



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

***Extracção e determinação da actividade
antioxidante de produtos naturais***

Andreína de Fátima Gaspar Ramos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Química Industrial

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Professora Doutora Maria Isabel Guerreiro da Costa Ismael

Covilhã, Junho de 2011

Agradecimentos

O meu enorme e sincero obrigada à Prof. Dout. Maria Isabel Ismael e ao Prof. Dout. José Albertino Figueiredo, pelos conhecimentos transmitidos, orientação pedagógica e científica. Bem como pela enorme disponibilidade e paciência prestada ao longo deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de laboratório pelos momentos de alegria, e cansaço passados entre pipetas, balões e frutos vermelhos.

E para finalizar, um obrigada cheio de carinho para os alicerces da minha vida tanto pessoal como profissional, aos meus pais, à minha avó (eterna no meu coração), ao meu namorado e aos meus amigos de sempre. Porque me ajudaram a rir mesmo quando estava triste. Porque me deram sempre a mão mesmo quando queria desistir. Porque me aturaram com muito mau feitio. Porque sempre acreditaram em mim.

E, sobretudo porque foi aqui que tudo aconteceu à Universidade da Beira Interior, obrigada.

Resumo

A importância dos compostos naturais com capacidade antioxidante tem sido largamente reconhecida nos últimos anos. O uso de antioxidantes naturais, como suplementos alimentares para inactivar os radicais livres, tem revelado uma importante atenção, não só pelas suas propriedades curativas, mas também por serem produtos de origem natural, sendo por vezes denominados nutracêuticos.

O principal objectivo da realização deste trabalho foi a extracção e o estudo de compostos existentes em frutos vermelhos. Nomeadamente, o morango, a cereja e a amora-preta. Frutos estes com elevada capacidade antioxidante, que podem ter importantes aplicações, nomeadamente em farmacologia no tratamento de doenças.

Foram utilizados os frutos frescos que foram tratados por dois métodos de extracção para se comparar a sua eficácia.

A escolha de frutos vermelhos como o produto natural a ser avaliado teve como fundamento base a sua relevante importância actual na alimentação dos Portugueses. Numa altura em que a obesidade aumenta significativamente, até as crianças estão mais gordas, nada como uma alimentação equilibrada rica em frutas e vegetais para evitar doenças como a diabetes ou o cancro.

A actividade antioxidante dos extractos concentrados foi determinada utilizando o método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), baseado na capacidade que este radical tem em reagir com doadores de hidrogénio para conhecimento da sua actividade antioxidante, utilizando como referência o antioxidante sintético comercialmente conhecido como Trolox.

Ao analisar os resultados da actividade antioxidante verificou-se que o extracto de morangos apresentava maior actividade, seguidamente a amora-preta e por fim a cereja. Verificou-se ainda que uma mistura destes três tipos de frutos apresenta uma maior actividade antioxidante do que os extractos separadamente, o que leva a concluir que esta mistura poderá ter importantes aplicações terapêuticas.

Palavras-chave

Produtos naturais, Frutos vermelhos, actividade antioxidante, DPPH.

Abstract

The importance of natural compounds with antioxidant capacity has been widely recognized in recent years. The use of natural antioxidants as dietary supplements to inactivate free radicals, has revealed an important focus, not only for its healing properties, but also because they are natural products and sometimes called are nutraceuticals.

The main objective of the present study was the extraction and study of existing compounds in red fruits. In particular, the strawberry, cherry and blackberry. These fruits with high antioxidant capacity, which may have important applications, particularly in pharmacology in diseases treatment.

We used fresh fruit that were treated by two different extraction methods to compare their effectiveness.

The choice of red fruits such as natural product to be evaluated was based material based on their current importance in the diet of the Portuguese. At a time when obesity increases significantly until the kids are fatter, nothing like a balanced diet rich in fruits and vegetables to prevent diseases such as diabetes or cancer.

The antioxidant activity of the concentrated extracts was determined using the method of the radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picril-hydrazyl) based on the ability of this radical has to react with hydrogen donors for knowledge of their antioxidant activity, using reference to the commercially known as synthetic antioxidant Trolox.

The obtained results of antioxidant activity showed that strawberries extract, had higher activity, then the blackberry and cherry. It was also found that a mixture of these three kinds of fruit has a higher antioxidant activity than the extracts separately, which leads to the conclusion that this mixture may have important therapeutic applications.

Keywords

Natural products, Red fruits, antioxidant activity, DPPH.

Índice geral

| | |
|--|----|
| Índice de figuras..... | 1 |
| Índice de tabelas..... | 2 |
| Índice de gráficos..... | 3 |
| Glossário..... | 4 |
| Capítulo 1 | |
| Introdução..... | 6 |
| Capítulo 2 | |
| Introdução Teórica | 8 |
| 2.1- Radicais Livres | 9 |
| 2.2- Fontes de radicais livres..... | 10 |
| 2.3 - Antioxidantes..... | 13 |
| 2.4 - Frutos vermelhos..... | 14 |
| 2.4.1 - Amora-preta..... | 15 |
| 2.4.2 - Morangos..... | 16 |
| 2.4.3 - Cerejas..... | 17 |
| 2.5 - Métodos de Extracção..... | 18 |
| 2.5.1 - Extracção com solventes orgânicos..... | 18 |
| 2.5.1.1- Influência do solvente..... | 18 |
| 2.5.1.2- Influência do tempo..... | 19 |
| 2.5.1.3- Influência da temperatura..... | 19 |
| 2.5.2- Extracção supercrítica..... | 20 |
| 2.6 - Método do DPPH..... | 22 |
| Capítulo 3 | |

| | |
|--|----|
| Materiais e Métodos..... | 24 |
| 3.1 - Preparação da fruta..... | 24 |
| 3.2- Métodos de extracção..... | 24 |
| 3.3- Método do DPPH..... | 25 |
| Capitulo 4 | |
| Resultados e discussão..... | 27 |
| 4.1- Preparação de extractos..... | 27 |
| 4.2 - Estudo dos produtos concentrados..... | 29 |
| 4.3 - Actividade antioxidante dos produtos concentrados..... | 37 |
| Capitulo 5 | |
| Conclusão..... | 41 |
| Bibliografia..... | 43 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Fig.1- Imagem ilustrativa de um conjunto de frutos vermelhos..... | 8 |
| Fig 2- Imagem de um quadro representativo da redução do oxigénio a espécies reactivas.. | 10 |
| Fig. 3 Imagem ilustrativa de uma célula - Fontes Endógenas..... | 12 |
| Fig. 4 - Imagem ilustrativa de fontes exógenas..... | 12 |
| Fig. 5 - Imagem ilustrativa de um antioxidante a neutralizar um radical livre..... | 14 |
| Fig. 6 - Imagem ilustrativa de um conjunto de frutos vermelhos..... | 15 |
| Fig. 7 - Imagem ilustrativa da representação de amora-preta..... | 16 |
| Fig. 8 - Imagem ilustrativa da representação de morangos..... | 17 |
| Fig. 9 - Imagem ilustrativa da representação de cerejas..... | 18 |
| Fig. 10 - Imagem ilustrativa de representação de amora-preta, cereja e morango..... | 29 |

Índice de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Correspondências entre massas iniciais e finais dos concentrados de fruta..... | 28 |
| Tabela 2- Comparação da Actividade Antioxidante dos diferentes sumos de frutos..... | 37 |
| Tabela 3- Comparação da Actividade Antioxidante das diferentes polpas de frutos..... | 38 |

Glossário:

| | |
|----------------------------|---|
| OH^\cdot | Radical hidroxilo |
| O_2^\cdot | Anião radical peróxido |
| ROO^\cdot | Hidroperoxido |
| DPPH | (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) |
| DPPH_{rem} | (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) remanescente |
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| %AA | percentagem de actividade antioxidante |
| min | minutos |
| % | Percentagem |
| Atm | Atmosferas |

Capítulo 1

Introdução

Introdução

Já desde os primórdios que o homem se interessa pelos compostos provenientes da natureza. Simples extracções aquosas de flores, plantas e até mesmo de insectos foram usadas para isolar compostos cujo sabor, cor e odor pudessem ser utilizadas para variados fins. Estes compostos eram usados, como venenos, no tratamento de doenças, para o fabrico de perfumes, estimulantes e muitas outras aplicações. [1]

Os produtos naturais, são compostos químicos obtidos de fontes naturais, quer estas sejam de origem animal ou vegetal, no entanto a maioria dos produtos naturais são isolados a partir de plantas, devido à facilidade do processo de isolamento.

Estudos recentes revelam a elevada importância dos compostos antioxidantes pesquisados em frutas e vegetais, nomeadamente em doenças cardíacas e em algumas doenças cancerígenas. [2]

Assim, podemos dizer que a área dos produtos naturais é cada vez mais importante, tanto a nível industrial como a nível do quotidiano populacional, sendo por isso uma área em expansão. [3]

Cada vez mais se procura fazer desta área de investigação, uma área do futuro.

