



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E DA CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE DE GENÓTIPOS DE *RUBUS IDAEUS* L.**

Trabalho submetido por
Rita dos Reis Cornamusaz
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Novembro de 2021



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE GENÓTIPOS DE *RUBUS IDAEUS* L.

Trabalho submetido por
Rita dos Reis Cornamusaz
para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Maria Madalena Moraes Bettencourt da Câmara Correia

e coorientado por
Prof. Doutora Margarida Maria de Mesquita Cabral de Moncada

Novembro de 2021

Agradecimentos

À Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz, por terem disponibilizado as instalações e materiais necessários à execução deste trabalho.

À minha orientadora Prof. Doutora Madalena Bettencourt da Câmara, por todo o apoio e dedicação na realização deste projeto.

À minha coorientadora, Prof. Doutora Margarida Moncada, pela sua disponibilidade e contribuição em todas as etapas.

Ao INIAV, I.P. (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária), em particular ao Doutor Pedro Brás de Oliveira e ao Doutor Francisco Luz, pela disponibilização das amostras de framboesa, indispensáveis à realização deste trabalho.

À coordenadora do curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, a Prof. Doutora Patrícia Cavaco Silva, por toda a dedicação e partilha de conhecimentos a todos os alunos que integram o curso.

Aos meus pais, por todo o apoio e carinho ao longo de toda a minha vida.

Resumo

A produção de framboesa em Portugal assume hoje um grande interesse económico para os agricultores, especialmente no Alentejo Litoral e no Algarve. As framboesas são frutos nutricionalmente densos e abundantes em compostos bioativos. A ingestão destes frutos tem sido associada a efeitos fisiológicos benéficos, para além dos nutricionais. Em 2018, o INIAV, I.P. e a empresa Beira Baga iniciaram um pequeno programa de melhoramento genético visando o fornecimento de cultivares de framboesa para todos os produtores.

Este trabalho compreendeu uma revisão narrativa (2011-2021) sobre efeitos benéficos para a saúde de polifenóis da framboesa com atividade antioxidante e a determinação do teor em humidade, grau Brix, conteúdo em fenóis totais e da atividade antioxidante *in vitro* (método FRAP) de 5 genótipos de framboesa vermelha (GFV) e 1 de framboesa amarela (GFA), selecionados no âmbito do programa de melhoramento referido, e de 4 cultivares de framboesa vermelha (Cv).

Na revisão narrativa, foram encontrados artigos sobre diversos temas ligados à saúde (síndrome metabólica, doenças neurodegenerativas, fotoenvelhecimento), que alegam benefícios para a mesma sobretudo resultado de polifenóis da framboesa. Alguns artigos relatam estudos de intervenção em humanos, nomeadamente estudos randomizados e controlados e estudos de biodisponibilidade.

Os dados obtidos para as diferentes amostras estão dentro dos valores publicados para a framboesa. Os resultados médios obtidos para o teor de humidade e o grau Brix, variaram entre 87,4 - 90,7 e 6,9 - 9,8. Os conteúdos em fenóis totais e os valores FRAP (mg EAG e μ moles de eq. Trolox/ 100 g framboesa fresca, respetivamente) apresentavam-se, em média, entre 96,2 - 124,1 e 722,5 -1011,1 (para os GFV), 104,6 e 899,3 (para o GFA) e 151,4 -202,3 e 1113,6 - 1436,2 (para as Cv).

No futuro, seria desejável que os programas de melhoramento de framboesa incluíssem parâmetros relativos a compostos bioativos, nomeadamente elagitaninos e antocianinas.

Palavras-chave: Framboesa vermelha, compostos fenólicos, genótipo, atividade antioxidante (FRAP)

Abstract

Raspberry production in Portugal is currently of great economic interest to farmers, especially in the Alentejo Litoral and Algarve. Raspberries are nutritionally dense fruits rich in bioactive compounds. The ingestion of these fruits has been associated with beneficial physiological effects, in addition to nutritional ones. In 2018, the INIAV, IP and the Beira Baga company started a small genetic improvement program aimed at supplying all growers with raspberry cultivars.

This work comprised a narrative review (2011-2021) on the beneficial health effects of raspberry polyphenols with antioxidant activity and the determination of moisture content, Brix degree, total phenol content and in vitro antioxidant activity (FRAP method) of 5 red raspberry (GFV) and 1 yellow raspberry (GFA) genotypes, selected under the aforementioned breeding program, and 4 red raspberry (Cv) cultivars.

In the narrative review, articles were found on various topics related to health (metabolic syndrome, neurodegenerative diseases, photoaging), which allege benefits to health, especially as a result of raspberry polyphenols. Some articles report intervention studies in humans, namely randomized and controlled studies and bioavailability studies.

The data obtained for the different samples are within the published values for the raspberry. The average results obtained for the moisture content and the Brix degree ranged between 87.4 - 90.7 and 6.9 - 9.8. The total phenol contents and the FRAP values (mg EAG and μ moles of Trolox eq./100 g fresh raspberry, respectively) were, on average, between 96.2 - 124.1 and 722.5 -1011.1 (for GFVs, 104.6 and 899.3 (for GFA) and 151.4 -202.3 and 1113.6 - 1436.2 (for Cv).

In the future, it would be desirable for raspberry breeding programs to include parameters related to bioactive compounds, namely ellagitannins and anthocyanins.

Keywords: Red raspberry, phenolic compounds, antioxidant activity, genotype.

Índice Geral

Resumo	1
Abstract	3
Índice Geral.....	5
Índice de Figuras	7
Índice de Tabelas	9
Índice de Abreviaturas.....	11
I. INTRODUÇÃO	13
1. Framboesa vermelha (<i>Rubus Idaeus</i> L.) - generalidades	13
2. Classificação botânica	14
3. Morfologia	14
4. Cultivares de framboesa	16
5. Composição nutricional da framboesa	16
6. Composição fenólica	18
7. Genotipagem	22
8. Objetivo	22
9. Metodologia.....	23
II. DESENVOLVIMENTO.....	25
1. Composição fenólica, atividade antioxidante da framboesa e benefícios para a saúde – revisão narrativa.....	25
1.1 Pesquisa exploratória.....	25
1.2 Resultados e discussão.....	25
1.2.1 Estudos realizados em humanos.....	26
1.2.2 Estudos realizados em animais.....	32
1.2.3 Estudos <i>in vitro</i> , em células	42
2. Avaliação do teor em fenóis totais e da capacidade antioxidante de genótipos de <i>Rubus idaeus</i> L.	48
1. Material e Métodos.....	48
1.1 Amostras de <i>Rubus idaeus</i> L.....	49
2. Reagentes, padrões e equipamentos.....	50
2.1 Reagentes e padrões.....	50
2.2 Equipamentos	50
2.3 Determinação do extrato seco e cálculo da humidade.....	50
2.4 Grau Brix	51
2.5 Preparação dos extratos de framboesa.....	52
2.6 Determinação do teor em compostos fenólicos totais.....	54
2.7 Determinação da capacidade antioxidante, método FRAP	55

3. Resultados e discussão	57
3.1 Teor de humidade	57
3.2 Grau Brix	58
3.3 Teor em compostos fenólicos totais	61
3.4 Atividade antioxidante	64
III. CONCLUSÃO	69
IV. BIBLIOGRAFIA	71

Índice de Figuras

Figura 1 – Morfologia da framboesa. Corte Longitudinal do fruto.....	15
Figura 2 – Diferentes fases de maturação da framboesa	15
Figura 3 – Preparação da amostra para a determinação do teor em humidade.	51
Figura 4 – Extrato de framboesa vermelha (à esquerda) e amarela (à direita), após a primeira centrifugação.....	53
Figura 5 – Extrato final de framboesa vermelha e amarela.....	53
Figura 6 – Reação de Folin-Ciocalteu nos extratos de framboesa.....	54
Figura 7 – Reta de calibração com ácido gálico.....	55
Figura 8 – Reação FRAP num Branco (à esquerda) e num extrato de framboesa (à direita).....	56
Figura 9 – Padrões após o desenvolvimento da reação FRAP, após o desenvolvimento do cromóforo, do menos concentrado (à esquerda), para o mais concentrado (direita). 57	
Figura 10 – Determinação da capacidade antioxidante pelo método FRAP. Reta de calibração com Trolox.....	57

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Composição nutricional da framboesa (adaptado do PortFIR, INSA, 2021)	17
Tabela 2 – Composição fenólica de framboesas vermelhas (adaptado da base de dados phenol explorer, (2015))	19
Tabela 3 – Resumo dos resultados da pesquisa efetuada na PubMed da Medline (6/7/2021)	26
Tabela 4 – Resumo dos ensaios em humanos encontrados na bibliografia pesquisada	27
Tabela 5 – Resumo dos ensaios em humanos encontrados na bibliografia pesquisada (continuação)	28
Tabela 6 – Resumo dos ensaios em animais encontrados na bibliografia pesquisada ..	33
Tabela 7 – Resumo dos ensaios em animais encontrados na bibliografia pesquisada (continuação)	34
Tabela 8 – Resumo dos ensaios em animais encontrados na bibliografia pesquisada (continuação)	35
Tabela 9 – Resumo dos ensaios em animais encontrados na bibliografia pesquisada (continuação)	35
Tabela 10 – Resumo dos ensaios em células encontrados na bibliografia pesquisada..	43
Tabela 11 – Resumo dos ensaios em células encontrados na bibliografia pesquisada (continuação)	43
Tabela 12 – Correção da Leitura refratométrica em função da temperatura	52
Tabela 13 – Teor de humidade das amostras de framboesa (%)	58
Tabela 14 – Grau Brix (°) das amostras de framboesa	59
Tabela 15 – Valores de ° Brix pesquisados na bibliografia	60
Tabela 16 – Teor médio em compostos fenólicos totais das amostras	61
Tabela 17 – Teor em compostos fenólicos totais da bibliografia	62
Tabela 18 – Capacidade antioxidante das amostras pelo método FRAP	65
Tabela 19 – Valores da capacidade antioxidante dos artigos da bibliografia	66

Índice de Abreviaturas

AC – Antocianinas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AE – Ácido elágico

AMPK – proteína quinase ativada por AMP

AUC – Área sob a curva

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro

CPF – Concentrado de puré de framboesa

CSF – Concentrado de sumo de framboesa

Cv – Cultivar

DA – Dose alta

DAI – Índice da atividade da doença

DB – Dose baixa

DC – Dieta controlo

DCV – Doenças cardiovasculares

DEN – N-nitrosodimetilamina

DPG – Dieta pobre em gordura

DRG – Dieta rica em gordura

dmUC – 8-metil-*O*-urolitina C

DSS – sulfato de dextrano de sódio

EA – Elagitaninos

EAG – Equivalentes de ácido gálico

EF – Extrato de framboesa

F – Framboesa

FD - Flavonóides

FF – Fruto Fresco

FI – Fruto Inteiro

FL – Flavonóis

FOS – Fruto-oligossacarídeos

FRAP – Poder antioxidante redutor do ferro

FS – Fruto Seco

FT – Fenóis totais

G – Gordura

GFA – Genótipo de framboesa amarela
GFV – Genótipo de framboesa vermelha
GPx – glutathione peroxidase
GA – Genótipo amarelo
GC – Grupo controlo
HDL – lipoproteína de alta densidade
HHDP – Grupo hexahidroxidifenol
INIAV I.P. – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, IP
IL – Interleucinas
IMC – Índice de Massa Corporal
LC – Lambertianina C
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
mUA – 8-metil-*O*-urolitina A
NO – Óxido nítrico
NOS – Síntase do óxido nítrico
NRF2 – Regulador da resposta antioxidante
OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
PF – Polpa do fruto
Pré-DM/ID – pré-Diabetes *mellitus*/Insulinodependente
RCT – Ensaio clínico randomizado e controlado
RI – Resistência à insulina
ROS – Espécies reativas de oxigénio
SF – Semente do fruto
SH-6 – Sanguina H-6
SOD – Superóxido dismutase
T – Tratamento
TA – Tecido adiposo
TG – Triglicéridos
TPTZ - 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina
Trolox – 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico
UA – Urolitina A
UB – Urolitina B
UC – Urolitina C

I. INTRODUÇÃO

1. Framboesa vermelha (*Rubus Idaeus* L.) - generalidades

As framboesas vermelhas (*Rubus Idaeus* L.), têm sido colhidas pelo Homem desde há milhares de anos. Há registos das framboesas terem sido cultivadas pelos romanos no século IV, tendo sido também utilizadas para fins medicinais por toda a Europa (Pritts, 1996). Acredita-se que os romanos as tenham cultivado um pouco por toda a Europa, tendo a sua popularidade aumentado ao longo dos séculos. Em 1823, estavam registadas 23 espécies de framboesa no ‘*History of English Gardening*’ (Swanson et al., 2011).

Os frutos e folhas eram comumente utilizados para tratar várias doenças, tais como doenças do foro gastrointestinal, cardiovascular, febre e diabetes. As folhas eram também utilizadas como emplastos, sendo aplicadas externamente em zonas inflamadas. Há estudos que indicam que as folhas de framboesa podem ter propriedades antiespasmódicas e propriedades relaxantes a nível muscular (Hummer, 2010).

Estes pequenos frutos são muito apreciados como sobremesa fresca, assim como em produtos processados, podendo ser consumidas em compotas, geleias, sumos, enlatados ou até mesmo liofilizadas (Swanson et al., 2011). Atualmente, os líderes mundiais de produção de framboesa vermelha são a Rússia, Polónia, Estados Unidos da América, Sérvia e México, respetivamente (Chepkemol, 2017).

Em Portugal, as regiões onde a produção de framboesa é mais importante são o Sudoeste Alentejano e o Sotavento Algarvio. Existe também produção na região do Fundão, Guimarães e Bragança, apesar de ser muito expressiva (Associação dos Jovens Agricultores de Portugal, 2017).

Na sua grande maioria, as framboesas da produção nacional são exportadas em fresco. Em 2018, a sua produção foi de cerca de 26,9 mil toneladas, principalmente destinadas à exportação (86%). A balança comercial com o exterior de framboesas frescas rondou os 160 milhões de euros (GPP, 2011).

2. Classificação botânica

As framboesas vermelhas pertencem à família *Rosaceae*, do género *Rubus*. O género *Rubus* integra mais de 250 espécies heterozigotas, estando estas subdivididas em 12 subgéneros (Bobinaite et al., 2016). As framboesas do subgénero *Idaeobatus* encontram-se distribuídas maioritariamente no hemisfério norte, na América do Norte, Europa e Ásia (Oliveira et al., 2007). O subgénero domesticado inclui amoras, framboesas, framboesas do ártico, framboesas em flor, sendo todas estas utilizadas em ensaios de melhoramento de espécies. O subgénero *Idaeobatus* é o mais importante a nível comercial, no entanto as framboesas mais importantes a nível económico são as framboesas vermelhas europeias (*R. idaeus* L. subsp. *idaeus*), as framboesas vermelhas norte-americanas (*R. idaeus* subsp. *strigosus*) e as framboesas pretas (*R. occidentalis* L.) (Bobinaite et al., 2016).

3. Morfologia

Morfologicamente, a *Rubus Idaeus* L. é um arbusto com cerca de 60 centímetros. As suas raízes podem chegar aos 25 centímetros de profundidade, com um diâmetro de 3 a 4 milímetros, que pode atingir 2 centímetros. A distribuição das raízes não é equivalente, existindo zonas com muitas raízes e outras mais rarefeitas (Oliveira et al., 2007). O caule é geralmente denominado por lançamentos, podendo ser liso ou apresentar pelos ou acúleos (espinhos) de diferentes formatos (Santos, 2009). As folhas são trifoliadas, geralmente com cinco folíolos quando adultas. Na parte superior não apresentam estomas, mas na página inferior apresentam estomas em grande número. As folhas acabam por cair durante o Outono. As flores são hermafroditas, tendo aproximadamente 2,5 centímetros de diâmetro, sendo geralmente compostas por cinco sépalas e 5 cinco pétalas, variando consoante o genótipo da planta. Podem existir flores solitárias, ou agrupamentos destas, sendo possível encontrar 3 a 75 flores por inflorescência (Oliveira, 2007). Estas flores segregam uma grande quantidade de néctar, que atrai os insetos polinizadores, nomeadamente as abelhas (Associação dos Jovens Agricultores de Portugal, 2017).

O fruto de *Rubus idaeus* L. é composto por diversas estruturas, as drupéolas, que se unem no recetáculo (carpóforo). Cada drupéola é constituída pela semente, que se

encontra rodeada pelo endocarpo (figura 1). Regra geral, cada framboesa pesa entre 2,5 a 5-6 gramas, mas em certas condições pode chegar aos 10 gramas (Jennings, 1988).

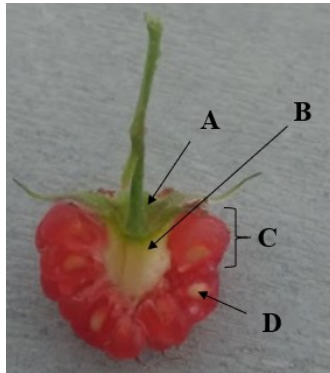


Figura 1 – Morfologia da framboesa. Corte Longitudinal do fruto.
Legenda: A: Pedúnculo; B: Recetáculo; C: Drupéola; D: Semente.

Durante a sua maturação, a framboesa vermelha começa por apresentar uma tonalidade branca esverdeada, evoluindo para um tom rosa e posteriormente para tons mais escuros de vermelho (figura 2). Os frutos amadurecem em três fases, sendo que cada fase dura entre 10 a 12 dias (Jennings, 1988).



Figura 2 – Diferentes fases de maturação da framboesa

A maturação é atingida após o crescimento máximo do fruto, acompanhada pelas características de sabor, textura, cor, diminuição da acidez e desaparecimento da adstringência. É neste processo que ocorre a formação dos açúcares, sendo que as framboesas serão mais ou menos doces consoante as concentrações de frutose, glucose e sacarose (Sousa, 2007).

4. Cultivares de framboesa

Na sua maioria, os cultivares mais importantes de framboesa vermelha são provenientes de hibridizações de *R. idaeus* e *R. strigosus*. Nos últimos anos, foram também utilizadas framboesas pretas (*R. occidentalis*) nestes cruzamentos. As características mais importantes provêm da *R. idaeus* (sabor, cor e gene dominante da resistência do vírus do mosaico da framboesa) (Bobinaite et al., 2016). Outras características, tais como resistência a doenças do caule e apodrecimento da raiz, são procuradas na *R. strigosus*. A facilidade de colheita, firmeza, menor suscetibilidade à podridão e maturação tardia são características encontradas na *R. occidentalis* (Daubeney, 2006).

Com a domesticação da espécie, houve uma diminuição da diversidade genética e morfológica na framboesa vermelha, pois os seus cultivares são geneticamente semelhantes. Assim, estão a ser feitos estudos de modo a ampliar a base genética de novos cultivares de framboesas (Fin et al., 2008).

A escolha dos atributos para os cultivares de framboesa é feita através das condições necessárias do meio ambiente, assim como as preferências do mercado. Algumas framboesas são cultivadas especialmente para fornecer o mercado de frutos frescos e outras para produtos processados. Também existem cultivares procurados pelas suas características de crescimento, ou seja, que podem ser cultivadas em estufas e túneis, podendo assim ser colhidas durante o inverno (Fin et al., 2008). Assim, estes cultivares vão continuar a ser desenvolvidos, em ordem a poder atender às necessidades dos consumidores um pouco por todo o mundo. Para além de se quererem produzir frutos de elevada qualidade, também se pretende obter espécies melhoradas, do ponto de vista das suas raízes e resistência a vírus que podem destruir os cultivares. Para além destas características, pretende-se também melhorar o fruto, bem como adaptar os seus cultivares a cada ambiente de cultivo (Fin et al., 2008).

5. Composição nutricional da framboesa

A framboesa vermelha é um fruto de baixo valor calórico e de elevada densidade nutricional, fornecendo cerca de 49 kcal por cada 100 gramas de fruto fresco (tabela 1) (INSA, 2021).

Tabela 1 – Composição nutricional da framboesa (adaptado do PortFIR, INSA, 2021)

Componente	Teor
Macroconstituintes (g/100 g de FF)	
Água	84,3
Proteína	0,9
Gordura total	0,6
Ácidos gordos monoinsaturados	0,1
Ácidos gordos polinsaturados	0,3
Ácido linoleico	0,2
Total de hidratos de carbono disponíveis	5,1
Mono + dissacáridos	5,1
Ácidos orgânicos	1,9
Fibra alimentar	6,7
Vitaminas	
Vitamina A total (equivalentes de retinol) (ug)	2
Caroteno (mg)	10
a-tocoferol (mg)	0,2
Tiamina (mg)	0,03
Riboflavina (mg)	0,02
Equivalentes de niacina (mg)	0,8
Niacina (mg)	0,6
Triptofano/60 (mg)	0,2
Vitamina B6 (mg)	0,05
Vitamina C (mg)	30
Folatos (ug)	33
Minerais	
Cinza (g)	0,54
Sódio (mg)	1
Potássio (mg)	229
Cálcio (mg)	26
Fósforo (mg)	23
Magnésio (mg)	20
Ferro (mg)	0,5
Zinco (mg)	0,3

As framboesas são uma ótima fonte de múltiplos nutrientes, principalmente fibra, contendo cerca de 6,7 gramas de fibra por 100 gramas de fruto fresco, e hidratos de carbono, nomeadamente açúcares (INSA, 2021) (tabela 1). Estes pequenos frutos contêm ainda ácidos orgânicos, proteínas e gordura em pequena quantidade, vitaminas, nomeadamente vitamina C e minerais. Assim, dada a sua composição nutricional, as

framboesas são consideradas uma boa alternativa aos *snacks*, pois a frutose vai ajudar a regular o nível de açúcar no sangue, tornando a digestão mais lenta. As fibras vão também contribuir para uma sensação de saciedade (Rao & Snyder, 2010).

A gordura presente na framboesa provém quase inteiramente das sementes, que são ricas em ácidos gordos insaturados (97,8%), pelo que é uma fonte de gorduras essenciais e saudáveis. Para além destas características, também contêm vitaminas lipossolúveis (Rao & Snyder, 2010; Bobinaite et al., 2016).

A vitamina C é uma importante aliada do sistema imunitário e do sistema nervoso e tem alegações de saúde autorizadas na UE. Contribui também para o funcionamento normal dos vasos sanguíneos, ossos, cartilagens, pele, gengivas e dentes. É também importante para o metabolismo produtor de energia. Ajuda também ao bom funcionamento da função psicológica, oxidações indesejáveis, aumenta a absorção de ferro e diminui o cansaço e a fadiga (Regulamento UE, N°432/2012). Considerando os dados da base de dados PortFIR (Tabela 1) e que o atual valor de referência desta vitamina é 80 mg/dia, a framboesa pode usar a alegação nutricional “Fonte de Vitamina C”, já que numa porção de 100 g, este pequeno fruto vermelho contém um valor ligeiramente superior à quantidade significativa para aquela vitamina (Reg 1169/2011 e Reg 1924/2006). Nessas condições, pode igualmente usar as alegações de saúde autorizadas para a vitamina C (Regulamento UE, N°432/2012).

Para além da vitamina C, a framboesa também constitui uma fonte de manganésio. Tanto o manganésio como a vitamina C são micronutrientes importantes para a proteção contra o *stress* oxidativo. Finalmente, as framboesas vermelhas são também conhecidas por fornecerem ácido fólico, niacina, potássio, cobre, riboflavina e ferro (Bobinaite et al., 2016).

6. Composição fenólica

Os compostos fenólicos um importante grupo de fitoquímicos, estando presente em todas as plantas, incluindo as framboesas. Os polifenóis das framboesas compreendem principalmente antocianinas e elagitaninos, para além de outros flavonoides, de ácidos fenólicos, taninos condensados e lignanos (tabela 2).

Tabela 2 – Composição fenólica de framboesas vermelhas (adaptado da base de dados Phenol explorer, (2015))

Classe	Subclasse	Composto	Teor (mg/100 g de FF)
Flavonoides	Flavonoides (Antocianinas)	Cianidina	0,53
		Cianidina-3-glucósido	14,89
		Cianidina-3-glucosilrutínósido	7,06
		Cianidina-3-rutínósido	5,2
		Cianidina-3-soforósido	37,61
		Delfinidina-3-glucósido	0,21
		Malvidina-3-glucósido	0,62
		Pelargodinina-3-glucósido	1,65
		Pelargodinina-3-glucosilrutínósido	0,82
		Pelargodinina-3-soforósido	3,46
		Pelargodinina-3-rutínósido	0,82
	Flavan-3-óis	(+) -Catequina	0,58
		(+) –Epicatequina	5,05
		Procianidina B2	0,1
	Flavonóis	Canferol	2,14E-03
		Canferol-3-glucósido	1,03
		Quercetina	0,02
		Quercetina-3-glucósido	3,58
		Quercetina-3-glucoronido	0,63
		Quercetina-3-rutínósido	11
Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxibenzoicos	Ácido elágico	2,12
		Ácido elágico arabinosido	2,27
		Ácido gálico	21,5
		Ácido p-hidroxibenzoico	1,82
	Ácidos hidroxicinâmicos	Ácido 5-cafeoilquínico	0,57
		Ácido p-coumárico	2,30E-04
		Ácido p-coumárico-4-glucósido	0,32
Taninos	Taninos hidrolisáveis (Elagitaninos)	Lambertianina C	30,84
		Sangiina H-6	76,1
		Sangiina H-10	28,5
	Taninos condensados (Proantocianidinas)	Procianidina	4,2
		Propelargonidina	11

Os compostos fenólicos desempenham várias funções biológicas, incluindo o crescimento, desenvolvimento e defesa da planta. Estes fitoquímicos incluem pigmentos, como as antocianinas, apresentam ação antimicrobiana e antifúngica, protegem a planta contra a radiação UV e têm atividade antioxidante contra radicais livres (Bravo, 1998).

As antocianinas são os principais flavanoides de frutos e vegetais e compreendem um importante grupo de pigmentos naturais solúveis em água. Estes polifenóis são responsáveis por diversas cores, do laranja ao vermelho, e do roxo ao azul, em flores, frutas e vegetais. As antocianinas são antocianidinas conjugadas, que se acumulam nos vacúolos das células. Aproximadamente 95% das antocianinas são derivadas de seis antocianidinas: cianidina, peonidina, pelargonidina, malvidina, delphinidina e petunidina (Bobinaité & Viškelis, 2013)

As principais antocianinas presentes nas framboesas são derivadas de cianidinas, que existem em formas não aciladas. As framboesas vermelhas contêm uma ampla diversidade antocianinas, sendo as maioritárias a cianidina-3-soforósido, cianidina-3-glucósido e a cianidina-3-glucosilrutinosido (tabela 2). As restantes antocianinas que se observam na tabela 2 são encontradas em quantidades diminutas (Bobinaite et al., 2016).

Alguns estudos demonstram que há diferenças significativas nos teores de antocianinas entre cultivares (Rao & Snyder, 2010). Num estudo que analisou 64 genótipos de framboesa nos Estados Unidos da América, Weber et al., (2008) concluiu que alguns desses genótipos acumulavam teores de antocianinas totais bastante baixos, e outros bastante altos, com uma variação considerável entre os 40 e os 100 mg por 100 de fruto fresco (FF). No entanto, outros estudos publicados relativos a genótipos de países diversos, obtiveram resultados bastantes díspares entre si (Bobinaite et al., 2016).

Há também evidência de variações significativas de ano para ano (Koponen et al., 2007; Lugase et al., 2011). As condições edafoclimáticas também influenciam o conteúdo destes flavonoides nos frutos de *Rubus idaeus* L., nomeadamente temperaturas baixas tendem a promover a síntese de antocianinas, e as temperaturas mais elevadas a sua diminuição (Bobinaité et al., 2016).

A concentração de antocianinas presente na framboesa varia ao longo do amadurecimento. Na framboesa não madura, verde, a sua concentração é baixa, apresentando apenas cianidina-3-glucósido e vestígios de cianidina-3-rutinosido. Quando o fruto passa a ter uma cor rosada, quantidades pequenas de cianidina-3-

soforósido e de cianidina-3-glucosilrutinosídeo começam a ser produzidas. Finalmente, quando as framboesas estão completamente maduras, o teor daquelas antocianinas aumenta muito (Beekwilder et al., 2005).

Os taninos são compostos solúveis em água com peso molecular entre os 300 e os 3000 Dalton. Este polifenóis dividem-se em dois grupos, hidrolisáveis e condensados. Os taninos estão presentes nas plantas, sendo biossintetizados e acumulados nestas como compostos de defesa contra a acção de microrganismos e para fazer face o stress oxidativo (Barbehenn et al., 2006). Os taninos hidrolisáveis (elagitaninos) são ésteres de ácido gálico e elágico, glicosados, onde os grupos hidroxilo da glucose são esterificados com os ácidos fenólicos. Os elagitaninos são polifenóis maioritários da framboesa vermelha.

Os elagitaninos são complexos derivados do ácido elágico, contendo uma ou mais moléculas do grupo hexahidroxidifenoil (HHDP). Os elagitaninos podem ser hidrolisados com ácidos ou bases para libertar moléculas de HHDP, formando assim espontaneamente ácido elágico (Vekiari et al., 2008). Esta reacção pode ser utilizada para quantificar elagitaninos em alimentos. Neste processo, o ácido elágico livre e os seus glicosídeos são analisados sem hidrólise, sendo depois subtraídos ao valor total de ácido elágico, obtendo-se assim o valor real de elagitaninos (Bobinaite et al., 2016). Por serem muito complexas, as estruturas das moléculas dos elagitaninos são difíceis de quantificar nos alimentos. São necessários equipamentos mais avançados, como ressonância magnética nuclear e espectrofotómetros de massa. Existem grandes variações nas quantidades, devido às condições de cultivo, genótipos dos frutos e nível de maturação. As condições de extração (temperatura, solução extratante, assim como procedimentos de hidrólise), podem também causar variações nos valores destes importantes compostos fenólicos das framboesas (Bobinaite et al., 2016).

Os taninos condensados (proantocianidinas), são polímeros de flavan-3-óis (Monteiro et al., 2005), sendo que as proantocianidinas são semelhantes aos elagitaninos. As proantocianidinas existem em maiores quantidades quando a framboesa está verde. Com a maturação do fruto, a sua quantidade vai diminuindo gradualmente (Rao & Snyder, 2010).

7. Genotipagem

O desenvolvimento de mapas genéticos de alta densidade e marcadores, a caracterização molecular de mais variedades e genotipagem de alto rendimento são o futuro para a obtenção de cultivares melhoradas (Foster et al., 2019). A procura pelos consumidores da melhoria da qualidade dos produtos, tempo de vida de prateleira e aumento de cultivo tradicional, leva à necessidade de pesquisa de novas soluções, tal como as técnicas de melhoria das cultivares já existentes, o desenvolvimento de programas de melhoramento genético e seleção dos genótipos mais promissores (Ward et al., 2013).

Os fatores genéticos e ambientais foram descritos como possíveis influenciadores da variação da composição da framboesa. Atualmente, há pouca informação disponível a nível da genómica e da genotipagem em *Rubus idaeus* L.. Para além desta questão, existe também o problema da diminuta variabilidade genética das cultivares desta espécie. Nos últimos anos têm sido estudos que visam o melhoramento das cultivares existentes pelos parâmetros habituais, como por exemplo a capacidade de adaptação a certas condições climáticas, a produtividade e critérios de qualidade dos frutos, considerados já componentes que apresentam potenciais efeitos fisiológicos benéficos para a saúde humana (Mazur et al., 2014).

8. Objetivo

Esta dissertação foi concebida para uma caracterização preliminar da composição fenólica e da atividade antioxidante de genótipos de framboesa produzidos em Portugal, no âmbito de um pequeno programa de melhoramento genético do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., INIAV, I. P., e da empresa produtora de pequenos frutos Beira Baga. Este estudo envolvia a recolha e análise de amostras de genótipos e de cultivares, produzidos nas mesmas condições edafoclimáticas e culturais no Polo de Inovação da Fataca do INIAV, I.P., em Odemira, estas últimas para comparação, a avaliação de parâmetros da qualidade e composicionais, a produção de extratos ricos em polifenóis e a determinação do teor em fenóis totais e da atividade antioxidante.

Infelizmente, as restrições impostas pela pandemia Covid-19 exigiram uma revisão dos objetivos propostos inicialmente. Assim, o capítulo Desenvolvimento compreende os *itens* seguintes:

1 – Composição fenólica, atividade antioxidante da framboesa e benefícios para a saúde – revisão narrativa.

2 – Avaliação do teor em fenóis totais e da capacidade antioxidante de amostras de *Rubus ideus* L., genótipos e cultivares.

3 – Conclusão relativa às notas finais dos estudos realizados.

9. Metodologia

Considerando os objetivos acima referidos, a metodologia adotada nos dois estudos que constituem esta dissertação é a seguinte:

1 – Revisão narrativa relativa ao estado da arte respeitante à composição fenólica, atividade antioxidante e efeitos benéficos para a saúde humana mediante pesquisa, seleção e análise de artigos científico revistos por pares na base de dados PubMed da Medline para a última década (2011 – 2021), considerando os níveis de evidência indicados na legislação vigente. Aspetos metodológicos particulares deste estudo serão descritos no *item* 1 do Desenvolvimento.

2 – O trabalho experimental relativo à Avaliação do teor em fenóis totais e da capacidade antioxidante de amostras de *Rubus ideus* L. foi realizado sobre amostras de genótipos e de variedades de framboesa vermelha e amarela disponibilizadas no âmbito do projecto PDR2020 Grupo operacional Competitvity Sudberry do INIAV, I.P. e da Beira Baga, e compreendeu a execução das tarefas seguintes: a) determinação por métodos normalizados da humidade e do grau brix nas diferentes amostras; b) preparação de extratos das amostras ricos em compostos fenólicos; c) implementação de metodologias analíticas para a caracterização da composição fenólica e da capacidade antioxidante *in vitro* das amostras; d) tratamento dos resultados (análise descritiva).

Os dados relativos ao trabalho experimental foram publicados sob forma de póster no 5º Congresso internacional do CiiEM, assim como no VI Colóquio Nacional da Produção de Frutos Pequenos (ver anexos).

II. DESENVOLVIMENTO

1. Composição fenólica, atividade antioxidante da framboesa e benefícios para a saúde – revisão narrativa.

1.1 Pesquisa exploratória

Para a revisão narrativa, efetuaram-se pesquisas na base de dados PubMed da Medline, em julho de 2021. Inicialmente utilizou-se o descritor “red raspberry”, sem qualquer filtro. Obtiveram-se 427 artigos, 22 revisões e 2 livros/documentos, desde o ano de 1937 até ao presente ano de 2021. Em seguida, aplicou-se um filtro para se obter os artigos a partir do ano 2000, obtendo-se 396 artigos, 21 revisões e 2 livros/documentos. Observou-se assim que a maioria dos artigos referentes a “red raspberry” foram publicados nos últimos 21 anos. Aplicou-se também o filtro dos últimos 10 anos, obtendo-se 290 artigos (16 revisões e 2 livros/documentos). Efetuou-se ainda uma pesquisa para os últimos 5 anos (2016-2021), observando assim 188 artigos (11 revisões e 2 livros/documentos). Após estas pesquisas, pesquisou-se as palavras-chave “red raspberry AND health benefits”, sem qualquer filtro, obtendo-se 25 artigos, a partir de 2005, 3 dos quais revisões. Aplicou-se o filtro para os últimos 10 anos (2011-2021), observando-se 21 artigos, dos quais 2 eram revisões. No filtro para os últimos 5 anos (2016-2021), obtiveram-se 14 artigos (2 revisões). Em seguida, efetuou-se uma pesquisa com as palavra-chave “red raspberry AND antioxidant activity”. Aplicou-se o filtro para obter os artigos a partir de 2005, obtendo-se 94 artigos (7 revisões). Após aplicação do filtro para os últimos 10 anos (2011-2021) obtiveram-se 70 artigos (3 revisões). No filtro para os últimos 5 anos (2016-2021), obtiveram-se 40 artigos (3 revisões). Pesquisou-se em seguida as palavras-chave “red raspberry AND antioxidant capacity”, a partir do ano de 2005, obtendo-se 39 artigos (1 revisão). No filtro para os últimos 10 anos, obtiveram-se 28 artigos (1 revisão). Para os últimos 5 anos (2016-2021), obtiveram-se 14 artigos (1 revisão) (ver tabela 3).

1.2 Resultados e discussão

Os resultados obtidos apresentam-se na tabela 3. Depois de analisados os artigos considerados na pesquisa foram classificados nas categorias: (1) ensaios em humanos, (2) ensaios em animais e (3) ensaios *in vitro*, em células. Optou-se por esta classificação, seguindo o estabelecido no Regulamento (CE) Nº 353/2008, que

resumidamente hierarquiza os estudos científicos para a fundamentação científica de alegações de saúde da seguinte forma: estudos de intervenção no ser humano, estudos aleatórios controlados, estudos de observação no ser humano. Após estes estudos, seguem-se os estudos efetuados em animais, e seguidamente os estudos efetuados *in vitro*.

Tabela 3 – Resumo dos resultados da pesquisa efetuada na PubMed da Medline (6/7/2021)

Descritores (Filtros)	Período	Artigos (n°)	‘Review’ + ‘Books’ & ‘Documents’
‘Red Raspberry’	1937-2021	427	22 + 2 (RS=0; MA=0)
	2000-2021	396	21 + 2
	2011-2021	290	16 + 2
	2016-2021	188	11 + 2
‘Red Raspberry’ AND ‘Health Benefits’	2005-2021	25	3 + 0
‘Red Raspberry’ AND ‘Health Benefits’ (10 years)	2011-2021	21	2 + 0
‘Red Raspberry’ AND ‘Health Benefits’ (5 years)	2016-2021	14	2 + 0
‘Red Raspberry’ AND ‘Antioxidant Activity’	2005-2021	94	7 + 0
	2011-2021	70	3 + 0
	2016-2021	40	3 + 0
‘Red Raspberry’ AND ‘Antioxidant Capacity’	2005-2021	39	1 + 0
	2011-2021	28	1 + 0
	2016-2021	14	1 + 0

1.2.1 Estudos realizados em humanos

A pesquisa realizada na base de dados PubMed incluiu estudos de intervenção em humanos (tabelas 4 e 5). Entre 2011 e 2021, foram encontrados 9 artigos com ensaios clínicos, dos quais 5 foram selecionados. Os artigos rejeitados eram ensaios com misturas de diversos frutos e/ou relativos a efeitos das folhas de *Rubus idaeus L.*

Um resumo dos aspetos relevantes dos ensaios clínicos dos artigos selecionados encontra-se nas tabelas 4 e 5:

Tabela 4 – Resumo dos ensaios em humanos encontrados na bibliografia pesquisada

Referência	Participantes	Classificação do Estudo e Efeito Fisiológico	Desenho do estudo	Duração	Resultado
Franck et al. (2020)	48 participantes (16 homens e 32 mulheres)	Ensaio Clínico Randomizado Controlado Metabolismo fosfolípido e função imunológica	GC: Placebo; 0 g de F congelada T1: 280 g de F congelada	8 semanas	Modulação da expressão de alguns genes Nenhum efeito significativo a nível metabólico
Istas et al. (2018)	10 participantes saudáveis (homens)	Ensaio Clínico Randomizado Duplamente Cego Ingestão de EA e libertação de urolitinas (biodisponibilidade) Melhoria da Função Endotelial através da redução da pressão arterial, um risco de DCV	GC: Placebo; 0 g de F congelada T1: 200 g de F congelada em sumo (AC: 164 mg; EA 30 mg; FL: 5,7 mg) T2: 400 g de F congelada em sumo (AC: 328 mg; EA: 60 mg; FL: 11 mg)	24 horas	<u>F, T1 e T2 vs Controlo</u> Melhoria clinicamente relevante da função endotelial, resultado da ↓ da pressão arterial (com potencial para uma de 10 a 15% para uma ingestão de framboesa longo prazo) Não se observaram diferenças significativas entre tratamentos
Xiao et al. (2019)	32 participantes 11 saudáveis (6 mulheres e 5 homens) 21 pré-DM/ID (9 mulheres e 12 homens)	Ensaio Clínico Randomizado Controlado Efeito da F na Resposta Metabólica Pós-prandial, em indivíduos pré-DM/ID	Placebo 0 g de F (grupo controlo) T1: 125 g de F congelada para participantes saudáveis (T1a) e pré-DM/ID (T1b) (AC: 72,8 mg; EA/AE: 33,2 mg; outros FD: 8,3 mg) T2: 250 g de F congelada para participantes saudáveis (T2a) e pré-DM/ID (T2b) (AC: 145,6 mg; EA/AE: 66,5 mg; outros FD: 16,5 mg)	24 horas, em 3 fases (3 dias distintos, com intervalos de pelo menos 3 dias)	Grupo pré-DM/ID (T1b vs. GC) ↓ da glicémia no plasma em 30 min; ↓ da AUC da insulina no plasma em 2h; <u>pico de insulina ↓ para 30 min</u> (T2b vs. GC) ↓ da glicémia no plasma em 30 min; ↓ da AUC da insulina no plasma e da glicémia no plasma em 2h; <u>pico de insulina ↓ de 1 h para 30 min</u> Grupo saudável (T1a e T2a vs. GC) ↑ da glicémia no plasma 2 h após a ingestão, pico de glicémia inferior ao do controlo, não dependente da dose

Tabela 5 – Resumo dos ensaios em humanos encontrados na bibliografia pesquisada (continuação)

Referência	Participantes	Classificação do Estudo e Efeito Fisiológico	Desenho do estudo	Duração	Resultado
Ludwig et al. (2015)	9 participantes saudáveis (5 mulheres e 4 homens)	Ensaio Clínico Outros ensaios, estudo de biodisponibilidade	300 g de F em sumo (AC: 292 µmol/300 g de F; AE: 6,3 µmol/300 g de F; EA: 251 µmol/300 g de F)	48 horas	Excreção na urina de 18 metabolitos das AC, sobretudo ácidos fenólicos hidroxibenzóicos, incluindo ácido cafeico (correspondendo apenas a 15% da ingestão) Excreção na urina de metabolitos dos EA e AE, sobretudo urolitinas A e B, com um C _{máx} > 24 h (correspondendo a 7% da ingestão)
Zhang et al. (2020)	35 participantes 10 saudáveis (controlo) 25 pré-DM/ID	Ensaio Clínico Randomizado Cruzado Controlado Outros Ensaios, estudo de biodisponibilidade	Fase 1: bebida de F congelada com 388,4 de polifenóis (61% de AC, 32% de EA, 5% de flavan-3-óis, 1% de FL e 2% de AF) Fase 2: bebida de F fresca com 129,7 mg de polifenóis (60% de AC, 33% de EA, 4% de flavan-3-óis, 1% de FL e 2% de AF), com adição de 8 g de FOS (T1) ou sem adição de 8 g de FOS (T2)	Fase 1: 24 h Fase 2: 12 semanas (8 semanas de intervenção e 4 semanas de restrição de F; 4 semanas T1, 4 semanas de restrição de F, 4 semanas T2)	<u>Fase 1, pré-DM/ID vs GC</u> ↑ da concentração de conjugados derivados de AC no plasma (correspondendo a cerca de 45% e 27% da ingestão nos pré-DM/ID e nos saudáveis, respetivamente) <u>Fase 2, T1: FOS + F em pré-DM/ID vs GC</u> ↓ da concentração de conjugados de AC no plasma e ↑ de derivados de EA, concretamente urolitinas A e B <u>Em conclusão, Fase 1 vs Fase 2</u> ↓ valor de derivados de AC no plasma ↑ de urolitinas no plasma

AC: antocianina; AE: ácido elágico; AUC: área sob a curva; DCV: doenças cardiovasculares; EA: elagitanino; F: Framboesa; FD: flavonóides; FL: Flavonóis; FOS: fruto-oligossacarídeos; GC: grupo controlo; pré-DM/ID: pré-Diabetes *mellitus*/Insulinodependente; T: tratamento.

Síndrome metabólica

A síndrome metabólica consiste num conjunto de doenças metabólicas, que inclui HTA (hipertensão arterial), obesidade, diabetes *mellitus* e dislipidemias, estando esta síndrome associada a um risco elevado de DCV (doenças cardiovasculares). Esta envolve fatores genéticos e adquiridos (como alimentação e sedentarismo). Nos últimos anos, um pouco por todo o mundo, observou-se um aumento exponencial destes fatores, em especial em países desenvolvidos. Estudos têm vindo a relatar o benefício de certos compostos naturais, presentes em plantas e frutos, com potenciais efeitos benéficos no tratamento desta síndrome (Rochlani et al., 2017). Seguidamente, descrevem-se os estudos de intervenção em humanos, com ingestão de framboesa, relativos a síndrome metabólica.

Franck et al. (2020) realizaram um ensaio clínico randomizado e controlado (RCT) com 48 participantes. O objetivo desse RCT foi de estudar o efeito da ingestão diária de 280 g de framboesa congelada, durante 8 semanas, no risco de síndrome metabólica. Neste estudo, participaram 16 homens e 32 mulheres, todos com um IMC (índice de massa corporal) entre 25 e 40. Estes participantes tinham também um nível de triglicéridos (TG) e de insulina mais elevados do que o normal, mas sem lhes ter sido diagnosticado diabetes ou hipercolesterolemia. Os participantes foram separados em dois grupos, um dos quais o GC (grupo controlo), que ingeriu o placebo (0 g de framboesa), e o grupo T1 (tratamento), que ingeriu 280 g de framboesa congelada. Todos os participantes foram avaliados às 0, 4 e 8 semanas, tendo-lhe sido feitas análises ao sangue e urina nesses três momentos. No final das 8 semanas, conclui-se que houve uma modelação da expressão de alguns genes, no entanto, para indivíduos em risco de doença metabólica, não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos, a nível de marcadores metabólicos.

Istas et al. (2018), descrevem um ensaio clínico randomizado duplamente cego realizado com 10 homens, com o objetivo de avaliarem o efeito da ingestão dos EA (elagitaninos) da framboesa e a libertação dos seus metabolitos, as urolitinas, durante 24 horas. Os indivíduos foram divididos em 3 grupos, em que um ingeriu o placebo (GC), outro ingeriu 200 g de framboesa congelada (T1) e terceiro 400 gramas de framboesa congelada (T2), em batido (ver tabela 4). Foram feitas três colheitas de sangue e urina,

às 0 h, 2 h e 24 h do estudo, de modo a quantificar a quantidade de metabolitos no sangue e na urina. As análises efetuadas às 24 horas foram efetuadas sob um jejum superior a 12 horas. As análises efetuadas às 2h apresentaram o $C^{máx}$ de AE (ácido elágico) (T1 e T2 vs GC), estando correlacionado com a melhoria da função endotelial (diminuição da pressão arterial). Nas amostras de urina, às 24 h, observou-se o $C^{máx}$ de urolitinas, metabolitos de elagitaninos. Os elagitaninos são metabolizados pela microbiota do cólon, sendo catabolizados em urolitina (metabolitos com benefícios vasculares). Este composto pode ser detetado até 80 horas após o consumo de elagitaninos. Correlacionou-se o $C^{máx}$ das urolotinas com a melhoria da função endotelial às 24 h apenas no grupo que ingeriu os 200 g de framboesa. Assim, Ista et al. concluiu com este estudo que a ingestão diária de uma certa quantidade de framboesa vermelha pode levar à melhoria da função endotelial até 24 horas após a sua ingestão.

Xiao et al. (2019) descrevem um ensaio clínico randomizado controlado com 32 participantes, dos quais 6 mulheres e 5 homens metabolicamente saudáveis e 9 mulheres e 12 homens pré-DM/ID (pré-diabéticos *mellitus*/insulinodependentes). O estudo dividiu os participantes em três grupos, GC (placebo), T1 (125 g de framboesa congelada) e o T2 (250 g de framboesa congelada) (ver Tabela 4). Os grupos T1 e T2 foram compostos por indivíduos saudáveis (T1a/T2a) e pré-DM/ID (T1b/T2b). Este estudo exigiu uma dieta pobre em polifenóis, a começar no mínimo três dias antes do ensaio. Metade das framboesas foram consumidas em sumo, e a outra metade com cereais. Recolheram-se amostras de sangue em jejum e ao longo das 24 horas seguintes à ingestão. Com este estudo, Xiao et al. (2019) observaram que no grupo T1b vs GC, houve uma diminuição da glicémia no plasma em 30 minutos, diminuição da AUC (área sob a curva) da insulina no plasma em 2 h, e o pico de insulina diminuiu para 30 minutos. No grupo T2b vs GC, observaram também uma diminuição da glicémia no plasma em 30 minutos, diminuição da AUC (área sob a curva) da insulina no plasma e da glicémia no plasma em 2 h, e o pico de insulina diminuiu de 1 hora para 30 minutos. Quando compararam os resultados do T1a e T2a com o GC, observaram que o aumento da glicémia no plasma ocorreu 2 h após a ingestão, e o pico da glicémia do T1a e T2b foi inferior ao do GC (não dependente da dose). Assim, Xiao et al. (2019) conclui com este estudo que a ingestão de framboesas em certas quantidades pode levar a efeitos benéficos para a saúde, tal como a gestão da glicose pós-prandial e insulina em populações de risco, apresentado assim este estudo relevância clínica.

Ludwig et al. (2015) fizeram um ensaio de clínico de biodisponibilidade, com 9 indivíduos saudáveis, 5 mulheres e 4 homens que ingeriram 300 g de framboesa homogeneizada em sumo (ver tabela 5). Foram realizados exames à urina e ao sangue. A urina começou a ser recolhida nas 12 horas anteriores ao estudo, assim como toda a que foi excretada nas 48 horas após a ingestão dos frutos. O sangue foi recolhido logo antes da ingestão de frutos, e várias vezes nas 48 horas seguintes. Os resultados obtidos mostraram que as AC (antocianinas) excretadas na urina correspondiam a 0,007% da quantidade ingerida. Foram excretados 18 metabolitos derivados de AC, correspondendo a 15% da quantidade ingerida. Os EA passam do intestino delgado para o intestino grosso, onde a microbiota medeia a sua conversão em urolitina A ou B, que são encontradas no plasma. O estudo de Ludwig et al. (2015) aparentou que o metabolismo das antocianinas parece iniciar-se no trato gastrointestinal superior (provavelmente devido ao seu pH mais elevado), com os derivados no plasma a apresentarem um $C^{máx}$ 1 – 1,5h após a ingestão. Os compostos originados pela ingestão de elagitaninos foram principalmente metabolitos de fase II (urolitinas A e B), com um $C^{máx}$ > 24 horas, sendo ainda excretados nas 32 a 48 horas após a ingestão. As quantidades e os tipos de urolitinas produzidos diferiram muito entre os indivíduos em estudo, presumivelmente devido às diferenças de composição da microbiota intestinal dos mesmos. Estes processos que se iniciam no trato gastrointestinal, e subsequente formação de metabolitos de fase II, têm um papel importante na biodisponibilidade tanto das antocianinas, como dos elagitaninos. São os seus metabolitos que se encontram no sistema circulatório, que podem explicar o modo subjacente de ação destes compostos, que têm efeitos protetores na saúde humana.

Zhang et al. (2020) desenvolveu um estudo de intervenção com 35 indivíduos, 10 dos quais saudáveis (GC) e 25 indivíduos pré-DM/ID. O objetivo do estudo foi de observar o efeito da suplementação de framboesas vermelhas com ou sem adição de FOS (fruto-oligossacarídeos) em indivíduos pré-DM/ID. O estudo foi dividido em duas fases, fase 1 e fase 2 (ver tabela 5). Na fase 1, os indivíduos ingeriram uma bebida de framboesa congelada concentrada, tendo esta fase a duração de 24 h. Na segunda fase, que teve a duração de 12 semanas, os indivíduos foram separados em dois grupos (T1 e T2), sendo que no T1 ingeriram uma bebida de framboesa congelada com a adição de FOS, durante 4 semanas. Seguidamente, fizeram uma pausa de 4 semanas, sendo seguida mais 4 semanas de ingestão de framboesa, mas sem a adição de FOS. O grupo T2 executou o mesmo processo, mas começou pela ingestão de framboesa sem adição

de FOS. Ao analisarem os resultados, Zhang et al. (2020) observaram que na fase 1 (pré-DM/ID vs GC), houve um aumento da concentração de conjugados derivados de AC no plasma, correspondendo a cerca de 45% e 27% da ingestão no pré-DM/ID e no GC, respectivamente. Na fase 2 (T em pré-DM/ID vs GC), observaram uma diminuição da concentração de conjugados de AC no plasma e um aumento de derivados de EA (concretamente urolitinas A e B). Depois de compararem os resultados das duas fases, Zhang et al. (2020), concluíram que na fase 1 houve um de valor inferior de derivados de AC no plasma e um valor mais elevado de urolitinas no plasma. Com este estudo, concluíram que existe um efeito benéfico na ingestão de framboesa a longo prazo, em indivíduos pré-DM/ID, no entanto, são necessários mais estudos para fundamentar estes resultados.

1.2.2 Estudos realizados em animais

Da pesquisa realizada no PubMed, foram incluídos 11 artigos de estudos de intervenção em animais, concretamente em ratos. Pode-se observar o resumo dos dados relevantes desses estudos nas tabelas 6, 7, 8 e 9.

Tabela 6 – Resumo dos ensaios em animais encontrados na bibliografia pesquisada

Referência	Modelo animal (estado de saúde; sexo)	Desenho	Duração	Resultado
Bibi et al. (2018)	24 ratos C57BL/6J saudáveis (machos) Efeito da F em colite crônica induzida por DSS	2 grupos com 12 ratos T1: DC + 1% DSS T2: DC + 5% do peso da ração seca de F _{liof} + 1% DSS	10 semanas	<u>DC + F + 1% DSS vs DC + 1% DSS</u> ↓ da DAI e dano histológico em 38,9%, ↓ dos mediadores da inflamação em 20 – 70% - ↓ IL-6 e COX-2 - Melhoria da estrutura do cólon e ↓ distorção da cripta - > regeneração do epitélio, com o ↑ da diferenciação celular - ↓ da sinalização oncogénica pela supressão do tumor p53
Carey et al. (2019)	60 ratos C57BL/6 saudáveis (machos) Memória e aprendizagem	4 grupos com 15 ratos T1: DC (10% de G) T2: DC + 4% do peso seco da DC em F _{liof} T3: DRG (60% de G) T4: DRG + 4% do peso seco da DRG em F	20 semanas	<u>12 semanas</u> - Os ratos das dietas DC e DRG pioraram a sua <i>performance</i> , quando comparados com as dietas suplementadas com F <u>20 semanas</u> - DRG + 4% de F tinha um tempo de latência ↓ para encontrar a saída vs DRG - IL-6 ↑ nos DRG - ↑ do FNDC nos ratos suplementados com F
Chen et al. (2011)	100 ratos saudáveis Wistar Efeito do EF em ratos com lesões hepáticas provocadas por DEN	5 grupos com 20 ratos T1: Controlo T2: DEN T3: DEN + 0,75 g de FF/kg de peso vivo /dia T4: DEN + 1,5 g de FF/kg de peso vivo /dia T5: DEN + 3 g de FF/kg de peso vivo /dia	20 semanas	<u>DEN + FF vs DEN</u> - Inibição da proliferação de células e da angiogénese - Apoptose das lesões hepáticas induzidas por DEN

Tabela 7 – Resumo dos ensaios em animais encontrados na bibliografia pesquisada (continuação)

Referência	Modelo animal (estado de saúde; sexo)	Desenho	Duração	Resultado
Fan et al. (2019)	40 ratos C57BL/6 saudáveis (machos) Mecanismo de regulação da obesidade e da inflamação	5 grupos com 8 ratos T1: DC (10% G) T2: DRG (45% G) T3: DRG + FI (45% G + 0,4% em FI _{liof}) T4: DRG + SF (45% G + 0,1% em SF _{liof}) T5: DRG + PF (45% G + 0,3% em PF _{liof})	16 semanas	<u>DRG + (FI/SF/PF) vs DRG</u> - ↓ da obesidade, inflamação e resistência à insulina <u>DRG + (FI/PF)</u> - Reversão da disfunção do TA mediado pela obesidade - Inibição da ativação do NLRP3 e do modificador epigenético p/a regulação da adipogênese
Jean-Gilles et al. (2012)	6 ratos Lewis saudáveis 18 ratos Lewis com artrite induzida Efeito anti-inflamatório da F na artrite induzida	4 grupos de 6 ratos T1: Controlo T2: 30 mg/kg de peso vivo de EF (DB) T3: 120 mg/kg de peso vivo de EF (DA)	30 dias	<u>DA vs Controlo</u> - ↓ incidência e severidade da doença - Inibição significativa da inflamação, ↓ danos da cartilagem - Reabsorção óssea
Luo et al. (2017)	32 ratos C57BL/6J saudáveis (machos) Suplementação de F nas doenças metabólicas	4 grupos de 8 ratos T1: DPG T2: DRG T3: DRG + CSF (2,5 % do peso da ração seca de F _{liof}) T4: DRG + CPF (2,5 % do peso da ração seca de F _{liof})	10 semanas	DRF + CSF e DRG + CPF vs DRG - ↓ do peso, ↓ da acumulação de G no fígado - ↑ da expressão genética da Hmox 1

Tabela 8 – Resumo dos ensaios em animais encontrados na bibliografia pesquisada (continuação)

Referência	Modelo animal (estado de saúde; sexo)	Desenho	Duração	Resultado
Noratto et al. (2017)	30 ratos diabéticos obesos Estudo dos efeitos metabólicos da suplementação de F e fatores de risco de DCV	2 grupos com 15 ratos T1: Ração (Controlo) T2: Ração + 9,8% do peso seco em F _{liof}	8 semanas	<u>Suplementação vs Controlo</u> - ↓ de ROS - ↑ GPx - ↑ GPx/SOD na atividade do fígado/eritrócitos no sangue
Tu et al. (2019)	40 ratos C57BL/6 saudáveis (machos) Estudo da hiperlipidemia	5 grupos com 8 ratos T1: DC T2: DRG T3: DRG + 100 mg de EF/kg de peso vivo T4: DRG + 200 mg de EF/kg de peso vivo T5: DRG + 300 mg de EF/kg de peso vivo	8 semanas	<u>DRG vs DC</u> - Peso ↑ em 70,16%, colesterol e TG ↑ <u>DRG + EF (100, 200 e 300 mg/Kg) vs DRG</u> - ↓ tamanho dos adipócitos - ↓ acumulação de gordura induzida por DRG - ↑ da atividade antioxidante - ↓ dos TG e colesterol LDL (dose-dependente)
Wang et al. (2019)	15 ratos saudáveis <i>nude</i> (fêmeas) Efeito da F na prevenção de lesões causadas por UVB	3 grupos com 5 ratos T1: Controlo T2: Exposição UVB T3: Exposição UVB + 750 µL/ml de EF	5 dias	<u>Exposição UVB + 750 µL/ml de EF vs Exposição UVB</u> - Prevenção das lesões causadas por UVB através da ↓ da morte celular dos queratinócitos - ↓ da descamação, eritema, rugas, perda de água - ↓ dos danos das fibras de colagénio - Inibição da MAPK p38 cinase, c-Jun e NF-κB - Ativação da cascata de sinalização Nrf2

Tabela 9 – Resumo dos ensaios em animais encontrados na bibliografia pesquisada (continuação)

Referência	Modelo animal (estado de saúde; sexo)	Desenho	Duração	Resultado
Zhao et al. (2018)	12 ratos AMPK α 1 ^{-/-} , (macho) 12 ratos AMPK α 1 ^{fl/fl} , (macho) Resposta da inflamação e RI no músculo esquelético	4 grupos de 6 ratos T1: DRG T2: DRG + 5% do peso da ração seca de F _{liof}	10 semanas	<u>DRG + 5% de FS vs DRG</u> AMPK α 1 ^{fl/fl} - ↓ do armazenamento de lípidos, ↓ da inflamação - Melhoria da sensibilidade à insulina e biogénese mitocondrial promovida pelo músculo esquelético
Zhu et al. (2018)	40 ratos C57BL/6J saudáveis Ação preventiva da suplementação de F nas doenças metabólicas	4 grupos de 10 ratos T1: 10% de G (DC) T2: 10% de G + 2,4 g de F _{liof} (DC + FS) T3: 60% de G (DRG) T4: 60% de G + 2,4 g de F _{liof} (DRG + FS)	12 semanas	<u>DRG + FS vs DRG</u> - Normalização do nível basal de glicose no sangue e da RI - Melhoria dos níveis de O ₂ e produção de CO ₂ - ↓ dos níveis de gordura no fígado - Supressão da ativação do inflamossoma NLRP3 - ↓ da produção da IL-1 β e IL-18

CPF: concentrado de puré de framboesa; CSF: Concentrado de sumo de framboesa; DA: dose alta; DB: dose baixa; DAI: índice da atividade da doença; DC: dieta controlo; DCV: doença cardiovascular; DEN: N-nitrosodimetilamina; DRG: dieta rica em gordura; DSS: sulfato de dextrano de sódio; EF: extrato de framboesa; F: framboesa; FI: fruto inteiro; FF: fruto fresco; FNDC: fator neurotrófico derivado do cérebro; FS: framboesa seca; G: gordura; GPx: glutathione peroxidase; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; PF: polpa do fruto; RI: Resistência à insulina; ROS: espécies reativas de O₂; SF: semente do fruto; SOD: superóxido dismutase; TA: tecido adiposo; TG: triglicéridos.

Doenças cardiovasculares

As DCV são doenças que afetam o sistema circulatório. Têm diversos fatores de risco, como pressão arterial elevada, colesterol e triglicéridos elevados, diabetes, obesidade e sedentarismo. Uma dieta equilibrada e atividade física contribuem em muito para a redução do risco destes fatores. A inflamação e o *stress* oxidativo aumentam a probabilidade de ocorrência de DCV, sendo necessário encontrar soluções para diminuir os seus fatores de risco.

A hiperlipidémia (valores elevados de colesterol no plasma) é um dos fatores de risco de DCV. Estudos demonstraram que os extratos de plantas ricos em polifenóis e flavonóides tem um efeito positivo no metabolismo dos lípidos *in vivo*. A longo prazo, podem ser mais adequados do que os medicamentos, por terem uma toxicidade mais baixa. Tu et al. (2019) desenvolveram um ensaio em ratos machos saudáveis C57BL/6, de modo a estudarem o efeito de um EF na hiperlipidémia. Neste ensaio, utilizaram 40 ratos, divididos em cinco grupos de 8. Um grupo recebeu uma dieta controlo (DC), outro uma dieta rica em gordura (DRG). Os outros três grupos receberam a mesma DRG, suplementada com 100, 200 e 300 mg de EF/kg de peso vivo, respetivamente. Ao fim de 8 semanas, observou-se que os ratos da DRG tinham tido um aumento significativo de peso (70,16%), assim como um valor elevado de colesterol e triglicéridos. Nos três grupos que tiveram a suplementação de EF, quando comparados com o grupo DRG, observou-se uma diminuição da acumulação de gordura induzida pela DRG, diminuição do tamanho dos adipócitos, aumento da atividade antioxidante, assim como a diminuição dos triglicéridos e do colesterol LDL (dose-dependente). Estes resultados foram promissores para a diminuição da hiperlipidémia induzida pela dieta. Noutro estudo, desenvolvido por Luo et al. (2017), estudaram-se 32 ratos saudáveis machos C57BL/6J, sendo que se dividiram em quatro grupos de oito. Cada grupo recebeu uma dieta, DPG (dieta pobre em gordura), DRG + CSF (concentrado de sumo de framboesa) e DRG + CPF (concentrado de puré de framboesa). Ambas as suplementações (CSF e CPF) correspondiam a 2,5 % do peso da ração seca de framboesa liofilizada. Ao fim de 10 semanas, verificou-se uma diminuição do peso e acumulação da gordura no fígado, assim como o aumento da expressão genética da Hmox 1 (que tem uma ação de proteção contra o *stress* oxidativo) em ambos os grupos suplementados, quando comparados com o grupo DRG. Este estudo aponta para o efeito protetor da framboesa contra o *stress* oxidativo.

Noratto et al. (2017) desenvolveram um estudo com 30 ratos diabéticos obesos, de modo a serem estudados os efeitos metabólicos da suplementação de framboesa e fatores de risco de DCV. Os ratos deste estudo foram divididos em dois grupos de 15, recebendo cada um uma dieta específica. Um grupo ingeriu uma ração *standard*, e o outro grupo ração *standard* suplementada com 9,8% do peso seco em framboesa liofilizada. Ao cabo de 8 semanas, verificou-se uma diminuição de ROS e o aumento de GPx (glutathione peroxidase) na atividade do fígado e nos eritrócitos no sangue. O GPx é uma enzima de desintoxicação dos peróxidos orgânicos e inorgânicos, atuando na atividade antioxidante, reduzindo o stress oxidativo do organismo.

A acumulação de lípidos é uma das principais características da obesidade. Esta acumulação dessensibiliza no músculo esquelético a sinalização de insulina, levando à resistência da mesma e a diabetes tipo II. A AMPK (proteína quinase ativada por AMP) funciona como um sensor que detecta o nível de energia no músculo esquelético, controlando o metabolismo dos ácidos gordos e da glucose. A ativação da AMPK previne a obesidade e as doenças metabólicas associadas. Dietas ricas em polifenóis são excelentes ativadores da AMPK, ajudando assim na prevenção das doenças metabólicas (obesidade, diabetes tipo II). A AMPK α é uma isoforma de AMPK. Estudos demonstraram que é possível que esta isoforma medeia a resistência à insulina no músculo esquelético. Assim, Zhao et al. (2018) estudaram 24 ratos machos, 12 dos quais AMPK α 1^{-/-}, e 12 AMPK α 1^{fl/fl}, com o objetivo de estudarem a resposta da inflamação e resistência à insulina no músculo esquelético. Os ratos foram divididos em quatro grupos, com 6 elementos em cada (dois grupos AMPK α 1^{-/-} e dois grupos AMPK α 1^{fl/fl}), recebendo duas dietas diferentes (DRG e DRG + 5% do peso da ração seca de framboesa liofilizada, com 11 mg de EAG/kg de FS), para serem estudados os seus efeitos em ambos os tipos de rato. Os resultados apresentados mostram que os ratos que ingeriram dieta suplementada com framboesa tiveram uma diminuição da acumulação de lípidos, bem como uma diminuição da inflamação. Observou-se também uma melhoria da sensibilidade à insulina e biogénese mitocondrial promovida pelo músculo esquelético. Estes resultados foram apenas obtidos pelo grupo AMPK α 1^{fl/fl}. Segundo os autores, mais estudos com isoformas de AMPK são necessários para se poderem cimentar estes resultados.

Estudos apontam para a importância do NLRP3 na patogénese da diabetes tipo II, assim como da resistência à insulina. Zhu et al. (2018) estudaram o papel das framboesas na supressão do NLRP3 em ratos. O estudo compreendeu 40 ratos

C57BL/6J saudáveis, que foram separados em 4 grupos de 10 e tratados durante 12 semanas com 4 dietas diferentes: DC (dieta controlo com 10% de gordura), DC + FS (dieta controlo com 10% de gordura e 2,4 g de framboesa liofilizada), DRG (dieta com 60% de gordura) e DRG + FS (dieta com 60% de gordura e 2,4 g de framboesa liofilizada). Após as 12 semanas, observou-se que os ratos que ingeriram a DRG + FS, quando comparados com o grupo da DRG, diminuíram os níveis de gordura no fígado e normalizaram o nível basal de glicose no sangue e da resistência à insulina. Observou-se também uma melhoria dos níveis de O₂ e produção de CO₂, assim como a diminuição da produção da IL-1 β e IL-18. Também se verificou a supressão da ativação do inflamossoma NLRP3. Noutro estudo, dirigido por Fan et al. (2019), 40 ratos machos saudáveis C57BL/6 foram divididos em 5 grupos de 8, recebendo cada um uma dieta específica. As cinco dietas foram constituídas pela DC (10% de gordura), DRG (45% de gordura), DRG + FI (45% de gordura + 0,4% de framboesa inteira liofilizada), DRG + SF (45% de gordura + 0,1% de sementes de framboesa) e DRG + PF (45% de gordura + 0,3% de puré de framboesa). Nas dietas suplementadas, quando comparadas com a DRG, observou-se uma diminuição da obesidade, inflamação e resistência à insulina. No entanto, na DRG + FI e DRG + PF, observou-se também uma reversão da disfunção do tecido adiposo mediado pela obesidade, assim como a inibição da ativação do NLRP3 e do modificador epigenético para a regulação da adipogénese. Estes dois estudos (Zhu et al. e Fan et al, 2018), fundamentam os outros estudos já existentes, que referem a importância do NLRP3 na diabetes tipo II.

Artrite reumatoide

A artrite reumatoide é uma doença crónica autoimune, que se caracteriza pela inflamação do líquido sinovial e aumento da densidade das células, hiperplasia sinovial, infiltração de células inflamatórias, o que leva à formação de cartilagem e destruição óssea, que por sua vez leva à perda de mobilidade e dor crónica. Para estudar o efeito de um extrato de framboesa (EF) na artrite reumatóide, Jean-Gilles et al. (2012) estudou 24 ratos, 6 saudáveis e 18 em que se induziu a doença. Para a indução da doença, foi injetado na cauda dos ratos 750 μ g de *Mycobacterium tuberculosis*. Os ratos foram separados em 4 grupos de 6, nos quais 3 grupos receberam a injeção. Dos 3 grupos que receberam a injeção, um deles não recebeu tratamento. Os outros dois receberam EF, com duas doses diferentes, 30 e 120 mg/kg de peso vivo, respetivamente. Este EF continha 20% de equivalentes de ácido gálico, e 5% de antocianinas em equivalentes de

cianidina-3-glucósido), assim como 9,25% de elagitaninos. Os resultados apontaram para efeitos positivos no grupo dos 120 mg/kg, pois houve uma descida significativa da inflamação, danos da cartilagem, assim como reabsorção óssea. No geral, a incidência e a severidade da doença diminuíram. No entanto, são necessários mais estudos, e também em humanos, com consumo regular de framboesa para se poderem comparar os efeitos benéficos.

Colite ulcerosa

A colite ulcerosa é uma doença inflamatória intestinal, de etiologia desconhecida. A evolução clínica é imprevisível, alterando entre períodos de exacerbação e remissão. Esta doença aumenta o risco de desenvolvimento de cancro colorretal. As lesões na mucosa aumentam a sinalização da inflamação, aumentando a severidade da doença, existindo um risco de hiperplasia. Bibi et al. (2018) desenvolveram um estudo com 24 ratos C57BL/6J machos saudáveis, separando-os em dois grupos de 24. A ambos os grupos foi administrado uma dose de DSS (sulfato de dextrano de sódio), de forma a induzir a colite. As doses foram administradas em ciclos de 7 dias, sendo colocadas na água, seguidos de ciclos de 14 dias, em que não se administrava DSS. Um dos grupos ingeriu uma DC, e o outro grupo uma DC suplementada com 5% de peso da ração em framboesa liofilizada (11 gramas de EAG/kg de FS), durante 10 semanas. Ao compararem os dois grupos, Bibi et al. (2018) observaram que o grupo que ingeriu a framboesa teve uma diminuição do DAI (índice da atividade da doença) e do dano histológico em 38,9%, assim como um decréscimo dos mediadores da inflamação de cerca de 20 a 70%. Histologicamente, observaram uma melhoria da estrutura do cólon e uma diminuição da distorção da cripta intestinal, devido a uma maior regeneração do epitélio, com o aumento da diferenciação celular. Os valores da IL-6 e da COX-2 diminuíram, assim como a sinalização oncogénica, através da supressão do tumor p53. Estes efeitos demonstram o potencial da framboesa na redução do risco de colite.

Doenças neurodegenerativas

Estudos recentes demonstraram que fitoquímicos específicos da framboesa aparentam ter um efeito benéfico na prevenção da disfunção cognitiva (antocianinas e elagitaninos). Dietas ricas em gorduras podem afetar precocemente as funções cognitivas, devido ao aumento do stress oxidativo e inflamação dos tecidos. De modo a

observar estes fenómenos, Carey et al. (2019) realizaram um estudo com 60 ratos machos C57BL/6 saudáveis. O estudo teve a duração de 20 semanas, nas quais os ratos foram divididos em 4 grupos diferentes, sendo-lhes dada uma dieta específica (DC), com 10% de gordura; dieta rica em gordura (DRG), dieta DC com 4% do peso seco em framboesa liofilizada (DC + 4%), e dieta DRG com 4% do peso seco em framboesa liofilizada (DRG + 4%). Para o estudo, os ratos foram colocados em labirintos, sendo avaliada a sua performance no tempo necessário para saírem, bem como o número de erros cometidos. Ao fim de 12 semanas, os ratos com as dietas DC e DRG pioraram a sua performance, quando comparados com os ratos que tiveram a suplementação de framboesa. Às 20 semanas, os ratos da DRG + 4% tinham um tempo de latência inferior aos ratos DRG, assim como a IL-6 com um nível inferior. Os ratos que receberam suplementação apresentaram um BDNF mais elevado, assim como um valor IL-6 diminuído, o que contribui para a conservação da memória e aprendizagem. Mais estudos são necessários para comprovar a influência da framboesa neste tipo de degeneração, assim como estudos realizados no ser humano.

Lesões hepáticas

As lesões hepáticas podem facilmente evoluir para um cancro de fígado, que é a terceira causa de morte por cancro no mundo. Estima-se que cerca de 30% dos cancros hepáticos podem ser prevenidos através da alimentação. Chen et al. (2011) estudaram o efeito de um EF em ratos com lesões hepáticas induzidas por DEN (N-nitrosodimetilamina). Para tal, utilizaram 100 ratos Wistar saudáveis, que foram separados em 5 grupos de 20. Um grupo recebeu uma DC, sem DEN. Os outros 4 grupos receberam uma dose diária de água com 0,025% de DEN, durante 20 semanas. Dentro destes 4 grupos, três deles foram suplementados com três doses diferentes de EF (0,75, 1,5 e 3 g de equivalentes de FF/kg de peso vivo/dia). O estrato continha 437,62 mg EAG/100g de FF. Observou-se que o EF inibiu a proliferação de células, assim como a angiogénese, induzindo também a apoptose dos tecidos com lesões hepáticas. Este estudo comprova que uma alimentação específica pode proteger o fígado de lesões causadas por ação de químicos, sendo necessários mais estudos para se estudar o efeito em células cancerígenas humanas.

Fotoenvelhecimento

A radiação UVB pode causar danos graves, através das proteínas e ADN, stress oxidativo, inflamação, podendo levar à carcinogénese, nos casos mais graves e recorrentes de exposição. Estudos apontam para a importância dos antioxidantes como estratégia para a foto proteção da pele. Com o objetivo de testar estes efeitos, Wang et al. (2019) fizeram um estudo com 15 ratos nude (espécie com pele muito clara e sem pêlo), aplicando um extrato de framboesa na pele antes de os expor à luz UVB. O extrato de framboesa era rico em ácido elágico, cianidina, pelargonidina-3-soforósido, cianidina-3- rutinósido e conjugados de metil quercetina pentose. Separaram-se os ratos em 3 grupos de 5. Um grupo (controlo), não foi exposto aos UVB nem lhe foram aplicados extratos de framboesa. Os outros dois grupos foram expostos aos UVB, sendo que um grupo recebeu o tratamento com o extrato. O tratamento consistiu na aplicação de 750 µL/ml no dorso. Os grupos expostos aos UVB receberam uma radiação de 150 mJ/cm², uma vez por dia, durante 5 dias. Após a avaliação de resultados, observaram que os ratos que obtiveram o tratamento com o extrato tiveram menos descamação, eritema, rugas e perda de água do que o grupo que não foi tratado. Verificaram-se também menos danos nas fibras de colagénio, assim como uma menor morte celular nos queratinócitos, havendo assim menos lesões. Assim, Wang et al. (2019) observou que o extrato de framboesa tem um papel de proteção no fotoenvelhecimento da pele, através da ativação da cascata de sinalização NRF2 (regulador da resposta antioxidante). Também se observou a inibição da MAPK p38 cinase, c-Jun e NF- κ B, na diminuição da inflamação provocada pelos UVB. Com estes dados, pressupõem-se que este tipo de extrato poderá ser utilizado na prevenção do fotoenvelhecimento da pele quando se trata de exposição aguda aos UVB. Poderá também ser utilizado em doenças inflamatórias crónicas de pele.

1.2.3 Estudos *in vitro*, em células

Após pesquisa no PubMed, foram encontrados 7 artigos referentes a ensaios realizados *in vitro*, em diferentes tipos de linhagens de células. Nas tabelas 10 e 11, encontra-se o resumo dos artigos encontrados.

Tabela 10 – Resumo dos ensaios em células encontrados na bibliografia pesquisada

Referência	Tipo de célula	Objetivo	Desenho	Resultado
Gao et al. (2018)	Fibroblastos dérmicos humanos	Efeito protetor da framboesa no fotoenvelhecimento provocado por UVB	- Sêrum (Controlo) - 1 µg/ml de EF - 10 µg/ml de EF - 100 µg/ml de EF	<u>100 µg/ml de EF</u> - ↓ da secreção de MMPs induzidos por UVB - ↓ da ativação dos MAPK induzidos por UVB, fator nuclear-$\kappa\beta$ e a ativação do P1 - ↑ da síntese de pro-colagénio tipo I - ↑ da expressão citoprotetora da heme oxigenase-1
Nowak et al. (2017)	Células Caco-2 de adenocarcinoma do cólon humano	Estudo da atividade genotóxica e citotóxica de elagitaninos da F	- 2,5 a 160 µg/ml de EF enriquecido com EA (EF + EA) - 9,3 a 378 µM de LC - 12,8 – 256 µM de SH-6	<u>EF + EA, LC e SH-6</u> - Indução de danos no ADN, entre 7,3 e 56,8%, causando a quebra da dupla hélice, e oxidação das bases do ADN <u>EF</u> - Morfologia celular afetada - Indução da apoptose das células Caco-2
Ma et al. (2018)	Microglia BV-2	Avaliação dos efeitos das antocianinas nos radicais livres e como neuro protetores das microglias	- Extrato de F enriquecido com AC 20µg/ml	- ↓ da inflamação induzida por H₂O₂ e stress oxidativo - ↑ da viabilidade das células induzidas em stress oxidativo por H₂O₂ - ↓ da atividade apoptótica da protease (capase-3/7)

Tabela 11 – Resumo dos ensaios em células encontrados na bibliografia pesquisada (continuação)

Referência	Tipo de célula	Objetivo	Desenho	Resultado
Sousa et al. (2016)	Células microvasculares endoteliais humanas (HMVECs)	Estudo dos fenóis da framboesa na inibição da angiogénese	EF de diferentes concentrações (10 a 250 µg/ml EAG)	> 50 - ↓ da viabilidade e proliferação das células - ↓ da capacidade de migração das células para áreas lesadas - ↓ de estruturas semelhantes a capilares - ↓ das ramificações - ↓ da atividade de sinalização da VEGF - Rearranjo do citoesqueleto de actina filamentosa nas doses mais ↑
Toney et al. (2021)	Microglia BV-2	Efeito dos metabolitos dos polifenóis da F na neuroinflamação induzida por LPS em 3, 12 e 24h	- 10 µg/mL de EF - 10 µM de urolitina A	<u>3h (EF e UA)</u> ↓ de iNOS <u>12/24h EF</u> - ↓ TNF; IL-6 apenas nas 24h <u>12/24h UA</u> - ↓ TNF, IL-1β, IL-6 e JNK/c-Jun
Xu et al. (2018)	Microglia BV-2	Estudo dos mecanismos da neuroinflamação das urolitinas	- 0,3 - 100 µM de UA, UB, UC, mUA e dmUC	<u>UA e UB (30 µM)</u> - ↓ dos níveis de NO - Supressão dos níveis de mRNA dos genes pro-inflamatórios TNFα, IL-6, IL-1β, iNOS e COX-2 <u>UA (30 µM)</u> - ↓ dos níveis de fosforilação do Erk1/2, MAPK p38 e Akt, prevenção da degradação e fosforilação do IκB-α - Inibição da subunidade de fosforilação NF-κB p65
Zhou et al. (2018)	Neuroblastomas humanos (SH-SY5Y)	Avaliação dos efeitos neuroprotetores de neolignanos contra o stress oxidativo induzido por H ₂ O ₂	- Neolignanos enantioméricos de F (1a/1b-3a/3b) e (1b e 2a)	<u>Neolignano 2a</u> - ↓ da apoptose induzida pelo efeito oxidativo do H₂O₂ - ↓ de ROS - ↓ da disfunção mitocondrial

AC: antocianinas; ADN: Ácido desoxirribonucleico; dmUC: 8,9-dimetil-*O*-urolitina C; EAG: equivalentes de ácido gálico EF: extrato de framboesa; F: framboesa; FI: framboesa inteira; LC: Lambertianina C; mUA: 8-metil-*O*-urolitina A; NOS: Síntase do óxido nítrico; NO: óxido nítrico; ROS: espécies reativas de oxigénio; SH-6: Sanguina H-6.

Doenças neurodegenerativas

A microglia desempenha um papel fundamental na resposta a lesões e infecções no cérebro. Por vezes, a hiperativação da microglia pode levar à libertação de citocinas pré-inflamatórias em quantidades elevadas, que incluem o TNF- α , IL-6 e IL-1 β , assim como fatores neurotóxicos (ROS, NO e PGE₂, que aceleram a neuroinflamação. Estudos apontam cada vez mais para a influência da neuroinflamação, quando mediada pela microglia, no aumento significativo da patogénese de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer e Esclerose Múltipla. Assim, a prevenção e o tratamento deste tipo de doenças podem passar pela supressão da hiperativação da microglia (Xu et al., 2018). No SNC (Sistema Nervoso Central), o LPS (lipopolissacarídeo) é utilizado para ativar os fatores de inflamação, ativando a microglia. O LPS é reconhecido pelo TLR4, que se encontra na superfície da microglia, o que leva à ativação das vias de sinalização MAPK, PI3K/Akt e NF- κ B. Estas ativações levam à transdução de mRNA, bem como à expressão de enzimas pró-inflamatórias (iNOS, COX-2). Ao se intervir nas vias de sinalização, existe a possibilidade de prevenir/atenuar a doença (Xu et al., 2018).

As urolitinas têm vindo a ser estudadas em diversas linhagens de células pelo seu efeito anti-inflamatório, incluindo a diminuição dos sintomas de neuroinflamação. No entanto, os estudos ainda são limitados. Assim, Xu et al. (2018) estudaram o mecanismo das células de microglia BV-2, adicionando-lhes 0,3 a 100 μ M de UA (urolitina A), UB (urolitina B), UC (urolitina C), mUA (8-metil-O-urolitina A) e dmUC (8,9-dimetil-O-urolitina C), induzindo-lhes a inflamação através de LPS. Observaram que as UA, UB e UC inibiram o NO em concentrações de 30 μ M. Nas concentrações de 3 a 30 μ M, as UA e UB diminuíram os valores das citocinas TNF- α , IL-6, IL-1 β e COX-2. Na UA, observou-se uma maior diminuição dos níveis de fosforilação do Erk1/2, MAPK p38 e Akt, assim como a prevenção da degradação e fosforilação do I κ B- α . Observou-se também a inibição da subunidade de fosforilação NF- κ B p65. Com este estudo, Xu et al. (2018) concluíram que as urolitinas têm potencial para serem utilizadas como supressor de neuroinflamação.

Noutro estudo, desenvolvido por Toney et al. (2021), estudou-se também a inflamação induzida por LPS em células de microglia BV-2. O estudo comparou o efeito de 10 μ g/ml de EF e de 10 μ M de UA, após 3, 12 e 24 horas de indução. Nas 3 horas de indução, ambos os tratamentos diminuíram a expressão de iNOS. No EF, às 12

horas, observou-se uma diminuição da expressão de TNF. Às 24 horas, observou-se uma diminuição dos valores de IL-6. Já no tratamento com UA, tanto às 12 como às 24 horas observou-se uma diminuição da expressão de TNF, IL-6, IL-1 β e da via de sinalização JNK/c-Jun.

Os neolignanos são polifenóis dietéticos, sendo encontrados em frutos e vegetais, incluindo a framboesa vermelha. Estudos têm vindo a demonstrar o seu potencial na prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas. Zhou et al. (2018), estudaram o efeito de vários neolignanos provenientes de framboesas ((1a/1b-3a/3b) e 1b e 2a) em neuroblastomas humanos (SH-SY5Y) induzidos em stress através de H₂O₂. Observaram que o neolignano 2a foi o que obteve resultados mais promissores, através de uma maior redução de ROS, diminuição da disfunção mitocondrial, e consequente redução da apoptose induzida por H₂O₂. Este estudo demonstra assim o potencial da framboesa como neuro protetor, sendo necessários mais estudos para fundamentar este ensaio.

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa, na qual se observa um aumento dos níveis de AGEs (produtos finais de glicação avançada), tanto nos neurónios como no líquido cefalorraquidiano. Os AGEs podem aumentar a produção de ROS, levando à inflamação dos tecidos e apoptose. Ma et al. (2018), estudaram os efeitos de um EF enriquecido em antocianinas em células de Microglia BV-2, de modo a observarem os efeitos de anti glicação, anti fibrilação A β e as propriedades anti neuro inflamatórias na doença de Alzheimer. O EF continha 5,8% de EAG (% m/m) e 5,6% de antocianinas em equivalentes de cianidina-3-*O*-glucósido (% m/m). Os resultados demonstraram uma diminuição da inflamação induzido pelo H₂O₂ e pelo stress oxidativo, e consequentemente um aumento da viabilidade das células. Verificou-se também uma diminuição da atividade apoptótica da protéase (capase-3/7). Apesar dos resultados promissores, é necessário efetuarem-se estudos *in vivo* de modo a serem confirmadas estas conclusões.

Fotoenvelhecimento

A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo que uma das suas principais funções é de proteger o corpo das agressões externas. A radiação UV é das maiores agressões sofridas pela pele, sobretudo pelos raios UVA e UVB. A energia deste tipo de radiação é absorvida pelos cromóforos celulares, que reagem com o oxigénio molecular, formando-se assim ROS. O nível aumentado destas espécies altera a capacidade das

fibras elásticas e de colagénio da pele, podendo serem observadas rugas e a diminuição da elasticidade da pele (fotoenvelhecimento). Gao et al. (2018) estudaram o efeito de um EF em fibroblastos dérmicos humanos, com o objetivo de observarem os efeitos do fotoenvelhecimento neste tipo de célula. Aplicaram radiação UV (144 mJ/cm^2) nas células, que seguidamente foram tratadas com 3 concentrações de EF diferentes, 1, 10 e 100 µg/ml . O EF continha uma concentração de $2,33 \text{ g}$ de EAG/ 100 g de FS. Após esta aplicação, observaram a diminuição da secreção de MMPs e da ativação dos MAPK induzidos por UVB, fator nuclear- $\kappa\beta$, assim como a ativação do P1. Os MMPs fazem parte do processo de fotoenvelhecimento, através da clivagem do colagénio. Os MAPKs são vias de sinalização que são sensíveis a ROS. Gao et al. (2018) observaram também o aumento da síntese de pro-colagénio tipo I, bem como o aumento da expressão citoprotetora da heme oxigenase-1. Assim, este estudo comprova que o EF tem efeitos positivos no fotoenvelhecimento.

Efeitos anticancerígenos

Os fitoquímicos apresentam atividade biológica com diferentes mecanismos de ação. Estes podem ser encontrados em frutas e legumes, incluindo as framboesas. De entre as suas características, os fitoquímicos podem ter propriedades antioxidantes, estimular o sistema imunitário, entre outros. Vários estudos associam a ingestão de frutas e legumes com uma diminuição do risco de alguns tipos de cancro. Nowak et al. (2017) desenvolveram um estudo com células Caco-2 de adenocarcinoma do cólon humano, investigando a atividade genotóxica e citotóxica de um EF enriquecido em EA, com concentrações entre $2,5$ a 160 µg/ml , assim como dois EA diferentes: SH-6 (Sanguina H-6) (concentrações entre $12,8$ e 256 µM) e LC (Lambertianina C) (concentrações entre $9,3$ e 378 µM). Observaram que estes três tratamentos causaram uma indução de danos no ADN, entre $7,3$ e $56,8\%$, causando a quebra da dupla hélice, e oxidação das bases do ADN. O EF afetou a morfologia das células, causando também a indução da apoptose das células Caco-2. O EF foi o que apresentou um maior grau de genotoxicidade, tendo este potencial para ser utilizado como complemento alimentício para a redução do risco de desenvolvimento de cancro.

A angiogénese caracteriza-se pela formação de novos vasos sanguíneos, a partir de vasos já existentes. Nos tumores, a angiogénese começa logo no início, sendo um fator limitante do crescimento e metastização. As células cancerígenas agem como estimuladores de angiogénese (VEGF-A), que medeiam a sua proliferação, migração e

consequente formação de metástases, assegurando a sobrevivência do tumor. Sousa et al. (2016) estudaram o efeito de um EF em células endoteliais humanas. Utilizaram concentrações entre os 10 e os 250 µg/ml de EAG. Observaram uma diminuição da viabilidade e proliferação das células, assim como uma menor capacidade de migração para as áreas afetadas. Também verificaram uma diminuição da formação de estruturas semelhantes a capilares, bem como as suas ramificações. Observaram uma diminuição da atividade da via de sinalização VEGF. Nas concentrações mais elevadas de EF, observou-se um rearranjo do citoesqueleto da actina filamentosa. Estes resultados comprovam a hipótese do EF ter o poder de diminuir a angiogénese, sendo necessários estudos mais específicos em diferentes tecidos, bem como ensaios *in vivo*.

2. Avaliação do teor em fenóis totais e da capacidade antioxidante de genótipos de *Rubus idaeus* L.

Este estudo tem como objetivo avaliar alguns indicadores da qualidade comercial, composição fenólica e capacidade antioxidante de amostras de genótipos e de cultivares de *Rubus idaeus* L., produzidas no âmbito de um programa de melhoramento genético do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, INIAV, I. P., e da empresa produtora de pequenos frutos Beira Baga que visa o desenvolvimento de uma variedade nacional. Assim, o presente estudo pretendeu contribuir para esse projecto, com dados relativos à composição fenólica e à capacidade antioxidante dessas amostras. Concretamente, avaliou-se a percentagem de humidade, grau Brix (sólidos solúveis totais), o teor em fenóis totais e a capacidade antioxidante, tanto dos genótipos em estudo, assim como em várias cultivares comercializadas, de modo a se compararem os resultados.

1. Material e Métodos

Foram analisadas oito amostras de genótipos de framboesa (cinco de framboesa vermelha e três de framboesa amarela), assim como quatro cultivares de framboesa vermelha. Efetuou-se o ensaio de humidade, assim como o grau Brix. Posteriormente, foram também realizadas extrações em triplicado de cada amostra, com o objetivo de se

obterem extratos ricos em compostos fenólicos para, a partir destes se quantificar o teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu e a capacidade antioxidante pelo teste FRAP. Todos os testes foram efetuados em triplicado. No entanto no final, resultado de selecções realizadas no âmbito do programa de melhoramento referido, apenas se considerou um dos genótipos de framboesa amarela, em vez das três utilizadas no ensaio da humidade e do grau Brix.

1.1 Amostras de *Rubus idaeus* L.

As amostras utilizadas neste estudo referem-se à produção de 2019. Todas as operações culturais na planta, até à colheita das framboesas e o transporte das mesmas para Oeiras foram realizadas por agrónomos do INIAV, I.P. As plantas da framboesa foram instaladas em maio de 2019, no Pólo da Inovação de Fataca, em Odemira, no litoral alentejano. A plantação foi feita em contentores de esferovite de 36 litros, com 3 plantas, numa densidade de 3 plantas por metro linear, sobre túneis cobertos de plástico de polietileno. Todos os genótipos frutificaram no lançamento do primeiro ano, no outono. Registou-se a produção e o levantamento empírico e expedito de algumas características mais relevantes de qualidade do fruto, como o calibre, cor, brilho e textura, tendo sido estes parâmetros avaliados em fresco e após sete dias de conservação a 4° C. Após este período, foram selecionados os genótipos mais promissores, alguns dos quais constituíram as amostras estudadas neste trabalho. Os frutos foram colhidos inteiros e maduros, tendo sido transportados para o laboratório do IUEM e imediatamente congelados a -18 °C, até se proceder aos ensaios. No laboratório do IUEM foram estudados 8 genótipos, sendo estes 5 genótipos de framboesa vermelha e 3 genótipos de framboesa amarela, e como de 4 cultivares de *Rubus idaeus* L., para comparação. No avançar da investigação, não se justificou o estudo dos 3 genótipos de framboesa amarela. As amostras foram todas codificadas. Os genótipos de framboesa vermelha designaram-se de GFV1, GFV2, GFV3, GFV4 e GV5, e os de framboesa amarela foram codificados em GFA1, GFA2 e GFA3. Os cultivares de framboesa (Autumn Treasure, Erika, Kweli e Joan J), mantiveram o mesmo nome.

Todas as amostras foram analisadas para o teor de humidade e para o grau Brix, em triplicado. Seguidamente, foram efetuados extratos ricos em compostos fenólicos (metanol: água: ácido fórmico, 79,9: 20: 0,01% V/V), em triplicado. Nestes extratos,

determinou-se o teor de fenóis totais (FT) pelo método Folin-Ciocalteu, e mediu-se a capacidade antioxidante *in vitro* pelo método FRAP, também em triplicado.

2. Reagentes, padrões e equipamentos

2.1 Reagentes e padrões

Da Panreac, obtiveram-se os reagentes Folin-Ciocalteu, carbonato de sódio anidro (99,5%) e o padrão de ácido gálico 1-hidrato ($\geq 99\%$).

Da Sigma-Aldrich usaram-se os reagentes seguintes: metanol ($\geq 99\%$), ácido fórmico ($\geq 98\%$), ácido clorídrico ($\geq 98\%$), 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina 10mM (TPTZ) ($\geq 97\%$), 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico (Trolox) (97%).

2.2 Equipamentos

Para a realização do trabalho de laboratório, utilizaram-se vários equipamentos. As pesagens foram efetuadas numa balança analítica Sartorius TE214S, de precisão $\pm 0,1\text{mg}$. A secagem, para o ensaio da humidade, foi executada numa estufa (convecção e circulação forçada à pressão atmosférica). A determinação dos sólidos solúveis totais (grau Brix) foi medida num refratómetro ótico portátil Zuzi série 300. Para se efetuarem os extratos ricos em fenóis, foi necessário fazer-se centrifugações. Para tal, utilizou-se uma centrífuga Eppendorf 5810R. Finalmente, a absorvância das amostras respeitantes aos ensaios da determinação do teor em compostos fenólicos totais e da capacidade antioxidante (método FRAP), foi medida num espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 de duplo feixe.

2.3 Determinação do extrato seco e cálculo da humidade

A determinação do teor em humidade das amostras de framboesas analisadas foi realizada segundo o procedimento da norma da OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico), descrita por Correia (Correia, 2016).

Para este ensaio, pesaram-se cerca de 9 gramas de framboesa congelada. As amostras foram colocadas em cápsulas de porcelana (previamente secas na estufa a 100 °C até peso constante, arrefecidas num exsiccador e pesadas), devidamente taradas, para se registar a massa inicial depois de concluído o esmagamento das framboesas (com a ajuda de uma espátula, para se separarem completamente as drupéolas) (figura 3). Em seguida, foram colocadas na estufa a 100 °C durante 72 horas. Ao terminar este período,

foram arrefecidas num exsicador, arrefecidas e realizada a sua pesagem na balança analítica. Seguidamente, foram novamente submetidas a secagem por períodos de 1 hora, seguida de arrefecimento em exsicador, até peso constante. O cálculo percentagem da humidade foi efetuado através da seguinte fórmula:

$$\text{Humidade (\%)} = \frac{(\text{Peso da amostra+cápsula})-(\text{peso da amostra seca+cápsula})}{(\text{Peso da amostra+cápsula})-\text{Tara da cápsula}} \times 100$$

Os resultados foram expressos em percentagem (g de humidade/100g de framboesa), arredondados às décimas.



Figura 3 – Preparação da amostra para a determinação do teor em humidade.
Cápsula de porcelana com uma amostra de framboesa esmagada

2.4 Grau Brix

A determinação dos sólidos solúveis totais, grau Brix, foi efetuada pelo método refratométrico descrito na norma portuguesa NP EN 12143 (1999). Trata-se de uma determinação rápida da concentração de açúcar no fruto, através da refratometria. O índice de refração consiste no quociente do seno do ângulo de incidência e do seno do ângulo de refração (da luz) e o ângulo de refração, obtido com a passagem da luz através das gotas de sumo de framboesa. Este método é de grande importância, pois este é um parâmetro de qualidade relevante para o consumidor pois é uma medida do teor em açúcares dos frutos.

Neste ensaio, tomaram-se várias framboesas congeladas escolhidas aleatoriamente. Estas framboesas foram esmagadas até se extrair o sumo das mesmas, medindo-se sempre a temperatura do sumo com um termómetro. De modo a proceder a

esta técnica, utilizou-se um refratômetro ótico portátil. Para calibrar o equipamento, recorreu-se a água destilada (índice de refração 0) e a uma solução de sacarose a 10% (m/m) (índice de refração de 10). Calibrou-se o mesmo, colocando duas a três gotas de solução no prisma (o suficiente para o cobrir totalmente, sem bolhas de ar), com uma pipeta descartável. Procedeu-se à leitura das amostras, colocando-se 2 a 3 gotas de sumo, sempre em triplicado, medindo-se sempre a sua temperatura. Entre cada leitura, limpou-se o prisma com a ajuda de um toalhete embebido em álcool a 70%, calibrando-se o refratômetro sempre que necessário. Os valores obtidos foram corrigidos, através da tabela 12.

Tabela 12 – Correção da Leitura refratométrica em função da temperatura

Temperatura (° C)	Teor de sacarose (g/100g)				
	5	10	15	20	30
Subtrair					
15	0,25	0,27	0,31	0,31	0,34
16	0,21	0,23	0,27	0,27	0,29
17	0,16	0,18	0,2	0,2	0,22
18	0,11	0,12	0,14	0,15	0,16
19	0,06	0,07	0,08	0,08	0,08
Adicionar					
21	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07
22	0,12	0,14	0,14	0,14	0,14
23	0,18	0,2	0,2	0,21	0,21
24	0,24	0,26	0,26	0,27	0,28
25	0,3	0,32	0,32	0,34	0,36

2.5 Preparação dos extratos de framboesa

Os compostos fenólicos presentes na framboesa são fitoquímicos que existem numa concentração diminuta, pelo que o estudo dos mesmos exige a obtenção prévia de um extrato dos frutos rico naqueles compostos. No presente trabalho, o procedimento de extração adotado foi o descrito por Correia (Correia, 2016). Resumidamente, preparou-se uma solução extratante com 79,9% de metanol, 20% de água e 0,1% de ácido fórmico (V/V/V). Numa balança analítica, pesaram-se 40 gramas de framboesa, que foram transferidas para um homogenizador, juntamente com 90 ml de solução extratante acima referida. Procedeu-se à homogeneização da mistura durante 1 minuto (etapa 1).

Seguidamente, distribuiu-se a mistura em tubos falcon de 50 ml, que foram posteriormente centrifugados na centrífuga a (4 °C, 7000 rpm, 20 minutos) (etapa 2) (figura 4). Concluída esta operação, retirou-se o sobrenadante cuidadosamente, este filtrado com papel de filtro para uma proveta de 200 ml (etapa 3) (figura 5). Os resíduos sólidos dos diferentes tubos foram combinados no homogenizador, e adicionados de 50 ml de solução extratante. Repetiram-se novamente todas as etapas. Este processo foi efetuado em triplicado.



Figura 4 – Extrato de framboesa vermelha (à esquerda) e amarela (à direita), após a primeira centrifugação

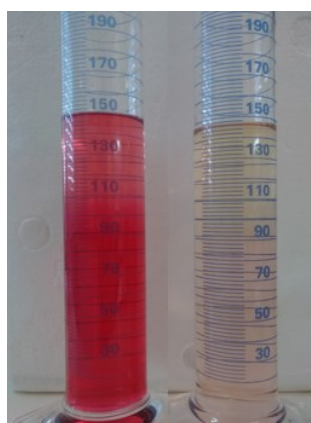


Figura 5 – Extrato final de framboesa vermelha e amarela

Concluído o processo de extração, o extrato foi acondicionado em tubos falcon de 50 mL, tendo sido congelados de imediato a -80 °C, até ao momento dos ensaios descritos em seguida. Os extratos foram efetuados em fevereiro de 2020, e devido à pandemia Covid-19 só foi possível executar os restantes ensaios em outubro de 2020, o que significa que estiveram armazenados durante 8 meses.

2.6 Determinação do teor em compostos fenólicos totais

Determinou-se o teor em compostos fenólicos totais através do método Folin-Ciocalteu, adaptado do método descrito por Singleton & Rossi (1965). O método de Folin-Ciocalteu é um método colorimétrico, sendo necessário fazer uma reta de calibração para se obter os resultados. Neste ensaio, foi utilizado o ácido gálico como padrão. Este método mede a concentração total de fenóis presentes no extrato através do seu grupo hidroxilo. Os fenóis do extrato reagem com o reagente redox (reagente Folin-Ciocalteu), formando um cromóforo de tom azul, que pode ser quantificado através da leitura da absorvância do espectrofotômetro a 725 nm. Quanto mais escura a cor, maior é o teor em compostos fenólicos no extrato.

Para esta técnica, diluíram-se 300 μ L de extrato de framboesa num balão de 50 ml, perfazendo o mesmo com água desionizada tipo II. Preparou-se também uma solução de carbonato de sódio anidro a 35%. Seguidamente pipetaram-se 3,5 ml de extrato diluído de framboesa para um tubo de ensaio. Adicionou-se 100 μ L de reagente de Folin-Ciocalteu, assim como 400 μ L da solução de carbonato de sódio. Agitaram-se os tubos num vórtex, tendo sido colocados logo de seguida no escuro durante uma hora. Após a reação ocorrer (figura 6), procedeu-se à leitura da absorvância das amostras no espectrofotômetro, a 725 nm. Este procedimento foi efetuado em triplicado.



Figura 6 – Reação de Folin-Ciocalteu nos extratos de framboesa

A quantificação de compostos fenólicos totais foi obtida com uma reta de calibração efetuado com o padrão de ácido gálico. A quantificação de compostos fenólicos totais foi obtida a partir de uma reta de calibração tendo sido usado como padrão o ácido gálico. Preparou-se uma solução-mãe de ácido gálico em metanol:água (80:20 v/v) de 100 µg/mL, tendo-se preparado a partir desta solução 6 soluções com as concentrações compreendidas entre 1 e 6 mg/ml. As leituras do branco (água destilada) e dos padrões foram feitas em triplicado. Os resultados foram apresentados em mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g de FF (fruto fresco) e em mg equivalentes de ácido gálico/100 g de FS (fruto seco). Após a leitura dos padrões, traçou-se a reta de calibração, com a absorvância em função da concentração. Aplicou-se a regressão linear ao gráfico (figura 7), obtendo-se a equação $y = 0,0911x - 0,0063$ e um $R^2 = 0,9995$.

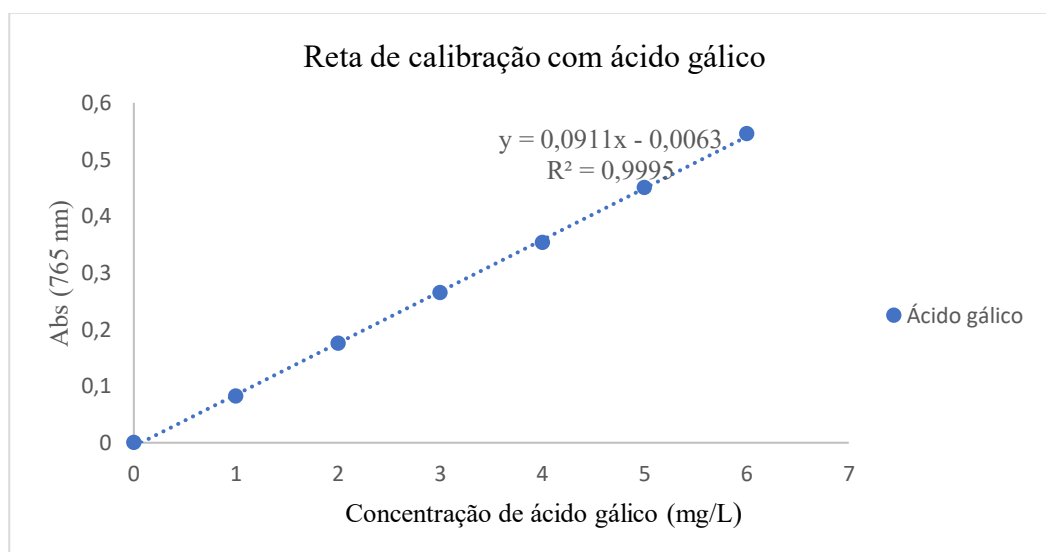


Figura 7 – Reta de calibração com ácido gálico

Realizados os cálculos, obtiveram-se os teores em compostos fenólicos totais, expressos respetivamente em mg EAG/100 mg Fruto Fresco (FF) e em mg EAG/100 mg Fruto Seco (FS).

2.7 Determinação da capacidade antioxidante, método FRAP

O teste do poder antioxidante redutor do ferro (FRAP) foi realizado segundo o método de Thaipong et al. (2006). Este ensaio baseia-se numa reação redox, em que o Fe^{3+} é reduzido a Fe^{2+} , na presença de TPTZ, formando um intenso complexo azul cujo

λ_{max} =593 nm, num pH ácido de 3,6. É um método colorimétrico, sendo os seus resultados lidos com um espectrofotómetro de luz visível.

Começou-se por preparar a solução *stock*, composta por 100 ml de tampão acetato 300 mM, juntamente com 10 ml de TPTZ 10 mM em ácido clorídrico a 40 mM e 10 ml de ferro hexa-hidratado a 20 mM, que foi mantida a 37 °C com a ajuda de um banho-maria até ser utilizada. Diluíram-se os extratos de framboesa, colocando 400 μL de extrato num balão de 10 ml, perfazendo este com metanol. Seguidamente, num tubo de ensaio, juntou-se 2850 μL de solução *stock* a 150 μL de extrato diluído. Homogeneizou-se o tubo, sendo este posteriormente colocado no escuro durante 30 minutos, até a reação ocorrer (figura 8). Após este tempo, procedeu-se à leitura das absorvâncias no espectrofotómetro, a 593 nm. Os resultados foram expressos em μmoles de Trolox/g de FF e em μmoles de Trolox/g de FS.

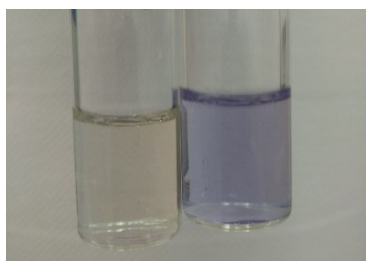


Figura 8 – Reação FRAP num Branco (à esquerda) e num extrato de framboesa (à direita)

A quantificação da capacidade redutora FRAP exigiu a elaboração de uma reta de calibração com o padrão de Trolox (figura 9). Para tal, preparou-se uma solução mãe com o padrão de Trolox (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$), a partir da qual se fizeram sete padrões, com as concentrações de 25 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM , 400 μM , 600 μM e 800 μM , respetivamente, assim como um branco sem Trolox.

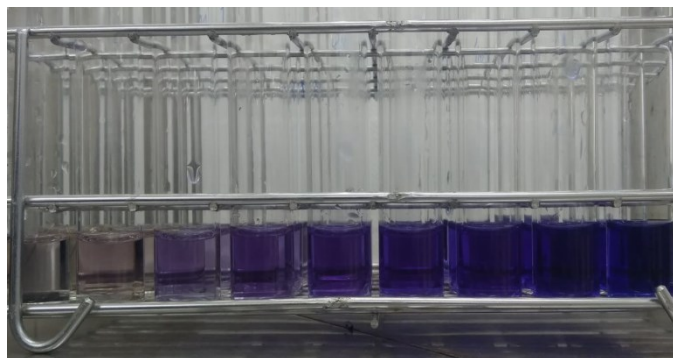


Figura 9 – Padrões após o desenvolvimento da reação FRAP, após o desenvolvimento do cromóforo, do menos concentrado (à esquerda), para o mais concentrado (direita).

Após a leitura dos padrões, construiu-se a reta de calibração com Trolox para a determinação da capacidade antioxidante pelo método FRAP (figura 10). Após a regressão linear, obteve-se a equação $y = 0,0023x - 0,0025$ e um $R^2 = 0,9995$.

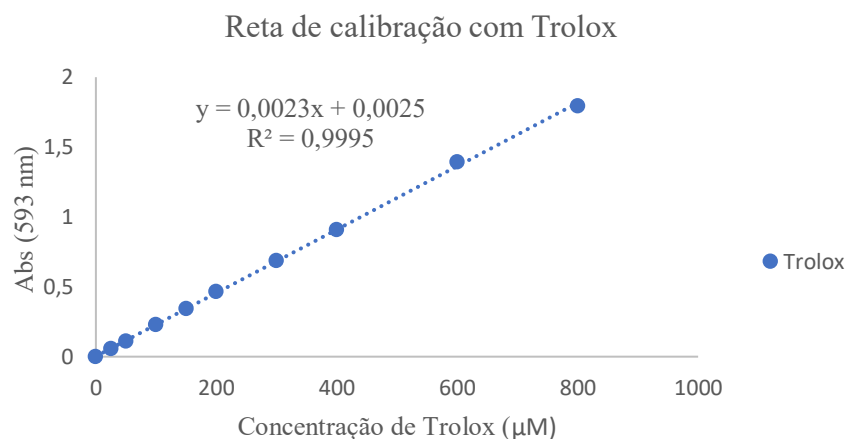


Figura 10 – Determinação da capacidade antioxidante pelo método FRAP. Reta de calibração com Trolox

Os resultados foram expressos em μ moles de Trolox/100g de FF e μ moles de Trolox/100g de FS.

3. Resultados e discussão

3.1 Teor de humidade

O teor de humidade das diferentes amostras analisadas, genótipos de framboesa vermelha e amarela e cultivares de framboesa vermelha, apresentam-se na tabela 13.

Tabela 13 – Teor de humidade das amostras de framboesa (%)

Amostra	Média ± Desvio-padrão
GFV1	88,6 ± 0,82
GFV2	88,9 ± 1,02
GFV3	89,3 ± 0,29
GFV4	88,7 ± 0,48
GFV5	89,6 ± 0,46
cv Kweli	89,6 ± 0,46
cv Erika	87,4 ± 0,45
cv Autumn Treasure	88,5 ± 0,58
cv Joan J	88,8 ± 0,11
GFA1	90,7 ± 0,36
GFA2	88,3 ± 1,87
GFA3	89,5 ± 0,55

O teor de humidade dos frutos de *Rubus idaeus L.* estudados variou entre os 87,4% e 90,7%. Os genótipos de framboesa vermelha, foram muito próximos, variando apenas entre 88,6% (GFV1) e 89,6% (GFV5). Os valores das cultivares não diferem muito dos valores dos genótipos, variando entre os 88,5% (cv Autumn Treasure) e 89,6% (cv Kweli). Nos genótipos de framboesa amarela, as variações foram maiores, entre 88,3% (GFA2) e 90,7% (GFA1), tendo correspondido aos valores mais baixos e mais altos deste estudo. Assim, no geral, o teor em humidade mais elevado é o do GFA1, e o mais baixo é o do GFA2 (entre 88,3% e 90,7%). Considerados os dados obtidos e o publicado na bibliografia podemos afirmar que esses valores estão dentro do intervalo de variação reportado para framboesas vermelhas. Importa notar que não foram encontrados dados relativos ao teor de humidade de framboesas amarelas. Concretamente, Correia (Correia, 2016), refere um teor de humidade para amostras de cultivares de framboesas vermelhas produzidas em Portugal entre 79,2 a 89,6%. O valor de humidade que consta da base de dados PortFIR do INSA relativa à composição dos alimentos para framboesa vermelha (embora tal não esteja especificado) é 84,3% (Tabela 1)(INSA, 2010). Finalmente, num estudo efetuado na Turquia, com 14 amostras de framboesas selvagens e duas cultivares, cv Tulameen e cv Heritage, os resultados obtidos ficaram compreendidos entre 76,7 – 83,4% (Çekiç & Özgen, 2010).

3.2 Grau Brix

O teor médio em sólidos solúveis das amostras (grau Brix) das amostras de *Rubus idaeus L.* analisadas, genótipos e cultivares, apresentam-se na tabela 14.

Tabela 14 – Grau Brix (°) das amostras de framboesa

Amostra	Média ± Desvio-padrão
GFV1	9,3 ± 0,1
GFV2	8,3 ± 0,1
GFV3	7,4 ± 0,1
GFV4	9,0 ± 0,1
GFV5	7,4 ± 0
cv Kweli	9,8 ± 0,1
cv Erika	7,8 ± 0
cv Autumn Treasure	8,3 ± 0,2
cv Joan J	9,0 ± 0
GFA1	6,9 ± 0,1
GFA2	5,5 ± 0,1
GFA3	7,5 ± 0

O grau Brix dos frutos de *Rubus idaeus* L. estudados variou entre os 5,5 e 9,8. Estes resultados encontram-se todos dentro da gama dos valores esperados (tabela 15). Os genótipos de framboesa vermelha, variaram entre os 7,4 (GFV3) e os 9,3 (GFV1). Os valores das cultivares encontram-se entre os 7,8 (cv Erika) e os 9,8 (cv Kweli). Os genótipos de framboesa amarela eram os menos doces, aos quais corresponderam os valores mais baixos, variando entre os 5,5 (GFA2) e os 7,5 (GFA3).

Após pesquisa bibliográfica, reuniram-se os valores encontrados na tabela 15.

Tabela 15 – Valores de ° Brix pesquisados na bibliografia

° Brix	Referência
11,6 – 11,9	Anjos et al. (2020)
10,33	Rios de Souza et al. (2014)
4,1	Gomes et al. (2017)
10,87 – 13,60	Tosun et al. (2009)
12,0	Ozarda et al. (2015)
8,1 – 11,0	Mazur et al. (2014)

Através da tabela 15, observa-se que os valores se encontram compreendidos entre os 4,1 (Gomes et al., 2017) e os 13,60 (Tosun et al., 2009). Esta discrepância de valores deve-se às diferentes localizações geográficas dos diferentes estudos, sendo a sua maior influência o clima dos locais de recolha das amostras, assim como das

cultivares de *Rubus idaeus* L. em estudo. Assim, observa-se que todos os valores obtidos neste estudo se encontram dentro da gama de valores encontrados na bibliografia. Anjos et al. (2020) estudou duas cultivares de framboesa (cv Tulameen e cv Kweli), colhidas em Braga, Portugal. O objetivo do estudo foi a comparação de vários parâmetros de qualidade entre duas cultivares, com agricultura orgânica vs convencional. Para a agricultura convencional, obteve uma gama de valores entre os 11,6 e os 11,9, sendo que os 11,6 correspondem aos valores obtidos pela cv Kweli. Este valor está acima do obtido neste estudo, observando-se assim a existência de cultivares com um ° Brix ainda mais elevado (cv Tulameen).

Rios de Souza et al. (2014) refere um valor de grau Brix de 10,33, em framboesas cultivadas em Minas Gerais, Brasil, que foram colhidas aquando maduras. Estes valores estão acima de todos os resultados obtidos neste projeto, no entanto, este valor mais elevado pode ser devido ao clima. Em contrapartida, Gomes et al. (2017), obteve resultados bastante inferiores neste ensaio, obtendo o valor de $4,1 \pm 0,1$, em framboesas colhidas maduras no Algarve.

Ozarda et al. (2015) refere o valor de 12,0, em framboesas de cultivar desconhecida, adquiridas num mercado na Turquia. O clima mais quente desse país pode justificar um valor mais elevado de ° Brix.

Tosun et al. (2009), menciona valores entre 10,87 – 13,60 em framboesas colhidas na região de Erzurum, na Turquia. Este estudo comparou a cv Heritage com genótipos de framboesa vermelha pré-selecionados (rendimento alto e livres de pragas e doenças). Todos os resultados obtidos foram acima do valor da cv Heritage (que obteve um valor de 11,4) para todos os genótipos, exceto um, que teve o valor mais baixo do estudo (10,87). Estes valores estão todos acima dos obtidos neste estudo.

Mazur et al. (2014), obteve um ° Brix entre 8,1 – 11,0 em framboesas colhidas na Oeste da Noruega. Este estudou comparou cultivares com genótipos de framboesas vermelhas. O valor mais baixo deste estudo (8,1) foi obtido pela cv Veten, e o mais elevado (11,0), por um dos genótipos de framboesa em estudo. Estes resultados vão de encontro aos obtidos neste estudo, pois houve diversos genótipos (G1, G2 e G4), que obtiveram valores mais elevados que a cv Erika.

3.3 Teor em compostos fenólicos totais

Os valores obtidos para o conteúdo em fenóis totais das amostras estudadas, após realização dos cálculos através da equação referida em 2.3.4, apresentam-se na tabela 16.

Tabela 16 – Teor médio em compostos fenólicos totais das amostras

Amostra	Média ± Desvio-padrão (mg EAG/100 g FF)	Média ± Desvio-padrão (mg EAG/100 g FS)
GFV1	110,6 ± 12,14	970,4 ± 106,50
GFV2	124,1 ± 5,99	1118,3 ± 53,97
GFV3	101,3 ± 5,59	946,7 ± 52,27
GFV4	105,4 ± 9,53	932,7 ± 84,34
GFV5	96,2 ± 7,95	924,5 ± 76,43
cv Kweli	151,4 ± 11,39	1456,1 ± 109,54
cv Erika	154,9 ± 11,53	1229,7 ± 91,49
cv Autumn Treasure	202,3 ± 13,78	1759,3 ± 119,87
cv Joan J	184,0 ± 13,33	1643,2 ± 118,98
GFA1	104,6 ± 4,44	1125,3 ± 47,79

O teor em compostos fenólicos dos frutos de *Rubus idaeus* L. estudados variou entre os 96,2 ± 7,95 (GFV5) e os 202,3 ± 13,78 em mg EAG/100 g de FF (cv Autumn Treasure), e entre os 924,5 ± 76,43 (GFV5) e os 1759,3 ± 119,87 em mg EAG/100 g de FS (cv Autumn Treasure).

Em fruto fresco (FF) os genótipos de framboesa vermelha variaram entre os 96,2 ± 7,95 (GFV5) e os 124,1 ± 5,99 mg EAG/100 g (GFV2). As cultivares de framboesa vermelha variaram entre os 151,4 ± 11,39 (cv Kweli) e os 202,3 ± 13,78 mg EAG/100 g (cv Autumn Treasure). O GFA1 obteve o valor de 104,6 ± 4,44, coincidindo este valor com os dos genótipos de framboesa vermelha. Em fruto seco (FS), os genótipos de framboesa vermelha variaram entre os 924,5 ± 76,4 (GFV5) e os 1118,3 ± 53,97 mg EAG/100 g (GFV2). As cultivares de framboesa vermelha variaram entre os 1229,7 ± 91,49 (cv Erika) e os 1759,3 ± 119,87 mg EAG/100 g (cv Autumn Treasure). O GFA1 apresentou o valor de 1125,3 ± 47,79 mg EAG/100 g, estando este valor acima de todos os valores dos genótipos de framboesa vermelha. Isto deve-se ao facto do GFA1 apresentar um valor de percentagem de humidade superior aos dos genótipos de framboesa vermelha.

O teor em fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu é frequentemente realizado em estudos relativos à composição fenólica deste pequeno fruto. Alguns dados da bibliografia consultada foram reunidos na tabela 17.

Tabela 17 – Teor em compostos fenólicos totais da bibliografia

Teor em compostos fenólicos	Referência
357,83 mg EAG/100 g de FF	Rios de Souza et al. (2014)
57,96 – 185,74 mg EAG/100 g de FF	Giuffrè et al. (2019)
146,3 – 218,0 mg EAG/100 g de FF	Kljusurić et al. (2016)
152 mg EAG/100 g de FF *	Subbiah et al. (2021)
129,04 – 184,6 mg EAG/100 g de FF	Dobson et al. (2012)
1,24 – 1,34 mg EAG/ g de FF	Verde et al. (2013)
114,5 – 203,1 mg EAG/100 g de FF *	Tosun et al. (2009)
2169,24 – 2498,44 mg EAG/Kg de FF *	Bradish et al. (2012)
183,1 – 297,7 mg EAG/100 g de FF	Mazur et al., (2014)
864 – 1161 mg EAG/Kg de FF *	Anjos et al. (2020)
97,5 – 301,1 mg EAG/100 g de FF	Santos (2020)
1358 mg EAG/100 g de FS	Grabek-Lejko & Wojtowicz (2014)

(*o valor repostado no estudo foi convertido para mg/100 g de FF)

Os dados para o conteúdo em fenóis totais publicados variaram entre 57,96 mg EAG/100g de FF (Giuffrè et al., 2019) e os 357,83 mg EAG/100g de FF (Rios de Souza et al., 2014) (tabela 17). Esta gama de valores deve-se à localização geográfica de cada estudo (clima, tipo de solo), assim como ao tipo de extração efetuada (reagentes, temperatura, número de extrações e duração), entre outros fatores.

O estudo desenvolvido por Rios de Souza et al. (2014), em framboesas colhidas em Minas Gerais, Brasil, obteve o resultado de $357,8 \pm 7,06$ mg EAG/100g de FF. Este estudo obteve um valor acima do obtido neste estudo. Estes resultados podem ser devido ao clima, solo, assim como a solução extratante utilizada, temperatura e duração da mesma.

Giuffrè et al. (2019) estudou os compostos fenólicos totais em extrato framboesas congeladas da cv Erika, ao longo de 12 meses. Ao longo dos 12 meses, os valores foram variando, diminuindo no 2º, 4º, 6º, 7º e 8º. Os valores variaram entre os $57,96 \pm 12,08$ e os $185,74 \pm 21,81$ mg EAG/100g de FF. O 8º mês obteve o valor de

71.14 ± 18.44 mg EAG/100g de FF, que equivale ao tempo em que os extratos deste estudo estiveram congelados a – 18 °C. Observa-se que o valor deste estudo é superior ao obtido por Giuffrè et al. (2019).

Kljusurić et al. (2016) fez um estudo de comparação, com framboesas congeladas da Croácia e da Bulgária, avaliando os seus teores em compostos fenólicos a fresco e após 30 dias a – 5 °C. As framboesas provenientes da Croácia obtiveram o valor de 299,0 ± 14,6 mg EAG/100g de FF (extrato fresco) e 218,0 ± 8,3 mg EAG/100g de FF (extrato armazenado). As amostras da Bulgária, apresentaram 207,4 ± 9,4 mg EAG/100g de FF (extrato fresco) e 146,3 ± 11,0 mg EAG/100g de FF (extrato armazenado). Observa-se que a quantidade fenóis diminuiu em ambos os extratos ao cabo dos 30 dias. Os valores após os 30 dias estão em conformidade com os resultados obtidos no presente estudo.

Subbiah et al. (2021) fez um estudo sobre framboesas recolhidas na Austrália. As framboesas em estudo foram colhidas frescas e maduras. As amostras apresentaram o valor de 1,52 mg EAG/g de FF, o que equivale a 152 mg EAG/100g de FF.

Dobson et al. (2012) estudou o cruzamento de uma cultivar europeia (cv Glen Moy) com uma cultivar norte-americana (cv Latham). O estudo foi feito ao longo de 6 anos, na Escócia. As framboesas foram recolhidas todos os anos, em dois locais diferentes, na mesma data. Os resultados deste estudo ficaram compreendidos entre 129,04 ± 49,8 – 184,6 ± 47,0 mg EAG/100g de FF.

Verde et al. (2013) procedeu à análise dos compostos fenólicos totais, através de 25 g de framboesa da cv Amira. Os resultados obtidos compreenderam 1,24 a 1,34 mg EAG/g de FF, o que equivale a 124 – 134 mg EAG/g de FF. Estes valores apresentam-se mais baixos do que os obtidos neste estudo (valores das cultivares).

Tosun et al. (2009) comparou a cv Heritage com 11 genótipos de framboesa vermelha. Os seus resultados ficaram compreendidos entre 114,5 – 203,1 mg EAG/100 g de FF. A cv Heritage obteve um valor de 121,4 mg EAG/100 g de FF. Observa-se que nesse estudo, os genótipos obtiveram maioritariamente valores superiores à da cultivar, exceto dois.

Bradish et al. (2012) efetuaram pesquisas em cultivares de framboesa vermelha no norte da Califórnia, Estados Unidos da América. Os valores do teor de compostos fenólicos obtidos ficaram compreendidos entre os 2169,24 – 2498,44 mg EAG/Kg de FF (equivalente a 216,9 – 249,8 mg EAG/100g FF. Estes valores estão todos acima dos valores obtidos. Isto poderá ser devido às condições climáticas mais quentes do local.

Mazur et al. (2014) obteve valores entre 183,1 – 297,7 mg EAG/100 g de FF, no seu estudo efetuado na noruega. O valor mais baixo foi obtido por um genótipo em estudo, e o mais elevado pela cv Malling Hestia. Estes valores são referentes a uma média de 3 anos do estudo. Observaram uma variação entre os anos, assim como um valor mais elevado de compostos fenólicos amostras que amadurecem mais tarde. Os valores deste estudo ficaram quase todos abaixo destes valores, exceto o das cultivares.

Num estudo realizado em Braga, Portugal, Anjos et al. (2020), resultou num valor de compostos fenólicos de 864 – 1161 mg EAG/Kg de FF (equivalente a 86,4 – 116,1 mg EAG/100 g de FF), em cultivares de framboesa vermelha. Comparando com este estudo, as cultivares ficaram todas acima destes valores, assim como todos os genótipos (incluindo o de framboesa amarela), exceto um.

Santos (2020) utilizou amostras recolhidas em Portugal, tendo efetuado o extrato exatamente da mesma forma que neste estudo. Obteve resultados compreendidos entre os 97,5 – 301,1 mg EAG/100 g de FF. Apenas um genótipo deste presente estudo se encontra fora destes valores (GFV5), estando abaixo dos 97,5 mg EAG/100 g de FF.

Grabek-Lejko & Wojtowicz (2014) juntaram amostras silvestres de diversos arbustos de *Rubus idaeus* L. em diferentes regiões do sudeste da Polónia. Liofilizaram as amostras, realizando a partir do pó dessas amostras um extrato rico em compostos fenólicos. Após análise, obtiveram 1358 mg EAG/100 g de FS valor não surpreendente uma vez que se trata de frutos silvestres.

3.4 Atividade antioxidante

Após se efetuarem os cálculos através da equação referida em 2.3.5, obtiveram-se os resultados apresentados na tabela 18.

Tabela 18 – Capacidade antioxidante das amostras pelo método FRAP

Amostra	Média ± Desvio-padrão (μmoles de Trolox/100 g de FF)	Média ± Desvio-padrão (μmoles de Trolox/100 g de FS)
GFV1	999,6 ± 59,2	8768,8 ± 519,22
GFV2	1011,1 ± 59,9	9109,4 ± 539,19
GFV3	722,5 ± 38,3	6752,3 ± 358,41
GFV4	761,0 ± 64,0	6734,1 ± 566,02
GFV5	770,2 ± 67,8	7406,1 ± 652,33
cv Kweli	1079 ± 105,6	8996,7 ± 362,34
cv Erika	1113,6 ± 45,7	10377,1 ± 1015,78
cv Autumn Treasure	1436,2 ± 231,1	12488,3 ± 2009,28
cv Joan J	1263 ± 125	11277,7 ± 1116,17
GFA1	899,3 ± 8,8	9670,0 ± 94,94

Analisando a tabela 18, observa-se que a capacidade antioxidante dos frutos de *Rubus idaeus* L. variou entre os 722,5 ± 38,3 e os 1436,2 ± 231,1 μmoles de Trolox/100 g de FF, e entre os 6734,1 ± 566,02 e os 12488,3 ± 2009,28 μmoles de Trolox/100 g de FS.

Em FF, os genótipos de framboesa vermelha variaram entre os 770,2 ± 67,8 (G5) e os 1011,1 ± 59,9 em μmoles de Trolox/100 g (GFV2). As cultivares de framboesa variaram entre os 1079 ± 105,6 (cv Kweli) e os 1436,2 ± 231,1 em μmoles de Trolox/100 g (cv Autumn Treasure). O GFA1 obteve o valor de 899,3 ± 8,8 μmoles de Trolox/100 g, estando este valor dentro dos valores dos genótipos de framboesa vermelha. Em FS, os genótipos de framboesa vermelha variaram entre os 6734,1 ± 566,02 (GFV4) e os 8768,8 ± 519,22 μmoles de Trolox/100 g (GFV1). As cultivares de framboesa variaram entre os 8996,7 ± 362,34 (cv Kweli) e os 12488,3 ± 2009,28 μmoles de Trolox/100 g (cv Autumn Treasure). O GFA1 apresentou o valor de 9670,0 ± 94,94 μmoles de Trolox/100 g, estando acima de todos os genótipos, assim como da cv Kweli. Como já referido anteriormente, isto deve-se ao seu valor mais elevado de percentagem de humidade.

Após pesquisa bibliográfica, construiu-se a tabela 19, com os valores encontrados.

Tabela 19 – Valores da capacidade antioxidante dos artigos da bibliografia

Capacidade antioxidante	Referência
1197,3 – 1376,6 µmoles de Trolox/100 g de FF	Bradish et al. (2012)
916 – 3430 µmoles de Trolox/100 g de FF	Santos (2020)
813 – 1243 µmoles de Trolox/100 g de FF *	Tosun et al. (2009)
1120 – 1980 µmoles de Trolox/100 g de FF *	Çekiç & Özgen (2010)
582 – 4405 µmoles de Trolox/100 g de FF *	Kostecka-Gugała et al. (2015)
16594 µmoles de Trolox/100 g de FS *	Grabek-Lejko & Wojtowicz (2014)
743–1083 µmoles de Trolox/100 g de FF	García et al. (2020)

(*artigos em que o valor foi convertido para µmoles de Trolox /100 g de FF)

Na tabela 19, observa-se que os valores encontrados na pesquisa bibliográfica se encontram entre os 582 µmoles de Trolox/100 g de FF (Kostecka-Gugała et al. 2015) e os 4405 µmoles de Trolox/100 g de FF (Kostecka-Gugała et al. 2015). Apenas se encontrou um artigo com o valor em FS, e como o artigo não referencia a percentagem de água das framboesas em estudo, não foi possível fazer a conversão.

Bradish et al. (2012), descreve um valor entre 1197,3 e 1376,6 µmoles de Trolox/100 g de FF, num estudo efetuado apenas com três cultivares. Apenas duas cultivares deste estudo se encontram dentro deste intervalo de valores. As cultivares em estudo são diferentes das de Bradish et al. (2012). Isto cimenta as variações que se obtêm entre cultivares, que podem ter valores muito distintos entre si.

Santos (2020), refere valores entre os 916 – 3430 µmoles de Trolox/100 g de FF, num estudo feito da mesma forma que este (peso de amostra e tipo de extrato). Apenas as cultivares e dois genótipos (GFV1 e GFV2) se encontram dentro desta gama de valores.

Tosun et al. (2009), obteve valores entre os 813 e os 1243 µmoles de Trolox/100 g de FF. Neste estudo, que compara genótipos com a cv Heritage, apenas dois genótipos apresentaram um valor inferior à cv Heritage, sendo que esta obteve o valor de 837 µmoles de Trolox/100 g de FF.

Çekiç & Özgen (2010) apresentam um estudo de comparação entre duas cultivares (cv Tulameen e cv Heritage) e 14 amostras de framboesas vermelhas selvagens colhidas nas montanhas da Turquia. Obtiveram resultados entre 1120 –1980 µmoles de Trolox/100 g de FF. O valor mais alto e mais baixo foi obtido por duas das

amostras de framboesa selvagem. As cultivares apresentaram 1440 μ moles de Trolox/100 g de FF (cv Tulameen) e 1810 μ moles de Trolox/100 g de FF (cv Heritage). Sete amostras de framboesa selvagem estiveram abaixo da cv Tulameen, e duas amostras de framboesa selvagem estiveram acima de ambas as cultivares.

Kostecka-Gugała et al. (2015) recolheram amostras de 11 cultivares de *Rubus idaeus* L. no sul da Polónia. Os resultados obtidos encontram-se entre 582 – 4405 μ moles de Trolox/100 g de FF. Estes valores encontram-se dentro da gama do obtido neste estudo. A discrepância destes valores demonstra que entre cultivares pode haver uma grande diferença de capacidade antioxidante. García et al. (2020) também efetuou um estudo de comparação de cultivares, em Huelva (Espanha), assim como em Kenitra (Marrocos). Obteve valores entre os 743–1083 μ moles de Trolox/100 g de FF. Todas as cultivares deste estudo se encontram dentro desta gama de valores, sendo que apenas um genótipo de framboesa vermelha (GFV3) se encontra fora destes parâmetros. Este estudo (García et al., 2020), refere uma temperatura média de 17 ° C no decorrer deste estudo. Esta temperatura mais temperada deve ser tida em conta para estes resultados mais baixos.

Grabek-Lejko & Wojtowicz (2014) (com um estudo também feito com amostras provenientes da Polónia), apresentam o valor de 16594 μ moles de Trolox/100 g de FS. Este valor encontra-se acima dos valores obtidos neste estudo. Como Grabek-Lejko & Wojtowicz (2014) não referem o teor de humidade das suas amostras, não é possível indicar se este valor é discrepante ou não, pois se as suas amostras tiverem mais humidade que as deste estudo, o valor poderá ser equivalente (amostras com mais humidade ficam mais concentradas depois de secas).

III. CONCLUSÃO

Esta dissertação visou contribuir para uma caracterização preliminar da composição fenólica e da atividade antioxidante de genótipos de framboesa produzidos em Portugal, no âmbito de um pequeno programa de melhoramento genético do INIAV, I. P. e da empresa Beira Baga e, dados os constrangimentos da pandemia Covid-19 realizar uma revisão narrativa para ‘Composição fenólica, atividade antioxidante da framboesa e benefícios para a saúde’.

Na revisão narrativa foram encontradas evidências científicas de que a framboesa vermelha possui alegadamente efeitos benéficos para a saúde, anti-inflamatórios e anticancerígenos, entre outros. Os efeitos benéficos relatados nos diversos estudos, seja em ensaios em humanos, ensaios *in vivo* (animais) ou em ensaios *in vitro* (células), referem-se à sua composição fenólica, nomeadamente aos seus polifenóis maioritários, elagitaninos e antocianinas. As evidências apresentadas, nomeadamente nos estudos *in vitro* e *in vivo* em animais, são optimistas mas carecem de comprovação, tanto na manutenção da saúde como na prevenção. Os estudos de intervenção em humanos realizados, ainda que insuficientes, constituem um passo importante nesse sentido.

Os resultados da caracterização preliminar da composição fenólica e da atividade antioxidante de genótipos de framboesa produzidos no âmbito do programa de melhoramento supracitado encontram-se todos dentro da gama de valores referida na bibliografia.

No respeitante ao teor em fenóis totais e, por consequência, aos valores da capacidade antioxidante pelo método FRAP, observou-se que as cultivares analisadas para efeito de comparação apresentaram os valores mais elevados. O genótipo de framboesa amarela apresentou valores naqueles parâmetros superiores aos de alguns dos genótipos de framboesa vermelha..

Infelizmente, devido ao que já foi explicado, não foi possível realizar os restantes ensaios propostos para este estudo, ficando a faltar resultados de diversos indicadores importantes para a seleção de um genótipo. Futuramente, poderá ser desenvolvido um novo projeto para se poder dar continuidade a este trabalho, de

modo a dar-se um contributo para a seleção de um genótipo abundante em compostos fenólicos que satisfaz os critérios agronómicos e de qualidade exigidos.

IV. BIBLIOGRAFIA

- Anjos, R., Cosme, F., Gonçalves, A., Nunes, F. M., Vilela, A. & Pinto, T. (2020). Effect of agricultural practices, conventional vs organic, on the phytochemical composition of 'Kweli' and 'Tulameen' raspberries (*Rubus idaeus* L.). *Food Chemistry*, 328, 1-8.
- Associação dos Jovens Agricultores de Portugal (2017). Manual Boas Práticas para Culturas Emergentes. A Cultura da Framboesa. ISBN: 978-989-8319-18-0.
- Barbehenn, R.V., Jones, C. P., Hagerman, A. E., Karonen, M. & Salminen, J. P: (2006). Ellagitannins have greater oxidative activities than condensed tannins and galloyl glucoses at high pH: potential impact on caterpillars. *Journal of Chemical Ecology*, 32, 2253-2267.
- Beekwilder, J., Jonker, H., Meesters, P., Hall, R.D., van der Meer, I.M. & Ric de Vos, C.H. (2005). Antioxidants in raspberry: on-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3313–3320.
- Bibi, S., Du, M. & Zhu, M. (2018). Dietary red raspberry reduces colorectal inflammation and carcinogenic risk in mice with dextran sulfate sodium–induced colitis. *The Journal of Nutrition*, 148, 667 – 674.
- Bobinaite, R., Viskelis, P. & Venskutains, P. R. (2016). Nutritional composition of fruit cultivars, Chapter 29, 713-731.
- Bobinaite, R. & Viškelis, J. (2013). Anthocyanins: occurrence, bioactivity and bioavailability, with special reference to the anthocyanins of raspberries (a review). *Sodininkyste ir darzininkyste* 32, 39–47.
- Bradish, C. M., Perkins-Veazie, P., Fernandez, G. E., Xie, G. & Jia, W. (2012). Comparison of Flavonoid Composition of Red Raspberries (*Rubus idaeus* L.)

- Grown in the Southern United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 5779 – 5786.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56, 11, 317 – 333.
- Carey, A. N., Pintea, G. I., Leuven, S. V., Gildawie, K. R., Squicimara, L., Fine, E., Rovnak, A. & Harrington, M. (2019). Red raspberry (*Rubus idaeus*) supplementation mitigates the effects of a high-fat diet on brain and behavior in mice. *Nutritional Neuroscience*, ISSN: 1028-415X.
- Çekiç, Ç. & Özgen, M. (2010). Comparison of antioxidant capacity and phytochemical properties of wild and cultivated red raspberries (*Rubus idaeus* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 540 – 544.
- Chen, H., Liu, M., Shi, L., Zhao, J., Zhang, C., Lin, L., Liu, Y., Zhang, S., Jin, J., Wang, L., Shen, B. & Liu, J. (2011). Effects of Raspberry Phytochemical Extract on Cell Proliferation, Apoptosis, and Serum Proteomics in a Rat Model. *Journal of Food Science*, 76, 8, 192 – 198.
- Chepkemoi, J. (2017). The Leading Raspberry production Nations in the World. Disponível em: <https://www.worldatlas.com/articles/the-leading-raspberry-producing-nations-in-the-world.html>
- Correia, M. M. M. B. C. (2016). Caracterização química e avaliação da atividade biológica da framboesa (*Rubus idaeus* L.). Contribuição para o desenvolvimento de uma alegação de saúde. Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa.
- Daubeney, H., 2006. History of the British Columbia raspberry breeding programme. *Davidsonia* 17, 9–22.
- Dobson, P., Graham, J., Stewart, D., Brennan, R., Hackett, C. A. & McDougall, G. J. (2012). Over-seasons Analysis of Quantitative Trait Loci Affecting Phenolic

- Content and Antioxidant Capacity in Raspberry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60, 5360-5366.
- Fan, R., You, M., Toney, A. M., Kim, J., Giraud, D., Xian, Y., Ye, F., Gu, L., Ramer-Tait, A. E. & Chung, S. (2019). Red Raspberry Polyphenols Attenuate High-Fat Diet–Driven Activation of NLRP3 Inflammasome and its Paracrine Suppression of Adipogenesis via Histone Modifications. *Molecular Nutrition Food Research*, 64, 15.
- Fin, C. E., Moore, P. P. & Kempler, C., 2008. Raspberry cultivars what's new? What's succeeding? Where are breeding programs headed? *Acta Horticulturae*, 777, 33–40.
- Foster, T. M., Bassil, N. V., Dossett, M., Worthington, M. L. & Graham, J. (2019). Genetic and genomic resources for *Rubus* breeding: a roadmap for the future. *Horticulture Research*, 6, 616.
- Franck, M., Toro-Martín, J., Garneau, V., Guay, V., Kearney, M., Pilon, G., Roy, D., Couture, P., Couillard, C., Marette, A. & Vohl, M. (2020). Effects of Daily Raspberry Consumption on Immune-Metabolic Health in Subjects at Risk of Metabolic Syndrome: A Randomized Controlled Trial. *Nutrients*, 12, 3858.
- Gao, W., Wang, Y., Hwang, E., Lin, P., Bae, J., Seo, S. A., Yan, Z. & Yi, T. (2018). *Rubus idaeus* L. (red raspberry) blocks UVB-induced MMP production and promotes type I procollagen synthesis via inhibition of MAPK/AP-1, NF- κ B and stimulation of TGF- β /Smad, Nrf2 in normal human dermal fibroblasts. *Journal of Photochemistry & Photobiology*, 185, 241 – 253.
- García, A. V., Pérez, S. E. M., Butsko, M., Moya, M. S. P. & Sanahuja, A. B. (2020). Authentication of “Adelita” Raspberry Cultivar Based on Physical Properties, Antioxidant Activity and Volatile Profile. *Antioxidants*, 9, 593.
- GPP (2021). Estatísticas Agrícolas. Produtos. GlobalAgrimar. Framboesa. Consultado a 15/04/2021. Disponível em <https://www.gpp.pt/index.php/produtos/produtos>.

- Giuffrè, A. M., Louadj, L., Rizzo, P., De Salvo, E. & Sicari, V. (2019). The Influence of Film and Storage on the Phenolic and Antioxidant Properties of Red Raspberries (*Rubus idaeus* L.) cv. Erika. *Antioxidants*, 8, 54.
- Gomes, M. S., Cardoso, M. G., Guimarães, A. C., Guerreiro, A. C., Gago, C. M. L., Vilas-Boas, E. V. B., Dias, C. M. B., Manhita, A. C. C., Faleiro, M. L., Miguel, M. G. C. & Antunes, M. D. C. (2017). Effect of edible coatings with essential oils on the quality of red raspberries over shelf-life. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 929-938.
- Grabek-Lejko, D. & Wotjowicz, K. (2014). Comparison of antibacterial and antioxidant properties of fruits and leaves of blackberries (*Rubus plicatus*) and raspberry (*Rubus idaeus*). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 3, 514 – 518.
- Hummer, K. E. (2010). *Rubus* pharmacology: antiquity to the present. *Hort Science*, 45, 1587–1591.
- Instituto Nacional Doutor Ricardo Jorge (2021). Frutas e Hortícolas: análise comparativa dos seus teores em compostos fenólicos e flavonóides totais. Acedido em dia 20 de fevereiro de 2021. Disponível em: <http://portfir.insa.pt/>
- Istas, G., Feliciano, R. P., Weber, T., Garcia-Villalba, R., Tomas-Barberan, F., Heiss, C. & Rodriguez-Mateos, A. (2018). Plasma urolithin metabolites correlate with improvements in endothelial function after red raspberry consumption: A double-blind randomized controlled trial. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 651.
- Jean-Gilles, D., Li, L., Ma, H., Yuan, T., Chichester, C. O. & Seeram, N. P. (2012). Anti-inflammatory effects of polyphenolic-enriched red raspberry extract in an antigen-induced arthritis rat model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 5755 – 5762.

- Jennings, D. L. (1988). Raspberries and Blackberries: Their Breeding, Diseases and Growth. *Academic Press*, London.
- Kljusurić, J. G., Mihalev, K., Bečić, I., Polović, I., Georgieva, M., Djaković, S. & Kurtanek, Z. (2016). Near-Infrared Spectroscopic Analysis of Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Berry Fruits. *Food Technology and Biotechnology*, 54, 236-242.
- Koponen, J. M., Happonen, A. M., Mattila, P.-H. & Törrönen, A. R. (2007). Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1612-1619.
- Kostecka-Gugała, A., Ledwożyw-Smoleń, I., Augustynowicz, J., Wyżgolik, G., Kruczek, M., & Kaszycki, P. (2015). Antioxidant properties of fruits of raspberry and blackberry grown in central Europe. *Open Chemistry*, 13, 1313 – 1325.
- Ludwig, I. A., Mena, P., Calani, L., Borges, G., Pereira-Caro, G., Bresciani, L., Del Rio, D., Lean, M. E. J. & Crozier, A. (2015). New insights in to the bioavailability of red raspberry anthocyanins and ellagitannins. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 758 – 769.
- Lugasi, A., Hovari, J., Kadar, G. & Denes, F. (2011). Phenolics in raspberry, blackberry and currant cultivars grown in Hungary. *Acta Alimentaria*, 40, 52-64.
- Luo, T., Miranda-Garcia, O., Sasaki, G. & Shay, N. F. (2017). Consumption of a single serving of red raspberries per day reduces metabolic syndrome parameters in high-fat fed mice. *Food & Function*, 8, 4081 – 4088.
- Ma, H., Johnson, S. L., Liu, W., DaSilva, N. A., Meschwitz, S., Dain, J. A. & Seeram, N. P. (2018). Evaluation of Polyphenol Anthocyanin-Enriched Extracts of Blackberry, Black Raspberry, Blueberry, Cranberry, Red Raspberry, and Strawberry for Free Radical Scavenging, Reactive Carbonyl Species Trapping,

- Anti-Glycation, Anti- β -Amyloid Aggregation, and Microglial Neuroprotective Effects. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 461.
- Marvin P. Pritts (1997) Raspberries, *Journal of Small Fruit & Viticulture*, 4:3-4, 189-225.
- Mazur, S. P., Nes, A., Wold, A., Remberg, S. F. & Aaby, K. (2014). Quality and chemical composition of ten red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes during three harvest seasons. *Food Chemistry*, 160, 233 – 240.
- Minatel, I. O., Borges, C. V., Ferreira, M. I., Gomez, H. A. G., Chen, C.-Y. O., & Lima, G. P. P. (2017). Phenolic Compounds - Biological Activity, Chapter 1, 317-333.
- Monteiro, J. M., Albuquerque, U. P., Araújo, E. L. & Amorim, E. L. C. (2005). Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, 8, 5, 892-896.
- Noratto, G. D., Chew, B. P. & Atienza, L. M. (2017). Red raspberry (*Rubus idaeus* L.) intake decreases oxidative stress in obese diabetic (db/db) mice. *Food Chemistry*, 227, 305 – 314.
- Nowak, A., Sójka, M., Klewicka, E., Lipińska, L., Klewicki, R. & Kołodziejczyk, K. (2017). Ellagitannins from *Rubus idaeus* L. exert geno- and cytotoxic effects against human colon adenocarcinoma cell line caco-2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 14, 2947 – 2955.
- Oliveira, P. B. (2007). A planta de framboesa: Morfologia e fisiologia. *Divulgação Agro*, 556, 1.
- Oliveira, P. B., Fonseca, L. L. & Silva, A.R. (2007). Framboesa: Tecnologias de produção. *Divulgação Agro*, 556, 3.
- Ozarda, O., Demirkoz, A. B. & Özdemir, M. (2015). Sensory characteristics and antioxidant capacity of red raspberry extract as a preservative in fruity flavoured beverages. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 6687 – 6694.

- Phenol Explorer (2015). Showing all polyphenols found in Red raspberry, raw. Consultado a 22/01/2021. Disponível em: <http://phenol-explorer.eu/contents/food/67>
- Rao, A. V. & Snyder, D. M. (2010). Raspberries and Human Health: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3871-3883.
- Regulamento (UE) nº 1924/2006 de 20 de Dezembro de 2006 relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 404 de 2006 (20.12.2006).
- Regulamento (UE) nº 432/2012 de 16 de Maio de 2012 que estabelece uma lista de alegações de saúde permitidas relativas a alimentos que não referem uma redução de um risco de doença ou o desenvolvimento e a saúde das crianças (texto relevantes para efeitos de EEE). *Jornal Oficial da União Europeia* L 136 2012 (25.5.2012).
- Regulamento (UE) nº 1169/2011 de 25 de Outubro de 2011 relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, que altera os Regulamentos (CE) n.º 1924/2006 e (CE) n.º 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho e revoga as Directivas 87/250/CEE da Comissão, 90/496/CEE do Conselho, 1999/10/CE da Comissão, 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, 2002/67/CE e 2008/5/CE da Comissão e o Regulamento (CE) n.º 608/2004 da Comissão. *Jornal Oficial da União Europeia* L 304 2011 (25.10.2011).
- Rios de Souza, V., Pereira, P. A. P., da Silva, T. L. T., Lima, L. C. O. L., Pio, R. & Queiroz, F. (2014). Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, 156, 362-368.
- Rochlani, Y., Pothineni, N. V., Kovelamudi, S. & Mehta, J. (2017). Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, 11, 215 – 225.

- Santos, H. D. (2020). Estudo da composição fenólica e da capacidade antioxidante de genótipos de framboesa. Licenciatura em Ciências da Saúde, Instituto Universitário Egas Moniz.
- Santos, M. M. V. L. O. (2009). Influência da enxertia herbácea no vigor, produtividade e hábitos de frutificação da framboesa vermelha (*Rubus idaeus* L.). Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.
- Singleton, V. L. & Rossi, J. A. J. (1965). Colorimetry of total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Sousa, M., Machado, V., Costa, R., Figueira, M. E., Sepodes, B., Barata, P., Ribeiro, L. & Soares, R. (2016). Red raspberry phenols inhibit angiogenesis: A morphological and subcellular analysis upon human endothelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117, 1604 – 1612.
- Sousa, M. B. (2007). Framboesa: qualidade pós-colheita. *Divulgação Agro* 556, 6.
- Subbiah, V., Zhong, B., Nawaz, M. A., Barron, C. J., Dunshea, F. R. & Suleria, H. A. R. (2021). Screening of Phenolic Compounds in Australian Grown Berries by LC-ESI QTOF-MS/MS and Determination of Their Antioxidant Potential. *Antioxidants*, 10, 26.
- Swanson, J., Weber, C.A., Finn, C.E., Fernandez-Fernandez, F., Sargent, D., Carlson, J.E., Graham, J. (2011). Breeding, genetics and genomics of *Rubus*. In: Foltá, K., Kole, C. (Eds.), *Genetics, Genomics and Breeding of Berries*. Science Publishers, Manchester, New Hampshire, pp. 64–113.
- Thaipong, K., Cisneros-Zevallos, L., Boonprakob, U., Crosby, K. e Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669- 675.

- Toney, A. M., Albusharif, M., Works, D., Polenz, L., Schlange, S., Chaidez, V., Ramer-Tait, A. & Chung, S. (2021). Differential Effects of Whole Red Raspberry Polyphenols and Their Gut Metabolite Urolithin A on Neuroinflammation in BV-2 Microglia. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18, 68.
- Tosun, M., Ercisli, S., Karlidag, H. & Sengul, M. (2009). Characterization of Red Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Genotypes for Their Physicochemical Properties. *Journal of Food Science*, 74, 7, 575 – 579.
- Tu, L., Sun, H., Tang, M., Zhao, J., Zhang, Z., Sun, X. & He, S. (2019). Red raspberry extract (*Rubus idaeus* L. shrub) intake ameliorates hyperlipidemia in HFD-induced mice through PPAR signaling pathway. *Food and Chemical Toxicology*, 133, 1 – 11.
- Vekiari, S. A., Gordon, M. H., Garcia-Macias, P. & Labrinea, H. (2008). Extraction and determination of ellagic acid content in chestnut bark and fruit. *Food Chemistry*, 110, 1007 – 1011.
- Verde, S. C., Trigo, M. J., Sousa, M. B., Ferreira, A., Ramos, A. C., Nunes, I., Junqueira, C., Melo, R., Santos, P. M. P. & Botelho, L. M. (2013). Effects of gamma radiation on raspberries: safety and quality issues. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 76:291–303.
- Wang, P., Cheng, Y., Hung, Y., Lee, C., Fang, J., Li, W., Wu, Y. & Pan, T. (2019). Red raspberry extract protects the skin against UVB-induced damage with antioxidative and anti-inflammatory properties. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 9529676.
- Ward, J. A., Bhangoo, J., Fernández-Fernández, F., Moore, P., Swanson, J. D., Viola, R., Velasco, R., Bassil, N., Weber, C. A. & Sargent, D. J. (2013). Saturated linkage map construction in *Rubus idaeus* using genotyping by sequencing and genome-independent imputation. *BioMed Central Genomics*, 14, 2.

- Weber, C. A., Perkins-Veazie, P., Moore, P. P. & Howard, L. (2008). Variability of antioxidant content in raspberry germplasm. *Acta Horticulturae*, 777, 493–498.
- Xiao, D., Zhu, L., Edirisinghe, I., Fareed, J., Brailovsky, Y. & Burton-Freeman, B. (2019). Attenuation of postmeal metabolic indices with red raspberries in individuals at risk for diabetes: a randomized controlled trial. *Obesity*, 1 – 9.
- Xu, J., Yuan, C., Wang, G., Luo, J., Ma, H., Xu, L., Mu, Y., Li, Y., Seeram, N. P., Huang, X. & Li, L. (2018). Urolithins attenuate LPS-induced neuroinflammation in BV2Microglia via MAPK, Akt, and NF-κB signaling pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 3, 571 – 580.
- Zhang, X., Sandhu, A., Edirisinghe, I. & Burton-Freeman, B. M. (2020). Plasma and urinary (poly)phenolic profiles after 4-week red raspberry (*Rubus idaeus* L.) intake with or without fructo-oligosaccharide supplementation. *Molecules*, 25, 4777.
- Zhao, L., Zou, T., Gomez, N. A., Wang, B., Zhu, M. & Du, M. (2018). Raspberry alleviates obesity-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) α1. *Nutrition & Diabetes*, 8, 39.
- Zhou, L., Yao, G., Lu, L., Song, X., Lin, B., Wang, X. & Song, X. (2018). Neolignans from red raspberry (*Rubus idaeus* L.) exhibit enantioselective neuroprotective effects against H₂O₂-induced oxidative injury in SH-SY5Y cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 43, 11390 – 11397.
- Zhu, M., Kang, Y., Xue, Y., Liang, X., García, M. P. G., Rodgers, D., Kagel, D. R. & Du, M. (2018). Red raspberries suppress NLRP3 inflammasome and attenuate metabolic abnormalities in diet-induced obese mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 53, 96 – 103.

Anexos

Anexo 1 – Poster publicado no 5º Congresso internacional do CiiEM



5th IC CiiEM

International Congress of CiiEM

97

97th Annual Meeting



CiiEM

Centro de Investigação Interdisciplinar Egas Moniz



INIAV

Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

Study of the phenolic content and the antioxidant capacity of *Rubus idaeus* L. genotypes within the development of a national cultivar

Rita Cornamusaz¹, Francisco Luz², Pedro Brás de Oliveira², Margarida Cabral Moncada³, Madalena Bettencourt da Câmara³

¹IUEM, Instituto Universitário Egas Moniz, Caparica, Portugal ritac.16@gmail.com

²Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., INIAV, I.P., Av. da República, Nova-Oeiras, 2784-505 Oeiras; pedro.oliveira@iniav.pt

³CiiEM, Centro de Investigação Interdisciplinar Egas Moniz, Instituto Universitário Egas Moniz, Caparica, Portugal margaridacm@egasmoniz.edu.pt; mbettencourt@egasmoniz.edu.pt

INTRODUCTION

Raspberry production in Portugal is currently of great economic interest, offering sustenance for small and large farmers, especially in Alentejo coast and Algarve. In 2018, around 26.9 thousand tons of raspberries were produced, mainly for export (86%) [1]. In this year, INIAV, I.P. in close partnership with Beira Baga, an enterprise that produces and commercializes small fruits, started a small breeding program with the objective of making raspberry cultivars available to all producers. This is particularly important in a moment when all raspberry cultivars are only released for exclusive or club growers. This study aims to investigate if the *Rubus idaeus* L. genotypes selected within the program by their agronomic and commercial quality parameters are also more abundant in phenolic compounds and had higher antioxidant capacity.

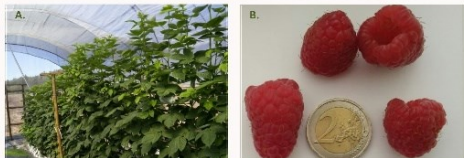


FIGURE 1 – (A) aspects of the plants installation at Fátima Innovation Pole, in Odemira, Portugal; (B) quality evaluation aspects of fresh *Rubus idaeus* L., in the field, for selection

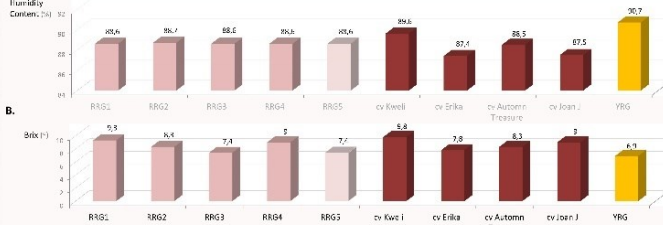
MATERIAL AND METHODS

The plants were installed in May 2019, at the Fátima Innovation Pole, in Odemira (planted in 36 l styrofoam containers, with 3 plants, at a density of 3 plants per linear meter, over tunnels covered in polyethylene plastic) (Figure 1A). All genotypes were fruitful in the first year of release in the fall. Production was recorded and an empirical and expeditious survey of some of the most relevant quality characteristics of the fruit fresh and after 7 days stored at 4 °C, such as size, color / brightness and texture (Figure 1B). After this period, the genotypes best positioned in the hierarchy were selected. The laboratory work was carried out on samples of 12 genotypes, 9 red and 3 yellow raspberries (RRG and YRG), and 4 cultivars (Cv) of *Rubus idaeus* L.. All samples were analyzed for their brix degree (NP EN 12143) and humidity content (Organization for Cooperation and Development method) [2].

An raspberry extract rich in phenolic compounds (extract solution composition - methanol: water: formic acid, 79.9:20.0:0.1 %v/v) [2] was made for 6 selected genotypes, 5 red and 1 yellow raspberries (RRG and YRG), and 4 cultivars (Cv) of *Rubus idaeus* L.. in triplicate. Then, the extract content of total phenols (TP) was determined by the Folin-Ciocalteu [2], and their *in vitro* antioxidant capacity was measured by the Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) method [3].

RESULTS AND DISCUSSION

This preliminary study evaluated aspects of quality and composition and phytochemical activity of fruits of selected genotypes and cultivars, the latter for comparison purposes.



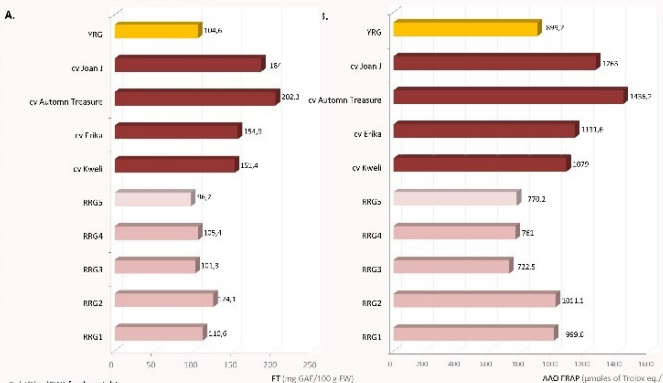
Subtítulo: (FW) Fresh weight

FIGURE 2 – (A) Moisture content, expressed in % (g/100 g FW), and (B) Brix degree, of red raspberry (RRG 1-5) and yellow (YRG) genotypes and red raspberry cultivars (cv)

Generally, breeding programs aim to optimize plants and fruits for certain production systems, mainly based on parameters such as yield, capacity to resist pests and diseases, quality attributes such as the taste and texture of fruits or their ability to maintain quality in the post-harvest, among others [4].

The phytochemical composition of raspberries is not currently a selection parameter. However, that composition depends on the genotype, among others factors.

The results of all samples were within the values published for raspberry [2, 5-6].



Subtítulo: (FW) Fresh weight

FIGURE 3 – (A) Total phenols (TF) content, as mg of GAE/100 g FW and (B) FRAP value, µmoles of Trolox eq./100 g FW of red raspberry (RRG 1-5) and yellow raspberry (YRG) genotypes and red raspberry cultivars (cv)

The moisture content and the Brix degree (average ± standard deviation) ranged between 96.2 ± 0.45 - 90.7 ± 0.36% and 6.9 ± 0.1 - 9.8 ± 0.1°, respectively (Figure 2, A and B).

The TF contents and FRAP values (mean ± standard deviation) (mg gallic acid eq. and Trolox eq. µmoles/100 g fresh weight, respectively) were between 96.2 ± 7.95 - 124.1 ± 5.99 mg and 722.5 ± 38.3 - 1011.1 ± 59.9 (for RRG) 104.6 ± 4.44 and 899.3 ± 8.80 (for YRG) and 151.4 ± 11.39 - 202.3 ± 13.78 and 1113.6 ± 45.7 - 1436.2 ± 231.1 (for Cv) (Figure 3, A and B).

The findings obtained here seem to support the investigation question as the 4 RRG selected in 2020 had higher TP content than the rejected one. However, all Cv had higher TP and FRAP values.

FINAL NOTE

The INIAV, I.P. breeding program, as others breeding programs, does not take into consideration the phytochemical composition of raspberries. However, according to our preliminary results, it's interesting to note that the selection made seems also taking in consideration raspberry phenolics. These constituents are largely responsible for their antioxidant capacity and, according to scientific evidences could also contribute to others beneficial health effects.

REFERENCES

1. GPR. Estatísticas Agrícolas Produções. Produtos. GlobalAgrarim. Frambosa. Available at: <https://www.gpr.pt/index.php/producoes/producoes>

2. Correia, M. Caracterização química e avaliação da atividade biológica da frambosa (*Rubus idaeus* L.): contribuição para o desenvolvimento de uma algação de saúde. Tese de Doutoramento. Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, 2016.

3. Thapang, K., Boonprakob, U., Crook, K., Cincero-Valeros, L., Borne, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* 2008 19, 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>

4. Foster, L.M., Bassil, N.S., Dessert, M., Kiangari, C., Worthington, J., J. Graham. Genetic and genomic resources for *Rubus* breeding: a roadmap for the future. *Front. Res.* 2019 1,115. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01152>

5. Yara, A.L., Pardo, J., Dias, M.L., Petrevis, J., Nogueira, A., Sokolov, M., Ferreira, L.C.R., Barros, L. Compositional Features of the "João" Red Raspberry and its Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Foods*. 2020 9(11):1522. <https://doi.org/10.3390/foods9111522>

6. Garcia, A.V., Pérez, S.L.M., Balseiro, M., Moya, M.S.P., Sanjaume, A.B. Authentication of "Adelfa" Raspberry Cultivar Based on Physical Properties, Antioxidant Activity and Volatile Profile. *Antioxidants (Basel)*. 2020 9(7):593. <https://doi.org/10.3390/antiox9070593>

Anexo 2 – Poster publicado no VI Colóquio Nacional da Produção de Pequenos Frutos

