores aos das infusões, apesar de nem sempre existirem diferenças significativas. De acordo com os autores, os TPT variaram entre 62 e 176,5 mg EAG/L, sendo a decocção das folhas a que demonstraram um teor superior de polifenóis. Estes valores são similares aos encontrados no presente estudo.

Por outro lado, Šavikin *et al.* avaliaram o teor fenólico de diferentes frutos vermelhos, como *Aronia melanocarpa*, *Ribes nigrum* e *Vaccinium myrtillus*, reportando

valores entre 601 e 888 mg EAG/L (62). O fruto com maior teor de polifenóis foi *A. melanocarpa*, seguindo-se *V. myrtillus* e *R. nigrum*. Os autores verificaram diferenças significativas entre as infusões de *A. melanocarpa* e de *V. myrtillus*. De acordo com os mesmos, a temperatura contínua das decocções conduz a um teor inferior de TPT quando comparado às infusões. Contudo, estas amostras foram primeiramente submetidas a uma extração com 70% de etanol em água ultrassónica, o que pode influenciar os resultados obtidos e conduzir a valores superiores quando comparados aos apresentados na Tabela 5 (62).

Tabela 5 – Teor de polifenóis totais (TPT), teor de flavonoides totais (TFT), avaliação da capacidade antioxidante por redução do ião férrico (FRAP) e por inibição do radical DPPH* de infusões e decocções de *A. arguta* e *A. deliciosa*.

Amostras		TPT (mg EAG/L)	TFT (mg ECA/L)	FRAP (μ mol ESF/L)	DPPH* (% inibição)
<i>A. arguta</i>	Decocção	146,35 $\pm$ 3,10 ^{a, *}	32,39 $\pm$ 1,29 ^{a, *}	1292,45 $\pm$ 20,92 ^{a, *}	56,65 $\pm$ 8,52 ^a
	Infusão	93,81 $\pm$ 2,21 ^b	17,77 $\pm$ 1,44 ^b	801,53 $\pm$ 8,21 ^c	42,85 $\pm$ 2,62 ^{a, b}
<i>A. deliciosa</i>	Decocção	77,06 $\pm$ 2,11 ^{c, *}	9,89 $\pm$ 0,64 ^{c, *}	849, 74 $\pm$ 17,46 ^b	37,19 $\pm$ 1,06 ^b
	Infusão	60,50 $\pm$ 1,37 ^d	7,84 $\pm$ 0,75 ^d	871,85 $\pm$ 44,64 ^b	54,31 $\pm$ 7,62 ^a

Diferentes letras (a, b, c, d) na mesma coluna representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos entre as diferentes amostras.

* exprime diferenças significativas ($p < 0,05$) entre infusão e decocção da mesma espécie.

3.2.2 Teor de flavonoides totais (TFT)

Os flavonoides constituem um grupo importante de compostos fenólicos, encontrando-se presentes em plantas, vegetais, frutas e variedades de bebidas, como chás, cafés e bebidas à base de fruta (65,84). Diferentes estudos demonstraram que estes compostos têm benefícios para a saúde, particularmente na proteção cardiovascular, atividades anti-inflamatória, anticancerígena, antiviral, antialérgica e antioxidante (65,85,86).

No presente trabalho, o TFT foi determinado por um método colorimétrico que se baseia na formação de compostos de flavonoide-alumínio com coloração rosa, ocorrendo a absorção máxima a 510 nm. Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram que os TFT variaram entre 7,84 e 32,29 mg ECA/L, nomeadamente, para a infusão de *A. deliciosa* e a decocção de *A. arguta*. Tal como aconteceu no ensaio dos TPT, os resultados mostraram claramente que a decocção de *A. arguta* apresenta um maior teor de flavonoides comparativamente às outras amostras em estudo. Também foi notório que tanto a decocção como a infusão de *A. arguta* apresentaram valores superiores comparativamente aos de *A. deliciosa*. A análise estatística ($p < 0,05$) mostrou diferenças significativas entre todas as amostras, bem como entre a decocção e a infusão de cada espécie. Este facto, como referido anteriormente para o ensaio dos TPT, pode dever-se ao tempo de contacto e à temperatura a qual o fruto é submetido na decocção, o que faz com que se verifique uma melhor e maior extração de flavonoides.

Pereira *et al.* analisaram igualmente o teor de flavonoides presentes nos diferentes extratos de *C. maritimum*, utilizando rutina como solução-padrão (83). No ensaio do TFT a amostra com o menor teor em flavonoides foi a infusão do caule (114,5 mg ER (equivalentes de rutina)/L) e a que apresentou um maior teor foi a decocção das folhas (289 mg ER/L). As decocções apresentaram os valores mais elevados, exceto nas flores onde o teor de flavonoides na infusão foi o mais alto. Deste modo, apesar dos valores encontrados por estes autores serem cerca de 10 vezes superiores aos referenciados na Tabela 5, percebe-se que os teores de flavonoides são superiores nas decocções.

3.3 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante das infusões e das decocções está relacionada com a capacidade que estas apresentam para proteger um sistema biológico de um potencial efeito prejudicial durante processos oxidativos. Com efeito, no presente estudo, a

capacidade antioxidante dos diferentes extratos foi avaliada através do ensaio DPPH[•] e FRAP.

3.3.1 Avaliação da capacidade de inibição do radical DPPH[•]

O método de captação do radical DPPH[•] é vulgarmente usado na determinação primária da atividade antioxidante [95]. Este método colorimétrico fundamenta-se na utilização do radical DPPH[•], que funciona como dador de hidrogénio, e na presença de antioxidantes, ocorrendo a alteração da sua coloração de roxo para amarelo [35]. A capacidade antioxidante baseada na inibição do radical DPPH[•] pelas amostras de infusões e decocções foi expressa em percentagem de inibição para a maior concentração testada (20 g/L).

Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram que os valores de percentagem de inibição de DPPH[•] variaram entre 56,65 e 37,19 %. Assim como aconteceu no ensaio do FRAP e nos ensaios de determinação dos compostos bioativos, o valor mais elevado foi obtido para a decocção de *A. arguta*. Contudo, neste ensaio verificou-se que a percentagem de inibição da decocção *A. arguta* > infusão *A. deliciosa* > infusão *A. arguta* > decocção *A. deliciosa*. A análise estatística ($p < 0,05$) revelou diferenças significativas entre as decocções das diferentes espécies. Além disso, a infusão de *A. arguta* não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) nem para a decocção da mesma espécie, nem para a infusão e a decocção de *A. deliciosa*. Por seu lado, a decocção de *A. deliciosa* apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) para a infusão da mesma espécie e para a decocção de *A. arguta*.

Atualmente, a atividade antioxidante é um dos parâmetros mais valorizados. Além disso, verifica-se uma procura crescente por antioxidantes naturais, pelo que a investigação se tem focado na determinação da atividade antioxidante de extratos de plantas e frutos. As decocções e infusões inserem-se neste grupo. De forma a determinar também a atividade antioxidante, Pereira *et al.* submeteram os diferentes extratos de *C. maritimum* ao ensaio de captação do radical DPPH[•] (83). Os resultados obtidos estavam compreendidos entre 79,4 e 88,0 % de atividade por copo de chá, verificando-se ainda um valor inferior na infusão dos caules e superior na infusão das flores de *C. maritimum*.

3.3.2 Capacidade antioxidante por redução do ião férrico (FRAP)

O ensaio FRAP avalia a capacidade de redução do ião férrico (Fe^{3+}) a ião ferroso (Fe^{2+}) na presença de antioxidantes (65). Este ensaio espectrofotométrico é simples e

reprodutível, verificando-se a alteração da cor amarela para azul uma vez que o complexo $\text{Fe}^{3+} - \text{TPTZ}$ é reduzido a Fe^{2+} e forma o complexo $\text{Fe}^{2+} - \text{TPTZ}$ (36,87). Neste estudo, os resultados obtidos na avaliação do FRAP foram expressos em micromoles de equivalentes de sulfato ferroso (ESF) por litro de amostra e encontram-se resumidos na Tabela 5.

De acordo com Tabela 5, a ordem crescente da atividade antioxidante foi: infusão *A. arguta* < decocção *A. deliciosa* < infusão *A. deliciosa* < decocção *A. arguta*. Como era esperado, a decocção de *A. arguta* apresentou o valor mais elevado para a redução do ião férrico (1292,45 $\mu\text{mol ESF/L}$), tendo o resultado mais baixo sido obtido para a infusão da mesma espécie (801,53 $\mu\text{mol ESF/L}$). A análise dos resultados revelou que existem diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre a infusão e a decocção de *A. arguta*. Pelo contrário, não existem diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre os extratos de *A. deliciosa*. Também foi perceptível que as duas amostras de *A. arguta* foram significativamente diferentes das amostras de *A. deliciosa*.

Lv *et al.* analisaram a atividade antioxidante de chás pretos da China de diferentes variedades (88). Os chás *Fuzhuan* e *Liubao* apresentaram uma capacidade de redução do ião férrico similar, obtendo-se valores de 184,31 $\mu\text{mol/L}$ para o *Fuzhuan* e de 188,46 $\mu\text{mol/L}$ para o *Liubao*, enquanto que o chá *Pu-erh* obteve uma capacidade inferior comparativamente aos outros dois em estudo (127,35 $\mu\text{mol/L}$) (88). Desta forma, percebe-se que os resultados obtidos por estes autores para os chás pretos da China são inferiores aos encontrados nas infusões e decocções de *A. arguta* e de *A. deliciosa*, apresentando estes últimos uma maior capacidade de redução do ião férrico e, consequentemente, uma maior atividade antioxidante.

3.4 Correlação entre os compostos bioativos e a atividade antioxidante

Como referido anteriormente, a atividade antioxidante foi avaliada com base em ensaios *in vitro*, nomeadamente a capacidade de sequestro do radical DPPH^{*} e o ensaio FRAP. A possível correlação entre estes resultados e os resultados de TFT e TPT foi avaliada pela correlação de *Pearson*. Este coeficiente quantifica o grau de correlação linear entre duas variáveis quantitativas.