Os Antioxidantes naturais são substâncias químicas naturalmente encontradas principalmente na composição de alimentos de origem vegetal e que possuem efectiva actividade antioxidante, ou seja, são capazes de retardar ou inibir a oxidação de compostos oxidáveis.

A actividade dos antioxidantes naturais é de interesse nutricional, uma vez que é associada à potencialização de efeitos promotores da saúde humana através da prevenção de várias doenças como diabetes, arteriosclerose, cancro, Doença de Alzheimer, de Parkinson, SIDA e osteoporose. Em alguns casos, estes compostos também são empregues com propósitos terapêuticos, devido as suas propriedades farmacológicas tais como vasodilatadores, anti-inflamatório, bactericida, estimuladores da resposta imune, antialergénicos e antivirais.

A actividade dos antioxidantes naturais é também de interesse tecnológico, pois o processamento de obtenção de alimentos com elevado teor destas substâncias supõem uma redução da utilização de antioxidantes sintéticos potencialmente cancerígenos, possibilitando a obtenção de alimentos mais saudáveis que podem ser incluídos no grupo dos alimentos funcionais.

Sabemos hoje que o nosso organismo está exposto à acção de formas extremamente reactivas de oxigénio, azoto ou radicais livres, que são continuamente produzidas por factores internos (respiração, algumas funções imunes mediadas pelas células) e externos (fumo, gases de automóveis, dieta desequilibrada, etc). Uma super carga de radicais livres no nosso organismo causa um desequilíbrio orgânico, levando ao stress oxidativo que está a surgir como causa de várias doenças.

O benefício do consumo dos antioxidantes naturais deve-se, essencialmente, à facilidade de remover radicais livres do nosso organismo, interrompendo a reacção em cadeia provocada por estes. Todavia, os antioxidantes naturais podem também exercer a sua acção antioxidante através de outros mecanismos: protegendo contra a oxidação de nossa proteína, DNA e gordura corporal, bem como inibindo a acção da enzima oxidante no nosso organismo. Hoje sabemos que os antioxidantes naturais são um dos mais importantes constituintes da dieta humana, sendo amplamente distribuídos em alimentos de origem vegetal como frutas, legumes e verduras. Alguns destes compostos são incolores, como os encontrados na cebola branca. Outros possuem cor, como no repolho roxo, casca da uva escura e vinho tinto. Outros exemplos são o morango, a maçã, a ameixa, o cacau, a batata, o tomate, os feijões, o trigo e seus derivados, a aveia, os brócolos, o espinafre, alguns temperos como orégãos, alecrim, canela e cravo. A capacidade antioxidante também tem sido encontrada para o azeite de oliva e bebidas como chá ou café. As sementes como tamarindo, canela, sésamo, linhaça e girassol são outras possíveis fontes de antioxidantes naturais. [4]



Fig.1- Imagem ilustrativa de um conjunto de frutos vermelhos.

Capítulo 2

Introdução Teórica

Introdução Teórica

2.1 - Radicais livres

Nos últimos tempos, um número relativo de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis por algumas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como o cancro, doenças cardiovasculares e disfunções cerebrais.

As espécies reactivas de oxigénio, tais como o radical hidroxilo (OH^\bullet), o anião radical peróxido (O_2^-) e o hidroperóxido (ROO^\bullet), causam transformações no DNA, podem oxidar lípidos e proteínas. As espécies reactivas de oxigénio atacam as cadeias de ácidos gordos polinsaturados dos fosfolípidios e do colesterol. Estas espécies retiram um hidrogénio do grupo metileno bis-alílico, iniciando assim o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os radicais de carbono formados reagem com o oxigénio originando radicais peróxido, que por sua vez podem atacar novas cadeias de ácidos gordos polinsaturados, propagando assim a reacção. [5]

Quadro 1. Redução do oxigénio a espécies reativas.

| | |
|---|------------------------|
| $\text{O}_2 + e^- \rightarrow \text{O}_2^- \bullet$ | radical superóxido |
| $\text{O}_2^- \bullet + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HO}_2^- \bullet + \text{OH}$ | radical hidroperóxido |
| $\text{HO}_2^- \bullet + e^- + \text{H} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ | peróxido de hidrogénio |
| $\text{H}_2\text{O}_2 + e^- \rightarrow \bullet\text{OH} + \text{OH}^-$ | radical hidroxila |

Fig 2- Imagem de um quadro representativo da redução do oxigénio a espécies reativas.

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena, ou serem provenientes da dieta alimentar e de outras fontes. Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes podem ocorrer lesões oxidativas de carácter cumulativo. E assim, os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desactivar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos das células.

A teoria que rege os radicais livres surgiu em 1954, com o Dr. Denham Harmon, que foi o precursor da teoria do envelhecimento como consequência da acção dos radicais livres no

organismo. Embora possam ser eliminados pelo organismo saudável, muitos são subprodutos do metabolismo celular humano normal, enquanto outros são decorrentes de dietas inadequadas como, da exposição a substâncias tóxicas. Os seus efeitos sobre a saúde abrangeriam também todas as doenças que nos afectam. [7]

Recorrendo a bioquímica, observamos que as moléculas são constituídas por átomos unidos através de ligações químicas formadas por um par de electrões. Quando as ligações químicas se desfazem, cada fragmento molecular passa a conter um único electrão na sua orbital externa, agora desemparelhada e ávido por estabelecer uma nova ligação. Estes fragmentos moleculares carregados, instáveis e reactivos constituem os radicais livres. Assim, o termo radical livre é frequentemente usado para designar qualquer átomo ou molécula com existência independente, contento um ou mais electrões desemparelhados, nas orbitais externas. Isto determina uma atracção para um campo magnético, o que pode torná-lo altamente reactivo, capaz de reagir com qualquer composto situado próximo à sua orbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora de electrões. Os radicais livres actuem como catalisadores, ou pontes, para desencadear reacções químicas ou modificações em outras moléculas.

Cada radical livre é capaz de procurar um parceiro quebrando a sua ligação química, para se agrupar. Nessa busca desenfreada por novos parceiros os radicais livres destroem enzimas, atacam células causando sérios danos estruturais e conseqüentemente o seu mau funcionamento e ate mesmo a morte celular.

2.2 - Fontes de radicais livres

Existem dois tipos de fontes de radicais livres, que pode enquadrar-se como endógenas, quando produzidas pelo próprio organismo como produto de uma determinada reacção metabólica, ou exógenas, quando são provenientes das condições do meio externo ao sistema biológico.

- Endógenas: As fontes endógenas geradas de radicais livres incluem as mitocôndrias e a actividade de algumas enzimas como xantina oxidase, citocromo P450-oxidase, monoaminoxidases, as enzimas envolvidas na via de produção de prostaglandinas, tromboxanos e a NADPH-oxidase da membrana plasmática de macrófagos. Podem também ser gerados nos peroxissomo e leucócitos.



Fig. 3 Imagem ilustrativa de uma célula - Fontes Endógenas.

- Exógenas: As fontes exógenas geradoras de radicais livres incluem o tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, a dieta, anestésicos, pesticidas, radiações gama e ultravioleta.



Fig. 4 - Imagem ilustrativa de fontes exógenas.

De uma forma geral, um antioxidante é uma substância que presente em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retarda significativamente ou inibe a oxidação do substrato. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reactivos para propagar a reacção em cadeia, sendo neutralizados por reacção com outro radical, formando produtos estáveis ou ate mesmo podendo ser reciclados por outro oxidante.[6]

2.3 - Antioxidantes

De uma forma geral, um antioxidante é uma substância que presente em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retarda significativamente ou inibe a oxidação do substrato. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reactivos para propagar a reacção em cadeia, sendo neutralizados por reacção com outro radical, formando produtos estáveis ou ate mesmo podendo ser reciclados por outro oxidante.[6]

Os antioxidantes podem ser divididos em 3 grandes grupos: antioxidantes de prevenção; antioxidantes desactivadores de radicais e antioxidantes reparadores.

Os antioxidantes de prevenção diminuem as concentrações de O_2 localizado, unem os iões metálicos de forma a não degenerarem em espécies reactivas e convertem peróxidos em álcoois.

Os antioxidantes desactivadores de radicais suprimem a reacção em cadeia, desactivando os radicais iniciadores da reacção e quebram a reacção em cadeia no caso de esta se propagar.

Os antioxidantes reparadores são enzimas de reparação e reposição de agentes antioxidantes e de reconstituição das membranas celulares.

