



**Anaísa Sofia Gomes Pereira**

Licenciada em Ciência e Tecnologia Animal

**Avaliação da bioacessibilidade de compostos  
antioxidantes em variedades de maçã  
produzidas em Portugal.**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte,  
Professora Auxiliar, FCT/UNL



**Anaísa Sofia Gomes Pereira**

Licenciada em Ciência e Tecnologia Animal

**Avaliação da bioacessibilidade de compostos  
antioxidantes em variedades de maçã  
produzidas em Portugal.**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte,  
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Doutora Benilde Simões Mendes – FCT/UNL

Vogais: Doutora Helena Maria Borba Alves dos Santos – FCM/UNL

Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte - FCTUNL



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Março 2014**



## **Copyright – Anaísa Sofia Gomes Pereira, FCT/UNL, UNL**

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## **Agradecimentos**

Agradeço à minha família por todo o apoio e carinho constante em especial aos meus pais pelo seu apoio incondicional, incentivo, amizade e paciência demonstrados e ajuda total em todos os obstáculos que foram surgindo ao longo desta caminhada. E ao meu companheiro e melhor amigo Tiago por estar sempre presente em todos os momentos ajudando-me e incentivando-me a cada dia que passa.

Agradeço à minha orientadora pelo seu apoio e colaboração total, pela disponibilidade constante em solucionar problemas e dúvidas e proporcionar as melhores condições possíveis para a realização deste trabalho experimental e por todas as palavras amigas e de incentivo, que foram parte fundamental para o sucesso deste trabalho.

Agradeço à minha colega de trabalho, Sheila Lemos, que esteve sempre presente na elaboração deste trabalho experimental, partilhando comigo todos os momentos bons e menos bons, sendo a sua presença amiga constante, encorajamento e ajuda uma parte muito importante para o sucesso deste trabalho.

Agradeço a todos os frequentadores habituais do laboratório 145, pela boa disposição e disponibilidade constante para ajudar, em especial à Sara e à D. Rita e à D. Rosa por nos proporcionarem uma ajuda fundamental no laboratório.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma possibilitaram a realização e conclusão deste trabalho.

## Resumo

Este trabalho teve por objetivo avaliar a bioacessibilidade em antioxidantes e em compostos fenólicos de três variedades de maçã produzidas em Portugal, nomeadamente as variedades Reineta, Granny Smith e Starking. Desta forma, compararam-se os resultados obtidos em amostras preparadas em acetona e em amostras submetidas a uma simulação da digestão gástrica e gastrointestinal *in vitro*. Para todas as amostras foi avaliado o teor de fenóis e flavonóides totais, bem como, a atividade antioxidante através de diferentes ensaios (FRAP, CUPRAC, sequestro dos radicais hidroxilo, anião superóxido e DPPH).

Os resultados obtidos mostraram que a simulação das digestões *in vitro*, levaram, de um modo geral, à diminuição do teor em compostos fenólicos e em flavonóides bem como da atividade antioxidante detetada. Assim, de acordo com aqueles resultados, após a digestão gastrointestinal cerca de 75% dos polifenóis, para a variedade Reineta, 67% para a Granny Smith e 34% para a Starking e cerca de 60% dos flavonóides para as variedades Reineta e Granny Smith e 29% para Starking presentes nas maçãs ficaram disponíveis para poderem ser posteriormente absorvidos. Foi igualmente possível verificar que a solubilização dos compostos fenólicos ocorre maioritariamente durante a fase gástrica da digestão, ocorrendo um pequeno aumento do teor destes compostos durante a fase intestinal. Contudo, este aumento do teor de compostos fenólicos, e, flavonóides, nem sempre se traduziu num aumento da atividade antioxidante.

Os resultados obtidos revelam as maçãs das variedades Reineta e Granny Smith como melhores escolhas do que a variedade Starking devido a apresentarem um conteúdo em compostos antioxidantes bioacessíveis mais elevado. Os resultados permitem concluir que, apesar das diferenças observadas antes e após a simulação da digestão gastrointestinal, que apontam no sentido da digestão gastrointestinal não conseguir extrair todo o potencial antioxidante dos frutos, a atividade antioxidante obtida sugere que as maçãs ainda possam desempenhar um papel importante na defesa antioxidante, em particular atuando na desativação de espécies reativas de oxigénio que se possam formar no aparelho digestivo.

**Palavras – chave:** atividade antioxidante, digestão gastrointestinal *in vitro*, maçã, compostos fenólicos, flavonóides

## **Abstract**

This study aimed to evaluate the bioaccessibility in antioxidants and phenolic compounds of three varieties of apple produced in Portugal, namely Reineta, Granny Smith and Starking varieties. Thus, a comparison of the results obtained on samples prepared in acetone and samples subjected to simulated gastric and gastrointestinal digestion in vitro. For all samples was evaluated the content of phenols and flavonoids, as well as antioxidant activity through different tests (FRAP CUPRAC, sequestration of the hydroxyl radical, superoxide anion and DPPH).

The results showed that the simulation of the in vitro digestion led, in general, the decrease in the content of flavonoids and phenolics and antioxidant activity detected. Thus, according to these results, following gastrointestinal digestion about 75 % of polyphenols to Reineta range 67% to 34% Granny Smith and for Starking and about 60 % of flavonoids and to the Granny Smith variety Reineta and 29% to Starking present in apples were available in order to be subsequently absorbed. It was also verified that the solubility of phenolic compounds occurs mainly during the gastric phase of digestion, occurring a small increase in the content of these compounds in the intestinal phase. However, this increase in the content of phenolic compounds and flavonoids, not always resulted in increased antioxidant activity.

The results reveal the apples of varieties Reineta and Granny Smith as better choices than the Starking variety due to submit content in higher bioaccessive antioxidant compounds. The results indicate that, despite the differences observed before and after simulated gastrointestinal digestion, pointing towards the gastrointestinal digestion can not extract all the antioxidant potential of fruit, the antioxidant activity obtained suggests that apples may still play an important role in antioxidant defense, in particular working on the deactivation of reactive oxygen species that may form in the digestive tract.

**Keywords:** antioxidant activity, in vitro gastrointestinal digestion, apple phenolics, flavonoids.

## Índice Geral

1. Introdução	3
1.1. Stress Oxidativo, Radicais livres e Sistema de defesa antioxidante	3
1.1.1. Formação e Efeitos Biológicos dos Radicais Livres	3
1.1.2. Sistemas de Defesa Antioxidante	6
1.1.2.1. Mecanismo de Atuação dos Antioxidantes não Enzimáticos	7
1.2. Os Polifenóis	9
1.2.1. Os Ácidos Fenólicos	10
1.2.2. Os Flavonóides	12
1.2.3. Outros Polifenóis e antioxidantes	14
1.2.4. Fatores que afetam a presença de polifenóis nos alimentos	15
1.3. O Processo digestivo	16
1.4. Bioacessibilidade e Biodisponibilidade de Polifenóis	18
1.5. Simulação in vitro da digestão gastrointestinal	21
1.6. Alimentos Funcionais	22
1.7. As Maçãs	23
1.7.1. Maçã Reineta	24
1.7.2. Maçã Granny Smith	25
1.7.3. Maçã Starking delicious/Red delicious	25
1.7.4. Características Nutricionais da Maçã	26
1.7.5. Produção e Consumo de Maçã	30
1.7.6. Antioxidantes em maçãs	31
1.7.7. Efeitos benéficos da maçã na saúde	33
1.8. Enquadramento e Objetivos do trabalho	34
2. Materiais e Métodos	35
2.1. Reagentes e Enzimas	35
2.2. Aquisição das maçãs	35
2.3. Preparação das amostras	35
2.3.1. Preparação dos extratos em acetona	36
2.3.2. Simulação da digestão gástrica	36
2.3.3. Simulação da digestão gastrointestinal	37
2.4. Determinação dos fenóis totais - Método de Folin-Ciocalteu	37
2.5. Determinação dos flavonóides totais	38
2.6. Determinação da capacidade antioxidante	38
2.6.1. Capacidade de Sequestro do radical DPPH•	38
2.6.2. Avaliação da capacidade de redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC	39
2.6.3. Determinação da atividade de redução Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP	40
2.6.4. Determinação da atividade antioxidante por sequestro do radical hidroxilo através da diminuição da degradação da desoxirribose	42
2.6.5. Capacidade de sequestro do radical anião superóxido	43
2.7. Análise Estatística dos dados	45
3. Resultados e Discussão	46
3.1. Determinação do teor em fenóis totais	46
3.2. Determinação do teor em flavonóides totais	48
3.3. Determinação da Capacidade Antioxidante	49
3.3.1. Avaliação da redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC	49
3.3.2. Avaliação da atividade de redução Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP	51
3.3.3. Capacidade de Sequestro do Radical DPPH•	53
3.3.4. Capacidade de Sequestro do Radical Hidroxilo	54
3.3.5. Capacidade de Sequestro do Radical Anião Superóxido	56
4. Conclusões	58
Bibliografia	62

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> – Reação de Fenton (Leopoldini et al., 2011)	8
<b>Figura 1.2</b> - Estrutura geral dos ácidos fenólicos: (A) Estrutura geral dos ácidos hidroxibenzóicos e (B) Estrutura geral dos ácidos hidroxicinâmicos (Gomes, 2010)	11
<b>Figura 1.3</b> - Estrutura básica dos flavonóides (Gomes, 2010)	12
<b>Figura 1.4</b> - Estrutura básica das diversas classes de flavonóides (Manach et al., 2004)	12
<b>Figura 1.5</b> - Sistema digestivo humano, incluindo o trato gastrointestinal e órgãos anexos (Giori, 2010)	16
<b>Figura 1.6</b> - Aspeto da maçã Reineta	24
<b>Figura 1.7</b> – Aspeto da maçã Granny Smith	25
<b>Figura 1.8</b> - Aspeto da maçã Starking	26
<b>Figura 2.1</b> - Reação de desativação do radical DPPH• (Moon e Shibamoto, 2009)	39
<b>Figura 2.2</b> - Redução do complexo Cu(II)–neocuproína a Cu(I)–neocuproína, por ação dos antioxidantes da amostra (Apak et al., 2004)	40
<b>Figura 2.3</b> - Formação do complexo (Fe <sup>2+</sup> -TPTZ) após redução do Fe <sup>3+</sup> por um antioxidante (Moon e Shibamoto, 2009)	41
<b>Figura 2.4</b> - Reação de formação dos compostos MDA-TBA (adaptado de Chobot, 2010)	42
<b>Figura 2.5</b> - Estrutura do (A) NBT <sup>2+</sup> e do (B) formazano (Valentão et al., 2001)	44
<b>Figura 2.6</b> - Formação do radical anião supeóxido utilizando o sistema metossulfato de fenazina (PMS)/NADH (Valentão et al., 2001)	44
<b>Figura 3.1</b> - Teor de compostos fenólicos totais (mg EAG/g de maçã) nas amostras em estudo. Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste t (p< 0,05). Letras minúsculas significam diferenças significativas entre tratamentos para a mesma variedade. Letras maiúsculas significam diferenças significativas entre variedades para o mesmo tratamento.	46
<b>Figura 3.2</b> - Teor em flavonoides totais (mg equivalentes de catequina/ g de maçã) das amostras em estudo. Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste t (p<0,05). Letras minúsculas significam diferenças significativas entre tratamentos para a mesma variedade. Letras maiúsculas significam diferenças significativas entre variedades para o mesmo tratamento.	49
<b>Figura 3.3</b> - Capacidade antioxidante das variedades de maçã determinada pelo ensaio CUPRAC (µmol EAA/g de maçã). Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste t (p<0,05). Letras minúsculas significam diferenças significativas entre tratamentos para a mesma variedade de maçã. Letras maiúsculas significam diferenças significativas entre variedades de maçã para o mesmo tratamento.	50
<b>Figura 3.4</b> - Capacidade antioxidante das variedades de maçã determinada pelo ensaio FRAP (µmol Fe <sup>2+</sup> /g de maçã ). Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste t (p<0,05). Letras minúsculas significam diferenças significativas entre tratamentos para a mesma variedade. Letras maiúsculas significam diferenças significativas entre variedades para o mesmo tratamento.	52

**Figura 3.5** - Capacidade antioxidante das variedades de maçã determinada pelo sequestro do radical DPPH• ( $\mu\text{g EAA}/100\text{g}$ ). Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste t ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes significam diferenças significativas entre tratamentos para a mesma variedade. Letras maiúsculas diferentes significam diferenças significativas entre variedades para o mesmo tratamento. 53

**Figura 3.6** - Capacidade antioxidante das variedades de maçã determinada pelo sequestro do radical hidroxilo (% de sequestro/mg de maçã). Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste t ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes significam diferenças significativas entre tratamentos para a mesma variedade. 55

**Figura 3.7** - Capacidade antioxidante das variedades de maçã determinada pelo sequestro do radical anião superóxido ( $\text{mol EAG}/100 \text{ g de maçã}$ ) em três variedades diferentes de maçã em três tratamentos. Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste t ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes significam diferenças significativas entre tratamentos para a mesma variedade. Letras maiúsculas diferentes significam diferenças significativas entre variedades para o mesmo tratamento. 56

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1</b> - Principais antioxidantes endógenos (Bouayed e Bohn, 2010)	7
<b>Tabela 1.2</b> - Principais antioxidantes exógenos obtidos pela dieta, principalmente pelo consumo de frutas, legumes e grãos (Bouayed e Bohn, 2010)	7
<b>Tabela 1.3</b> - Composição média de seis variedades de maçã com casca em vitaminas e minerais (Adaptado de INSA, 2014)	27
<b>Tabela 1.4</b> - Informação nutricional das variedades Granny Smith, Reineta e Starking (Almeida e Pintado, 2007)	28
<b>Tabela 1.5</b> - Algumas características físico-químicas e sensoriais das variedades Granny Smith, Reineta e Starking (Almeida e Pintado, 2007)	29
<b>Tabela 1.6</b> - Produção de maçã em Portugal (www.FAOstat.com, acedido em Janeiro 2014)	30
<b>Tabela 1.7</b> - Exportação/Importação de maçã em Portugal (www.FAOstat.com, acedido em Janeiro 2014)	31

## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

**ADN** – Ácido desoxirribonucleico;

**CAT** - Catalase;

**CUPRAC** - Cupric Reducing Antioxidant Capacity

**DPPH<sup>•</sup>** – Radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo;

**EAA** – Equivalentes de ácido ascórbico;

**EAG** – Equivalentes de ácido gálico;

**EDTA** - Ácido etilenodiaminotetracético;

**Eq** - Equivalentes;

**FRAP** - Ferric Reduction Antioxidant Power

**g** - aceleração gravítica

**GI** - Gastrointestinal;

**GPx** - Glutaciona peroxidase;

**GSH** - Glutaciona reduzida;

**HAT** - Mecanismo antioxidante por transferência de átomo de hidrogénio;

**NADH** - Dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida;

**NBT<sup>2+</sup>** - Azul de nitrotetrazólio;

**PMS** - Metossulfato de fenazina;

**ROS** - Espécies Reativas de Oxigénio;

**rpm** - Rotações por minuto;

**SET** - Mecanismo antioxidante por transferência de um eletrão;

**SOD** - Superóxido dismutase;

**TBA** – Ácido tiobarbitúrico;

**TPTZ** - 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina;

## 1. Introdução

O estilo de vida moderno, que se reflete na falta de tempo, favoreceu os maus hábitos alimentares dando origem a que a muitas pessoas tenham uma dieta incompleta e inadequada. Associado a este tipo de alimentação tem-se verificado um acréscimo de doenças crónicas degenerativas e outras como, por exemplo, a obesidade e diabetes, ligadas aos consumos excessivos de gorduras e açúcares e à falta de alimentos de origem vegetal (Lidon e Silvestre, 2010). Relacionadas com estas doenças estão igualmente os radicais livres responsáveis por reações de oxidação. O equilíbrio entre o potencial antioxidante e oxidante é considerado crítico para manter um sistema biológico saudável e sabe-se que os antioxidantes produzidos endogenamente podem não ser suficientes para combater os radicais livres produzidos pelo organismo. Desta forma, podem originar-se condições de *stress* oxidativo, ou seja, condições de desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a sua remoção pelos sistemas químicos e enzimáticos de defesa antioxidante (De Oliveira *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2010; Bouayed, 2010).

Há diversos fatores que parecem contribuir para ao *stress* oxidativo, como, por exemplo, o consumo de álcool, o tabagismo, a dieta inadequada, exercício físico realizado de forma extrema, a exposição à radiação ultravioleta, exposição a condições ambientais impróprias (temperatura elevada e poluição ambiental, domiciliar e ocupacional) e estados psicológicos que provoquem *stress* emocional (De Oliveira *et al.*, 2009). Para combater estas situações o organismo humano necessita de antioxidantes exógenos provenientes de uma dieta saudável. Assim, os alimentos naturalmente enriquecidos nutricionalmente são uma mais-valia no reforço dietético. Daí também o grande interesse nos alimentos funcionais, ou seja, alimentos que quando consumidos usualmente na dieta para além das propriedades nutricionais básicas, apresentam efeitos metabólicos e fisiológicos benéficos para a saúde (Lidon e Silvestre, 2010). De acordo com a *American Dietetic Association* (Associação Dietética Americana), a melhor estratégia nutricional para promover a saúde e reduzir o risco de doenças crónicas é a obtenção de nutrientes de uma grande variedade de alimentos (De Oliveira *et al.*, 2009). A saúde e o bem-estar dos consumidores são os principais impulsionadores da indústria alimentar moderna e por isso os produtores de alimentos mostram cada vez mais interesse no desenvolvimento de produtos com um maior nível de certeza sobre conterem compostos benéficos para a saúde, como os antioxidantes, para ir de encontro ao crescente interesse dos consumidores na relação entre dieta e saúde (Kevers *et al.*, 2011; Parada e Aguilera, 2007).

Diversos estudos epidemiológicos têm descrito os efeitos benéficos do consumo de frutas e vegetais com elevado teor de compostos fenólicos para a prevenção de doenças humanas, tais como as cataratas, diabetes, doença de Alzheimer, asma, doenças cardio e cerebrovasculares e cancro, especialmente cancro do trato gastrointestinal. Os efeitos de proteção fornecidos pelas frutas e legumes contra estas doenças, que são marcadamente

associados com o *stress* oxidativo, têm sido atribuídos à presença de compostos antioxidantes, em particular, à presença de polifenóis. Por serem capazes de promover a boa saúde e prevenir ou aliviar doenças, os alimentos ricos em compostos fenólicos, como as frutas e legumes, obtiveram o estatuto de alimentos funcionais (Kaur e Kapoor, 2001; Boyer e Liu, 2004; Bouayed, 2010; Serra *et al.*, 2010; Tagliazucchi *et al.*, 2010; Landete, 2012).

As maçãs estão entre os frutos mais amplamente cultivados e consumidos, principalmente devido à sua disponibilidade ao longo de todo ano. Estes frutos constituem uma importante parte da dieta humana, pois são uma fonte de açúcares, ácidos e vários compostos biologicamente ativos, tais como compostos fenólicos, que são responsáveis pela maior parte da atividade antioxidante da fruta. As maçãs contêm uma significativa quantidade de diferentes classes de compostos fenólicos e o seu consumo está associado à redução do risco de várias doenças (Vieira *et al.*, 2009; Briones-Labarca *et al.*, 2011; Cindrić *et al.*, 2012; Candrawinata *et al.*, 2013). Por estas razões a maçã foi escolhida como objeto deste estudo.

Um dos principais factores que pode influenciar os efeitos benéficos dos polifenóis *in vivo* é a sua biodisponibilidade e destino metabólico, tendo em conta que apenas os compostos libertados da matriz do alimento e / ou absorvidos ao longo do tubo digestivo ficam biodisponíveis e em condição de serem utilizados para as funções do corpo e exercerem os seus efeitos benéficos. Desta forma o conhecimento sobre os níveis de ingestão de polifenóis, juntamente com a sua bioacessibilidade/biodisponibilidade em todo o trato gastrointestinal, constituem fatores fundamentais para avaliar o seu significado biológico na saúde humana (Briones-Labarca *et al.*, 2011; Palafox-Carlos *et al.*, 2011).

Os métodos de simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* são amplamente utilizados no presente, uma vez que são rápidos, seguros, fiáveis e não têm as questões éticas dos métodos *in vivo*. Estes ensaios consistem em simular os processos de digestão e absorção (bioassimilação) ou apenas o processo de digestão (bioacessibilidade), permitindo desta forma estudar as mudanças que ocorrem nos componentes da dieta durante a digestão gástrica e intestinal (Parada e Aguilera, 2007; Bouayed *et al.*, 2011; Briones-Labarca *et al.*, 2011).

Os ensaios de digestão *in vitro* têm demonstrado a importância de dietas ricas em frutas e vegetais, comprovando a presença de substâncias antioxidantes, que auxiliam no combate aos radicais livres, tendo sido verificada uma boa correlação entre os modelos de avaliação da biodisponibilidade pelo método *in vitro* com os resultados de estudos em seres humanos e animais (Alves *et al.*, 2010; Bouayed *et al.*, 2011). Neste contexto, o objetivo deste trabalho experimental consistiu na avaliação da bioacessibilidade de compostos antioxidantes, através da simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*, de três variedades de maçãs produzidas em Portugal, nomeadamente as variedades Granny Smith, Reineta e Starking.

## 1.1 Stress Oxidativo, Radicais livres e Sistema de defesa antioxidante

Os termos relacionados com *stress* oxidativo, dano oxidativo, radicais livres e antioxidantes tornaram-se parte integrante do vocabulário científico e são usados numa variedade de discussões científicas por químicos, físicos, biólogos e outros pesquisadores. Quimicamente, cada composto, incluindo o oxigênio molecular, que possa aceitar elétrons é um oxidante ou agente oxidante. Contrariamente uma substância que doa elétrons é um redutor ou o agente redutor. Quando um redutor doa elétrons, faz com que uma outra substância possa ser reduzida, a esta reação química chama-se redução. Quando um oxidante aceita elétrons, faz com que uma outra substância seja oxidada, a esta reação química onde há perda de um ou mais elétrons dá-se o nome de oxidação. Estas reações, chamadas reações redox, (transferência de elétrons), são um dos processos químicos mais fundamentais para inúmeras vias bioquímicas, química celular, biossíntese e regulação e sobrevivência das células. O efeito colateral dessa dependência é a produção de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem causar danos oxidativos, por isso o estudo destas reações é também importante para a compreensão da oxidação biológica e efeitos dos radicais e dos antioxidantes (Kohen e Nyska, 2002; Alves *et al.*, 2010).

O *stress* oxidativo é comumente definido como um grave desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio, azoto e enxofre, entre outras, e a remoção destas pelos sistemas químicos e enzimáticos de defesa antioxidante e, também a reparação enzimática das biomoléculas lesadas, o que leva à acumulação de danos oxidativos nas células (De Oliveira *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2010; Halliwell, 2011). O desequilíbrio entre os oxidantes e os antioxidantes a favor dos oxidantes pode resultar dos antioxidantes produzidos pelo corpo serem insuficientes para combater os radicais livres produzidos pelo organismo, e tem sido sugerido como sendo uma das causas do envelhecimento e do aparecimento de várias doenças no Homem (Katalinic *et al.*, 2004). Este equilíbrio, referido como o potencial redox, é específico para cada organelo e local biológico, e qualquer interferência pode ser prejudicial para a célula e para o organismo. Alterando o equilíbrio no sentido de um aumento dos pró-oxidantes sobre a capacidade do antioxidante obtém-se a condição de *stress* oxidativo que pode levar a danos oxidativos, mas alterando o equilíbrio no sentido de um aumento do poder redutor, ou antioxidante, podem também ocorrer danos, sendo essa situação definida como o *stress* redutor (Kohen e Nyska, 2002).

### 1.1.1 Formação e Efeitos Biológicos dos Radicais Livres

Os radicais livres, foram inicialmente usados para descrever os compostos intermediários na química orgânica e inorgânica, e foram sugeridas várias definições químicas para os mesmos. Mais tarde esses radicais foram sugeridos como participantes importantes em ambientes biológicos e responsáveis por processos nocivos nas células. Pouco depois,

sugeriu-se que estas espécies podiam desempenhar um papel nos eventos fisiológicos e, particularmente, no processo de envelhecimento. Esta teoria dos radicais livres no envelhecimento inspirou muitos estudos e contribuiu significativamente para o conhecimento atual sobre os radicais e, mais especificamente, radicais derivados do oxigênio. Esses radicais são agora considerados componentes principais em reações bioquímicas, resposta celular e evolução clínica (Kohen e Nyska, 2002).