A correlação dos ensaios realizados para a decocção de *A. arguta* demonstrou uma correlação positiva entre o FRAP/TPT ($r = 0,199$) e o FRAP/TFT ($r = 0,465$). Já para a

infusão da mesma espécie, verificou-se que o TFT apresentou uma correlação positiva com o TPT ($r = 0,092$) e o DPPH• ($r = 0,507$). Igualmente o TPT exibiu uma correlação positiva para os ensaios de FRAP ($r = 0,134$) e DPPH• ($r = 0,329$).

No que diz respeito às decocções de *A. deliciosa*, verificou-se uma correlação positiva entre TFT/TPT ($r = 0,511$), TFT/DPPH• ($r = 0,187$) e TPT/FRAP ($r = 0,065$). Já para a infusão de *A. deliciosa*, observou-se uma correlação positiva entre o TFT/TPT ($r = 0,367$), TFT/FRAP ($r = 0,483$) e o TPT/ DPPH• ($r = 0,361$).

Pelos resultados obtidos verifica-se uma correlação ligeiramente positiva entre o teor flavonoides e de polifenóis, bem como estes e a atividade antioxidante exibida *in vitro*. Contudo, a interpretação dos resultados tem de ser cuidadosa e cautelosa, uma vez que os efeitos finais de um extrato resultam de ações combinatórias e sinérgicas dos seus constituintes, no qual outros compostos, nomeadamente de outras classes químicas, podem contribuir para os efeitos observados (65).

3.5 Capacidade de captação de espécies reativas

No mundo atual o consumidor revela uma preocupação crescente com a saúde e o bem estar, demonstrando interesse em alimentos com compostos bioativos ou funcionais que possam ser importantes não só na nutrição, mas também na manutenção do estado de saúde (89). A produção de espécies reativas ocorre naturalmente em alguns processos fisiológicos, como na defesa contra agentes infecciosos e na sinalização celular (66). Contudo, se ocorrer um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas pró-oxidantes e a capacidade de defesa antioxidante das células gera-se um fenómeno previamente descrito como stresse oxidativo que conduz a danos nos principais constituintes celulares, nomeadamente lípidos, proteínas e ADN (66). Deste modo, os radicais livres podem causar oxidação e danos nas moléculas biológicas. Porém os compostos fenólicos são capazes de neutralizar estas ações nocivas, devido à sua atividade antioxidante (65). Os resultados da capacidade de captação da ERO e ERA estão sumariados na Tabela 7.

As infusões e as decocções de *A. arguta* e de *A. deliciosa* demonstraram ter capacidade de captação das espécies reativas, com exceção do $O_2^{\bullet-}$ e do H_2O_2 (Tabela 6). Os valores de IC_{50} calculados foram encontrados em baixas concentrações. É de todo importante salientar que a atividade antioxidante dos extratos pode não ser atribuída apenas a um determinado composto fenólico mas à ação conjunta de várias moléculas bioativas (66).

A produção do radical anião superóxido desempenha um papel importante na sinalização celular *redox* e no desenvolvimento de condições fisiopatológicas, como a hipertensão, a inflamação e a aterosclerose (66). Para esta espécie reativa não foi possível determinar o valor de IC_{50} . Contudo, das amostras em estudo, a que apresentou uma percentagem de inibição superior para a concentração mais elevada testada foi a decocção de *A. arguta* (49,18 %), seguindo-se a decocção de *A. deliciosa* (43,96 %), a infusão de *A. arguta* (35,82 %) e, por fim, a infusão de *A. deliciosa* (29,88 %).

Das ERO, o peróxido de hidrogénio é das espécies menos reativas (89). Apesar disso, esta espécie pode produzir outras espécies mais potentes e com efeitos mais tóxicos, como o radical hidroxilo ($HO^{\bullet}$) (66). Como é possível comprovar na Tabela 6, não foi possível determinar o IC_{50} para as concentrações em estudo, obtendo-se as percentagens de inibição para a concentração máxima testada (1000 $\mu\text{g/mL}$). O extrato com maior atividade de captação desta espécie foi a infusão de *A. deliciosa* (49,56 %). No que toca à espécie *A. arguta*, a percentagem de inibição para a decocção e a infusão foi de, respetivamente, 44,35 % para e 41,72 %.

Tabela 6 – Capacidade de captação do anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), peróxido ($ROO^{\bullet}$) e óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) pelas decocções e infusões de *A. arguta* e *A. deliciosa*.

Espécies reativas	IC ₅₀ (µg/mL)				
	ERO			ERA	
	$O_2^{\bullet-}$	H_2O_2	$HOCl$	$ROO^{\bullet}$ ($m_{amostra}/m_{Trolox}$)	$NO^{\bullet}$
<i>A. arguta</i>					
Decocção	n.d.	n.d.	15,50 ± 3,02	0,0087 ± 0,0005	27,83 ± 2,54
Infusão	n.d.	n.d.	27,49 ± 1,81	0,0121 ± 0,0003	36,03 ± 2,36
<i>A. deliciosa</i>					
Decocção	n.d.	n.d.	15,67 ± 2,39	0,0114 ± 0,0004	27,51 ± 2,34
Infusão	n.d.	n.d.	47,76 ± 2,42	0,0103 ± 0,0006	18,96 ± 1,96
Controlos positivos					
Ácido ascórbico	370,10 ± 27,98	93,84 ± 4,59	2,23 ± 0,05	0,8171 ± 0,44	-
Quercetina	-	-	0,21 ± 0,01	5,0540 ± 0,44	0,06 ± 0,01

IC₅₀ = concentração inibitória, *in vitro*, necessária para diminuir em 50% a quantidade de espécies reativas na amostra testada (média ± desvio-padrão).

($m_{amostra}/m_{Trolox}$) – rácio obtido pela razão entre o declive de cada uma das amostras em estudo e o declive obtido pelo Trolox.

n.d. Atividade não determinada para a concentração máxima testada de 1000 µg/mL.

Outra ERO envolvida em várias patologias, como por exemplo a indução de inflamações crónicas, é o ácido hipocloroso (66,89). De acordo com a Tabela 6, as decocções tiveram uma boa capacidade de captação do HOCl, apresentando baixos valores de IC₅₀, respetivamente, 15,50 µg/mL e 15,67 µg/mL para a decocção de *A. arguta* e a decocção de *A. deliciosa*. Por seu lado, as infusões apresentam valores elevados de IC₅₀, nomeadamente, 27,49 µg/mL para a *A. arguta* e 47,76 µg/mL para a *A. deliciosa*. Também é perceptível que a espécie *A. arguta* tem uma maior capacidade de captação de espécies de HOCl comparativamente à *A. deliciosa*.

O ensaio ORAC é um método rápido para determinar a capacidade de captação do radical ROO[•]. A sua metodologia baseia-se na inibição antioxidante pela oxidação induzida por uma sonda ao radical peroxilo, sendo estes radicais produzidos pela decomposição térmica de compostos azotados, como o AAPH (90). Os resultados apresentados na Tabela 6 indicam que a infusão de *A. arguta* é a mais eficiente, enquanto a sua decocção é a menos eficiente, tendo apresentado rácios de 0,0121 e de 0,0087, respetivamente. Quanto à espécie *A. deliciosa*, a decocção (rácio de 0,0114) demonstrou uma maior capacidade de captação comparativamente à infusão (rácio de 0,0103).

No que toca às ERA avaliou-se apenas a capacidade de captação do NO[•] (Tabela 6). A capacidade reativa das espécies de azoto pode implicar efeitos nefastos para a atividade de numerosas moléculas biológicas (66,91). A produção de ERA inicia-se pela produção de NO[•], sendo induzida pela óxido nítrico sintetase através da conversão de L-arginina em L-citrulina (91). A toxicidade está associada com os níveis de produção de óxido nítrico. Esta espécie reativa é responsável por várias doenças, particularmente aterosclerose, diabetes, cancro, asma, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (66,91). Neste ensaio, a infusão de *A. deliciosa*, curiosamente, demonstrou ser a amostra com maior capacidade de captação do NO[•] (IC₅₀ = 18,96 µg/mL). Foi também notório que o extrato de *A. deliciosa*, comparativamente aos diferentes extratos de *A. arguta*, é mais potente e eficaz, verificando-se que a infusão *A. deliciosa* > decocção *A. deliciosa* > decocção *A. arguta* > infusão *A. arguta*.

Pistón *et al.* avaliaram diferentes extratos de folhas de alcachofra (infusão, decocção e extrato hidroalcoólico) no que toca à capacidade de captação de ERO e ERA (66). Quanto à inibição do O₂^{•-}, os autores obtiveram resultados de IC₅₀ baixos, sendo o mais baixo encontrado na infusão com o valor de 34 µg/mL. Tal como no presente estudo, Pistón *et al.* também não encontraram atividade para os diferentes extratos contra o H₂O₂ (66). A avaliação da capacidade de captação do HOCl revelou bons resultados para os três extratos em estudo, com baixos IC₅₀, tendo o extrato mais eficiente sido a infusão (IC₅₀ = 3,7 µg/mL) (66). O ensaio do ORAC também revelou que a infusão era mais eficiente do

que os outros dois extratos em estudo. Os valores reportados por estes autores para a capacidade de captação do NO^* variaram entre 5,5 e 11,0 $\mu\text{g/mL}$ para a infusão e o extrato hidroalcoólico, respetivamente, sendo inferiores aos encontrados nas infusões e decocções de *A. arguta* e *A. deliciosa* (66).

Comparativamente ao estudo realizado por Almeida *et al.* em folhas de *A. arguta*, percebe-se que estas apresentam uma maior capacidade de captação para as espécies O_2^* , H_2O_2 e NO^* (92). Pelo contrário, a capacidade de captação da espécie HOCl foi mais eficiente nas infusões e decocções tanto de *A. arguta* como de *A. deliciosa*, uma vez que para os extratos de folhas de *A. arguta* os valores de IC_{50} variaram entre 82,33 e 137,50 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato aquoso e hidroalcoólico, respetivamente (92). Quanto ao ensaio ORAC, Almeida *et al.* não conseguiram determinar o valor de IC_{50} na concentração máxima testada (1000 $\mu\text{g/mL}$) (92).

