

***COREMA ALBUM (L.) D. DON: CARACTERIZAÇÃO  
FÍSICO-QUÍMICA, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN  
VITRO* EM ENSAIOS DE DPPH, ABTS E FRAP E PERFIL  
DE ÁCIDOS GORDOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA***

**Taciana Raquel Bertotti**

***COREMA ALBUM (L.) D. DON: CARACTERIZAÇÃO  
FÍSICO-QUÍMICA, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE IN  
VITRO EM ENSAIOS DE DPPH, ABTS E FRAP E  
PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS POR CROMATOGRAFIA  
GASOSA***

**Taciana Raquel Bertotti**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Gestão da  
Qualidade e Segurança Alimentar

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora em Biotecnologia e Investigação Biomédica Maria Jorge Campos, Professora da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria - ESTM/MARE IPLeia e coorientação da Doutora em Química Biológica Daniela Vaz, Professora da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico de Leiria – ESSLei e da Doutora em Qualidade Alimentar Vânia Ribeiro, Professora da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico de Leiria – ESSLei.



**Corema album (L.) D. Don: caracterização físico-química, capacidade antioxidante *in vitro* em ensaios de DPPH, ABTS e FRAP e perfil de ácidos gordos por cromatografia gasosa**

Copyright © Taciana Raquel Bertotti

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2019

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

Partes deste trabalho foram apresentadas na X Conferência de Inovação e Segurança Alimentar - CISA 2019, que decorreu nas instalações da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – ESTM, pertencente ao Instituto Politécnico de Leiria e, no 5º Simpósio de Produção e Transformação de Alimentos em Ambiente Sustentável – PTAAS 2019, que decorreu na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja.

## Dedicatória

“Dedico esta pesquisa a todas as pessoas que estiveram ao meu lado durante minha trajetória acadêmica do Mestrado, especialmente aos meus pais, Vilmar e Iracilda, que nunca perderam a fé nos meus sonhos e foram meus pilares de sustentação para que eu concluísse esta importante etapa da minha vida.”



## Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me iluminado nesta caminhada, me dando força necessária para que eu não desistisse nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Vilmar Bertotti e Iracilda P. Bertotti, meu irmão, Vilmar Bertotti Júnior e ao meu esposo, João Balduino, que foram fonte inesgotável de apoio, amor e carinho incondicionais, estímulos fundamentais para enfrentar as situações adversas e que tornaram mais fácil a minha jornada.

Ao Instituto Politécnico de Leiria, que oportunizou minha bolsa estudantil de mérito e que, ao longo do tempo, me forneceram toda a assistência necessária enquanto estudante internacional, assim como a todos os meus Professores do Mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar da ESTM, por todo o conhecimento repassado no percurso da minha formação.

Agradeço com muito carinho à minha orientadora, Doutora Maria Jorge Campos e às minhas coorientadoras, Doutora Daniela Vaz e Doutora Vânia Sofia Ribeiro, pelo engajamento com esta pesquisa, por terem me auxiliado na germinação das idéias, pelas instruções e ensinamentos transmitidos de forma tão enriquecedora, pelas revisões de conteúdo e às valiosas e incontáveis horas dedicadas no acompanhamento das práticas laboratoriais. Obrigada pela confiança e por compartilharem com tanta humildade de sua sabedoria e experiência.

A toda equipe do MARE-IPLeia – Marine and Environmental Sciences Centre – nomeadamente à Doutora Marta Neves, pela amabilidade com a qual me auxiliou e forneceu todo o suporte necessário durante os processos de análise química instrumental por GC - Gas Chromatography (Cromatografia Gasosa).

Agradeço ao apoio na realização dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ao Dr. Pedro Cruz da plataforma UC-NMR, Centro de Química da Universidade de Coimbra, financiada pelo programa FEDER/ERDF-COMPETE e FCT via fundos RECI/QEQ-QFI/0168/2012,

CENTRO-07-CT62-FEDER-002012, UID/QUI/00313/2019 e Rede Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (RNRMN).

A toda a equipe do Laboratório de Química do IPL, em especial à responsável pelas instalações, Maria Carlos Loureiro Rodrigues, por toda a atenção e simpatia dedicadas no decorrer dos trabalhos.

Ao Professor Doutor Luís Soares Luís, coordenador do CTeSP em Alimentação Saudável da ESSLei, pelos ensinamentos e auxílio no desenvolvimento de uma Cerveja tipo Ale enriquecida com camarinha (*Corema album ssp. album*).

Agradeço de forma muito especial à minha colega de curso e grande amiga, Ana Carolina Lucas Branco, pelo espírito de cooperação, por se fazer sempre presente nessa jornada e por todos os momentos em que contei com o seu apoio, carinho e amizade.

Hoje minha felicidade é pela certeza de dever cumprido. Minha profunda gratidão a todas as pessoas que estiveram ao meu lado nessa caminhada.



## Resumo

*Corema album* (L.) D. Don, popularmente conhecida como camarinha, é um arbusto característico de regiões dunares e de falésias da Costa Atlântica Ibérica. Devido à crescente degradação de seu habitat natural, por alterações no ecossistema e pelo avanço da urbanização nas regiões de prevalência da espécie, este estudo, através da caracterização físico-química e determinação dos principais componentes bioativos do fruto, visa contribuir com o reconhecimento da espécie, de modo a confirmar seu valor nutricional e potencial benéfico para a saúde.

As determinações físico-químicas revelaram que a camarinha possui uma altura média de  $8,81 \text{ mm} \pm 0,61$ , diâmetro médio de  $8,93 \pm 0,64$ , calibre de  $0,89 \text{ cm} \pm 0,89$ , volume médio  $2,92 \text{ cm}^3 \pm 0,30$  e elevado teor de umidade ( $81,68\% \pm 0,45$ ). O teor de açúcares redutores para sementes, polpa e folhas liofilizadas foram de  $23,69 \text{ mg}/100\text{g} \pm 0,82$ ,  $71,55 \text{ mg}/100\text{g} \pm 1,09$  e  $218 \text{ mg}/100\text{g} \pm 2,30$  respetivamente. O perfil de ácidos gordos revelou que, para extratos das folhas e polpa liofilizadas, os ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) representam  $55,41\%$  e  $46,99\%$  do total de ácidos gordos respetivamente. Nas sementes o ácido araquídico (C20:0) e o ácido linoleico (C18:2n-6) aparecem em maior quantidade,  $50,80\% \pm 1,20$  e  $31,10\% \pm 0,35$  respetivamente. O conteúdo fenólico total foi de  $83,64 \text{ mg VCEAC}/100\text{g} \pm 1,04$  para amostras do fruto inteiro,  $246,73 \text{ mg VCEAC}/100\text{g} \pm 21,20$  para as folhas,  $32,00 \text{ mg VCEAC}/100\text{g} \pm 2,39$  nas flores,  $31,44 \text{ mg VCEAC}/100\text{g} \pm 0,20$  para polpa desidratada,  $28,48 \text{ mg VCEAC}/100\text{g} \pm 0,44$  para sementes desidratadas e de  $59,54 \text{ mg VCEAC}/100\text{g} \pm 2,45$  no sumo.

A atividade antioxidante total foi determinada através dos ensaios ABTS, DPPH e FRAP, sendo DPPH o teste que apresentou maior correlação ( $r = 0,9216$ ) entre o conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante. Os resultados obtidos para a capacidade antioxidante total por meio do teste DPPH foram de  $168,07 \text{ mg VCEAC}/100\text{g} \pm 2,27$  para folhas,  $90,19 \text{ mg VCEAC}/100\text{g} \pm 3,32$  para flores e  $60,70 \text{ mg VCEAC}/100\text{g} \pm 0,19$  para o sumo. Em relação à polpa e

as sementes desidratadas, os resultados obtidos foram de 51,62 mg VCEAC/100g  $\pm$  2,35 e 45,32 mg VCEAC/100g  $\pm$  1,24 respetivamente. O ensaio NMR, realizado em extratos da polpa desidratada de camarinha, permitiu identificar alguns polifenóis que podem estar contribuindo com o teor total de fenólicos e a capacidade antioxidante, sendo estes atribuídos ao ácido cumárico, ácido caféico, ácido procatequino, hidroxitirosol e oleuropeínas.

Diante dos resultados relatados, a camarinha pode se apresentar como uma proposta viável e inovadora para alguns nichos de mercado na elaboração de formulações de novos produtos, tanto por se tratar de um recurso nativo quanto por suas características bioativas.

Relativamente à aplicação da pesquisa, foi desenvolvida uma cerveja tipo *Ale* com a incorporação de camarinha, cuja principal finalidade foi valorizar o potencial comercial e económico do fruto, além de conferir um aumento das propriedades funcionais à bebida. A partir de uma análise subjetiva, foi possível definir o produto final como uma cerveja de sabor levemente ácido e frutado e com suave amargor. A cerveja também apresentou elevada capacidade antioxidante, sendo que esta característica aliada a sabores mais disruptivos pode agregar atributos diferenciados e capazes de surpreender o consumidor.

**Palavras-chave:** Camarinha, frutos silvestres, compostos bioativos, inovação alimentar.



## Abstract

*Corema album* (L.) D. Don, popularly known as camarinha, is a shrub characteristic of dunes and cliffs of the Iberian Atlantic Coast. Due to the increasing degradation of its natural habitat, changes in the ecosystem and the advancement of urbanization in the regions of prevalence of the species, this study, through the physicochemical characterization and determination of the main bioactive components of the fruit, aims to contribute to the recognition of the species, by confirming its nutritional value and potential health benefit.

Physicochemical determinations revealed that the camarinha has an average height of  $8.81 \text{ mm} \pm 0.61$ , average diameter of  $8.93 \pm 0.64$ , caliber  $0.89 \text{ cm} \pm 0.89$ , average volume  $2.92 \text{ cm}^3 \pm 0.30$  and high moisture content ( $81.68\% \pm 0.45$ ). The reducing sugar content for seeds, pulp and lyophilized leaves were  $23.69 \text{ mg} / 100\text{g} \pm 0.82$ ,  $71.55 \text{ mg} / 100\text{g} \pm 1.09$  and  $218 \text{ mg} / 100\text{g} \pm 2.30$  respectively. The fatty acid profile revealed that for leaf extracts and lyophilized pulp, polyunsaturated fatty acids (PUFAs) represent 55.41% and 46.99% of the total fatty acids respectively. In the seeds arachidic acid (C20: 0) and linoleic acid (C18: 2n-6) appear in greater amount,  $50.80\% \pm 1.20$  and  $31.10\% \pm 0.35$  respectively. The total phenolic content was  $83.64 \text{ mg VCEAC} / 100\text{g} \pm 1.04$  for whole fruit samples,  $246.73 \text{ mg VCEAC} / 100\text{g} \pm 21.20$  for leaves,  $32.00 \text{ mg VCEAC} / 100\text{g} \pm 2.39$  in the samples. flowers,  $31.44 \text{ mg VCEAC} / 100\text{g} \pm 0.20$  for dehydrated pulp,  $28.48 \text{ mg VCEAC} / 100\text{g} \pm 0.44$  for dehydrated seeds and  $59.54 \text{ mg VCEAC} / 100\text{g} \pm 2.45$  in juice.

Total antioxidant activity was determined by the ABTS, DPPH and FRAP assays, being DPPH the test that showed the highest correlation ( $r = 0.9216$ ) between the total phenolic content and the antioxidant activity. The results for total antioxidant capacity by DPPH test were  $168.07 \text{ mg VCEAC} / 100\text{g} \pm 2.27$  for leaves,  $90.19 \text{ mg VCEAC} / 100\text{g} \pm 3.32$  for flowers and  $60.70 \text{ mg VCEAC} / 100\text{g} \pm 0.19$  for the juice. Regarding the pulp and dehydrated seeds, the results obtained were  $51.62 \text{ mg VCEAC} / 100\text{g} \pm 2.35$  and  $45.32 \text{ mg VCEAC} / 100\text{g} \pm 1.24$  respectively. The NMR assay, performed on extracts of dehydrated

camarinha pulp, identified some polyphenols that may be contributing to the total phenolic content and antioxidant capacity, which are attributed to coumaric acid, caffeic acid, procatequin acid, hydroxytyrosol and oleuropeins.

Given the reported results, camarinha may present itself as a viable and innovative proposal for some niche markets in the elaboration of new product formulations, both because it is a native resource and for its bioactive characteristics.

Regarding the application of the research, an Ale beer was developed with the incorporation of camarinha, whose main purpose was to enhance the commercial and economic potential of the fruit, besides conferring an increase of functional properties to the drink. From a subjective analysis, it was possible to define the final product as a slightly acidic and fruity beer with mild bitterness. The beer also showed high antioxidant capacity, and this feature combined with more disruptive flavors can add different attributes and surprise the consumer.

**Keywords:** Camarinha, wild fruits, bioactive compounds, food innovation.



## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema taxonômico para classificação de espécie do Gênero <i>Corema</i> . ....	1
<b>Figura 2.</b> <i>Corema album</i> D. Don em habitat natural localizado na Aldeia do Meco, Portugal. ....	2
<b>Figura 3.</b> Camarinhas de coloração branca (a) e coloração rosa translúcida, completamente maduras (b). Fonte: adaptado de Bras de Oliveira; Dale (2012). ....	3
<b>Figura 4.</b> Distribuição da espécie <i>Corema album</i> na Península Ibérica. ....	4
<b>Figura 5.</b> Enquadramento regional da localidade de São Pedro de Moel na região litoral do conselho de Leiria. ....	5
<b>Figura 6.</b> Setor de arriba em São Pedro de Moel (Vista para Norte). ....	6
<b>Figura 7.</b> Formas de utilização da Camarinha. Aperitivos (a), bebidas ácidas (b), compotas e licores (c), geleias (d) e biscoitos (e). ....	7
<b>Figura 8.</b> Classificação conforme as classes e subclasses dos compostos fenólicos. ....	10
<b>Figura 9.</b> Ponto de recolha das camarinhas assinalado a amarelo (39°45'46.8"N 9°01'49.8"W elevação 29m) Praia de São Pedro de Moel, Leiria, Portugal. Fonte: Google Earth (2019). ....	14
<b>Figura 10.</b> Imagem demonstrativa das medições de altura (verde) e diâmetro (amarelo). ....	16
<b>Figura 11.</b> Conversão de açúcares redutores pelo Método DNS ....	19
<b>Figura 12.</b> Reta de calibração do método de DNS com soluções padrão de D-glicose, para quantificação de açúcares redutores. ....	20
<b>Figura 13.</b> Amostras liofilizadas das folhas, polpa e sementes de camarinha. ....	21
<b>Figura 14.</b> Amostras de polpa, sementes e folhas de camarinha sob catálise ácida (2 mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 2% (v/v) em metanol). ....	22
<b>Figura 15.</b> Amostras após 5 minutos de centrifugação a 1000 rpm, com sobrenadante contendo os esteres metílicos de ácidos gordos (FAME's). ....	22
<b>Figura 16.</b> Reta de calibração do ácido gálico para quantificação de compostos fenólicos totais pelo método <i>Folin – Ciocalteu</i> . ....	26
<b>Figura 17.</b> Reta de calibração do ácido ascórbico para a determinação da capacidade antioxidante pelo método ABTS. ....	28
<b>Figura 18.</b> Reta de calibração do ácido ascórbico para a determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH. ....	30
<b>Figura 19.</b> Reta de calibração do sulfato ferroso para a determinação da capacidade antioxidante pelo método FRAP. ....	32

<b>Figura 20.</b> Disposição dos discos sobre a superfície de Muller-Hinton Agar (MHA) inoculado.	34
<b>Figura 21.</b> Compostos Fenólicos Totais (mg GAE/100g) em amostras do fruto inteiro (FI), folhas (FO), flores (FL), sumo (SU), polpa desidratada (PD) e sementes desidratadas (SD), obtidos a partir do método <i>Folin-Ciocalteu</i> .	49
<b>Figura 22.</b> Capacidade Antioxidante Total (mg VCEAC/100g) em amostras do fruto inteiro (FI), folhas (FO), flores (FL), sumo (SU), polpa desidratada (PD) e sementes desidratadas (SD), obtida a partir do método ABTS.	52
<b>Figura 23.</b> Capacidade Antioxidante Total (mg VCEAC/100g) em amostras do fruto inteiro (FI), folhas (FO), flores (FL), sumo (SU), polpa desidratada (PD) e sementes desidratadas (SD), obtida a partir do método DPPH.	55
<b>Figura 24.</b> Capacidade Antioxidante Total ( $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$ ) em amostras do fruto inteiro (FI), flores (FL), sumo (SU), polpa desidratada (PD) e sementes desidratadas (SD), obtida a partir do ensaio FRAP.	58
<b>Figura 25.</b> Reta de correlação entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total realizada através do ensaio ABTS.	61
<b>Figura 26.</b> Reta de correlação entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total realizada através do ensaio DPPH.	62
<b>Figura 27.</b> Reta de correlação entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total realizada através do ensaio FRAP.	63
<b>Figura 28.</b> Efeito antibacteriano dos extratos da polpa e sementes da camarinha na estirpe <i>Staphylococcus aureus</i> .	65
<b>Figura 29.</b> Efeito antibacteriano dos extratos da polpa e sementes da camarinha na estirpe <i>Escherichia coli</i> .	65
<b>Figura 30.</b> Efeito antibacteriano dos extratos da polpa e sementes da camarinha na estirpe <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	66
<b>Figura 31.</b> Gráfico dos resultados de viabilidade celular das células CACO - 2, submetidas ao efeito do sumo de camarinha em diferentes concentrações, avaliados através do ensaio MTT, após 6 horas de incubação.	68
<b>Figura 32.</b> Espectro 1D 1H RMN de polpa desidratada de camarinha, apresentando a região do espectro associada aos sinais provenientes de grupos aromáticos (6.0 a 8.0 ppm), atribuídos ao ácido cumárico, ácido cafeico, ácido procatequino, hidroxitirosol e oleuropeínas.	69
<b>Figura 33.</b> Fluxograma do processo de produção da cerveja enriquecida com camarinha.	71
<b>Figura 34.</b> Cerveja de camarinha após 15 dias da fermentação de segundo estágio.	72



## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Tempo de retenção (Rt) e conteúdo de ácidos fenólicos em bagas de <i>Corema album</i> , de acordo com León-González et.al. (2013).....	11
<b>Tabela 2.</b> Resultados das características biométricas das camarinhas.....	39
<b>Tabela 3.</b> Resultados referentes à altura da camarinha obtidos em diferentes estudos. ....	39
<b>Tabela 4.</b> Resultados referentes ao diâmetro da camarinha obtidos em diferentes estudos. ...	40
<b>Tabela 5.</b> Resultados referentes ao teor de humidade obtidos em diferentes estudos. ....	42
<b>Tabela 6.</b> Composição em ácidos gordos (%) presentes nas amostras de folhas de camarinha. ....	44
<b>Tabela 7.</b> Composição em ácidos gordos (%) presentes nas amostras de polpa de camarinha. ....	46
<b>Tabela 8.</b> Composição em ácidos gordos (%) presentes nas amostras de sementes de camarinha.....	47
<b>Tabela 9.</b> Teor de compostos fenólicos totais, determinado pelo método Folin-Ciocalteu, em estudos variados para diferentes tipos de frutos. ....	51
<b>Tabela 10.</b> Comparação da capacidade antioxidante total da camarinha com diferentes frutos, determinada pelo método ABTS, através de um estudo conduzido por Floegel et al. (2011). ..	54
<b>Tabela 11.</b> Comparação da capacidade antioxidante total da camarinha com outros frutos, determinada pelo método DPPH, a partir de diferentes estudos.....	57
<b>Tabela 12.</b> Comparação da capacidade antioxidante total da camarinha com outros frutos, determinada pelo método FRAP, a partir de diferentes estudos. ....	60
<b>Tabela 13.</b> Compilação dos resultados do teor de compostos fenólicos totais determinado via método Folin-Ciocalteu e atividade antioxidante total pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP....	64
<b>Tabela 14.</b> Avaliação da atividade antibacteriana dos antibióticos utilizados nas estirpes selecionadas.....	66
<b>Tabela 15.</b> Resultados de viabilidade celular das células CACO - 2, submetidas ao efeito do sumo de camarinha em diferentes concentrações, avaliados através do ensaio MTT após 6 horas de incubação. ....	67



## Lista de siglas

AA	Ácido ascórbico
ABTS	Ácido 2,2-azinobis (3 etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ALA	Ácido alfa – linolénico ( <i>Alpha – linolenic acid</i> )
A $\beta$	Peptídeo $\beta$ -amilóide
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro ( <i>Brain derived neurotrophic factor</i> )
CIP	Ciprofloxacina
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DPPH	Radical 2,2-difenil-1 picrilhidrazil
EPA	Ácido eicosapentanóico ( <i>Eicosapentanoic acid</i> )
FAMES	Ésteres metílicos de ácidos gordos ( <i>Fatty acid methyl esters</i> )
FeSO <sub>4</sub>	Sulfato ferroso
FI	Fruto inteiro
FO	Folhas
FL	Flores
FRAP	Poder Antioxidante de redução do ferro ( <i>Ferric reducing antioxidant power</i> )
GAE	Equivalentes em ácido gálico ( <i>Gallic acid equivalents</i> )
GC	Cromatógrafo gasoso ( <i>Gas chromatograph</i> )
MHA	Muller-Hinton agar
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolio]

MUFA	Ácido gordo monoinsaturado ( <i>Monounsaturated Fatty Acid</i> )
NMR	Ressonância magnética nuclear ( <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )
PD	Polpa desidratada
PEF	Frações enriquecidas de polifenóis
PI	Porcentagem de inibição
PS	Peso seco
PUFA	Ácido gordo polinsaturado ( <i>Polyunsaturated Fatty Acid</i> )
ROS	Espécies reativas de oxigênio ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
SD	Semente desidratada
SFA	Ácido gordo saturado ( <i>Saturated fatty acid</i> )
SSC	Teor de sólidos solúveis ( <i>Soluble solids content</i> )
SU	Sumo
UV	Ultra-violeta
VCEAC	Atividade antioxidante equivalente em vitamina C
$\alpha$ Syn	Alfa sinucleína



# Índice

<b>DEDICATÓRIA</b>	<b>V</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMO</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>XVI</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>XIX</b>
<b>LISTA DE SIGLAS</b>	<b>XXI</b>
<b>1. ENQUADRAMENTO TEÓRICO</b>	<b>1</b>
<b>1.1. TAXONOMIA E CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE <i>COREMA ALBUM</i></b>	<b>1</b>
1.1.1. LOCALIZAÇÃO E PREVALÊNCIA GEOGRÁFICA	3
1.1.2. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA GEOGRÁFICA EM ESTUDO	5
<b>1.2. UTILIZAÇÃO DA CAMARINHA E COMERCIALIZAÇÃO</b>	<b>6</b>
<b>1.3. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E NUTRICIONAIS</b>	<b>8</b>
1.3.1. COMPOSIÇÃO FENÓLICA	9
<b>1.4. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BENÉFICO PARA A SAÚDE</b>	<b>12</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>14</b>
<b>2.1. AMOSTRAS</b>	<b>14</b>
<b>2.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA</b>	<b>15</b>
2.2.1. DETERMINAÇÃO DO PESO MÉDIO	15
2.2.2. DETERMINAÇÃO DA ALTURA E DIÂMETRO	15

2.2.3.	DETERMINAÇÃO DA HUMIDADE	16
2.2.4.	DETERMINAÇÃO DA PARTE EDÍVEL	17
2.2.5.	TEOR DE SÓLIDOS SOLÚVEIS - SSC	17
2.2.6.	DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES	18
2.2.7.	ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS	20
<b>2.3.</b>	<b>ATIVIDADE ANTIOXIDANTE</b>	<b>23</b>
2.3.1.	EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	23
2.3.2.	QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	25
2.3.3.	CAPACIDADE DE REDUÇÃO DO RADICAL ABTS	27
2.3.4.	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH	29
2.3.5.	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP)	30
<b>2.4.</b>	<b>ATIVIDADE ANTIBACTERIANA</b>	<b>32</b>
2.4.1.	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	32
2.4.2.	ESTIRPES BACTERIANAS	33
2.4.3.	MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO	33
<b>2.5.</b>	<b>TESTE DE VIABILIDADE CELULAR</b>	<b>35</b>
2.5.1.	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	36
2.5.2.	ENSAIO MTT	36
<b>2.6.</b>	<b>RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR</b>	<b>37</b>
<b>2.7.</b>	<b>TRATAMENTO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>37</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA</b>	<b>39</b>
3.1.1.	CARACTERÍSTICAS BIOMÉTRICAS	39
3.1.2.	DETERMINAÇÃO DA PARTE EDÍVEL	41
3.1.3.	DETERMINAÇÃO DE HUMIDADE	41
3.1.4.	TEOR DE SÓLIDOS SOLÚVEIS	42
3.1.5.	DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES	43
3.1.6.	DETERMINAÇÃO DO PERFIL ÁCIDOS GORDOS	43
<b>3.2.</b>	<b>ATIVIDADE ANTIOXIDANTE</b>	<b>47</b>
3.2.1.	QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	47
3.2.2.	CAPACIDADE DE REDUÇÃO DO RADICAL ABTS	51
3.2.3.	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE: DPPH	54
3.2.4.	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE: FRAP	57

3.2.5. CORRELAÇÃO ENTRE OS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DETERMINADA PELOS ENSAIOS ABTS, DPPH E FRAP	61
<b>3.3. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIBACTERIANA</b>	<b>64</b>
<b>3.4. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR</b>	<b>66</b>
<b>3.5. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR</b>	<b>68</b>
<b>4. APLICAÇÕES</b>	<b>70</b>
<b>4.1. DESENVOLVIMENTO DE UMA CERVEJA TIPO ALE ENRIQUECIDA COM CAMARINHA</b>	<b>70</b>
4.1.1. FORMULAÇÃO E FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO	70
4.1.2. TEOR ALCOÓLICO, SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS E PH	72
4.1.3. QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DA CERVEJA	74
4.1.4. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE - ABTS E DPPH	75
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>78</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>90</b>



# 1. Enquadramento Teórico

## 1.1. Taxonomia e Caracterização da Espécie

### *Corema album*

O género *Corema*, tem sua origem na palavra grega *Korema*, que significa “vassoura”, sendo este nome atribuído ao género devido aos ramos da planta serem demasiadamente preenchidos por folhas, semelhantes à uma vassoura (Gil-López, 2011).

O género *Corema* encaixa-se na família Ericaceae da ordem das Ericales, e inclui duas espécies, uma delas *Corema conradii* nativa da costa noroeste dos Estados Unidos, e a outra o *Corema album* (L.) D. Don, originário da Península Ibérica, particularmente das áreas costeiras voltadas para o Oceano Atlântico. A *Corema album* inclui duas subespécies, sendo estas a *Corema album* subespécie *azoricum*, originária dos Açores, e a outro a subespécie do continente, a *Corema album* ssp. *album* (Figura 1) (Andrade, Gonçalves & Guiné, 2017).

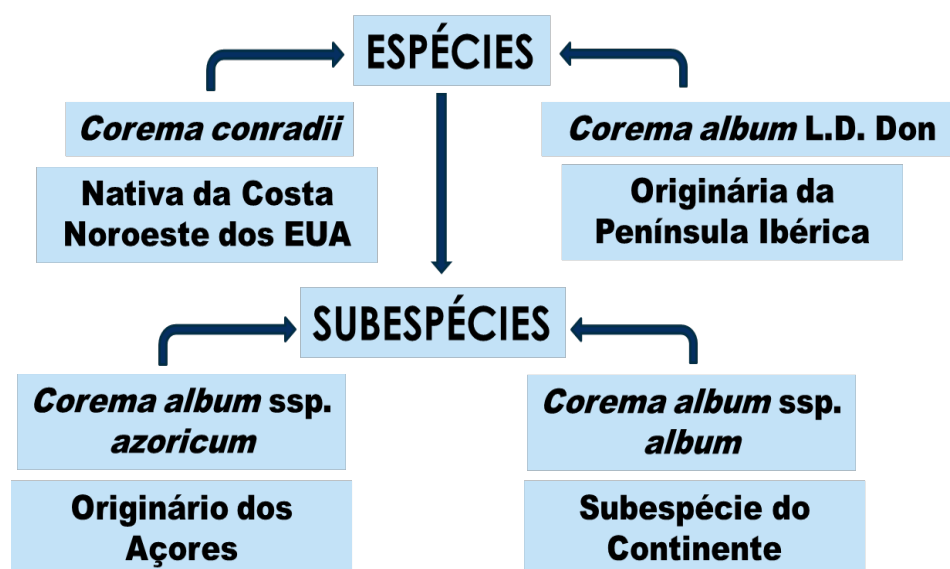


Figura 1. Esquema taxonômico para classificação de espécie do Género *Corema*.

*Corema album* (L.) D. Don é uma das espécies endémicas mais características dos sistemas dunares da costa Atlântica da Península Ibérica,

ocorre sobre arribas rochosas e por vezes em subcoberto de pinhais. Estes habitats têm sofrido um crescente impacto humano nos últimos tempos (Clavijo et al., 2002). Esta degradação das zonas costeiras torna a Camarinha uma espécie em risco, dado que as suas populações se encontram em regressão em número e tamanho, como consequência do desenvolvimento urbano nas zonas costeiras, do impacto do turismo nas dunas de areia e do impacto de espécies invasoras, como por exemplo a *Acacia sp.* (Calviño-Cancela, 2005).