Os radicais livres são espécies reativas formadas continuamente durante os processos metabólicos, normais ou patogênicos, surgindo naturalmente durante o metabolismo, podendo igualmente ser provenientes de fontes exógenas físicas e químicas. Estes radicais são definidos como qualquer espécie contendo um ou mais elétrons desemparelhados, sendo que a ocorrência de um elétron não emparelhado resulta na alta reatividade dessas espécies pela sua afinidade em doar ou obter um outro elétron para atingir a estabilidade. As espécies radicalares atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes para o metabolismo, encontrando-se envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (Kohen e Nyska, 2002; De Oliveira *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2010; Halliwell, 2011). As vias celulares que consomem oxigênio são responsáveis pela geração da maior parte das ROS. Entre estas vias encontra-se a respiração mitocondrial (em que 85% de oxigênio é metabolizado), e as reações catalisadas pela NAD(P)H oxidase e pela xantina oxidase. As espécies reativas de oxigênio são propositadamente produzidas pelas células do sistema imunológico como forma de neutralizar vírus e bactérias (Bouayed, 2010).

No entanto, conforme anteriormente referido, há diversos fatores que potenciam a formação de radicais livres, e de outras espécies reativas não radicalares. Entre esses fatores encontra-se o consumo de álcool ou de tabaco, uma dieta excessiva em gordura e hidratos de carbono e relativamente deficiente em vitaminas, a exposição à radiação ultravioleta, à temperatura elevada a determinados poluentes, tais como, herbicidas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, ozono, a exposição a diversos fármacos, e à radiação terapêutica (raio-x), condições de hipertermia e de inflamação (De Oliveira *et al.*, 2009). Experiências em animais mostraram que situações de *stress*, como a imobilização e privação de sono estimulam a produção excessiva espécies reactivas de oxigênio. O *stress* emocional e humor deprimido também estão associados com uma formação maciça destas espécies. O exercício físico intenso e exaustivo também pode resultar na produção de espécies reativas de oxigênio em excesso (Kaur e Kapoor, 2001; De Oliveira, 2009; Alves *et al.*, 2010; Bouayed e Bohn, 2010).

As espécies reativas mais estudadas nos sistemas biológicos incluem as espécies reativas de oxigênio, as espécies reativas de azoto, os radicais derivados de tióis (RS<sup>•</sup>) e as espécies reativas de cloro e complexos de metais de transição, principalmente Fe, Cu, Mn e Cr. Outros iões metálicos, sem atividade redox direta, também podem afetar o balanço oxidativo, como os iões de metais pesados (Pb, Cd) e trivalentes (Bi, Al), que são capazes de se ligar

fortemente aos grupos fosfatos dos fosfolípidios de membranas celulares, diminuindo sua fluidez e, conseqüentemente, aumentando sua peroxidabilidade. Os íons divalentes (Mg, Ca, Zn) são cofatores de proteínas e enzimas envolvidas na maquinaria redox celular, podendo também afetar o balanço oxidativo (De Oliveira *et al.*, 2009). As espécies reativas incluem, não só espécies radicalares, como, por exemplo, o radical anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), radical óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), ou radicais peróxido ( $ROO^{\cdot}$ ) mas também moléculas neutras como o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), o oxigénio singleto ( $^1O_2$ ) ou carregadas como o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Kaur e Kapoor, 2001; De Oliveira *et al.*, 2009; Bouayed e Bohn, 2010).

Quando em concentração excedente ao normal, as espécies reativas podem causar danos celulares. Os radicais livres reagem rapidamente com outros compostos, tentando capturar os eletrões necessários para ganharem estabilidade. Geralmente atacam as moléculas estáveis mais próximas, roubando os seus eletrões. Quando a molécula que foi atacada perde o seu eletrão torna-se um radical livre em si, iniciando uma reação em cadeia. Uma vez o processo iniciado pode desencadear um efeito cascata, iniciar a peroxidação lipídica que resulta na desestabilização e desintegração das membranas celulares ou na oxidação de outros componentes celulares tais como proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos. A oxidação destas moléculas pode alterar o funcionamento de organelos celulares como as mitocôndrias, com conseqüente alteração na estrutura e função e prejuízo das funções vitais em diversos tecidos, como, por exemplo, o tecido vascular ou o tecido cerebral, e órgãos, como, por exemplo, o fígado (Kaur e Kapoor, 2001; Kohen e Nyska, 2002; De Oliveira, 2009; Alves *et al.*, 2010; Bouayed e Bohn, 2010). O estado de *stress* oxidativo, pode ainda originar diferenças na expressão genética, na conformação das proteínas e na sinalização celular (Bouayed, 2010).

As alterações oxidativas na estrutura e funções celulares têm sido implicadas num grande número de doenças agudas e crónicas, incluindo cancro, diabetes, infertilidade masculina, artrite reumatóide e outras doenças autoimunes, aterosclerose, doenças cardiovasculares, patologias neurológicas degenerativas (doença de Alzheimer e doença de Parkinson) e cataratas (Kaur e Kapoor, 2001; Knekt *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Boyer e Liu, 2004; Bouayed, 2010).

Os radicais livres atuam de maneira destrutiva também sobre plantas e alimentos. A peroxidação lipídica é a principal causa da deterioração dos alimentos ricos em gordura. Ela é responsável pela modificação do odor e sabor dos alimentos, bem como perda da qualidade nutricional, acarretando depreciação e/ou rejeição por parte dos consumidores. A decomposição oxidativa pode ser iniciada por processos térmicos, absorção de raios gama ou radiação ionizante, ou por iniciação química envolvendo íons metálicos ou metaloproteínas (Alves *et al.*, 2010).

Desta forma, pode concluir-se que o equilíbrio entre o potencial antioxidante e oxidante é crítico para manter um sistema biológico saudável. A complexa interação entre as espécies reativas e os antioxidantes tem sido um dos principais motores da evolução e sobrevivência

dos seres humanos, na forma como as células se comunicam e respondem ao perigo, e em doenças relacionadas com a idade dos seres humanos e outros animais (Halliwell, 2011).

A maioria dos radicais são espécies de curta duração, reagem rapidamente com outras moléculas. Alguns dos radicais livres derivados do oxigénio são muito reativos com um tempo de semi-vida muito curto. Por exemplo, o radical hidroxilo tem nos sistemas biológicos um tempo de semi-vida de apenas  $10^{-9}$  segundos (Leopoldini *et al.*, 2011). A elevada reatividade dos radicais faz com que os antioxidantes devam estar presentes no local em que os radicais são produzidos, de modo a evitar a interação entre estas espécies e os diversos alvos biológicos (Kohen e Nyska, 2002).

### 1.1.2 Sistemas de Defesa Antioxidante

A fim de lidar com o excesso de radicais livres produzidos em condições de *stress* oxidativo, os organismos desenvolveram mecanismos sofisticados para a manutenção da homeostase redox. Estes mecanismos de proteção incluem a eliminação ou destoxificação de espécies reativas de oxigénio ou o bloqueio da sua produção através, por exemplo, do sequestro de metais de transição. Estes mecanismos de defesa antioxidante podem ser enzimáticos ou não enzimáticos, podendo ser produzidos no corpo, ou seja, endogenamente, ou fornecidos pela dieta, ou seja de origem exógena (Han *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2010).

Os antioxidantes enzimáticos incluem as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione-peroxidase, entre outras. Os antioxidantes não enzimáticos incluem moléculas endógenas, tais como, por exemplo, a glutathione e o ácido úrico, e também moléculas exógenas que são fornecidos especialmente pela nutrição tais como vitaminas, ácidos gordos polinsaturados, polifenóis ou carotenóides (Bouayed, 2010). A superóxido dismutase é considerada como a linha de frente de defesa antioxidante, embora possa exibir atividade peroxidásica, na presença de excesso de  $H_2O_2$ ; destacam-se também a catalase e as glutathione peroxidases, encarregadas de reduzir peróxidos geradores de radicais  $OH^\bullet$  e  $RO^\bullet$ , respetivamente (De Oliveira *et al.*, 2009).

No entanto, os sistemas de defesa antioxidantes endógenos são incompletos sem os antioxidantes exógenos tais como vitamina C, vitamina E, carotenóides e os polifenóis, que têm um papel fundamental em muitos mecanismos antioxidantes em organismos vivos (Lee *et al.*, 2003; Bouayed e Bohn, 2010).

Em suma, os antioxidantes podem dividir-se em dois grandes grupos, os antioxidantes endógenos, enzimáticos e não enzimáticos (Tabela 1.1), e os antioxidantes exógenos, provenientes da dieta (Tabela 1.2).

**Tabela 1.1** Principais antioxidantes endógenos (Bouayed e Bohn, 2010).

<b>Antioxidantes enzimáticos</b>	<b>Antioxidantes não enzimáticos (principais agentes intracelulares de redução)</b>
Superóxido dismutase (SOD): Destoxificação do $O_2^{\cdot -}$	Glutationa (GSH)
Catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx): Destoxificação de peróxidos (CAT de $H_2O_2$ , e GPx de $H_2O_2$ e ROOH)	Ácido úrico
Glutaciona redutase: Regeneração da glutaciona oxidada	Acido lipóico
Tioredoxina reductase: Proteção contra a oxidação de proteínas	NADPH
Glicose -6-fosfato-desidrogenase: Regeneração de NADPH	Coenzima Q
	Albumina e bilirrubina.

**Tabela 1.2.** Principais antioxidantes exógenos obtidos pela dieta, principalmente pelo consumo de frutas, legumes e grãos (Bouayed e Bohn, 2010).

#### **Principais antioxidantes exógenos**

- Vitaminas: vitamina C, vitamina E
- Oligoelementos: zinco, selênio
- Os carotenóides:  $\beta$ -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina
- Ácidos fenólicos: ácidos clorogénicos, ácido gálico, ácido caféico,
- Flavonóis: quercetina\*, kaempferol \*, miricetina \*
- Flavonóides: proantocianidinas, catequinas
- Antocianidinas: cianidina \*, pelagonidina\*
- Isoflavonas: genisteína \*, daidzeína\*, gliciteína \*
- Flavanonas: naringenina\*, eriodictiol \*, hesperetina\*
- Flavonas: luteolina\*, apigenina \*

\* e os seus glucósidos.

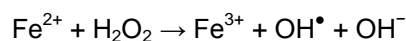
#### **1.1.2.1 Mecanismo de Atuação dos Antioxidantes não Enzimáticos**

Um antioxidante pode ser definido como um composto capaz de prevenir ou reduzir o processo de oxidação, ou a extensão do dano oxidativo biológico (Kohen e Nyska, 2002; De Oliveira *et al.*, 2009). Os antioxidantes podem neutralizar radicais livres doando os seus próprios eletrões convertendo-se em espécies radicalares pouco reativas. Assim, podem também ser definidos como as substâncias capazes de extinguir ou estabilizar radicais livres, prevenindo ou retardando o processo de oxidação em alimentos e sistemas biológicos (Kaur e

Kapoor, 2001; Heo *et al.*, 2007). Nos alimentos os antioxidantes funcionam como conservantes, retardando a deterioração, ranço ou descoloração causada pela oxidação. É o caso da peroxidação lipídica, uma reação importante responsável pela deterioração de alimentos durante o processamento e armazenamento que pode dar origem à formação substâncias tóxicas, mutagénicas e potencialmente cancerígenas (Kaur e Kapoor, 2001).

Os antioxidantes de baixo peso molecular podem ser sintetizados no próprio organismo ou ser oriundos da dieta. Estão presentes em número e concentração maiores que os antioxidantes enzimáticos e distribuídos em ambientes lipofílicos e hidrofílicos (De Oliveira *et al.*, 2009).

Existem diferentes mecanismos pelos quais os compostos antioxidantes podem exercer a sua acção. Entre estes podem ser citados a inativação de radicais por transferência de átomos de hidrogénio (mecanismo HAT) ou por transferência de electrões (mecanismo SET). Outro mecanismo antioxidante é a quelação de metais de transição, como o cobre e o ferro, evitando que eles participem em reações que geram radicais livres. Na verdade, alguns metais no seu estado de oxidação baixo (principalmente  $Fe^{2+}$ ), quando não se encontram ligados a proteínas quelantes, podem estar envolvidos em reações Fenton, a partir das quais se podem gerar radicais hidroxilo (Figura 1.1) (Leopoldini *et al.*, 2011). Conforme já anteriormente referido, o radical hidroxilo é um dos radicais mais reativos, não é eliminado por meio de reações enzimáticas podendo reagir com todo o tipo de moléculas.



**Figura 1.1** – Reação de Fenton (Leopoldini *et al.*, 2011).

A Reação de Fenton pode causar a acumulação de radicais livres em locais específicos e iniciar processos de danos de biomoléculas. Estas reações ocorrem em neurónios dopaminérgicos do tecido do sistema nervoso, em que o catabolismo da dopamina produz, normalmente, alguns níveis de peróxido de hidrogénio. A acumulação do radical hidroxilo nesses neurónios pode ser reconhecida como um dos principais agentes etiológicos da doença de Parkinson. Outras doenças neurodegenerativas, tais como doença de Alzheimer e a doença de Huntington, têm como característica um aumento significativo do ferro em algumas regiões do cérebro (Leopoldini *et al.*, 2011).

Outros mecanismos de atividade antioxidante incluem a inibição de enzimas oxidativas, como, por exemplo, a xantina oxidase, a coclooxigenase ou os citocromos P450, ou o aumento da atividade ou da expressão das enzimas antioxidantes por exemplo, suprarregulando a expressão de genes que codificam para a SOD, catalase ou glutathiona peroxidase (Magalhães *et al.*, 2008).

Os alimentos ricos em antioxidantes demonstraram desempenhar um papel essencial na prevenção de doenças cardiovasculares, cancro, doenças neuro-degenerativas, das quais as mais conhecidas são as doenças de Alzheimer e de Parkinson, bem como inflamações e envelhecimento cutâneo. Na última década, aumentaram as evidências que ligam os distúrbios do metabolismo oxidativo a elevados níveis de ansiedade e depressão. Os resultados recentes levantam a possibilidade da ansiedade e depressão poderem ser prevenidas ou tratadas, seja por uma dieta rica em antioxidantes naturalmente existentes nos alimentos, seja por suplementação diária com antioxidantes (Kaur e Kapoor, 2001; Bouayed, 2010).

Nos últimos anos, o uso de alguns antioxidantes sintéticos tem sido restringido devido ao seu possível efeito tóxico e carcinogénico. Esta preocupação tem resultado num aumento do interesse na investigação da eficiência de compostos que ocorrem naturalmente, com propriedades antioxidantes. Assim, os antioxidantes naturais presentes nos alimentos e outros materiais biológicos têm atraído um interesse considerável por causa da sua presumida segurança e potencial efeito nutricional e terapêutico (Kaur e Kapoor, 2001). Um bom antioxidante deve ser um composto biológico naturalmente presente em tecidos animais; deve ser ativo na proteção de moléculas de proteínas, lipídios e ADN; deve ter uma boa biodisponibilidade; deve ter uma meia-vida longa; deve ser ativo no espaço intra e extracelular e, deve ser capaz de atravessar intacto a membrana celular (De Oliveira *et al.*, 2009). Os compostos fenólicos têm vindo a ser amplamente estudados devido às suas propriedades bioativas, especialmente à sua capacidade antioxidante.

## 1.2 Os Polifenóis

Os polifenóis abrangem mais de 8 000 compostos que ocorrem naturalmente, todos possuindo uma característica estrutural comum: um anel aromático tendo mais do que um substituinte hidroxilo (Manach *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2007; Bouayed *et al.*, 2011; Leopoldini *et al.*, 2011; Palafox-Carlos *et al.*, 2011). Estes compostos podem apresentar diversas estruturas, desde moléculas simples até estruturas poliméricas com uma grande massa molecular. Os polifenóis são metabolitos secundários produzidos pelas plantas e são comumente encontrados em alimentos como frutos, legumes e grãos integrais.

Nas plantas que os sintetizam, os compostos fenólicos, possuem funções de defesa contra a radiação ultravioleta, agressão por patogénicos ou ataque de pragas. Muitos destes compostos são também responsáveis pela cor atraente de folhas, frutos e flores. Já em animais e no Homem tem-se observado que são capazes de reagir com radicais livres, formando radicais estáveis (Manach *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2008; Palafox-Carlos *et al.*, 2011).

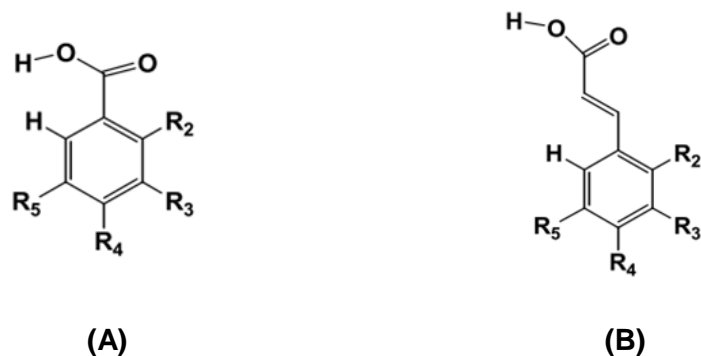
Com efeito, o conteúdo em polifenóis na dieta tem vindo a ser alvo de muita atenção, devido à sua atividade antioxidante e às suas possíveis implicações benéficas para a saúde

humana, consequência da sua comprovada atividade biológica na prevenção de doenças. De fato, eles são capazes de eliminar espécies reativas de oxigênio e azoto, responsáveis pelo aparecimento de vários processos inflamatórios e doenças degenerativas associadas ao *stress* oxidativo, tais como cancro e doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Manach *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2007; Heo *et al.*, 2007; Bouayed *et al.*, 2011; Carbone *et al.*, 2011; Panzella *et al.*, 2013). Estas moléculas têm demonstrado vários efeitos biológicos, quando testadas *in vitro* ou *in vivo*. Assim, elas podem ter um efeito vasodilatador, anti-proliferativo, anti-bacteriano, anti-carcinogénico, anti-inflamatório, imuno-estimulante, anti-mutagénico, antidepressivo, anti-ansiedade, antialérgico, antiviral e estrogénico. Mais ainda, diversos trabalhos apontam aos polifenóis capacidade para proteger neurónios contra o *stress* oxidativo, estimular a vasodilatação, melhorar a secreção de insulina e inibir as atividades das enzimas fosfolipase A2, ciclooxigenase, lipoxigenase e xantina oxidase (Manach *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2007; Heo *et al.*, 2007; Bouayed, 2010; Bouayed *et al.*, 2011; Leopoldini *et al.*, 2011; Palafox-Carlos *et al.*, 2011). Diversos polifenóis, têm ainda sido destacados devido à possibilidade de se ligarem a recetores celulares e transportadores de membranas e influenciarem a expressão génica, a sinalização e a adesão celular e modularem a atividade de uma vasta gama de enzimas e recetores de células (Heo *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2008; Bouayed *et al.*, 2011).

Os compostos fenólicos podem ser classificados em diferentes grupos, em função do número de anéis fenólicos que eles contêm e dos elementos estruturais que ligam esses anéis uns aos outros. As distinções são, assim, efetuadas entre os ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e taninos, lignanos ou ligninas poliméricas (Han *et al.*, 2007; Palafox-Carlos *et al.*, 2011).

### **1.2.2 Os Ácidos Fenólicos**

Os ácidos fenólicos são fenóis que possuem uma funcionalidade do ácido carboxílico, estes ácidos são responsáveis por cerca de um terço do consumo total de polifenóis e podem subdividir-se em derivados do ácido hidroxibenzóico, como, por exemplo, o ácido gálico, e derivados do ácido hidroxicinâmico, como, por exemplo, o ácido cafeico, ferúlico e p-cumárico e sináptico (Figura 1.2).



**Figura 1.2** - Estrutura geral dos ácidos fenólicos: (A) Estrutura geral dos ácidos hidroxibenzóicos e (B) Estrutura geral dos ácidos hidroxicinâmicos (Gomes, 2010).

O teor em ácidos hidroxibenzóicos de plantas comestíveis é geralmente muito baixo, com exceção de alguns frutos vermelhos, rabanete preto e cebola, que podem ter concentrações de várias dezenas de miligramas por quilograma de peso fresco. O chá é uma importante fonte de ácido gálico. Além disso, os ácidos hidroxibenzóicos são componentes de estruturas complexas, tais como taninos hidrolisáveis (galotaninos em mangas e elagitaninos em frutos vermelhos, como morangos, framboesas e amoras) (Manach *et al.*, 2004).

Os ácidos hidroxicinâmicos são raramente encontrados na forma livre, exceto em alimentos processados que sofreram congelamento, esterilização, ou fermentação. As formas ligadas são derivados glicosilados ou ésteres de ácido quínico, ácido chiquímico e ácido tartárico. O éster de ácido cafeico e ácido quínico, o ácido clorogénico, encontra-se em muitos tipos de frutos e em concentrações elevadas no café (Manach *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2007; Leopoldini *et al.*, 2011). Os ácidos clorogénico e cafeico mostraram ser antioxidantes e exercer um efeito inibitório sobre a reação de *N*-nitrosação *in vitro*, inibindo, deste modo, a formação de compostos *N*-nitroso potencialmente mutagénicos e carcinogénicos (Han *et al.*, 2007). Os frutos que têm o maior teor nestes ácidos são mirtilos, kiwis, ameixas, cerejas e maçãs.

O ácido cafeico é geralmente o ácido fenólico mais abundante nos frutos representando, na maior parte dos casos, entre 75 % a 100 % do conteúdo total de ácidos hidroxicinâmicos. Os ácidos hidroxicinâmicos são encontrados em todas as partes do fruto, embora as concentrações mais elevadas sejam encontradas nas partes exteriores do fruto maduro. As concentrações geralmente diminuem durante o curso de amadurecimento, mas as quantidades totais aumentam à medida que os frutos aumentam em tamanho. O ácido ferúlico é o ácido fenólico mais abundante nos grãos de cereais, que constituem a sua principal fonte alimentar (Manach *et al.*, 2004).

### 1.2.3 Os Flavonóides

Os flavonóides apresentam uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos (denominados anel A e B) unidos por um anel heterocíclico que contém um átomo de oxigênio (anel C) (Figura 1.3).

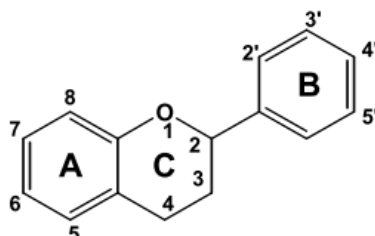


Figura 1.3 - Estrutura básica dos flavonóides (Gomes, 2010).

De acordo com o grau de oxidação do anel C, o padrão de hidroxilação e o substituinte no átomo de carbono 3 os flavonóides podem ser classificados em subclasses flavonóis (quercetina, miricetina, kaempferol), flavonas (luteolína, apigenina), isoflavonas (genisteína, daidzeína), flavanonas (hesperetina, naringenina), flavanóis (catequina, epicatequina, galactocatequina) e antocianidinas (cianidina, malvidina, petunidina) (Figura 1.4)

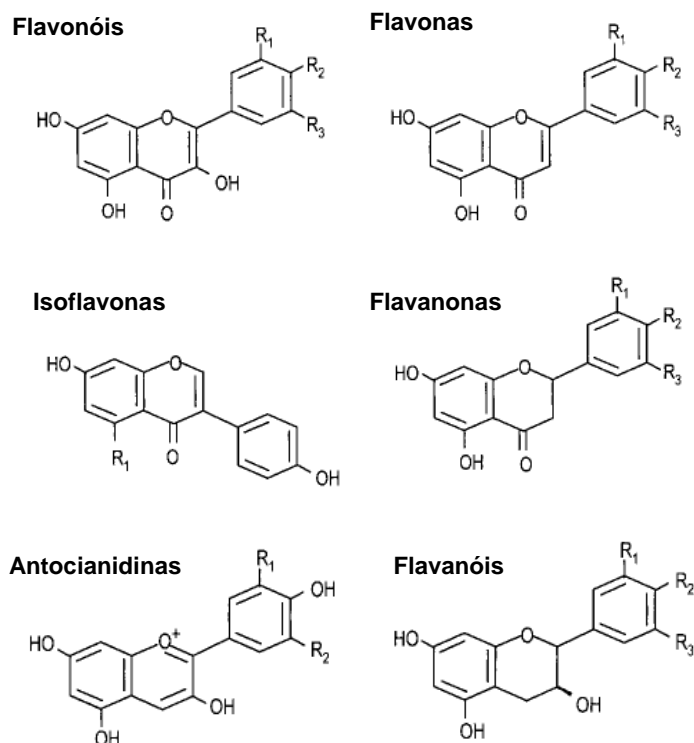


Figura 1.4 - Estrutura básica das diversas classes de flavonóides (Manach *et al.*, 2004).