3.6 Determinação do teor de vitamina C

A vitamina C é uma das vitaminas solúveis em água mais importante, estando particularmente presente em frutos e vegetais e sendo amplamente usada como aditivo alimentar e antioxidante (71,93). Esta vitamina é um antioxidante obtido através da dieta, sendo um cofactor essencial para muitas enzimas (71). A forma reduzida da vitamina C, o ácido L-ascórbico, é a principal forma ativa biológica desta vitamina e é um antioxidante eficaz devido ao seu alto poder de doação de eletrões e rápida conversão na forma ativa reduzida (71). Com efeito, a determinação da quantidade de vitamina C é de extrema importância para compreender o impacto da alimentação na saúde humana (71). A deteção simultânea do ácido L-ascórbico e do ácido desidroascórbico é complexa devido à baixa absorção do ácido desidroascórbico na zona do ultravioleta (72,94). Por isso, usualmente determina-se indiretamente, ou seja, pela diferença do teor de vitamina C total (obtida depois da redução do ácido desidroascórbico) e do teor de ácido L-ascórbico da amostra (72).

Os resultados de vitamina C (total), ácido ascórbico e de ácido desidroascórbico estão representados na Tabela 7. A Figura 17 representa alguns dos cromatogramas obtidos. Os diferentes extratos de *A. arguta* e de *A. deliciosa* foram analisados quanto à concentração total de vitamina C. Contudo, para a decocção e infusão de *A. arguta* não se obtiveram resultados, uma vez que o resultado foi inferior ao LOD (0,035 $\mu\text{g/mL}$). Para a espécie *A. deliciosa*, a infusão revelou um teor superior de vitamina C total

comparativamente à decocção. O teor de ácido ascórbico é também muito mais elevado na infusão.

Tabela 7 – Teores de vitamina C (total), ácido ascórbico e ácido desidroascórbico para a decocção e infusão de *A. deliciosa*.

Parâmetros	Vitamina C (Total) (mg/100 g)	Ácido ascórbico (mg/100 g)	Ácido desidroascórbico (mg/100 g)
<i>A. deliciosa</i>			
Decocção	422,5 ± 3,20	149,4 ± 0,18	273,0 ± 3,30
Infusão	770,5 ± 1,55*	485,5 ± 2,91*	285,0 ± 4,38

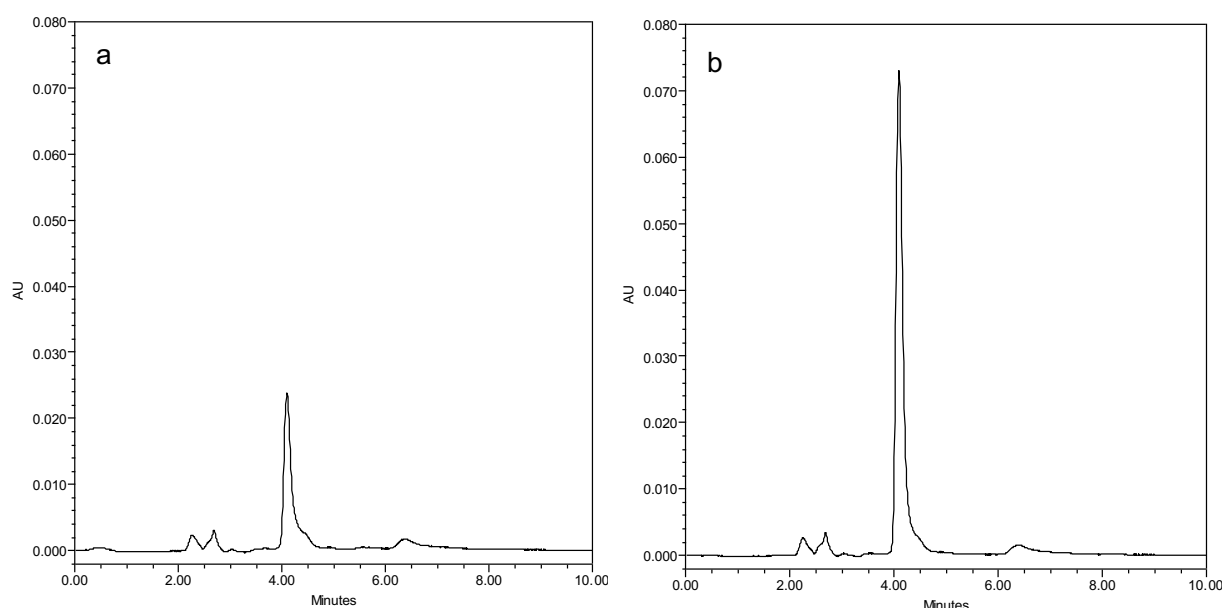


Figura 17 – Cromatogramas obtidos por HPLC para a decocção (a) e a infusão (b) de *A. deliciosa*.

A vitamina C é caracterizada pela sua degradação na preparação e no processamento de alimentos (95). Também está descrito que esta vitamina é bastante instável, pois oxida facilmente na presença de oxigénio, luz e iões pesados (23), bem como com o aumento da atividade da água (95). Além do mais, a vitamina C é termolábil (96). Com efeito, este comportamento pode-se visualizar nos resultados obtidos para a decocção, uma vez que o tempo de contacto e a temperatura à qual o fruto é submetido é superior. Não era de todo expetável não obter resultados para os extratos de *A. arguta*,

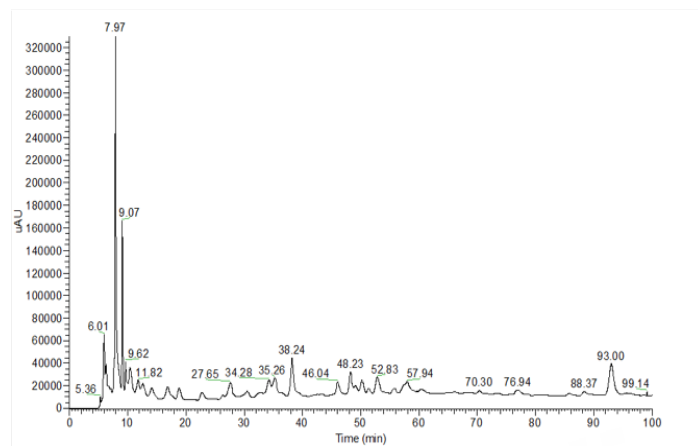
uma vez que está descrito que os valores de vitamina C neste fruto são superiores aos reportados para *A. deliciosa* (23). Contudo, tal facto pode dever-se à instabilidade da vitamina C, como anteriormente referido. Segundo Wojdyło *et al.*, os valores de vitamina C no frutos de *A. arguta* estão compreendidos entre 76,09 e 282,56 mg/100 g ff (24). Por seu lado, *A. deliciosa* apresenta valores na ordem dos 85 mg/100 g ff (27), consideravelmente inferiores ao encontrado neste estudo.

3.7 Determinação dos compostos fenólicos

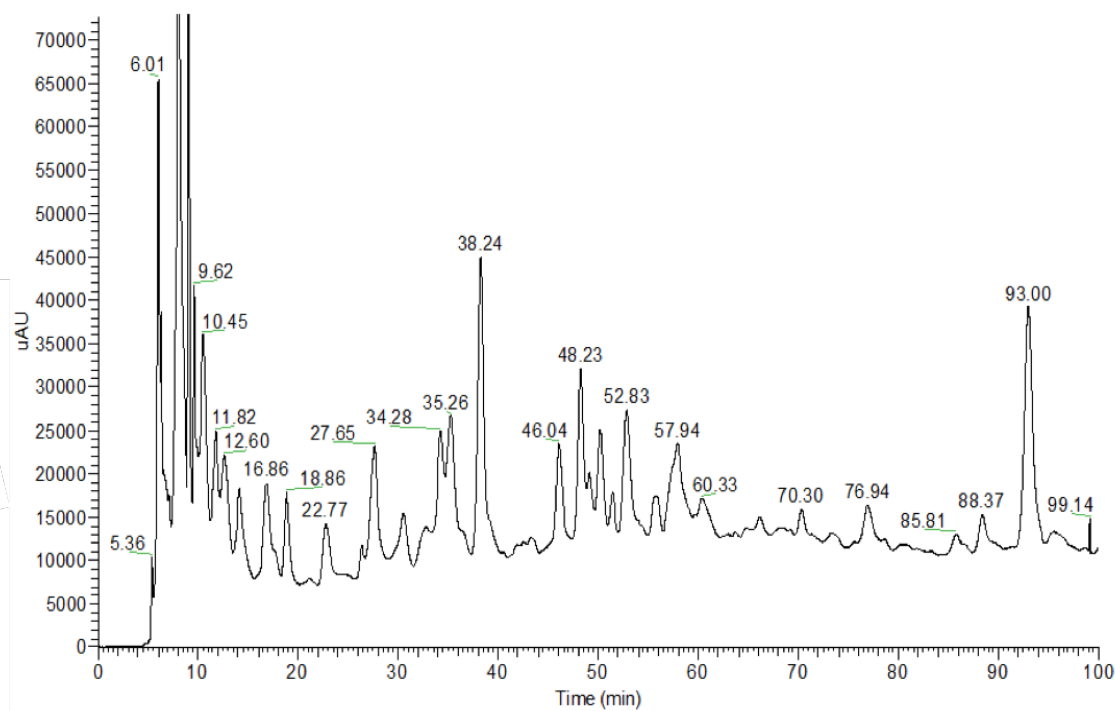
Os compostos fenólicos são metabolitos secundários das plantas que se revestem de importância para a qualidade nutricional e sensorial dos frutos, dos vegetais e de outras plantas (97,98). O perfil fenólico das plantas é diretamente influenciado por fatores extrínsecos e intrínsecos, como o estágio do desenvolvimento da planta ou as condições agronómicas e ambientais durante o crescimento, bem como a variabilidade genética (86,92). Das várias metodologias disponíveis, o HPLC é a preferencial para separar e quantificar os compostos fenólicos presentes nos frutos (98).

O perfil dos compostos fenólicos obtidos nas diferentes decocções e infusões de *A. arguta* e de *A. deliciosa* estão representados na Figura 18, e os resultados de validação dos parâmetros da metodologia de HPLC-DAD-MS utilizada encontram-se nas Tabelas 8 e 9.