A *Corema album*, popularmente conhecido como Camarinha, é um arbusto dióico, com numerosos ramos, geralmente entre 30 – 75 cm de altura podendo chegar até a 1 m (Figura 2) (Bras de Oliveira; Dale, 2012). Nas plantas masculinas os ramos são mais eretos, enquanto que nas plantas femininas os ramos são mais curtos e mais procumbentes (Tutin et al., 1980). O crescimento vegetativo é renovado a partir de gomos a cerca de 25 mm do chão (Bras de Oliveira; Dale, 2012).



**Figura 2.** *Corema album* D. Don em habitat natural localizado na Aldeia do Meco, Portugal.

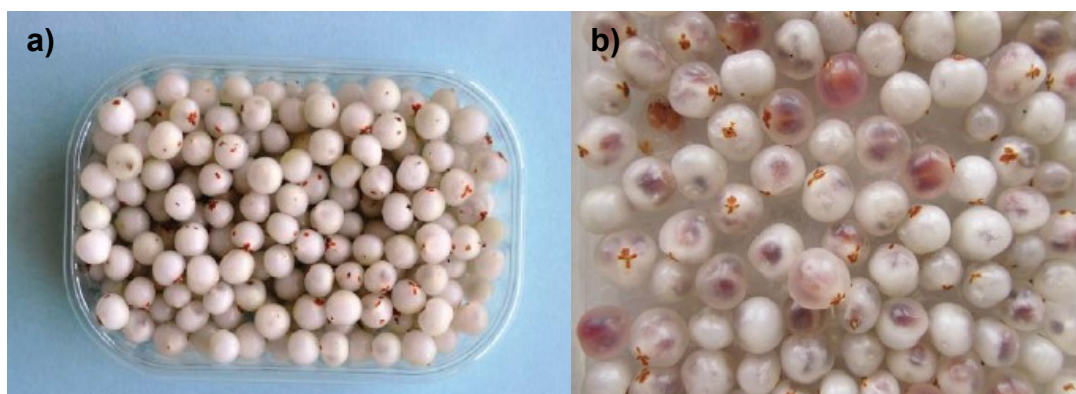
Fonte: Adaptado de Bras de Oliveira; Dale (2012).

O período de crescimento ocorre de fevereiro a julho e atinge o seu máximo entre abril e junho, enquanto a floração ocorre nos meses de fevereiro a abril, com frutos amadurecendo de junho a julho. São as plantas femininas que produzem bagas comestíveis (brancas ou rosadas), geralmente com três sementes (variando de 2 a 9) (Álvarez-Cansino et al., 2010). A alta proporção do

peso das sementes (54,97% do peso seco), explica a menor parte comestível destes frutos em relação a outros de tamanho semelhante (León-González et.al., 2013).

O número de flores por inflorescência varia conforme o sexo/género, mas nunca excede as 20 flores (Álvarez-Cansino et al., 2010) (Gutián, Medrano & Rodríguez, 1997). As flores masculinas dispõem-se em inflorescências terminais, com 3 estames de tonalidade avermelhada, enquanto as flores femininas estão agrupadas no mesmo tipo de inflorescência, com pétalas de 1 mm (Lisboa, 2017).

As camarinhas possuem uma forma arredondada, sendo a coloração primariamente branca (Figura 3.a) com alguma coloração rosa ou translúcida quando completamente madura (Figura 3.b) (Antunes da Costa, 2011). A fruta desenvolvida é tipicamente branca, porém a discriminação entre genótipos pode ser observada entre os frutos que apresentam uma cor branca pérola e outros frutos que se tornam translúcidos. Esta é considerada a fase em que as sementes são observáveis a partir da parte externa da baga conforme a Figura 3.b, em que se apresenta mais transparente. Estas bagas pertencentes aos genótipos que se tornam transparentes desenvolvem uma superfície rosada (Bras de Oliveira; Dale, 2012).

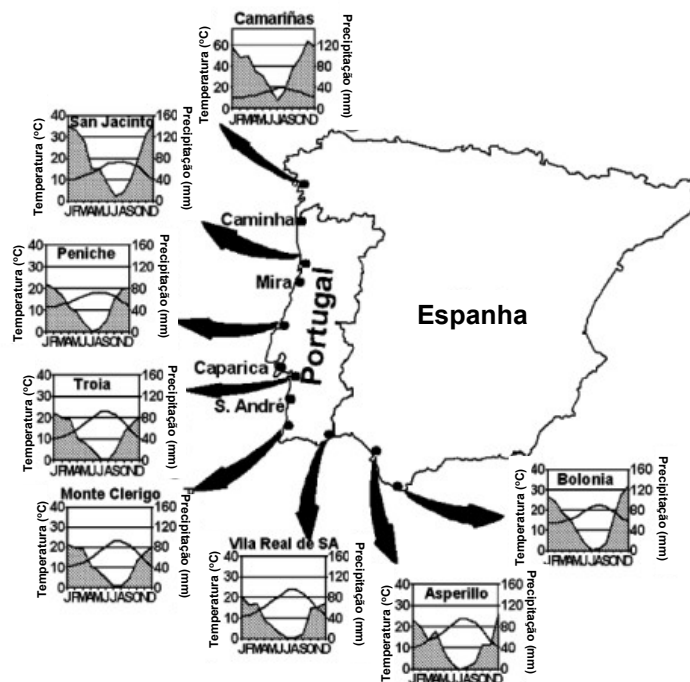


**Figura 3.** Camarinhas de coloração branca (a) e coloração rosa translúcida, completamente maduras (b). Fonte: adaptado de Bras de Oliveira; Dale (2012).

### 1.1.1. Localização e Prevalência Geográfica

O *Corema album* cresce principalmente em dunas de areia como também habita locais rochosos e falésias, tal como ocorre nas Ilhas dos Açores, com predominância de lava vulcânica e campos de cinzas (Calviño-Cancela, 2004). O

*Corema album* ssp. *album* ocorre na Costa Atlântica da Península Ibérica, de Gibraltar a Finisterra; enquanto o *Corema album* ssp. *azoricum* ocorre nos Açores, e está presente em seis das nove ilhas do arquipélago. Existem grandes populações nos três grandes sistemas de dunas, Aspeillo no Parque Nacional Doñana, no Sul da Espanha, de Sines a Troia, a sudoeste de Portugal, e de Nazaré a Ovar no centro-norte de Portugal (Figura 4) (Clavijo et al., 2002).



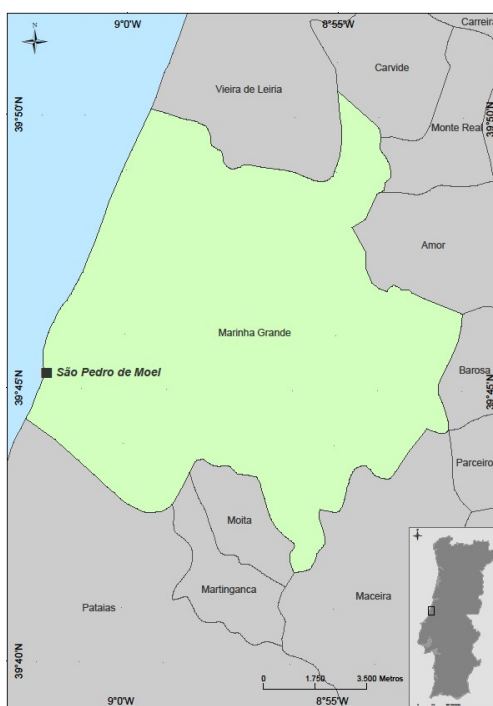
**Figura 4.** Distribuição da espécie *Corema album* na Península Ibérica.

Fonte: Adaptado de Zunzunegui et al. (2006).

A espécie *Corema album* segue uma distribuição principalmente norte-sul ao longo da Costa Ocidental da Península Ibérica com uma população isolada no sudeste da Costa e uma subespécie endêmica nas ilhas de Açores. As condições climáticas mudam dramaticamente ao longo deste gradiente, sendo mais húmido no Norte e seco a quente no Sul. As variações climáticas e o *stress* hídrico experimentado pelas plantas (maior no Sul), são fatores importantes que condicionam as variações entre as plantas e suas características físico-químicas (Larrinaga & Guitián, 2016).

### 1.1.2. Caracterização da Área Geográfica em Estudo

Localizado na Estremadura Portuguesa, São Pedro de Moel pertence à Freguesia e Concelho de Leiria e, de acordo com a NUT III, corresponde à sub-região do Pinhal Litoral. É abrangido pela área de jurisdição da ARH (Administração da Região Hidrográfica) do Tejo, e abrangido pelo POOC (Plano de Ordenamento da Orla Costeira) Ovar – Marinha Grande (Figura 5) (Soares, 2013).



**Figura 5.** Enquadramento regional da localidade de São Pedro de Moel na região litoral do conselho de Leiria.

Fonte: Adaptado de Soares (2013).

O núcleo urbano de São Pedro de Moel está localizado em afloramentos carbonatados jurássicos que formam saliência natural condicionante da orientação da costa que se desenvolve para Norte (Ribeiro & Gamito, 2012). Ao Norte é praticamente rectilínea, quase sempre baixa e arenosa. Já em São Pedro de Moel, é alta e rochosa numa extensão de cerca de 1 km de arriba (Figura 6) (Soares, 2013).



**Figura 6.** Setor de arriba em São Pedro de Moel (Vista para Norte).

Fonte: Adaptado de Soares (2013).

A situação geográfica inclui-se na zona temperada do hemisfério Norte, com características de céu limpo, ar seco e precipitação escassa. Os valores médios de temperatura variam ao longo do ano, sendo os meses entre dezembro e fevereiro os mais frios (média anual mínima 10,2 °C) e os meses de julho a agosto os mais quentes (média anual máxima 18,0 °C) (Soares, 2013).

Em relação à precipitação, a normal climatológica revela que os meses mais secos, com valores inferiores a 20 mm, estendem-se de julho a agosto, já a época chuvosa ocorre de outubro a fevereiro (Soares, 2013).

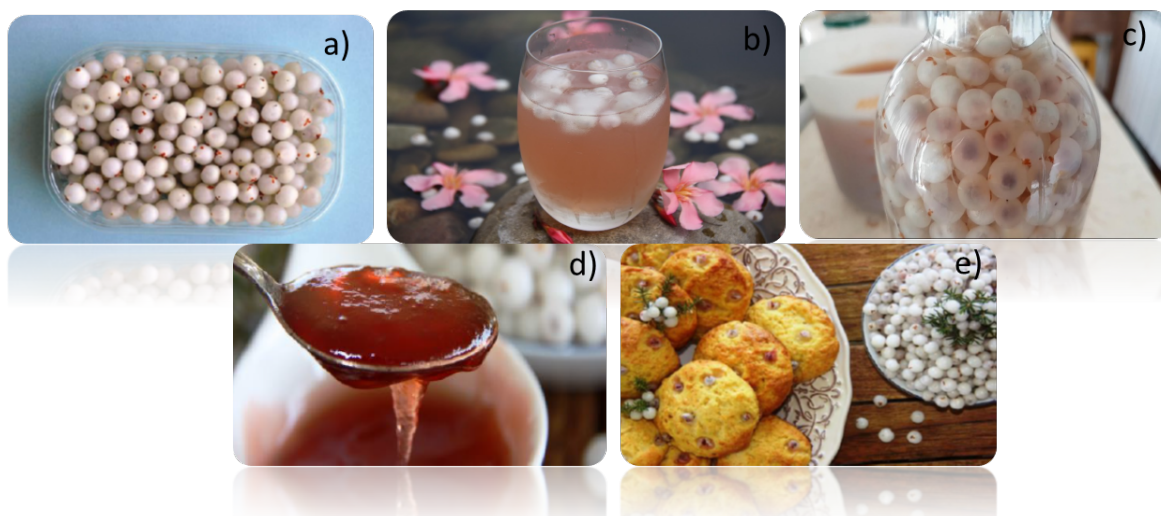
## **1.2. Utilização da Camarinha e Comercialização**

Entre os pequenos frutos coloridos de polpa mole, as bagas compõem a maior proporção consumida na dieta. Frutos de baga são popularmente consumidos não apenas em formas frescas e congeladas, mas também como produtos processados e derivados, incluindo frutas enlatadas, iogurtes, bebidas, doces e geleias. Além disso, tem havido uma tendência crescente na ingestão de extratos de bagas como ingredientes em alimentos funcionais e suplementos alimentares, que podem ou não ser combinados com outras frutas coloridas, vegetais e extratos de ervas (Pimpão et al., 2013).

Os frutos de bagas, além de possuírem ótimos sabores, têm importância económica e, devido às suas propriedades antioxidantes, são de grande interesse

para nutricionistas e tecnólogos alimentares, devido à oportunidade de utilização como alimentos funcionais (Skrovankova et al., 2015).

No caso das camarinhas, estas são tradicionalmente consumidas frescas, como aperitivos (Figura 7 a), ou usadas em limonadas pelo sabor ácido (Figura 7 b), compotas e licores (Figura 7 c), geleias (Figura 7 d), processadas ou transformadas sob a forma de biscoitos (Figura 7 e) (León-González et.al., 2013).



**Figura 7.** Formas de utilização da Camarinha. Aperitivos (a), bebidas ácidas (b), compotas e licores (c), geleias (d) e biscoitos (e).

No passado, as bagas das camarinhas eram colhidas em áreas de dunas por pessoas com baixos rendimentos e vendidas nos mercados das aldeias costeiras da Galiza, Portugal e Andaluzia, sendo particularmente apreciadas por crianças (Gil-López, 2011).

Embora a perda de ecossistemas naturais e as mudanças socioeconômicas tenham ocasionado uma diminuição no consumo, a camarinha apresenta possibilidades no mercado mundial de frutos silvestres, dada a sua novidade e sabor ácido fresco (León-González et al., 2013), sendo que, o sabor é um dos principais atributos que o consumidor aprecia nas bagas e que pode influenciar a sua aceitação junto do setor alimentar (Di Vittori et al., 2018).

Artigos recentemente publicados em revistas do setor alimentar, referem que a geleia de camarinha é um produto com sabor único que já encontrou, inclusive,

interesse por parte de grandes chefes da cozinha internacional (Amesterdão, Barcelona, Belo Horizonte, Londres e Paris) (Andrade, 2016).

### **1.3. Características Químicas e Nutricionais**

O termo qualidade nutricional pode ser definido, no sentido estrito, como a quantidade de compostos bioativos saudáveis presentes na matriz dos frutos. No entanto, em alguns casos, foi definido como uma combinação de atributos sensoriais (cor, açúcar, acidez, aroma) e nutricionais (antioxidantes, vitaminas e minerais). Além das suas características agronômicas e organolépticas, nos últimos anos o alto valor nutricional destas frutas tem sido amplamente estudado e tendo o consumidor mostrado interesse nessa informação (Di Vittori et al., 2018).

O interesse gerado em torno da qualidade nutricional das bagas deve-se ao facto de que compostos bioativos presentes nestes frutos poderiam proteger o corpo humano de várias doenças crônicas, como eventos cardiovasculares, cancro e outras doenças degenerativas relacionadas com a idade, bem como pelos variados benefícios que os frutos podem fornecer (Ames et al., 1993). Essas associações podem ser explicadas, de forma parcial, devido à presença de sequestradores de radicais livres, como polifenóis e ácido ascórbico nos frutos (Atala et al., 2009).

As bagas são fontes importantes de compostos fenólicos, especialmente os derivados do ácido hidroxibenzoico e hidroxicinâmico, antocianinas, flavonóides, catequinas e taninos, sob forma hidrolisável ou de forma condensada (Kä; Hopia; Heinonen, 2001).

A composição química das bagas no geral é variada, dependendo das condições de cultivo e da variedade. No geral, são ricas em açúcares (glicose, frutose), mas baixas em calorias. Contêm apenas pequenas quantidades de gordura, mas um alto teor de fibra dietética (celulose, hemicelulose, pectina); ácidos orgânicos, tais como o ácido cítrico, ácido málico, tartárico, oxálico e fumárico; minerais; algumas vitaminas (ácido ascórbico e ácido fólico) e fitoquímicos, compostos que podem ser uma boa opção para a indústria alimentar usar como ingredientes alimentares funcionais (Skrovankova et al., 2015).

As bagas são ótimas fontes de macro e micronutrientes e os principais elementos minerais encontrados em frutos de bagas são o fósforo, potássio, cálcio, magnésio, ferro, manganês, cobre, sódio e alumínio, sendo estes constituintes essenciais para o corpo humano, devido ao importante papel que desempenham no desenvolvimento de ossos e dentes, reforço muscular e outros processos fisiológicos e bioquímicos (Di Vittori et al., 2018).

A vitamina C, incluindo o ácido ascórbico e o ácido desidroascórbico, nos frutos de baga, é um dos fatores de qualidade nutricional mais importantes, além de possuir muitas atividades biológicas no corpo humano (Lee & Kader, 2000).

### **1.3.1. Composição Fenólica**

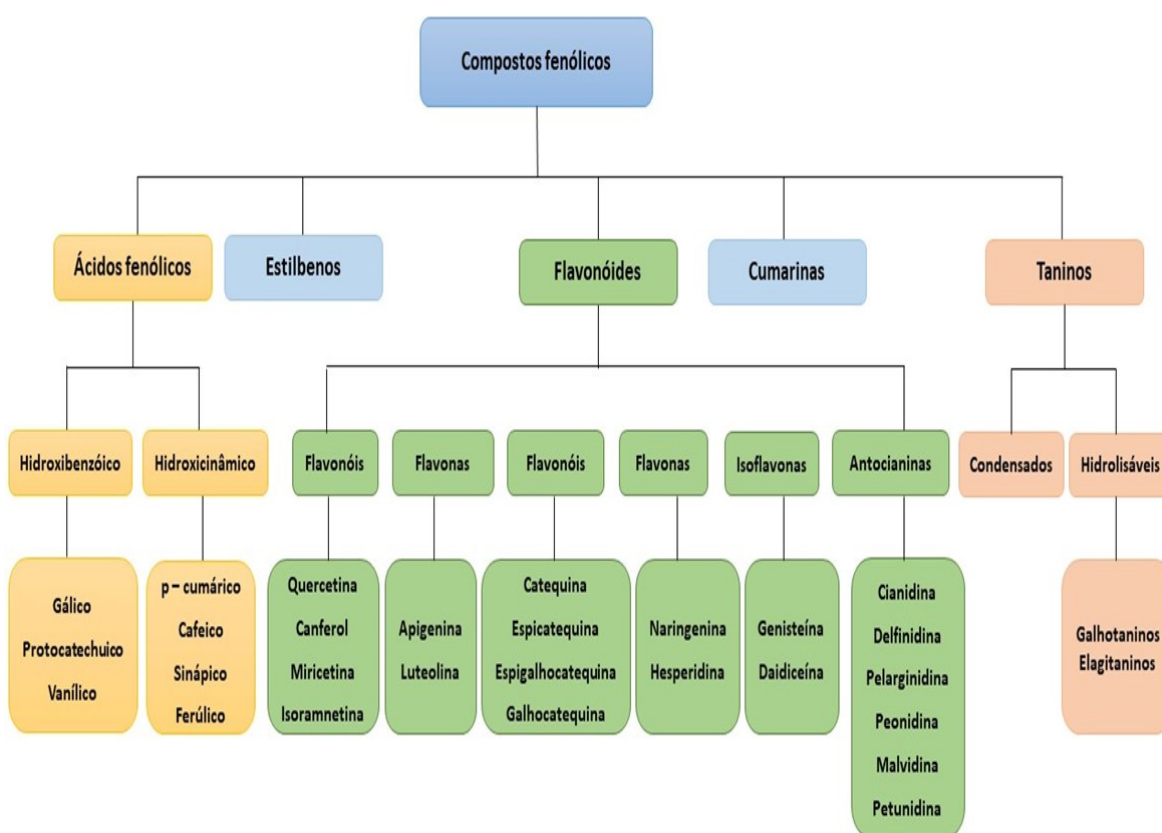
O consumo de uma dieta rica em alimentos à base de plantas está associado à diminuição do risco de cancro das células epiteliais em vários locais, sendo que, embora existam ainda poucas evidências ligando exclusivamente o consumo de bagas com menor risco de cancro, estas contêm altos níveis de compostos que podem reduzir a transformação maligna, incluindo os flavonóides, polifenóis e antocianinas (Duthie, 2007).

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários, presentes no reino vegetal e com impacto na saúde humana, diminuindo o risco de diversas doenças pela redução de fenómenos oxidativos (Ferrerres et al., 2009). São sintetizados pelas plantas durante o desenvolvimento normal e em resposta a condições de *stress*, como infecção, ferimentos e radiação UV, tornando-se um grupo muito diversificado de fitoquímicos derivados dos aminoácidos fenilalanina e tirosina (Naczk & Shahidi, 2004).

Os compostos fenólicos pertencem a um grupo amplo e heterogêneo de componentes químicos que possuem um ou mais anéis aromáticos com um sistema aromático conjugado e um ou mais grupos hidroxilo. Eles tendem a doar elétrons ou átomos de hidrogênio a radicais livres e a converte-los em grupos inofensivos, apresentando assim elevada atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*. Ocorrem sob forma livre ou conjugada com açúcares, ácidos ou outras biomoléculas solúveis em água (ácidos fenólicos, flavonóides e quinonas), bem

como compostos insolúveis em água (taninos condensados) (Skrovankova et al., 2015).

Genericamente, conforme esquematizado na Figura 8, os compostos fenólicos podem ser divididos em flavonóides, que por sua vez são subdivididos em flavonóis, flavonas, flavanóis, flavonas, antocianinas e isoflavonas; e os não flavonóides, que compreendem os grupos dos ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos ou ácidos hidroxicinâmicos), taninos, cumarinas e estilbenos (Fraga, 2010).



**Figura 8.** Classificação conforme as classes e subclasses dos compostos fenólicos.

Fonte: Adaptado de Oliveira (2012).

Frutos de baga são particularmente ricos em uma gama diversificada de polifenóis de várias classes diferentes, sendo mais abundantes os ácidos fenólicos, taninos e flavonóides, especialmente antocianinas, responsáveis pela pigmentação colorida (PIMPÃO et al., 2013). Os polifenóis também contribuem para a qualidade organoléptica e nutritiva dos frutos, como a cor, sabor e aroma,

estando particularmente presentes em frutos com sabores mais adstringentes e amargos (Garcia-Salas et al., 2010).

Nos últimos dez anos, investigadores e fabricantes de alimentos mostraram-se cada vez mais interessados em polifenóis, pelo reconhecimento das suas propriedades antioxidantes, grande abundância na dieta e pelo seu potencial papel de prevenção de várias doenças associadas ao *stress* oxidativo, como vários tipos de cancro e doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Manach et al., 2004).

Um estudo em *Corema album* realizado por León-González et.al. 2013, recorrendo a Cromatografia Líquida acoplada à Espectroscopia de massa e detetor UV-VIS, indicou um total de compostos fenólicos de  $1214,4 \pm 122,7$  mg equivalentes em ácido gálico (GAE)/kg de fruto fresco ou  $7318,6 \pm 739,6$  mg GAE/kg fruto seco, sendo que na categoria dos flavonóides foi possível detectar a presença de flavonóis ( $638,3 \pm 80,1$  mg/kg peso seco de fruto) e uma baixa quantidade de antocianinas ( $19,6 \pm 2,4$  mg/kg peso seco de fruto). Os ácidos fenólicos foram o principal grupo de compostos fenólicos encontrados no fruto ( $2268,1 \pm 229,9$  mg/kg peso seco de fruto), o que justifica o sabor ácido (Tabela 1).

**Tabela 1.** Tempo de retenção (Rt) e conteúdo de ácidos fenólicos em bagas de *Corema album*, de acordo com León-González et.al. (2013).

Pico	Rt (min)	Compostos	(M-H) <sup>-</sup>	mg/kg DW $\pm$ SD
<b>Ácidos Fenólicos</b>				
1	15,4	ácido p-cumárico	163	$11,8 \pm 1,3$
2	21,1	ácido p-hidroxibenzóico	137	$50,2 \pm 4,9$
3	24,7	ácido cafeico	179	$142,1 \pm 14,2$
4	26,3	ácido clorogênico	353	$1857,6 \pm 180,3$
5	28,9	ácido ferúlico	193	$49,4 \pm 6,1$
6	29,8	ácido neoclorogênico	353	$157,1 \pm 23,2$

Conforme a Tabela 1, é possível verificar que o ácido hidroxicinâmico mais abundantemente presente no *Corema album* é o ácido clorogênico ( $1857,6 \pm$

180,3 mg/kg peso seco de fruto), sendo também um constituinte importante de outras bagas, onde estudos *in vivo* demonstraram que este ácido pode ter efeitos protetivos contra carcinogênese induzida em ratos (León-González et al., 2012; León-González et al., 2013). Outros estudos *in vitro* sugeriram também que os efeitos quimiopreventivos do ácido clorogênico podem ser mediados pela regulação positiva de glutathione e enzimas celulares antioxidantes (León-González et al., 2013). As propriedades do ácido clorogênico fazem com que os extratos fenólicos de *Corema album* sejam candidatos interessantes para a quimioproteção celular (León-González et al., 2012).

#### **1.4. Avaliação do Potencial Benéfico para a Saúde**

Numerosos estudos sugerem que o consumo de bagas possui efeito benéfico na saúde humana. De acordo com Fuentealba et al. (2011), as potenciais propriedades neuroprotetoras dos frutos têm sido amplamente reconhecidas, conforme avaliou no seu estudo, as propriedades protetoras de extrato de mirtilo (BB-4), rico em polifenóis, em modelo neurodegenerativo induzido pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ), sugerindo que o extrato de mirtilo (BB-4) poderia ser um complemento nutricional importante para a saúde neural, devido à proteção do tecido neural pelo BB4 da toxicidade induzida pelos agregados de  $A\beta$  amilóide (Fuentealba et al. 2011).

Nesta mesma linha de investigação, um estudo realizado por Macedo et al. (2015), avaliou o efeito protetor de polifenóis de folhas e frutos de *Corema album* na proteção de células sob *stress* oxidativo e da toxicidade induzida pela proteína  $\alpha$ -Syn (alfa sinucleína), dois importantes marcadores na Doença de Parkinson (Macedo et al., 2015). Os resultados indicaram uma maior capacidade de proteção do que o *Ginko biloba*, espécie reconhecida por suas propriedades benéficas para a saúde.

O estudo supracitado também indicou que as frações enriquecidas de polifenol (PEF) da folha de *Corema album* são agentes promissores que resgatam o fluxo autofágico e diminuem a fibrilização da  $\alpha$ -Syn, o que resulta na formação de espécies não tóxicas.

O *stress* oxidativo é a principal causa de doenças hepáticas, e extratos vegetais com propriedades antioxidantes tem recebido ampla atenção como possíveis agentes terapêuticos e preventivos, que combatem a produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS), bem como o *stress* oxidativo (León-González et al., 2012).

Conforme estudo realizado por León-González et al. (2012), analisou-se a composição fenólica de três diferentes extratos obtidos a partir do fruto de *Corema album* e investigou-se o efeito quimio-protetor dos extratos contra o *stress* oxidativo induzido e os diferentes mecanismos de defesa. Os resultados revelaram os ácidos hidroxicinâmicos como a principal fração fenólica e demonstraram que o pré-tratamento das células hepáticas com qualquer um dos extratos conferiu proteção significativa contra o *stress* oxidativo quimicamente induzido.

As atividades biológicas dos ácidos hidroxicinâmicos naturais incluem também a inibição da proliferação de células tumorais e atividade anti-inflamatória (León-González et al., 2012). A maioria dos efeitos biológicos dos extratos deve ser atribuída ao grupo dos ácidos hidroxicinâmicos, em particular ao ácido clorogênico, o qual demonstrou atividade protetora de células do fígado em modelos de lesão hepática experimental, onde a sua administração a ratos, aumentou a homeostase glicêmica e lipídica e o *status* antioxidante geral (León-González et al., 2012).

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Amostras

As camarinhas, folhas e flores foram colhidas de forma aleatória, de arbustos dunares, junto à praia de São Pedro de Moel, Distrito de Leiria, tangenciando a Avenida do Farol, às proximidades do Farol Penedo da Saudade, sob as coordenadas  $39^{\circ}45'46.8''\text{N}$   $9^{\circ}01'49.8''\text{W}$  / elevação 29m, conforme ilustrado na Figura 9. Foram realizadas duas colheitas. Em setembro de 2018 para caracterização físico-química, perfil de ácidos gordos, atividade antibacteriana e aplicabilidade (elaboração de uma cerveja enriquecida com camarinha) e uma nova colheita em setembro de 2019 para determinação da capacidade antioxidante, fenólicos totais, viabilidade celular e ressonância magnética nuclear. Após cada colheita, os frutos foram devidamente higienizados com água destilada e armazenados à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

A partir da amostragem foram selecionadas, aleatoriamente, amostras para a realização das análises supracitadas.