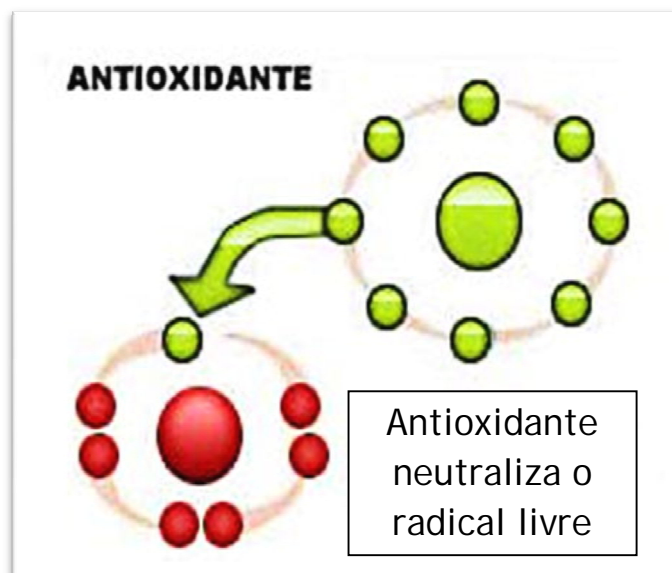


Fig. 5 - Imagem ilustrativa de um antioxidante a neutralizar um radical livre.

2.4 - Frutos vermelhos

Os frutos vermelhos são elementos importantes a incluir numa dieta equilibrada. Isto porque são principalmente ricos em antioxidantes e vitamina **C**. A vitamina C é por si só um antioxidante mas tem também outras funções como por exemplo estimular a absorção de ferro, desintoxicar o organismo, prevenir constipações e gripes ao fortalecer o nosso sistema imunológico e é importante para a produção de colagénio.

Numa altura em que a obesidade aumenta a olhos vistos, até as crianças estão mais gordas, nada como uma alimentação equilibrada rica em frutas e vegetais para evitar doenças como a diabetes ou o cancro.

Cada um tem o seu sabor intenso. Framboesas, mirtilos, amoras, groselhas, qualquer um deles faz bem à saúde. Segundo um estudo da OMS, Organização Mundial de Saúde, quem consumir uma grande quantidade de frutos e verduras tem menos probabilidade de contrair doenças do coração e alguns tipos de cancro.

Os frutos silvestres previnem a má digestão e ajudam a combater outros danos no organismo. Por exemplo, as framboesas são conhecidas por reduzirem o risco de cancro até 80%, os mirtilos ajudam a combater a depressão assim como as infecções urinárias, as groselhas ricas em vitamina C e potássio ajudam a baixar a tensão arterial.

Os frutos silvestres são fortificantes naturais. As groselhas ajudam a reforçar as defesas do organismo, na medida em que têm grande quantidade de vitamina C. No decorrer deste estudo os frutos vermelhos eleitos para pesquisa foram a amora-preta, o morango e a cereja.



Fig. 6 - Imagem ilustrativa de um conjunto de frutos vermelhos.

2.4.1 - Amora-preta

O cultivo comercial da amora-preta teve início na Europa, no Séc. XVII. O seu interesse comercial aumentou devido às suas propriedades naturais. As amoras-pretas contêm um nível apreciável de compostos fenólicos, incluindo antocianidinas, flavonoídes, ácido clorogénico e procianidinas.

A amora-preta *in natura* é altamente nutritiva. Da sua composição fazem parte a água (85%), as proteínas, as fibras, os lipídeos e também os hidratos de carbono. Também possui cálcio, fósforo, potássio, magnésio, ferro, selénio e várias vitaminas, no entanto, é uma fruta de baixo valor calórico, apenas 52 calorias em 100 gramas de fruta.

Vários tipos de açúcares e ácidos fazem parte da composição desta fruta, sendo que o balanço entre acidez e sólidos solúveis é que dá o seu delicioso sabor característico. Ainda na amora-preta, são encontradas outras substâncias como os fitoquímicos, ou compostos secundários. Estas substâncias são produzidas naturalmente pelas plantas para se protegerem do ataque de pragas e doenças, e também ajudam a planta a resistir a condições adversas ao ambiente.

Muitos destes fitoquímicos actuam na prevenção e no combate de doenças crónicas como o cancro e as doenças cardiovasculares. Exemplos de fitoquímicos encontrados em amora-preta são as antocianinas, que dão a coloração vermelha e roxa das frutas, os carotenóides que são responsáveis pela coloração alaranjada, e ainda, existem vários outros fitoquímicos que não apresentam cor como os ácidos fenólicos, por exemplo, mas são de grande importância para a saúde



Fig. 7 - Imagem ilustrativa da representação de amora-preta.

2.4.2 - Morangos

Morangueiro é o nome comum de um conjunto de espécies, do género *Fragaria* L., que produz o morango, incluindo um conjunto alargado de espécies e variedades silvestres.

Existem mais de 20 espécies do género *Fragaria* que recebem a designação comum de morangueiro, com ampla distribuição nas zonas temperadas e sub-tropicais.

Apesar de algumas diferenças anatómicas típicas, a classificação das espécies assenta essencialmente sobre o número de cromossomas, sendo que existem sete tipos básicos de cromossomas que todas as espécies e seus híbridos possuem em comum. A grande distinção resulta do grau de poliploidia que as espécies exibem.

Algumas espécies são diploides, isto é, têm dois conjuntos dos sete cromossomas básicos (14 cromossomas no total), outras são tetraploides (quatro conjuntos, 28 cromossomas), hexaploides (seis conjuntos, 42 cromossomas), octoploides (oito conjuntos, 56 cromossomas) ou decaploides (dez conjuntos, 70 cromossomas).

Como regra geral, embora com algumas exceções notáveis, as espécies de morangueiro com mais cromossomas tendem a ser mais robustas e maiores, produzindo também em geral morangos maiores.

O morango é rico em vitamina C e, por isso, o consumo da fruta evita a fragilidade dos ossos e a má formação dos dentes. Ele também dá resistência aos tecidos, age contra infecções, ajuda a cicatrizar ferimentos e evita hemorragias. O morango também possui, em menor quantidade, vitamina B5, conhecida como niacina. Ela tem a função de evitar problemas de pele, do aparelho digestivo e do sistema nervoso. Na fruta, também é encontrado ferro, que faz parte da formação do sangue.

Os morangos são uma fruta de consumo usual. É um fruto rico em vitamina C, E, β -caroteno e compostos fenólicos (ácido fenólico, flavonóides e antocianidinas).



Fig. 8 – Imagem ilustrativa da representação de morangos.

2.4.3 - Cerejas

Cerejeira é o nome dado a várias espécies de árvores originárias da Ásia, algumas frutíferas, outras produtoras de madeira nobre. Estas árvores classificam-se no subgénero **Cerasus** incluído no género *Prunus* (Rosaceae). Os frutos da cerejeira são conhecidos como **cerejas**, algumas delas comestíveis.

As cerejas são frutos pequenos e arredondados que podem apresentar várias cores, sendo o vermelho a mais comum entre as variedades comestíveis. A cereja-doce, de polpa macia e succulenta, é servida ao natural, como sobremesa. A cereja-ácida ou ginja, de polpa bem mais firme, é usada no fabrico de conservas, compotas e bebidas licorosas. As cerejas contêm proteínas, cálcio, ferro e vitaminas A, B, e C. Quando consumida ao natural, tem propriedades refrescantes, diuréticas e laxativas. Como a cereja é muito rica em tanino, consumida em excesso pode provocar problemas estomacais, não sendo aconselhável consumir mais de 200 ou 300 gramas da fruta por dia.

O cultivo da cerejeira é realizado em regiões frias. Necessitam de 800 a 1000 horas de frio para que possam produzir satisfatoriamente em áreas com Invernos frios e chuvas.



Fig. 9 – Imagem ilustrativa da representação de cerejas.

2.5 - Métodos de Extracção

Para a identificação e isolamento de compostos bioactivos em fontes naturais (como frutas, sementes e especiarias) é necessária a realização de extracção com solventes de polaridades diferentes. As extracções têm como objectivo principal a comparação dos resultados e encontrar a melhor alternativa para a sua aplicação.

Algumas etapas preliminares devem ser realizadas para facilitar o processo de extracção e conservar os compostos antioxidantes. Os compostos antioxidantes são sensíveis à acção da luz, oxigénio e calor. Os vegetais normalmente são desidratados, liofilizados ou congelados. E ainda peneirados ou moídos antes do processo de extracção. Assim, os substratos atingem maior superfície de contacto com o solvente de extracção e as enzimas lipoxigenase tornam-se inactivas. Tais enzimas, naturalmente presentes em vegetais, são responsáveis pela rancidez oxidativa enzimática.[9]

2.5.1 - Extracção com solventes orgânicos

A extracção com solventes orgânicos é frequentemente utilizada para o isolamento dos compostos bioactivos. O rendimento da extracção e a determinação da actividade antioxidante dos extractos dependem do tipo de solvente, devido às diferenças nos potenciais antioxidantes e à polaridade dos compostos.