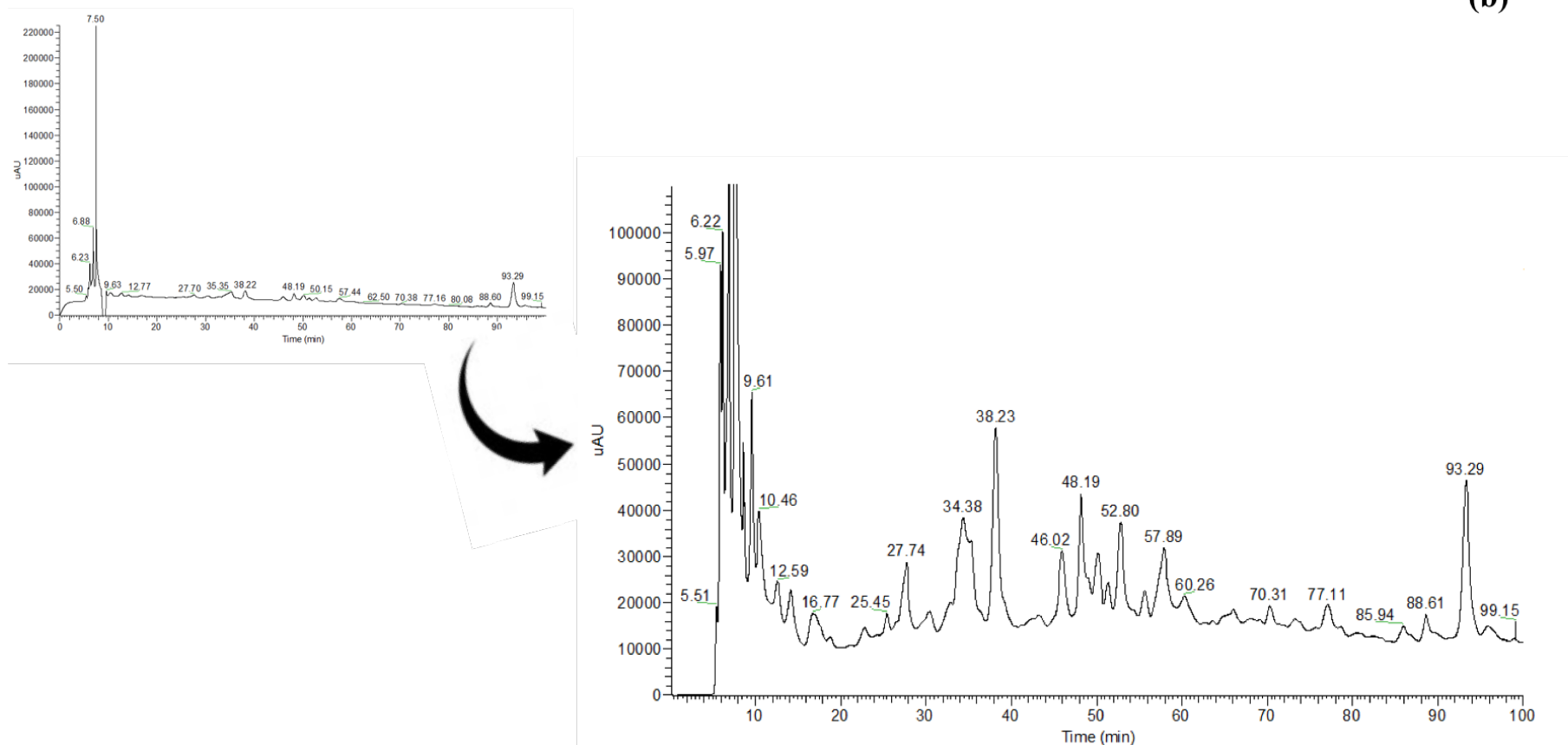
De acordo com a Figura 18 (a) e (b) é perceptível que os extratos de *A. arguta* apresentam maior variedade de compostos fenólicos na sua composição do que os extratos de *A. deliciosa*. Quanto à infusão e à decocção de *A. arguta*, estes são muito semelhantes em termos de composição, uma vez que em ambos os extratos é notória a presença de ácido quínico (Tr = 9,62 e 10,45 minutos), ácido *cis*-caftárico (Tr = 12,60 minutos), ácido cafeico e seus derivados (Tr = 27,65 e 34,28 minutos), cafeoil hexosídeo (Tr = 48,23 minutos), luteolina glucuronido (Tr = 57,94 minutos), derivados de quercetina (Tr = 85,81 minutos) e miricetina (Tr = 93,00 minutos) (Tabela 8). Contudo, existem compostos que estão presentes na decocção e não se encontram na infusão, como por exemplo o ácido cafeoilquínico (Tr = 35,26 minutos) (Figura 18 (a) e (b)). Por sua vez, as infusões e as decocções de *A. deliciosa* (Figura 18 (c) e (d)) são muito similares entre si, apresentando poucos compostos fenólicos na sua composição, nomeadamente o ácido quínico (Tr = 12,12 e 18,90 minutos), ácido cafeico (Tr = 27,79 minutos) e seus derivados e o cafeoil hexosídeo (Tr = 38,34 e 48,35 minutos) (Tabela 9).



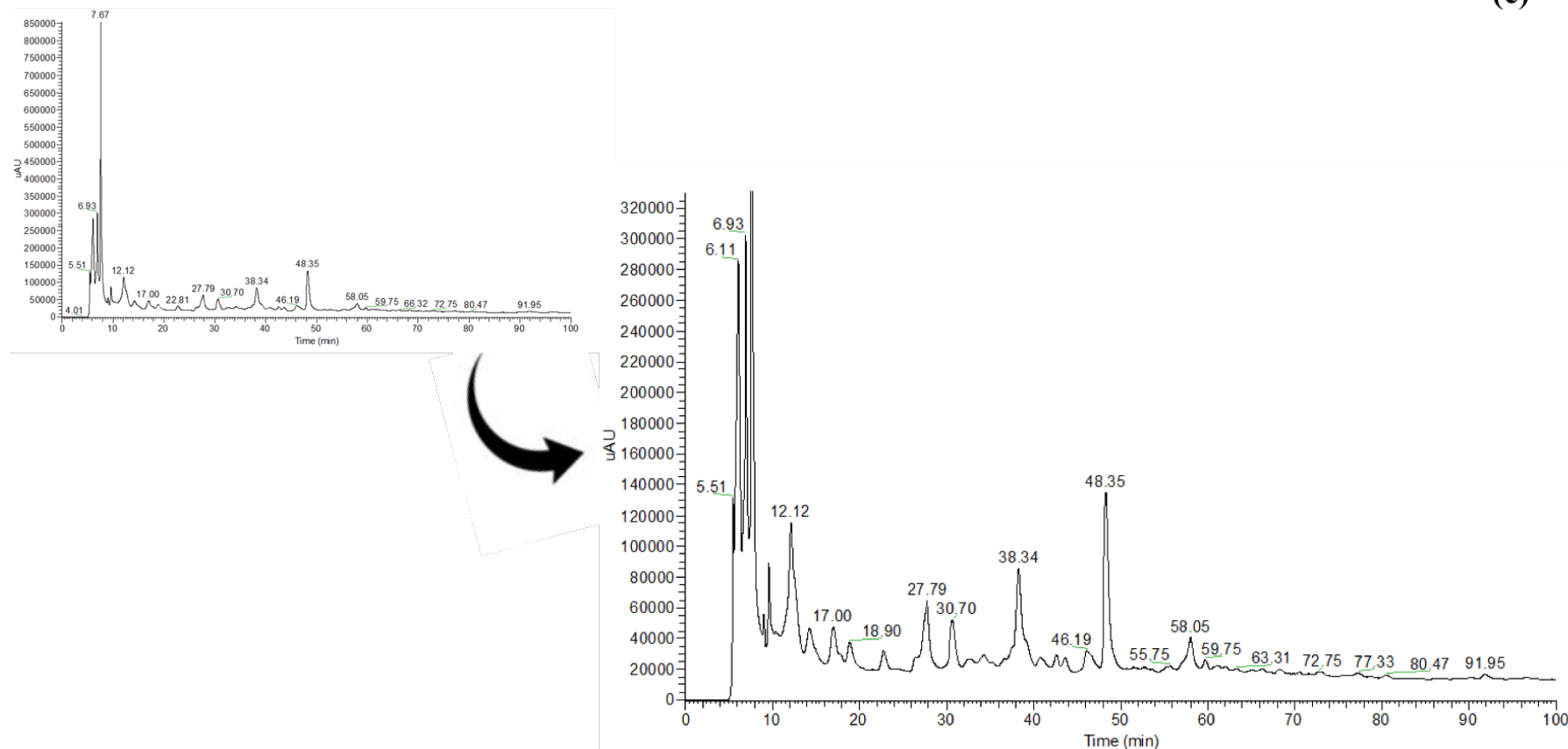
(a)



(b)



(c)



(d)