**Figura 9.** Ponto de recolha das camarinhas assinalado a amarelo ( $39^{\circ}45'46.8''\text{N}$   $9^{\circ}01'49.8''\text{W}$  elevação 29m) Praia de São Pedro de Moel, Leiria, Portugal. Fonte: Google Earth (2019).

## 2.2. Caracterização Físico-Química

### 2.2.1. Determinação do Peso Médio

Para determinar a massa média foram selecionadas aleatoriamente 150 camarinhas, de forma a obter uma amostra heterogênea, sequencialmente foi realizada a pesagem das mesmas, em balança analítica de precisão KERN, modelo 470-36. O peso médio foi determinado conforme a Equação 1.

$$\text{Massa Média do Fruto} = \frac{\sum \text{Massa do Fruto}}{n}$$

Equação 1

Onde n representa o número de frutos que constituem a amostra, neste caso n = 150.

### 2.2.2. Determinação da Altura e Diâmetro

Para medição dos parâmetros altura e diâmetro, foram selecionadas aleatoriamente 50 camarinhas de forma a obter o valor médio para altura (equação 2) e diâmetro (equação 3). O método foi realizado com recurso a um paquímetro digital INECO modelo 101.01L150/E (Figura 10).

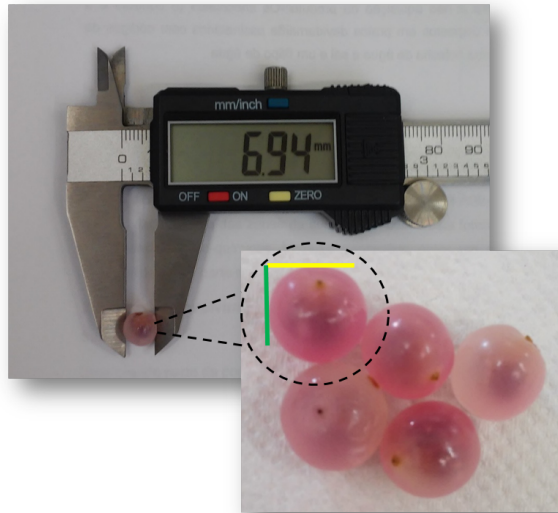
$$\text{Altura média do fruto} = \frac{\sum \text{da altura do fruto}}{n}$$

Equação 2

$$\text{Diâmetro médio do fruto} = \frac{\sum \text{do diâmetro do fruto}}{n}$$

Equação 3

Onde n representa o n – Número de frutos que constituem a amostra, neste caso n = 50 para as equações 2 e 3.



**Figura 10.** Imagem demonstrativa das medições de altura (verde) e diâmetro (amarelo).

Conforme demonstrado na Figura 10, a altura da fruta indica o tamanho médio na dimensão longitudinal, enquanto o diâmetro indica o tamanho médio na dimensão equatorial/transversal, ambos a partir de uma amostra representativa dos frutos (Di Vittori et al., 2018). Após a obtenção dos resultados de massa, altura e diâmetro médios, foi possível calcular os valores de média do calibre (Equação 4) e volume (Equação 5) dos frutos.

$$\text{Calibre} = \frac{\text{altura} + \text{diâmetro do fruto}}{2}$$

Equação 4

$$\text{Volume} = \pi \frac{4}{3} \text{ calibre}^3$$

Equação 5

### 2.2.3. Determinação da Humidade

Para determinar o teor de humidade, procedeu-se a uma amostragem de 5,0 g do fruto, sendo esta análise realizada em triplicado. As amostras foram colocadas em estufa Heraeus modelo D-6450 Hanau, à temperatura constante de 60°C por 72 horas. Os resultados foram expressos em percentagem (%) de teor de humidade, conforme Equação 6.

$$\text{Teor de Humidade} = \frac{\Delta \text{Peso} \times 100}{P_i}$$

Equação 6

Onde  $\Delta$  Peso, representa a diferença entre a massa inicial da amostra e a massa da amostra após secagem em estufa; e  $P_i$  – Representa a massa inicial da amostra.

#### **2.2.4. Determinação da Parte Edível**

A parte edível de um alimento corresponde à massa do produto que pode ser integralmente utilizado, descartando-se toda parte que não será consumida. Os valores da parte edível, expressos em percentagem, dependerão do modo de aproveitamento dos alimentos, gostos e hábitos alimentares. Assim sendo, tornam-se valores médios estimados, com grande possibilidade de variação na prática (INSA, 2016). Para esta determinação, considerou-se o consumo em fresco, onde se descartaram apenas as sementes. Foi selecionada uma amostra constituída por 30 camarinhas. Manualmente, foram removidas as sementes com recurso a duas pinças. A percentagem da parte edível do fruto fresco foi determinada a partir das Equações 7 e 8.

$$\text{Peso Edível da Amostra} = \text{Peso da Amostra Fresca} - \text{Peso das Sementes}$$

Equação 7

$$\% \text{ Edível do Fruto Fresco} = \frac{\text{Peso Edível da Amostra} \times 100}{\text{Peso da amostra fresca}}$$

Equação 8

#### **2.2.5. Teor de Sólidos Solúveis - SSC**

SSC (*soluble solids content*) ou o teor de sólidos solúveis está relacionado com o conteúdo dos compostos dissolvidos nos sumos de frutas, sendo este em sua maioria constituído por açúcares. O método tradicional mais utilizado para medir o SSC requer a extração do sumo dos frutos e é realizado com recurso a refratômetros digitais. É um método destrutivo, utilizado nas detecções de

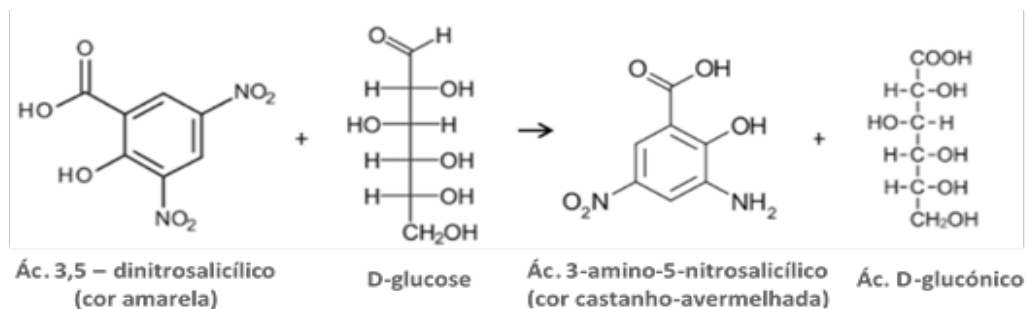
amostragem, sendo este muito importante, uma vez que determina não só a doçura, mas a percepção de sabor, maturação e qualidade dos frutos pós-colheita (Guo et al., 2019).

A doçura é particularmente apreciada pelo consumidor, sendo este parâmetro geralmente indicado como Sólidos Solúveis Totais e o valor é expresso em grau Brix (°Brix) (Di Vittori et al., 2018). A percentagem de sólidos solúveis do sumo foi determinada com recurso a um refratômetro modelo HI 96813. Para a presente análise foi realizada a extração do sumo de 3 camarinhas, escolhidas aleatoriamente, por pressão manual mecânica. Após a calibração do aparelho com água destilada, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, colocou-se 1 gota de sumo das camarinhas sobre a superfície do prisma do refratômetro e procedeu-se a leitura do índice de refração, a uma temperatura de média de  $17,8 \pm 0,1$  °C. Esta determinação foi realizada em triplicado.

#### **2.2.6. Detminação de Açúcares Redutores**

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método DNS (ácido 3,5–dinitrosalicílico), descrito por Miller (1959), de acordo com adaptação do procedimento de Garriga, Almaraz & Marchiaro (2017).

O método DNS é uma técnica colorimétrica que consiste na reação de redução entre o ácido 3,5-dinitrosalicílico e os açúcares redutores presentes na amostra. O poder de redução destes açúcares (ex: monossacarídeos aldose) vem do seu grupo carbonilo, que pode ser oxidado a grupo carboxilo através de agentes oxidantes, enquanto o DNS (com coloração amarela) é reduzido a ácido 3-amino 5-nitrosalicílico (com cor castanho-avermelhada) (Figura 11), a qual pode ser quantificada por espectrofotometria a 540 nm (comprimento de onda de absorvância máxima) (Miller, 1959). A determinação foi realizada em triplicado.



**Figura 11.** Conversão de açúcares redutores pelo Método DNS

Fonte: Adaptado de Garriga, Almaraz & Marchiaro (2017).

Foram desenvolvidos extratos da polpa, folhas e sementes da camarinha, obtidos por hidrólise de 1,0 g de peso seco das amostras liofilizadas, em 50 mL de ácido sulfúrico 0,25 N, em banho termostatizado, a 50°C, durante 1 hora. Posteriormente, em tubos de 10 mL, foi colocado 1 mL de extrato de cada amostra e 1 mL de reagente DNS. Os tubos foram submetidos a banho termostatizado a 100°C, por 5 minutos. Após este período, os extratos arrefeceram à temperatura ambiente. Posteriormente, os volumes dos extratos foram completados com 8 mL de água destilada e homogeneizados em vortex. Procedeu-se a leitura dos valores de absorvância em espectrofotômetro Varian Cary 50 Scan UV Visible após calibração do equipamento, no comprimento de onda de 540nm ( $\lambda=540\text{nm}$ ). A amostra controle foi analisada tendo em conta o mesmo procedimento, substituindo o volume de amostra de extrato por água destilada.

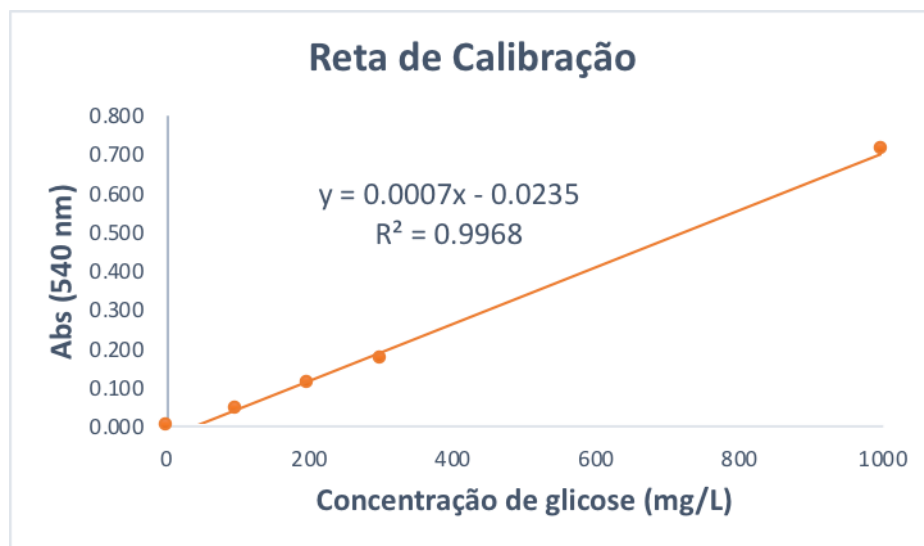
A reta de calibração (Figura 12) foi executada com soluções padrão de glicose, de diferentes concentrações, obtidas por diluição de uma solução padrão a 1mg/mL.

A quantificação total de açúcares redutores (equação 9) foi calculada através da equação correspondente à reta de calibração.

$$C = \frac{\text{Abs} - (-0,0235)}{0,0007}$$

Equação 9

Onde Abs representa o valor de absorvância de cada amostra a 540 nm.



**Figura 12.** Reta de calibração do método de DNS com soluções padrão de D-glicose, para quantificação de açúcares redutores.

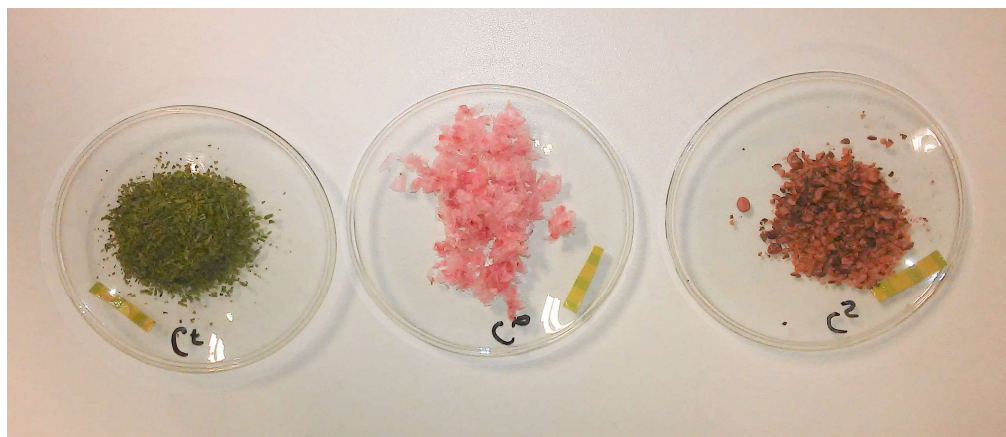
### 2.2.7. Análise do perfil de ácidos gordos

Os ácidos gordos são essenciais, alguns são sintetizados no organismo, mas outros devem ser ingeridos através dos alimentos para uma vida saudável, pois não conseguem ser produzidos no corpo humano (Reche et al., 2019). Muitos tipos de ácidos gordos desempenham um papel importante na regulação de uma variedade de funções fisiológicas e biológicas. São compostos orgânicos formados por uma cadeia hidrocarbonada e um grupo carboxílico que são normalmente ligados com acilglicerídeos formadores de glicerol (mono-, di- ou triacilglicerídeos) (Sánchez-Salcedo et al., 2016).

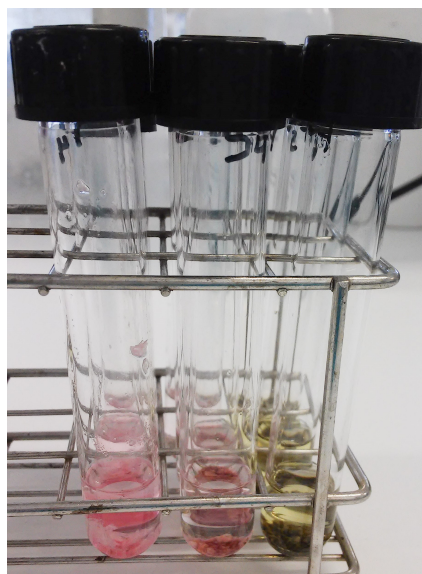
A análise do perfil de ácidos gordos do presente trabalho, recorreu à transmetilação direta, de acordo com um procedimento adaptado de Fernández et. al. (2015). Esta determinação foi realizada em triplicado e os ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME's) foram obtidos por transmetilação direta a partir de amostras liofilizadas e trituradas da polpa, folhas e sementes da camarinha (Figura 13), sob catálise ácida, onde em tubos de vidro com rosca, 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2% (v/v) em metanol foram adicionados a 50 mg das amostras liofilizadas (Figura 14). Posteriormente, os tubos foram devidamente fechados e submetidos a banho-maria (Mammert), durante 2 horas, a 80°C. Após o arrefecimento até a temperatura ambiente, adicionou-se a cada tubo 1 mL de

água MiliQ e 2 ml de n-hexano. Em seguida, a mistura resultante foi agitada em vortex durante 1 minuto e posteriormente centrifugada (Eppendorf Centrifuge – 5810 R) a 1000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, o sobrenadante ou fase n-hexano contendo os esteres metílicos de ácidos gordos (FAMES) foi cuidadosamente transferido para *vials* de cromatografia gasosa (Figura 15).

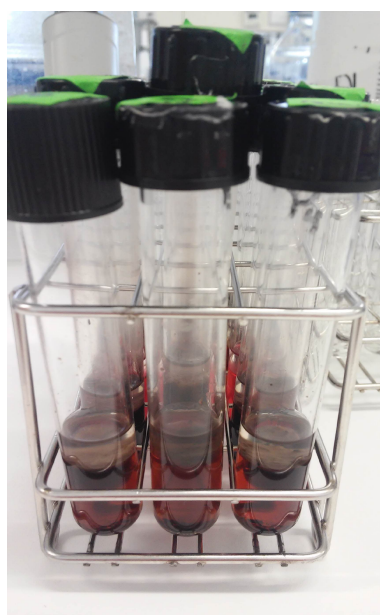
A análise dos FAME's foi realizada em cromatógrafo gasoso (GC) Finnigan Ultra Trace, equipado com coluna capilar Thermo TR-FAME (60 m x 0,25 mm ID, 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura da membrana), um *auto sampler* AS 3000 (Thermo Electron Corporation) e um detetor de ionização de chama (FID), conforme estabelecido por Silva et. al. (2017). As temperaturas do detetor e do injetor (modo *splitless*) foram programadas para 250 °C e 280°C, na devida ordem. Para a coluna, a temperatura foi programada para um valor inicial de 100°C durante 1 minuto, aumentando 10°C  $\text{min}^{-1}$  até atingir 160°C, sendo esta temperatura mantida por 10 minutos. O gás de arraste utilizado foi o hélio (1,2  $\text{ml min}^{-1}$ ). Ar sintético e hidrogênio foram utilizados para a chama do detetor, com fluxo de 350 e 35  $\text{ml min}^{-1}$ , nesta respectiva ordem. Para a aquisição e análise de dados, como tempos de retenção, áreas de pico e integração, assim como para controlar o instrumento, foi utilizado o *software* Xcalibur (Thermo Fisher Scientific).



**Figura 13.** Amostras liofilizadas das folhas, polpa e sementes de camarinha.



**Figura 14.** Amostras de polpa, sementes e folhas de camarinha sob catálise ácida (2 mL de  $H_2SO_4$  a 2% (v/v) em metanol).



**Figura 15.** Amostras após 5 minutos de centrifugação a 1000 rpm, com sobrenadante contendo os esteres metílicos de ácidos gordos (FAME's).

A identificação dos picos cromatográficos (Anexo 1), foi realizada através da comparação do tempo de retenção dos picos das amostras com o padrão Supelco FAME Mix C8 – C24.

A determinação do perfil dos ácidos gordos foi realizada atribuindo-se que a fração correspondente a um determinado ácido gordo é a razão entre a respetiva área do pico e a área total dos picos, representados em percentagem.

## 2.3. Atividade Antioxidante

O *stress* oxidativo leva à formação de radicais livres, que são extremamente perigosos para os organismos vivos, causando doenças prejudiciais, incluindo doenças cardiovasculares, cancro e diabetes (Valko et al., 2007). Pelo contrário, os antioxidantes são ferramentas úteis para prevenir os efeitos indesejáveis dos radicais livres e levar a uma redução do risco de algumas doenças agudas crónicas relacionadas com o estado redox do corpo humano (Bardakci et al., 2019).

A determinação da capacidade antioxidante do fruto no presente trabalho constituiu-se na quantificação dos compostos fenólicos totais via Método Folin-Ciocalteu e na avaliação da capacidade antioxidante através dos Métodos ABTS (ácido 2,2-azinobis (3 etilbenzotiazolina-6-sulfónico)); DPPH (2,2-difenil-1 picrilhidrazil) e FRAP (*ferric reducing antioxidant power*). As análises foram efetuadas no fruto inteiro, folhas, flores, sumo, polpa desidratada e semente desidratada.

### 2.3.1. Extração dos Compostos Fenólicos

A análise dos compostos fenólicos foi efetuada em extratos de fruto inteiro, folhas, flores, sumo e polpa desidratada de camarinha. O solvente utilizado para o procedimento foi a acetona, onde de acordo com estudos conduzidos por Alothman, Bhat & Karim (2009) e Fonseca, Santos & Cunha (2015), o solvente acetona mostrou-se mais eficiente no processo de extração dos compostos fenólicos.

Para a extração dos compostos fenólicos do fruto inteiro, estes primeiramente foram higienizados com água destilada. Em seguida, os frutos foram triturados por pressão manual mecânica, com auxílio de almofariz com pilão. A extração foi realizada na proporção 1:10 (1,5 g de amostra em 15 ml de solvente acetona 70% v/v). Para tanto, pesou-se cerca de 1,5 g da amostra do fruto triturado. Posteriormente a amostra (1,5 g) foi colocada em frasco de vidro rolhado com 15 ml de acetona 70% v/v e levada a agitador magnético por 2 horas a 9000 rpm. Após este período, o conteúdo foi filtrado (papel filtro 90 mm de diâmetro – Xinxing 202 moderate) para tubos de ensaio e mantidos a uma

temperatura de aproximadamente -20°C. Este procedimento foi realizado em duplicado.

Retativamente às folhas, após devida higienização com água destilada, as folhas foram cortadas em porções pequenas com auxílio de uma tesoura. A extração foi realizada na proporção 1:10 (1,5 g de amostra em 15 ml de solvente acetona 70%v/v), tendo-se pesado cerca de 1,5 g das amostras já higienizadas e cortadas. Posteriormente a amostra (1,5 g) foi colocada em frasco de vidro rolhado com 15 ml de acetona 70% v/v e levada a agitador magnético por 2 horas a 9000 rpm. Em seguida, o conteúdo foi filtrado (papel filtro 90 mm de diâmetro – xinxing 202 moderate) para tubos de ensaio e mantidos a uma temperatura de aproximadamente -20°C. Este procedimento foi realizado em duplicado.

Para a extração dos compostos fenólicos das flores de camarinha, estas foram inicialmente higienizadas com água destilada. Após secagem, as flores foram cuidadosamente retiradas do caule com auxílio de uma pinça. Em seguida, pesou-se cerca de 0,36 g das amostras e foram transferidas para frasco de vidro rolhado, onde se adicionou 10 ml de acetona 70% v/v. Posteriormente o conteúdo foi levado a agitador magnético por 2 horas a 9000 rpm. Após este período, o conteúdo foi filtrado (papel filtro 90 mm diâmetro – Xinxing 202 moderate) para tubos de ensaio e mantidos a uma temperatura de aproximadamente -20°C.

Em relação ao sumo, este foi extraído do fruto por pressão manual mecânica com auxílio de almofariz com pilão. A extração foi realizada na proporção 1:2 (7 ml de sumo em 7 ml de solvente acetona 70 % v/v). Em seguida, o conteúdo foi levado a agitação magnética por 2 horas a 9000 rpm. O conteúdo foi então filtrado (papel fitro 90 mm de diâmetro – Xinxing 202 moderate) para tubos de ensaio e mantidos a uma temperatura de aproximadamente -20°C.

Relativamente à polpa e sementes desidratadas, inicialmente foram separadas manualmente, as sementes da polpa, com recurso de duas pinças. Em seguida, as amostras foram devidamente pesadas e tranferidas para cápsulas, as quais foram previamente mantidas em estufa (Heraeus modelo D-6450 Hanau) para remoção da humidade (70°C, 1 hora). As cápsulas contendo as amostras de polpa e sementes foram levadas à estufa (Heraeus modelo D-6450 Hanau) onde permaneceram durante 20 h a 70°C para a completa remoção da humidade da

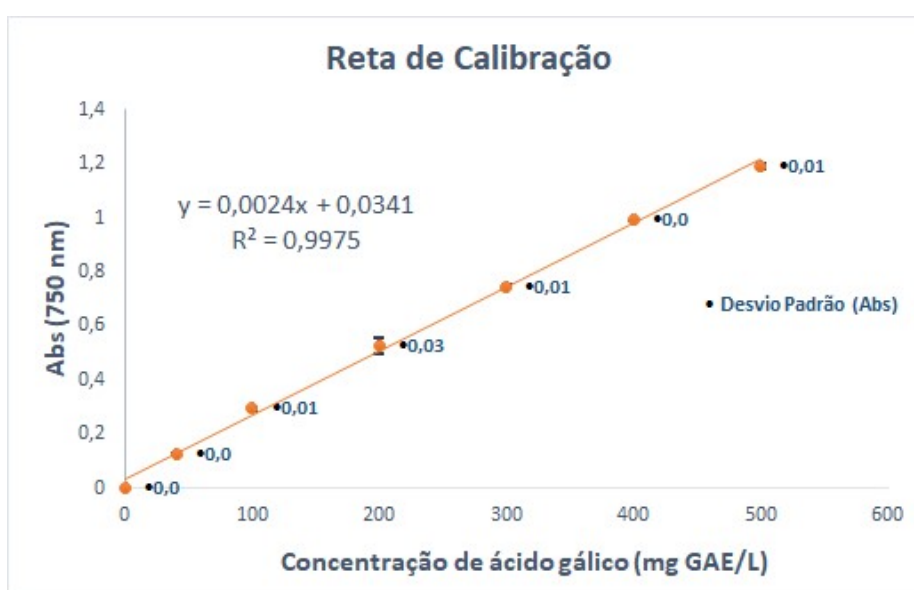
polpa e das sementes. Após este período, as amostras desidratadas foram devidamente pesadas para a realização do método de extração. Para as amostras de polpa já desidratadas, foram pesadas aproximadamente 0,45 g (peso final após desidratação) e transferidas para um frasco de vidro rolhado, onde se adicionaram 10 ml de acetona 70% v/v e foi levado à agitação magnética por 2 horas a 9000 rpm. Posteriormente, procedeu-se a filtração (papel filtro 90 mm de diâmetro – Xinxing 202 moderate) para tubos de ensaio e o armazenamento sob refrigeração a -20°C. Em relação às sementes desidratadas, foram pesadas cerca de 0,8 g da amostra (peso final após desidratação) e foram transferidas para um frasco de vidro rolhado. Adicionou-se então 10 ml de acetona 70% v/v e o conteúdo foi levado à agitação magnética por 2 horas a 9000 rpm. Em seguida, foi realizada a filtração (papel filtro 90 mm de diâmetro) para tubos de ensaio e o armazenamento sob refrigeração a -20°C. Este procedimento foi realizado em duplicado. Para a quantificação dos compostos fenólicos totais (*Folin-Ciocalteu*), assim como para a determinação da capacidade antioxidante (ABTS e DPPH), para os extratos do fruto inteiro, folhas, flores, sumo e polpa desidratada foi realizada nova diluição (1:10) em duplicado. Para o método FRAP, foram utilizados os extratos iniciais.

### 2.3.2. Quantificação dos Compostos Fenólicos Totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada via método *Folin-Ciocalteu* (Singleton & Rossi, 1965). Este é um método colorimétrico reconhecido e amplamente utilizado para quantificar compostos fenólicos totais em vários extratos, permitindo a análise de compostos orgânicos que possuem anéis aromáticos hidroxilados. Os compostos fenólicos reagem ao reagente *Folin-Ciocalteu* (fosfomolibdato e fosfotungstato), resultando em coloração azul que pode ser determinada espectrofotometricamente a 750 nm (Vázquez et al., 2015).

O método *Folin-Ciocalteu* utilizado na presente investigação foi realizado de acordo com o procedimento de Giao et al. (2007). Em tubos de ensaio, foram pipetados 0,250 ml de cada extrato e adicionado 0,250 ml do reagente *Folin-Ciocalteu*. Após homogeneização, juntou-se 5 ml de uma solução de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e em seguida 7 ml de água destilada. Agitou-se e os tubos de ensaio foram incubados a temperatura ambiente por 60 minutos. Após este

período, foram lidas as absorvâncias das misturas reaccionais em espectrofotometro Varian Cary 50 Scan UV Visible ao comprimento de onda de 750 nm. A determinação dos compostos fenólicos do presente estudo foi realizada em duplicado. A amostra controlo foi realizada considerando-se o mesmo procedimento, apenas substituindo 0,250 mL de extrato por 0,250 mL de água destilada MilliQ. Foi preparada uma reta de calibração (Figura 16), utilizando ácido gálico como composto padrão. A análise foi realizada em duplicado. A quantificação dos compostos fenólicos foi expressa em miligramas de equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de amostra (mg GAE/100g).



**Figura 16.** Reta de calibração do ácido gálico para quantificação de compostos fenólicos totais pelo método *Folin – Ciocalteu*.

A quantificação dos compostos fenólicos totais é calculada através da equação 11, correspondente à reta de calibração (Figura 16).

$$C = \frac{\text{Abs} - (0,0341)}{0,0024}$$

Equação 11

Onde Abs representa a absorvância de cada amostra a 750 nm.