2.5.1.1- Influência do solvente

Não existe sistema de extracção com solventes que seja satisfatório para o isolamento de todos ou de classe específica de antioxidantes naturais, devido a diversos factores. A natureza química desses compostos nos alimentos varia do simples ao altamente polarizado, há grande variedade de compostos bioactivos nos vegetais (como os ácidos fenólicos, antocianinas e taninos) e diferentes quantidades presentes para além da possibilidade de interacção dos compostos antioxidantes com hidratos de carbono, proteínas e outros componentes dos alimentos. Alguns desses complexos, assim como alguns fenólicos com alto peso molecular, são altamente insolúveis em água. Entretanto, os extractos sempre contêm

mistura de substâncias fenólicas de diferentes classes que são solubilizadas no solvente do sistema.

Estudos comparativos para a selecção do solvente óptimo são necessários, pois a actividade dessas substâncias depende dos compostos polifenólicos, uma vez que a actividade antioxidante máxima é exigida para cada substrato. Solventes com menor polaridade, como o acetato de etilo, normalmente extraem compostos com maior actividade antioxidante que a mistura com etanol ou metanol, ou o metanol sozinho. Já extractos de etanol e metanol apresentam alta actividade inibidora da peroxidação lipídica. [10]

Por isso a escolha do solvente é um dos passos mais importantes para uma óptima extracção.

2.5.1.2- Influência do tempo

O tempo de extracção também afecta consideravelmente a recuperação dos polifenóis. O período de extracção deve variar entre 1 minuto a 24 horas. No entanto, longos períodos de extracção aumentam a possibilidade de oxidação dos fenólicos exigindo que agentes redutores sejam adicionados ao solvente do sistema.

Por exemplo, em estudos realizados com resíduos de frutas vermelhas, os extractos foram preparados com etanol, metanol e água, a tempos de extracção de 1, 12 e 24 horas. Comparando-se os resultados, o conteúdo de polifenóis diminuiu no extracto aquoso com maior tempo de extracção, enquanto nos extractos metanólicos e etanólicos houve acréscimo no conteúdo de fenóis com o aumento do tempo.

2.5.1.3- Influência da temperatura

A estabilidade dos compostos polifenólicos, durante a desidratação e extracção, é afectada por degradações químicas, enzimáticas e pela volatilização dos compostos. No entanto a decomposição térmica tem sido apontada como a maior causadora da redução do conteúdo de polifenóis. Na decomposição térmica, os fenóis podem reagir com outros componentes e impedir sua extracção.

A temperatura durante a extracção pode afectar os compostos bioactivos de diferentes maneiras. O conteúdo total de fenólicos diminui com aumento da temperatura, assim como o

conteúdo de proantocianidina nas mesmas condições. Por essa razão usa-se a extracção com fluido supercrítico que preserva a acção antioxidante dos extractos. [10]

Por exemplo estudos revelam que o aquecimento das sementes de uva favoreceu a liberação de compostos fenólicos e, portanto, aumentou a quantidade de compostos activos nos extractos.

2.5.2- Extracção supercrítica

A extracção com solventes constitui método de separação conveniente, mas deve-se levar em consideração os efeitos tóxicos causados pelos resíduos. A extracção com fluído supercrítico é considerada desejável, pois não libera resíduos tóxicos de solventes no ambiente.

A obtenção de compostos antioxidantes mediante extracção com gases, como o dióxido de carbono, sob condições críticas de pressão e temperatura constitui método moderno e eficiente. Algumas substâncias, como o metanol e o etanol, podem ser utilizadas como co-solventes, melhorando o rendimento e a selectividade dos extractos.

O fluido submetido à pressão e temperatura acima de seu ponto crítico torna-se supercrítico. Várias propriedades dos fluidos são alteradas sob essas condições, tornando-se parecidas com as de alguns gases e líquidos. A densidade do fluido supercrítico é similar a dos líquidos, a sua viscosidade assemelha-se à dos gases e a sua capacidade de difusão é intermediária entre os dois estados. Portanto, o estado supercrítico de fluidos pode ser definido como o estado no qual o líquido e o gás são indistinguíveis entre si.

Devido à sua baixa viscosidade e alta capacidade de difusão, os fluidos supercríticos apresentam propriedades de transporte melhores que os líquidos. Podem se difundir facilmente através de materiais sólidos, resultando em melhores rendimentos nas extracções. O dióxido de carbono (CO₂), é o fluido mais utilizado devido a sua moderada temperatura (31,3°C) e pressão crítica (72,9 atm). Pois é gasoso à temperatura ambiente. Entretanto, o CO₂ supercrítico (pela baixa polaridade) é menos efectivo para a extracção de compostos com maior polaridade em fontes naturais. Tal facto é superado com a adição de modificadores, também conhecidos como co-solventes. As indústrias alimentares, cosméticas e farmacêuticas, têm interesse pela extracção supercrítica para a substituição dos processos de extracção convencionais (como a extracção com solventes orgânicos e a hidrodestilação para obtenção de óleos essenciais e oleorresinas.[11]

A extracção supercrítica produz extractos livres de resíduos e pode ser conduzida em baixas temperaturas, preservando a qualidade de compostos termo-sensíveis.

O grande inconveniente da extracção supercrítica reside na alta pressão necessária para a operação que requer equipamentos excessivamente caros, elevando o custo do produto final. Outras vantagens como, por exemplo, a alta pureza dos extractos e a grande eficiência do processo podem torná-la viável para a aplicação em alimentos.

2.6 - Método do DPPH

Vários métodos são utilizados para determinar a actividade antioxidante em extractos e em substâncias isoladas. De entre todos os métodos existentes o método referido em causa neste trabalho foi um dos mais usados, o método do DPPH. O método consiste em avaliar a actividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil - DPPH, de coloração púrpura que absorve a um comprimento de onda de 515 nm. Por acção de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R[•]), o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo esta ser monitorizada pelo decréscimo da absorvância.

A partir dos resultados obtidos determina-se a percentagem de actividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e a percentagem de DPPH remanescente no meio reaccional.

A percentagem de actividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE₅₀), também chamada de concentração inibitória (CI₅₀).

Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE₅₀ e maior a sua actividade antioxidante. [19]

Capítulo 3

Materiais e Métodos

Materiais e Métodos

Neste capítulo, efectua-se uma descrição sumária dos métodos de extracção usados bem como do método de análise de actividade antioxidante dos extractos.

3.1 - Preparação da fruta

A fruta foi seleccionada de acordo com critérios físicos e químicos. Foi previamente lavada, descascada e triturada com a ajuda de um almofariz. Após trituração foi passada num passador de rede fina com a finalidade de separar o sumo da polpa. Por fim foi colocada em balões de fundo redondo previamente pesados e levados ao evaporado rotativo. Este passo permitiu a concentração, isto é, a remoção do excesso de água existente na fruta.

3.2- Métodos de extracção

Após concentração no evaporador rotativo foram eleitos dois métodos de extracção distintos.

O Método A que usou 3 gramas de concentrado (polpa ou sumo) adicionado a um balão de fundo redondo, previamente pesado, com 7 ml de acetona, mais uma mistura de 7:3 de acetona/água. Foram colocados no ultra-sons durante 15 min isentos de luz. O preparado foi filtrado e os resíduos lavados com 7:3 de acetona água e filtrados. Após filtração foram evaporados a 40°C durante 5 min e transferidos para balões de 25ml aferidos com água destilada. Finalmente foram armazenados a frio para futuras análises.

O método B que usou 3 gramas de concentrado (polpa ou fruta) adicionado a um balão de fundo redondo, previamente pesado, com 10 ml de 5:5 metanol e água. Levou-se a macerar no frio (4°C) durante 24 horas. Os sobrenadantes foram colectados e armazenados no frio.

3.3 - Método de DPPH

Após a obtenção dos extractos devidamente concentrados procedeu-se á análise da actividade antioxidante. Para isso aplicou-se o método de DPPH.

Foram efectuados ensaios prévios a fim de escolher uma concentração de extracto que fosse adequada à análise da actividade antioxidante. E após algumas tentativas chegou-se á conclusão que a concentração de 5000µg/ml seria a mais adequada.

Prepararam-se as soluções com concentração de 5000µg/ml em balões de 25 ml em metanol.

Preparou-se a solução mãe de DPPH com uma concentração de 40µg/ml, armazenou-se no frio e isenta de luz.

A análise em causa foi feita num espectrofotómetro de feixe duplo a um comprimento de 515 nm.

Nas células adicionou-se 2,7mL de solução de DPPH mais 0,3mL de solução extractada. Procedeu-se a leituras de absorvancias em intervalos de 1 em 1 min durante 120 min.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Resultados e discussão

4.1- Preparação de extractos

Na preparação dos extractos realizaram-se recolhas de frutos vermelhos. Esta recolha foi baseada em critérios físicos e químicos homogéneos. A selecção da fruta teve como princípios base a qualidade, a cor, o tamanho e a isenção de microrganismos (fungos, bolores, etc).

Após a selecção e lavagem da fruta seguiu-se a concentração da mesma, com a finalidade de retirar o excesso de água. Esta etapa permite uma maior facilidade de extracção bem como uma maior durabilidade do concentrado.

Obteve-se então:

| Fruta | Massa Inicial | Massa após concentração | Percentagem de concentrado |
|-------------|---------------|-------------------------|----------------------------|
| Morango | 250 g | Polpa - 101,131g | 40,45% |
| | | Sumo - 26,479g | 10,59% |
| Amora-preta | 125g | Polpa - 28,263g | 22,61% |
| | | Sumo - 14,479g | 11,58% |
| Cereja | 125g | Polpa - 85,356g | 68,29% |
| | | Sumo - 15,942g | 12,75% |

Tabela 1 - Correspondências entre massas iniciais e finais dos concentrados de fruta.

Analisando os resultados da tabela 1 e comparando com a literatura sabemos que qualquer dos frutos analisados tem na sua composição aproximadamente 80% de água. E assim analisando a concentração de sumo obtida vemos que o resultado confere com a boa qualidade física e estrutural do fruto.

Após concentração tanto do sumo como da polpa dos frutos iniciou-se os processos de extracção. Foram seleccionados dois métodos distintos mas com a mesma metodologia base, isto é, métodos de extracção por solvente a frio.

O primeiro processo designou-se Método A, um método que partiu da extracção de 3 gramas de concentrado em acetona e água (7:3 acetona/água). Este método teve como base o solvente acetona e o ultra-sons. O banho de ultra-sons foi efectuado durante 15 min no escuro. Seguiu-se uma nova concentração e armazenamento a frio.

O segundo processo designou-se Método B, um método que partiu da extracção de 1 grama de concentrado em metanol e água (5:5 metanol/água). Este método teve como base o solvente metanol e a maceração a frio (4°C) e no escuro. Após 24 horas de maceração procedeu-se ao armazenamento a frio.



Fig. 10 - Imagem ilustrativa de representação de amora-preta, cereja e morango.

4.2 - Estudo dos produtos concentrados

Vários métodos têm sido usados na determinação da actividade antioxidante de compostos naturais.

O método usado neste trabalho é o método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Baseia-se na redução do DPPH em solução alcoólica e na presença de um antioxidante dador de hidrogénios devido à formação da forma não radicalar de DPPH-H na reacção.

Os extractos foram obtidos a partir de dois métodos de extracção com solventes e prosseguiu-se a análise da actividade antioxidante através do método do DPPH.

Os extractos foram analisados de modo a comparar espécies de fruta concentradas e métodos de extracção. Tendo em conta que usamos dois métodos distintos de extracção por solvente o método A, cujo solvente orgânico é a acetona e o método B, cujo solvente é o metanol.

Inicia-se o estudo de cada concentrado comparando a %DPPHrem ao longo do tempo. Os resultados são representados nos gráficos seguintes:

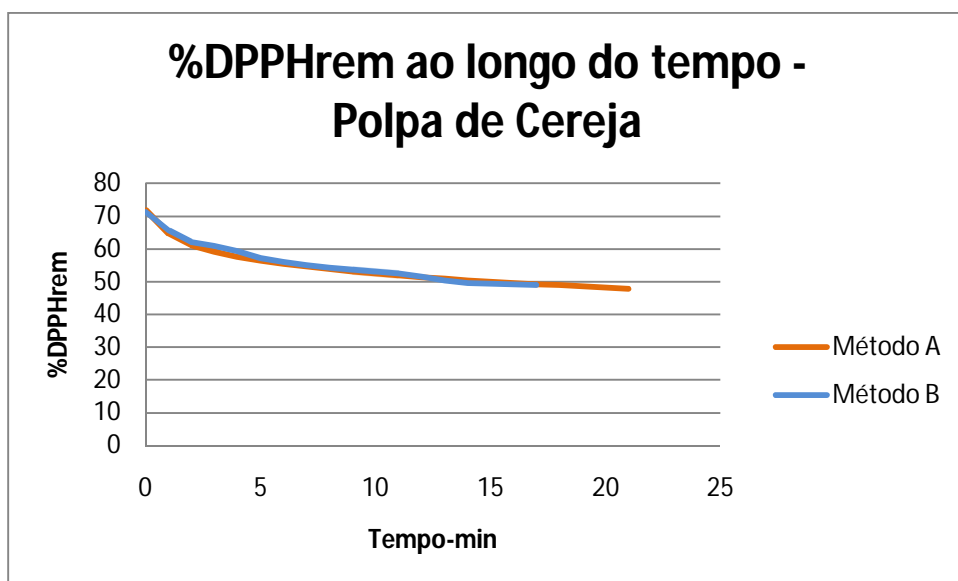


Gráfico 1 - %DPPHrem ao longo do tempo (min).

Ao analisar o gráfico 1 conclui-se que a %DPPHrem não teve muitas oscilações ao longo do tempo. Tornou-se constante muito rápido e não atingiu valores muito baixos o que leva a

concluir que do concentrado de Polpa de cereja não temos uma elevada actividade antioxidante. Comparando a eficiência dos métodos de extracção A e B, concluimos que estão equiparados.

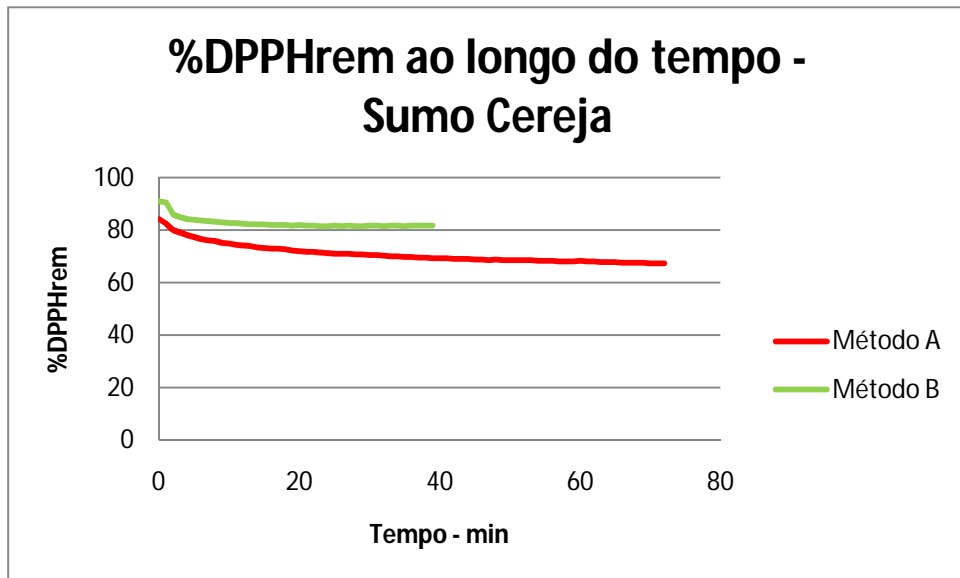


Gráfico 2- %DPPHrem ao longo do tempo (min).

Ao analisar o gráfico 2 conclui-se que a %DPPHrem não teve muitas oscilações ao longo do tempo. Tornou-se constante muito rápido e não atingiu valores muito baixos o que a leva a concluir que do concentrado de Sumo de cereja não temos uma elevada actividade antioxidante. Comparando métodos de extracção o método A foi o mais eficiente pois atingiu valores mais baixos de %DPPHrem.

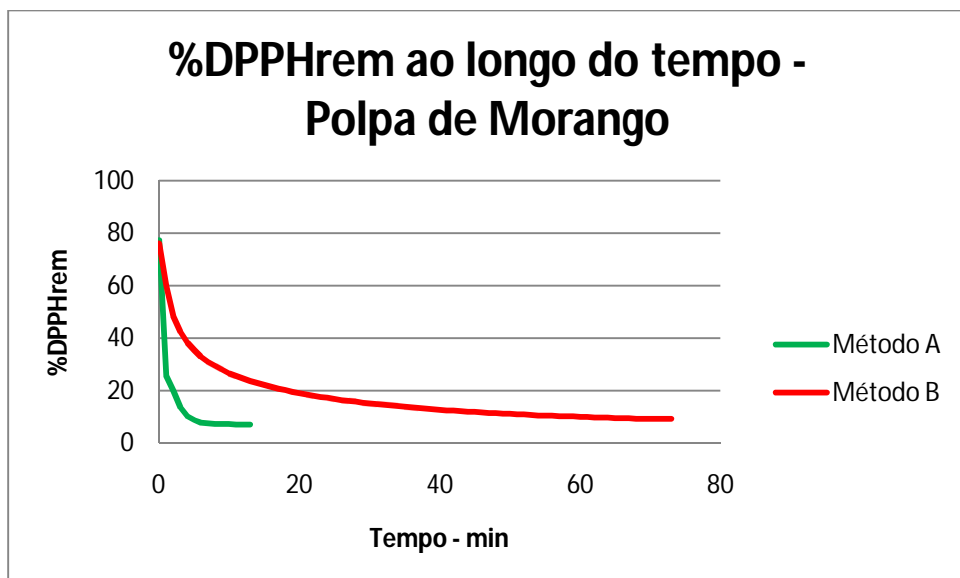


Gráfico 3- %DPPHrem ao longo do tempo (min).

Ao analisar o gráfico 3 conclui-se que a %DPPHrem não teve muitas oscilações ao longo do tempo. Tornou-se constante depois do minuto 65 para o método B e depois do minuto 6 para o método A. Atingiu valores relativamente baixos, perto dos 9% o que leva a concluir que do concentrado de Polpa de Morango temos uma elevada actividade antioxidante. Ao comparar métodos de extracção verifica-se que o método A é o de maior eficiência pois é com este que a reacção atinge mais rapidamente o equilíbrio. E ao comparar com a literatura podemos verificar a veracidade do método de extracção bem como do método de análise da actividade antioxidante.

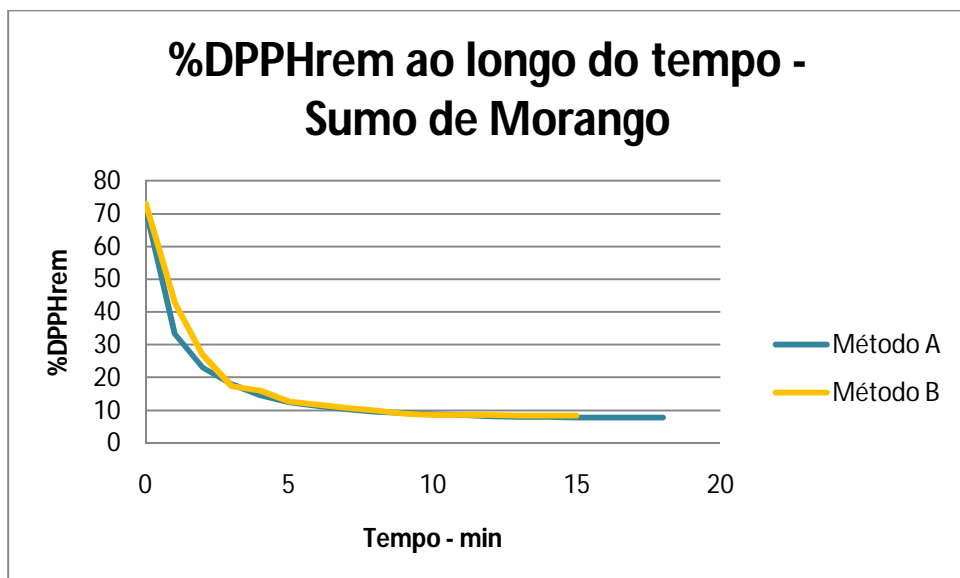


Gráfico 4 - %DPPHrem ao longo do tempo (min).

Ao analisar o gráfico 4 conclui-se que a %DPPHrem não teve muitas oscilações ao longo do tempo. Tornou-se constante depois do minuto 10 e atingiu valores relativamente baixos, perto dos 7% de %DPPHrem o que leva a concluir que do concentrado de Sumo de Morango obteve-se uma elevada actividade antioxidante. Ao comparar métodos verifica-se que o método A prevalece em reacção ao método B pois a reacção é mais rápida em A. E comparando com a literatura podemos verificar a veracidade do método de extracção bem como do método de análise da actividade antioxidante.

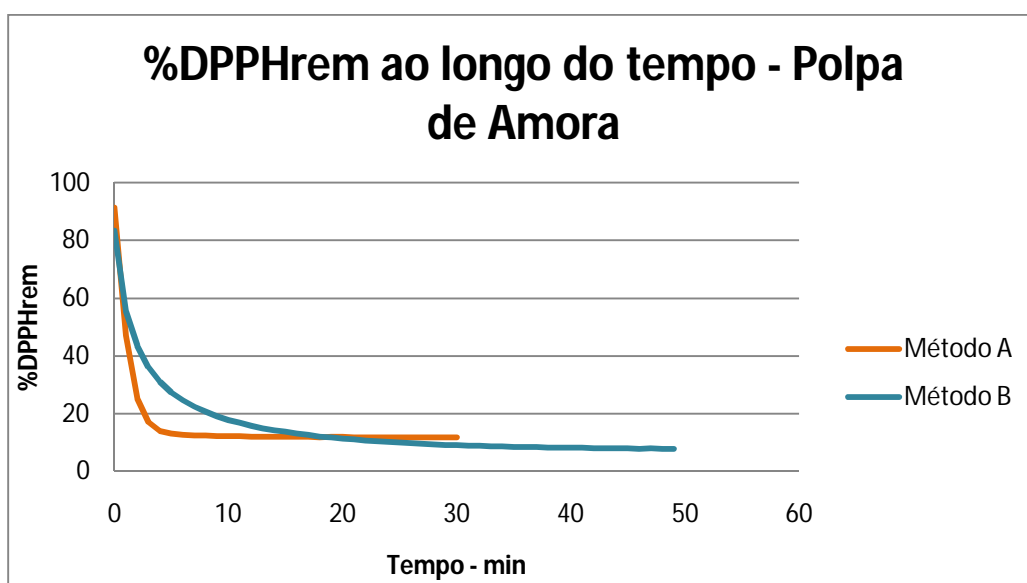


Gráfico 5 - %DPPHrem ao longo do tempo (min).

Ao analisar o gráfico 5 conclui-se que a %DPPHrem não teve muitas oscilações ao longo do tempo. Tornou-se constante depois do minuto 6 para o método A e depois do minuto 10 para o método B. Atingiu-se valores relativamente baixos, perto dos 7% de %DPPHrem o que leva a concluir que do concentrado de Polpa de Amora extraído tem uma elevada actividade antioxidante. Ao comparar métodos de extracção verifica-se que o método A é o mais eficiente pois estabiliza mais rapidamente e atinge valores mais baixos de %DPPHrem e consequentemente mais %Actividade Antioxidante. E ao comparar com a literatura podemos verificar a veracidade do método de extracção bem como do método de análise da actividade antioxidante.

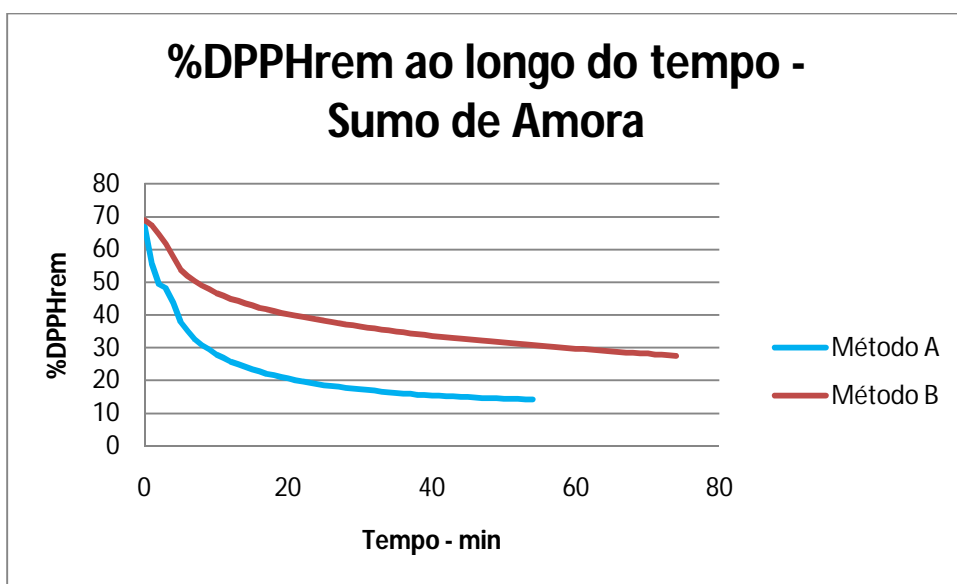


Gráfico 6 - %DPPHrem ao longo do tempo (min).

Ao analisar o gráfico 6 conclui-se que a %DPPHrem não teve muitas oscilações ao longo do tempo. Tornou-se constante depois do minuto 45 para o método A e após o minuto 60 para o método B. Atingiu-se valores relativamente baixos, perto dos 14% de %DPPHrem para o método A e perto dos 27% para o método B. Pode-se concluir que do concentrado de Sumo de Amora extraído temos uma elevada actividade antioxidante. Ao comparar métodos de extracção verifica-se que o método A tem maior eficiências pois atinge valores mais baixos de %DPPHrem e estabiliza mais rápido que o método B. E ao comparar com a literatura podemos verificar a veracidade do método de extracção bem como do método de análise da actividade antioxidante.

Por fim, analisou-se uma mistura dos três frutos em causa. Pesou-se a mesma quantidade de massa dos três frutos e dissolveu-se de modo a preparar uma concentração de 5000 µg/mL. E obteve-se:

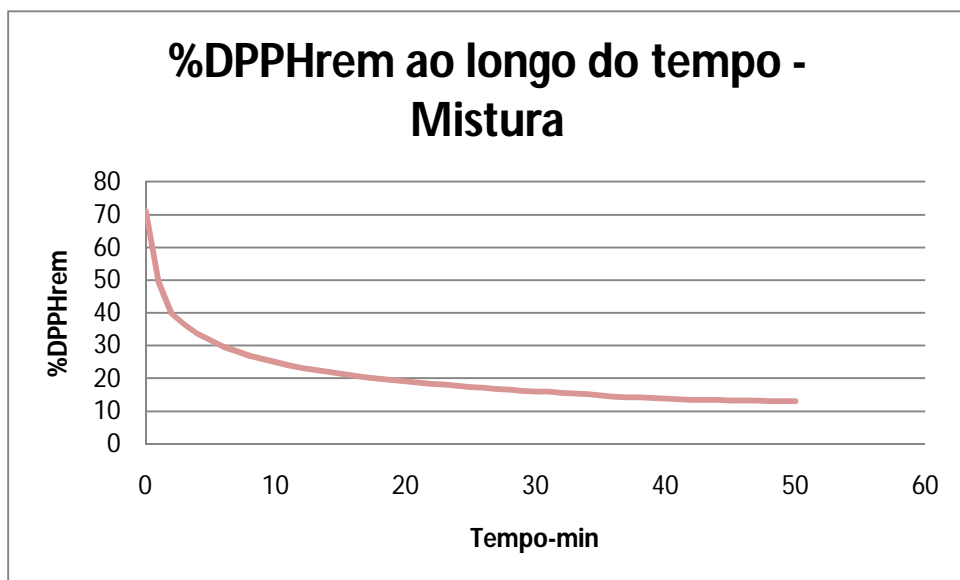


Gráfico 7 - %DPPHrem ao longo do tempo (min).

Ao analisar o gráfico 7 verifica-se que na mistura o comportamento da reacção é semelhante ao comportamento individual de cada elemento concentrado. Verifica-se que atinge-se a estabilidade após o minuto 40 e obteve-se um valor de %DPPHrem final de aproximadamente 13% o que significa que ter-se-á uma elevada actividade antioxidante nesta junção de 3 frutos.

De um modo global, comparou-se todas as %DPPHrem ao longo do tempo para os diferentes frutos analisados.

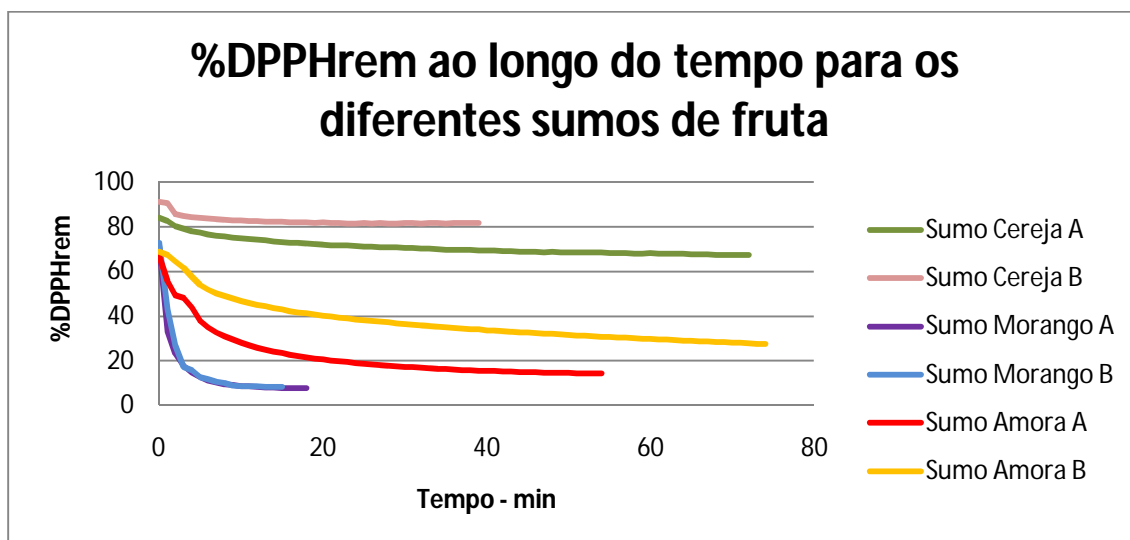


Gráfico 8 - %DPPHrem ao longo do tempo.

Assim, ao analisar o gráfico 8 verifica-se que o fruto com maior capacidade antioxidante é o morango e a amora. Nomeadamente o morango extraído segundo o método A. Este gráfico mostra a redução de DPPH disponível no meio, isto é para percentagens reduzidas de DPPHrem no meio, menor é a quantidade de radicais livres e maior é a capacidade antioxidante do fruto.

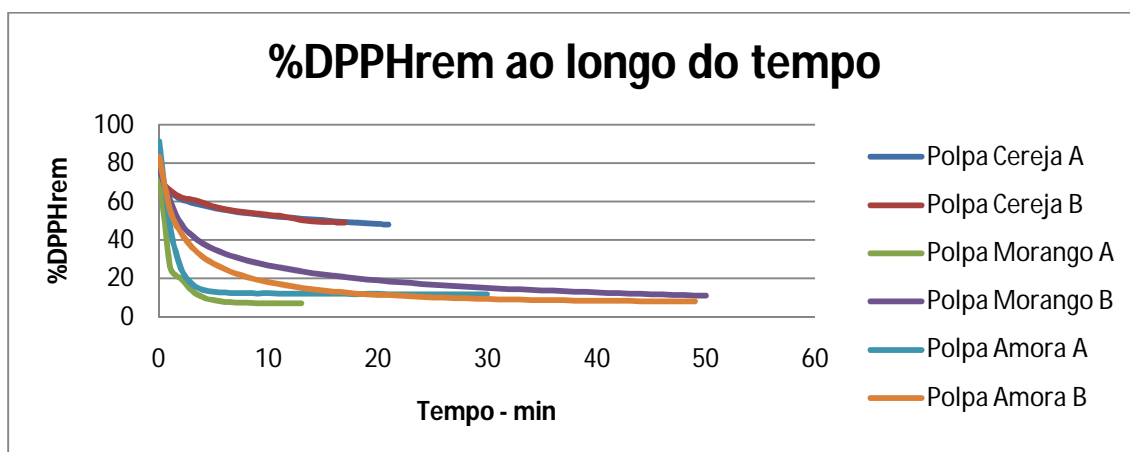


Gráfico 9 - %DPPHrem ao longo do tempo.

Representa-se no gráfico 9 a %DPPHrem ao longo do tempo para os três tipos de fruta, neste caso para os concentrados da polpa. Verifica-se que os frutos com maior actividade antioxidante são a cereja e o morango extraídos pelo método A. Pois são os que apresentam maior redução da %DPPHrem e conseqüentemente mais actividade antioxidante.

4.3 - Actividade antioxidante dos produtos concentrados

Vários métodos têm sido usados na determinação da actividade antioxidante de compostos naturais.

O método usado neste trabalho é o método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Baseia-se na redução do DPPH em solução alcoólica e na presença de um antioxidante dador de hidrogénios devido à formação da forma não radicalar de DPPH-H na reacção.

Os compostos analisados foram concentrados previamente e modo a remover totalmente os solventes usados nos métodos de extracção. Posteriormente cada 0,125g de concentrado foi dissolvido em 50 ml metanol e analisados. Os resultados são apresentados na tabela seguinte:

| Tempo (min) | %AA | | | | | |
|----------------|----------|------------------|-----------|-----------|---------|---------|
| | Cereja A | Cereja B | Morango A | Morango B | Amora A | Amora B |
| 1 | 16% | 9% | 29% | 27% | 33% | 31% |
| 5 | 22% | 16% | 87% | 85% | 57% | 43% |
| 10 | 25% | 17% ¹ | 92% | 92% | 72% | 53% |
| 15 | 27% | 18% | 94% | 93% | 77% | 57% |
| 20 | 28% | 18% | 94% | 93% | 80% | 60% |
| 30 | 30% | 19% | | | 80% | 64% |
| 40 | 31% | 19% | | | | 67% |
| 50 | 32% | | | | | 69% |
| 60 | 33% | | | | | 71% |
| 70 | 33% | | | | | 73% |

Tabela 2- Comparação da Atividade Antioxidante dos diferentes sumos de frutos.

Após leitura e interpretação da Tabela 2 verifica-se que o fruto que tem maior poder antioxidante é o morango com uma %AA de 94%. E que para além de ser o fruto com maior actividade antioxidante testada, este atingiu o seu equilíbrio após o décimo minuto de

reacção. Mais uma vez estamos perante o método A como sendo o método com maior eficiência. A seguir o fruto com maior actividade antioxidante é a amora-preta com aproximadamente 80% e atinge o equilíbrio após o minuto 15. O método em destaque é o método A.

Por fim obteve-se para a cereja uns valores de actividade antioxidante menos esperados. Atinge-se segundo o método A cerca de 33 % AA e para o método B 19% AA.

| Tempo (min) | %AA | | | | | |
|-------------|----------|----------|-----------|-----------|---------|---------|
| | Cereja A | Cereja B | Morango A | Morango B | Amora A | Amora B |
| 1 | 29% | 29% | 23% | 24% | 9% | 17% |
| 5 | 43% | 41% | 91% | 63% | 87% | 70% |
| 10 | 48% | 47% | 94% | 73% | 89% | 82% |
| 15 | 50% | 51% | 94% | 78% | 89% | 87% |
| 20 | 52% | 52% | | 82% | 90% | 90% |
| 30 | 53% | 52% | | 86% | 90% | 92% |
| 40 | 53% | | | 88% | | 93% |
| 50 | | | | 90% | | 93% |
| 60 | | | | 91% | | |
| 70 | | | | 92% | | |

Tabela 3- Comparação da Actividade Antioxidante das diferentes polpas de frutos.

Analisando a tabela 3 conclui-se novamente que tanto para a polpa como para o sumo o morango é o fruto com maior actividade antioxidante. E de seguida a amora e por fim a cereja. Tanto a cereja como a amora-preta apresentam maior actividade antioxidante na análise da polpa (a polpa é constituída pela casca do fruto e sementes).

A cereja é o fruto que apresenta menor actividade antioxidante, tal facto não é comparável com a realidade literária. Este resultado deve-se às más condições climáticas e laboratoriais executadas na altura. Tendo em conta que a época nacional de colheita de

cerejas é no mês de Maio/Junho estas são cerejas estrangeiras e modificadas de modo a aguentarem maior tempo de exposição.

A fórmula usada para cálculo da % de actividade antioxidante é a seguinte:

$$\%AA = \frac{Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})}{Abs_{controle}} \times 100 \quad (1)$$

Para testar o método experimental utilizado no estudo da actividade antioxidante, efectuou-se a determinação da actividade de uma espécie conhecida o Trolox.

E o resultado obtido experimentalmente deu 96,5 % de AA o que corresponde a um valor similar ao da literatura. [11]

O que leva a concluir que o procedimento usado para determinar as actividades as amostras dos compostos isolados e purificados é considerado válido.

Capítulo 5

Conclusão

Conclusão

A realização deste trabalho experimental permitiu extrair e concentrar extractos de frutos vermelhos, assim como estudar a sua actividade antioxidante. As técnicas utilizadas tornaram-se ferramentas preciosas para o estudo químico dos compostos.

A extracção das amostras realizou-se com as técnicas de extracção escolhidas, cujo extractor base é um solvente.

Ao comparar os dois métodos de extracção verifica-se que o método A é o mais recomendável para os morangos e cerejas. Pois, foi com estes método que se obteve maior redução de DPPH e conseqüentemente maior capacidade antioxidante. E para o caso da amora-preta foi o método B.

Os resultados obtidos para o morango e amora estão de acordo com a literatura o que podemos concluir que os métodos usados são válidos.

No caso da cereja verificamos que os resultados são diferentes dos apresentados na literatura o que leva a admitir erros de execução bem como de manuseamento. Analisando a época de colheita temos amostras de cerejas colhidas no mês de Janeiro provenientes do estrangeiro. As diferenças analisadas nos resultados podem provir de factores tais como o tempo de exposição ao frio, em câmaras frigoríficas, o modo de cultivo e tratamento das mesmas. Bem como químicos usados para a sua durabilidade em viagens e exposições comerciais.

Do estudo executado conclui-se que o morango é o fruto com maior actividade antioxidante e conseqüentemente o que terá maior benefício para a saúde humana.

Posteriormente temos a amora-preta e finalmente a cereja.

O método de extracção com maior poder extractivo é o Método A, este método usa como solvente extractor a acetona e uma ajuda fundamental do aparelho de ultrasons. O ultrasons tem um papel importante na quebra de ligações e formação de maior número de radicais livres que ficam apostos a novas e rápidas reacções em cadeia.

Bibliografia

- [1] Mann, J.; Davidson, R S.; Hobbs, B.; Banthorpe, D. V.; Harbome, J. B.; "Natural Products: Their Chemistry and Biological Sidnificance"; 1 st Edition; Longman Scientific and Technical; England; (1994)
- [2] Nicholas J. Miller & Catherine A. Rice-Evans; "The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink"; PII: S0308-8146(1996)00339- 1
- [3] Thomson, R H.; "The Chemistry of Natural Products"; 200 Edition; Blackie A cademic and Professional; England; (1993)
- [4] Camille S.Bowen-Forbes, YanjunZhang, MuraleedharanG.Nair; "Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits"; Journal of Food Composition and Analysis (2010)
- [5] Balázs Koroknai, Zsófia Csanádi, László Gubicza, Katalin Bélafi-Bakó; "Preservation of antioxidant capacity and flux enhancement in concentration of red fruit juices by membrane processes" Desalination 228 (2008) 295-301
- [6] Ana B. Cerezo, Elyana Cuevas, P. Winterhalter, M.C. Garcia-Parrilla, A.M. Troncoso "Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in Camarosa strawberry" Food Chemistry 123 (2010) 574-582
- [7] Ilkay Koca , Bulent Karadeniz; "Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey"; Scientia Horticulturae 121 (2009) 447-450
- [8] Anne-Laure Gancel, Aurélien Feneuil , Oscar Acosta, Ana Mercedes Pérez, Fabrice Vaillant ; "Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant capacity of tropical highland blackberry (Rubus adenotrichus)" Food Research International (2010)
- [9] Shiow Y. Wang, Linda Bowman, Min Ding, "Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (Rubus sp.) and promotes antiproliferation of human cancer cells"; Food Chemistry 107 (2008) 1261-1269

- [10] Dai J., A. Gupte, L. Gates, R.J. Mumper; "A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms"; *Food and Chemical Toxicology* 47 (2009) 837-847
- [11] Pantelidis G.E., M. Vasilakakis, G.A. Manganaris, Gr. Diamantidis; "Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries"; *Food Chemistry* 102 (2007) 777-783
- [12] Ayman H. Kamel, Felismina T.C. Moreira, Cristina Delerue-Matos, M. Goreti F. Sales* "Electrochemical determination of antioxidant capacities in flavored waters by guanine and adenine biosensors"; *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2008) 591-599
- [13] Barroso M. Fátima, Aurora Silva, Sandra Ramos, M.T. Oliva-Teles , Cristina Delerue-Matos, M. Goreti F. Sales, M.B.P.P. Oliveira, "Flavoured versus natural waters: Macromineral (Ca, Mg, K, Na) and micromineral (Fe, Cu, Zn) contents"; *Food Chemistry* 116 (2009) 580-589
- [14] Stoilova I., A. Krastanov, A. Stoyanova, P. Denev , S. Gargova; "Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*)"; *Food Chemistry* 102 (2007) 764-770
- [15] Jamil Harba, Basel Khraiweshb, Josef Streif , Ralf Reskid, Wolfgang Frankd "Characterization of blueberry monodehydroascorbate reductase gene and changes in levels of ascorbic acid and the antioxidative capacity of water soluble antioxidants upon storage of fruits under various conditions"; *Scientia Horticulturae* 125 (2010) 390-395
- [16] Serafini Mauro, Maria Francesca Testa , Debora Villaño , Monia Pecorari, Karin van Wieren, Elena Azzini, Ada Brambilla, Giuseppe Maiani, "Antioxidant activity of blueberry fruit is impaired by association with milk"; *Free Radical Biology & Medicine* 46 (2009) 769-774
- [17] Anna Gliszczyn´ska-S´wigło, "Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays"; *Food Chemistry* 96 (2006) 131-136
- [18] Morillas-Ruiz J.M., J.M. Rubio-Perez, M.D. Albaladejo, P. Zafrilla, S. Parra, M.L. Vidal-Guevara; "Effect of an antioxidant drink on homocysteine levels in Alzheimer's patients" *Journal of the Neurological Sciences* (2010)
- [19] Ayman H. Kamel, Felismina T.C. Moreira, Cristina Delerue-Matos, M. Goreti F. Sales, "Electrochemical determination of antioxidant capacities in flavored waters by guanine and adenine biosensors" *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2008) 591-599

[20] Cleytom Marcos Sousa, Hilris Rocha, Gerardo Magela, Vieira-Jr; "Fenóis totais e actividade antioxidante de cinco plantas medicinais"; Quimica Nova, Vol. 30, No 2, 351-355, (2007)

[21] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier and C. Berset; "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity"; lebensmittel-wissenschaft-und-tecnolog 28.25-30 (1995).