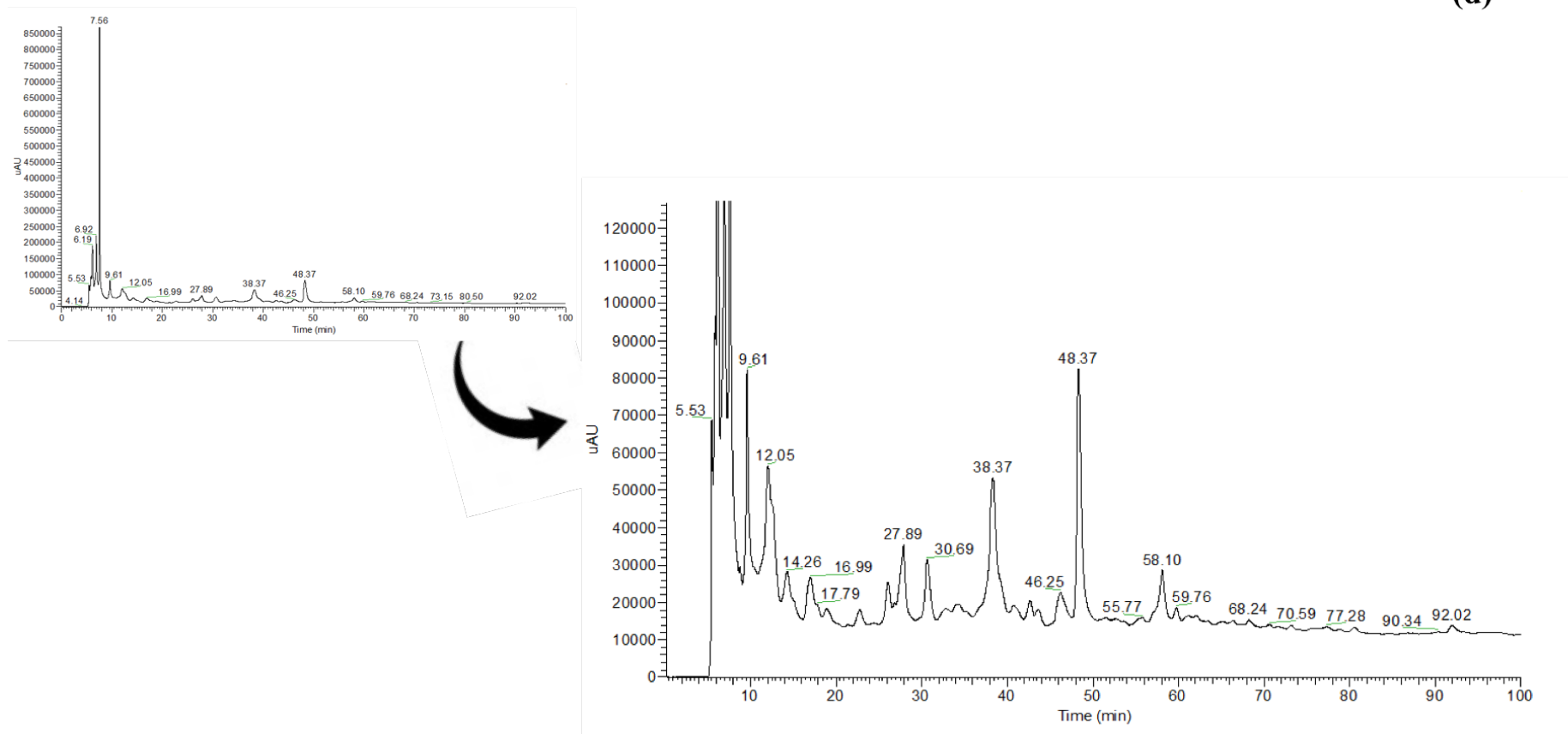


Figura 18 – Perfil cromatográfico dos compostos fenólicos obtidos por HPLC-MS (280 nm) de (a) decocções de *A. arguta*; (b) infusão de *A. arguta*; (c) decocções de *A. deliciosa*; (d) infusão de *A. deliciosa*. Condições cromatográficas: ver Tabela 4. A identificação e informação de pico está apresentada nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 – Compostos fenólicos identificados por HPLC-DAD-MS nas decocções e infusões de *A. arguta*.

Compostos fenólicos	Tr (min)	[MS]	MS ²	λ (nm)
Ácido quínico	9,62	191,25	111,20; 172,87	256; 328
	10,45	628,87		238; 271
Ácido <i>cis</i>-caftárico	12,60	311,27		232; 259
Ácido cafeico e seus derivados	27,65	563,14	341 (179)	247; 289
	30,50	373,07	312,93 (-60)	229; 253; 295
	34,28	753,33	591,24 (-162); 663,16 (-90)	280
Ácido cafeoilquínico	35,26	353,45	190,87 (-162)	325
	37,41	359,20	298,95 (-60)	
Cafeoil hexosídeo	48,23	341,20	179	253; 292; 316
Ácido cafeoilquínico	50,20	353,18	-	325
Quercetina-pentósido-hexosídeo	55,78	595,14	355,27(-240); 385,13 (-210); 475,00 (-120)	292
Luteolina glucurónido	57,94	461,22	400,93 (-60)	259; 289; 322
Derivados de quercetina	85,81	505,83	-	325
Rutina/ Q-3-ram-7-glc	88,37	609,25	300,16 (-309)	256; 295; 355
Luteolina hexosídeo				
Miricetina	93,00	463,28	301,07 (-162);	256; 355

Tabela 9 – Compostos fenólicos identificados por HPLC-DAD-MS nas decocções e infusões de *A. deliciosa*.

Compostos fenólicos	Tr (min)	[MS]	MS ²	λ (nm)
Ácido quínico	9,58	383,07	191,00 (111,13)	253; 328
	12,12	227,00	113,13	232; 256
	12,70	371,20	-	229; 259
	13,75	629	436,73 (-192)	
	18,90	6293	436,63 (332,73)	292
	22,78	401,13	295,13 (-1006)	280
Ácido cafeico e seus derivados	27,79	563,13	341,00 (179,07)	289
Cafeoil hexosídeo	38,34	341,40	179,13 (-162)	289; 316
	48,35	341,40	179,13 (135,19)	316
	58,19	341,40	179,13 (135,19)	
	61,22	475,13	415,05 (-60)	

Wojdyło *et al.* estudaram o perfil fenólico de 5 cultivares de *A. arguta* e de 2 cultivares de *A. deliciosa* (24). Os autores conseguiram quantificar alguns compostos fenólicos, particularmente derivados de quercetina e kaempferol, ácido quínico, ácido-O-hexosídeo cafeico, ácido neoclorogénico, cafeoil hexosídeo e ácido clorogénico. Neste estudo, como quantificaram os compostos fenólicos, foi também perceptível que a espécie *A. arguta*, principalmente a variedade Issai, apresenta uma maior quantidade destes compostos.

Por seu lado, Park *et al.* avaliaram a composição de diferentes cultivares do fruto do kiwi (*A. chinensis*) reportando a presença de ácidos fenólicos, nomeadamente ácido protocatecuico, *p*-hidroxibenzóico, cafeico, vanílico, ferúlico e anísico (99).

No estudo realizado por Almeida *et al.* em folhas de *A. arguta*, os autores identificaram e quantificaram os compostos fenólicos dos diferentes extratos em estudo (aquoso, hidroalcoólico e alcoólico), tendo sido possível identificar derivados do ácido cafeico, catequina, ácido clorogénico, derivados de quercetina e derivados de kaempferol (92). O extrato alcoólico foi o que revelou uma maior quantidade de compostos fenólicos.

3.8 Viabilidade celular

As linhas celulares Caco-2 e HT29-MTX são frequentemente utilizadas como modelos intestinais para avaliar o efeito provocado na viabilidade celular por novos ingredientes. Esta seleção de linhas celulares assenta no facto de ser no intestino delgado que ocorre a maior parte da absorção dos compostos bioativos (89). Segundo Lea, a linha celular Caco-2 pode fornecer informações importantes sobre as propriedades biológicas e bioquímicas da barreira da mucosa intestinal, bem como sobre o comportamento desta barreira na absorção de medicamentos e compostos dietéticos utilizados na indústria farmacêutica e alimentar (75). A morfologia e as características funcionais desta linhagem celular são muito similares à dos enterócitos (Figura 19), nomeadamente nas “*tight junctions*”, nas laterais apicais e basolaterais e na presença de microvilosidades na superfície apical (100).

De forma a simular a absorção intestinal *in vitro*, ou seja, a reproduzir o epitélio intestinal humano, vários investigadores apontam a utilização conjunta de linhas celulares de Caco-2 e HT29-MTX (89,92,101). A linha celular HT29-MTX está indicada para estudar a digestão e a biodisponibilidade de compostos alimentares (76). O muco produzido por esta linha celular é utilizado como modelo de estudo da importância do muco no transporte de vários compostos no trato intestinal (101).

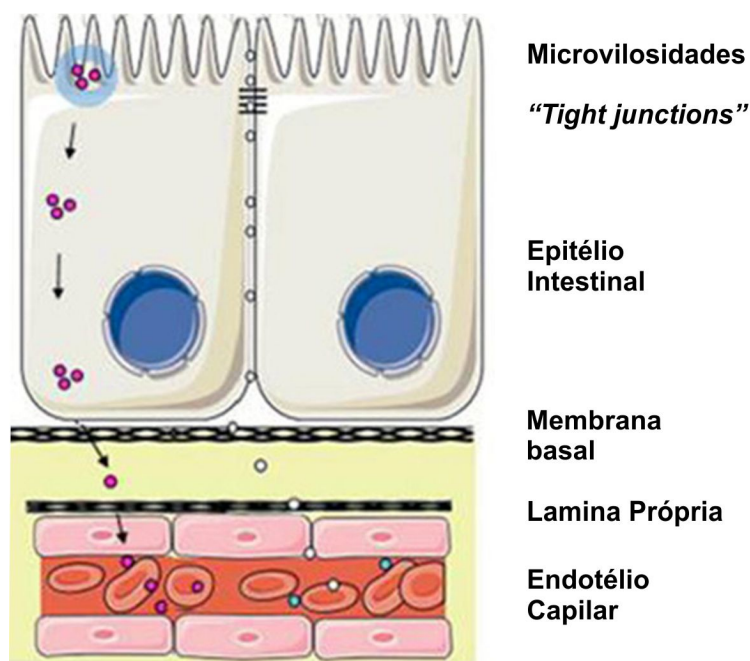


Figura 19 – Esquemática de um enterócito. Barreira física do epitélio intestinal onde se dá a passagem dos produtos desde o lúmen intestinal até à lâmina própria, passando pela membrana basal. Adaptado de Lozoya-Agullo (101).

Como anteriormente referido, os efeitos dos diferentes extratos de *A. arguta* e de *A. deliciosa* na viabilidade celular foram avaliados nas linhas celulares Caco-2 e na HT29-MTX nas concentrações de 0,1 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, através da metodologia MTT. Este método determina a disrupção da função bioquímica, quantificando a atividade mitocondrial pela redução do MTT através da enzima succinato desidrogenase (77,78). Por sua vez, o método LDH é utilizado para avaliar a citotoxicidade, avaliando a presença no meio extracelular da enzima lactato desidrogenase.

De acordo com os resultados obtidos (Figura 20 e 21), as infusões e as decocções de ambas as espécies não provocaram um decréscimo na viabilidade celular de Caco-2 e de HT29-MTX, verificando-se uma viabilidade acima de 100 % para todas as concentrações testadas.