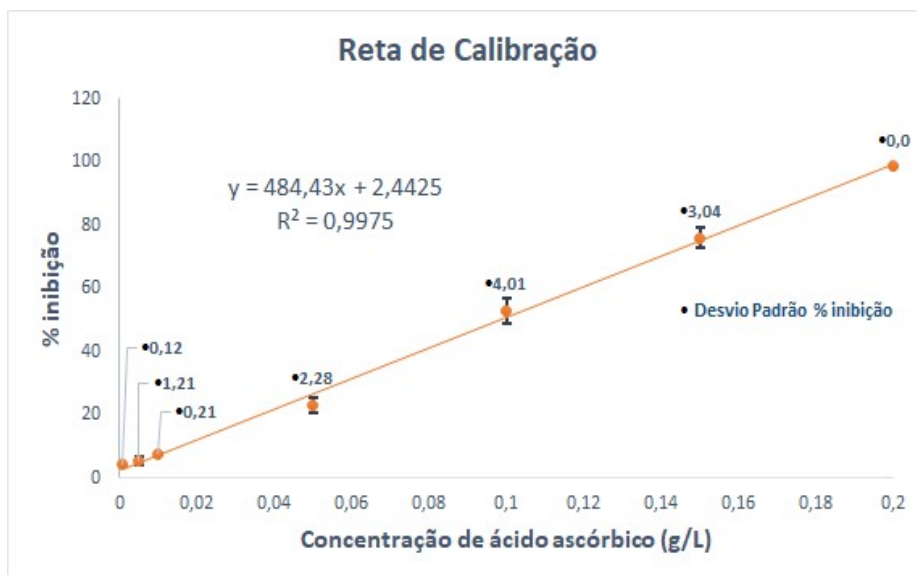
### 2.3.3. Capacidade de redução do radical ABTS

A avaliação da capacidade antioxidante de cada um dos extratos, utilizou como método o ensaio ABTS (ácido 2,2-azinobis (3 etilbenzotiazolina-6-sulfônico)). O ensaio ABTS determina a capacidade de eliminação da atividade antioxidante, reagindo com um forte agente atioxidante (permanganato de potássio ou persulfato de potássio) na presença de sal ABTS, sendo este ensaio uma abordagem mais simples e frequente baseada da inibição da formação de ABTS por oxidantes de um elétron. A percentagem de inibição é expressa utilizando valores de concentrações eficazes ( $CE_{50}$ ), que são relatados como a quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de radicais sequestrantes em 50% (Sridhar & Charles, 2019).

O método utilizado no presente estudo foi adaptado de acordo com estudo conduzido por Giau et al.(2007). Inicialmente, foi necessário realizar a preparação da solução concentrada de ABTS. Foi preparada uma solução de 10 ml de ABTS 7 mmol/L (0,03841g) e uma solução de 10 ml de persulfato de potássio ( $K_2O_2S_8$ ) 2,45 mmol/L (0,0066g). Posteriormente, em tubo de vidro, juntou-se o volume da solução de persulfato ao volume de solução de ABTS, deixando a solução agir por um período mínimo de 16 horas, protegido da luz e ar e à temperatura ambiente. Após este período, em frasco protegido da luz, aproximadamente 2 mL do ABTS concentrado foi filtrado através de seringa com filtro (0,22  $\mu$ m) e juntou-se 200 mL de água ultrapura. Esperou-se cerca de 15 minutos até o conteúdo do frasco (ABTS diluído) estabilizar. O objetivo da diluição foi a obtenção de uma solução com valores de absorvância de  $0,700 \pm 0,020$ , lidas ao comprimento de onda de 734 nm.

Para a realização da análise, em cuvetes descartáveis (Brand standard – PMMA semi-micro) foi adicionado 1 mL da solução diluída de ABTS e 20  $\mu$ L de extrato. Para evitar o contacto com oxigênio ( $O_2$ ), colocou-se Parafilm® em cada cuvete e homogenizou-se a solução manualmente. A reacção decorreu durante 6 minutos e após este intervalo foi realizada a leitura das soluções em espectrofotômetro Varian Cary 50 Scan UV Visible ao comprimento de onda de 734 nm. A amostra controlo foi submetida ao mesmo procedimento, apenas substituindo-se o extrato por água ultrapura MilliQ. O composto padrão utilizado, o

ácido ascórbico foi usado para preparar a reta de calibração (Figura 17). Os resultados correspondentes à atividade antioxidante foram expressos em mg VCEAC/100g de amostra (VCEAC: Equivalente em Vitamina C). Esta determinação foi realizada em triplicado com triplicado de cada extrato.



**Figura 17.** Reta de calibração do ácido ascórbico para a determinação da capacidade antioxidante pelo método ABTS.

A obtenção dos valores da capacidade antioxidante de cada extrato (Equação 13), necessita de calcular primeiramente a percentagem de inibição (PI) (Equação 12).

$$PI = \frac{Abs\ r - Abs\ a}{Abs\ r} \times 100$$

Equação 12

Onde Abs r representa a absorvância inicial da solução de ABTS e Abs a representa a absorvância da solução após 6 minutos.

$$C = \frac{PI - 2,4425}{484,43}$$

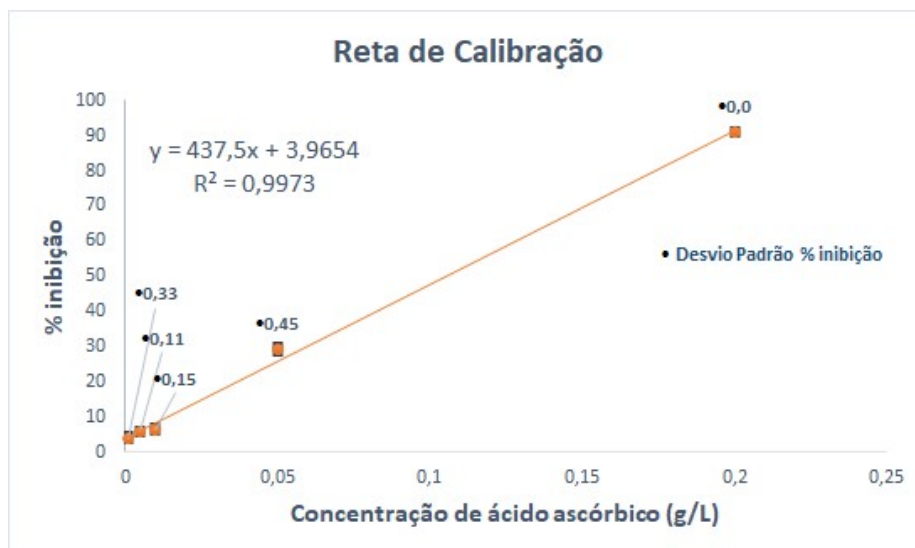
Equação 13

### 2.3.4. Determinação da capacidade antioxidante pelo Método DPPH

Para a realização do estudo de remoção do radical DPPH, a análise foi realizada conforme procedimento descrito por Brand-Williams, Cuvelier & Berset (1995). Entre todos os métodos utilizados para determinação da capacidade antioxidante, o DPPH é considerado um dos ensaios mais populares dada a sua facilidade, baixo custo e eficiência (Kandi & Charles, 2019). O radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) exibe uma forte cor púrpura que muda para amarelo após reação com espécies antioxidantes e é comumente usado para a determinação da capacidade antioxidante de compostos bioativos em diferentes amostras (Braham et al., 2019).

Inicialmente, uma solução de DPPH com 0,0039g (0,0099 mmol) em 100mL (0,099 mM) de acetona 70% v/v foi preparada, para que a absorvância se situasse na gama de absorvância de  $0,500 \pm 0,040$ , correspondente à solução controlo. Posteriormente, 3,9 ml da solução de DPPH diluída foi adicionada a 0,100 ml (100  $\mu$ L) de cada extrato, em tubos de vidro rolhados. Em seguida, o conteúdo foi agitado em *vortex*, permanecendo em repouso no escuro à temperatura ambiente durante 30 minutos. A absorvância foi lida ao comprimento de onda de 515 nm, onde se utilizou como amostra controlo acetona a 70% v/v e amostra controlo de solução de DPPH diluído (absorvância:  $0,500 \pm 0,040$ ). As análises de cada amostra foram realizadas em duplicado com repetição das réplicas.

O resultado final foi expresso em concentração equivalente de ascórbico (mg VCEAC/g), utilizando reta de calibração, conforme Figura 18. O cálculo do VCEAC de cada composto considerou a equação da reta de calibração da vitamina C, segundo a equação  $y=4,375 + 3,9654$



**Figura 18.** Reta de calibração do ácido ascórbico para a determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH.

### 2.3.5. Determinação da capacidade antioxidante pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)

Para a realização da presente análise, o método foi aplicado de acordo com estudo conduzido por Rufino et al. (2006). O ensaio do poder antioxidante redutor férrico (FRAP), baseia-se na capacidade dos antioxidantes em reduzir o ferro férrico (III) a ferro ferroso (II). A reação é subsequentemente monitorizada pela interação com o composto corante 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), que forma uma cor azul violeta monitorizada pela absorvância a 593 nm. O ensaio FRAP demonstrou ser aplicável a uma ampla gama de compostos antioxidantes, no entanto, sua taxa de reação e rendimento final podem variar para cada composto antioxidante (Jones et al., 2017).

Inicialmente procedeu-se à preparação das soluções de HCl 40 mM; TPTZ 10 mM; cloreto férrico 20 mM; tampão acetato 0,3 M, pH 3,6; solução do reagente FRAP e solução padrão de sulfato ferroso 2 mM, conforme Rufino et al. (2006).

A solução de TPTZ foi preparada dissolvendo-se 3,12 g de TPTZ (0,01 mol) em 5,0 mL de HCl 40 mM e completou-se o volume para 1,0 L em balão volumétrico, com HCl 40 mM. Em seguida realizou-se a homogeneização e o conteúdo foi transferido para um frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado, e o mesmo foi armazenado sob refrigeração, por um período máximo de um mês.

O reagente FRAP foi obtido a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL de solução de TPTZ 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM, o qual foi utilizado imediatamente após sua preparação.

Para a referida análise, em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 90 µL de cada extrato para tubos de ensaio. Posteriormente, acrescentou-se 270 µL de água destilada e misturou-se com 2,7 mL do reagente FRAP. Em seguida, procedeu-se à homogeneização em agitador de tubos, os quais foram mantidos em banho-maria a 37°C durante 30 minutos. Após este período realizou-se as leituras ao comprimento de onda de 595 nm. O reagente FRAP foi utilizado como amostra referência para as leituras no espectrofotômetro. A análise foi realizada em duplicado.

A curva de calibração (Figura 19) foi realizada a partir da solução padrão de sulfato ferroso (2000 µM), onde se dissolveu 27,8 mg de sulfato ferroso em água destilada, com aferição do volume para 50 mL de água destilada em balão volumétrico. Em seguida o preparado foi homogeneizado e transferido para um frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado, sendo esta solução utilizada apenas no dia da análise. A solução padrão de sulfato ferroso (2000 µM) foi preparada em balões volumétricos de 10 mL, variando as concentrações de 200 µM a 1500 µM. O procedimento realizado foi o mesmo que para com os extratos, apenas substituindo-se 90 µL de cada extrato por 90 µL de cada solução de sulfato ferroso.

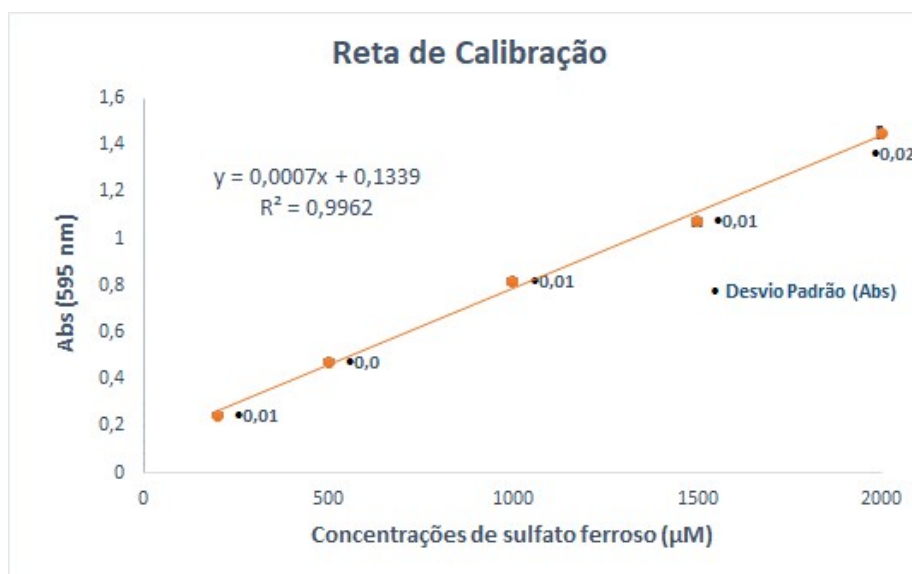
Para calcular a atividade antioxidante, substituiu-se na equação da reta a absorvância equivalente a 1000 µM do padrão sulfato ferroso. O valor obtido para o termo C (concentração) (Equação 14), corresponde à diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1000 µM de sulfato ferroso.

$$C = \frac{\text{Abs} - 0,1339}{0,0007}$$

Equação 14

Onde Abs corresponde à absorvância correspondente a 1000  $\mu\text{M}$  de sulfato ferroso e C (concentração) corresponde à diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1000  $\mu\text{M}$ .

A partir do resultado encontrado (x) na equação 14, este foi dividido por 1000 para ter o valor em gramas. Sequencialmente, foi efetuada uma nova divisão por 1000 para encontrar o resultado final (z), onde  $z = (x / 1000 \times 1) / 1000$ . Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  sulfato ferroso/g de amostra.



**Figura 19.** Reta de calibração do sulfato ferroso para a determinação da capacidade antioxidante pelo método FRAP.

## 2.4. Atividade antibacteriana

A determinação da atividade antibacteriana foi realizada em extratos de polpa e sementes da camarinha *in natura*, em acetona 70% (v/v). A avaliação foi efetuada *in vitro*, pelo método de difusão em disco, e estudado o seu efeito sobre diferentes estirpes bacterianas. A execução desta análise foi realizada nas dependências laboratoriais do MARE-IPLeia - Marine and Environmental Sciences Centre.

### 2.4.1. Preparação dos extratos

A extração foi realizada em 1,0 g de amostra de polpa e sementes de camarinha, previamente pesadas em balança analítica Sartorius. Estas foram

trituras, por pressão manual mecânica, com recurso a almofariz com pilão. Sequencialmente, as amostras foram colocadas em frasco de vidro graduado, onde foi adicionado 10 mL de solvente acetona 70% v/v e posteriormente levadas a agitador magnético P selecta, modelo Agimatic-N, onde permaneceram por 1 hora a 7000 rpm. Após a agitação magnética, os extratos foram transferidos para tubos de 15 mL e submetidos a centrifugação, em centrífuga Eppendorf modelo 5810 R, a 14000 rpm por 15 minutos.

Na sequência da centrifugação, o conteúdo dos tubos foi transferido para balões de fundo redondo, devidamente pesados e colocados individualmente em rotavapor, para evaporação do solvente. Após a evaporação do solvente, os balões foram pesados e foi preparado um extrato com acetona (70% v/v) na concentração de 100mg/mL.

#### **2.4.2. Estirpes bacterianas**

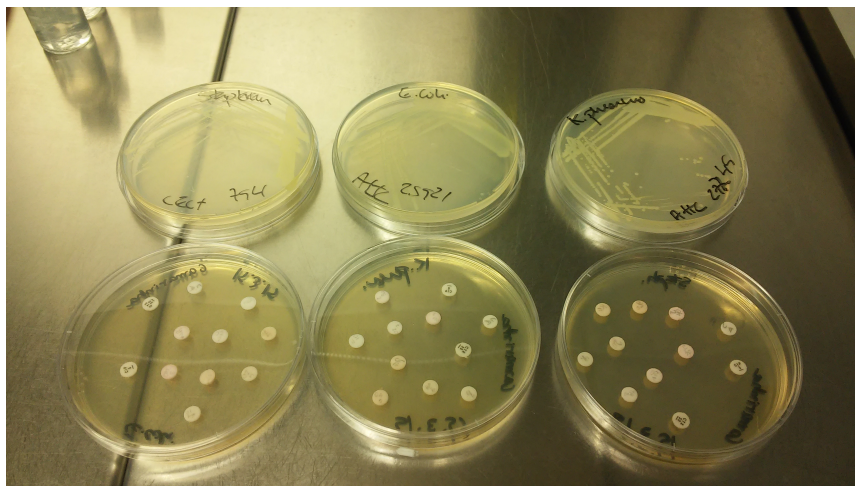
A atividade antibacteriana dos extratos da polpa e sementes da camarinha foi testada individualmente perante três estirpes de bactérias, sendo duas Gram negativas (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) e uma Gram positiva (*Staphylococcus aureus*).

#### **2.4.3. Método de Difusão em Disco**

A atividade antibacteriana foi determinada recorrendo ao método de difusão em disco. Nestes ensaios, utilizou-se o meio Agar Mueller-Hinton (MHA), preparado de acordo com as indicações do fornecedor, sendo este previamente esterilizado a 121°C por 15 minutos.

Na sequência da esterilização, foram vertidos cerca de 15ml de meio agar em placas de Petri esterilizadas de forma a obter uma camada base. Posteriormente, com auxílio de uma ansa esterilizada, preparou-se uma suspensão bacteriana em NaCl 0,85% m/v até se atingir uma densidade ótica correspondente à turbidez padrão de 0,5 na escala Mcfarland ( $1,5 \times 10^8$  ufc/mL). Após verificação da solidificação da camada base, realizou-se o espalhamento de 1 mL de cada inóculo, por toda superfície de Muller-Hinton Agar (MHA), com auxílio de uma zaragatoa estéril. Em seguida, foram colocados os discos de papel

de filtro qualitativo, com 8 mm de diâmetro, esterilizados e devidamente identificados, mantendo-se uma distância equitativa entre cada um dos discos, sobre a superfície do agar inoculado, conforme Figura 20.



**Figura 20.** Disposição dos discos sobre a superfície de Muller-Hinton Agar (MHA) inoculado

Para avaliar a atividade antibacteriana dos extratos da polpa e sementes da camarinha, foram utilizadas quatro quantidades diferentes dos respectivos extratos (1 mg, 2 mg, 3 mg e 4 mg) em cada disco. Para eliminar o possível efeito do solvente acetona na atividade antibacteriana dos extratos, esta foi utilizada como controlo negativo. Foram utilizados os antibióticos ciprofloxacina 5 µg (CIP 5) e cefotaxima 30 µg (CTX 30) como controlo positivo.

As placas de Petri foram incubadas a uma temperatura de 37°C por 24 horas, sendo que, após o período de incubação, as placas foram observadas de modo a verificar a existência de halos de inibição do crescimento bacteriano. A avaliação do crescimento nas respetivas placas foi realizada por meio de leituras visuais, procedendo-se a comparação com os controlos negativo (solvente) e positivo (antibióticos), assim como a medição dos halos desenvolvidos.

De forma a comprovar a esterilidade do meio Muller-Hinton Agar (MHA), foram mantidas duas placas de Petri sem inóculo nas mesmas condições do ensaio durante o mesmo período de tempo. Foram também mantidas, nas mesmas condições, três placas de Petri inoculadas com cada uma das estirpes,

por espalhamento, de forma a verificar a capacidade reprodutiva das estirpes bacterianas.

## 2.5. Teste de Viabilidade Celular

O presente ensaio teve como principal finalidade avaliar a resposta da viabilidade das células ao efeito do sumo da camarinha. O teste foi realizado via ensaio MTT, conforme as indicações descritas no Kit nº 11465001 – Sigma aldrich, em culturas celulares tumorais CACO – 2 do adenocarcinoma coloretal humano da European Collection of Cell Cultures (ECACC, UK).

A linha celular CACO – 2 foi estabelecida por Fogh; Orfeo (1977), a partir de um adenocarcinoma coloretal humano e, originalmente usadas para triagem de efeitos citotóxicos de drogas antitumorais, assim como para estudos de mecanismos de resistência a medicamentos (Fogh; Orfeo, 1977). Somente mais tarde foi demonstrado que as células CACO – 2, mantidas em culturas de longo prazo, sofrem diferenciação morfológica e funcional (Levy et al., 1989). Além de exibirem numerosas atividades metabólicas (enzimas metabólicas e transportadores), as células CACO – 2 apresentam uma melhor diferenciação enterocítica morfológica e funcional do que outras linhas celulares do adenocarcinoma de cólon e, apesar de algumas limitações decorrentes da sua origem tumoral, são consideradas o melhor modelo *in vitro* do intestino delgado (Zucco F. et.al., 2006).

O MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolio]) é um sal de tetrazolio amarelo, solúvel em água, para testar a viabilidade celular e a triagem de micotoxinas em larga escala (Lü et al., 2012). Testes baseados em tetrazolio, como o ensaio MTT, medem a viabilidade celular em termos da capacidade de células metabolicamente ativas de reduzir o sal amarelo de tetrazolio em cristais de formazan púrpura que podem ser solubilizados e quantificados espectrofotometricamente (Gomez Perez et al., 2017). Estudos anteriores mostraram que o MTT é absorvido pelas células através de endocitose e reduzido à formazan nos compartimentos endossomais e lisossomais, onde é então transportado para a superfície celular através de exocitose. Assim, a

quantidade de formazan formado pode ser usada para refletir o potencial redutivo das células e sua viabilidade (Liu et al., 1997).

O procedimento desenvolvido no presente estudo foi adaptado conforme método realizado por Nunes et al., (2014). A execução deste ensaio ocorreu em parceria com investigadores do Centro de Química da Universidade de Coimbra.

### **2.5.1. Preparação das amostras**

A obtenção do sumo da camarinha foi realizada por pressão manual mecânica, com recurso a almofariz com pilão, em seguida efetuada a filtração simples em papel de filtro qualitativo 90 mm de diâmetro. O extrato foi congelado a uma temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, realizou-se a liofilização do sumo em liofilizador Kinetics Ez – Dry, modelo EZ550R, acoplado a bomba de vácuo Edwards 12, em temperatura constante de  $-42\text{ }^{\circ}\text{C}$  e pressão de 100 mT.

Foram preparadas 5 amostras de extrato a 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0 % m/v com a finalidade de testar diferentes concentrações, sendo que a amostra liofilizada foi ressuspensa em meio de cultura DNEM, dependendo de cada concentração.

### **2.5.2. Ensaio MTT**

O levantamento das células com solução a 2,5% (m/V) de tripsina EDTA (10x solution, Sigma – Aldrich) foi efetuado após 7 dias de desenvolvimento celular. Em câmara de contagem de Neubauer e com recurso ao corante Azul de Tripán, efetuou-se a contagem das células. Posteriormente, realizou-se o plaqueamento das células em placas de 96 poços, com uma densidade de  $1 \times 10^4$  células/poço em 300  $\mu\text{l}$  de meio e em seguida incubou-se em uma incubadora de  $\text{CO}_2$  (Thermo Scientific BB15) com 5% de  $\text{CO}_2$ , 95% de humidade e uma temperatura constante de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 dias - condições necessárias para que se atingisse a confluência celular total, com renovação de meio de cultura ao fim de 3 dias.

Em seguida ao período de incubação, o meio foi retirado das placas e devidamente substituído pelas amostras de extrato de camarinha, anteriormente preparadas e diluídas em meio, às diferentes concentrações testadas conforme

secção 2.5.1. Posteriormente as placas foram colocadas na incubadora por um período de aproximadamente 6 horas e em seguida o meio e o extrato das placas foram removidos e lavados com solução de lavagem - tampão PBS (*phosphate buffer saline*). Sequencialmente foram adicionados 50 µl/poço de solução 0,5 mg/ml MTT previamente preparada. Novamente procedeu-se à incubação das placas durante aproximadamente 3 horas, sendo que após este tempo foi possível verificar a formação de cristais sujeitos à solubilização, para efeito de quantificação.

Com recurso a um leitor de placas Elisa (Bio Tek), as soluções resultantes foram quantificadas em espectrofotometro a comprimento de onda de 570 nm, para cálculo de viabilidade celular, de acordo com a equação 15. Como método de controlo foram utilizadas amostras que correspondiam a poços contendo apenas o meio DNEM. O presente ensaio foi realizado em duplicado, com quaduplicados de cada concentração.

$$\text{Viabilidade celular (\% do controlo)} = \frac{\text{Absorvância da amostra a testar}}{\text{Absorvância do controlo}} \times 100$$

Equação 15

## 2.6. Ressonância magnética nuclear

As amostras analisadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram preparadas por diluição direta da solução dos extratos com água deuterada D<sub>2</sub>O 10% (v/v), para um volume final de 500 µL. Os espectros 1D 1H RMN foram adquiridos a 25 °C num espectrómetro Bruker Avance III 400 MHz, utilizando a sequência de impulso zgpr. Foi adquirida uma janela espectral de 6402 Hz com um total de 512 scans e um tempo de relaxação de 2 s, foi utilizado também o método de presaturação para supressão do sinal de solvente.

## 2.7. Tratamento de Dados e Análise Estatística

Os resultados realizados no presente estudo foram submetidos a análise recorrendo ao programa Microsoft Excel 2016. Para efeito de tratamento dos dados obtidos, apresenta-se média ± desvio padrão. As retas de calibração e

correção foram determinadas por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1 Caracterização Físico-Química

#### 3.1.1. Características Biométricas

Os resultados relativos às características biométricas das camarinhas, encontram-se representados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Resultados das características biométricas das camarinhas.

Características Biométricas	Resultados (média ± desvio padrão)
Altura (mm)	8,81 ± 0,61
Diâmetro (mm)	8,93 ± 0,64
Calibre (cm)	0,89 ± 0,89
Volume (cm <sup>3</sup> )	2,92 ± 0,30
Peso Médio (g)	0,40 ± 0,06

Relativamente à altura, o resultado obtido no presente estudo (8,81 mm ± 0,61) foi semelhante aos valores encontrados por Calviño-Cancela (2005) (8,20 mm ± 0,02), Larrinaga (2010) (8,16 mm), sendo que o resultado que mais se aproximou, foi do estudo conduzido por Andrade, Gonçalves & Guiné (2017) (8,63 mm ± 0,84). A compilação destes resultados está descrita na Tabela 3.

**Tabela 3.** Resultados referentes à altura da camarinha obtidos em diferentes estudos.

Estudos	Altura (média ± desvio padrão)
Presente trabalho	8,81 ± 0,61
Calviño-Cancela (2005)	8,20 ± 0,02
Larrinaga (2010)*	8,16
Andrade; Gonçalves; PF Guiné (2017)	8,63 ± 0,84

\* Não há valores obtidos para desvio padrão

No que diz respeito ao valor médio do diâmetro, o valor obtido no presente estudo ( $8,93 \text{ mm} \pm 0,64$ ) foi semelhante aos valores obtidos por Calviño-Cancela (2004) ( $9,0 \text{ mm} \pm 0,1$ ) e Calviño-Cancela (2005) ( $9,10 \text{ mm} \pm 0,02$ ) e ligeiramente superior ao intervalo encontrado por Bras de Oliveira & Dale (2012) (5 a 8 mm). Os resultados dos estudos conduzidos por Larrinaga (2010) (9,54 mm) e Andrade, Gonçalves & Guiné (2017) ( $9,43 \text{ mm} \pm 0,74$ ) apresentaram valores ligeiramente superiores ao resultado obtido no presente estudo. A compilação destes resultados está descrita na Tabela 4.

**Tabela 4.** Resultados referentes ao diâmetro da camarinha obtidos em diferentes estudos.

<b>Estudos</b>	<b>Diâmetro (média <math>\pm</math> desvio padrão)</b>
Presente trabalho	$8,93 \pm 0,64$
Calviño-Cancela (2004)	$9,0 \pm 0,1$
Calviño-Cancela (2005)	$9,1 \pm 0,02$
Larrinaga (2010)*	9,54
Bras de Oliveira; Dale (2012)*	5 à 8
Andrade; Gonçalves; PF Guiné (2017)	$9,43 \pm 0,74$

\* Não há valores obtidos para desvio padrão

Em relação ao calibre, o resultado do presente estudo ( $0,89 \text{ cm} \pm 0,06$ ) foi praticamente idêntico ao encontrado por Andrade, Gonçalves & Guiné (2017) ( $0,90 \text{ cm} \pm 0,06$ ). Relativamente ao volume, o valor obtido no presente estudo ( $2,92 \text{ cm}^3 \pm 0,30$ ) foi superior ao obtido por Andrade, Gonçalves & PF Guiné (2017) ( $0,39 \text{ cm}^3 \pm 0,09$ ) em frutos recolhidos de arbustos dunares em diferentes pontos da Praia de Mira.

Relativamente ao peso médio do fruto obtido no presente estudo ( $0,41 \text{ g} \pm 0,06$ ) foi similar ao intervalo encontrado em estudo conduzido por Bras de Oliveira & Dale (2012) (0,30 a 0,50 g) com frutos recolhidos em 7 localizações diferentes, distribuídas de Sines à Aveiro, sendo que, para os frutos recolhidos na mesma região do presente estudo (São Pedro de Moel), o resultado foi semelhante ( $0,49 \text{ g} \pm 0,06$ ). O resultado obtido por Andrade, Gonçalves & PF Guiné (2017) ( $0,66 \text{ g} \pm 0,11$ ) foi ligeiramente superior em relação ao presente estudo.

Os resultados das características biométricas verificados nos estudos descritos anteriormente, apresentaram-se, de uma forma geral, semelhantes aos resultados do estudo presente. A maior diferença encontrada foi referente ao volume, sendo que esta pode estar relacionada às diferentes regiões em que os frutos foram recolhidos, visto que, as características edafoclimáticas de cada região influenciam diretamente nos parâmetros físicos, assim como o grau de maturação e a forma como a amostra foi selecionada também interferem neste tipo de caracterização.

### **3.1.2. Determinação da Parte Edível**

No presente estudo foi calculado o teor da parte edível do fruto fresco (%), sendo que, considerou-se que todo fruto é consumido, com exceção das sementes.