Muitos flavonóides ocorrem naturalmente como glucósidos, principalmente, de D-glucose, L-ramnose, galactose e arabinose. Os flavonóis são os flavonóides mais onipresentes nos alimentos, estando, geralmente, presentes em concentrações relativamente baixas de 15 a 30 mg/kg de peso fresco. As fontes mais ricas são as cebolas, couve-flor, alho-porro, brócolos e mirtilos. Os flavonóis acumulam-se nos tecidos exteriores e elevatórios dos vegetais (pele e folhas), porque a sua biossíntese é estimulada pela luz. Deste modo, verifica-se a existência de diferenças marcantes na concentração destes compostos entre frutos da mesma árvore e até mesmo entre os diferentes lados de uma única peça de fruta, dependendo da exposição à luz solar. Da mesma forma, em vegetais folhosos, como alface e repolho, a concentração de glicosídeos de flavonóis é cerca de 10 vezes maior nas folhas externas verdes do que nas folhas de cor clara internas (Manach *et al.*, 2004).

As flavonas são muito menos comuns do que flavonóides em frutas e legumes, sendo a salsa e o aipo as suas principais fontes alimentares. As flavanonas encontram-se no tomate, plantas aromáticas e, principalmente, nos citrinos. As isoflavonas encontram-se em leguminosas e, por apresentarem algumas semelhanças estruturais com os estrogénios, têm propriedades pseudo-hormonais, sendo por isso designadas por fitoestrogénios. Os flavanóis podem existir nos alimentos na forma monomérica ou polimérica (taninos condensados ou proantocianidinas), não ocorrendo nos alimentos em formas glicosiladas. Os frutos e principalmente o chá e o chocolate constituem as principais fontes destes compostos (Manach *et al.*, 2004)

Quando as antocianidinas se encontram na sua forma de glicosídeo são conhecidas como antocianinas (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009). As antocianinas são pigmentos que originam as cores, vermelho, cor -de-rosa, azul ou roxo de frutos, plantas, flores e folhas. Elas existem em diferentes formas químicas, tanto coloridos como sem cor, de acordo com o pH (McDougall *et al.*, 2007). As antocianinas isoladas são altamente instáveis e muito suscetíveis à degradação. A sua estabilidade é afetada por vários fatores tais como pH, temperatura de armazenamento, estrutura química, concentração, luz, oxigénio ou iões metálicos (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009). Apesar de serem altamente instáveis na forma de agliconas (antocianidinas), enquanto estiverem em plantas são resistentes ao pH e às condições de luz e de oxidação, sendo a sua degradação evitada por glicosilação. Além disso, as antocianinas são estabilizadas através da formação de complexos com outros flavonóides (copigmentação). As antocianinas encontram-se em concentrações elevadas em frutos como os mirtilos, cerejas, morangos ou amoras e no vinho tinto (Manach *et al.*, 2004).

Os flavonóides são antioxidantes eficazes quer pela sua capacidade para eliminar radicais livres, quer pelas suas propriedades como agentes quelantes de iões metálicos. Os flavonóides inibem a enzima óxido nítrico sintase, que gera óxido nítrico, o qual, para além de ser uma espécie radicalar, pode, por sua vez, originar a formação de peroxinitrito (Knekt *et al.*, 2002; Leopoldini *et al.*, 2011). Contudo, sob certas condições, os flavonóides, podem também comportar-se como pro-oxidantes.

Diferentes atividades biológicas, incluindo actividade antibacteriana, antitrombótica, vasodilatadora, anti-inflamatória e anticancerígena, mediadas por diferentes mecanismos, estão associadas aos flavonóides. Estudos *in vitro* indicam diferenças consideráveis no potencial antioxidante de diferentes subgrupos de flavonóides, em função das suas estruturas químicas. Mais ainda, essas diferenças de estrutura implicam, igualmente, diferenças na biodisponibilidade, distribuição e metabolismo dos diferentes flavonóides (Knekt *et al.*, 2002).

Os flavonóides têm demonstrado efeitos antiproliferativos, sendo capazes de induzir a apoptose em diferentes linhas celulares tumorais e inibir a invasão e a formação de metástases. Os flavonóides parecem conseguir modular as vias de transdução de sinal inibindo a proliferação de células tumorais. Os flavonóides parecem inibir a agregação e aderência plaquetária contribuindo para a diminuição do risco de desenvolvimento de trombozes e da aterosclerose. Estes compostos, parecem também aumentar a vasodilatação ao induzir o relaxamento do músculo liso vascular. As investigações bioquímicas dos mecanismos de ação de flavonóides demonstraram que estes compostos podem induzir ou inibir uma grande variedade de sistemas enzimáticos, incluindo a expressão de genes relacionados com as enzimas de biotransformação. O seu consumo está relacionado com uma menor incidência de doenças cerebrovasculares, cancro de pulmão, cancro da próstata, diabetes tipo 2, asma, etc. (Veeriah *et al.*, 2006; Leopoldini *et al.*, 2011).

#### **1.2.4 Outros Polifenóis e antioxidantes**

Os taninos são um grupo de polifenóis de elevado peso molecular solúveis em água e são vulgarmente encontrados complexados com alcalóides, polissacarídeos e proteínas. Estão divididos em dois grupos, os taninos condensados ou proantocianidinas e os hidrolisáveis. Os taninos condensados são polímeros de flavanóis e os taninos hidrolisáveis são polímeros de ácidos hidroxibenzóicos, principalmente ácido gálico, e açúcares, principalmente glucose (Han *et al.*, 2007; Leopoldini *et al.*, 2011).

Os lignanos são formados por duas unidades de fenilpropano. A fonte alimentar mais rica é a linhaça. Outros cereais, grãos, frutas e certos legumes também contêm vestígios destes mesmos lignanos, mas concentrações são muito baixas comparativamente à linhaça (Manach *et al.*, 2004).

Os estilbenos são encontrados apenas em pequenas quantidades na dieta humana e são estruturalmente caracterizados pela presença de um núcleo 1,2- difeniletieno e existem sob a forma de monómeros ou oligómeros. Dentro destes compostos destaca-se o resveratrol, cujos efeitos anticancerígenos têm sido extensivamente estudados (Manach *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2007).

Para além dos polifenóis as vitaminas, em particular as vitaminas C e E e os carotenóides constituem outras importantes classes de antioxidantes veiculados pela dieta. Os carotenóides e compostos relacionados com as cores da natureza, consistem num grupo de mais de 600 pigmentos coloridos que ocorrem naturalmente sendo comuns em plantas, mas apenas cerca de 24 são comuns na alimentação humana. Nas plantas, eles têm funções essenciais como pigmentos acessórios na fotossíntese e fotoproteção. A ingestão de frutas e vegetais ricos em carotenóides tem sido associada à redução do risco de uma variedade de doenças comuns incluindo vários tipos de cancro, doenças cardiovasculares, degeneração macular e formação de cataratas (Palafox-Carlos *et al.*, 2011).

### **1.2.5 Fatores que afetam a presença de polifenóis nos alimentos**

O conteúdo de compostos fenólicos nas plantas varia com a espécie, variedade, o órgão considerado, as condições fisiológicas, o solo, clima e práticas agrícolas (Boyer e Liu, 2004; Carbone *et al.*, 2011; Candrawinata *et al.*, 2013). A exposição à luz tem um efeito considerável sobre a maioria dos flavonóides. O grau de maturação afeta consideravelmente as concentrações e as proporções dos vários polifenóis. Também o armazenamento pode afetar o conteúdo de polifenóis, que são facilmente oxidados. Em geral, as concentrações de ácidos fenólicos diminuem durante o amadurecimento, enquanto que as concentrações de antocianinas aumentam (Manach *et al.*, 2004).

Os métodos de preparação culinária também têm um efeito significativo sobre o teor de polifenóis dos alimentos. Por exemplo, a moagem de tecidos de plantas pode conduzir à degradação oxidativa de polifenóis como um resultado de rompimento celular e o contacto entre a polifenol-oxidase citoplasmática e substratos fenólicos presentes nos vacúolos. Também o simples facto de retirar a pele de frutos e vegetais pode eliminar uma parte significativa dos polifenóis, porque estas substâncias estão muitas vezes presentes em concentrações mais elevadas nas partes exteriores do que na parte interna (Manach *et al.*, 2004).

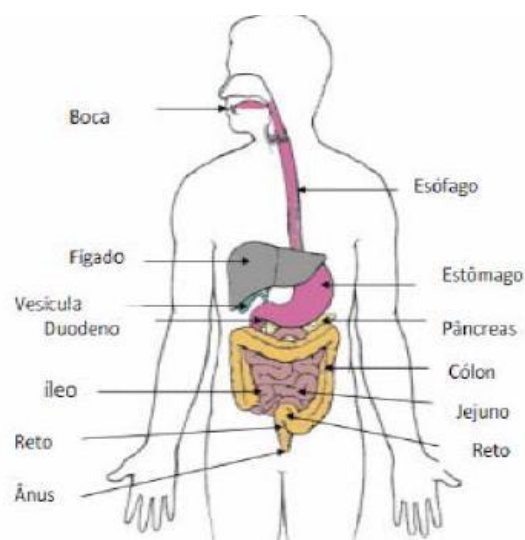
Os polifenóis presentes na pele e sementes de frutos podem servir como fontes naturais de antioxidantes. Com efeito, o processamento dos frutos comestíveis para a produção de sumos naturais, sumos concentrados, doces em conserva ou polpas gera sementes e cascas como desperdício que em vez de serem descartadas podem se utilizadas e valorizadas na obtenção de polifenóis puros ou de extratos ativos. A substituição de

antioxidantes sintéticos por naturais pode apresentar vantagens devido a implicações na área de saúde e na funcionalidade. Os antioxidantes naturais têm como vantagem uma maior solubilidade tanto em água como em óleo que é útil na preparação de emulsões e outras formulações, como os hidrogéis (De Oliveira *et al.*, 2009).

### 1.3 O Processo digestivo

A digestão humana é extracelular, pois ocorre no interior do tubo digestivo, e compreende processos físicos (mecânicos) como a mastigação, a deglutição e os movimentos peristálticos e processos químicos, graças à ação das enzimas secretadas por glândulas anexas em várias partes do aparelho digestivo. Enzimas estas que promovem a hidrólise enzimática das macromoléculas ingeridas (proteínas, lípidos, glícidos e ácidos nucleicos) na presença da água, de forma que estas sejam transformadas em unidades capazes de serem absorvidas para a corrente sanguínea pelas células da mucosa gastrointestinal (Gaboardi, 2013; Thiemann, 2013).

O aparelho digestivo humano possui um tubo musculoso, que engloba a boca, faringe, esófago, estômago, intestino delgado, intestino grosso e ânus, ao qual ainda estão associados órgãos e glândulas que participam na digestão (Figura 1.5) (Lidon e Silvestre, 2010).



**Figura 1.5** - Sistema digestivo humano, incluindo o trato gastrointestinal e órgãos anexos (Giori, 2010)

De forma resumida nos seres humanos, o processo digestivo começa na boca ou cavidade bucal, onde a desagregação mecânica e química do alimento tem lugar, dá-se a degradação inicial de polissacarídeos e triglicerídeos durante a mastigação e ensalivação (por ação dos dentes e língua, que tende a facilitar a ação enzimática). A saliva é composta predominantemente por água, que propicia a fluidificação do alimento, muco, que lubrifica, amacia e facilita a deglutição. A principal enzima da saliva é a amilase salivar que inicia a digestão de glúcidos, o amido é hidrolisado a oligossacarídeos e maltose e os taninos são precipitados pelas proteínas salivares (Lidon e Silvestre, 2010; Bouayed *et al.*, 2011; Gião *et al.*, 2011). Outras enzimas presentes na saliva como a maltase e catalase são de menor importância porque são produzidas em quantidades menores. O gosto é então detetado pelas papilas linguais localizadas sobre a superfície da língua. Os odores são detetados pelos recetores do olfato inseridos na porção elevada do nariz. O paladar diferencia somente, o doce, o ácido, o salgado, o amargo e o umami (Lidon e Silvestre, 2010; Thiemann, 2013).

Subsequentemente, o bolo alimentar é deglutido para a faringe que através de movimentos voluntários (ondas de contrações e relaxamentos musculares ritmado) fazem com que progrida para o esôfago e deste para o estômago e depois para o intestino delgado.

As glândulas localizadas na parede estomacal produzem diariamente cerca de três litros de uma mistura contendo muco, água, ácido clorídrico, enzimas e sais, o suco gástrico. A secreção ácida é estimulada por impulsos nervosos que chegam ao estômago, pela gastrina e pela histamina. O suco gástrico dissolve o cimento intercelular dos alimentos, auxiliando a fragmentação mecânica iniciada pela mastigação. A água constitui um importante mecanismo fluidificador dos alimentos, o muco lubrifica o bolo alimentar, além de proteger a parede do estômago contra a ação das enzimas gástricas e do ácido clorídrico. O ácido facilita a fragmentação de diversas macromoléculas, proporciona um pH ótimo para a digestão proteica e contribui para a ativação de enzimas presentes no suco gástrico, o pH ácido ativa o pepsinogénio em pepsina, além de exercer uma ação germicida. As enzimas do suco gástrico são a pepsina, lipase gástrica e amilase gástrica. A pepsina é uma enzima proteolítica, que tem o máximo de atividade a pH ácido (pH 2,0) tornando-se inativa a valores de pH superiores a 5,0. A ação do suco gástrico sobre o bolo alimentar dá origem ao quimo (Lidon e Silvestre, 2010; Thiemann, 2013).

Do estômago o quimo passa para o intestino delgado estimulando a mucosa duodenal a produzir as hormonas secretina e pancreosina, que, por sua vez, estimulam o pâncreas a secretar o suco pancreático contendo água, enzimas (tripsina, quimotripsina, amilase pancreática, lipase pancreática, ribonuclease e desoxirribonuclease), e grandes quantidades de bicarbonato de sódio para neutralizar a acidez do quimo e, assim, garantir a ação das enzimas pancreáticas. As enzimas proteolíticas são secretadas numa forma inativa sendo ativadas apenas quando atingem o trato digestivo (Lidon e Silvestre, 2010; Thiemann, 2013). No duodeno é igualmente descarregada a bílis proveniente da vesícula biliar. A bílis não apresenta enzimas digestivas mas possui sais biliares (glicolato e taurocolato de sódio) que

emulsionam as gorduras. O suco entérico é produzido pelo epitélio glandular das criptas de Lieberkuhen, localizadas no intestino delgado. Este suco contém muco, cuja função é proteger a parede intestinal contra uma autodigestão, e diversas enzimas que activam as enzimas pancreáticas e que completam a digestão de glúcidos e proteínas. No intestino o quimo é transformado em quilo, que apresenta então uma composição rica em açúcares simples, aminoácidos, ácidos gordos e glicerol (Lidon e Silvestre, 2010; Gião *et al.*, 2011; Bouayed *et al.*, 2011; Gaboardi, 2013; Thiemann, 2013).

Os nutrientes nas suas formas mais simples são então absorvidos através da parede intestinal, enquanto a água é reabsorvida. No intestino grosso (que não possui vilosidades nem secreta sucos digestivos) ocorre, então, a absorção de água, quer a ingerida quer a proveniente das secreções digestivas, e sais, e, por ação de numerosas bactérias que compõem a flora intestinal, processa-se a dissolução de restos alimentícios não assimiláveis, conduzindo assim à formação de fezes. A fermentação bacteriana que ocorre no intestino grosso colónico também desempenha um papel chave na liberação de nutrientes e não nutrientes, tornando-os disponíveis para a absorção através da barreira intestinal (Lidon e Silvestre, 2010; Bouayed *et al.*, 2011; Gião *et al.*, 2011; Gaboardi, 2013; Thiemann, 2013).

#### **1.4 Bioacessibilidade e Biodisponibilidade de Polifenóis**

Um dos principais temas a respeito dos efeitos benéficos dos polifenóis é a sua biodisponibilidade e destino metabólico. A investigação sobre a biodisponibilidade de compostos fenólicos e outros antioxidantes de matrizes sólidas é importante, uma vez que apenas os compostos libertados da matriz do alimento e/ou absorvidos no intestino delgado ficam biodisponíveis e em condição de serem utilizados para as funções do corpo, podendo, assim, exercer os seus efeitos benéficos (Briones-Labarca *et al.*, 2011; Palafox-Carlos *et al.*, 2011).

A bioacessibilidade é definida como a quantidade de cada composto ingerido que fica disponível para absorção no intestino após digestão. Por outro lado, o termo biodisponibilidade é por vezes utilizado numa visão mais ampla que já contempla a quantidade disponível no local de ação, ou seja, já envolve a fração assimilada pelas células. A biodisponibilidade dos nutrientes é normalmente determinada pela medição da sua concentração plasmática (ensaio *in vivo*). Tanto a bioacessibilidade como a biodisponibilidade dependem das características dos compostos e da matriz alimentar em que estão inseridos e, ainda, de fatores de variabilidade individual, como, por exemplo a acidez do estômago ou as concentrações e atividades enzimáticas, o estado fisiológico, a dose de cada composto e a natureza dos outros componentes da refeição. Em muitos casos, a biodisponibilidade e bioacessibilidade dos nutrientes são regidas pelas propriedades físicas da matriz alimentar, que afetam a eficiência do processo de digestão (Parada e Aguilera, 2007; Bouayed *et al.*, 2011).

Vários estudos têm realçado a fraca biodisponibilidade de vários grupos de polifenóis refletida pela sua baixa concentração no plasma. Com efeito, mesmo quando ingeridos em quantidades relevantes na dieta, as concentrações plasmáticas dos antioxidantes, após ingestão normal, raramente ultrapassam os nanomolares (Palafox-Carlos *et al.*, 2011).

A biodisponibilidade dos polifenóis depende de uma variedade de fatores, incluindo a liberação a partir da matriz durante a digestão gastrointestinal, o metabolismo pela flora intestinal, a eficiência da sua passagem transepitelial, a absorção celular, o metabolismo intracelular, a distribuição e a excreção (Tagliazucchi *et al.*, 2010; Bouayed *et al.*, 2011; Gião *et al.*, 2011).

A digestão é um processo fisiológico que permite a extração de macronutrientes, micronutrientes e fitoquímicos a partir da matriz de alimento, para a absorção subsequente (Bouayed *et al.*, 2011). O trato gastrointestinal pode ser considerado como um extrator onde tanto a ação mecânica, como a ação química e enzimática contribuem para a extração de compostos fenólicos de matrizes sólidas (Tagliazucchi *et al.*, 2010). Assim, para avaliar o significado biológico dos polifenóis sobre a saúde humana é necessário conhecer não só os níveis de ingestão mas também a quantidade que apresenta biodisponibilidade (Gião *et al.*, 2011). Apenas os polifenóis que são solubilizados a partir da matriz do alimento e que não são destruídos durante a digestão gastrointestinal são realmente bioacessíveis e, por conseguinte, potencialmente biodisponíveis (Tagliazucchi *et al.*, 2010).

O metabolismo de polifenóis ocorre através de uma via comum. A maior parte dos polifenóis estão presentes na alimentação sob a forma de ésteres, glicosídeos, ou polímeros que não podem ser absorvidos na sua forma nativa. Estas substâncias têm de ser hidrolisadas pelas enzimas intestinais ou pela microflora do cólon antes de poderem ser absorvidas. Quando a flora está envolvida, a eficiência de absorção é frequentemente reduzida porque a flora também degrada as agliconas produzindo diversos ácidos aromáticos simples. Depois de absorvidos os polifenóis são metabolizados, no intestino delgado e no fígado, sofrendo, principalmente metilação, sulfatação e glucuronidação (Manach *et al.*, 2004).

Sabe-se que os polifenóis são capazes de penetrar nos tecidos, particularmente aqueles em que eles são metabolizados, mas a sua capacidade de se acumular no interior de tecidos-alvo específicos ainda necessita mais investigação. Os polifenóis e os seus derivados são eliminados principalmente na urina e bÍlis. Estes são segregados através da via biliar para o intestino, onde podem ser submetidos à ação de enzimas bacterianas, especialmente de glucuronidases, podendo ser reabsorvidos nos segmentos distais do intestino. Esta reciclagem enterohepática pode levar a uma maior presença de polifenóis no interior do corpo (Manach *et al.*, 2004).

Durante a digestão gastrointestinal, os polifenóis podem ou interagir com outros componentes alimentares, ser ainda mais degradados (tais como antocianinas no intestino delgado), ou metabolizados, por exemplo, por hidrólise. Essas mudanças estruturais podem afetar tanto a sua posterior absorção como a sua bioatividade (Bouayed *et al.*, 2011). Além

disso, mais efeitos indiretos da dieta em vários parâmetros da fisiologia do intestino (pH, fermentações intestinais, excreção biliar, tempo de trânsito, etc.) podem ter consequências sobre a absorção dos polifenóis. As enzimas transportadoras envolvidas na absorção e metabolismo dos polifenóis também podem ser induzidas ou inibidas pela presença de alguns micronutrientes ou xenobióticos (Manach *et al.*, 2004).

Desta forma, a atribuição inequívoca de atividade antioxidante biológica, mesmo que detetada *in vitro*, a compostos isolados e identificados de um extrato não é fácil, pois vários fatores têm de ser avaliados. A biodisponibilidade de cada antioxidante difere grandemente devido à enorme diversidade estrutural e à origem dietética e os antioxidantes mais abundantes em frutos ingeridos não são necessariamente os que conduzem a maiores concentrações de metabolitos ativos nos tecidos-alvo, quer seja porque têm uma atividade intrínseca inferior ou porque são pouco absorvidos a partir do intestino, altamente metabolizado, ou rapidamente eliminados. Dentro dos vários fatores que influenciam este parâmetro, há que ter em conta, a estabilidade sob condições gastrointestinais e a libertação a partir da matriz alimentar, especialmente a partir de sólidos, o pH, a temperatura, presença de inibidores ou potenciadores de absorção, a presença de enzimas, hospedeiro, a ação sinérgica dos constituintes supostamente ativos, interações químicas com outros fitoquímicos e biomoléculas presentes nos alimentos sua absorção pelo sistema gastrointestinal, possíveis atividades tóxicas colaterais, velocidade de metabolização e excreção, etc. (Manach *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2007; Parada e Aguilera, 2007; De Oliveira *et al.*, 2009; Tagliazucchi *et al.*, 2010; Bouayed *et al.*, 2011; Palafox-Carlos *et al.*, 2011).

Por exemplo, a muito baixa biodisponibilidade de antocianinas pode ser atribuída, pelo menos parcialmente, à elevada instabilidade destas moléculas nas condições alcalinas do intestino delgado. A partir de estudos sobre a simulação da digestão gastrointestinal humana verificou-se que as antocianinas, embora estáveis nas condições ácidas do estômago, são menos estáveis ao pH elevado do intestino delgado (McDougall *et al.*, 2007; Tagliazucchi *et al.*, 2010).

A fibra dietética, a componente da parede celular indigerível de material vegetal, considera-se desempenhar um papel importante na dieta humana e na saúde, no entanto, há evidências indicando que estes açúcares complexos interagem diretamente com os antioxidantes e interferem com a assimilação adequada destes compostos. Atualmente existem evidências que indicam que a microestrutura dos alimentos afeta a biodisponibilidade, principalmente dos antioxidantes (Manach *et al.*, 2004; Parada e Aguilera, 2007; Palafox-Carlos *et al.*, 2011). Independentemente da sua biodisponibilidade, os polifenóis alimentares podem desempenhar um papel importante na proteção do próprio trato gastrointestinal de danos oxidativos e cancro. Os compostos que estão presentes em baixas concentrações no plasma podem estar presentes no lúmen do gastrointestinal em concentrações muito maiores após o consumo direto de uma refeição rica em vegetais, fruta e seus derivados. Neste caso, os fatores mais importantes para determinar os potenciais efeitos benéficos dos polifenóis sobre

as células epiteliais do intestino são a sua estabilidade e a sua bioacessibilidade sob condições gastrointestinais (Tagliacruzchi *et al.*, 2010).

### 1.5 Simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal

Muitas técnicas têm sido propostas para a quantificação da biodisponibilidade dos compostos veiculados pela alimentação. Os métodos mais confiáveis para estudos de biodisponibilidade consistem na medição da absorção *in vivo* em seres humanos utilizando uma técnica de marcação. Os ensaios *in vivo* com humanos são, contudo, demorados, muito caros, e complicados, para além de produzirem resultados variáveis. Os métodos *in vitro* estão a ser amplamente utilizados no presente, uma vez que são rápidos, seguros e não têm as restrições éticas dos métodos *in vivo*. Os métodos *in vitro* consistem em simular os processos de digestão e absorção (para biodisponibilidade) ou apenas o processo de digestão (para bioacessibilidade) e a resposta medida é a concentração de um nutriente em algum tipo de extrato final, permitindo desta forma estudar as mudanças que ocorrem nos componentes da dieta durante a digestão gástrica e intestinal, e os fatores que afetam a sua disponibilidade (Parada e Aguilera, 2007; Bouayed *et al.*, 2011; Briones-Labarca *et al.*, 2011).

Tem sido demonstrado que os modelos de avaliação da biodisponibilidade pelo método *in vitro* podem ser bem correlacionados com os resultados de estudos em seres humanos e animais (Bouayed *et al.*, 2011). Os modelos de simulação da digestão gastrointestinal (modelos GI) tentam reproduzir as condições fisiológicas da boca, estômago e intestino delgado durante a mastigação, digestão e absorção. De um modo geral, dividem-se em duas grandes categorias: modelos estáticos ou seja modelos que não imitam os processos físicos, tais como corte, mistura, hidratação, e assim por diante, enquanto os modelos dinâmicos incluem processos físicos e mecânicos e mudanças temporais nas condições luminais para imitar as condições *in vivo*. Estes últimos são especialmente úteis quando a condição física da digestão (mistura de partículas de alimentos ingeridos e fluidos liberados durante a digestão) muda ao longo do tempo (por exemplo, tamanho de partícula e viscosidade). O processo de digestão num modelo GI estático é simulado sob condições controladas utilizando enzimas digestivas comerciais, por exemplo, a pepsina gástrica e a pancreatina (mistura das enzimas pancreáticas), enquanto que o processo de absorção final é geralmente avaliado utilizando culturas de células Caco-2. A linha celular Caco-2 consiste numa linha imortalizada de células de carcinoma do cólon humano, que expressa os diversos transportadores celulares (Parada e Aguilera, 2007).

A determinação da biodisponibilidade/bioacessibilidade dos polifenóis constitui um passo importante para a verificação da manutenção das propriedades bioativas verificadas *in vitro* para a realidade *in vivo*. Com efeito, os polifenóis bioacessíveis presentes num determinado alimento podem diferir quantitativa e qualitativamente dos extraídos com métodos

químicos. Deste modo, os mais polifenóis bioacessíveis não são necessariamente aqueles que se encontram presentes em maior concentração nos alimentos (Tagliazucchi *et al.*, 2010).

Verificou-se em estudos que os polifenóis com a maior atividade antioxidante a pH ácido não são necessariamente aqueles com a atividade antioxidante mais elevada, a pH neutro ou ligeiramente alcalino. Neste sentido, pode especular-se que as células intestinais podem ser mais eficientemente protegidas contra o *stress* oxidativo por polifenóis que tenham uma maior capacidade sequestrante a pH alcalino enquanto que no estômago podem ter maior efeito os polifenóis que possuam maior capacidade sequestrante a pH ácido (Tagliazucchi *et al.*, 2010). Em geral, tanto o estômago como o trato intestinal estão constantemente expostos a ROS. Assim, os antioxidantes, mesmo quando não absorvidos, podem desempenhar um papel importante na prevenção de doenças do trato gastrointestinal resultantes da atuação das ROS geradas no lúmen do intestino (Bouayed *et al.*, 2011).

## 1.6 Alimentos Funcionais

Os estudos realizados que correlacionam a alimentação com a saúde são cada vez mais e as provas de que a alimentação é fundamental para promover um bom funcionamento do organismo e prevenir doenças são claras. Por esta razão cientistas e indústrias alimentares investem cada vez mais na pesquisa, de forma a conhecer os principais compostos responsáveis pelos benefícios na saúde, para melhorarem e criarem novos produtos com o objetivo de promoverem uma vida mais saudável e, desta forma, prevenir doenças. A dieta alimentar humana deve ser completa, equilibrada e variada, devendo incluir alimentos de todos os grupos alimentares, mesmo que em quantidades diferentes. Os alimentos naturais, principalmente os de origem vegetal, como as frutas e hortaliças, que desde a antiguidade são referidos como essenciais por terem propriedades benéficas, devem ser ingeridos em maior quantidade. Já as gorduras e os açúcares deverão ser consumidos com moderação e em quantidades menores. O essencial é reunir através da alimentação todas as substâncias nutritivas, nomeadamente, proteínas, ácidos gordos, açúcares, vitaminas e minerais nas quantidades ideais para um ótimo funcionamento do organismo e manutenção de um estado fisiológico saudável (Lidon e Silvestre, 2010).

No entanto, as condições ideais nem sempre são realistas e o estilo de vida moderno reflete-se numa vida com falta de tempo para preparar refeições equilibradas e a procura de soluções rápidas que na maioria das vezes não são as mais saudáveis. Associado à alimentação incompleta e inadequada têm-se verificado um crescimento de doenças crónicas degenerativas e outras como a obesidade e diabetes ligadas aos consumos excessivos de gorduras e açúcares e à falta de alimentos de origem vegetal. Assim, os alimentos naturalmente enriquecidos nutricionalmente poderão ser uma mais-valia no reforço dietético, sem necessidade de recorrer a suplementos. Os alimentos funcionais muito referidos hoje em dia, são alimentos ou ingredientes que para além das propriedades nutricionais básicas,

apresentam efeitos metabólicos e fisiológicos benéficos para a saúde, quando consumidos usualmente na dieta (Lidon e Silvestre, 2010).

As frutas e legumes são incluídos no grupo dos alimentos funcionais por serem capazes de promover a boa saúde e prevenir ou aliviar doenças (Kaur e Kapoor, 2001). Com efeito, estudos epidemiológicos têm descrito os efeitos benéficos do consumo de frutas e vegetais com elevado teor de compostos fenólicos para a prevenção de doenças humanas, tais como as cataratas, diabetes, doença de Alzheimer, asma e doenças cardio e cerebrovasculares e cancro, especialmente do trato gastrointestinal. Os efeitos de proteção fornecidos por frutas e legumes contra estas doenças, que são marcadamente associadas com o *stress* oxidativo, têm sido atribuídos à presença de compostos antioxidantes, em particular de polifenóis (Boyer e Liu, 2004; Bouayed, 2010; Tagliazucchi *et al.*, 2010; Landete, 2012).

Desta forma a determinação da capacidade antioxidante em frutas e legumes é fundamental tendo em conta que fazem parte da alimentação diária da população e podem por isso contribuir fortemente para a melhoria da saúde e bem-estar reduzindo o risco de doenças, que se traduz numa melhoria na qualidade de vida. A fruta é um dos alimentos mais nutritivos na dieta humana. O valor dietético destes alimentos baseia-se principalmente no seu teor em fibras e micronutrientes, assim como em substâncias bioativas não nutricionais, nomeadamente, os fitoquímicos, incluindo compostos polifenólicos (Candrawinata *et al.*, 2013). Há que ter em conta que o valor nutricional e atividade biológica relacionada com a ingestão de frutos dependem não só da concentração, mas também da quantidade desses alimentos consumidos diariamente. As maçãs são uma das principais frutas frequentemente consumidas. Desta forma os compostos fenólicos da maçã como fonte de antioxidantes na dieta podem fornecer uma proteção essencial contra os radicais livres e consequentes contra as doenças associadas aos danos oxidativos (Lee *et al.*, 2003).

## 1.7 As Maçãs

As maçãs são frutas conhecidas e difundidas do género *Malus* (cerca de 25 espécies), pertencente à família *Rosaceae*, e sub-família das *Pomóideas* (Ferreira, 1994; Cindrić, *et al.*, 2012). A cultura da árvore que dá maçãs, comumente chamada de macieira mas que também tem outros nomes de uso mais regional como "maceira", "maçãzeira" e "maçaneira" ou "maçaneira", já era praticada cinco séculos antes de Cristo pelos gregos e romanos que a espalharam pela Europa e Ásia. Na idade média concentrou-se sobretudo nas zonas de influência das ordens religiosas. Diversas variedades foram selecionadas e propagadas por enxertia há mais de 2000 anos. Quando os europeus se instalaram nos novos mundos, muitas maçãs foram levadas para essas regiões e as suas sementes deram origem a novas variedades (Ferreira, 1994).

A maçã é uma boa fonte de componentes nutritivos e não-nutrientes. As maçãs têm um papel importante na dieta humana devido aos seus monossacáridos, minerais, fibras, vitamina C e determinados compostos fenólicos (Balázs *et al.*, 2012). As maçãs estão entre os frutos mais amplamente cultivados e consumidos, sendo a *Malus domestica* a espécie mais comum, principalmente devido à sua disponibilidade ao longo de todo o ano. Há muitas variedades de maçãs com diferentes tamanhos, formas, conteúdos de açúcar, níveis de acidez e firmeza (Candrawinata *et al.*, 2013).

As variedades em estudo neste trabalho fazem parte das variedades mais consumidas e apreciadas no nosso país e entre elas apresentam diferenças significativas de aspeto e de características sensoriais. As variedades estudadas foram a Reineta, Granny Smith e Starking/Red Delicious, cujas características são referidas de seguida.

### 1.7.2 Maçã Reineta

A maçã Reineta corresponde a uma variedade de maçã muito vigorosa e rústica tendo os seus frutos grande procura. Esta variedade tem origem na França, sendo uma mutação brozeada da Reineta do Canadá. A época de colheita é em princípios de Setembro, sendo que esta maçã apresenta grande sensibilidade à queda em pré-colheita. A árvore apresenta um porte pendente, ramificação pouco numerosa, vigorosa de madeira flexível. A sua produtividade é média, apresenta uma lenta entrada em produção, sendo que frutifica principalmente em madeira velha (de mais de 3 anos) com uma alternância média. No que respeita à resistência às doenças esta variedade é pouco sensível ao pedrado, medianamente sensível ao oídio, muito sensível ao cancro (*Nectria galligena* Bres.) (Ferreira, 1994).

Esta maçã apresenta um calibre grande e irregular, tem uma forma achatada com assimetrias no desenvolvimento, apresentando uma epiderme rugosa, frágil, pouco cerosa, parda e muito sensível ao fendilhamento (Figura 1.6). O seu pedúnculo é muito curto e grosso e a sua polpa é sucosa, acídula, doce e agradavelmente perfumada.



Figura 1.6 - Aspecto da maçã Reineta.

### 1.7.3 Maçã Granny Smith

Em Portugal há condições para a cultura da variedade Granny Smith, sobretudo nas regiões mais quentes. Todavia, se não for colhida verde, os frutos coram com frequência, característica de melhor qualidade mas que não é admitida pela normalização. A variedade Granny Smith tem origem na Austrália, Sidney. A árvore apresenta um porte ereto com ramificação pendente e tendência para o desguarnecimento, sendo muito vigorosa. A sua produtividade é média a elevada e é muito sensível ao pedrado, sensível ao oídio e ao cancro (*Nectria galligena* Bres) (Ferreira, 1994).

Os frutos (Figura 1.7) apresentam um calibre médio e homogêneo, uma forma semi-elevada, levemente tronco-cônica, regular. A sua epiderme apresenta uma cor verde ficando amarela quando madura, têm cutícula espessa, resistente, cerosa, com laivos de vermelho violáceo do lado do sol, lentículas redondas brancas muito evidentes. O pedúnculo é comprido, fino e flexível. Quanto à sua polpa esta é branca, fina, consistente, muito sucosa, pouco doce, acidula, discretamente aromática, farinha quando madura.



Figura 1.7 - Aspecto da maçã Granny Smith

### 1.7.4 Maçã Starking delicious/Red delicious

A maçã Starking é um clone da variedade Delicious e é originária de um rebento de raiz dum porta-enxerto que frutificou em 1872 no estado de Iowa nos Estados Unidos da América. A árvore apresenta um porte semi-ereto é muito vigorosa e muito sensível às baixas temperaturas durante a floração. A sua produtividade é boa mas tem uma entrada lenta em produção e frutifica essencialmente em madeira de dois e três anos. Quanto à resistência às doenças é pouco sensível ao oídio muito sensível ao pedrado (*Venturia inequalis* Wint), muito

sensível ao cancro (*Nectria galligena* Bres) e ao cancro papiráceo (*Diaporthe pernicioso*), muito sensível à asfixia radicular, aos ácaros e aos afídeos (Ferreira, 1994).

O fruto apresenta um calibre médio a grande, irregular, a sua forma é alongada, tronco-cônica, costada (5 lóbulos junto à fossa apical) e irregular. Apresenta uma epiderme vermelha estriada em parte ou na quase totalidade do fruto, sobre fundo amarelo. O pedúnculo é de comprimento médio e inclinado. A polpa apresenta-se branca creme, fina, consistente, sucosa, doce, aromática (ananás) pouco acidula e muito agradável (Figura 1.8). A sua conservação não deve ultrapassar os seis meses a + 2° C. Perde rapidamente a qualidade após a saída do frigorífico (farinamento). É sensível ao escaldão e acastanhamento interno e por vezes mantém a cavidade pistilar aberta, o que permite a infeção do interior do fruto.



**Figura 1.8** - Aspecto da maçã Starking.

#### **1.7.5 Características Nutricionais da Maçã**

De uma forma geral, os frutos têm uma composição variada e equilibrada. Eles são moderadamente enérgicos, no que diz respeito a ingestão de calorias e são bem equilibrados em teor de açúcar e de ácido, apresentando um sabor agradável, que é geralmente apreciado pelos consumidores. A porção comestível maçãs frescas contém 75 a 95% de água, em que os minerais como K, Mg, Ca e Na e oligoelementos, tais como o Mn, Cu, Fe, B, F, Se e Mo se encontram dissolvidos. Uma grande diversidade de vitaminas está presente, mas as vitaminas do complexo B são as mais abundantes. O conteúdo de fibra, como pectinas, celulose, hemicelulose e lenhina, nas maçãs é elevado quando comparado com o de outros frutos frescos. As proteínas e os lipídios dão um pequeno contributo ao suprimento energético devido às suas concentrações relativamente pequenas (Feliciano *et al.*, 2010; Cindrić *et al.*, 2012).

As maçãs constituem uma importante parte da dieta humana, pois elas são uma fonte de açúcares, ácidos e vários compostos biologicamente ativos, tais como os compostos

fenólicos, que são responsáveis pela maior parte da sua atividade antioxidante. A concentração destes compostos fenólicos, particularmente das antocianinas, é fortemente dependente do modo de cultivo e da maturidade das maçãs e está intimamente relacionado com as suas qualidades nutricionais e sensoriais, tais como o sabor e cor. Além disso, estudos recentes têm mostrado que a colheita da maçã também pode influenciar substancialmente a atividade antioxidante total e outros aspetos físico-químicos, tais como a cor, a matéria seca, o pH e o teor total de sólidos solúveis, açúcares, ácidos fenólicos e antocianinas. Estes parâmetros podem fornecer informações importantes para o consumidor em termos de reconhecimento de uma fruta mais nutritiva (Vieira *et al.*, 2009). Nas tabelas 1.3 e 1.4 apresenta-se a composição média de maçãs com casca e ainda a informação nutricional analisada por outros autores nas variedades Reineta, Granny Smith e Sarking.

**Tabela 1.3** - Composição média de seis variedades de maçã com casca em vitaminas e minerais (Adaptado de INSA, 2014).

<b>Componentes</b>	<b>Valor por 100 g de parte edível</b>
Energia , kcal	57
Energia , kJ	238
Água, g	82,9
Proteína, g	0,2
Gordura total, g	0,5
<b>Total de Hidratos de Carbono disponíveis, g</b>	13,4
<b>Total de Hidratos de Carbono expresso em monossacáridos, g</b>	13,6
<b>Mono+dissacáridos, g</b>	13,4
<b>Ácidos orgânicos, g</b>	0,20
Álcool, g	0
Amido, g	0
Oligossacáridos, g	0
Fibra alimentar, g	2,1
Ácidos gordos saturados, g	0,1
Ácidos gordos monoinsaturados, g	0
Ácidos gordos polinsaturados, g	0,2
Ácidos gordos trans, g	0
Ácido linoleico, g	0,1
Colesterol, mg	0
<b>Vitamina A total (equivalentes de retinol), ug</b>	4,0
Caroteno, mg	26
Vitamina D, ug	0
$\alpha$ -tocoferol, mg	0,59
Tiamina, mg	0,020
Riboflavina, mg	0,030
Equivalentes de niacina, mg	0,20

**Tabela 1.3 (continuação)** - Composição média de seis variedades de maçã com casca em vitaminas e minerais (Adaptado de INSA, 2014).

Componentes	Valor por 100 g de parte edível
<b>Niacina, mg</b>	0,10
<b>Triptofano/60, mg</b>	0,10
<b>Vitamina B6, mg</b>	0,040
<b>Vitamina B12 , ug</b>	0
<b>Vitamina C, mg</b>	7,0
<b>Folatos, ug</b>	5,0
<b>Cinza, g</b>	0,32
<b>Sódio (Na), mg</b>	6,0
<b>Potássio (K), mg</b>	139
<b>Cálcio (Ca), mg</b>	6,0
<b>Fósforo (P), mg</b>	8,0
<b>Magnésio (Mg), mg</b>	8,0
<b>Ferro (Fe), mg</b>	0,2
<b>Zinco (Zn), mg</b>	0

**Tabela 1.4** - Informação nutricional das variedades Granny Smith, Reineta e Starking (Almeida e Pintado, 2007).

Variedade	Energia (kcal)	Água (g/100g)	Fibra alimentar (g/100g)	Açúcares totais (g/100g)	Proteína total (g/100g)	Gordura total (g/100g)	Cinza total (g/100g)
<b>Granny Smith</b>	45,2±2,2	87,7±0,8	1,9±0,0	11,5±0,8	0,47±0,03	0,10±0,00	0,20±0,01
<b>Reineta</b>	61,2±0,9	81,7±0,1	2,4±0,1	17,5±0,1	0,47±0,03	0,10±0,00	0,28±0,01
<b>Starking</b>	52,2±1,8	84,3±0,5	2,0±0,1	15,1±0,5	0,33±0,03	0,10±0,00	0,20±0,00

A cor da casca, a firmeza, o teor em sólidos solúveis e acidez são parâmetros importantes na avaliação das maçãs. A cor dos frutos pode ser caracterizada com base nas coordenadas cromáticas luminosidade ( $L^*$ ), croma ( $C^*$ ) e tonalidade ( $h$ ). As diferentes colorações da casca traduzem diferenças nos pigmentos dominantes e na sua concentração. Uma vez que alguns pigmentos das maçãs (por ex. antocianinas e carotenos) possuem uma elevada atividade antioxidante, as diferenças de cor traduzem-se em diferenças na atividade

antioxidante de frutos (Almeida e Pintado, 2007). O teor em sólidos solúveis e acidez são importantes porque a percepção sensorial das maçãs depende, em larga medida, da relação entre o teor de açúcares (teor em sólidos solúveis) e o teor em ácidos orgânicos (acidez titulável) (Almeida e Pintado, 2007). Na Tabela 1.5 apresentam-se algumas destas características para as variedades de maçã estudadas.

**Tabela 1.5** - Algumas características físico-químicas e sensoriais das variedades Granny Smith, Reineta e Starking (Almeida e Pintado, 2007).

	<b>Granny Smith</b>	<b>Reineta</b>	<b>Starking</b>
<b>Classe coloração epiderme</b>	Verde	Parda	Vermelha
<b>Luminosidade</b>	52,8±0,8	43,5±0,7	26,7±1,3
<b>Croma</b>	29,9±0,4	20,8±0,4	26,0±1,1
<b>Tonalidade (°)</b>	121,2±0,3	23,2±1,3	18,5±1,1
<b>Firmeza da polpa (kgf)</b>	6,3±0,2	6,3±0,2	6,7±0,2
<b>Sólidos solúveis (g/100g)</b>	10,8±0,6	15,0±0,3	13,2±0,5
<b>Acidez titulável (g malato/100g)</b>	0,60±0,00	0,73±0,03	0,2±0,00
<b>pH</b>	3,36±0,01	3,33±0,01	4,08±0,01
<b>Classe</b>	Ácida	Ácida	Doce
<b>Razão açúcares/ácidos</b>	18±1	21±1	66±2

As variedades Granny Smith, Reineta e Starking são semelhantes em termos de firmeza da polpa. As variedades Reineta e Granny Smith têm maior acidez total do que a Starking, sendo classificadas como maçãs ácidas enquanto que a Starking é classificada como uma maçã doce (Almeida e Pintado, 2007).

### 1.7.6 Produção e Consumo de Maçã

A maçã é um dos frutos mais amplamente produzidos e consumido em todo o mundo, a maior parte da produção de maçã é consumido em fresco, sendo o restante consumido na forma de sumos, concentrados e purés. Considerando tanto a fruta fresca como os produtos processados, em conjunto, as maçãs aparecem em primeiro lugar no consumo de frutos

(Lamperi *et al.*, 2008; Bouayed *et al.*, 2011; Kevers *et al.*, 2011). Quanto à produção mundial a China é sem dúvida o maior produtor, tendo produzido em 2012, 37.000.000.00 toneladas, em segundo lugar, e bastante afastados, encontram-se os Estados Unidos da América com 4.110.046.00 toneladas produzidas em 2012, seguindo-se a Turquia e a Polónia com 2.889.000.00 e 2.877.336.00 toneladas respetivamente (www.FAOstat.com, acedido em Janeiro 2014).

A produção de maçã em Portugal nos últimos anos, entre 2005 e 2012 (tabela 1.6), apresentou-se um pouco irregular reflexo da situação económica no nosso país e de algumas irregularidades nas condições climáticas (www.FAOstat.com, acedido em Janeiro 2014). No entanto neste ano (2013/2014) registaram-se aumentos significativos de produção de maçã, com mais 25 por cento, sendo previsivelmente a melhor campanha do último quinquénio (www.agrotec.pt, acedido em Dezembro 2013).

**Tabela 1.6** - Produção de maçã em Portugal (www.FAOstat.com, acedido em Janeiro 2014).

	Área colhida (ha)	Produção (toneladas)	Rendimento (kg/ha)
<b>2005</b>	21 292,00	249 143,00	117 012,00
<b>2006</b>	20 674,00	258 382,00	124 979,20
<b>2007</b>	14 558,00	245 471,00	168 615,88
<b>2008</b>	13 757,00	237 011,00	172 283,93
<b>2009</b>	12, 65,00	236 146,00	209 427,78
<b>2010</b>	12 450,00	212 902,00	171 005,62
<b>2011</b>	12 539,00	247 229,00	197 168,04
<b>2012</b>	12 900,00	186 000,00	144 186,05

No que diz respeito às exportações e importações (tabela 1.7) que constituem parte fundamental do rendimento económico num país, nos últimos anos (2005 a 2012) a tendência observada é a diminuição das importações o que significa um melhor grau de aprovisionamento em Portugal e um aumento nas exportações sendo que o objetivo é aumentar estes valores (www.FAOstat.com, acedido em Janeiro 2014). Note-se que as exportações (saídas) aumentaram muito significativamente de 2000 a 2011 (de 2,6 M€ para cerca de 11 M€) mas o peso do valor das exportações de maçã no setor agrícola é atualmente de apenas 2% (Globalagrinar, 2013). O Grau de Autoaprovisionamento, em 2011, foi superior a 87%. A quase totalidade da produção nacional destina-se ao mercado interno, como se pode constatar pelo Grau de Abastecimento do Mercado Interno que se situa em valores muito próximos (80%) (Globalagrinar, 2013).

**Tabela 1.7** - Exportação/Importação de maçã em Portugal (www.FAOstat.com, acessado em Janeiro 2014).

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<b>Quantidade exportada (toneladas)</b>	8 397,00	9 159,00	8 560,00	9 915,00	10 678,00	8 985,00	20 486,00
<b>Quantidade importada (toneladas)</b>	74 130,00	68 508	85 698,00	70 210,00	63 097,00	56 043,00	57 494,00

A maçã com todas as suas características parece ser um produto com um potencial de crescimento tendo em conta que o nosso país apresenta as condições ótimas para a sua produção e que os consumidores mostram grande interesse neste fruto. É por isso necessário aumentar a produção contrariando os últimos anos, orientar para novos mercados e para o mercado externo, melhorar as capacidades de produção e conservação e conseqüentemente melhorar a apresentação do produto ao consumidor apostando na diferenciação pela qualidade e segurança alimentar (Globalagrimar, 2013). Sendo ainda a maçã um fruto com comprovada elevada capacidade antioxidante, há que apostar na otimização dos processos de produção de forma a controlar os fatores que influenciam os teores de antioxidantes e desta forma controlá-los para obter maçãs com os melhores teores destes compostos.

### 1.7.7 Antioxidantes em maçãs

Devido à sua disponibilidade no mercado durante todo o ano, as maçãs constituem os frutos mais consumidos em muitas dietas ocidentais, e são, portanto, das principais fontes de antioxidantes exógenos da dieta no corpo humano principalmente na Europa e Estados Unidos da América (Lamperi *et al.*, 2008; Bouayed *et al.*, 2011; Carbone *et al.*, 2011). Em comparação com outros frutos populares, as maçãs estão entre as mais ricas fontes de antioxidantes (Candrawinata *et al.*, 2013). As maçãs contêm uma significativa quantidade de diferentes classes de compostos fenólicos (Cindrić *et al.*, 2012). Os compostos fenólicos determinam a qualidade da maçã, influenciando as características de sabor (amargo e adstringente) e cor (Balázs *et al.*, 2012). A distribuição de compostos fenólicos varia consideravelmente entre diferentes espécies, e também em tecidos diferentes. O conteúdo fenólico e a distribuição entre as principais classes dependem de vários fatores, como o genótipo (variedade), estágio de maturação e das condições ambientais como a região de crescimento e as práticas rurais,

fatores pós-colheita, incluindo a temporada de fruta, exposição à luz, armazenamento e processamento. Por outro lado, é bem estabelecido que a genética desempenha um papel importante no controle da composição de polifenóis de maçãs e outras frutas (Khanizadeh *et al.*, 2008; Lamperi *et al.*, 2008; Ajila *et al.*, 2010; Kevers *et al.*, 2011; Belviso *et al.*, 2013; Panzella *et al.*, 2013).

Segundo vários autores, o conteúdo de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante é particularmente maior na casca do que na polpa, em conformidade com o seu papel defensivo contra a pressão patogénica, que atua principalmente na pele. Não é apenas a concentração de compostos fenólicos totais muito maior na casca do que na polpa, mas também os glicosídeos de quercetina são encontrados apenas na casca. Estes fatos sugerem que as cascas de maçã podem possuir mais bioatividade do que a polpa (Lee *et al.*, 2003; Lamperi *et al.*, 2008; Khanizadeh *et al.*, 2008; Ajila *et al.*, 2010; Cindrić *et al.*, 2012; Panzella *et al.*, 2013;). No entanto, a polpa acaba por ser a porção que mais contribui para o aporte de antioxidantes devido à percentagem real das cascas do fruto maçã (com base no peso) para a quantidade total de maçã ser muito inferior à da polpa e, principalmente, porque a casca da fruta é frequentemente descartada como resíduo durante a produção de maçã ou antes de se comer (Cindrić *et al.*, 2012). O perfil de polifenóis de todas as variedades de maçãs é muito idêntico, mas as concentrações podem variar de 0,1 a 5 g total de polifenóis/kg de peso fresco podendo chegar a 10 g/kg, em certas variedades de maçãs para sidra (Briones-Labarca *et al.*, 2011; Panzella *et al.*, 2013). A maioria dos fenóis na maçã pertence à classe dos flavonóides. As seis principais classes de compostos polifenólicos encontrados em maçãs são os glicosídeos de flavonóis (principalmente quercetina e conjugados de quercetina), catequinas e epicatequinas, antocianinas, dihidrochalconas (floreína e floridizina), ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido clorogénico e ácidos hidroxicinâmicos) e cianidinas. Estes compostos podem estar presentes sob a forma de ésteres, como acontece com os ácidos hidroxicinâmicos, ou glicósidos de, principalmente, galactose, glucose, ramnose, arabinose, e xilose, como acontece com os flavonóides. Os flavonóis e antocianinas foram relatados como os principais compostos fenólicos na casca da maçã, enquanto procianidinas, catequinas, ácidos hidroxicinâmicos e dihidrochalconas se encontram maioritariamente na polpa (Lee *et al.*, 2003; Ajila *et al.*, 2010; Feliciano *et al.*, 2010; Serra *et al.*, 2010; Baláz *et al.*, 2012; Belviso *et al.*, 2013; Candrawinata *et al.*, 2013; Panzella *et al.*, 2013).

### 1.7.8 Efeitos benéficos da maçã na saúde

As maçãs são uma importante fonte de fenóis e o seu consumo está associado à redução do risco de várias doenças (Briones-Labarca *et al.*, 2011). Investigações epidemiológicas revelaram uma correlação inversa entre o consumo de maçãs e várias doenças crônicas em humanos, como o cancro de pulmão, asma e outras disfunções pulmonares, diabetes, obesidade, colesterol elevado, doenças cardiovasculares e menor neuro-degeneração relacionada com a idade. O consumo das maçãs também tem sido associado com o controle do peso nas dietas. Tem-se verificado que o consumo de maçãs reduz significativamente a concentração de malondialdeído do plasma, o qual constitui um importante marcador de *stress* oxidativo. Portanto, o consumo de maçãs e derivados pode proteger as células humanas dos danos oxidativos e tem sido por isso positivamente associado com a prevenção de tantas doenças (Boyer e Liu, 2004; Lamperi *et al.*, 2008; Lavelli e Vantaggi, 2009; Feliciano *et al.*, 2010; Serra *et al.*, 2010; Bouayed, *et al.*, 2011; Candrawinata *et al.*, 2013; Panzella *et al.*, 2013).

A pesquisa mostra que menos casos de acidente vascular cerebral trombótico ocorrem em pessoas que consomem maçãs numa base diária, em oposição àqueles com um consumo mínimo. O consumo de maçã demonstrou inibir a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade entre 9 e 38%. A inclusão de uma quantidade moderada de maçã na dieta parece diminuir a absorção do colesterol. Além disso, os flavonóides da maçã estão associados à diminuição da mortalidade por doença cardíaca em grupos de idosos (Candrawinata *et al.*, 2013). Diversas pesquisas têm sugerido que comer maçãs pode reduzir o risco de cancro de pulmão, especialmente entre os fumadores atuais e ex-fumadores. As maçãs são um dos poucos exemplos de frutas que estão fortemente associados com um risco significativamente reduzido de cancro no pulmão. Vários estudos têm relatado que a quercetina, um flavonóide importante na maçã possui propriedades inibidoras para vários componentes chave de sinalização celular em células cancerosas (Zessner *et al.*, 2008; Candrawinata *et al.*, 2013).

O consumo regular de maçã também tem sido relacionada com o bom funcionamento do circuito respiratório. Sugere-se que o consumo regular possa diminuir a severidade da asma e dos seus sintomas. O risco de desenvolver diabetes tipo 2 também parece poder ser diminuído pelo consumo de maçãs. Além de diminuir o risco de diabetes, as maçãs são ricas em fibra dietética e têm um índice glicémico baixo, o que ajuda a reduzir o nível de glucose no sangue e a equilibrar a resposta de insulina do corpo (Candrawinata *et al.*, 2013).

## 1.8 Enquadramento e Objetivos do trabalho

Este trabalho teve por objetivo estudar a bioacessibilidade dos antioxidantes nas variedades de maçã, Reineta, Granny Smith e Starking produzidas em Portugal. Para isso efetuou-se uma simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal e estudou-se o impacto deste procedimento na capacidade antioxidante e no teor em fenóis e flavonóides totais das várias amostras de maçã. Para poder ter uma melhor noção da forma como a digestão vai alterando os compostos responsáveis pela atividade antioxidante das maçãs, foram retiradas amostras após o processo de simulação da digestão gástrica e no final da simulação da digestão gastrointestinal.

Os objetivos específicos deste estudo foram:

1. Elaborar para cada uma das variedades de maçã em estudo uma simulação da digestão gástrica, uma simulação da digestão gastrointestinal e um extrato em acetona (atividade antioxidante total).

2. Quantificar os compostos fenólicos e, em particular, os flavonóides no extrato em acetona e nas amostras obtidas após simulação da digestão gástrica e gastrointestinal.

3. Determinar a capacidade antioxidante no extrato em acetona e nas amostras obtidas após simulação da digestão gástrica e gastrointestinal, de modo a conferir qual o impacto do processo digestivo nas propriedades bioativas das distintas variedades de maçã. Não havendo nenhum método padrão validado que possa avaliar todos os possíveis mecanismos de atividade antioxidante, esta foi avaliada através da conjugação de diversos dos métodos existentes, que detetam diferentes *endpoints*: capacidade de redução do cobre; capacidade de redução do ferro, capacidade de sequestro dos radicais anião superóxido, hidroxilo e 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>).

4. Comparar as diferentes variedades de maçã entre si relativamente à sua capacidade antioxidante e ao conteúdo em compostos fenólicos.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Reagentes e Enzimas

Na realização do presente trabalho foram utilizados os seguintes reagentes e enzimas: acetato de amónio (Riedel-de Haën, 98%), acetato de sódio tri-hidratado (Panreac, 99%), acetona (Panreac, 99,9%), ácido acético (Panreac, 99%), ácido L(+)-ascórbico (Panreac, 99%), ácido clorídrico (Panreac, 37%), ácido gálico monohidratado (Merck, 99,5%), ácido tiobarbitúrico (TBA) (Acros, 98%), ácido tricloroacético (Riedel-de Haën, 99,5%), álcool etílico (Riedel-de Haën, 99%), azul de nitrotetrazólio (NBT<sup>2+</sup>) (Sigma), bicarbonato de sódio (Panreac, 99%), bílis bovina desidratada (Sigma B3883), carbonato de sódio (VReis), (+)-catequina monohidratada (Sigma > 96%), cloreto de cobre (II) bihidratado (Riedel-de Haën, 99%), cloreto de alumínio (Fluka, 99%), cloreto férrico hexahidratado (Merck, 99%), desoxirribose (Sigma, 99%), dihidrogenofosfato de potássio (Merck, 99,5%), dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida (NADH) (Sigma, 97%), hidrogenofosfato de dipotássio (BDH Chemicals Lda, 97,5%), hidróxido de sódio (Merck, 99%), metossulfato de fenazina (PMS) (Sigma, 90%), neocuproína (Sigma), nitrito de sódio (Merck, 99%), pancreatina de pâncreas de porco (Sigma P3292), pepsina de mucosa gástrica porcina (Sigma, P7125), peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Panreac, 30%), radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) (Sigma-Aldrich), reagente de Folin-Ciocalteau (Panreac), sal dissódico de ácido etilenodiaminatetracético (EDTA) (Panreac, 99%), sulfato ferroso heptahidratado (Riedel-de Haën, 99%), 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (Fluka, 99%). Na preparação de todas as soluções e diluições utilizou-se sempre água ultra-pura, captada a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Molsheim, França).

### 2.2. Aquisição das maçãs

As maçãs utilizadas no ensaio pertenciam às variedades Reineta, Granny Smith e Starking. Todas as maçãs foram produzidas em Portugal e adquiridas no comércio de Lisboa. No momento da compra e da preparação das amostras todas as maçãs se encontravam no estágio de maturação próprio para o consumo *in natura*.

### 2.3. Preparação das amostras

As maçãs (6 de cada variedade) foram lavadas em água corrente, passadas por água ultrapura (Mili Q) e secas em papel. Em seguida, retiraram-se os caroços e fatiaram-se as

polpas dos frutos sem se retirar a pele. As maçãs assim preparadas foram pesadas, colocadas num copo misturador (Electric Co) juntamente com água Mili Q acidificada a pH 2 (0,3 mL de água por cada grama de maçã) e trituradas até formar uma pasta homogénea. A água adicionada foi pesada antes de ser introduzida no copo misturador. Foi necessária adição de água para que o liquidificador conseguisse triturar devidamente as maçãs e utilizou-se água acidificada por forma a tentar minimizar a atividade da polifenoloxidase. Imediatamente após a trituração, a pasta obtida foi distribuída por nove frascos de vidro tipo Schott de 100 mL (5 g por frasco), tendo-se então procedido à preparação dos extratos em acetona e às simulações das digestões gástrica e gastrointestinal. Todos os procedimentos foram efectuados em triplicado.

### **2.3.1. Preparação dos extratos em acetona**

Os extratos em acetona foram preparados de acordo com o procedimento descrito por Serra *et al.*, (2010). Assim aos frascos contendo os 5 g de maçã triturada adicionou-se uma solução de acetona a 80% (v/v) numa proporção peso/volume de (1:2). A acetona parece ser um bom solvente para a preparação de extratos de maçã devido a desnaturar rapidamente a enzima polifenoloxidase. Em seguida, os frascos contendo as amostras, foram colocados em agitação ao abrigo de luz durante 30 minutos. Findo este tempo as amostras foram centrifugadas (13257g, 30 minutos e a 4°C), filtradas (Millipore Millex GP com poro de 0,22 µm), aliqüotadas em microtubos tipo Eppendorf estéreis (cerca de 1 mL de amostra por cada microtubo) e armazenadas a -60 °C.

### **2.3.2. Simulação da digestão gástrica**

Para a simulação da digestão gástrica seguiu-se o procedimento descrito por Briones-Labarca *et al.*, (2011). Assim, aos frascos contendo os 5 g de maçã triturada adicionaram-se 25 mL de água e ajustou-se o pH a 2 com uma solução de HCl 1M. Em seguida adicionaram-se 50 µL de uma solução de pepsina (50 mg/mL em HCl 0,1 N) por cada mililitro de amostra. As amostras foram incubadas ao abrigo da luz, durante duas horas, com uma agitação de 100 rpm e à temperatura de 37 °C. Findo este tempo as amostras foram imediatamente colocadas em gelo e de seguida centrifugadas (11 000 rpm, 30 minutos e a 4 °C), filtradas (Millipore Millex GP com poro de 0,22 µm), aliqüotadas em microtubos tipo Eppendorf estéreis (cerca de 1 mL de amostra por cada microtubo) e armazenadas a -60 °C. Paralelamente à digestão das amostras realizou-se um ensaio controlo (branco da digestão gástrica), em que se substituiu a amostra por igual volume de água ultra-pura, tendo o restante procedimento sido exatamente idêntico ao descrito para as amostras.

### 2.3.3. Simulação da digestão gastrointestinal

Para a simulação da digestão gastrointestinal seguiu-se o procedimento descrito por Briones-Labarca *et al.*, (2011). As amostras foram preparadas conforme o descrito no ponto anterior para a preparação da digestão gástrica. Após a incubação com pepsina, acertou-se o pH das amostras a 6,0 recorrendo a uma solução de  $\text{NaHCO}_3$  1 M e adicionou-se 250  $\mu\text{L}$  de uma solução mista de pancreatina e bÍlis (4 mg de pancreatina e 24 mg de bÍlis/mL em  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M). As amostras foram novamente incubadas ao abrigo da luz, durante duas horas, com uma agitação de 60 rpm e à temperatura de 37 °C. Findo este tempo as amostras foram centrifugadas (11 000 rpm, 30 minutos e a 4 °C), filtradas (Millipore Millex GP com poro de 0,22  $\mu\text{m}$ ), aliqotadas em microtubos tipo Eppendorf estÉreis (cerca de 1 mL de amostra por cada microtubo) e armazenadas a -60 °C. Paralelamente à digestão das amostras realizou-se um ensaio controlo (branco da digestão gastrointestinal), em que se substituiu a amostra por igual volume de Água ultra-pura, tendo o restante procedimento sido exatamente idêntico ao descrito para as amostras.

### 2.4. Determinação dos fenóis totais - Método de Folin-Ciocalteu

A quantificação dos compostos fenólicos totais presentes nas amostras foi realizada através do ensaio colorimétrico de Folin-Ciocalteu. O mecanismo básico deste método reside na capacidade dos compostos fenólicos, na forma de ião fenolato, reduzirem o heteropolianião molibdotungnesteniosfórico (coloração amarela) presente no reagente de Folin-Ciocalteu, produzindo uma mistura de óxidos de tungsténio e molibdénio com coloração azul. Desta forma, a leitura da absorvância a 765 nm, permite a quantificação dos compostos redutores presentes na amostra, pois a intensidade da coloração azul desenvolvida é proporcional ao seu teor. A reação ocorre em meio alcalino, obtido pela adição de carbonato de sódio em solução saturada. O ácido gálico é utilizado como composto padrão de referência, sendo os resultados expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG) (Magalhães *et al.*, 2008; Antunes, 2012).

O procedimento de determinação dos compostos fenólicos totais realizado foi adaptado a partir de um método já publicado (Koşar *et al.*, 2008), com algumas modificações. Assim, em balões volumétricos de 10 mL, contendo cerca de 6 mL de Água ultrapura, adicionou-se o volume adequado de cada amostra ou das suas diluições (extratos em acetona, amostras após digestão gástrica e após digestão gastrointestinal e respectivos controlos das digestões), 500  $\mu\text{L}$  de reagente de Folin-Ciocalteu sem diluição e deixou-se um minuto à temperatura ambiente. Findo este tempo adicionou-se 1,5 mL de uma solução de carbonato de sódio a 20% (peso/volume) e perpez-se o volume a 10 mL com Água ultrapura. As misturas assim preparadas foram incubadas durante 2 horas, a 25 °C e no escuro, tendo-se em seguida procedido à medição da absorvância das amostras num espectrofotómetro (SPEKOL 1500) a 765 nm, contra um branco preparado da mesma forma mas substituindo a amostra por Água

ultrapura. Todas as amostras foram analisadas em triplicado, tendo a concentração em fenóis sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de ácido gálico com concentrações entre os 0,5 e os 5 mg/L. Para a quantificação dos fenóis presentes nos extratos em acetona adicionou-se aos padrões um volume de acetona a 80% (v/v) igual ao existente nas amostras. Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de peso fresco de maçã.

## **2.5. Determinação dos flavonóides totais**

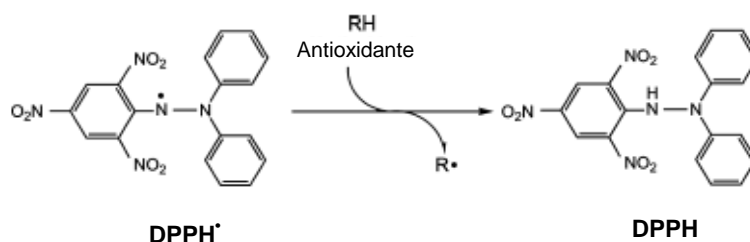
Para a determinação dos flavonóides totais utilizou-se o procedimento descrito por Barros e colaboradores (2010). Assim, às amostras, ou às suas diluições, adicionou-se água até perfazer 2 mL. Em seguida adicionaram-se 150 µL de uma solução nitrito de sódio (5%, p/v) e, 6 minutos depois, 150 µL de uma solução cloreto de alumínio (10%, p/v). Após mais 6 minutos adicionaram-se 2 mL de NaOH (4%, p/v) e água até perfazer os 5 mL. As amostras assim preparadas foram incubadas durante 15 minutos no escuro, tendo-se em seguida procedido à medição da sua absorvância num espectrofotómetro (SPEKOL 1500) a 510 nm, contra um branco preparado da mesma forma mas substituindo a amostra por água ultrapura. Todas as amostras foram analisadas em triplicado, tendo a concentração em flavonóides sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de catequina com concentrações entre os 4,5 e os 290 mg/L. Para a quantificação dos flavonóides presentes nos extratos em acetona adicionou-se aos padrões um volume de acetona a 80% (v/v) igual ao existente nas amostras. Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de catequina por grama de peso fresco de maçã.

## **2.6. Determinação da capacidade antioxidante**

### **2.6.1. Capacidade de Sequestro do radical DPPH<sup>•</sup>**

O método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) baseia-se na determinação da mudança da cor púrpura para amarelo que o radical DPPH<sup>•</sup> sofre ao aceitar um hidrogénio ou ao ser reduzido por um antioxidante (Figura 2.1). À medida que este processo ocorre o radical vai desaparecendo, dando lugar à hidrazina correspondente, passando a cor de púrpura, com um máximo de absorção a 517 nm, para amarelo. Desta forma, a atividade antioxidante pode ser determinada através da avaliação da diminuição da

absorção do DPPH<sup>•</sup> a 517 nm (Prior *et al.*, 2005; Magalhães *et al.*, 2008; Miceli *et al.*, 2009; Moon e Shibamoto, 2009).



**Figura 2.1** - Reação de desativação do radical DPPH<sup>•</sup> (Moon e Shibamoto, 2009).

O procedimento do ensaio DPPH<sup>•</sup> foi adaptado a partir de um método já publicado (Miceli *et al.*, 2009), com algumas modificações. Para tal, em tubos de ensaio, misturaram-se 500 µL de cada uma das amostras, ou de suas diluições, com 3 mL de uma solução de DPPH<sup>•</sup> (24 mg/L em etanol). As diversas misturas foram agitadas, tendo-se medido a absorvância a 517 nm (espectrofotômetro SPEKOL 1500) após 30 minutos de incubação no escuro e à temperatura ambiente. Todas as amostras foram analisadas em triplicado, tendo para cada amostra sido determinada a percentagem de sequestro através da equação:

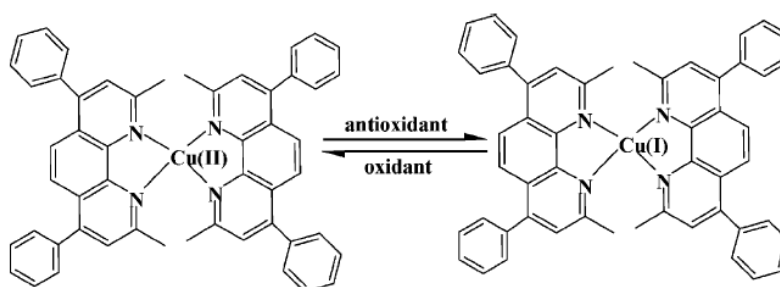
$$\% \text{Inibição} = \left[ \frac{\text{Absorvância}_{\text{sem amostra}} - \text{Absorvância}_{\text{com amostra}}}{\text{Absorvância}_{\text{sem amostra}}} \right] \times 100$$

A capacidade de sequestro do radical DPPH<sup>•</sup> das amostras foi expressa em mg de equivalentes de ácido ascórbico (EAA) por 100 g de peso fresco de maçã, após interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de ácido ascórbico com concentrações entre os 0,02 e 0,035 mg/mL. Para a determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH<sup>•</sup> nos extratos em acetona adicionou-se aos padrões um volume de acetona a 80% (v/v) igual ao existente nas amostras.

## 2.6.2. Avaliação da capacidade de redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC

O método CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) consiste na redução do Cu(II) para Cu(I) através da ação de antioxidantes redutores, presentes numa amostra. Esta reação origina um complexo Cu-neocuproina (Cu(I)-neocuproina) na forma reduzida, que apresenta uma coloração amarela intensa, com um máximo de absorção a 450 nm (Figura

2.2). Como tal, a redução da forma oxidada do complexo referido pelos componentes da amostra é determinada espectrofotometricamente, mediante a leitura da absorvância a 450 nm. (Apak *et al.*, 2004). O ácido ascórbico é utilizado como composto padrão de referência, sendo os resultados expressos em equivalentes de ácido ascórbico (EAA), normalmente  $\mu\text{mol/g}$  de amostra (Antunes, 2012).

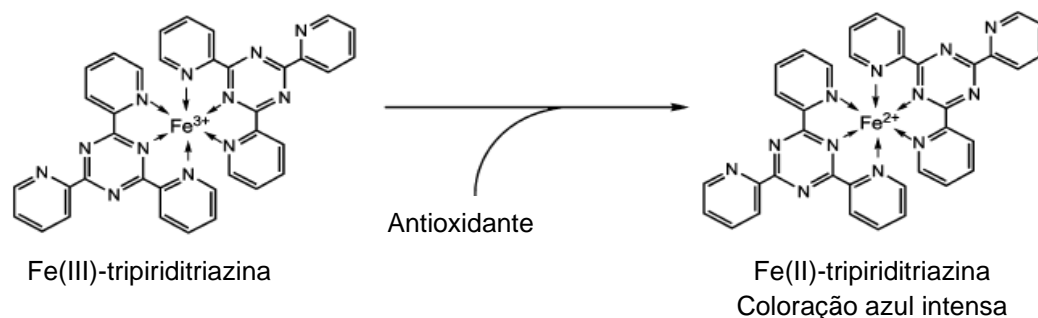


**Figura 2.2** - Redução do complexo Cu(II)–neocuproína a Cu(I)–neocuproína, por ação dos antioxidantes da amostra (Apak *et al.*, 2004).

A realização do ensaio CUPRAC foi efetuada de acordo com o método descrito por Apak e colaboradores (2004) com adaptações. Assim, num tubo de ensaio juntou-se 1 mL de cada uma das seguintes soluções: cloreto de cobre (II) bihidratado 10 mM, acetato de amônio 1M e neocuproína 7,5 mM em etanol. Em seguida, adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  de amostra, ou de suas diluições, e completou-se a 4100  $\mu\text{L}$  com água. Os tubos foram incubados ao abrigo da luz durante uma hora à temperatura ambiente procedendo-se então à leitura da absorvância (espectrofotómetro SPEKOL 1500) a 450 nm, utilizando como branco a mesma mistura com 1,1 mL de água em vez da amostra. As amostras foram analisadas em triplicado tendo a atividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por 1,1 mL das soluções padrão de ácido ascórbico com concentrações entre os 15,625 e os 250  $\mu\text{M}$ . Para a determinação da atividade CUPRAC nos extratos em acetona adicionou-se aos padrões um volume de acetona a 80% (v/v) igual ao existente nas amostras. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  equivalentes de ácido ascórbico/g de peso fresco de maçã.

### 2.6.3. Determinação da atividade de redução Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP

Este método baseia-se na capacidade dos antioxidantes reduzirem o  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ . Quando o Fe(III) do complexo de Fe(III)-tripiriditriazina ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) é reduzido a Fe(II) forma-se, em meio ácido, uma intensa coloração azul suscetível de ser quantificada espectrofotometricamente a 593 nm (Figura 2.3)(Bergamaschi, 2010).



**Figura 2.3** - Formação do complexo ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) após redução do  $\text{Fe}^{3+}$  por um antioxidante (Moon e Shibamoto, 2009).

Este método só consegue detetar antioxidantes capazes de ceder eletrões não sendo detetados aqueles que têm por mecanismo de ação a transferência de átomos de hidrogénio. Este método não consegue detetar antioxidantes com o grupo tiol, com, por exemplo, o glutationa (Apak *et al.*, 2004). Qualquer composto presente na amostra, mesmo que não tenha nenhuma acção antioxidante, desde que tenha um potencial redox superior ao do par Fe(III)/Fe(II) pode, teoricamente, reduzir o Fe(III) e, deste modo, contribuir para uma avaliação por excesso das capacidades antioxidantes da amostra (Magalhães *et al.*, 2008).

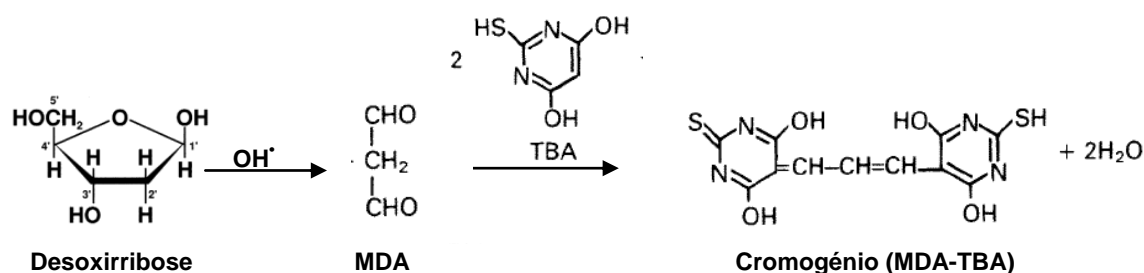
Para a realização do ensaio FRAP seguiu-se o método descrito por Ramful e colaboradores (2010) com certas modificações. Preparou-se o reagente FRAP no momento da utilização, adicionando 25 mL de tampão acetato 0,25 M (pH 3,6); 2,5 mL de TPTZ (10 mM em HCl 40 mM) e 2,5 mL de cloreto de ferro (III) (20 mM). O ensaio iniciou-se com a adição, num tubo de ensaio, de 3,0 mL do reagente FRAP, preparado de fresco e pré-aquecido a 37 °C, com 300  $\mu\text{L}$  de água e 100  $\mu\text{L}$  de cada uma das amostras ou das suas diluições. As misturas foram incubadas durante 4 minutos a 37 °C. Durante esta incubação foi possível observar o aparecimento de uma coloração azul, cuja intensidade variava entre as várias amostras, e que foi quantificada por leitura da absorvância a 593 nm (num espectrofotómetro SPEKOL 1500), utilizando como branco a absorvância do reagente FRAP.

As amostras foram analisadas em triplicado, tendo a atividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita para

as amostras, mas substituindo as amostras por soluções de sulfato ferroso com concentrações entre os 0,25 e os 1,25 mM. Para a determinação da capacidade da atividade FRAP nos extratos em acetona adicionou-se aos padrões um volume de acetona a 80% (v/v) igual ao existente nas amostras. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ /g de peso fresco de maçã.

#### 2.6.4. Determinação da atividade antioxidante por sequestro do radical hidroxilo através da diminuição da degradação da desoxirribose

A degradação da desoxirribose pelo radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ) leva à formação de diversos produtos, entre os quais se encontra o malonildialdeído (MDA), que em meio ácido e a temperatura elevada, reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) dando origem a compostos cor-de-rosa passíveis de serem quantificados espectrofotometricamente por medição da absorvância a 532 nm (Figura 2.4).



**Figura 2.4** - Reação de formação dos compostos MDA-TBA (adaptado de Chobot, 2010).

Se à mistura de reação for adicionado um composto capaz de sequestrar os radicais hidroxilo, verifica-se uma menor extensão da degradação da desoxirribose e, conseqüentemente, uma diminuição da formação do cromogénio, o que se traduz numa diminuição da absorvância a 532 nm.

Os radicais hidroxilo necessários para esta reação são gerados através da reação entre o peróxido de hidrogénio e o  $\text{Fe}^{2+}$  (reação de Fenton). Para este efeito o ferro é adicionado sob a forma de  $\text{Fe}^{3+}$  na presença de EDTA. O ácido ascórbico inicia a reação ao reduzir o  $\text{Fe(III)}$  a  $\text{Fe(II)}$ . A formação do complexo  $\text{Fe-EDTA}$  evita a formação de complexos entre o ferro e as substâncias presentes nas misturas de ensaio, a desoxirribose ou o ácido ascórbico, não impedindo a participação do ferro na reação de Fenton. Quando o ensaio é realizado na ausência de EDTA a desoxirribose pode quelatar o  $\text{Fe(III)}$  o que leva a uma ainda maior degradação desta molécula, devido à formação “site specific” dos radicais hidroxilo (Chobot, 2010).

Quando este ensaio se processa na ausência de água oxigenada revela a possibilidade dos componentes da amostra gerarem espécies reativas de oxigénio (Duarte *et al.*, 1999). Assim, a realização deste ensaio na última condição descrita permite estimar o potencial pró-oxidante da amostra. O radical hidroxilo é uma das espécies reativas de oxigénio que se pode formar *in vivo*. Desta forma, uma das vantagens deste ensaio é a de se utilizar um oxidante com relevância fisiológica.

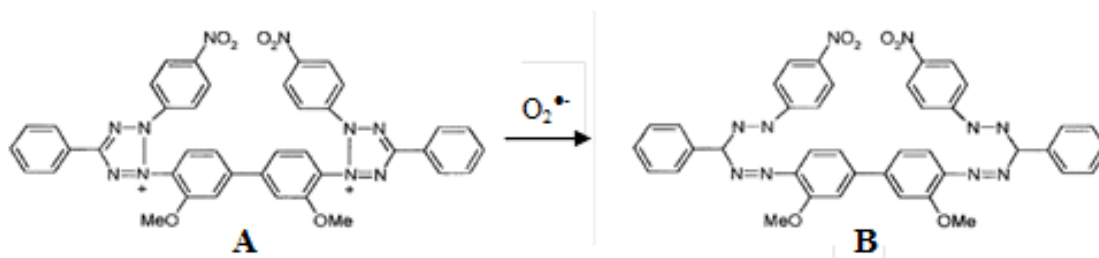
O procedimento de determinação da capacidade de sequestro do radical OH<sup>•</sup> através da determinação da diminuição da degradação da desoxirribose foi adaptado a partir de um método já publicado (Chobot, 2010). As determinações foram efetuadas em triplicado, num espectrofotómetro (SPEKOL 1500), a 532 nm. Em tubos de ensaio adicionou-se pela seguinte ordem 690 µL de tampão de fosfatos de potássio (15 mM, pH 7,4), 25 µL de amostra, 100 µL de desoxirribose (28 mM), 50 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (28,4 mM), 50 µL de solução de FeCl<sub>3</sub>/EDTA (FeCl<sub>3</sub> 400 µM dissolvido em 2mM de Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O) e por fim, 10 µL de ácido ascórbico 5 mM, perfazendo com o solvente da amostra a um volume final de 1 mL. Esta mistura reacional foi incubada a 37 °C durante uma hora. Após esse período, adicionou-se 1 mL de solução de TBA (1% p/v, em NaOH 50 mM) e 1 mL de ácido tricloroacético (2,8%, p/v). A solução resultante foi aquecida durante 15 minutos, em banho de água, a 100 °C. Terminado o tempo de incubação, a amostra foi sujeita a um arrefecimento, com posterior leitura da absorvância a 532 nm. Realizou-se, igualmente, um branco, contendo todos os componentes da mistura reacional substituindo a desoxirribose por igual volume de água, a fim de averiguar a existência de produtos TBA reativos, provenientes de contaminantes presentes no material ou reagentes. Efetuou-se, igualmente, um controlo positivo, contendo todos os componentes da mistura reacional, substituindo a amostra por igual volume de água.

Os resultados foram expressos em percentagem de inibição da formação de produtos reativos face ao TBA por mg de peso fresco de maçã. A percentagem de inibição foi calculada relativamente ao controlo positivo, calculada recorrendo à seguinte expressão:

$$\% \text{Inibição} = \left[ \frac{\text{Absorvância}_{\text{controlo positivo}} - \text{Absorvância}_{\text{amostra}}}{\text{Absorvância}_{\text{controlo positivo}}} \right] \times 100$$

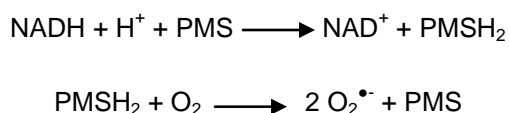
#### **2.6.5. Capacidade de sequestro do radical anião superóxido**

O azul de nitrotetrazólio (NBT<sup>2+</sup>) reage com o radical anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) dando origem a um diformazano que possui um máximo de absorção a 560 nm (Figura 2.5). Desta forma se à mistura de reacção se adicionar um composto com capacidade para captar o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> passarão a existir no meio reaccional dois compostos a competir pelo radical anião superóxido, o que se traduz por uma diminuição da extensão da redução do NBT<sup>2+</sup>, com uma consequente diminuição da taxa de aumento da absorvância a 560 nm (Nakamura *et al.*, 1992; Valentão *et al.*, 2002).



**Figura 2.5** - Estrutura do (A)  $NBT^{2+}$  e do (B) formazano (Valentão *et al.*, 2001).

Neste ensaio o radical anião superóxido é gerado utilizando o sistema metossulfato de fenazina (PMS)/NADH em condições aeróbias (Figura 2.6).



**Figura 2.6** - Formação do radical anião superóxido utilizando o sistema metossulfato de fenazina (PMS)/NADH (Valentão *et al.*, 2001).

O radical anião superóxido resulta da redução do oxigénio molecular e pode surgir no decurso de diversos processos metabólicos. Desta forma, uma das vantagens deste ensaio é a de se utilizar um oxidante com relevância fisiológica. Este ensaio pode dar resultados erróneos quando a amostra interfere com o sistema gerador do radical anião superóxido ou quando a amostra reduz directamente o  $NBT^{2+}$ , embora esta última situação possa ser despistada pela observação da estabilidade da absorvância antes da adição do PMS (Nakamura *et al.*, 1992; Valentão *et al.*, 2001).

O procedimento de determinação da capacidade sequestrante de  $O_2^{\bullet-}$  pela diminuição da formação de formazano foi adaptado a partir de um método já publicado (Nakamura *et al.*, 1992; Valentão *et al.*, 2001), com algumas modificações. Sendo assim, adicionaram-se em cuvetes do espectrofotómetro diferentes volumes das amostras, ou das suas diluições, de modo a testar diferentes concentrações, completando-se posteriormente com água ultra pura, até 200  $\mu L$ . Logo depois, adicionaram-se 300  $\mu L$  de NADH (1,66 mM em tampão fosfato 19 mM, pH 7,4), 300  $\mu L$  de  $NBT^{2+}$  (430  $\mu M$ , em tampão fosfato 19 mM, pH 7,4) e tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) a fim de se completar o volume a 2 950  $\mu L$ . A reacção iniciou-se com a adição

de 50 µL de PMS (162 µM, em tampão fosfato 19 mM, pH 7,4) acompanhando-se a variação da absorvância a 560 nm, durante dois minutos à temperatura ambiente. Realizou-se, igualmente, um ensaio controlo substituindo a amostra por igual volume de solvente da amostra. As determinações foram realizadas em triplicado, num espectrofotómetro (SPEKOL 1500). A percentagem de inibição da redução do NBT<sup>2+</sup> de cada uma das concentrações das amostras foi calculada em relação ao controlo recorrendo à seguinte expressão:

$$\% \text{Inibição} = [(Declive_{\text{médio do controlo}} - Declive_{\text{médio da amostra}}) / (Declive_{\text{médio do controlo}})] \times 100$$

A capacidade de sequestro do radical anião superóxido das amostras foi expressa mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de peso fresco de maçã, após interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de ácido gálico com concentrações entre os 0,005 e 0,078 mM. Para a determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido nos extratos em acetona adicionou-se aos padrões um volume de acetona a 80% (v/v) igual ao existente nas amostras.

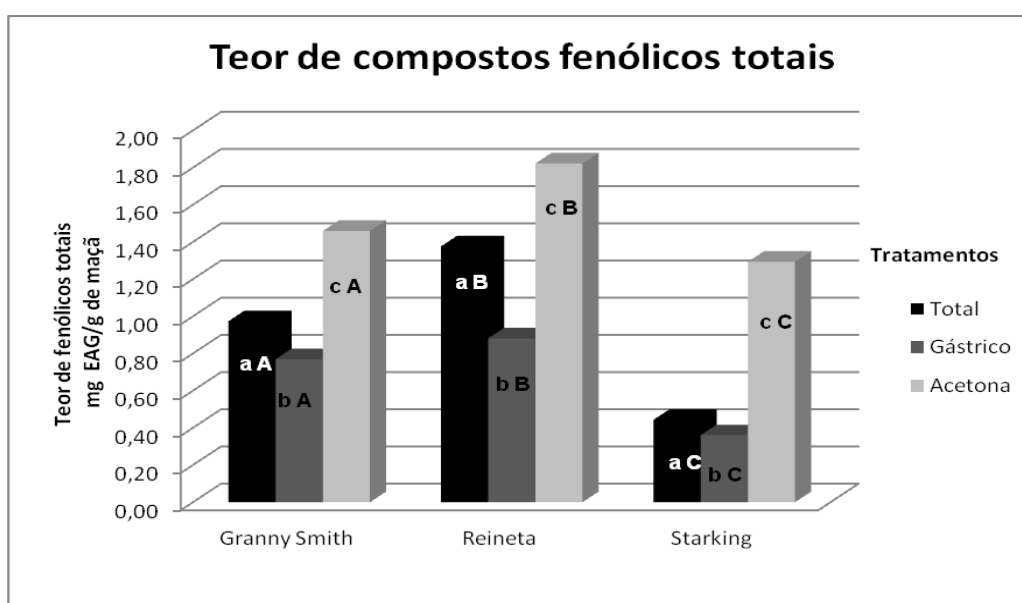
## 2.7. Análise Estatística dos dados

O tratamento estatístico dos resultados obtidos foi efetuado recorrendo ao software Microsoft Office Excel 2010® (Microsoft Corporation, Washington). Em todos os testes-t elaborados foi utilizado um nível de significância de 0,05, sendo que se  $P < 0,05$  existem diferenças significativas entre as amostras.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Determinação do teor em fenóis totais

O teor de fenóis totais foi determinado com recurso ao método Folin-Ciocalteu e os resultados obtidos expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de peso fresco de maçã. O resultado obtido com os brancos das digestões, nas soluções enzimáticas utilizadas, mostrou a existência de compostos capazes de reduzir o reagente de Folin, no entanto os resultados foram muito baixos quando comparado com o das amostras e, deste modo, pode considerar-se esta interferência negligenciável. Os resultados referentes à composição em compostos fenólicos totais das amostras em estudo encontram-se na Figura 3.1.



**Figura 3.1** - Teor de compostos fenólicos totais (mg EAG/g de maçã) nas amostras em estudo. Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste t ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas significam diferenças significativas entre tratamentos para a mesma variedade. Letras maiúsculas significam diferenças significativas entre variedades para o mesmo tratamento.

As três variedades de maçãs apresentaram entre si diferenças significativas no teor em fenóis totais sendo a variedade Reineta a que apresentou o teor mais elevado, seguida pela Granny Smith e a Starking com o teor mais baixo. A observação da Figura 3.1 permite verificar a existência de um decréscimo do teor em compostos fenólicos totais após a simulação da digestão tanto gástrica como gastrointestinal, sendo que as amostras digeridas apresentaram

teores de fenóis totais significativamente inferiores aos dos extratos em acetona. Verificaram-se diferenças significativas do teor de fenóis entre os diferentes tratamentos Total, Gástrico e Acetona dentro da mesma variedade de maçã e entre todas as variedades para o mesmo tratamento.

Os resultados mostram que a maioria dos compostos fenólicos é solubilizada durante a digestão gástrica, ocorrendo posteriormente um aumento gradual e significativo do teor em compostos fenólicos da digestão gástrica para a digestão gastrointestinal, para as variedades Granny Smith e Reineta e um ligeiro aumento para a variedade Starking. Este aumento pode estar relacionado com a atividade das enzimas pancreáticas. O aumento de fenóis na fase intestinal também pode ser devido ao maior tempo de extração (Bouayed *et al.*, 2011).

A maçã Reineta que mostrou ter maior quantidade de compostos fenólicos no extrato de acetona mostrou que esses compostos não são tão facilmente libertados no meio gástrico recuperando apenas 48% dos compostos, comparando com o extrato em acetona, mas após a digestão gastrointestinal foram recuperados cerca de 75% dos compostos. A maçã Granny Smith que também apresenta teores altos de compostos fenólicos no extrato de acetona teve uma maior solubilização na fase gástrica comparativamente à Reineta, tendo uma percentagem de recuperação de 53% dos compostos, seguindo-se um aumento na fase gastrointestinal, atingindo uma percentagem de recuperação de 67%. Já a Starking mostrou um menor teor fenólico comparativamente às outras variedades, e a maior solubilização dos compostos deu-se na fase gástrica com uma percentagem de recuperação de 28% seguido de um ligeiro aumento na fase gastrointestinal, obtendo-se uma percentagem de 34% de recuperação dos compostos. Desta forma, pode concluir-se que para a variedade starking se verificou uma fraca solubilização dos compostos fenólicos após a digestão pelo que se pode dizer que os compostos presentes na matriz desta maçã são mais sensíveis à digestão e uma grande parte desses compostos não fica disponível nestas condições.

Os resultados obtidos parecem estar em concordância com um estudo feito em maçãs em que também se observou a diminuição dos fenóis com a digestão (comparando com a extração química), verificando-se um aumento da fase gástrica para a fase intestinal (Bouayed *et al.*, 2011).

Num estudo feito com uvas também se observou um pequeno aumento do nível de fenóis entre as fases gástrica e intestinal da digestão (Tagliazucchi *et al.*, 2010). Os mesmos autores referem que a extração de fenóis é afetada pela temperatura, relação solvente/sólido, tipo de solvente assim como do pH e sugerem que a transição do estômago para o intestino possa induzir alterações estruturais nas moléculas polifenólicas que podem ser atribuídas à ionização dos grupos hidroxilo, especulando ainda que as células intestinais possam ser mais eficientemente protegidas pelos polifenóis contra o *stress* oxidativo pois estes aparentam ter melhor atividade antiradicalar no pH encontrado no intestino comparativamente ao estômago (Tagliazucchi *et al.*, 2010). Nestes estudos a percentagem de compostos fenólicos recuperados

após a digestão variou entre 40 e 60% (Bouayed *et al.*, 2011; Tagliazucchi *et al.*, 2010), valores estes que também são próximos dos obtidos no presente trabalho.

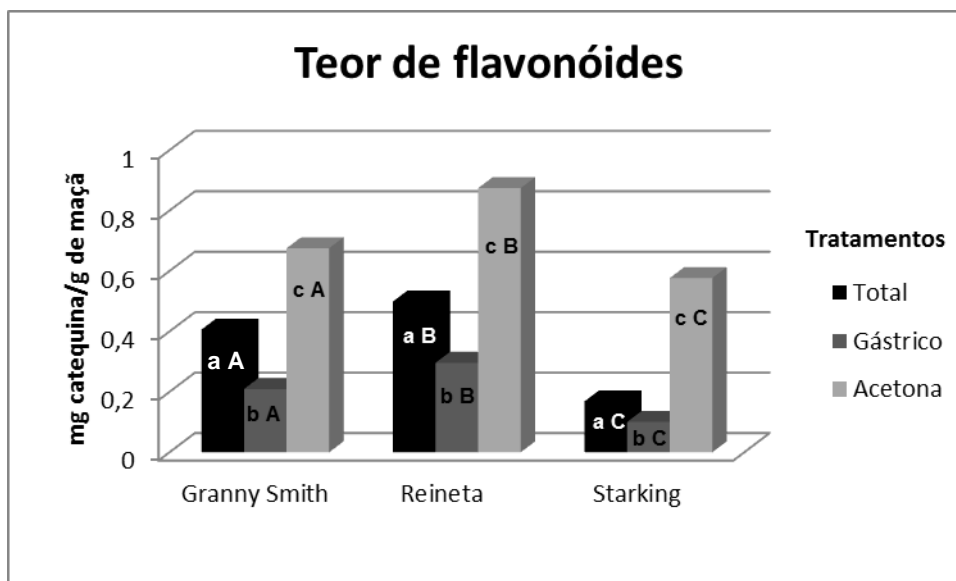
De uma forma geral os resultados parecem indicar que durante a digestão das maçãs não se consegue obter uma libertação completa dos compostos fenólicos presentes nos frutos ou uma parte destes compostos talvez seja degradada durante condições digestivas.

### **3.2. Determinação do teor em flavonóides totais**

O teor em flavonóides totais das amostras em estudo encontram-se na Figura 3.2. Os brancos de ambas as digestões não interferiam no ensaio. A observação da Figura 3.2 permite verificar a existência de um decréscimo do teor em flavonóides totais após a simulação da digestão, tanto gástrica como gastrointestinal, apresentando as amostras digeridas teores de flavonóides totais significativamente inferiores aos dos extratos em acetona. Verificaram-se diferenças significativas entre todos os tratamentos para a mesma variedade de maçã e entre todas as variedades para o mesmo tratamento. Em concordância com o observado para os fenóis totais, os resultados mostram que grande parte dos flavonóides é solubilizada durante a digestão gástrica, ocorrendo depois um aumento significativo do teor nestes compostos da digestão gástrica para a digestão gastrointestinal.

Em ambos os estudos anteriormente referidos, feitos em outras variedades de maçãs e uvas os flavonóides também mostraram um padrão semelhante ao dos fenóis (Bouayed *et al.*, 2011; Tagliazucchi *et al.*, 2010).

De acordo com os resultados obtidos foram recuperados cerca de 30% dos flavonóides durante a digestão gástrica passando este valor para cerca de 60% após a digestão gastrointestinal para as variedades Granny Smith e Reineta. Na variedade Starking após a digestão gástrica foram recuperados cerca de 17% dos flavonóides tendo este valor aumentado para 29% após a digestão gastrointestinal, apresentando valores muito inferiores ao das outras variedades. Uma vez mais a variedade Reineta mostrou os teores mais altos e a Starking os teores mais baixos. Verificou-se também e igualmente ao caso dos fenóis, que apesar da Reineta ser aquela que apresenta maior teor de flavonóides no tratamento em acetona e após a digestão gastrointestinal, no extrato gástrico é a Granny Smith que apresenta maior teor, possivelmente os compostos presentes nesta maçã são mais facilmente solubilizados no meio ácido (digestão gástrica) do que as outras variedades.



**Figura 3.2** - Teor em flavonoides totais (mg equivalentes de catequina/ g de maçã) das amostras em estudo. Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste t ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas significam diferenças significativas entre tratamentos para a mesma variedade. Letras maiúsculas significam diferenças significativas entre variedades para o mesmo tratamento.

Tal como já referido no caso dos fenóis totais, também neste caso, os resultados apontam no sentido de durante a digestão das maçãs não se conseguir obter uma libertação completa dos flavonóides presentes nos frutos ou de uma parte destes compostos ser degradada nas condições digestivas.

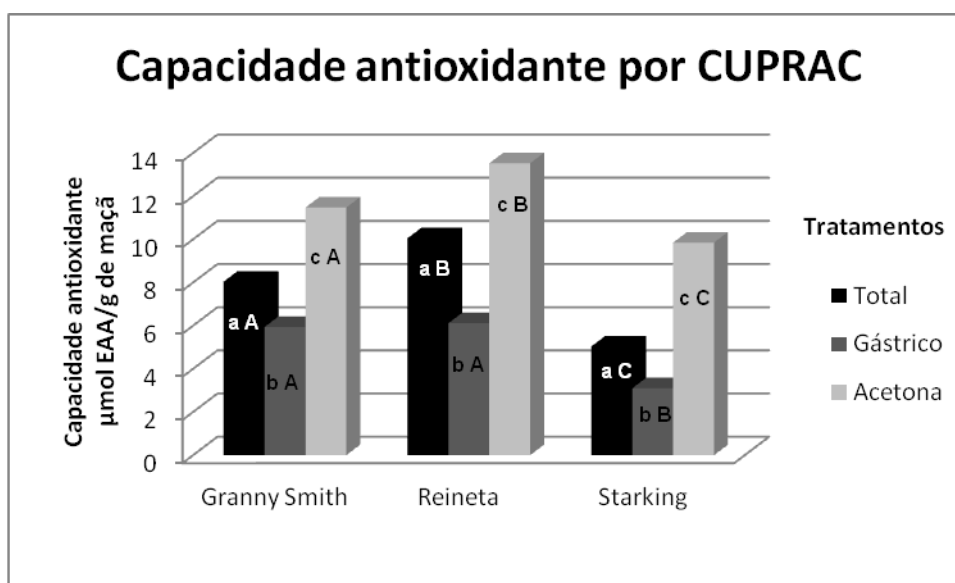
### 3.3. Determinação da Capacidade Antioxidante

Uma vez que não existe um método universal para analisar a actividade antioxidante de uma amostra, por esta poder ser exercida através de diferentes mecanismos, aplicaram-se diversos ensaios de avaliação do potencial antioxidante das maçãs antes e após simulação da digestão gastrointestinal. Assim, realizaram-se dois ensaios de determinação da capacidade redutora (ensaios CUPRAC e FRAP), capacidade de sequestro do radical DPPH<sup>•</sup> e capacidade de sequestro de duas das principais ROS que podem formar-se *in vivo*: os radicais anião superóxido e hidroxilo.

#### 3.3.1. Avaliação da redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC

A análise da capacidade antioxidante das distintas variedades de maçã pelo ensaio CUPRAC (Figura 3.3) permitiu observar que todas as variedades em estudo apresentaram

valores mais elevados de CUPRAC nos extratos em acetona e verificou-se a diminuição dos compostos responsáveis pela atividade CUPRAC após a digestão, sendo que a maioria dos compostos foi extraída durante a fase gástrica ocorrendo um aumento significativo do valor de CUPRAC após a fase intestinal. Desta forma, verifica-se que nem todos os compostos responsáveis pela atividade antioxidante das maçãs, detetada pelo ensaio CUPRAC, ficaram bioacessíveis após a simulação da digestão gastrointestinal. Verificou-se que os brancos tanto da digestão gástrica como da digestão gastrointestinal não interferiram no ensaio, ou seja, as várias enzimas e sais biliares não possuem, nas concentrações adicionadas, compostos positivamente interferentes com o método em questão.



**Figura 3.3** - Capacidade antioxidante das variedades de maçã determinada pelo ensaio CUPRAC (µmol EAA/g de maçã). Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste t ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas significam diferenças significativas entre tratamentos para a mesma variedade de maçã. Letras maiúsculas significam diferenças significativas entre variedades de maçã para o mesmo tratamento.

Verificou-se a existência de diferenças significativas entre todos os tratamentos para a mesma variedade de maçã. Também se verificaram diferenças significativas entre todas as variedades no tratamento gastrointestinal (total) e no tratamento em acetona. Já no tratamento gástrico verificou-se não existirem diferenças significativas entre as variedades Granny Smith e Reineta, no entanto ambas foram significativamente diferentes em relação à Starking que apresentou uma atividade antioxidante significativamente inferior.

A maçã Reineta que apresentou a maior atividade antioxidante no extrato de acetona recuperou 45% desta atividade na fase gástrica a qual aumentou para uma percentagem de 74% após a fase gastrointestinal, obtendo uma atividade antioxidante mais elevada do que as restantes variedades. A maçã Granny Smith na fase gástrica recuperou 52% da atividade

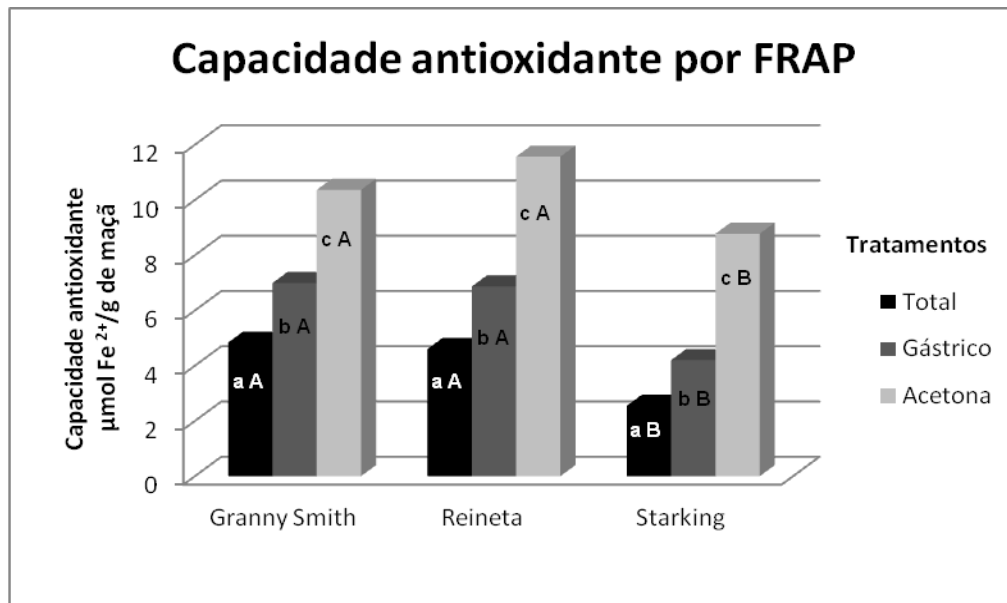
antioxidante, mostrando novamente maior facilidade de solubilização no meio gástrico comparando com as outras variedades e após a digestão gastrointestinal apresentou 70% de recuperação. Por último a variedade Starking recuperou durante a fase gástrica 31% da atividade antioxidante tendo registado um aumento para 51% após a fase gastrointestinal. Esta variedade mostra, outra vez, teores significativamente inferiores às outras variedades sendo que apenas uma baixa percentagem de compostos responsáveis pela atividade antioxidante detetada se encontram bioacessíveis após a fase gastrointestinal.

Estes resultados, juntamente com os resultados obtidos nos ensaios anteriores, sugerem o envolvimento dos fenóis e, em particular, dos flavonóides na atividade antioxidante detetada pelo ensaio CUPRAC e sugerem, uma vez mais, que a última etapa da digestão *in vitro* e as suas condições contribuem para uma melhor solubilização dos compostos antioxidantes presentes na matriz destas maçãs.

### **3.3.2. Avaliação da atividade de redução Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP**

Os resultados do ensaio FRAP para as variedades de maçã e para os distintos tratamentos estão apresentados na Figura 3.4. Os brancos de ambas as digestões não interferiam no ensaio.

Os valores mais elevados foram encontrados nos extratos em acetona, onde a variedade Reineta apresentou, novamente, uma maior capacidade antioxidante, provavelmente pela sua diferenciada concentração de polifenóis. Observou-se uma diminuição da atividade antioxidante na fase gástrica que diminuiu ainda mais após a fase intestinal, no entanto após a digestão gastrointestinal foi a variedade Granny Smith que apresentou uma maior atividade antioxidante sendo a menor, novamente, apresentada pela variedade Starking. Verificaram-se diferenças significativas entre todos os tratamentos dentro da mesma variedade de maçã, no entanto não se verificaram diferenças significativas entre as variedades Granny Smith e Reineta em nenhum tratamento, mas ambas as variedades foram significativamente diferentes da variedade Starking em todos os tratamentos.



**Figura 3.4** - Capacidade antioxidante das variedades de maçã determinada pelo ensaio FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$  de maçã). Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste t ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas significam diferenças significativas entre tratamentos para a mesma variedade. Letras maiúsculas significam diferenças significativas entre variedades para o mesmo tratamento.

Durante a fase de digestão gástrica houve uma percentagem de recuperação da atividade antioxidante que variou entre 47% e 67% correspondendo a maior percentagem à variedade Granny Smith e a menor percentagem à variedade Starking. Após a digestão gastrointestinal ocorreu uma diminuição dessa atividade tendo os extratos apresentado, em relação aos extratos em acetona, uma atividade antioxidante de cerca de 47% na maçã Granny Smith e 39% e 29% nas maçãs Reineta e Starking, respetivamente. O fato de ter sido a variedade Granny Smith a obter valores mais elevados de compostos antioxidantes detetados pelo FRAP, pode estar correlacionado com os resultados observados nos outros testes que mostraram que esta variedade apresentou uma maior facilidade na solubilização ou uma maior estabilidade dos compostos na fase de digestão gástrica, ou seja em meio ácido. Com efeito, a variedade Granny Smith demonstrou sempre uma maior percentagem de recuperação de compostos antioxidantes na fase gástrica, comparativamente às outras variedades. Bouayed e colaboradores (2011), sugerem, tendo em conta que o ensaio FRAP se realiza a pH ácido, que este ensaio talvez seja melhor para testar a atividade antioxidante dos extratos gástricos.

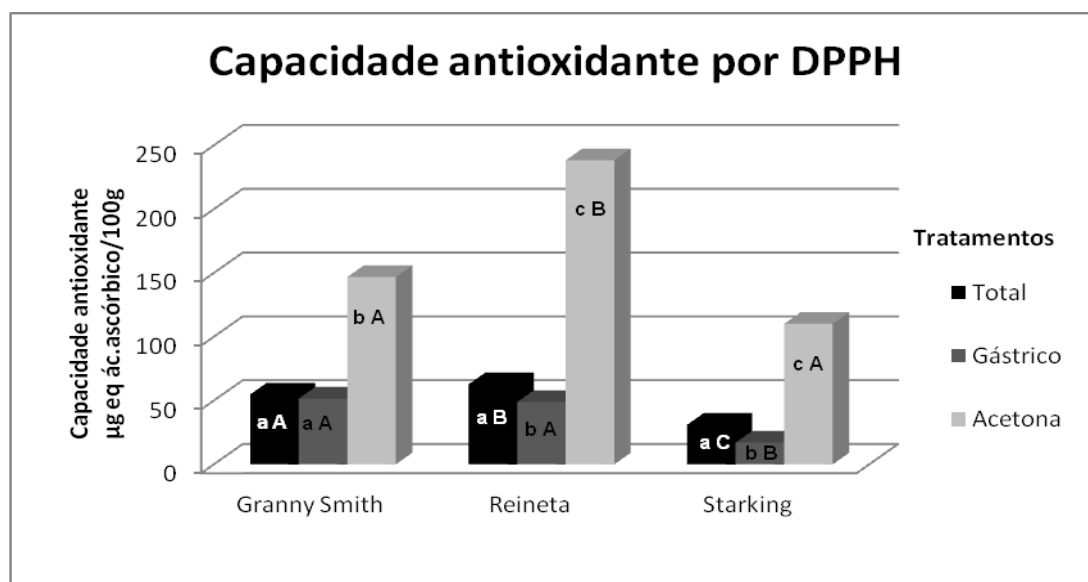
Após a digestão gastrointestinal a atividade antioxidante detetada pelo ensaio FRAP diminuiu em todas as variedades, contrariamente ao verificado em todos os ensaios anteriormente realizados. Este fato pode significar que os compostos responsáveis por esta atividade são principalmente solubilizados na fase gástrica e são depois pouco estáveis durante a digestão intestinal. Num estudo semelhante feito com outras variedades de maçãs, já referido anteriormente, os resultados do FRAP permitiram igualmente observar uma degradação ou

libertação incompleta dos compostos antioxidantes na fase intestinal uma vez que esta apresentou valores de atividade antioxidante inferiores à fase gástrica, sendo que a maior parte da solubilização ocorreu na fase gástrica (Bouayed *et al.*, 2011), assim como no presente trabalho. As diferenças verificadas entre os resultados obtidos neste ensaio e no ensaio CUPRAC realçam bem a necessidade de se realizarem diferentes ensaios quando se pretende avaliar a atividade antioxidante.

Tal como verificado para o ensaio CUPRAC, também neste ensaio se observou que os extratos em acetona das maçãs com maior teor de fenóis e flavonóides totais foram as que apresentaram maiores valores de FRAP, indicando que estes compostos possam contribuir significativamente para a atividade antioxidante detetada por este ensaio. Estes resultados parecem estar de acordo com os resultados apresentados num estudo feito com uvas, já referido anteriormente, em que os valores de FRAP mostraram correlação com os teores de fenóis e flavonóides (Tagliazucchi *et al.*, 2010).

### 3.3.3. Capacidade de Sequestro do Radical DPPH'

A capacidade de sequestrar o radical DPPH' das amostras de maçãs em estudo encontra-se na Figura 3.5. Os brancos de ambas as digestões não demonstraram nenhuma capacidade para sequestrar este radical, não tendo, assim, nenhuma interferência nos resultados obtidos.



**Figura 3.5** - Capacidade antioxidante das variedades de maçã determinada pelo sequestro do radical DPPH' (µg EAA/100g). Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste t ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes significam diferenças significativas entre tratamentos para a mesma variedade. Letras maiúsculas diferentes significam diferenças significativas entre variedades para o mesmo tratamento.

Através da Figura 3.5 pode observar-se que, mais uma vez, é a maçã Reineta a que apresenta uma maior atividade antioxidante seguida pela Granny Smith e Starking com a menor. Assim, a capacidade de sequestro do radical DPPH<sup>•</sup> foi superior nas amostras com mais elevado teor em compostos fenólicos, o que realça a contribuição destes compostos para as propriedades antioxidantes das maçãs. Verificaram-se diferenças significativas entre todas as variedades para o mesmo tratamento, com exceção das variedades Reineta e Granny Smith para o tratamento gástrico e Starking e Granny Smith para o extrato em acetona.

Após a simulação das digestões gástrica e gastrointestinal foi possível verificar uma redução bastante significativa da atividade antioxidante de todas as variedades de maçãs em estudo. Os extratos em acetona apresentaram sempre uma atividade muito superior, demonstrando que os compostos antioxidantes detetados neste ensaio se perdem ou se alteram durante a simulação da digestão. Foram recuperados cerca de 30% de compostos antioxidantes após a fase gastrointestinal, para as variedades Reineta e Starking e cerca de 40% para a variedade Granny Smith. Desta forma, os resultados sugerem que os compostos responsáveis pelo sequestro do radical DPPH<sup>•</sup> são sensíveis às condições de digestão gastrointestinal sendo os das variedades Starking e Reineta os mais sensíveis.

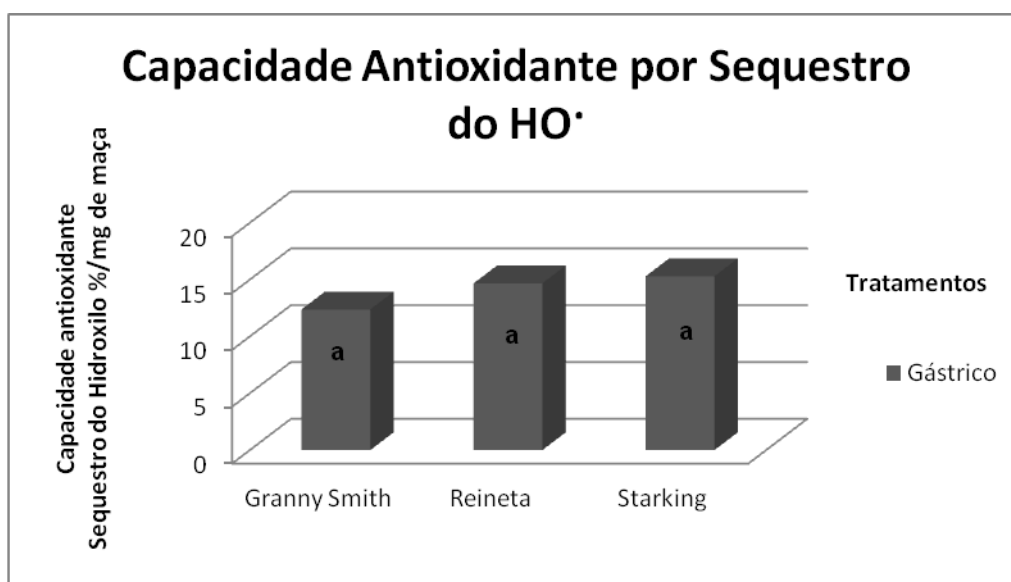
Os resultados obtidos mostram que a simulação da digestão exerceu um efeito diferente sobre as várias amostras em estudo. Assim, os compostos responsáveis pela atividade de sequestro do radical DPPH<sup>•</sup> das maçãs Granny Smith foram praticamente todos extraídos durante a fase de digestão gástrica, uma vez que não se verificam diferenças significativas entre os valores de sequestro após a digestão gástrica e gastrointestinal. Já no caso das maçãs Reineta e Starking verificou-se um ligeiro mas significativo aumento desta atividade de sequestro após a digestão gastrointestinal, pelo que apesar do aumento não ser grande parece que a digestão intestinal contribui para uma melhor solubilização dos compostos antioxidantes presentes na matriz da fruta. Assim, Reineta foi a variedade que apresentou mais compostos bioacessíveis após a fase gastrointestinal, como esperado, seguida da Granny Smith e Starking com menos compostos. Os resultados mostraram também que apesar da Reineta ser a que apresenta maior teor de compostos antioxidantes no extrato em acetona e após a digestão gastrointestinal, após a digestão gástrica a Granny Smith é a variedade que apresenta mais compostos antioxidantes, como verificado nos outros testes realizados.

#### **3.3.4. Capacidade de Sequestro do Radical Hidroxilo**

A determinação da capacidade das amostras em estudo para sequestrar o radical hidroxilo constitui um ensaio com relevância fisiológica devido à possível formação deste radical em organismos aeróbios (incluindo o Homem). Neste ensaio apenas foi possível considerar os resultados obtidos com as amostras após a simulação da digestão gástrica uma

vez que, quer a acetona quer o branco da digestão gastrointestinal interferiram com o ensaio. No caso da acetona esta levava a uma inibição de 100%, no caso do branco da digestão gastrointestinal o valor rondava os 50% de inibição. Contudo, neste último caso, optou-se por não descontar o valor do branco às amostras uma vez que não é sabido até que ponto a presença das amostras altera a ação dos componentes do branco e vice-versa.

Os resultados da capacidade de sequestro do radical hidroxilo para as três variedades de maçã após simulação da digestão gástrica, expressos em termos de percentagem de inibição por mg de peso fresco de maçã, encontram-se na Figura 3.6. Foi possível verificar em todas as amostras a ocorrência de sequestro do radical hidroxilo, com conseqüente diminuição da formação do composto cromogénico MDA-TBA, e correspondente diminuição da intensidade da coloração rósea no final do ensaio. Não se verificaram diferenças significativas entre as variedades no tratamento gástrico.



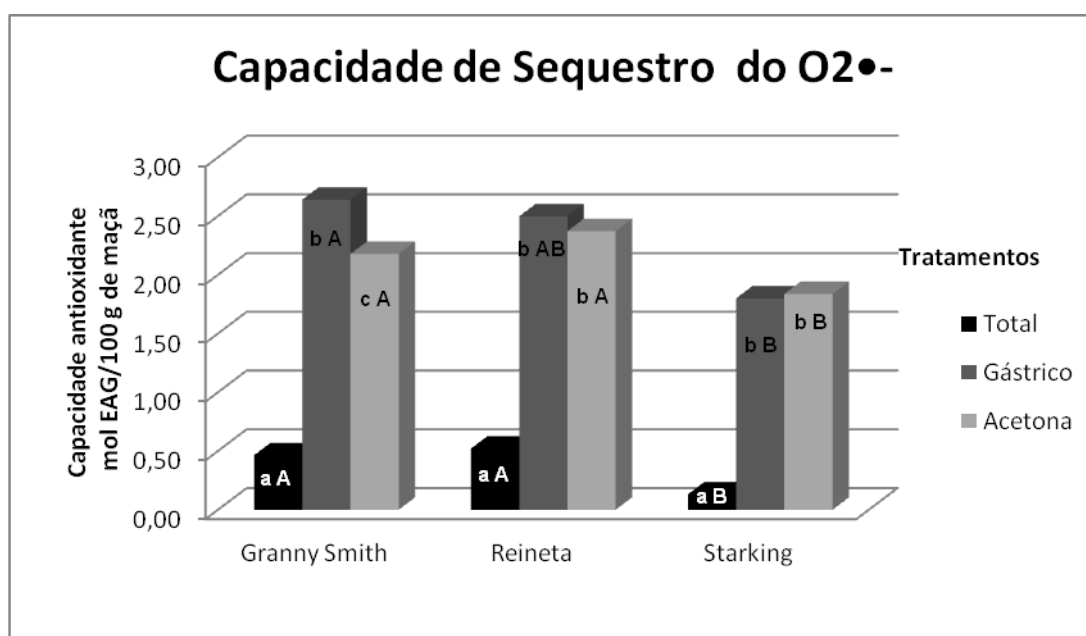
**Figura 3.6** - Capacidade antioxidante das variedades de maçã determinada pelo sequestro do radical hidroxilo (% de sequestro/mg de maçã). Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste t ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes significam diferenças significativas entre tratamentos para a mesma variedade.

As variedades apresentaram capacidades de sequestro significativamente semelhantes entre si. Contrariamente a todos os outros testes realizados, neste, a variedade Starking foi aquela que teve uma maior percentagem de inibição na fase gástrica, sendo que as variedades Granny Smith e Reineta apresentaram valores de inibição muito semelhantes entre si e ligeiramente mais baixos do que a Starking. Assim, apesar de não haver diferenças significativas entre as variedades parece que a variedade Starking teve mais facilidade em

solubilizar compostos comparando aos outros testes. Estes resultados sugerem, que para além dos compostos fenólicos, talvez outros compostos possam estar envolvidos nesta atividade.

### 3.3.5. Capacidade de Sequestro do Radical Anião Superóxido

A capacidade de sequestro do radical anião superóxido é, igualmente, um ensaio com elevada relevância biológica dada a possibilidade de formação *in vivo* deste radical. Os brancos de ambas as digestões não interferiram no ensaio, isto é, não demonstraram nenhuma capacidade para sequestrar o radical anião superóxido. A análise dos dados obtidos (Figura 3.7) possibilitou concluir que todas as maçãs em estudo apresentaram capacidade de sequestro do radical em questão.



**Figura 3.7** - Capacidade antioxidante das variedades de maçã determinada pelo sequestro do radical anião superóxido (mol EAG/100 g de maçã) em três variedades diferentes de maçã em três tratamentos. Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste t ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes significam diferenças significativas entre tratamentos para a mesma variedade. Letras maiúsculas diferentes significam diferenças significativas entre variedades para o mesmo tratamento.

Os resultados mostraram ainda que a simulação da digestão intestinal levou a uma perda significativa dos compostos responsáveis por esta atividade, uma vez que se verificou uma diminuição acentuada da percentagem de sequestro entre a simulação da fase gástrica e intestinal da digestão. Foi igualmente possível observar que a simulação da digestão gástrica foi bastante eficiente na solubilização dos compostos antioxidantes presentes nos frutos. Estes extratos apresentaram uma capacidade de sequestro do radical anião superóxido inferior (mas muito pouco), à apresentada pelos extratos em acetona no caso da variedade Starking, ou superior, no caso das variedades Granny Smith e Reineta. Um estudo feito com alhos obteve resultados que também mostraram o aumento da capacidade antioxidante na fase gástrica comparativamente à extração química. Estes autores sugerem que a capacidade antioxidante dos alimentos possa, em alguns ensaios, ser subestimada porque os solventes orgânicos utilizados na extração podem não conseguir solubilizar todos os compostos presentes na matriz dos alimentos (Bhatt e Patel, 2013). Noutros estudos em que os fenóis aumentaram na digestão gástrica os autores sugerem que este fato pode ser atribuído, principalmente, ao pH e atividade enzimática ácida durante esta fase digestiva, que pode induzir a hidrólise de alguns compostos fenólicos ligados a outros constituintes dos alimentos (Rodríguez-Roque *et al.*, 2013).

A variedade Granny Smith apresentou diferenças significativas entre todos os tratamentos. A variedade Reineta não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos gástrico e acetona, mas ambos os tratamentos tiveram valores significativamente diferentes do tratamento total. A variedade Starking não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos gástrico e acetona e ambos foram significativamente diferentes do tratamento total assim como na Reineta. As variedades Granny Smith e Reineta não apresentaram diferenças significativas entre elas no tratamento total, mas ambas foram significativamente diferentes da variedade Starking que teve valores inferiores. No tratamento gástrico as variedades Granny Smith e Reineta não apresentaram diferenças significativas assim como a Reineta e a Starking, no entanto Granny Smith e Starking apresentaram diferenças significativas entre elas no tratamento gástrico, sendo que a Granny Smith mostrou, novamente, maior atividade antioxidante nesta fase de digestão.

No extrato em acetona as variedades Granny Smith e Reineta não apresentaram diferenças significativas entre si, sendo a Reineta a mostrar maior atividade antioxidante, mas foram ambas significativamente diferentes da variedade Starking que apresentou menor atividade. A maçã Reineta foi a que no final da digestão apresentou maior percentagem de recuperação de atividade com um valor de 22%, seguindo-se a Granny Smith e Starking com 21% e 7% respetivamente. Os resultados estão em concordância com o teor de fenóis, flavonóides e a maioria dos outros testes de capacidade antioxidante realizados, no entanto neste em específico, os compostos antioxidantes bioacessíveis após a digestão gastrointestinal foram muito inferiores aos observados nos outros testes principalmente no caso da variedade Starking que perdeu quase a totalidade dos compostos após fase intestinal.

#### 4. Conclusões

Os antioxidantes presentes em frutas, nomeadamente na maçã, são tema de grande interesse pela sua correlação com efeitos benéficos na saúde, no entanto para que estes compostos possam exercer as suas propriedades no organismo humano têm de passar pelo processo digestivo e ficar bioacessíveis ou para serem potencialmente biodisponíveis para diferentes órgãos após a sua absorção pelos enterócitos e a sua passagem para a corrente sanguínea ou então para exercerem os seus efeitos biológicos no lúmen do trato gastrointestinal. Por esta razão o objetivo deste trabalho consistiu no estudo do efeito da simulação da digestão gastrointestinal nas propriedades antioxidantes de três diferentes variedades de maçã produzidas em Portugal, nomeadamente as variedades Reineta, Granny Smith e Starking que estão entre as mais consumidas no nosso país.

Foram elaborados ensaios para quantificar o teor de fenóis e flavonóides totais e uma vez que não existe um método universal para a determinação da atividade antioxidante, por esta poder ser exercida através de diferentes mecanismos. Também a digestão *in vitro* pode transformar os compostos responsáveis pela atividade antioxidante em diferentes formas estruturais, as quais podem ter diferentes propriedades e funções químicas, sendo que estas diferenças podem gerar resultados de atividade antioxidante diferentes quando avaliados por diferentes métodos (Bhatt e Patel, 2013). Por isso a importância da avaliação da capacidade antioxidante ser feita por vários métodos. Neste estudo para avaliar esta atividade aplicaram-se cinco ensaios diferentes, nomeadamente, os ensaios de avaliação da capacidade redutora (FRAP e CUPRAC), capacidade de sequestro do radical DPPH' e capacidade de sequestro de duas das espécies reativas de oxigénio que podem formar-se *in vivo* (radical hidroxilo e radical anião superóxido).

Os resultados obtidos mostraram que a simulação da digestão gastrointestinal levou a uma perda de compostos visto que, de um modo geral, se verificou uma atividade antioxidante estatisticamente inferior à obtida com a extração em acetona. O fato de se ter observado sempre uma diminuição dos compostos após as fases de digestão comparativamente à extração química (em acetona) pode sugerir que a extração química pode sobrestimar a disponibilidade dos componentes ativos dos alimentos, quando comparados a fração livre após a digestão gastrointestinal. Esta observação vai de encontro com a obtida por outros autores (Bouayed *et al.*, 2011). Assim, os resultados mostram que a extração com solventes pode não ser o melhor método para avaliar a atividade antioxidante dos alimentos. Na maioria dos ensaios foi possível observar que o conteúdo em fenóis, flavonóides e atividade antioxidante dos compostos digeridos aumenta significativamente durante a transição do meio ácido gástrico para o meio alcalino intestinal, sugerindo que o meio intestinal possa facilitar a libertação dos compostos ligados à matriz do alimento, o que pode ser explicado pelo tempo adicional de extração e/ou pelo efeito das enzimas digestivas intestinais na matriz alimentar complexa (Bouayed *et al.*, 2011).

Também foi possível observar que durante a fase gástrica da digestão ocorreu a solubilização da maioria dos compostos responsáveis pela atividade antioxidante das maçãs. As amostras não se comportaram da mesma forma para todas as metodologias, e não houve uma ordem de atividade antioxidante definida para todas. Assim, enquanto que nos ensaios CUPRAC, DPPH<sup>•</sup> e no doseamento em fenóis e flavonóides totais se verificou um aumento entre a digestão gástrica e a gastrointestinal, nos restantes ensaios verificou-se o contrário, sugerindo uma menor estabilidade dos compostos responsáveis pela atividade antioxidante nas condições intestinais.

Entre as variedades todos os testes, exceto o do sequestro do radical hidroxilo, em que apenas foi possível analisar as amostras da fase gástrica, mostraram que a variedade Reineta foi a que apresentou mais compostos antioxidantes bioacessíveis tanto na extração química como após a digestão gastrointestinal. A variedade Granny Smith apresentou valores semelhantes mas inferiores exceto na fase de digestão gástrica em que esta variedade apresentou, na maioria dos testes, maior facilidade de solubilização comparativamente com as outras variedades sugerindo que os compostos presentes na matriz desta maçã são libertados com mais facilidade no meio ácido em relação ao observado nas outras variedades. A variedade Starking foi aquela que apresentou sempre menos compostos antioxidantes quer bioacessíveis após a digestão, quer após a extração química. Para além de parecer ter de fato um menor conteúdo em antioxidantes a variedade Starking também parece ser a mais sensível ao processo digestivo pois a percentagem de recuperação de compostos antioxidantes em todos os testes foi sempre bastante inferior à apresentada nas outras variedades.

A menor concentração em compostos fenólicos, em particular em flavonóides, assim como a menor atividade antioxidante, verificada após a simulação da digestão, comparativamente à extração com acetona, pode significar que uma parte dos compostos responsáveis pelo potencial antioxidante das maçãs foi degradada durante o processo de digestão e/ou que nem todos foram extraídos da matriz da fruta. Com efeito, os compostos antioxidantes das maçãs podem encontrar-se tanto na sua forma livre solúvel como ligados a outros componentes, tais como proteínas ou polissacáridos, podendo ainda formar complexos com minerais dificilmente solubilizados pela digestão gastrointestinal (Bouayed *et al.*, 2011). No entanto, apesar de na maioria dos ensaios a atividade antioxidante detetada em ambas as fases de digestão ser inferior à dos extratos em acetona, o que aponta no sentido da digestão gastrointestinal não conseguir extrair todo o potencial antioxidante dos frutos, a atividade antioxidante obtida sugere que as maçãs ainda possam desempenhar um papel importante na defesa antioxidante, em particular atuando na desativação de espécies reativas de oxigénio que se possam formar no aparelho digestivo.

Vários fatores, tais como características da amostra, a atividade enzimática, composição iónica, tensões mecânicas aplicadas e tempos de digestão para cada etapa, podem ter influência significativa sobre os resultados obtidos nos métodos de digestão *in vitro*. Mesmo *in vivo* estes fatores variam fazendo com que as condições de digestão não sejam

sempre as mesmas. Por exemplo, o tempo de digestão no estômago e intestino delgado depende de características individuais (idade, sexo, estado de saúde, etc.) e dos alimentos (quantidade total, composição, tamanho de partículas, etc.), podendo variar consideravelmente. Desta forma, a digestão *in vivo* nunca pode reproduzir exatamente aquilo que acontece *in vitro* (Hur *et al.*, 2010), podendo no entanto dar uma ideia aproximada. Assim, o estudo da bioacessibilidade dos componentes bioativos das diferentes variedades de maçã estudadas após o processo de digestão gastrointestinal, constitui um importante passo para tentar prever se os efeitos benéficos observados *in vitro* podem ou não manter-se *in vivo*.

O perfil fitoquímico das maçãs depende de diversas variáveis. Assim, as concentrações nestes compostos podem variar com a variedade, grau de maturação dos frutos, em resposta à luz disponível e a alguns tipos de fertilização, o clima, o tipo de solo, assim como a colheita e condições de armazenamento (Boyer e Liu, 2004; Candrawinata *et al.*, 2013). No entanto, com base em diversos estudos sabe-se que a espécie é de longe a variável que mais influencia a composição polifenólica quer de forma qualitativa, quer de forma quantitativa (Lamperi *et al.*, 2008). Assim, o consumidor deve ter em conta este aspeto na escolha de frutas no mercado. Apesar deste estudo se ter baseado em maçãs provenientes de um único local de produção e obtidas num único ano, é possível dizer que os resultados revelam as maçãs das variedades Reineta e Granny Smith como melhores escolhas do que a variedade Starking devido a apresentarem um conteúdo em compostos antioxidantes bioacessíveis mais elevado. Os potenciais benefícios da maçã na saúde são numerosos por isso independentemente da variedade sugere-se que esta fruta faça parte da dieta da população em geral.

De forma a dar continuidade a este estudo também seria relevante incluir a etapa da bioassimilação, que poderia ser conseguida pela incorporação de modelos celulares, tais como a linha celular de enterócitos humanos Caco-2, que expressa os transportadores normalmente presentes nos enterócitos e constitui um bom sistema celular para realizar estudos de absorção intestinal. Seria igualmente interessante determinar por técnicas cromatográficas o perfil em compostos fenólicos das variedades estudadas de modo a tentar estabelecer relações entre as atividades biológicas e a presença ou ausência de compostos específicos, tentando identificar os principais compostos bioativos presentes nas diferentes variedades e estudando de forma individual o modo como são afetados pela simulação da digestão. Seria ainda interessante avaliar a forma como esta simulação pode afetar outras atividades biológicas, tais como, por exemplo, a atividade antimutagénica contra mutagénicos diretos e pré-mutagénicos, atividade antiinflamatória ou atividade antibacteriana.

Para além destas perspetivas e apesar das dificuldades relativas à enorme variedade de polifenóis e às suas diferentes biodisponibilidades e outros fatores de variabilidade, era ainda interessante seguir a pesquisa no sentido de correlacionar a ingestão de polifenóis presentes nas maçãs com potenciais efeitos na saúde em estudos epidemiológicos. Uma hipótese seria realizar estudos *in vivo* em ratinhos de laboratório em que fosse possível avaliar o impacto dos compostos antioxidantes presentes nas maçãs, em doenças e condições

fisiológicas específicas. As correlações *in vitro in vivo* são fatores muito importantes e há claramente necessidade de mais pesquisas sobre este tema de forma a desenvolver sistemas bem definidos, mais realistas de modelos *in vitro* para avaliar de biodisponibilidade e digestibilidade dos alimentos.

## Bibliografia

Ajila, C.M., Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Valéro, J.R., (2011). Solid-state fermentation of apple pomace using *Phanerocheate chrysosporium* – Liberation and extraction of phenolic antioxidants. *Food Chemistry*, **126**, 1071–1080.

Antunes, R.B., (2012). Avaliação do efeito da digestão *in vitro* na capacidade antioxidante de infusões medicianais: flor de Camomila e flor de Laranjeira. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Almeida, D.P.F., Pintado, M., (2007). Caracterização nutritiva e funcional de variedades de maçã de Alcobaça – relatório final. Disponível em <https://www.google.pt/#q=CARACTERIZA%C3%87%C3%83O+NUTRITIVA+E+FUNCIONAL+D+E+VARIEDADES+DE+MA%C3%87%C3%83+DE+ALCOBA%C3%87A>.

Alves, C.Q., David, J.M., David, J.P., Bahia, M.V., Aguiar, R.M., (2010). Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Quimica Nova*, **33**(10), 2202-2210.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **52**, 7970 - 7981.

Barros, L., Carvalho, A.M., Morais, J.M., Ferreira, I.C.F.R., (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*, **120**, 247 – 254.

Balázs, A., Tóth, M., Blazics, B., Héthelyi, E., Szarka, S., Ficsor, E., Ficzek, G., Lemberkovics, E., Blázovics, A., (2012). Investigation of dietary important components in selected red fleshed apples by GC–MS and LC–MS. *Fitoterapia*, **83**, 1356–1363.

Belviso, S., Scursatone, B., Re, G., Zeppa, G., (2013). Novel Data on the Polyphenol Composition of Italian Ancient Apple Cultivars. *International Journal of Food Properties*, **16**(7), 1507-1515.

Bergamaschi, K.B., (2010). Capacidade antioxidante composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento. Dissertação de Mestrado apresentado à escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-10022011-144122/pt-br.php>.

Bhatt, A., Patel, V., (2013). Antioxidant activity of garlic using conventional extraction and *in vitro* gastrointestinal digestion. *Free Radicals and Antioxidants*, **3**, 30-34.

Bouayed, J., (2010). Polyphenols: A Potential New Strategy for the Prevention and Treatment of Anxiety and Depression. *Current Nutrition & Food Science*, **6**, 13-18.

Bouayed, J., Bohn, T., (2010). Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **3(4)**, 228-237.

Bouayed, J., Deußner, H., Hoffmann, L., Bohn, T., (2011). Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following *in vitro* digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry*, **131**, 1466–1472

Bouayed, J., Hoffmann, L., Bohn, T., (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, **128**, 14–21.

Boyer, J., Liu, R.H., (2004) Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*, **3(5)**, 1475-2891.

Briones-Labarca, V., Venegas-Cubillos, G., Ortiz-Portilla, S., Chacana-Ojeda, M., Maureira, H., (2011). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on bioaccessibility, as well as antioxidant activity, mineral and starch contents in Granny Smith apple. *Food Chemistry*, **128**, 520–529.

Candrawinata, V.I., Golding, J.B., Roach, P.D, Stathopoulos, C.E., (2013). From Apple to Juice—The Fate of Polyphenolic Compounds. *Food Reviews International*, **29**, 276–293.

Carbone, K., Giannini, B., Picchi, V., Lo Scalzo, R., Cecchini, F., (2011). Phenolic composition and free radical scavenging activity of different apple varieties in relation to the cultivar, tissue type and storage. *Food Chemistry*, **127**, 493–500.

Castaneda-Ovando, A., Pacheco-Hernandez, M. de L., Paez-Hernandez, M.E., Rodriguez, J.A., Galan-Vidal, C.A., (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, **113**, 859–871.

Chobot, V., (2010). Simultaneous detection of pro- and antioxidative effects in the variants of the deoxyribose degradation assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **58**, 2088-2094.

Cindrić, I.V., Krizman, I., Zeiner, M., Kampić, Š., Medunić, G., Stingeder, G., (2012). ICP-AES determination of minor- and major elements in apples after microwave assisted digestion. *Food Chemistry*, **135**, 2675–2680.

De Oliveira, A.C., Valentim, I.B., Goulart, M.O.F., Silva, C.A., Bechara, E.J.H., Trevisan, M.T.S., (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, **32(3)**, 689-702.

Duarte, M.P., Laires, A., Gaspar, J., Leão, D., Oliveira, J.S., Rueff, J. (1999) Genotoxicity of instant coffee: possible involvement of phenolic compounds. *Mutation Research*, **442**, 43–51.

Feliciano, R.P., Antunes, C., Ramos, A., Serra, A.T., Figueira, M.E., Duarte, C.M.M., De Carvalho, A., Bronze, M.R., (2010). Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 1 – Nutritional, phytochemical and sensory. *Evaluation. Journal of Functional Foods*, **2**, 35 – 45.

Ferreira, J.T., (1994). Variedades de Maceira. 1ª Edição, Instituto nacional de investigação agrária; estação nacional de fruticultura de viera natividade, Alcobaca, Portugal.

Gaboardi, M. (2013). Anatomia e Fisiologia do Sistema Digestório. Disponível em [http://www.granjaviana.med.br/index.php?view=article&catid=4%3A gastroenterologia&id=19%3A Adigestivo&format=pdf&option=com\\_content&Itemid=6](http://www.granjaviana.med.br/index.php?view=article&catid=4%3A gastroenterologia&id=19%3A Adigestivo&format=pdf&option=com_content&Itemid=6), acessado em Janeiro de 2014.

Gião, M.S., Gomes, S., Madureira, A.R., Faria, A., Pestana, D., Calhau, C., Pintado, M.E., Azevedo, I., Malcata, X., (2011). Effect of *in vitro* digestion upon the antioxidant capacity of aqueous extracts of *Agrimonia eupatoria*, *Rubus idaeus*, *Salvia sp.* and *Satureja montana*. *Food Chemistry*, **131**, 761–767.

Giori, F. P., (2010). Adaptação de metodologia de digestão *in vitro* e determinação da bioacessibilidade *in vitro* de  $\beta$ -caroteno em três variedades de batata doce de polpa alaranjada. Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, disponível em [http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select\\_action=&co\\_obra=181869](http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=181869), acessado em Dezembro 2013.

Globalagrimar, (2013). Ficha de internacionalização da maçã. Gabinete de planeamento e políticas, Portugal, disponível em <http://www.gpp.pt/GlobalAgriMar/informacao/Docs/Produtos/Fichas/2012S2MacaFI.pdf>, acessado em Janeiro de 2014.

Gomes, S.M.C., (2010), Determinação de antioxidantes por cromatografia líquida de alta pressão com detecção electroquímica. Dissertação de Mestrado em Química. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

- Halliwell, B., (2011). Free radicals and antioxidants – quo vadis?. *Pharmacological Sciences*, **32**(3), 125–130.
- Han, X., Shen, T., Lou, H., (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences*, **8**, 950-988.
- Heo, H.J., Kim, Y.J., Chung, D., Kim, D-O., (2007). Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chemistry*, **104**, 87–92.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **53**, 1841-1856.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E.A., McClements, D. J., (2010). *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, **125**, 1–12.
- INSA (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge) (2014). Maçã com casca, disponível em <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/DetailAlimento.aspx?ID=IS662>, acedido em Janeiro 2014.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M., (2004). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, **94**, 550–557.
- Kaur, C., Kapoor, H. C., (2001) Review: Antioxidants in fruits and vegetables ± the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, **36**, 703-725.
- Kevers, C., Pincemail, J., Tabart, J., Defraigne, J-O., Dommès, J., (2011). Influence of Cultivar, Harvest Time, Storage Conditions, and Peeling on the Antioxidant Capacity and Phenolic and Ascorbic Acid Contents of Apples and Pears. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **59**, 6165–6171.
- Khanizadeh, S., Tsao, R., Rekika, D., Yang, R., Charles, M. T., Rupasinghe, H. P. R., (2008). Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. *Journal of Food Composition and Analysis*, **21**, 396– 401.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Järvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A., (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **76**, 560–8.

Kohen, R., Nyska, A., (2002). Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, **30**( 6), 620–650.

Koşar, M.; Göger, F.; Başer, K.H.C., (2008). *In Vitro* Antioxidant Properties and Phenolic Composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 2369 - 2374.

Lamperi, L., Chiuminatto, U., Cincinelli, A., Galvan, P., Giordani, E., Lepri, L., Del Buba, M., (2008). Polyphenol Levels and Free Radical Scavenging Activities of Four Apple Cultivars from Integrated and Organic Farming in Different Italian Areas. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **56**, 6536–6546.

Landete J.M. (2012). Uptadet Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **52**, 936-948.

Lavelli, V., Vantaggi, C., (2009). Rate of Antioxidant Degradation and Color Variations in Dehydrated Apples as Related to Water Activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **57**, 4733–4738.

Lee, K.W., Kim, Y.J., Kim, D-O., Lee, H. J., Lee, C.Y., (2003). Major Phenolics in Apple and Their Contribution to the Total Antioxidant Capacity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**, 6516-6520.

Leopldini, M., Russo, N., Toscano, M., (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, **125**, 288–306.

Lidon, F., Silvestre, M.M., (2010). *Princípios de Alimentação e Nutrição Humana*. 1ª Edição, Escolar Editora, Lisboa, Portugal.

Lima, K.S.P., (2011). Avaliação da Actividade Antioxidante e Antimutagénica em Diferentes Infusões Medicinais: Barbas de Milho, Carqueja, Dente de Leão, Folhas de Oliveira e Urtiga-Branca. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C., (2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, **613**(1), 1-19.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **79**, 727–747.

McDougall, J., Fyffe, S., Dobson, P., Stewart, D., (2007). Anthocyanins from red cabbage – stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, **68**, 1285–1294.

Micelli, N., Trovato, A., Dugo, P., Cacciola, F., Donato, P., Marino, A., Bellinghieri, V., La Barbera, T.M., Güvenç, A., Taviano, M.F., (2009). Comparative analysis of flavonoid profile, antioxidant and antimicrobial activity of the berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 6570–6577.

Monn, J.K., Shibamoto, T., (2009). Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **57**, 1655 - 1666.

Nakamura, S., Kato, A., Kobayashi, K., (1992). Enhanced antioxidative effect of ovalbumin due to covalent binding of polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40(11)**, 2033-2037.

Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J. F., González-Aguilar, G. A., (2011). The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. *Journal of Food Science*, **76(1)** 1750-3841.

Panzella, L., Petriccione, M., Rega, P., Scortichini, M., Napolitano, A., (2013). A reappraisal of traditional apple cultivars from Southern Italy as a rich source of phenols with superior antioxidant activity. *Food Chemistry*, **140**, 672–679.

Parada, J., Aguilera, J. M., (2007). Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients. *Journal of Food Science*, **72(2)** 1750-3841.

Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K., (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53(10)**, 4290-4302.

Ramful, D., Bajorun, T., Bourdon, E.; Tarnus, E., Aruoma, O.I., (2010). Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritan citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, **278**, 75-87.

Rasteiro, E.M.N., (2012). Avaliação das propriedades antioxidantes e antimutagénicas de diferentes cultivares de *Vaccinium* spp, do grupo “Southern Highbush”, produzidas em Portugal. Dissertação de mestrado apresentado à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Rodríguez-Roque, M.J., Rojas-Graü, M.A., Elez-Martínez, P., Martín-Belloso, O., (2013). Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, **136**(1), 206-212.

Serra, A.T., Matias, A.A., Frade, R.F.M, Duarte, R.O., Feliciano, R.P., Bronze, M.R., Figueira, M.E., De Carvalho, A., Duarte, C.M.M., (2010). Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 2 – Antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of Functional Foods*, **2**, 46 –53.

Soares, M., Welter, L., Gonzaga, L., Lima, A., Mancini-Filho, J., Fett, R., (2008). Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos Campinas*, **28** (3), 727-732.

Tagliacuzzi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., Conte, A., (2010). *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, **120**, 599–606.

Thiemann, O. (2013). Apostila de Fisiologia, Sistema digestivo. Laboratório de Biologia do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, disponível em <http://biologia.ifsc.usp.br/bio2/apostila/apost-fisiol-parte4.pdf>, acessado em Dezembro de 2013.

Tiveron, A.P., (2010). Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil. Dissertação de Mestrado apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-20102010-101541/pt-br.php>, acessado em Dezembro de 2013.

Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Bastos, M.L., (2001). Antioxidant activity of *Centaureum erythraea* infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 3476 - 3479.

Veeriah, S., Kautenburger, T., Habermann, N., Sauer, J., Dietrich, H., Will, F., Pool-Zobel, B.L., (2006) Apple Flavonoids Inhibit Growth of HT29 Human Colon Cancer Cells and Modulate Expression of Genes Involved in the Biotransformation of Xenobiotics. *Molecular Carcinogenesis*, **45**, 164–174.

Vieira., F.G.K., Borges, G.D.S.C., Copetti, C., Amboni, R.D.D.M.C., Denardi, F., Fett, R., (2009). Physico-chemical and antioxidant properties of six apple cultivars (*Malus domestica* Borkh) grown in southern Brazil. *Scientia Horticulturae*, **122**(3), 421–425.

Zessner, H., Pan, L., Will, F., Klimo, K., Knauff, J., Niewöhner, R., Hümmer, W., Owen, R., Richling, E., Frank, N., Screier, P., Becker, H., Gerhauser, C., (2008) Fractionation of polyphenol-enriched apple juice extracts to identify constituents with cancer chemopreventive potential. *Molecular Nutrition Food Research*, **52**, S28 –S44.

**Portais da Internet:**

[www.agrotec.pt](http://www.agrotec.pt), acedido em Dezembro 2013.

[www.FAOstat.com](http://www.FAOstat.com), acedido em Janeiro 2014.