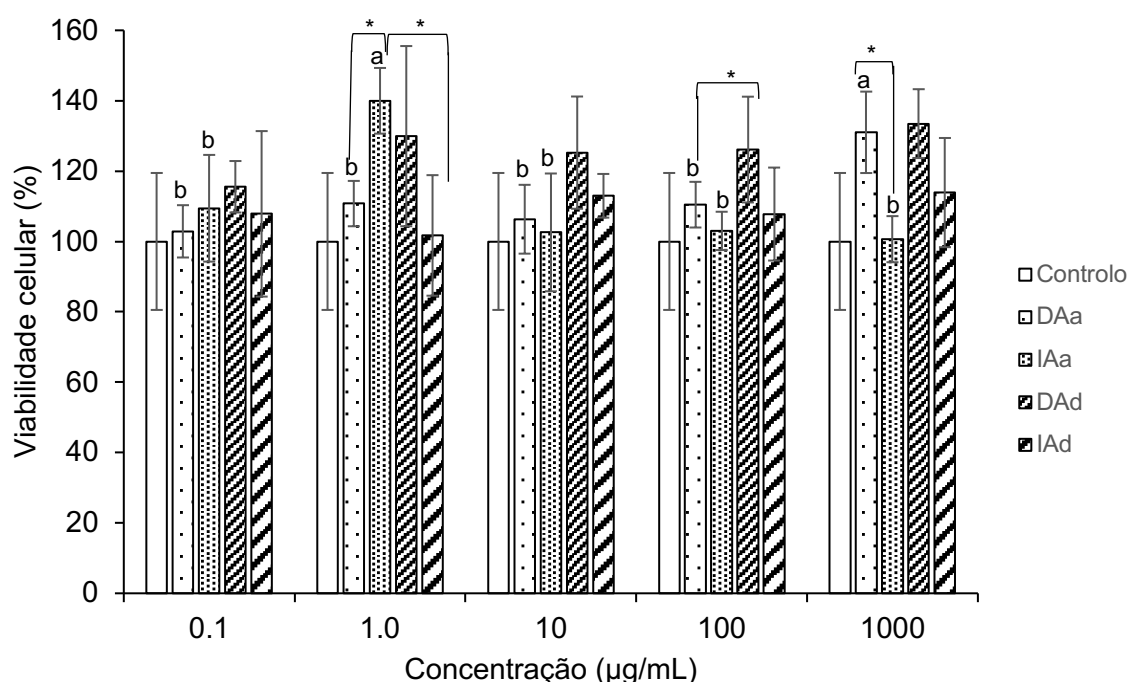


Figura 20 – Efeito da exposição às decocções e infusões de *A. arguta* e *A. deliciosa* em diferentes concentrações na viabilidade celular de Caco-2, através do ensaio de MTT. Os valores expressam a média $\pm$ DP. Diferentes letras (a, b, c, d) na mesma amostra representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos nas diferentes concentrações. * exprime diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes amostras para a mesma concentração.

A análise estatística mostrou que não existem diferenças significativas ($p > 0,05$) para as duas amostras de *A. deliciosa* para a linha celular Caco-2 (Figura 20). Quanto à decocção de *A. arguta*, a concentração que apresentou diferenças significativas foi a de 1000 µg/mL. Já na infusão, a concentração de 1 µg/mL demonstrou diferenças significativas ($p < 0,05$) perante as outras concentrações em estudo. A análise estatística da mesma concentração para as diferentes amostras revelou diferenças entre a decocção e infusão de *A. arguta*, bem como entre a infusão de *A. arguta* e a infusão de *A. deliciosa*. Também na concentração de 100 µg/mL as decocções das diferentes espécies mostraram ser significativamente diferentes ($p < 0,05$). Identicamente, na concentração de 1000 µg/mL os dois métodos extrativos de *A. arguta* revelaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

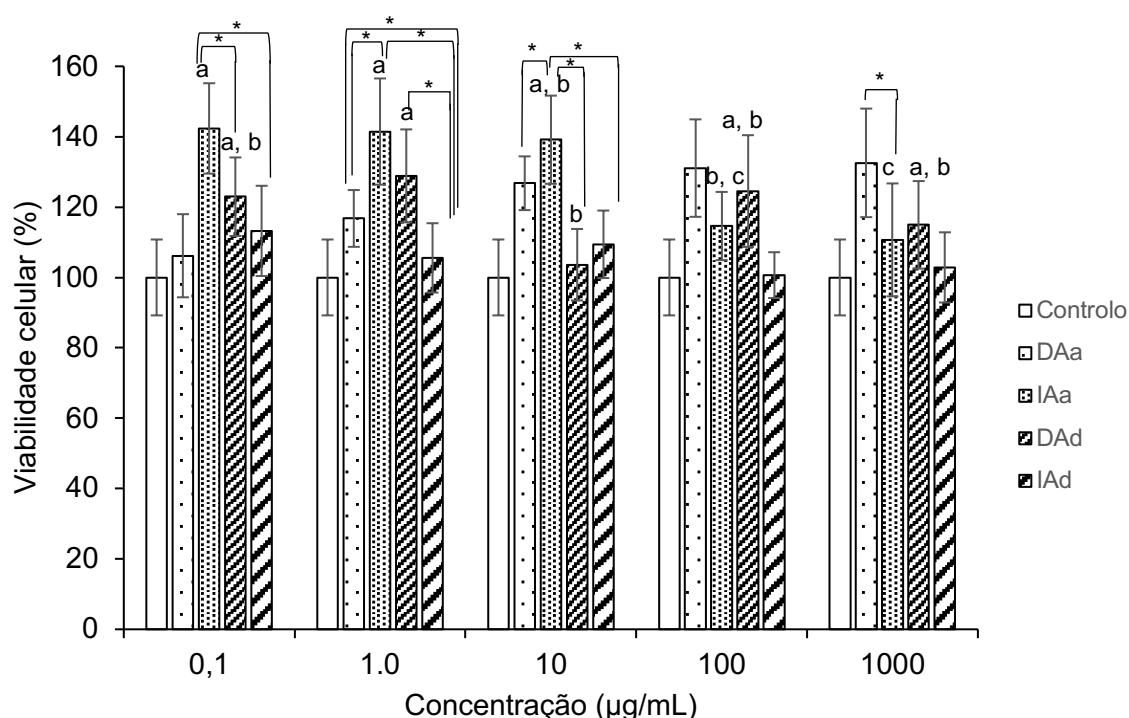


Figura 21 – Efeito da exposição às decocções e infusões de *A. arguta* e *A. deliciosa* em diferentes concentrações na viabilidade celular de HT29-MTX, através do ensaio de MTT. Os valores expressam a média $\pm$ DP. Diferentes letras (a, b, c, d) na mesma amostra representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos nas diferentes concentrações. * exprime diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes amostras para a mesma concentração.

Por sua vez, a análise estatística à linhagem celular HT29-MTX (Figura 21) demonstrou que para a decocção de *A. arguta* e para a infusão de *A. deliciosa* não existem diferenças significativas entre as concentrações analisadas ($p > 0,05$). A infusão de *A. arguta* não apresentou diferenças entre a concentração de 0,1, 1 e de 10 µg/mL, nem entre a de 10 µg/mL e a de 100 µg/mL, bem como entre a de 100 µg/mL e a de 1000 µg/mL. Nas diferentes concentrações de *A. deliciosa* as que apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) foram a de 1 µg/mL e a de 10 µg/mL. Quanto à análise por concentração testada, verificou-se que na concentração de 0,1 µg/mL a decocção de *A. arguta* mostrou ser significativamente diferente da decocção e da infusão de *A. deliciosa*. Para a concentração de 1 µg/mL, a infusão de *A. deliciosa* revelou diferenças significativas para todas as amostras em estudo e a decocção de *A. arguta* também apresentou diferenças para a infusão da mesma espécie. Para a concentração de 10 µg/mL, a infusão de *A. arguta* é significativamente diferente das outras três amostras. Já na concentração de 1000 µg/mL, verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a decocção e a infusão de *A. arguta*.

Também pelo ensaio de LDH foi perceptível que nenhuma das amostras provocou toxicidade nas linhagens celulares utilizadas, uma vez que os resultados obtidos foram

negativos para todas as concentrações avaliadas, o que era expectável tendo em conta os resultados de viabilidade celular.

Almeida *et al.* avaliaram o efeito dos diferentes extratos de folhas de *A. arguta* na viabilidade celular, selecionando igualmente as linhas celulares intestinais Caco-2 e HT29-MTX (92). De acordo com os resultados obtidos, os autores não verificaram um decréscimo na viabilidade celular de Caco-2 em todas as concentrações testadas do extrato aquoso (0,1 – 1000 µg/mL). Porém, a mesma linha celular exposta aos extratos hidroalcoólico e alcoólico teve uma diminuição na viabilidade celular para a concentração de 1000 µg/mL de 58% e 60%, respetivamente. Quanto à linha celular HT29-MTX, os autores não verificaram nenhum decréscimo da viabilidade celular para qualquer um dos extratos (92). Deste modo, é possível compreender que o comportamento das folhas em extrato aquoso é muito similar ao que acontece nas infusões e decocções do mesmo fruto, não se verificando toxicidade nas células intestinais.

4. Conclusão

O trabalho realizado pretendeu valorizar os frutos de *A. arguta* e de *A. deliciosa* que não apresentam características para serem aceites para comercialização. Juntamente com a procura e o interesse atual dos consumidores por infusões e decocções, pretendeu-se preparar e caracterizar infusões e decocções de frutos desidratados de ambas as espécies.

A avaliação global deste trabalho permitiu concluir que as infusões e decocções de *A. arguta* e de *A. deliciosa* apresentam um teor elevado de flavonoides e de compostos fenólicos, demonstrando também uma elevada atividade antioxidante. Contudo, a decocção de *A. arguta* revelou uma melhor evidência desta propriedade. Similarmente, foi compreensível que os extratos de *A. arguta* apresentavam uma maior variedade de compostos fenólicos na sua composição. No que diz respeito à vitamina C, a infusão de *A. deliciosa* foi a que demonstrou um maior teor.

As ERO e as ERA estão associadas ao stresse oxidativo e estas bebidas revelaram uma capacidade notável para diferentes espécies. De modo particular, as decocções das duas espécies apresentaram uma boa capacidade de captação do HOCl e do NO*.