A partir do resultado desta análise ( $83,98 \% \pm 1,15$ ) é possível inferir que, a edibilidade do fruto fresco é elevada, porém, por ser uma baga de dimensões reduzidas e a alta proporção das sementes (54,94% do peso seco) (León-González et.al., 2013), pode interferir de forma negativa na adesão à compra para possíveis comercializações.

### **3.1.3. Determinação de Humidade**

Para esta análise foi realizada a desidratação do fruto, de forma a garantir a eliminação total do teor de água. As amostras foram colocadas em estufa onde permaneceram à temperatura constante de 60°C por 72 horas. Devido à camarinha ser um fruto com elevado teor de água, a partir do resultado encontrado, foi possível confirmar o elevado teor de humidade.

O resultado do teor de humidade obtido neste estudo foi de  $81,68 \% \pm 0,45$ , sendo este semelhante ao encontrado por León-González et.al. (2013) (83,41%) e superior ao resultado referenciado por Clavijo et. al. (2003) (75%). O estudo conduzido por Andrade, Gonçalves & PF Guiné (2017) revelou um teor de humidade superior ( $87,89\% \pm 1,04$ ). A compilação dos resultados desta análise em comparação com os estudos supracitados encontra-se representada na Tabela 5.

**Tabela 5.** Resultados referentes ao teor de humidade obtidos em diferentes estudos.

<b>Estudos</b>	<b>Humidade (% ± desvio padrão)</b>
Presente trabalho	81,68 ± 0,45
León-González et.al. (2013)*	83,41
Clavijo et. al. (2003)*	75,0
Andrade; Gonçalves; PF Guiné (2017)	87,89 ± 1,04

\* Não há valores obtidos para desvio padrão

As diferenças relativas ao teor de humidade encontradas nos estudos supracitados podem estar relacionadas a fatores climáticos, regiões de colheita, e diferentes tipos de solo, quais influenciam diretamente na composição físico-química dos frutos. De acordo com Di Vittori et al. (2018), alguns dos principais fatores ambientais e agronômicos que influenciam a qualidade dos frutos silvestres são local de crescimento, exposição solar, temperatura, época de colheita e precipitação.

#### **3.1.4. Teor de Sólidos Solúveis**

Conforme referenciado por Di Vittori et al. (2018), o teor de açúcares elevado e o teor de ácido relativamente alto, são parâmetros necessários para determinar o bom sabor dos frutos, sendo que a percepção da doçura é um fator importante na determinação da preferência do consumidor.

O sumo puro da camarinha foi utilizado para determinar o teor de sólidos solúveis na presente investigação. O valor obtido de ° Brix ( $11,00 \pm 0,00$ ) foi superior aos resultados encontrados por Andrade; Gonçalves; Guiné (2017) ( $6,20 \pm 0,00$ ), Pimpão et al. (2013) e Santos et al. (2014) ( $6,80 \pm 0,00$ ).

Fatores ambientais e agronômicos como local de crescimento, temporada de colheita, precipitação pluvial e temperatura, influenciam diretamente no conteúdo de sólidos solúveis (Di Vittori et al., 2018).

Tendo em conta o supracitado, é possível inferir que o resultado obtido para o teor de sólidos solúveis da camarinha no presente estudo, demonstrando ser superior aos resultados reportados na literatura, tem relação com a época de

colheita do fruto, considerando que as amostras de camarinha utilizadas encontravam-se sob um estágio de maturação mais avançado.

### **3.1.5. Determinação de Açúcares Redutores**

Os resultados da determinação dos açúcares redutores, através do método DNS, obtidos a partir de 1,0 g de peso seco das amostras liofilizadas das camarinhas, foram expressos em mg/100 g ms (matéria seca).

Os valores obtidos para as amostras das sementes, polpa e folhas liofilizadas foram (23,69 mg/100g  $\pm$  0,82), (71,55 mg/100g  $\pm$  1,09) e (218,69 mg/100g  $\pm$  2,30) respectivamente.

O resultado encontrado para a amostra de polpa das camarinhas (71,55 mg/100g  $\pm$  1,09) foi relativamente superior ao obtido por Andrade; Gonçalves; Guiné (2017) (62,80 mg/100g  $\pm$  0,80). Esta diferença pode estar relacionada ao estado de maturação dos frutos, assim como o tipo de metodologia aplicado para esta determinação. Fatores edafoclimáticos também devem ser considerados, pois influenciam significativamente no parâmetro analisado.

Relativamente às folhas, o teor de açúcares redutores encontrado foi consideravelmente mais alto, em comparação com a polpa e as sementes. De acordo com Zhu et al. (2018), nas folhas em desenvolvimento, as enzimas de clivagem de sacarose são extremamente ativas, fornecendo grandes quantidades de açúcares redutores como substância, tanto para formar esqueletos de carbono celular, como para alimentar diversos mecanismos consumidores de energia. Neste sentido é possível inferir que em folhas imaturas ou em estado de desenvolvimento, maior será o teor de açúcares redutores, o que explica o valor obtido para a amostra analisada.

### **3.1.6. Determinação do perfil ácidos gordos**

Esta determinação foi realizada em triplicado e os ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME's) foram obtidos por transmetilação direta a partir de amostras liofilizadas e trituradas (50mg) da polpa, folhas e sementes da camarinha. A identificação dos cromatógrafos (Anexo 1), foi realizada através da

comparação do tempo de retenção dos picos das amostras com o padrão Supelco FAME Mix C8 – C24.

O perfil dos ácidos gordos foi realizado atribuindo-se que a fração correspondente a um determinado ácido gordo é a razão entre a respetiva área do pico e a área total dos picos, representados em percentagem.

A composição em percentagem dos ácidos gordos para as amostras das folhas de camarinha está apresentada na Tabela 6.

**Tabela 6.** Composição em ácidos gordos (%) presentes nas amostras de folhas de camarinha.

Ácidos gordos Nomenclatura	Folhas de camarinha	
	Média (%)	Desvio Padrão
Alfa-linolénico (C18:3n-3) - PUFA <sup>c</sup> /ALA <sup>d</sup>	37,67	± 1,89
Araquídico (C20:0) - SFA <sup>a</sup>	3,06	± 0,72
Behênico (C22:0) - SFA <sup>a</sup>	1,57	± 0,70
Eicosapentanoico (C20:5n-3) - PUFA <sup>c</sup> /EPA <sup>e</sup>	3,87	± 0,85
Esteárico (C18:0) - SFA <sup>a</sup>	3,54	± 0,65
Lignocérico (C24:0) - SFA <sup>a</sup>	3,02	± 0,28
Linoleico (C18:2n-6) - PUFA <sup>c</sup>	13,87	± 0,39
Mirístico (C14:0) - SFA <sup>a</sup>	1,68	± 0,04
Nervônico (C24:1n-9) - MUFA <sup>b</sup>	5,06	± 0,19
Oleico (C18:1n-9) - MUFA <sup>b</sup>	2,32	± 0,29
Palmítico (C16:0) - SFA <sup>a</sup>	14,17	± 0,88
Palmitoleico (C16:1n-7) - MUFA <sup>b</sup>	0,39	± 0,09
Tridecanóico (C13:0) - SFA <sup>a</sup>	5,11	± 2,24

<sup>a</sup>SFA: Ácidos gordos saturados (*Saturated fatty acids*).

<sup>b</sup>MUFA: Ácidos gordos monoinsaturados (*Monounsaturated fatty acids*).

<sup>c</sup>PUFA: Ácidos gordos polinsaturados (*Polyunsaturated fatty acids*).

<sup>d</sup>ALA: Ácido alfa-linolénico (*Alpha linolenic acid*).

<sup>e</sup>EPA: Ácido eicosapentanoico (*Eicosapentanoic acid*).

O perfil dos ácidos gordos das folhas de camarinha, conforme apresentado na Tabela 6, revelou que, em termos de quantidade absoluta, o ácido alfa-

linolénico (C18:3n-3) foi o ácido gordo identificado em maior abundância, representando  $37,67\% \pm 1,89$  do total dos ácidos gordos, seguido pelo ácido linoleico (C18:2n-6) ( $13,87\% \pm 0,39$ ). Foi também identificado em menor quantidade o ácido eicosapentanoico (C20:5n-3) ( $3,87\% \pm 0,85$ ).

O ácido palmítico (C16:0) foi o SFA mais abundante identificado ( $14,17\% \pm 0,88$ ), seguido pelo ácido tridecanóico (C13:0) ( $5,11\% \pm 2,24$ ). Os demais SFAs apresentaram valores consideravelmente inferiores. É possível verificar que os SFAs predominaram em relação aos MUFAs, representando 32,15% do total dos ácidos gordos, enquanto os MUFAs representaram apenas 7,77% do total, sendo o ácido nervônico (C24:1n-9) o MUFA predominante ( $5,06\% \pm 0,19$ ). Os PUFA's apresentaram uma média de 55,41% do total de ácidos gordos das folhas de camarinha, constituindo o grupo dominante.

A composição em percentagem dos ácidos gordos para as amostras de polpa de camarinha está apresentada na Tabela 7.

A partir dos valores obtidos, que representam o perfil de ácidos gordos presentes na polpa de camarinha, representado na Tabela 7, é possível verificar que, em termos de quantidade absoluta, o ácido eicosapentanoico (C20:5n-3) foi identificado em maior abundância, representando  $30,70\% \pm 2,10$  do total dos ácidos gordos, seguido pelo ácido linoleico (C18:2n-6) ( $12,84\% \pm 0,72$ ).

Relativamente aos SFAs, o ácido palmítico (C16:0) é predominante ( $11,20\% \pm 1,60$ ), seguido pelo ácido lignocérico (C24:0) ( $10,10\% \pm 1,90$ ) e pelo ácido láurico (C12:0) ( $9,60\% \pm 3,20$ ). Os demais SFAs apresentam valores relativamente inferiores.

Em relação aos MUFAs, o ácido oleico (C18:1n-9) é predominante ( $8,01\% \pm 0,81$ ), sendo que, para o referido grupo, também se apresentam em menores quantidades os ácidos nervônico (C24:1n-9) ( $2,00\% \pm 0,50$ ) e eicosanóico (C20:1n-9) ( $1,84\% \pm 0,14$ ).

Assim como para o perfil dos ácidos gordos presentes nas folhas de camarinha, na polpa os PUFA's também constituem o grupo dominante, representando 46,99% do total dos ácidos gordos, sendo o ácido alfa-linolénico (C18:3n-3) o que aparece em menor quantidade ( $3,45 \pm 0,54$ ). Os SFAs

representam 40,66%, enquanto os MUFAs 11,85% do total de ácidos gordos que compõe as amostras de camarinha.

**Tabela 7.** Composição em ácidos gordos (%) presentes nas amostras de polpa de camarinha.

Ácidos gordos Nomenclatura	Polpa de camarinha	
	Média (%)	Desvio Padrão
Alfa-linolénico (C18:3n-3) - PUFA <sup>c</sup> /ALA <sup>d</sup>	3,45	± 0,54
Araquídico (C20:0) - SFA <sup>a</sup>	0,67	± 0,05
Behênico (C22:0) - SFA <sup>a</sup>	4,23	± 0,89
Eicosanóico (C20:1n-9) - MUFA <sup>b</sup>	1,84	± 0,14
Eicosapentanoico (C20:5n-3) - PUFA <sup>c</sup> /EPA <sup>e</sup>	30,70	± 2,10
Estearico (C18:0) - SFA <sup>a</sup>	3,50	± 1,00
Láurico (C12:0) - SFA <sup>a</sup>	9,60	± 3,20
Lignocérico (C24:0) - SFA <sup>a</sup>	10,10	± 1,90
Linoleico (C18:2n-6) - PUFA <sup>c</sup>	12,84	± 0,72
Mirístico (C14:0) - SFA <sup>a</sup>	1,06	± 0,19
Nervônico (C24:1n-9) - MUFA <sup>b</sup>	2,00	± 0,50
Oleico (C18:1n-9) - MUFA <sup>b</sup>	8,01	± 0,81
Palmítico (C16:0) - SFA <sup>a</sup>	11,20	± 1,60

<sup>a</sup>SFA: Ácidos gordos saturados (*Saturated fatty acids*).

<sup>b</sup>MUFA: Ácidos gordos monoinsaturados (*Monounsaturated fatty acids*).

<sup>c</sup>PUFA: Ácidos gordos polinsaturados (*Polyunsaturated fatty acids*).

<sup>d</sup>ALA: Ácido alfa-linolénico (*Alpha linolenic acid*).

<sup>e</sup>EPA: Ácido eicosapentanoico (*Eicosapentanoic acid*).

A composição em percentagem dos ácidos gordos para as amostras de sementes de camarinha está apresentada na Tabela 8.

Conforme os dados obtidos na determinação do perfil de ácidos gordos nas sementes de camarinha (Tabela 8), é possível verificar que, em termos de quantidade absoluta, o ácido araquídico (C20:0) foi identificado em maior abundância (50,80% ± 1,20). Os SFAs representam o grupo dominante, 56,62% do total de ácidos gordos presentes nas sementes.

O PUFA linoleico (C18:2n-6) foi o único identificado, constituindo 31,10% ± 0,35 do total de ácidos gordos. O MUFA oleico (C18:1n-9) foi também identificado e constituiu 12,32% ± 0,33 do perfil total de ácidos gordos contidos nas amostras das sementes de camarinha.

**Tabela 8.** Composição em ácidos gordos (%) presentes nas amostras de sementes de camarinha.

Ácidos gordos Nomenclatura	Sementes de camarinha	
	Média (%)	Desvio Padrão
Araquídico (C20:0) - SFA <sup>a</sup>	50,80	± 1,20
Esteárico (C18:0) - SFA <sup>a</sup>	1,47	± 0,56
Linoleico (C18:2n-6) - PUFA <sup>c</sup>	31,10	± 0,35
Oleico (C18:1n-9) - MUFA <sup>b</sup>	12,32	± 0,33
Palmítico (C16:0) - SFA <sup>a</sup>	4,35	± 0,36

<sup>a</sup>SFA: Ácidos gordos saturados (*Saturated fatty acids*).

<sup>b</sup>MUFA: Ácidos gordos monoinsaturados (*Monounsaturated fatty acids*).

<sup>c</sup>PUFA: Ácidos gordos polinsaturados (*Polyunsaturated fatty acids*).

De um modo geral, os PUFAs (ácidos gordos polinsaturados), foram o grupo predominante nas folhas e polpa da camarinha, aparecendo também em boas quantidades nas sementes. De acordo com Satogami et al. (2019), os ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) vêm sendo destaque nos campos da psiquiatria, devido aos seus efeitos neuroprotetores, como a elevação dos níveis de BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), assim como elevada capacidade antioxidante e anti-inflamatória. Satogami et al. (2019) também cita que diversos estudos recentes relatam maior prevalência de distúrbios alimentares em indivíduos com níveis anormais de PUFAs.

## 3.2. Atividade Antioxidante

### 3.2.1. Quantificação dos compostos fenólicos totais

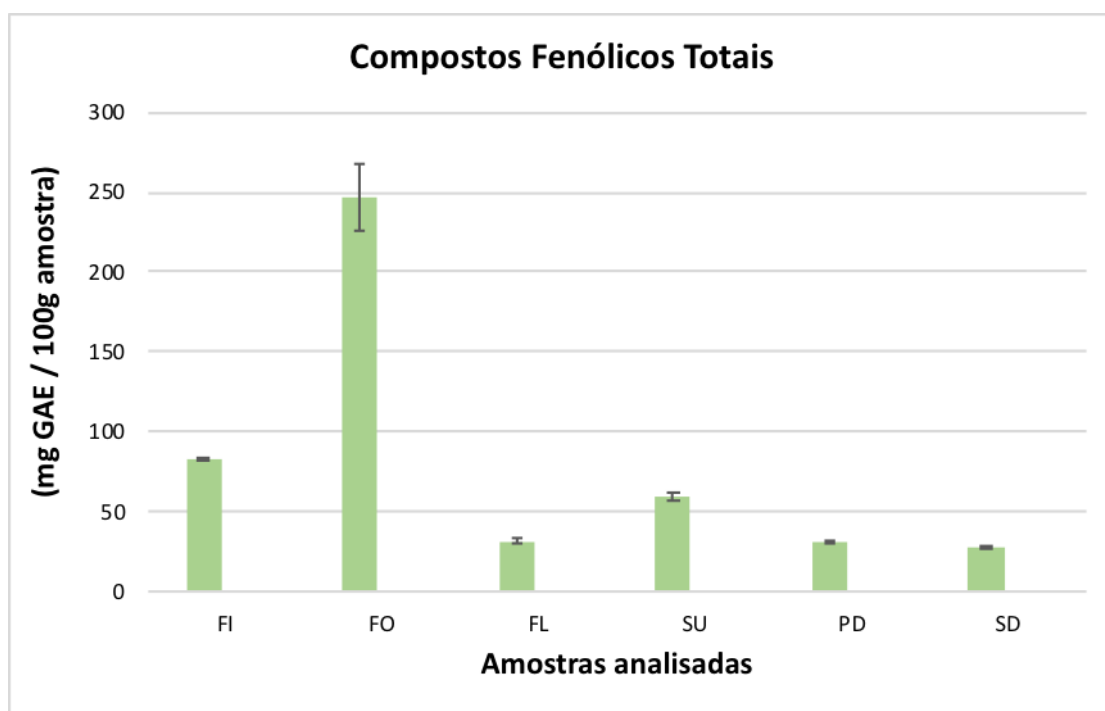
A quantificação dos compostos fenólicos totais foi determinada através do método *Folin-Ciocalteu*. Foram analisados extratos do fruto inteiro (FI), folhas

(FO), flores (FL), sumo (SU), polpa desidratada (PD) e sementes desidratadas (SD). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de amostra (mg GAE/100g), conforme demonstrado na Figura 21.

No que diz respeito a análise realizada no fruto inteiro, o valor de compostos fenólicos totais obtido foi de 83,64 mg GAE/100g  $\pm$  1,04, demonstrando ser inferior ao resultado encontrado por León-González et al. (2013) 121,44 mg GAE/100g  $\pm$  12,27. A diferença encontrada pode estar relacionada às características edafoclimáticas de cada região de colheita, condições de crescimento e estado de maturação dos frutos e o método de extração adotado. Um estudo conduzido por Andrade (2016), demonstrou que as camarinhas brancas apresentaram valores de compostos fenólicos totais superiores aos das camarinhas rosadas translúcidas, o que explica o valor obtido na presente investigação, onde os frutos utilizados encontravam-se em um estágio de maturação mais avançado.

Relativamente às folhas e flores, os resultados encontrados foram 246,73 mg GAE/100g  $\pm$  21,20 e 32,00 mg GAE/100g  $\pm$  2,39, respetivamente. As folhas apresentaram um valor interessante no teor de compostos fenólicos totais, demonstrando ser superior ao encontrado por Macedo et al. (2015) (112,35 mg GAE/100g  $\pm$  3,96). Frações enriquecidas de polifenóis (PEF) das folhas de *Corema album* foram caracterizadas pela primeira vez em um estudo conduzido por Macedo et al. (2015), onde obteve resultados promissores para os PEFs testados, demonstrando uma considerável atividade protetora contra a toxicidade induzida por  $\alpha$  Syn (alfa sinucleína), assim como sua capacidade de estabilizar espécies oligoméricas não tóxicas de  $\alpha$  Syn, reduzir os níveis de ROS (Espécies Reativas de Oxigênio) e aumentar a função autofágica comprometida pela expressão da  $\alpha$  Syn. Desta forma, os resultados sugerem que os polifenóis presentes nas folhas do *Corema album* podem ser agentes terapêuticos interessantes como forma de prevenir a toxicidade da  $\alpha$  Syn na Doença de Parkinson e em outras sinucleinopatias (MACEDO et al., 2015). A bioatividade de folhas e flores de *Corema album*, ainda pouco caracterizada, pode representar um conjunto de fitoquímicos importante a ser explorado em estudos futuros.

Em relação à polpa desidratada, o valor encontrado foi de 31,44 mg GAE/100g  $\pm$  0,20. Quanto ao sumo, era esperado que o teor de compostos fenólicos totais fosse relativamente menor (59,54 mg GAE/100 mL  $\pm$  2,45) se comparado ao fruto inteiro (83,64 mg GAE/100g  $\pm$  1,04), tonando-se assim possível inferir que também existem compostos fenólicos, em menores quantidades, nas sementes desidratadas (28,48 mg GAE/100g  $\pm$  0,44).



**Figura 21.** Compostos Fenólicos Totais (mg GAE/100g) em amostras do fruto inteiro (FI), folhas (FO), flores (FL), sumo (SU), polpa desidratada (PD) e sementes desidratadas (SD), obtidos a partir do método *Folin-Ciocalteu*.

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram comparar o teor de compostos fenólicos totais da camarinha com outros pequenos frutos (Tabela 9).

Através de um estudo conduzido por Rodrigues et al. (2011), onde avaliou o teor de compostos fenólicos totais de diferentes genótipos de mirtilo (*Vaccinium* sp.) cultivados no Brasil, através do método *Folin-Ciocalteu*, foi possível verificar que o conteúdo fenólico total dos mirtilos, quais variaram de 274,48 a 694,60 mg GAE/100g de peso fresco, demonstraram ser relativamente superiores ao do *Corema album* (83,64 mg GAE/100g  $\pm$  1,04).

Moyer et al. (2002) investigou diferentes espécies e genótipos de amoras e groselhas silvestres, quanto ao teor de compostos fenólicos totais, determinado através do método *Folin-Ciocalteu*, sendo que os resultados obtidos variaram de 126,00 mg GAE/100g  $\pm$  0,30 a 1079,00 mg GAE/100g  $\pm$  34,00 para as amoras e 191,00 mg GAE/100g  $\pm$  17,00 a 1790,00 mg GAE/100g  $\pm$  59,00 para as groselhas, valores superiores aos encontrados para a camarinha na presente investigação.

As razões para a alteridade dos valores encontrados nos estudos supracitados, para os diferentes frutos silvestres, em relação aos obtidos no presente estudo para a camarinha, deve-se não somente ao facto de serem frutos com características peculiares e de identidades e constituições diferentes, mas também possivelmente devido à coloração branca da camarinha, assim sendo, possuir um menor teor de antocianinas, compostos responsáveis por proporcionar cor aos frutos.

Abe et al. (2007) avaliou o conteúdo de compostos fenólicos totais de cinco cultivares de uvas através do método *Folin-Ciocalteu*, sendo que o conteúdo variou significativamente, entre 65,00 mg GAE/100g  $\pm$  1,00 a 390,00 mg GAE/100g  $\pm$  30,00. As uvas de coloração mais intensa demonstraram ser mais interessantes do ponto de vista funcional, apresentando maior teor de compostos fenólicos. A uva branca Moscato Emprapa, livre de antocianinas, foi a que apresentou menor teor de compostos fenólicos (65,00 mg GAE/100g  $\pm$  1,00), demonstrando ser inferior ao resultado obtido para a camarinha no presente estudo (83,64 mg GAE/100g  $\pm$  1,04).

**Tabela 9.** Teor de compostos fenólicos totais, determinado pelo método Folin-Ciocalteu, em estudos variados para diferentes tipos de frutos.

<b>Frutos</b>	<b>Compostos Fenólicos Totais (mg GAE/100g fruto fresco ± desvio padrão)</b>
Camarinha (Presente trabalho)	83,64 ± 1,04
Camarinha (León-González et.al., 2013)	121,44 ± 12,27
Mirtilo (Rodrigues et al., 2011)	274,48 ± 5,63 a 694,60 ± 47,39
Amora (Moyer et al., 2002)	126,00 ± 0,30 a 1079,00 ± 34,00
Groselha (Moyer et al., 2002)	191,00 ± 17,00 a 1790,00 ± 59,00
Uva branca Moscato - Embrapa (Abe et al., 2007)	65,00 ± 1,00

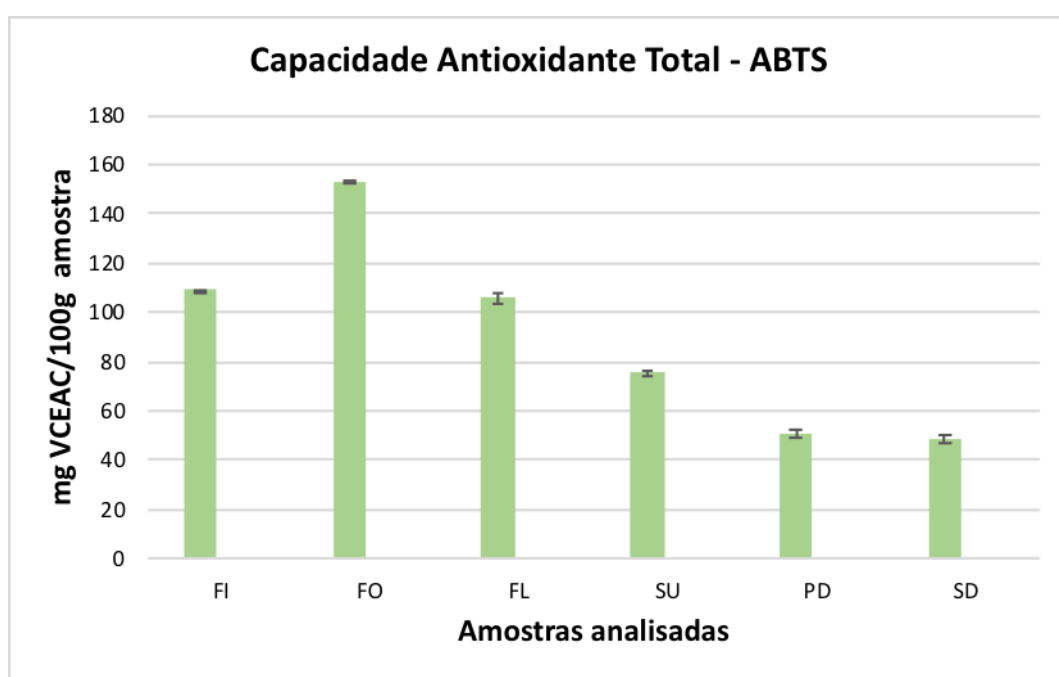
### 3.2.2. Capacidade de redução do radical ABTS

A capacidade antioxidante, determinada pelo poder de redução do radical ABTS, foi realizada em extratos do fruto inteiro (FI), folhas (FO), flores (FL), sumo (SU), polpa desidratada (PD) e sementes desidratadas (SD). Os resultados foram expressos em mg VCEAC/100g de amostra (VCEAC: Equivalente em Vitamina C), conforme demonstrado na Figura 22.

Relativamente à análise realizada no fruto inteiro, o resultado obtido para a capacidade antioxidante foi de 109,10 mg VCEAC/100g ± 0,17. Para as folhas e flores, respetivamente, os valores encontrados foram 153,14 mg VCEAC/100 g ± 0,19 e 105,73 mg VCEAC/100 g ± 1,73. O sumo da camarinha apresentou atividade antioxidante total de 75,29 mg VCEAC/100 g ± 0,73.

Em relação a polpa desidratada, o valor obtido foi de 50,61 mg VCEAC/100g ± 1,78. O resultado obtido por Andrade; Guiné; Gonçalves (2017), utilizando Trolox como padrão, foi de 65,00 µmol TE/g ± 2,00 para as polpas de camarinha branca e 52,00 µmol TE/g ± 3,00 para as polpas de camarinha translúcidas, demonstrando uma maior atividade antioxidante nos frutos de cor branca quando comparados aos frutos com grau de maturação mais avançado. O resultado encontrado para as sementes desidratadas analisadas na presente investigação foi

de 48,63 mg VCEAC/100 g  $\pm$  2,08. Andrade; Guiné; Gonçalves (2017) também estudou a capacidade antioxidante total das sementes de camarinha branca e camarinha translúcida e os resultados obtidos foram 48,00  $\mu$ mol TE/g  $\pm$  3,00 e 48,00  $\mu$ mol TE/g  $\pm$  4,00, não apresentando diferenças significativas para a atividade antioxidante total dos frutos em estágios de maturação diferentes. Apesar do método empregado para a determinação da capacidade antioxidante na presente investigação e no estudo supracitado ser o mesmo, os resultados não são comparáveis já que o padrão utilizado na respectiva análise foi diferente. Todavia, as diferenças encontradas devem ter relação com as características edafoclimáticas de cada região de colheita e o estágio de amadurecimento dos frutos analisados.



**Figura 22.** Capacidade Antioxidante Total (mg VCEAC/100g) em amostras do fruto inteiro (FI), folhas (FO), flores (FL), sumo (SU), polpa desidratada (PD) e sementes desidratadas (SD), obtida a partir do método ABTS.

Os resultados obtidos no presente estudo para a determinação da capacidade antioxidante total através do método ABTS, mostraram que a polpa da camarinha apresentou uma maior atividade antioxidante se comparada com as respectivas sementes. Apesar de ainda não terem sido caracterizadas quanto à sua bioatividade, as flores da camarinha apresentaram elevada capacidade

antioxidante, considerando-se assim um aspecto importante a ser explorado em estudos futuros.

Floegel et al. (2011) avaliou a capacidade antioxidante total de diferentes frutos, determinada através do método ABTS, tornando possível comparar os resultados com os obtidos no presente estudo (Tabela 10). Frutos como o mirtilo (476,60 mg VCEAC/100 g  $\pm$  28,90); cereja (194,20 mg VCEAC/100 g  $\pm$  22,00); groselha (119,60 mg VCEAC/100 g  $\pm$  7,50); uva vermelha (214,40 mg VCEAC/100 g  $\pm$  48,50) e morango (273,50 mg VCEAC/100 g  $\pm$  21,80) apresentaram maior capacidade antioxidante em relação ao resultado encontrado para camarinha nesta investigação (109,10 mg VCEAC/100 g  $\pm$  0,17). A camarinha apresentou capacidade antioxidante relativamente superior se comparada a frutos maiores como a manga (63,90 mg VCEAC/100 g  $\pm$  1,70); nectarina (35,70 mg VCEAC/100 g  $\pm$  30,00); avocado (70,00 mg VCEAC/100 g  $\pm$  10,10); pêsego (70,00 mg VCEAC/100 g  $\pm$  8,50); melão cantaloupe (49,30 mg VCEAC/100 g  $\pm$  6,10), grapefruit (toranja) (97,90 mg VCEAC/100 g  $\pm$  1,70) e a pêra (94,30 mg VCEAC/100 g  $\pm$  8,60).

Conforme resultados obtidos na determinação dos compostos fenólicos totais (3.2.1.), ao comparar a camarinha com outros pequenos frutos a partir de diferentes estudos, foi possível observar que esta apresentava valores inferiores de conteúdo fenólico total em relação aos demais frutos como mirtilo, amora e groselha. Da mesma forma para a capacidade antioxidante total, diante dos resultados apresentados no parágrafo acima, é possível verificar que os pequenos frutos com coloração mais intensa, como o mirtilo, cereja, groselha, uva vermelha e o morango apresentaram uma capacidade antioxidante consideravelmente maior em relação à camarinha. Apesar de serem frutos diversificados e, portanto, possuírem características e constituições diferentes, possivelmente a maior capacidade antioxidante esteja relacionada ao maior teor de antocianinas, já que conforme apresentado na Tabela 10, é possível verificar que as diferenças encontradas entre as capacidades antioxidantes determinadas pelo método ABTS, foi maior nos frutos altamente pigmentados.

**Tabela 10.** Comparação da capacidade antioxidante total da camarinha com diferentes frutos, determinada pelo método ABTS, através de um estudo conduzido por Floegel et al. (2011).

Frutos	Capacidade antioxidante - ABTS (mg VCEAC/100g fruto $\pm$ desvio padrão)
<b>Presente estudo</b>	
Camarinha	109,10 $\pm$ 0,17
<b>Floegel et al. (2011)</b>	
Mirtilo	476,60 $\pm$ 28,90
Cereja	194,20 $\pm$ 22,00
Cranberry	119,60 $\pm$ 7,50
Uva vermelha	214,40 $\pm$ 48,50
Morango	273,50 $\pm$ 21,80
Manga	63,90 $\pm$ 1,70
Nectarina	35,70 $\pm$ 30,00
Avocado	70,00 $\pm$ 10,10
Pêssego	70,00 $\pm$ 8,50
Melão Cantaloupe	49,30 $\pm$ 6,10
Grapefruit (toranja)	97,90 $\pm$ 1,70
Pêra	94,30 $\pm$ 8,60

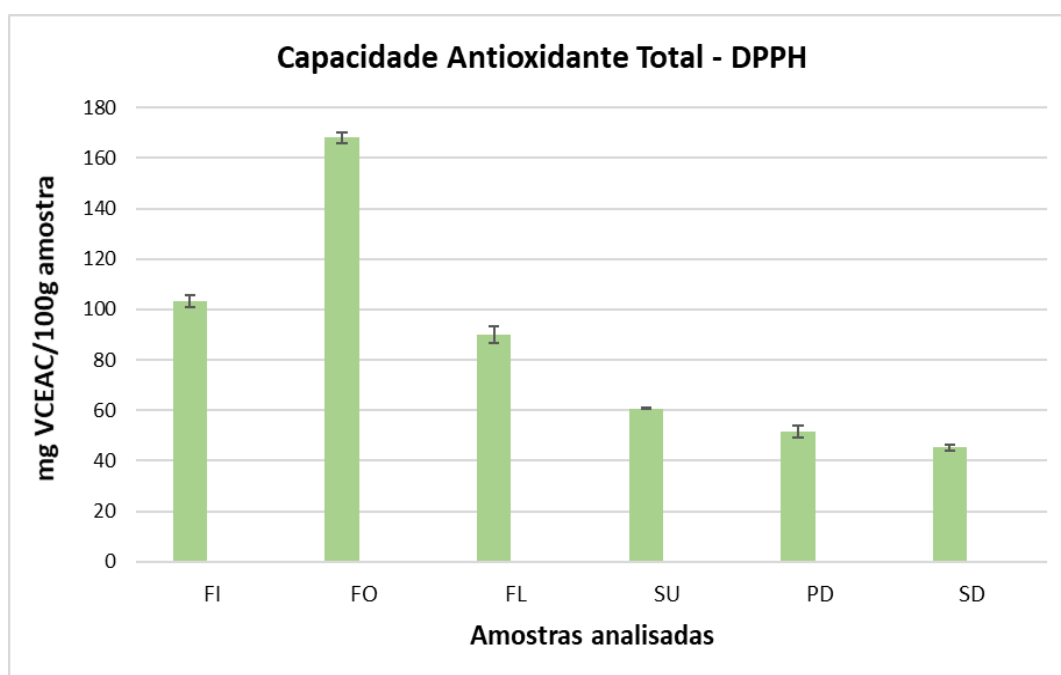
### 3.2.3. Capacidade antioxidante: DPPH

O ensaio DPPH foi realizado para determinar a capacidade antioxidante total do fruto inteiro (FI), folhas (FO), flores (FL), sumo (SU), polpa desidratada (PD) e sementes desidratadas (SD), sendo que os resultados foram expressos em mg VCEAC/100g de amostra (VCEAC: Equivalente em Vitamina C), conforme demonstrado na Figura 23.

Relativamente às folhas e flores, os valores obtidos foram de 168,07 mg VCEAC/100g  $\pm$  2,27 e 90,19 mg VCEAC/100g  $\pm$  3,32. O sumo apresentou uma capacidade antioxidante de 60,70 mg VCEAC/100g  $\pm$  0,19.

Em relação à polpa da camarinha e às sementes desidratadas, os resultados encontrados foram 51,62 mg VCEAC/100g  $\pm$  2,35 e 45,32 mg VCEAC/100g  $\pm$

1,24, demonstrando uma maior atividade antioxidante da polpa em relação às sementes. O resultado obtido por Andrade; Guiné; Gonçalves (2016), através do ensaio DPPH, utilizando Trolox como padrão, foi de 40,10  $\mu\text{mol TE/g}$  para as polpas de camarinha branca e 38,00  $\mu\text{mol TE/g} \pm$  para as polpas de camarinha translúcidas e uma capacidade antioxidante de 35,50  $\mu\text{mol TE/g}$  para sementes de camarinha branca e 36,00  $\mu\text{mol TE/g}$  para as sementes de camarinha translúcida, onde é possível observar que, os diferentes estágios de maturação dos frutos não influenciaram significativamente na capacidade antioxidante total, tanto para as análises realizadas na polpa quanto nas sementes. O método empregado na determinação da capacidade antioxidante do estudo anteriormente citado e da presente investigação é o mesmo, todavia não é possível realizar comparações aos resultados, já que os padrões utilizados nas respectivas análises são diferentes.



**Figura 23.** Capacidade Antioxidante Total (mg VCEAC/100g) em amostras do fruto inteiro (FI), folhas (FO), flores (FL), sumo (SU), polpa desidratada (PD) e sementes desidratadas (SD), obtida a partir do método DPPH.

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram comparar a atividade antioxidante total da camarinha com outros frutos a partir de diferentes estudos (Tabela 11).

O resultado da atividade antioxidante total da camarinha (FI), obtido no presente estudo, determinado através do ensaio DPPH, foi de 103,26 mg VCEAC/100 g  $\pm$  2,42, demonstrando ser consideravelmente superior ao fruto tamarindo (47,25 mg VCEAC/100 g  $\pm$  10,28) e à graviola (16,94 mg VCEAC/100 g  $\pm$  0,06), resultados esses obtidos a partir de um estudo conduzido por Almeida et al. (2011), realizado através do método DPPH.

Floegel et al. (2011) também avaliou a atividade antioxidante de alguns frutos através do ensaio DPPH, tendo a camarinha uma capacidade antioxidante superior (103,26 mg VCEAC/100 g  $\pm$  2,42) a frutos maiores como a laranja (81,40 mg VCEAC/100 g  $\pm$  13,20), a pera (68,30 mg VCEAC/100 g  $\pm$  4,70), a nectarina (38,90 mg VCEAC/100 g  $\pm$  5,70) e semelhante ao limão (101,20 mg VCEAC/100 g  $\pm$  2,00) e uma capacidade antioxidante inferior ao mirtilo (383,50 mg VCEAC/100 g  $\pm$  16,00), a cereja (165,10 mg VCEAC/100 g  $\pm$  12,80), a uva vermelha (182,90 mg VCEAC/100 g  $\pm$  36,80) e ao morango (520,70 mg VCEAC/100 g  $\pm$  39,30).

Um estudo conduzido por Van de Velde et al. (2016), avaliou a capacidade antioxidante total de três variedades de amoras pretas (*Jumbo*, *Blacksatim* e *Dirksen*) através do método DPPH, sendo que os valores obtidos foram significativamente superiores (800,00 mg VCEAC/100 g  $\pm$  50,00) (798,00 mg VCEAC/100 g  $\pm$  20,00) e (714,00 mg VCEAC/100 g  $\pm$  32,00), quando comparados à camarinha (103,26 mg VCEAC/100 g  $\pm$  2,42).

A partir das comparações apresentadas, é possível observar, assim como já citado em 3.2.2., que os frutos de coloração mais intensa e altamente pigmentados, como o mirtilo, cereja, uva vermelha, morango e amora preta, apresentaram uma atividade antioxidante relativamente superior, tanto em relação à camarinha quanto a outros frutos maiores e de coloração menos intensa, possivelmente devido ao maior teor de antocianinas presente nos frutos altamente pigmentados.

Apesar de possuírem características e constuições diferentes, a camarinha apresentou uma capacidade antioxidante total semelhante ao limão, fruto este conhecido por seu alto teor de compostos fenólicos e forte bioatividade (capacidade antioxidante e anti-inflamatória) (Dong et al., 2019).

**Tabela 11.** Comparação da capacidade antioxidante total da camarinha com outros frutos, determinada pelo método DPPH, a partir de diferentes estudos.

Frutos	Capacidade antioxidante - DPPH (mg VCEAC/100g fruto $\pm$ desvio padrão)
<b>Presente estudo</b>	
Camarinha	103,26 $\pm$ 2,42
<b>Almeida et al. (2011)</b>	
Tamarindo	47,25 $\pm$ 10,28
Graviola	16,94 $\pm$ 0,06
<b>Floegel et al. (2011)</b>	
Laranja	81,40 $\pm$ 13,20
Pêra	68,30 $\pm$ 4,70
Nectarina	38,90 $\pm$ 5,70
Limão	101,20 $\pm$ 2,00
Mirtilo	383,50 $\pm$ 16,00
Cereja	165,00 $\pm$ 12,80
Uva Vermelha	182,90 $\pm$ 36,80
Morango	520,70 $\pm$ 39,30
<b>Van de Velde et al. (2016)</b>	
Amora Preta ( <i>Jumbo</i> )	800,00 $\pm$ 50,00
Amora Preta ( <i>Blacksatim</i> )	798,00 $\pm$ 20,00
Amora Preta ( <i>Dirksen</i> )	714,00 $\pm$ 32,00

### 3.2.4. Capacidade antioxidante: FRAP

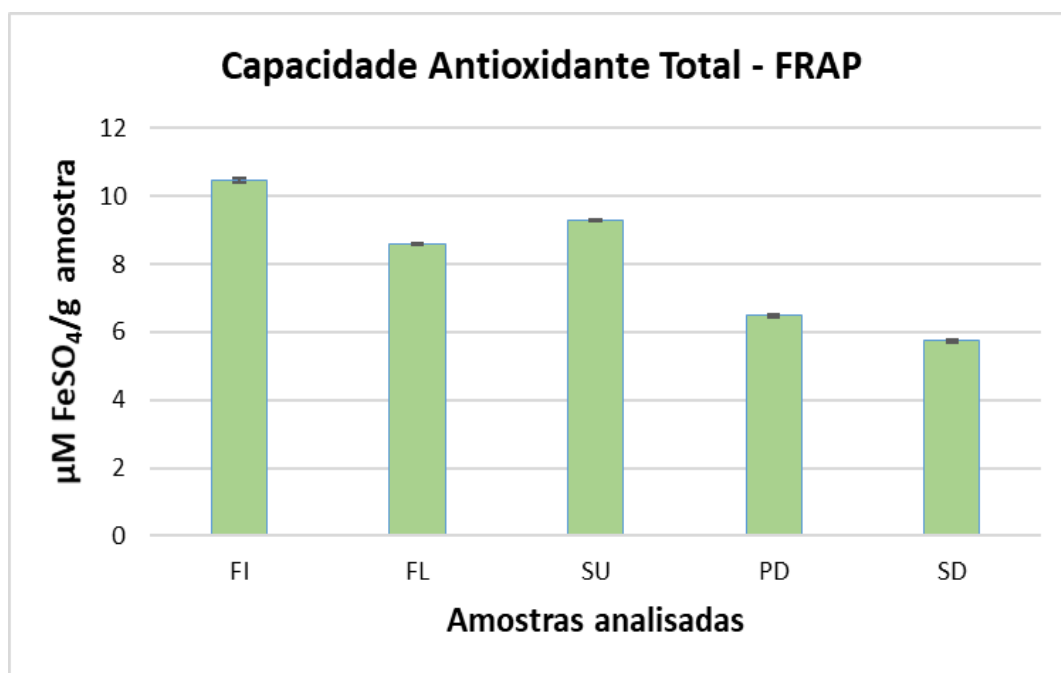
O ensaio do poder antioxidante redutor férrico (FRAP), foi realizado para determinar a capacidade antioxidante total do fruto inteiro (FI), flores (FL), sumo (SU), polpa desidratada (PD) e sementes desidratadas (SD) da camarinha, sendo que os resultados foram expressos em  $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$  de amostra, conforme demonstrado na Figura 24, onde  $\text{FeSO}_4$  – sulfato ferroso.

O resultado obtido para as flores foi de 8,59  $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 0,03$ . O sumo da camarinha apresentou uma capacidade antioxidante de 9,27  $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 0,02$ .

Relativamente à polpa e as sementes desidratadas, os resultados encontrados foram 6,48  $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 0,03$  e 5,74  $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 0,04$ ,

respectivamente, demonstrando que, assim como nos demais métodos anteriormente descritos, a polpa da camarinha apresentou uma capacidade antioxidante superior se comparada com as respectivas sementes.

O valor da capacidade antioxidante encontrado na amostra do fruto inteiro foi de  $10,46 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 0,07$ .



**Figura 24.** Capacidade Antioxidante Total ( $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$ ) em amostras do fruto inteiro (FI), flores (FL), sumo (SU), polpa desidratada (PD) e sementes desidratadas (SD), obtida a partir do ensaio FRAP.

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram comparar a atividade antioxidante total da camarinha com outros frutos a partir de diferentes estudos (Tabela 12).

Um estudo realizado por Denardin et al. (2015), avaliou a atividade antioxidante total, através do ensaio FRAP, de três variedades de pitanga, onde os valores obtidos foram  $33,17 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 2,80$  para pitanga laranja,  $23,43 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 4,40$  para pitanga vermelha e  $81,62 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 10,00$  para pitanga roxa e duas variedades de amora, sendo os resultados encontrados de  $52,51 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 3,30$  para a amora *Xavante* e  $66,60 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 4,30$  para a amora *Cherokee*, demonstrando resultados de atividade antioxidante superiores ao fruto

da camarinha ( $10,46 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 0,07$ ). A partir dos valores encontrados no estudo anteriormente citado, é possível verificar que a pitanga roxa apresentou uma capacidade antioxidante significativamente maior em comparação às outras duas variedades (laranja e vermelha), devido à sua elevada pigmentação e, portanto, maior teor de antocianinas, o que novamente justifica as diferenças de atividade antioxidante deste tipo de fruto quando comparados à camarinha. Denardin et al. (2015) também verificou que, tanto as amoras quanto a pitanga roxa possuem um maior teor de compostos fenólicos totais, quercetina (flavonóide) e cianidina (antocianina), compostos que contribuem diferencialmente para a capacidade antioxidante desses frutos.

koca; Karadeniz (2009) investigou a capacidade antioxidante total de mirtilos selvagens e cultivados, através do ensaio FRAP, sendo que os resultados obtidos variaram entre  $34,45 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$  a  $57,92 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$  para os mirtilos selvagens e  $7,41 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$  a  $13,69 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$  para mirtilos cultivados. Os mirtilos selvagens apresentaram uma capacidade antioxidante relativamente superior à camarinha ( $10,46 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 0,07$ ), enquanto que, para os mirtilos cultivados, a camarinha encontra-se dentro do intervalo dos valores obtidos, relativamente à sua capacidade antioxidante. Neste sentido, é possível inferir que as condições ambientais e de cultivo, as características edafoclimáticas e as variedades dentro de uma mesma espécie, são fatores que influenciam de forma significativa o parâmetro analisado.

Pineli et al. (2011) avaliou a capacidade antioxidante de duas variedades de morangos em diferentes estágios de maturação, via método FRAP, sendo que os resultados obtidos para a variedade *Osogrande* foram  $36,75 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 6,49$  (verde),  $34,30 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 3,00$  (rosa) e  $27,37 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 5,77$  (maduro) e para a variedade *Camino Real* foram  $26,50 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 2,00$  (verde),  $28,49 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 2,48$  (rosa) e  $24,13 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 2,97$  (maduro), valores superiores se comparados à camarinha ( $10,46 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 0,07$ ). A partir dos resultados obtidos no estudo em questão, é possível observar que, para a variedade *Osogrande*, a capacidade antioxidante variou consideravelmente entre os morangos verdes, quais apresentaram uma maior atividade antioxidante, em relação aos morangos maduros, e que para ambas as variedades, os morangos na fase rosa apresentaram maior atividade antioxidante em relação aos morangos

maduros, onde de acordo com Pineli et al. (2011), durante a fase rosa um maior teor de compostos fenólicos, ácido elágico e vitamina C também foram observados. Sendo assim, o grau de maturação dos frutos pode ser um importante fator a ser considerado para justificar as diferenças encontradas na análise do parâmetro em questão, para frutos de mesma espécie e variabilidade, sob estágios de maturação diferentes.

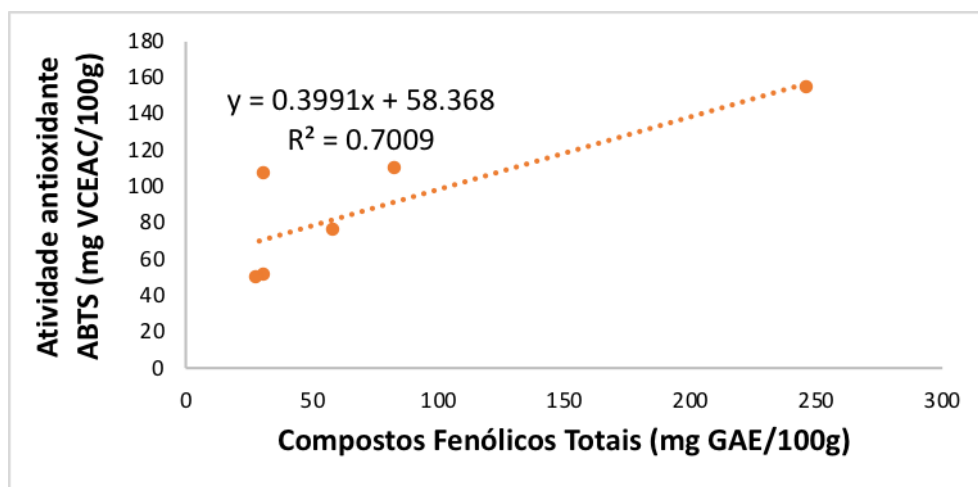
**Tabela 12.** Comparação da capacidade antioxidante total da camarinha com outros frutos, determinada pelo método FRAP, a partir de diferentes estudos.

Frutos	Capacidade antioxidante - FRAP ( $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$ fruto $\pm$ desvio padrão)
<b>Presente estudo</b>	
Camarinha	10,46 $\pm$ 0,07
<b>Denardin et al. (2015)</b>	
Pitanga Laranja	33,17 $\pm$ 2,80
Pitanga Vermelha	23,43 $\pm$ 4,40
Pitanga Roxa	81,61 $\pm$ 10,00
Amora <i>Xavante</i>	52,51 $\pm$ 3,30
Amora <i>Cherokee</i>	66,60 $\pm$ 4,30
<b>koca; Karadeniz (2009)*</b>	
Mirtilos Selvagens	34,45 a 57,92
Mirtilos Cultivados	7,41 a 13,69
<b>Pineli et al. (2011)</b>	
Morango <i>Osogrande</i> (verde)	36,75 $\pm$ 6,49
Morango <i>Osogrande</i> (rosa)	34,30 $\pm$ 300
Morango <i>Osogrande</i> (maduro)	27,37 $\pm$ 5,77
Morango <i>Camino Real</i> (verde)	26,50 $\pm$ 2,00
Morango <i>Camino Real</i> (rosa)	28,49 $\pm$ 2,48
Morango <i>Camino Real</i> (maduro)	24,13 $\pm$ 2,97

\* Não há valores obtidos para desvio padrão

### 3.2.5. Correlação entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total determinada pelos ensaios ABTS, DPPH e FRAP

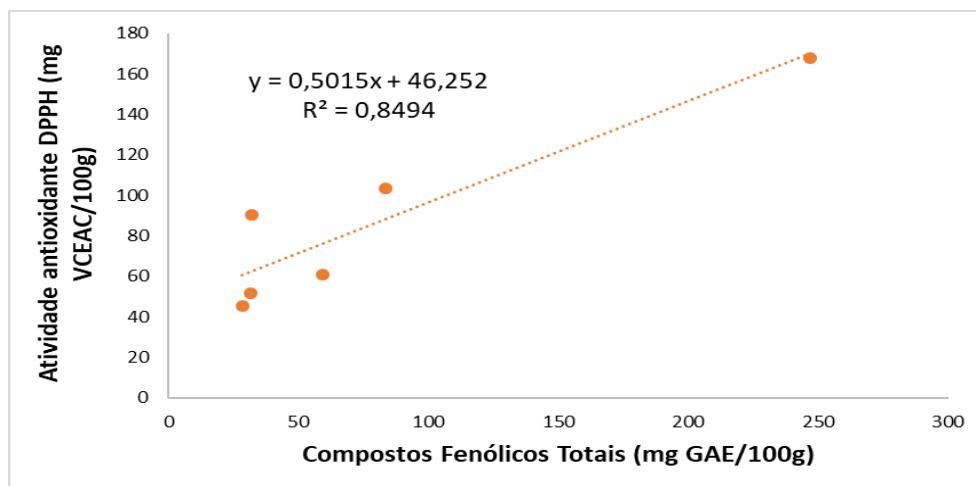
A correlação entre o teor de compostos fenólicos totais, expressos em mg GAE/100g de amostra e a atividade antioxidante total determinada pelo ensaio ABTS (mg VCEAC/100g) foi obtida pela reta de correlação apresentada na Figura 25.



**Figura 25.** Reta de correlação entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total realizada através do ensaio ABTS.

De acordo com o valor encontrado para o coeficiente de determinação ( $r^2 = 0,7009$ ), foi obtido o valor do coeficiente de correlação ( $r = 0,8372$ ), onde é possível verificar que existe uma correlação positiva forte entre os valores de compostos fenólicos totais e os valores de atividade antioxidante total obtidos através do método ABTS.

A correlação entre o teor de compostos fenólicos totais, expressos em mg GAE/100g de amostra e a atividade antioxidante total determinada pelo ensaio DPPH (mg VCEAC/100 g) foi obtida pela reta de correlação apresentada na Figura 26.

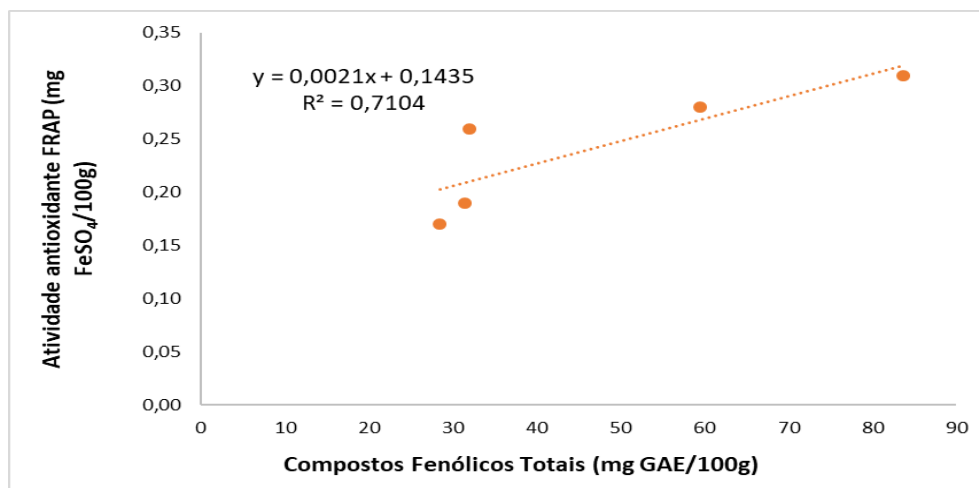


**Figura 26.** Reta de correlação entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total realizada através do ensaio DPPH.

Conforme o resultado encontrado para o coeficiente de determinação ( $r^2 = 0,8494$ ), foi obtido o valor para o coeficiente de correlação ( $r = 0,9216$ ), entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante pelo método DPPH, verificando-se que existe uma correlação positiva muito forte. Neste caso, possivelmente alguns compostos fenólicos sejam mais reativos perante o método DPPH, assim como pode-se também inferir que os compostos fenólicos presentes nas amostras podem ser os contribuintes mais relevantes para a capacidade antioxidante total.

Na investigação conduzida por Andrade (2016), em que avaliou a correlação entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante de amostras de polpa e sementes de camarinha, também encontrou um valor de correlação maior para o método DPPH ( $r^2 = 0,9066$ ) em relação ao método ABTS ( $r^2 = 0,7744$ ).

A correlação entre o teor de compostos fenólicos totais, expressos em mg GAE/100 g de amostra e a atividade antioxidante total determinada pelo ensaio FRAP (mg  $\text{FeSO}_4$ /100 g) foi obtida pela reta de correlação apresentada na Figura 27.



**Figura 27.** Retas de correlação entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total realizada através do ensaio FRAP.

A partir do coeficiente de determinação ( $r^2 = 0,7104$ ), entre o conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante pelo método FRAP, foi determinado o coeficiente de correlação ( $r = 0,8429$ ), verificando-se uma correlação positiva forte, assim como para o método ABTS.

De um modo geral, a partir dos resultados apresentados anteriormente, verifica-se que os compostos fenólicos estão significativamente correlacionados com a atividade antioxidante total e que o teste DPPH refletiu uma maior correlação com o conteúdo fenólico em relação aos ensaios ABTS e FRAP.

Os resultados também revelaram que as amostras com maior teor de compostos fenólicos totais apresentaram maior atividade antioxidante para os três ensaios (ABTS, DPPH e FRAP), conforme apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Compilação dos resultados do teor de compostos fenólicos totais determinado via método Folin-Ciocalteu e atividade antioxidante total pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP.

<i>Corema album</i>	GAE (mg/100g)	VCEAC (mg/100g)		Eq. ( $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$ )
	Fenólicos Totais	ABTS	DPPH	FRAP
Fruto Inteiro	83,64 $\pm$ 1,04	109,1 $\pm$ 0,17	103,26 $\pm$ 2,42	10,46 $\pm$ 0,07
Folhas	246,73 $\pm$ 21,20	153,14 $\pm$ 0,19	168,07 $\pm$ 2,27	*
Flores	32,00 $\pm$ 2,39	105,73 $\pm$ 1,73	90,19 $\pm$ 3,32	8,59 $\pm$ 0,03
Sumo	59,54 $\pm$ 2,45	75,29 $\pm$ 0,73	60,70 $\pm$ 0,19	9,27 $\pm$ 0,02
Polpa Desidratada	31,44 $\pm$ 0,20	50,61 $\pm$ 1,78	51,62 $\pm$ 2,35	6,48 $\pm$ 0,03
Semente Desidratada	28,48 $\pm$ 0,44	48,63 $\pm$ 2,08	45,32 $\pm$ 1,24	5,74 $\pm$ 0,04

\*Não foi possível determinar valores.

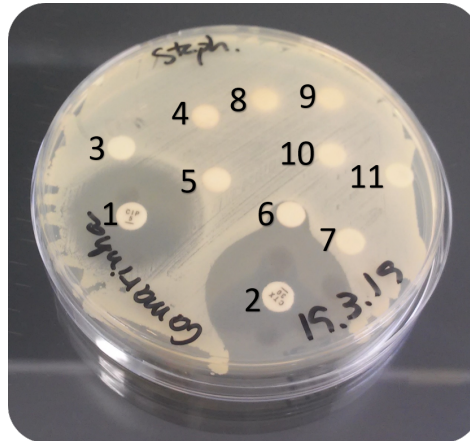
Valores apresentados como média  $\pm$  desvio padrão

### 3.3. Avaliação da capacidade antibacteriana

Para esta determinação, os resultados permitiram verificar que o meio de cultura se manteve estéril nas placas de Petri que não foram inoculadas e que as estirpes bacterianas se desenvolveram cobrindo a superfície das placas inoculadas.

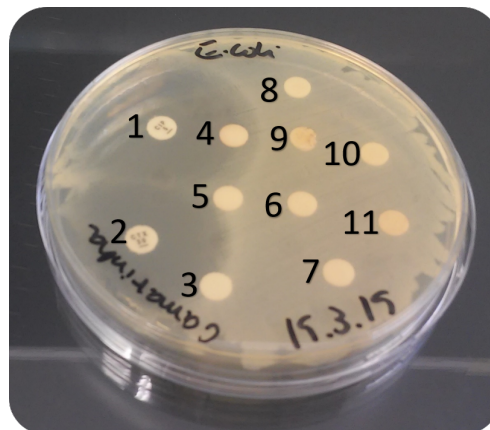
Os resultados obtidos para atividade antibacteriana dos extratos da polpa e sementes da camarinha, testados em três estirpes bacterianas pelo método de difusão em disco, estão representados nas Figuras 28, 29 e 30. O efeito de cada antibiótico para as estirpes selecionadas também encontram-se referidos nas figuras anteriormente citadas, sendo que as medições dos halos de inibição estão expostos na Tabela 14.

Perante análise dos resultados, é possível verificar que não houve formação de halos de inibição associados aos extratos da polpa e sementes da camarinha. Desta forma é possível concluir que, de acordo com as condições em que o estudo decorreu, não há indícios de atividade antibacteriana da camarinha nas estirpes selecionadas. Em relação ao controlo negativo (3), não se observa influência deste solvente para quaisquer das estirpes estudadas na presente investigação.



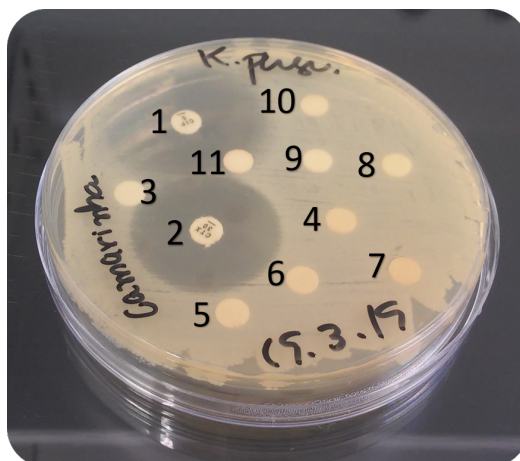
**Figura 28.** Efeito antibacteriano dos extratos da polpa e sementes da camarinha na estirpe *Staphylococcus aureus*.

- |   |   |
|---|---|
| 1 – Antibiótico CIP 5 (controlo positivo)     | 7 – 4 mg de extrato da polpa de camarinha     |
| 2 – Antibiótico CTX 30 (controlo positivo)    | 8 – 1 mg de extrato de sementes da camarinha  |
| 3 – 40 $\mu$ L de acetona (controlo negativo) | 9 – 2 mg de extrato de sementes da camarinha  |
| 4 – 1 mg de extrato de polpa da camarinha     | 10 – 3 mg de extrato de sementes da camarinha |
| 5 – 2 mg de extrato da polpa de camarinha     | 11 – 4 mg de extrato de sementes da camarinha |
| 6 – 3 mg de extrato da polpa de camarinha     |   |



**Figura 29.** Efeito antibacteriano dos extratos da polpa e sementes da camarinha na estirpe *Escherichia coli*.

- |   |   |
|---|---|
| 1 – Antibiótico CIP 5 (controlo positivo)     | 7 – 4 mg de extrato da polpa de camarinha     |
| 2 – Antibiótico CTX 30 (controlo positivo)    | 8 – 1 mg de extrato de sementes da camarinha  |
| 3 – 40 $\mu$ L de acetona (controlo negativo) | 9 – 2 mg de extrato de sementes da camarinha  |
| 4 – 1 mg de extrato de polpa da camarinha     | 10 – 3 mg de extrato de sementes da camarinha |
| 5 – 2 mg de extrato da polpa de camarinha     | 11 – 4 mg de extrato de sementes da camarinha |
| 6 – 3 mg de extrato da polpa de camarinha     |   |



**Figura 30.** Efeito antibacteriano dos extratos da polpa e sementes da camarinha na estirpe *Klebsiella pneumoniae*.

- |  |   |
|--|---|
| 1 – Antibiótico CIP 5 (controlo positivo)  | 7 – 4 mg de extrato da polpa de camarinha     |
| 2 – Antibiótico CTX 30 (controlo positivo) | 8 – 1 mg de extrato de sementes da camarinha  |
| 3 – 40 µL de acetona (controlo negativo)   | 9 – 2 mg de extrato de sementes da camarinha  |
| 4 – 1 mg de extrato de polpa da camarinha  | 10 – 3 mg de extrato de sementes da camarinha |
| 5 – 2 mg de extrato da polpa de camarinha  | 11 – 4 mg de extrato de sementes da camarinha |
| 6 – 3 mg de extrato da polpa de camarinha  |   |

**Tabela 14.** Avaliação da atividade antibacteriana dos antibióticos utilizados nas estirpes selecionadas.

Antibióticos	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Ciprofloxacina (CIP 5) - halo de inibição (mm)	27,0 Susceptível	30,0 Susceptível	29,0 Susceptível
Cefotaxima (CTX 30) - halo de inibição (mm)	29,0 Susceptível	28,0 Susceptível	28,0 Susceptível

### 3.4. Teste de Viabilidade Celular

Realizou-se o teste de viabilidade celular das células CACO – 2, procedendo-se à incubação das células com os extratos das camarinhas em 5 concentrações diferentes, de forma a avaliar a toxicidade dos extratos do sumo sobre a viabilidade celular das células CACO - 2 após 6 horas de incubação (Tabela 15).

Os resultados obtidos para o teste de viabilidade celular das células CACO – 2, a partir de diferentes concentrações - 2, 4, 6, 8 e 10 (%/m/v), estão

apresentados no gráfico da Figura 31, representando a percentagem da viabilidade celular em função das diferentes concentrações dos extratos, onde é possível verificar que para concentrações mais elevadas de extrato conduziram a uma menor viabilidade celular.

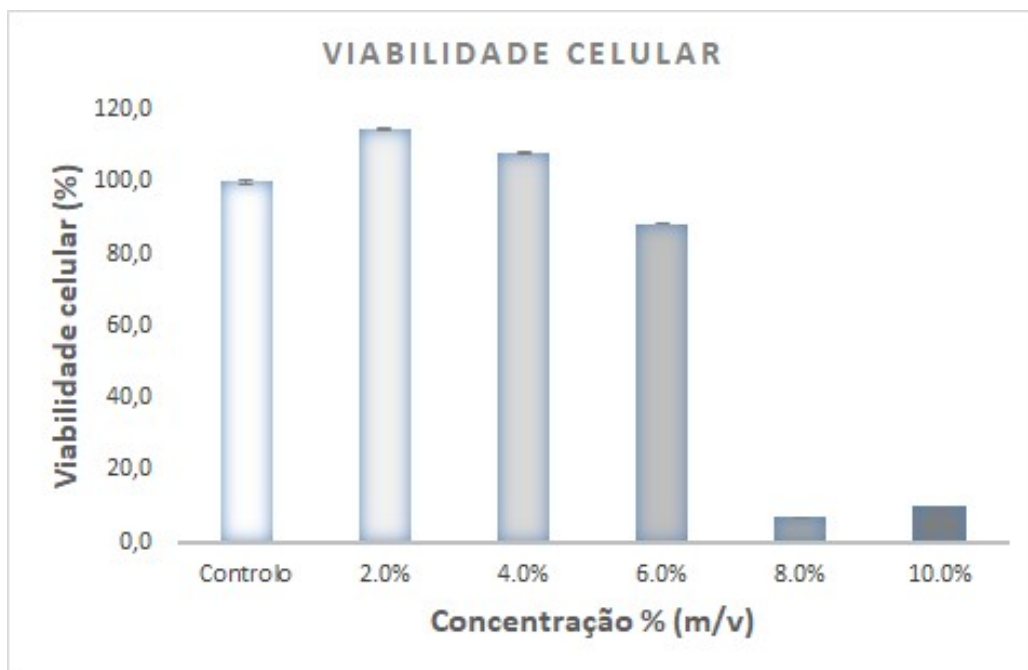
Conforme exposto na Figura 31, as concentrações de 6,0% m/v ( $88,4\% \pm 0,01$ ), 8,0% m/v ( $6,8\% \pm 0,01$ ) e 10,0% m/v ( $9,9\% \pm 0,05$ ) foram as que apresentaram menores níveis de viabilidade.

Relativamente ao extrato sob concentração mais alta (10,0% m/v), demonstrou não ser o que apresenta maior toxicidade (9,9%), se comparado ao extrato sob concentração de 8,0% m/v, qual apresentou uma menor viabilidade (6,8%), sendo que, para a concentração mais alta (10,0% m/v), a viabilidade deveria ser semelhante ou menor que a concentração de 8,0% m/v. Neste caso, sob uma perspectiva futura, a realização de um maior número de ensaios, aliado a uma gama maior de concentrações, seria fundamental como forma de clarificar tais resultados, de acordo com o devido comportamento celular.

De um modo geral, a partir dos resultados obtidos, é possível inferir que, concentrações maiores do que 4,0% (m/v) não são celularmente benéficas, já que apresentaram níveis de viabilidade celular menores do que 90%, sendo este um parâmetro considerável para estudos futuros e para a elaboração de produtos destinados à alimentação humana.

**Tabela 15.** Resultados de viabilidade celular das células CACO - 2, submetidas ao efeito do sumo de camarinha em diferentes concentrações, avaliados através do ensaio MTT após 6 horas de incubação.

Concentração % (m/v)	Viabilidade celular (%)	Desvio Padrão
Controlo	100,0	$\pm 0,38$
2,0	114,6	$\pm 0,15$
4,0	107,9	$\pm 0,20$
6,0	88,4	$\pm 0,01$
8,0	6,8	$\pm 0,01$
10,0	9,9	$\pm 0,05$

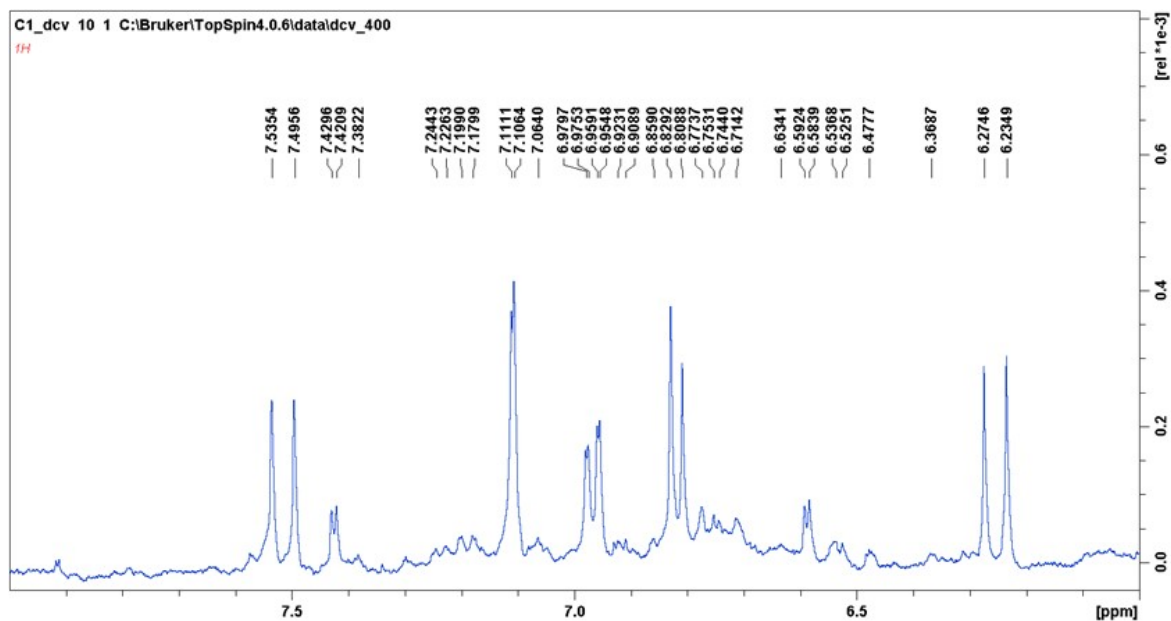


**Figura 31.** Gráfico dos resultados de viabilidade celular das células CACO - 2, submetidas ao efeito do sumo de camarinha em diferentes concentrações, avaliados através do ensaio MTT, após 6 horas de incubação.

### 3.5. Ressonância Magnética Nuclear

A análise das amostras de extratos de camarinha por espectroscopia de ressonância nuclear, permitiu proceder à identificação da presença de alguns grupos aromáticos, do tipo polifenol, em extratos de polpa desidratada de camarinha.

A Figura 32 apresenta em destaque a região de sinais associada a prótons constituintes de grupos aromáticos (6.0 a 8.0 ppm) do espectro 1D  $^1\text{H}$  NMR de amostra de polpa desidratada. A análise permite identificar sinais que podem ser atribuídos ao ácido cumárico, ácido cafeico, ácido procatequino, hidroxitirosol e oleuropeínas (Christophoridou & Dais, 2009). Deste modo, é possível através deste primeiro ensaio preliminar, identificar algumas das moléculas que podem estar a contribuir para o teor de compostos polifenólicos totais e a capacidade antioxidante, identificados através dos métodos químicos por Folin Ciocalteu, ABTS, DPPH e FRAP.



**Figura 32.** Espectro 1D <sup>1</sup>H RMN de polpa desidratada de camarinha, apresentando a região do espectro associada aos sinais provenientes de grupos aromáticos (6.0 a 8.0 ppm), atribuídos ao ácido cumárico, ácido cafeico, ácido procatequino, hidroxitiroso e oleuropeínas.

## 4. Aplicações

### 4.1. Desenvolvimento de uma cerveja tipo *Ale* enriquecida com camarinha

A cerveja é uma das bebidas alcoólicas mais consumidas no mundo e tem grande aceitação devido aos seus atributos sensoriais. Quando ingerida de forma moderada, a cerveja apresenta valor nutritivo e diversidade de apresentação. Embora com elevado teor de antioxidantes, fibras, minerais e vitaminas (Bamforth et al., 2011), ainda pouco se conhece sobre os seus benefícios e componentes.

Rica em hidratos de carbono, aminoácidos, minerais e compostos fenólicos, o consumo moderado de cerveja demonstra impactos benéficos no sistema imunológico humano (Ducruet et al., 2017). Um estudo conduzido por Brien et al. (2011) que avaliou o efeito do consumo de álcool sobre marcadores biológicos associados ao risco de doença coronariana, constatou que o consumo de até 15 g de álcool por dia para mulheres e 30 g por dia para homens, resultou em mudanças favoráveis em vários biomarcadores cardiovasculares, como perfil lipídico plasmático, estado antioxidante total do plasma, assim como os níveis de fibrinogênio, adiponectina e apolipoproteína A1. Relativamente à cerveja, o consumo diário moderado corresponde a 330 mL para mulheres e 660 mL para homens (Díaz et al., 2002).

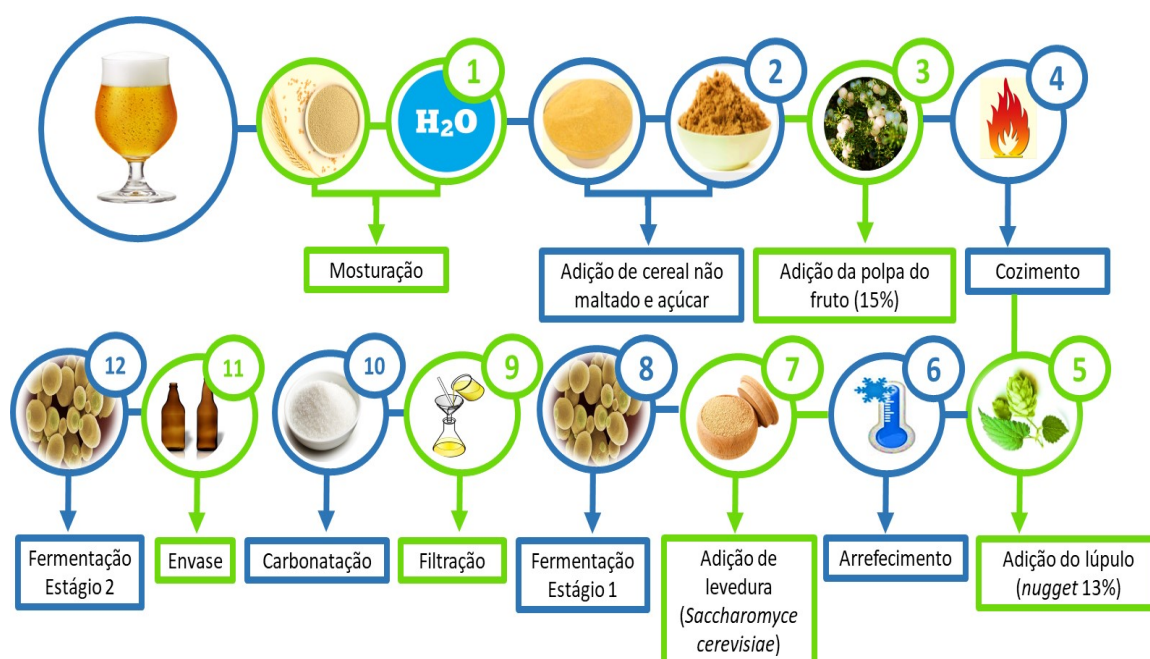
Os principais objetivos desta aplicação foram desenvolver uma nova alternativa à cerveja tradicional, procurando um nicho de mercado, além de valorizar o potencial comercial e económico da camarinha, associando a bebida formulada ao aumento das propriedades funcionais conferidas pelos frutos.

#### 4.1.1. Formulação e Fluxograma de Produção

As cervejas podem ser classificadas como “*Ale*” (*Porter, Stout, Saisons, Alt, Light ale, Pale ale, Bitters e Barley wines*) e “*Lager*” (*Bock, Dortmunder, Munchner, Pilsener e Vienna (Marzen)*), alta e baixa fermentação, respectivamente, sendo que, devido às altas temperaturas usadas no processo,

tanto os sabores quanto os aromas das cervejas tipo *lager* são mais suaves e leves em comparação às cervejas tipo *ale* (Araújo; Silva; Minim, 2003).

A cerveja foi desenvolvida com grau de carbonatação mais baixo, com adição de 5 à 6 g/L de açúcar após a fermentação de primeiro estágio, sob temperaturas de 12 a 15°C, sendo que a formulação foi determinada a partir dos componentes básicos da cerveja (água, malte, lúpulo, açúcar e fermento (*Saccharomyce cerevisiae*)), com adição da camarinha ao mosto (15%) e de cereal não maltado (milho) como forma de aumentar a capacidade da brassagem. As etapas de produção da cerveja estão descritas no fluxograma da Figura 33.



**Figura 33.** Fluxograma do processo de produção da cerveja enriquecida com camarinha.

Inicialmente, para a obtenção do mosto, ferveu-se 1,0 L de água filtrada e adicionou-se 150 g de malte (*Spraymalt Light Muntons*). O conteúdo foi mantido em ebulição durante 5 minutos e deixado arrefecer. Posteriormente dissolveu-se 50 mL do mosto obtido em um 1 L de água filtrada e adicionou-se 25 g de milho (sêmola), 62,5 g de açúcar amarelo e 15% de camarinha. O conteúdo foi levado à ebulição durante 30 minutos e após este período foi adicionado 1 g de lúpulo (*nugget* 13% m/v). Em seguida, o mosto foi arrefecido até atingir uma temperatura média de 30°C. Adicionou-se 1,5 g de levedura em pó (*Saccharomyce cerevisiae*), após hidratação da mesma durante 20 minutos. O conteúdo foi vertido para um

um frasco de vidro rolhado e armazenado por um período de 48 horas, em local fresco (12 a 15°C) para a fermentação de primeiro estágio.

Passadas 48 horas, procedeu-se à filtração simples (tecido grosso) e em sequência foi realizada a carbonatação de baixo grau, típica para cervejas tipo *Ale*, através da adição de 6 g/L de açúcar branco. Após a adição do açúcar, a cerveja foi envasada e mantida em local fresco (12 a 15°C) durante 15 dias, para que se procedesse a fermentação de segundo estágio.

Após o período de fermentação de segundo estágio, obteve-se o produto final (Figura 34) e foram analisados parâmetros físico-químicos como teor de sólidos solúveis (% °Brix), teor alcoólico (% v/v), pH, além de avaliado o efeito sobre o conteúdo fenólico total pelo método *Folin-Ciocalteu* e capacidade antioxidante total pelos métodos ABTS e DPPH.



**Figura 34.** Cerveja de camarinha após 15 dias da fermentação de segundo estágio.

#### **4.1.2. Teor alcoólico, sólidos solúveis totais e pH**

O álcool provável e Brix da cerveja de camarinha foram determinados com auxílio a um refratômetro digital modelo HI 96813. O pH foi determinado com auxílio a um potenciômetro de bancada Hanna modelo pH 212. As análises também foram realizadas à uma cerveja tipo *Ale* de fabricação nacional, que foi usada como controlo. As análises foram realizadas em triplicado.

O valor obtido para o álcool provável (% v/v) da cerveja de camarinha, tendo em consideração o valor teórico produzido a partir do valor dos sólidos solúveis presentes na cerveja foi de  $5,70 \% \pm 0,00$ , enquanto que para a cerveja controlo foi  $5,08 \% \pm 0,00$ . Relativamente ao teor de sólidos solúveis (% °Brix), a cerveja de camarinha apresentou um valor de  $3,00 \% \pm 0,00$  e a cerveja controlo  $5,63 \% \pm 0,06$ .

Num estudo conduzido por Moura-Nunes et al. (2016), em que se analisaram vinte e nove cervejas brasileiras, de quatorze marcas comerciais diferentes, determinaram-se valores para teor alcoólico (% v/v). Para todas as cervejas analisadas, o teor alcoólico variou de 4,0 a 6,5 % v/v e 0,0 a 0,3 % v/v para as cervejas não alcoólicas. Tendo em conta os resultados do estudo anteriormente citado, é possível observar que a cerveja de camarinha se manteve dentro do intervalo dos valores referenciados de teor alcoólico ( $5,70 \% \pm 0,00$ ), sendo superior a cerveja de fabricação nacional utilizada como controlo ( $5,08 \% \pm 0,00$ ).

A monitorização rigorosa dos processos fermentativos, fase em que os açúcares são convertidos em álcool, é fundamental para a obtenção do teor alcoólico desejável. Essa fase depende de muitos mecanismos celulares, sendo influenciada por diversos fatores, tais como a temperatura, pH, oxigénio dissolvido, agitação, disponibilidade de açúcares, nutrientes, presença de contaminantes e taxa de inoculação (Vivian et al., 2016).

Relativamente ao malte e ao cereal não maltado (milho), as quantidades destes cereais que foram utilizadas na produção da cerveja de camarinha, assim como a adição das camarinhas, podem ter contribuído para os resultados de teor alcoólico, relativamente superiores à cerveja controlo.

O valor de pH obtido para a cerveja de camarinha foi de  $3,91 \pm 0,01$ , enquanto que para a cerveja controlo foi  $4,40 \pm 0,00$ . Um estudo realizado por Nardini; Garaguso (2020) analisou diferentes tipologias de cervejas de frutas, entre cereja, ameixa, framboesa, pêssigo, damasco, uva, maçã e laranja, sendo que todas as cervejas foram produzidas pelo fabricante com a adição das frutas frescas à cerveja durante a primeira etapa do processo de fermentação. Os valores de pH nas cervejas de frutas variaram de 3,56 a 4,86. É possível observar

que o valor de pH da cerveja de camarinha ( $3,91 \pm 0,01$ ) encontra-se dentro do intervalo dos resultados obtidos nesse estudo, sendo superior para as cervejas com adição de cereja (3,71/3,86); framboesa (3,73/3,64); damasco (3,60) e ameixa (3,56). Desta forma é possível inferir que a adição da camarinha durante o processo de produção da cerveja pode ter influenciado no resultado da determinação do pH.

#### **4.1.3. Quantificação dos compostos fenólicos totais da cerveja**

A determinação do teor de compostos fenólicos totais da cerveja de camarinha e da cerveja controlo foram efetuadas através do método *Folin-Ciocalteu*, realizado de acordo com o procedimento de Gao et al. (2007), seguindo a mesma metodologia empregada na quantificação dos compostos fenólicos dos extratos da camarinha (2.3.2.) do presente estudo. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de amostra (mg GAE/100 g).

Entre os vários componentes antioxidantes presentes na cerveja, como produtos da reação de Maillard e sulfitos, os compostos fenólicos são de particular interesse por parte dos fabricantes, já que desempenham um papel muito importante no processo de fermentação, retardando ou impedindo os processos de oxidação (Zhao et al., 2010). De acordo com Vanderhaegen et al. (2006), a maior parte da fração de polifenóis presentes na cerveja é originária do malte de cevada (70 a 80%), sendo os outros 20 a 30% originários do lúpulo.

A cerveja de camarinha apresentou um teor de compostos fenólicos totais de 100,64 mg GAE/L  $\pm 1,57$ , demonstrando ser inferior à cerveja controlo (187,88 mg GAE/L  $\pm 4,62$ ). Em um estudo realizado por Zhao et al. (2010), investigou-se trinta e quatro amostras de cervejas comerciais, sendo que os resultados exibiram diferenças consideráveis no teor fenólico total, variando de 152,01 mg GAE/L a 339,12 mg GAE/L, tornando possível observar que a cerveja enriquecida com camarinha obteve valores inferiores aos encontrados no referido estudo, enquanto a cerveja controlo encontra-se dentro do intervalo dos resultados.

No estudo realizado por Nardini; Garaguso (2020), onde foi determinado o teor de compostos fenólicos totais através do método *Folin-Ciocalteu*, para diferentes cervejas comerciais de frutas variadas (cereja, ameixa, framboesa, pêssego, damasco, uva, maçã e laranja) os valores do conteúdo fenólico total variaram de 399,00 mg GAE/L  $\pm$  11,00 a 767 mg GAE/L  $\pm$  13,00, consideravelmente superiores à cerveja de camarinha, o que torna possível considerar um aumento na quantidade dos frutos utilizados durante o processo de produção da cerveja, já que em relação ao estudo anteriormente mencionado, a quantidade das frutas utilizadas, especificadas pelos fabricantes, foram superiores a quantidade de camarinha utilizada na produção da cerveja do presente estudo.

No caso das cervejas, o teor de compostos fenólicos deve ser analisado com cautela, já que diversos fatores relacionados às etapas de fabrico e os ingredientes e aditivos utilizados influenciam o parâmetro analisado. Durante o processo de produção, a adição de lúpulo, dos cereais e do malte leva a um aumento no conteúdo de compostos antioxidantes naturais da cerveja, principalmente os compostos fenólicos, produtos da reação de Maillard e sulfitos (Moura-Nunes et al., 2016). Desta forma, as diferenças de matérias primas e do processo de fermentação conduzem a diferenças significativas no perfil fenólico e consequentemente na atividade antioxidante das cervejas (Zhao et al., 2010).

Para Nardini e Garaguso (2020), o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante da cerveja, dependem da quantidade e qualidade da matéria prima e aditivos utilizados e do processo de fabrico da cerveja, sendo que cervejas com maior quantidade de antioxidantes fenólicos exibem melhor qualidade, além de uma maior estabilidade do aroma, sabor e espuma, e vida útil mais longa, se comparadas às cervejas com menor atividade antioxidante.

#### **4.1.4. Capacidade Antioxidante - ABTS e DPPH**

A capacidade antioxidante da cerveja enriquecida com camarinha e da cerveja controlo foi determinada através dos ensaios ABTS, adaptado de acordo com o procedimento de Gao et al. (2007).e DPPH, conforme procedimento descrito por Brand-Williams, Cuvelier & Berset (1995). Ambos os ensaios empregados seguiram a mesma metodologia para a determinação da capacidade

antioxidante dos extratos da camarinha, pela redução do radical ABTS (2.2.3.) e DPPH (2.3.4.). Os resultados foram expressos em mg VCEAC/100 g de amostra.

Relativamente à determinação da capacidade antioxidante total através do método ABTS, a cerveja de camarinha apresentou uma capacidade antioxidante total de 111,86 mg VCEAC/100 g  $\pm$  0,51 e a cerveja controlo 134,13 mg VCEAC/100 g  $\pm$  1,02, resultados esperados já que a cerveja de camarinha também apresentou um menor conteúdo fenólico em relação à cerveja controlo. A capacidade antioxidante da cerveja de camarinha foi consideravelmente superior aos resultados obtidos por Floegel et al. (2011), onde analisou a capacidade antioxidante através do método ABTS de uma cerveja convencional (46,10 mg VCEAC/100 g  $\pm$  0,30) e de uma cerveja leve (29,30 mg VCEAC/100 g  $\pm$  0,30). Nardini e Garaguso (2020) avaliou a capacidade antioxidante através do método ABTS de diferentes cervejas comerciais de frutas variadas, sendo que os resultados variaram de 1,62  $\pm$  0,02 mM de Trolox/L a 3,53  $\pm$  0,06 mM de Trolox/L. Neste caso, o método empregado para a determinação da capacidade antioxidante foi o mesmo, todavia, os resultados não podem ser comparados, já que o padrão utilizado na análise foi diferente.

Relativamente à determinação da capacidade antioxidante total da cerveja de camarinha e da cerveja controlo, através do ensaio DPPH, os resultados encontrados foram 93,20 mg VCEAC/100 g  $\pm$  0,87 e 108,08 mg VCEAC/100 g  $\pm$  2,89, respetivamente. Assim como para o método ABTS, a cerveja controlo apresentou atividade antioxidante superior à cerveja de camarinha, resultado este já esperado, tendo em conta que a cerveja controlo também apresentou um teor de compostos fenólicos totais superior.

Floegel et al. (2011) também avaliou a capacidade antioxidante de duas cervejas comerciais e vinhos de mesa branco e tinto através do ensaio DPPH. Em comparação ao referido estudo, a cerveja de camarinha apresentou capacidade antioxidante superior à cerveja convencional (30,20 mg VCEAC/100g  $\pm$  1,40) e à cerveja leve (12,20 mg VCEAC/100g  $\pm$  0,50). A capacidade antioxidante total da cerveja de camarinha também foi consideravelmente superior ao valor encontrado para o vinho de mesa branco (30,60 mg VCEAC/100 g  $\pm$  1,90) e inferior para o vinho tinto (196,40 mg VCEAC/100 g  $\pm$  0,10).

Para Zhao et al. (2010), é difícil comparar os dados da literatura quanto a atividade antioxidante e o perfil fenólico das cervejas devido à falta de acordo sobre métodos apropriados, sendo que, o emprego de diferentes métodos para avaliação da atividade antioxidante, baseados em diferentes mecanismos de reação, podem fornecer vários resultados de avaliação e, visto que a cerveja é uma mistura complexa de compostos naturais, as atividades e os mecanismos dos antioxidantes dependem em grande parte da composição e das condições do sistema de teste.

## 5. Conclusão

As camarinhas são frutos muito versáteis, podendo ser tanto consumidas frescas quanto utilizadas no preparo de sobremesas, compotas, geleias, licores, refrescos, saladas, biscoitos dentre outras preparações. Todavia, com as crescentes alterações do ecossistema, principalmente devido ao avanço da urbanização e a degradação de seu habitat natural, a camarinha perdeu notoriedade e a espécie vem apresentando sinais inequívocos de que se encontra em vulnerabilidade.

Neste sentido, o presente estudo teve importante contribuição com o resgate do reconhecimento da espécie e a confirmação de seu valor nutricional, através da caracterização físico-química e da determinação dos principais compostos bioativos presentes tanto no fruto quanto nas folhas e flores, matrizes essas ainda pouco estudadas.

Relativamente à caracterização química, os resultados demonstraram que a camarinha é um fruto constituído majoritariamente por água e com elevado teor de sólidos solúveis em estágios mais avançados de maturação. Essas características, aliadas a uma acidez típica, sabor muito característico e a versatilidade nas formas de consumo e utilização, tornam as camarinhas frutos interessantes para alguns nichos de mercado e com significativo potencial para integrar o mercado dos pequenos frutos, principalmente devido ao fato de serem um recurso natural e sustentável, já que se desenvolvem de forma espontânea nos seus habitats.

Os resultados do presente estudo também revelaram que as camarinhas são frutos com interessante teor de compostos fenólicos totais e considerável capacidade antioxidante, revelando um potencial atrativo para o consumidor e promissor para o aproveitamento tecnológico na indústria alimentar. Alguns estudos sugerem que os compostos fenólicos presentes no fruto podem ser contributos importantes no combate a algumas doenças relacionadas ao stress oxidativo e na quimioproteção celular. A análise de ressonância magnética nuclear, realizada em extratos da polpa de camarinha, identificou os ácidos cumárico, caféico, procatequino, hidroxitiroso e oleuropeínas, como principais polifenóis que podem estar contribuindo com o teor fenólico total e a capacidade

antioxidante do fruto. As folhas e flores também apresentaram importante bioatividade, o que pode representar um conjunto importante de fitoquímicos para ser explorado em investigações futuras.

O presente estudo também teve significativa contribuição ao determinar pela primeira vez o perfil de ácidos gordos em diferentes matrizes da planta (polpa, folhas e sementes), sendo que quantidades significativas de ácidos gordos polinsaturados foram identificados, resultados estes muito interessantes, já que alguns estudos sugerem a relação de efeitos neuroprotetores aos ácidos gordos polinsaturados, assim como elevada capacidade antioxidante e anti-inflamatória. Neste aspecto, novos estudos devem ser considerados a fim de avaliar relação dos principais ácidos gordos e a bioatividade presente nas diferentes matrizes da planta, assim como o potencial benéfico destes para a saúde humana.

Em relação ao estudo preliminar a fim de avaliar a toxicidade dos extratos de camarinha sobre a viabilidade celular em células CACO-2, os resultados demonstraram uma viabilidade celular elevada na presença de baixas concentrações dos extratos e que torna possível a absorção a nível gastrointestinal. Contudo, uma consolidação dos resultados obtidos no presente estudo deve ser considerada, sendo de fundamental importância novas investigações futuras ao parâmetro analisado, a fim de garantir a segurança para eventuais elaborações de produtos alimentares com a incorporação do fruto.

Apesar de não ter sido encontrado indícios de atividade antibacteriana nos extratos da polpa e sementes de camarinha para as estirpes selecionadas nesta investigação, como forma de obter resultados mais valorosos e completos, novos estudos que explorem a utilização de outras estirpes de microrganismos (bactérias e fungos) e que testem novos extratos, considerando também outras partes da planta, precisam ser ponderados.

Todos os experimentos realizados no presente estudo contribuem significativamente para uma melhor compreensão a respeito do fruto, suas características físico-químicas, bioatividade e os possíveis efeitos benéficos para a saúde humana. A camarinha pode ser uma alternativa interessante e viável para alguns nichos de mercado no desenvolvimento de novos produtos, sendo que a

divulgação das características do fruto pode impulsionar consideravelmente a adesão pelo consumidor.

Diante do exposto, a camarinha pode também ser uma alternativa interessante como fonte de renda para a população rural situada nas zonas onde a planta se desenvolve, através da criação de associações e cooperativas que possibilitem um circuito direto entre produtores e consumidores, a partir da venda do produto in natura e/ou na transformação industrial em pequena escala.

Relativamente à aplicação da pesquisa, foi desenvolvida uma cerveja tipo *Ale* com a incorporação de camarinha, cuja principal finalidade foi valorizar o potencial comercial e económico do fruto, além de conferir um aumento das propriedades funcionais da bebida.

Apesar da cerveja de camarinha ter apresentado valores de conteúdo fenólico total abaixo dos reportados pela literatura, a sua capacidade antioxidante total demonstrou ser superior a outras duas cervejas comerciais. Possivelmente, alguns compostos bioativos presentes no fruto possam ter contribuído com os resultados alcançados. Sendo assim, a utilização da camarinha como adjunto no processamento da cerveja pode apresentar-se como alternativa viável para o processo de fabrico de cervejas artesanais.

A partir da prova do produto final, numa análise subjetiva, é possível definir o produto final como uma cerveja de sabor levemente ácido e frutado e com suave amargor. Deste modo, sabores mais disruptivos aliados ao aumento das propriedades funcionais do produto pode agregar atributos diferenciados e capazes de surpreender o consumidor. No entanto, deve-se considerar a realização de novas formulações, com a finalidade de aumentar a qualidade de atributos importantes do ponto de vista do consumidor, como a cor, sabor, aroma e a formação e persistência da espuma, sendo que o grau de carbonatação, quantidade de lúpulo (alfa ácidos) e o tipo de cereais utilizados, interferem diretamente na sua qualidade.

## Bibliografia

- Abe, L. T., Da Mota, R. V., Lajolo, F. M., Genovese, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 394–400, jun. 2007.
- Almeida, M. M. B., De Souza, P. H. M., Arriaga, A. M. C., Do Prado, G. M., Magalhães, C. E. C., Maia, G. A., De Lemos, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2155–2159, 1 ago. 2011.
- Alothman, M.; Bhat, R.; Karim, A. A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 785–788, 1 ago. 2009.
- Álvarez-Cansino, L. A., Zunzunegui, M., Barradas, M. C. D., Esquivias, M. P. Gender-specific costs of reproduction on vegetative growth and physiological performance in the dioecious shrub *Corema album*. **Annals of Botany**, p. 989–998, 2010.
- Ames, B. N.; Shigenaga, M. K.; Hagen, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging (cancer/mutation/endogenous/DNA adducts/oxygen radicals). **PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Vol. 90, pp. 7915-7922, USA, 1993.
- Andrade, S. C. Estudo das Propriedades Físico-Químicas e Avaliação de Compostos Bioativos em Camarinhas (*Corema album* D. Don). **Instituto Politécnico de Viseu. Escola Superior Agrária**. Julho, 2016.
- Andrade, S. C.; Gonçalves, F.; Pf Guiné, R. Contribution for the physical-chemical characterization of Portuguese Crowberry (*Corema album*). **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 2, p. 9–14, 2017.
- Andrade, S. C.; Guiné, R. P. F.; Gonçalves, F. J. A. Evaluation of phenolic compounds, antioxidant activity and bioaccessibility in white crowberry (*Corema album*). **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 11, n. 4, p. 1936–1946, 17 dez. 2017.
- Antunes da Costa, C. Factores que condicionam a dispersão e o recrutamento da camarinha em sistemas dunares. **Universidade de Lisboa. Faculdade de Ciências. Departamento de Biologia Animal**. Lisboa, 2011.
- Araújo, F. B.; Silva, P. H. A.; Minim, V. P. R. Perfil sensorial e composição físico-química de cervejas provenientes de dois segmentos do mercado brasileiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 121–128, ago. 2003.

- Atala, E., Vásquez, L., Speisky, H., Lissi, E., López-Alarcón, C. Ascorbic acid contribution to ORAC values in berry extracts: An evaluation by the ORAC-pyrogallol red methodology. **Food Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 331–335, 1 mar. 2009.
- Bamforth, C. W. et al. **Beer: A Quality Perspective**. Bamforth C.W ed. [s.l.] Elsevier, 2011.
- Bardakci, H., Celep, E., Gozet, T., Kan, Y., Kirmizibekmez, H. Phytochemical characterization and antioxidant activities of the fruit extracts of several *Crataegus* taxa. **South African Journal of Botany**, v. 124, p. 5–13, 1 ago. 2019.
- Braham, F. Carvalho, D. O., Almeida, C. M. R., Zaidi, F., Magalhães, J. M. C. S., Guido, L. F., Gonçalves, M. P. Online HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from *Moringa oleifera* leaves. **South African Journal of Botany**, 13 maio 2019.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1 jan. 1995.
- Bras De Oliveira, P.; Dale, A. *Corema album* (L.) D. Don, the white crowberry-a new crop. **Journal of Berry Research**, v. 2, p. 123–133, 2012.
- Brien, S. E., Ronksley, P. E., Turner, B. J., Mukamal, k. J., Ghali, W. A., . Effect of alcohol consumption on biological markers associated with risk of coronary heart disease: systematic review and meta-analysis of interventional studies. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 342, p. d636, 22 fev. 2011.
- Calviño-Cancela, M. Ingestion and dispersal: Direct and indirect effects of frugivores on seed viability and germination of *Corema album* (Empetraceae). **Acta Oecologica**, v. 26, n. 1, p. 55–64, jul. 2004.
- Calviño-Cancela, M. Fruit consumers and seed dispersers of the rare shrub *Corema album*, Empetraceae in coastal sand dunes. **Revue d'Ecologie (La Terre et la Vie)**, v. 60, n. 2, p. 97–106, 2005.
- Clavijo, A., Díaz, M. C., Ain-Lhout, F., Correia, O. A fragmentação como causa principal da redução do habitat de *Corema album* na sua área de distribuição. **Revista de Biologia**, v. 20, n. June 2014, p. 109–120, 2002.
- Clavijo, A., Díaz Barradas, M. C., Zunzunegui, M. Ain-Lhout, F., Alvarez Cansino, L., Correia, O., Garcia Novo, F. A Conservação de *Corema album* no Litoral Atlântico da Península Ibérica; A influência de dispersores animais na regeneração natural. **Revista Biol.**, p. 43–53, 2003.
- Denardin, C. C., Hirsch, G. E., Da Rocha, R. F., Vizzotto, M., Henriques, A. T., Moreira, J. C. F., Guma, F. T. C. R., Emanuelli, T. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 387–398, 1 set. 2015.

- Di Vittori, L., Mazzoni, L., Battino, M., Mezzetti, B. Pre-harvest factors influencing the quality of berries. **Scientia Horticulturae**, v. 233, p. 310–322, 15 mar. 2018.
- Díaz, L., Montero, A., González-Gross, M., Vallejo, A., Romeo, J., Marcos, A. Influence of alcohol consumption on immunological status: a review. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, n. S3, p. S50–S53, 30 ago. 2002.
- Dong, X., Hu, Y., Li, Y., Zhou, Z. The maturity degree, phenolic compounds and antioxidant activity of Eureka lemon [*Citrus limon* (L.) Burm. f.]: A negative correlation between total phenolic content, antioxidant capacity and soluble solid content. **Scientia Horticulturae**, v. 243, p. 281–289, 3 jan. 2019.
- Ducruet, J., Rébénacque, P., Diserens, S., Kosinska-Cagnazzo, A., Héritier, I., Andlauer, W. Amber ale beer enriched with goji berries – The effect on bioactive compound content and sensorial properties. **Food Chemistry**, v. 226, p. 109–118, 1 jul. 2017.
- Duthie, S. Berry phytochemicals, genomic stability and cancer: Evidence for chemoprotection at several stages in the carcinogenic process. **Molecular nutrition & food research**, v. 51, p. 665–674, 1 jun. 2007.
- Fernández, A., Grienke, U., Soler-Vila, A., Guihéneuf, F., Stengel, D. B., Tasdemir, D. Seasonal and geographical variations in the biochemical composition of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) from Ireland. **Food Chemistry**, v. 177, p. 43–52, 15 jun. 2015.
- Ferreres, F., Gomes, D., Valentão, P., Gonçalves, R., Pio, R., Chagas, E. A., Seabra, R. M., Andrade, P. B. Improved loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars: Variation of phenolics and antioxidative potential. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 1019–1027, 1 jun. 2009.
- Floegel, A., Dae-Ok, K., Sang-Jin, C., Koo, S. I., Chun, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 7, p. 1043–1048, 1 nov. 2011.
- Fogh, J.; Fogh, J. M.; Orfeo, T. One Hundred and Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in Nude Mice<sup>23</sup>. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 59, n. 1, p. 221–226, jul. 1977.
- Fonseca, M. D. S.; Santos, V. A. Q.; Cunha, M. A. A. Determinação de Compostos Fenólicos, Antocianinas e Atividade Antioxidante de Mirtilos em Protocolos com Diferentes Agentes Extratores. p. 370. In: **In Anais do V Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia - VSIMBBTEC [=Blucher Biochemistry Proceedings]**. São Paulo: Blucher, 2015.
- Fraga, C. G. Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology. **Wiley. John Wiley & Sons**. Inc., Hoboken, New Jersey, 2010.

- Fuentealba, J., Dibarrart, a. J., Fuentes-Fuentes, M. C., Saez-Orellana, F., Quiñones, K., Guzmán, L., Perez, C., Becerra, J., Aguayo, L. G. Synaptic failure and adenosine triphosphate imbalance induced by amyloid- $\beta$  aggregates are prevented by blueberry-enriched polyphenols extract. **Journal of Neuroscience Research**, v. 89, n. 9, p. 1499–1508, set. 2011.
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8813–8826, dez. 2010.
- Garriga, M.; Almaraz, M.; Marchiaro, A. Determination of reducing sugars in extracts of *Undaria pinnatifida* (harvey) algae by UV-visible spectrophotometry (DNS method). **Actas de Ingeniería**, v. 3, p. 173–179, 2017.
- Gião, M. S., González-Sanjosé, M. L., Rivero-Pérez, M. D., Pereira, C. I., Pintado, M. E., Malcata, F. X. Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 14, p. 2638–2647, nov. 2007.
- Gil-López, M. J. Etnobotánica de la Camarina (*Corema album*, Empetraceae) en Cádiz. **Acta Botanica Malacitana**, p. 137–144, 2011.
- Gomez Perez, M., Fourcade, L., Mateescu, M. A., Paquin, J. Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds. **Analytical Biochemistry**, v. 535, p. 43–46, 15 out. 2017.
- Gutián, P.; Medrano & Mónica Rodríguez, M. Reproductive biology of *Corema album* (L.) D. Don (Empetraceae) in the northwest Iberian Peninsula. **Acta Botanica Gallica**, v. 144, n. 1, p. 119–128, 1997.
- Guo, W., Li, W., Yang, B., Zhu, Z. Z., Liu, D., Zhu, X. A novel noninvasive and cost-effective handheld detector on soluble solids content of fruits. **Journal of Food Engineering**, v. 257, p. 1–9, 1 set. 2019.
- INSA. **Parte Edível**. Disponível em: <<http://portfir.insa.pt/foodcomp/ediblepart>>. Acesso em: 22 abr. 2019.
- Jones, A., Pravadali-Cekic, S., Dennis, G. R., Bashir, R., Mahon, P. J., Shalliker, R. A. Ferric reducing antioxidant potential (FRAP) of antioxidants using reaction flow chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 967, p. 93–101, 15 maio 2017.
- Kä, M. P.; Hopia, A. I.; Heinonen, M. Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4076–4082, 2001.
- Kandi, S.; Charles, A. L. Statistical comparative study between the conventional DPPH spectrophotometric and dropping DPPH analytical method without spectrophotometer: Evaluation for the advancement of antioxidant activity

- analysis. **Food Chemistry**, v. 287, p. 338–345, 30 jul. 2019.
- Koca, I.; Karadeniz, B. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. **Scientia Horticulturae**, v. 121, n. 4, p. 447–450, 4 ago. 2009.
- Larrinaga, A. R. Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) select small seeds when feeding on the fruits of *Corema album*. **Ecological Research**, v. 25, n. 1, p. 245–249, jan. 2010.
- Larrinaga, A. R.; Guitián, P. Intraspecific variation in fruit size and shape in *Corema album* (Ericaceae) along a latitudinal gradient: from fruits to populations. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 118, n. 4, p. 940–950, 2016.
- Lee, S. K.; Kader, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, n. 3, p. 207–220, 1 nov. 2000.
- León-González, A. J., Mateos, R., Ramos, S., Ángeles Martín, M., Sarriá, B., Martín-Cordero, C., López-Lázaro, M., Bravo, L., Goya, L. Chemo-protective activity and characterization of phenolic extracts from *Corema album*. **Food Research International**, v. 49, n. 2, p. 728–738, 1 dez. 2012.
- León-González, A. J., Truchado, P., Tomás-Barberán, F. A., López-Lázaro, M., Díaz Barradas, M., Martín-Cordero, C. Phenolic acids, flavonols and anthocyanins in *Corema album* (L.) D. Don berries. **Journal of Food Composition and Analysis**, p. 58–63, 2013.
- Levy, P., Cherqui, L., Robert, A., Wicek, D., Picard, J. Changes in glycosaminoglycan sulfation and protein kinase C subcellular distribution during differentiation of the human colon tumor cell line Caco-2. **Experientia**, v. 45, n. 6, p. 588–591, jun. 1989.
- Lisboa, A. C. O. Germinação de sementes e desenvolvimento embrionário de *Corema album*: Efeito dos tratamentos físicos e químicos. **Universidade de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia**. Lisboa, 2017.
- Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H., Schubert, D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. **Journal of Neurochemistry**, 1997.
- Lü, L., Zhang, L., Sen Mun Wai, M., Tai Wai Yew, D., Xu, J. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 4, p. 636–644, 1 jun. 2012.
- Macedo, D., Tavares, L., McDougall, G. J., Miranda, H. V., Stewart, D., Ferreira, R. B., Tenreiro, S., Outeiro, T. F., Santos, C. N. (Poly)phenols protect from  $\alpha$ -synuclein toxicity by reducing oxidative stress and promoting autophagy. **Human Molecular Genetics**, v. 24, n. 6, p. 1717–1732, 2015.

- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability 1,2. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727–774, 2004.
- Miller, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, mar. 1959.
- Moura-Nunes, N., Cazaroti Brito, T., Dias da Fonseca, N., Fernandes de Aguiar, P., Monteiro, M., Perrone, D., Guedes Torres, A. Phenolic compounds of Brazilian beers from different types and styles and application of chemometrics for modeling antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 199, p. 105–113, 15 maio 2016.
- Moyer, R. A., Hummer, K. E., Finn, C. E., Frej, B., Wrolstad, R. E. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 519–525, 30 jan. 2002.
- Naczki, M.; Shahidi, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1–2, p. 95–111, 29 out. 2004.
- Nardini, M.; Garaguso, I. Characterization of bioactive compounds and antioxidant activity of fruit beers. **Food Chemistry**, v. 305, p. 125437, 1 fev. 2020.
- Nunes, R., Rodrigues, S., Pasko, P., Tyszka-Czochara, M., Grenha, A., Saraiva de Carvalho, I. Effect of Erica australis extract on Caco-2 cells, fibroblasts and selected pathogenic bacteria responsible for wound infection. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 99–104, 1 jan. 2014.
- Oliveira, F. M. Avaliação da resposta anti-inflamatória de um extrato de Vaccinium corymbosum (mirtilo) num modelo de Artrite Reumatóide. **Universidade de Lisboa. Faculdade de Farmácia**. Lisboa, 2012.
- Pimpão, R. C., Dew, T., Oliveira, P.B., Williamson, G., Ferreira, R. B., Santos. C. N. Analysis of Phenolic Compounds in Portuguese Wild and Commercial Berries after Multienzyme Hydrolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 4053–4062, 2013.
- Pineli, L. de L. de O., Moretti, C. L., dos Santos, M. S., Campos, A. B., Brasileiro, A. V., Córdova, A. C., Chiarello, M. D. Antioxidants and other chemical and physical characteristics of two strawberry cultivars at different ripeness stages. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 1, p. 11–16, 1 fev. 2011.
- Reche, J., Almansa, M. S., Hernández, F., Carbonell-Barrachina, A. A., Legua, P., Amorós, A. Fatty acid profile of peel and pulp of Spanish jujube (Ziziphus jujuba Mill.) fruit. **Food Chemistry**, v. 295, p. 247–253, 15 out. 2019.
- Ribeiro e Gamito. Plano de Gestão das Bacias Hidrográficas dos rios Vouga, Mondego e Lis Integrados na Região Hidrográfica 4. Parte 2- Caracterização Geral e Diagnóstico. 1.3-Geológica e Geomorfológica, junho de 2012, revisão final, p.41. **Ministério da Agricultura, Mar,**

**Ambiente e Ordenamento do Território; Administração da Região Hidrográfica do Centro.** Disponível em: <[https://sniambgeoviewer.apambiente.pt/Geodocs/geoportaldocs/Planos/PGRH4/RB%5CParte2%5C1.Caracterizacao\\_Geral%5C1.3\\_Geologica%5Crh4\\_p2\\_s1\\_3\\_rt\\_final.pdf](https://sniambgeoviewer.apambiente.pt/Geodocs/geoportaldocs/Planos/PGRH4/RB%5CParte2%5C1.Caracterizacao_Geral%5C1.3_Geologica%5Crh4_p2_s1_3_rt_final.pdf)>.

- Rodrigues, E., Poerner, N., Rockenback, I. I., Gonzaga, L. V., Mendes, C. R., Fett, R. Phenolic compounds and antioxidant activity of blueberry cultivars grown in Brazil. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 31, n. 4, p. 911–917, dez. 2011.
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., De Brito, E. S., De Moraes, S. M., Sampaio, C. G., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2006.
- Sánchez-Salcedo, E. M., Sendra, E., Carbonell-Barrachina, A. A., Martínez, J. J., Hernández, F. Fatty acids composition of Spanish black (*Morus nigra* L.) and white (*Morus alba* L.) mulberries. **Food Chemistry**, v. 190, p. 566–571, 1 jan. 2016.
- Santos, M. S., de Oliveira, C. M., Valdivieso, T., de Oliveira, p. B. Effects of pretreatments on *Corema album* (L.) D. Don (subsp. *album*) seeds' germination. **Journal of Berry Research**, v. 4, p. 183–192, 2014.
- Satogami, K., Tseng, P. T., Su, K. P., Takahashi, S., Ukai, S., Li, D. J., Chen, T. Y., Lin, P. Y., Chen, Y. N., Matsuoka, Y. J. Relationship between polyunsaturated fatty acid and eating disorders: Systematic review and meta-analysis. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 142, p. 11–19, 1 mar. 2019.
- Silva, C. O., Simões, T., Novais, S. C., Pimparel, I, Granada, L., Soares, A., M. V. M., Barata, C., Lemos, M. F. L. Fatty acid profile of the sea snail *Gibbula umbilicalis* as a biomarker for coastal metal pollution. **Science of The Total Environment**, v. 586, p. 542–550, maio 2017.
- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., Sochor, J. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 10, p. 24673–706, 16 out. 2015.
- Soares, R. A. P. Análise de risco de instabilidade de arribas em São Pedro de Moel. **Universidade de Lisboa. Faculdade de Ciências. Departamento de Geologia**, Lisboa, 2013.
- Sridhar, K.; Charles, A. L. In vitro antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH and ABTS assays: Estimation methods for EC50 using advanced statistical programs. **Food Chemistry**, v. 275, p. 41–49, 1 mar. 2019.
- Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters, S. M., Webb, D. A. *Flora Europaea*. Vol. V. **Flora Europaea**, Cambridge University Press, v. 3, p. 381–382, 1980.

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 1 jan. 2007.
- Van de Velde, F., Grace, M. H., Esposito, D., Pirovani, M. E., Lila, M. A. Quantitative comparison of phytochemical profile, antioxidant, and anti-inflammatory properties of blackberry fruits adapted to Argentina. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 47, p. 82–91, 1 abr. 2016.
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., Derdelinckx, G. The chemistry of beer aging – a critical review. **Food Chemistry**, v. 95, n. 3, p. 357–381, 1 abr. 2006.
- Vázquez, C. V., Rojas, M. G. V., Ramírez, C. A., Chávez-Servín, J. L., García-Gasca, T., Martínez, R. a. F., García, O. P., Rosado, J. L., López-Sabater, C. M., Castellote, A. I., Montemayor, H. M. A., Carbot, K. T. Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin–Ciocalteu method. **Food Chemistry**, v. 176, p. 480–486, 1 jun. 2015.
- Vivian, A. F., Aoyagui, C. T., de Oliveira, D. N., Catharino, R. R. Mass spectrometry for the characterization of brewing process. **Food Research International**, v. 89, p. 281–288, 1 nov. 2016.
- Singleton, V. L., Joseph A. Rossi. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1 jan. 1965.
- Zhao, H., Chen, W., Lu, J., Zhao, W. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1150–1158, 1 abr. 2010.
- ZHU, J., Qi, J., Fang, Y., Xiao, X., Li, J., Lan, J., Tang, C.. Characterization of Sugar Contents and Sucrose Metabolizing Enzymes in Developing Leaves of *Hevea brasiliensis*. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 58, 2018.
- Zucco F., Batto A. N., Bises, G., Chambaz, J., Chiusolo, A., Consalvo, L., Cross, H., Dal Negro, G., de Angelis, I., Fabre, G., Guillou, F., Hoffman, S., Laplanche, I., Morel, E., Piçon-Raymond, M., Prieto, P., Turco, L., Ranaldi, G., Rousset, M., Sambuy, Y., Scarino, M. L., Torreilles, F., Stamatii, A . An Inter-laboratory Study to Evaluate the Effects of Medium Composition on the Differentiation and Barrier Function of Caco-2 Cell Lines. **Alternative to laboratory animals - ATLA**, p. 603–618, 2006.
- Zunzunegui, M., Díaz Barradas, M. C., Clavijo, A., Alvarez Cansino, L., Ain-Lhout, F., García Novo, F.. Ecophysiology, growth timing and reproductive effort of three sexual forms of *Corema album* (Empetraceae). **Plant Ecology**, p. 35–46, 2006.



# Anexos

## Anexo 1