O objetivo do trabalho passou também pela avaliação dos diferentes extratos de *A. arguta* e de *A. deliciosa* em duas linhagens celulares intestinais de modo a comprovar a ausência de efeitos nefastos na viabilidade celular, o que foi comprovado até à concentração de 1000 µg/mL.

O estudo e o desenvolvimento de novas infusões e decocções usando o *baby kiwi* e o fruto do kiwi desidratados pode assim tornar-se uma garantia de sucesso, aliada a uma forma sustentável de reduzir desperdícios.

Numa perspetiva futura e de continuidade do presente trabalho, deverão ser tidas em conta a realização de análises sensoriais das decocções e das infusões para perceber as preferências do mercado e do consumidor. Seria também interessante efetuar um *scale-up* industrial de modo a averiguar a viabilidade do processo a larga escala.

5. Referências bibliográficas

1. FAO. Sustainability Pathways - We make the path by walking. 2016 [acedido em 06/04/2017]. Disponível em: <http://www.fao.org/nr/sustainability/home/en/>
2. Hyperion Fund. How can sustainable development be achieved? - Quora. Quora. 2015 [acedido em 17/10/2017]. 2007. Disponível em: <https://www.quora.com/How-can-sustainable-development-be-achieved>
3. Corsin F, Funge-Smith S, Clausen J. A qualitative assessment of standards and certification schemes applicable to aquaculture in the Asia-Pacific region. RAP Publication, FAO; 2007.
4. Alexandratos N, Bruinsma J. World agriculture towards 2030/2050: The 2012 revision. ESA Working paper Rome, FAO; 2012.
5. Sibbel A. The sustainability of functional foods. *Soc Sci Med*. 2007; 64 (3): 554–61.
6. Bacchetta L, Visioli F, Cappelli G, Caruso E, Martin G, Nemeth E, Van Raamsdonk L. A manifesto for the valorization of wild edible plants. *J Ethnopharmacol* 2016; 191: 180-187.
7. Dempewolf H, Eastwood RJ, Guarino L, Khoury CK, Muller J V, Toll J. Adapting agriculture to climate change: A global initiative to collect, conserve, and use crop wild relatives. *Agroecol Sustain Food Syst* 2014; 38: 369–77.
8. Spiertz H. Food production, crops and sustainability: Restoring confidence in science and technology. *Curr Opin Environ Sustain* 2010; 2 (5-6): 439–443.
9. Vinceti B, Termote C, Ickowitz A, Powell B, Kehlenbeck K, Hunter D. The contribution of forests and trees to sustainable diets. *Sustainability* 2013; 5 (11): 4797–4824.
10. Jamnadass RH, Dawson IK, Franzel S, Leakey RRB, Mithöfer D, Akinifesi FK, et al. Improving livelihoods and nutrition in sub-Saharan Africa through the promotion of indigenous and exotic fruit production in smallholders' agroforestry systems: A review. *Int For Rev*. 2011; 13 (3): 338–54.
11. Johns T, Sthapit BR. Biocultural diversity in the sustainability of developing country food systems. *Food Nutr Bull* 2004; 25 (2): 13.
12. Shumsky S, Hickey GM, Johns T, Pelletier B, Galaty J. Institutional factors affecting wild edible plant (WEP) harvest and consumption in semi-arid Kenya. *Land Use Policy* 2014; 38: 48–69.
13. FAO. Global food losses and food waste - Extent, causes and prevention. *Save food: An initiative on food loss and waste reduction*. 2011. p. 37.
14. Baptista P, Campos I, Pires I, Vaz S. Do Campo ao Garfo. *Desperdício Alimentar em Portugal*. Vol. 53, Cestras. Lisboa: Cestras; 2012. p. 1689-1699

15. Comissão Europeia. Regulamento de Execução (UE) N. 543/2011 de 7 de Junho de 2011, que estabelece regras de execução do Regulamento (CE) n. 1234/2007 do Conselho nos sectores das frutas e produtos hortícolas e das frutas e produtos hortícolas transformados. Vol. II, Jornal Oficial da União Europeia 2011. p. 157.
16. Latocha P, Łata B, Stasiak A. Phenolics, ascorbate and the antioxidant potential of kiwiberry vs. common kiwifruit: The effect of cultivar and tissue type. *J Funct Foods* 2015; 19: 155–63.
17. Turner NJ, Łuczaj ŁJ, Migliorini P, Pieroni A, Dreon AL, Sacchetti LE, et al. Edible and tended wild plants, Traditional Ecological Knowledge and Agroecology. *CRC Crit Rev Plant Sci* 2011; 30(937060902): 198–225.
18. Tardío J, De Cortes Sánchez-Mata M, Morales R, Molina M, García-Herrera P, Morales P, et al. Ethnobotanical and food composition monographs of selected mediterranean wild edible plants. In: *Mediterranean Wild Edible Plants: Ethnobotany and Food Composition Tables*. Springer New York 2016. p. 273–470.
19. Popkin BM. The nutrition transition and its health implications in lower-income countries. *Public Health Nutr*. Cambridge Univ Press 1998; 1 (01): 5–21.
20. Batal M, Hunter E. Traditional Lebanese recipes based on wild plants: An answer to diet simplification? *Food Nutr Bull* 2007; 28: S303–11.
21. Aberoumand A, Deokule SS. Determination of elements profile of some wild edible plants. *Food Anal Methods* 2009 Jun; 2 (2): 116–9.
22. Amirul Alam M, Juraimi AS, Rafii MY, Hamid AA, Kamal Uddin M, Alam MZ, et al. Genetic improvement of Purslane (*Portulaca oleracea* L.) and its future prospects. *Mol Biol Rep* 2014; 41 (11): 7395–411.
23. Latocha P. The Nutritional and Health Benefits of Kiwiberry (*Actinidia arguta*) – A review. *Plant Foods Hum Nutr* 2017; 1–10.
24. Wojdyło A, Nowicka P, Oszmiański J, Golis T. Phytochemical compounds and biological effects of *Actinidia* fruits. *J Funct Foods* 2017; 30: 194–202.
25. Fisk CL, McDaniel MR, Strik BC, Zhao Y. Physicochemical, sensory, and nutritive qualities of hardy kiwifruit (*Actinidia arguta* 'Ananasnaya') as affected by harvest maturity and storage. *J Food Sci* 2006; 71 (3): S204–10.
26. Matich AJ, Young H, Allen JM, Wang MY, Fielder S, McNeillage MA, et al. *Actinidia arguta*: Volatile compounds in fruit and flowers. *Phytochemistry* 2003; 63 (3): 285–301.
27. Ferguson AR, Ferguson LR. Are kiwifruit really good for you? *Acta Hort* 2003; 610: 131–8.

28. Latocha P, Krupa T, Wołosiak R, Worobiej E, Wilczak J. Antioxidant activity and chemical difference in fruit of different *Actinidia* sp. *Int J Food Sci Nutr* 2010. p.381-94.
29. Nishiyama I, Fukuda T, Shimohashi A, Oota T. Sugar and organic acid composition in the fruit juice of different *Actinidia* varieties. *Food Sci Technol Res* 2008; 14 (1): 67–73.
30. Leontowicz M, Leontowicz H, Jesion I, Bielecki W, Najman K, Latocha P, et al. *Actinidia arguta* supplementation protects aorta and liver in rats with induced hypercholesterolemia. *Nutr Res* 2016; 36 (11): 1231–42.
31. Nishimura M, Okimasu Y, Miyake N, Tada M, Hida R, Negishi T, et al. Inhibitory effect of *Actinidia arguta* on mutagenesis, inflammation and two-stage mouse skin tumorigenesis. *Genes Environ* 2016; 38 (1): 25.
32. Li Y, Zhang J-J, Xu D-P, Zhou T, Zhou Y, Li S, et al. Bioactivities and health benefits of wild fruits. *Int J Mol Sci* 2016; 17 (8).
33. Ferreira ICFR, Abreu RM V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise* 2007; 2: 32–9.
34. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39 (1): 44–84.
35. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol* 1990; 186 (1981): 1–85.
36. Moon J, Shibamoto T. Antioxidant assays for plant and food components. *J Agric Food Chem* 2009; 57:1655–66.
37. Carocho M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol* 2013; 51: 15–25.
38. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Ver* 2002; 82: 47–95.
39. Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors* 1997; 6 (4): 391–397.
40. Fu L, Xu BT, Xu XR, Qin XS, Gan RY, Li H Bin. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 wild fruits from South China. *Molecules* 2010; 15 (12): 8602–17.
41. Kozarski M, Klaus A, Jakovljevic D, Todorovic N, Vunduk J, Petrović P, et al. Antioxidants of edible mushrooms. *Molecules* 2015; 20 (10): 19489–525.

42. Moo-Huchin VM, Moo-Huchin MI, Estrada-León RJ, Cuevas-Glory L, Estrada-Mota IA, Ortiz-Vázquez E, et al. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chem* 2015; 166: 17–22.
43. He FJ, Nowson CA, MacGregor GA. Fruit and vegetable consumption and stroke: Meta-analysis of cohort studies. *Lancet* 2006; 367 (9507): 320–326.
44. Guimarães R, Barros L, Dueñas M, Carvalho AM, Queiroz MJRP, Santos-Buelga C, et al. Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. *Food Chem* 2013; 141 (4): 3721–3730.
45. López V, Akerreta S, Casanova E, García-Mina JM, Cavero RY, Calvo MI. *In vitro* antioxidant and anti-rhizopus activities of lamiaceae herbal extracts. *Plant Foods Hum Nutr* 2007; 62 (4): 151–155.
46. Biesalski HK, Dragsted LO, Elmadfa I, Grossklaus R, Müller M, Schrenk D, et al. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition* 2009; 25 (11–12): 1202–1205.
47. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Phenols, polyphenols and tannins: An overview. In: Crozier A, Clifford MN, Ashihara H, editors. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell Publishing Ltd. 2006. p. 1–24.
48. Leonov A, Arlia-Ciommo A, Piano A, Svistkova V, Lutchman V, Medkour Y, et al. Longevity extension by phytochemicals. *Molecules* 2015; 20 (4): 6544–72.
49. Muhammad A, Tel-Cayan G, Öztürk M, Nadeem S, Duru ME, Anis I, et al. Biologically active flavonoids from *Dodonaea viscosa* and their structure–activity relationships. *Ind Crops Prod* 2015; 78: 66–72.
50. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim Nova* 2007; 30 (2): 374–81.
51. Philippi ST. Pirâmide dos alimentos: fundamentos básicos da nutrição. Editora Manole 2015.
52. Strack D. Phenolic metabolism. In: Dey PM, Harborne JB, editors. *Plant biochemistry*. 1 st. London: Academic Press 1997. p. 387–417.
53. Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr Am Soc Nutrition* 2003; 133 (10): 3248S–3254S.
54. Harnly JM, Doherty RF, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Bhagwat S, et al. Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *J Agric Food Chem* 2006; 54 (26): 9966–9977.

55. Koes RE, Quottrochhio F, Mol JNM. Flavonoid Biosynthesis. *BioEssays* 1994; 16 (2): 123–32.
56. Vinatoru M, Mason TJ, Calinescu I. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *Trends Anal Chem* 2017; 97: 159–78.
57. Chang K. World tea production and trade - Current and future development. *Food Agric Organ* 2015.
58. THIE - Tea & Herbal Infusions Europe. Tea and herbal infusions – Variety by nature. [acedido em 18/01/2018]. Disponível em: <http://www.thie-online.eu/>
59. Morais ALF. Propriedades antioxidantes de bebidas e chás preparados a partir de diferentes formulações [dissertação de Mestrado em Controlo de Qualidade]. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2011.
60. Ribeiro LMGA. Avaliação do comportamento de consumo de infusões: um estudo exploratório baseado na etnografia visual [dissertação de Mestrado em Ciências do Consumo e Nutrição]. Universidade do Porto; 2015.
61. Guimarães R, Barros L, Carvalho AM, Ferreira ICFR. Infusions and decoctions of mixed herbs used in folk medicine: Synergism in antioxidant potential. *Phyther Res* 2011; 25 (8): 1209–1214.
62. Katarina Š, Zduni G, Jankovi T, Go D, Stanojkovi T, Pljevljaku D. Berry fruit teas: Phenolic composition and cytotoxic activity. *Food Res Int* 2014; 62: 677–683.
63. Pinto D, Braga N, Rodrigues F. *Castanea sativa* Bur : An undervalued by-product but a promising cosmetic ingredient. *Cosmetics* 2017; 4 (50): 1–15.
64. Moreira TCM. Valorização de *Calluna vulgaris* (L.) Hull como potencial ingrediente cosmético [dissertação de Mestrado em Controlo de Qualidade]. Universidade do Porto; 2016.
65. Rodrigues F, Palmeira-de-Oliveira A, das Neves J, Sarmiento B, Amaral MH, Oliveira MB. Medicago spp. extracts as promising ingredients for skin care products. *Ind Crops Prod* 2013; 49: 634–44.
66. Pistón M, Machado I, Branco CS, Cesio V, Heinzen H, Ribeiro D, et al. Infusion, decoction and hydroalcoholic extracts of leaves from artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *cardunculus*) are effective scavengers of physiologically relevant ROS and RNS. *Food Res Int* 2014; 64: 150–156.
67. Chisté RC, Mercadante AZ, Gomes A, Fernandes E, Lima JLFDC, Bragagnolo N. *In vitro* scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chem* 2011; 127 (2): 419–426.

68. Boeing JS, Ribeiro D, Chisté RC, Visentainer JV, Costa VM, Freitas M, et al. Chemical characterization and protective effect of the *Bactris setosa* Mart. fruit against oxidative/nitrosative stress. *Food Chem* 2017; 220: 427–437.
69. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 2001; 49 (10): 4619–4626.
70. Gomes A, Fernandes E, Silva AMS, Santos CMM, Pinto DCGA, Cavaleiro JAS, et al. 2-Styrylchromones: Novel strong scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. *Bioorganic Med Chem* 2007; 15 (18): 6027–6036.
71. Valente A, Albuquerque TG, Sanches-Silva A, Costa HS. Ascorbic acid content in exotic fruits: A contribution to produce quality data for food composition databases. *Food Res Int* 2011; 44 (7): 2237–2242.
72. Albuquerque TG, Santos F, Sanches-Silva A, Oliveira MBPP, Bento AC, Costa HS. Nutritional and phytochemical composition of *Annona cherimola* Mill. fruits and by-products: Potential health benefits. *Food Chem* 2016; 193: 187–195.
73. Henriques J, Ribeiro MJ, Falé PL, Pacheco R, Ascensão L, Florêncio MH, et al. Valorization of kiwifruit production: leaves of the pruning branches of *Actinidia deliciosa* as a promising source of polyphenols. *Eur Food Res Technol* 2017; 243 (8): 1343–1353.
74. Fernandes A, Fernandes I, Cruz L, Mateus N, Cabral M, De Freitas V. Antioxidant and biological properties of bioactive phenolic compounds from *Quercus suber* L. *J Agric Food Chem* 2009; 57 (23): 11154–11160.
75. Lea T. Caco-2 cell line. In: The impact of food bioactives on health: *In vitro* and *ex vivo* models. 1st ed. Spain: Springer, Cham 2015. p. 103–111.
76. Martínez-Maqueda D, Miralles B, Recio I. HT29 cell line. In: The impact of food bioactives on health: *In vitro* and *ex vivo* models. 1st ed. Spain: Springer, Cham 2015. p. 113–124.
77. Lobner D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: Validity for neuronal apoptosis? *J Neurosci Methods* 2000; 96 (2): 147–152.
78. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 2006; 160 (2): 171–177.
79. Rodrigues F, Gaspar C, Palmeira-De-Oliveira A, Sarmiento B, Amaral MH, Oliveira MBPP. Application of Coffee Silverskin in cosmetic formulations: Physical / antioxidant stability studies and cytotoxicity effects. *Drug Dev Ind Pharm* 2016; 42

- (1): 99–106.
80. Reddy A, Norris DF, Momeni SS, Waldo B, Ruby JD. The pH of beverages in the United States. *J Am Dent Assoc* 2016; 147 (4): 255–263.
 81. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 1999; 299: 152–78.
 82. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 2005; 53 (10): 4290–4302.
 83. Pereira CG, Barreira L, da Rosa Neng N, Nogueira JMF, Marques C, Santos TF, et al. Searching for new sources of innovative products for the food industry within halophyte aromatic plants: *In vitro* antioxidant activity and phenolic and mineral contents of infusions and decoctions of *Crithmum maritimum* L. *Food Chem Toxicol* 2017; 107: 581–589.
 84. Shaghaghi M, Manzoori JL, Jouyban A. Determination of total phenols in tea infusions, tomato and apple juice by terbium sensitized fluorescence method as an alternative approach to the Folin–Ciocalteu spectrophotometric method. *Food Chem* 2008; 108 (2): 695–701.
 85. Chen AY, Chen YC. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chem* 2013; 138 (4): 2099–2107.
 86. Rodrigues F, Santos J, Pimentel FB, Braga N. Promising new applications of *Castanea sativa* shell: nutritional composition, antioxidant activity, amino acids and vitamin E profile. *Food Funct* 2015; 6: 2854–2860.
 87. Kesić A, Ibrišimović-Mehmedinović N, Šestan A. Phytochemical profile of honey. In: phytochemicals-isolation, Characterisation and role in human health. InTech; 2015.
 88. Lv HP, Zhang Y, Shi J, Lin Z. Phytochemical profiles and antioxidant activities of Chinese dark teas obtained by different processing technologies. *Food Res Int* 2017; 100: 486–493.
 89. de Francisco L, Pinto D, Rosseto H, Toledo L, Santos R, Tobaldini-Valério F, et al. Evaluation of radical scavenging activity, intestinal cell viability and antifungal activity of *Brazilian propolis* by-product. *Food Res Int* 2018; 105: 537–47.
 90. Mellado-Ortega E, Zabalgogezcoa I, Vázquez de Aldana BR, Arellano JB. Solutions to decrease a systematic error related to AAPH addition in the fluorescence-based ORAC assay. *Anal Biochem* 2017; 519: 27–29.
 91. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and

- p>disease.
- Physiol Rev*
- 2007; 87 (1): 315–424.
92. Almeida D, Pinto D, Santos J, Vinha AF, Palmeira J, Ferreira HN, et al. Hardy kiwifruit leaves (*Actinidia arguta*): An extraordinary source of value-added compounds for food industry. *Food Chem* 2018; 259: 113–21.
 93. Pénicaud C, Peyron S, Bohuon P, Gontard N, Guillard V. Ascorbic acid in food: Development of a rapid analysis technique and application to diffusivity determination. *Food Res Int* 2010; 43 (3): 838–847.
 94. Spínola V, Mendes B, Câmara JS, Castilho PC. An improved and fast UHPLC-PDA methodology for determination of L-ascorbic and dehydroascorbic acids in fruits and vegetables. Evaluation of degradation rate during storage. *Anal Bioanal Chem* 2012; 403 (4): 1049–1058.
 95. Herbig AL, Renard CMGC. Factors that impact the stability of vitamin C at intermediate temperatures in a food matrix. *Food Chem* 2017; 220: 444–451.
 96. Mditshwa A, Magwaza LS, Tesfay SZ, Opara UL. Postharvest factors affecting vitamin C content of citrus fruits: A review. *Sci Hortic* 2017; 218: 95–104.
 97. Tomás-Barberán FA, Ferreres F, Gil MI. Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing. *Stud Nat Prod Chem*. 2000.
 98. Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem* 2011; 126 (4): 1821–1835.
 99. Park YS, Leontowicz H, Leontowicz M, Namiesnik J, Suhaj M, Cvikrová M, et al. Comparison of the contents of bioactive compounds and the level of antioxidant activity in different kiwifruit cultivars. *J Food Compos Anal* 2011; 24 (7): 963–70.
 100. Meunier V, Bourrie M, Berger Y, Fabre G. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol Toxicol* 1995; 11 (3-4): 187–194.
 101. Lozoya-Agullo I, Araújo F, González-Álvarez I, Merino-Sanjuán M, González-Álvarez M, Bermejo M, et al. Usefulness of Caco-2/HT29-MTX and Caco-2/HT29-MTX/Raji B coculture models to predict intestinal and colonic permeability compared to Caco-2 monoculture. *Mol Pharm* 2017; 14 (4): 1264–70.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco