

DM

**Estudo da Composição
e das Propriedades Bioactivas
de Plantas Produtoras de Bagas**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Joana Carolina Nunes Pinto

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA



UNIVERSIDADE da MADEIRA

A Nossa Universidade

www.uma.pt

Maio | 2016

**Estudo da Composição
e das Propriedades Bioactivas
de Plantas Produtoras de Bagas**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Joana Carolina Nunes Pinto

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

ORIENTADORA
Paula Cristina Machado Ferreira Castilho



ESTUDO DA COMPOSIÇÃO E DAS PROPRIEDADES BIOACTIVAS DE PLANTAS PRODUTORAS DE BAGAS

Esta dissertação foi desenvolvida na linha de Produtos Naturais do Centro de Química da Madeira (CQM), sob a orientação da Professora Doutora Paula Cristina Machado Ferreira Castilho. Foi apresentada à Universidade da Madeira, para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Aplicada.

Joana Carolina Nunes Pinto

2016

Funchal, Madeira - Portugal

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem.

Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.”

Walter Savage Landor

Agradecimentos

Ao Parque Ecológico do Funchal pela autorização da colheita da espécie *Vaccinium padifolium*.

À Dra. Cândida Dias, da Universidade dos Açores, pelo fornecimento da amostra da espécie *Vaccinium cylindraceum*.

À Esmeralda Meneses, da “Quintinha das ervas aromáticas”, pelo fornecimento da amostra da espécie *Elaeagnus umbellata*.

À minha orientadora, Professora Doutora Paula Cristina Machado Ferreira Castilho, expresseo o meu profundo agradecimento, por todo o apoio e incentivo ao longo deste projecto. Agradeço a sua disponibilidade e por cada palavra amiga, de reconhecimento e incentivo, que foram cruciais e sempre no momento certo. Agradeço por todos estes anos de dedicação.

À Doutora Rosa Perestrelo pelo apoio técnico e conhecimentos transmitidos, foram cruciais no progresso da parte prática deste trabalho.

Às técnicas de laboratório, Paula Andrade e Paula Sousa, pela disponibilidade e suporte técnico.

Ao Centro de Química da Madeira, pela oportunidade de desenvolver o meu projecto de mestrado nestas instalações.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pelo financiamento do projecto PEst-OE/QUI/UI674/2013 (CQM, fundos do Governo Português) e da Rede Nacional de Espectrometria de Massa (RNEMREDE/1508/REM/2011).

Ao Professor Doutor João Manuel Cunha Rodrigues por todo o incentivo e palavras de apoio.

Aos colegas de laboratório que, com todo o espírito de sacrifício e de entreatajuda, se revelaram fundamentais ao longo de todo este projecto. Agradeço essencialmente todo o apoio e o fantástico ambiente. Em especial, ao colega e amigo Vítor Agostinho Spínola por todo o apoio e conhecimento transmitidos ao longo deste trabalho.

Aos meus pais, José Maria Velosa Pinto e Rita do Rosário Vieira Nunes Pinto, e irmão, Marco André Nunes Pinto, a quem dedico esta dissertação, por tudo o que abdicaram em prol da minha educação. Agradeço por todos os ensinamentos, toda a caminhada, pela luta constante e por todo o apoio incondicional.

Ao Diogo Henrique Petito Abreu que, com toda a paciência, ouviu os meus desabafos. Agradeço por estares ao meu lado em todos os momentos e por nunca teres deixado de acreditar. Todo o amor, carinho e apoio transmitidos ao longo deste ano, foram factores importantes na realização deste projecto.

Aos amigos, Pedro Diogo Ideia Freitas e Ivo Miguel Sousa Ferreira, por todo o tempo que disponibilizaram, por todo o apoio e dedicação demonstrados. Obrigada pelo companheirismo, por cada palavra, por cada gesto. A vossa amizade e dedicação foram essenciais ao longo deste último ano.

Às amigas Valéria Nunes Jesus, Sandra Conceição Agrela, Irina Batista Rosa, Jenny Lemos Reis, Sara Cristina Pestana e Núria Vanessa Fernandes. Agradeço o vosso apoio, cada palavra, gesto e abraços. Agradeço por nunca terem deixado desmotivar, nem baixar os braços.

À Dra. Lígia Rubina Gomes Vieira, chefe da Câmara de Provedores do Instituto do Vinho, do Bordado e do Artesanato da Madeira (IVBAM), pela amizade, confiança e por toda a dedicação.

A todos os amigos e familiares, que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação, deixo o meu muito obrigado!

Resumo

O consumo de frutas e vegetais tem sido associado à prevenção de várias doenças crónicas, nomeadamente doenças cardiovasculares, diabetes, cancro e outras que envolvam processos inflamatórios. As bagas destacam-se pelo seu elevado conteúdo em polifenóis, cujas propriedades antioxidantes contribuem para a manutenção da saúde humana.

O presente trabalho teve como alvo de estudo as diferentes partes morfológicas (bagas e folhas) de espécies produtoras de bagas, nomeadamente *Elaeagnus umbellata*, a *Rubus grandifolius*, a *Sambucus lancolata*, a *Vaccinium padifolium* e a *Vaccinium cylindraceum*, tendo em vista a sua valorização como produtos alimentares e/ou nutracêuticos.

A caracterização físico-química destas espécies permitiu determinar que o teor total de sólidos solúveis (TSS) das bagas varia de 4,4 a 16,5 °Brix. As bagas demonstraram ser a parte morfológica com teor de humidade mais elevado.

A análise do perfil fenólico por HPLC-DAD-ESI/MSⁿ, no modo negativo, dos extractos metanólicos mostrou que as folhas apresentam maior conteúdo de compostos fenólicos, comparativamente às bagas. Os ácidos hidroxicinâmicos (derivados dos ácidos cafeicos, cumárico e ferúlico), os ácidos cafeoilquínicos, bem como os flavonóis-*O*-glicosilados (derivados da quercetina e canferol) predominam nestas espécies. A análise pelo modo positivo permitiu a identificação de antocianinas glicosiladas (delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina) nas bagas e folhas jovens da espécie *Vaccinium padifolium*.

Os ensaios *in vitro* de simulação da digestão gastrointestinal permitiram compreender a sua influência na actividade antioxidante dos extractos. Após a digestão, as folhas continuam a apresentar maior capacidade antioxidante do que as bagas. Adicionalmente, concluiu-se que as enzimas presentes neste processo têm menor influência do que o pH e a força iónica dos sucos digestivos.

O estudo do efeito inibitório *in vitro* dos extractos sobre a actividade de enzimas responsáveis pelo metabolismo dos hidratos de carbono permitiu determinar que os

extractos foram mais eficientes na inibição da actividade da α -glucosidase do que na inibição da actividade da α -amilase.

Palavras-chave: bagas, folhas, polifenóis, antocianinas, actividade antioxidante, digestão *in vitro*, diabetes.

Abstract

Fruit and vegetables consumption has been associated with chronic diseases prevention, including cardiovascular diseases, diabetes, cancer and others involving inflammatory processes. Berries are rich in polyphenols, which antioxidant properties contribute to the maintenance of human health.

The aim of this work was the study of the morphologic parts (berries and leaves) of berries-producing species, including *Elaeagnus umbellata*, *Rubus grandifolius*, *Sambucus lancolata*, *Vaccinium padifolium* and *Vaccinium cylindraceum*, in view to their valorization as food and/or nutraceuticals.

The physico-chemical characterization of these species established that the total soluble solids (TSS) content of berries varies from 4.4 to 16.5 ° Brix. Also, berries are the morphological part with higher humidity content.

The analysis of the phenolic profile by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ, in the negative mode, of the methanolic extracts showed that leaves have a higher content of polyphenols, compared to berries. Hydroxycinnamic acids (caffeic, coumaric and ferulic acid derivatives), caffeoylquinic acids and *O*-glycosylated flavonols (derivatives of quercetin and kaempferol) are predominant in these species. Moreover, the positive mode analysis allowed the identification of glycosylated anthocyanins (delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin and malvidin).

The simulation of *in vitro* gastrointestinal digestion allowed to understand its influence on the antioxidant activity of the extracts. After digestion, leaves still showed higher antioxidant capacity than the berries. Additionally, it was found that the enzymes present in this process have less influence than the pH and ionic strength of the digestive juice.

The *in vitro* inhibitory effects of the extracts on digestive enzymes responsible for the metabolism of carbohydrates, showed that the extracts were more active inhibitors of α -glucosidase than of α -amylase activity.

Keywords: berries, leaves, polyphenols, anthocyanins, antioxidant activity, *in vitro* digestion, diabetes.

Lista de publicações

Lista de artigos

Spínola, V., **Pinto, J.**, Castilho, P. C. (2015) Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD-ESI-MSn and screening for their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 173, 14-30.

Lista de comunicações orais

Pinto J., Spínola, V., Castilho P. C.; Polyphenols & carbohydrates metabolism: composition and beneficial effects of wild endemic berries from Madeira Island; XXIV Encontro Nacional da SPQ; Coimbra, Portugal; 01 – 03th July, 2015

Pinto J., Spínola, V., Castilho P. C.; Inhibitory effect on digestive enzyme of berry producing plants; 2nd CQM Annual Meeting; Funchal, Madeira; 30th January, 2015.

Spínola, V., **Pinto, J.**, Castilho, P. C.; BERRIES FROM MACARONESIA: BIOACTIVE COMPONENTS AND THEIR ANTIHYPERGLYCEMIA EFFECTS; EUROFOOD CHEM XVIII; Madrid, Spain; 13rd-16th October 2015.

Spínola, V., **Pinto, J.**, Castilho, P. C.; COMPOSITION AND IN VITRO INHIBITORY ACTIVITIES OF PLANT-PRODUCING BERRIES AND THEON GENERATION OF ADVANCED GLYCATION END-PRODUCTS: IN VITRO; 10th World Congress on Polyphenols Applications; Porto, Portugal; June 29 to July 1, 2016.

Lista de posters

Ideia P., **Pinto J.**, Morna A., Câmara J. S., Grace, C.; Metabolite profiling on coffee volatile composition based on SPME and GC-qMS; 9th GCxGC symposium; Riva del Garda, Italy, 18 – 23rd, may, 2014.

Spínola, V., **Pinto, J.**, Castilho, P. C.; Phenolic Characterization of Juice from Four Vegetables by HPLC-DAD-ESI-/MSn and their Antioxidant Activity; EUROFOOD CHEM XVIII; Madrid, Spain; 13rd-16th October 2015.

Índice Geral

Agradecimentos.....	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de publicações.....	xi
Índice Geral.....	xiii
Índice de Figuras.....	xvii
Índice de Tabelas	xxi
Lista de abreviaturas	xxiii
Nota introdutória.....	1
I. Introdução.....	3
1. Compostos bioactivos nas plantas	5
1.1. Principais classes de compostos fenólicos nas plantas.....	6
2. Espécies produtoras de bagas.....	15
2.1. Compostos fenólicos nas bagas	15
2.2. Espécies endémicas da Macaronésia	16
2.3. Outras espécies	21
3. Extracção, quantificação e separação de compostos bioactivos.....	23
3.1. Técnicas de extracção de compostos bioactivos	23
3.2. Extracção de compostos polares das plantas	26
3.3. Separação, quantificação e identificação de compostos bioactivos.....	27
4. Radicais livres e defesas antioxidantes	31
4.1. Radicais livres	31
4.2. <i>Stress</i> Oxidativo	33
4.3. Capacidade antioxidante.....	34
5. Digestão.....	41
5.1. Enzimas presentes na digestão	42
5.2. Biodisponibilidade dos compostos fenólicos	44
6. Os compostos fenólicos e o metabolismo dos hidratos de carbono.....	53
6.1. Metabolismo dos hidratos de carbono	53
6.2. Diabetes <i>mellitus</i>	54
6.3. Impacto dos compostos fenólicos no metabolismo dos hidratos de carbono	55

II. Metodologia Experimental	57
1. Materiais	59
1.1. Amostras	59
1.2. Reagentes, compostos de referência e equipamentos.....	60
2. Caracterização físico-química das bagas.....	61
2.1. Determinação dos sólidos solúveis totais (°Brix)	61
2.2. Determinação do teor de humidade.....	61
3. Extracção dos compostos fenólicos	62
4. Determinação do perfil fenólico por HLPC-DAD-ESI/MS ⁿ	63
4.1. Preparação da amostra	63
4.2. Cromatografia Líquida (HPLC)	63
4.3. Espectrometria de Massa (MS)	64
5. Estudo da influência da digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> na actividade antioxidante dos extractos	65
5.1. Modelo de digestão gastrointestinal <i>in vitro</i>	65
5.2. Determinação do conteúdo de fenólicos (TPC) e flavonóides totais (TFC) e da actividade antioxidante <i>in vitro</i> dos extractos	67
6. Estudos <i>in vitro</i> do efeito inibitório dos extractos sobre as enzimas do metabolismo dos hidratos de carbono.....	69
6.1. Ensaios de inibição da α -amilase.....	69
6.2. Ensaios de inibição da α -glucosidase	70
III. Resultados e Discussão.....	73
1. Caracterização física-química.....	75
1.1. Determinação dos sólidos solúveis totais (°Brix)	75
1.2. Determinação do teor de humidade.....	76
2. Extracção dos compostos fenólicos	77
3. Determinação do perfil fenólico por HLPC-DAD-ESI/MS ⁿ	78
3.1. Modo de ionização negativo	80
3.2. Modo de ionização positivo	177
4. Estudo da influência da digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> na actividade antioxidante dos extractos	191
4.1. Modelo de digestão gastrointestinal <i>in vitro</i>	191
4.2. Actividade antioxidante	191

5.	Estudo <i>in vitro</i> da inibição da actividade enzimática	208
5.1.	Inibição da α -amilase	208
5.2.	Inibição da α -glucosidase	210
IV.	Conclusão e Perspectivas futuras.....	215
V.	Referências.....	223
VI.	Anexos	239
1.	Reagentes e compostos de referência.....	241
2.	Equipamentos	242
3.	Rectas de calibração.....	242

Índice de Figuras

Figura 1 – Ácido clorogénico (ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquinico).	7
Figura 2 - Estrutura básica das diferentes classes de flavonóides. Representação das posições onde ocorrem as <i>O</i> - e <i>C</i> -glicosilações mais comuns. Adaptado de Castañeda-Ovando <i>et al.</i> (2009) [48]......	9
Figura 3 - Exemplo de um estilbeno, o <i>trans</i> -resveratrol.....	14
Figura 4 - <i>Rubus grandifolius</i> (Pico do Arieiro).	17
Figura 5 – Amoras e silvado colhidos em Machico.	17
Figura 6 - Folhas de sabugueiro colhidas no Pico das Pedras.	18
Figura 7 - Bagas de sabugueiro colhidas no Pico das Pedras.	18
Figura 8 - Folhas verdes (maduras) e vermelhas (jovens) da uveira da Madeira.	19
Figura 9 - Bagas de uveira da Madeira.	20
Figura 10 – Corola de flores em forma de campânula da uveira da Madeira. Foto de Capelo (2003) [28]......	20
Figura 11 – Bagas, folhas e flores da uveira dos Açores. Fotos de Hélder Fraga [34]......	21
Figura 12 - Bagas e folhas da oliveira de Outono.....	22
Figura 13 - Estrutura do radical DPPH (cor violeta escuro) e a sua forma reduzida (cor amarelo claro), após neutralização. Fonte: Gouveia (2011) [12]......	37
Figura 14 – Mecanismo proposto para a formação do complexo flavonóide-Al, em solução metanólica do cloreto de alumínio.....	40
Figura 15 – Regiões específicas da digestão gastrointestinal humana. Adaptado de Versantvoort <i>et al.</i> (2004) [72].	42
Figura 16 – Possíveis sítios de conjugação nos polifenóis. Estão representadas as possibilidades de metilação e de sulfatação ou glucoronidação. Adaptado de D’Archivio <i>et al.</i> (2010) [81]......	48
Figura 17 - Metabolismo dos ácidos hidroxicinâmicos. Adaptado de El-Seedi <i>et al.</i> (2012) [10].	49
Figura 18 - Disposição dos diferentes componentes nos ensaios de inibição enzimática.....	69
Figura 19 - Estudo dos sólidos solúveis totais (TSS) das bagas: <i>Rubus grandifolius</i> (Machico e Funchal), <i>Vaccinium padifolium</i> , <i>Vaccinium cylindraceum</i> , <i>Sambucus lanceolata</i> e <i>Elaeagnus umbellata</i> . Os resultados encontram-se expressos em ° Brix.....	75
Figura 20 - Cromatogramas da análise do perfil fenólico, por HPLC-DAD-ESI ⁺ /MS ⁿ , dos extractos metanólicos de <i>Elaeagnus umbellata</i> (bagas e folhas, respectivamente)......	80

Figura 21 - Espectro de massa da isoramnetina e da ramnetina. Estão representados os fragmentos característicos. Fonte: [111].	84
Figura 22 - Fragmentação dos sacarídeos. Fonte: Verardo <i>et al.</i> (2009) [116].	87
Figura 23 - Mecanismo de fragmentação do ácido ursólico. Adaptado de Che <i>et al.</i> (2011) [118].	89
Figura 24 - Cromatogramas da análise do perfil fenólico, por HPLC-DAD-ESI ⁺ /MS ⁿ , dos extractos metanólicos das bagas de <i>Rubus grandifolius</i> (colhidas no Funchal e em Machico, respectivamente).	99
Figura 25 - Mecanismo de fragmentação do ácido cafeico. Adaptado de Liu <i>et al.</i> (2007) [119].	101
Figura 26 - Cromatogramas da análise do perfil fenólico, por HPLC-DAD-ESI ⁺ /MS ⁿ , dos extractos metanólicos das folhas de <i>Rubus grandifolius</i> (colhidas no Funchal e em Machico, respectivamente).	111
Figura 27 - Fragmentação das proantocianidinas do tipo B. Adaptado de Soong <i>et al.</i> (2005) [128].	116
Figura 28 - Cromatogramas da análise do perfil fenólico, por HPLC-DAD-ESI ⁻ /MS ⁿ , dos extractos metanólicos de <i>Sambucus lanceolata</i> (bagas e folhas, respectivamente).	129
Figura 29 - Cromatogramas da análise do perfil fenólico, por HPLC-DAD-ESI ⁻ /MS ⁿ , dos extractos metanólicos de <i>Vaccinium padifolium</i> (bagas e folhas jovens e folhas maduras, respectivamente).	145
Figura 30 - Cromatogramas da análise do perfil fenólico, por HPLC-DAD-ESI ⁻ /MS ⁿ , dos extractos metanólicos de <i>Vaccinium cylindraceum</i> (bagas e folhas, respectivamente).	163
Figura 31 - Análise do perfil de antocianinas, por HPLC-DAD-ESI ⁺ /MS ⁿ , das bagas de <i>Rubus grandifolius</i> .	178
Figura 32 - Análise do perfil de antocianinas, por HPLC-DAD-ESI ⁺ /MS ⁿ , das bagas de <i>Sambucus lanceolata</i> .	181
Figura 33 - Análise do perfil de antocianinas, por HPLC-DAD-ESI ⁺ /MS ⁿ , das bagas de <i>Vaccinium padifolium</i> .	183
Figura 34 - Análise do perfil de antocianinas, por HPLC-DAD-ESI ⁺ /MS ⁿ , das folhas jovens de <i>Vaccinium padifolium</i> .	186
Figura 35 - Estudo da acção da radiação solar da espécie <i>Vaccinium myrtillus</i> L., pelos autores Jaakola <i>et al.</i> (2004) [140]. Em a) frutas e folhas; b) e c) folhas maduras e folhas jovens.	187
Figura 36 - Análise do perfil de antocianinas, por HPLC-DAD-ESI ⁺ /MS ⁿ , das bagas de <i>Vaccinium cylindraceum</i> .	189

Figura 37 - Estudo do TPC das amostras <i>não digeridas</i> , das diferentes partes morfológicas (bagas, folhas e folhas jovens) de <i>Rubus grandifolius</i> (Machico e Funchal), <i>Vaccinium padifolium</i> , <i>Vaccinium cylindraceum</i> , <i>Sambucus lanceolata</i> e <i>Elaeagnus umbellata</i> . Resultados expressos em mg GAE/ g extracto; valores apresentados média±desvio padrão.....	192
Figura 38 - Estudo do efeito da digestão <i>in vitro</i> no valor de TPC das bagas de <i>Rubus grandifolius</i> (Machico e Funchal), <i>Vaccinium padifolium</i> , <i>Vaccinium cylindraceum</i> , <i>Sambucus lanceolata</i> e <i>Elaeagnus umbellata</i> . Resultados expressos em mg GAE/ g extracto; valores apresentados média±desvio padrão.....	194
Figura 39 - Estudo do efeito da digestão <i>in vitro</i> no valor de TPC das folhas de <i>Rubus grandifolius</i> (Machico e Funchal), <i>Vaccinium padifolium</i> , <i>Vaccinium cylindraceum</i> , <i>Sambucus lanceolata</i> e <i>Elaeagnus umbellata</i> . Resultados expressos em mg GAE/ g extracto; valores apresentados média±desvio padrão.....	195
Figura 40 - Estudo do TFC das amostras <i>não digeridas</i> , das diferentes partes morfológicas (bagas, folhas e folhas jovens) de <i>Rubus grandifolius</i> (Machico e Funchal), <i>Vaccinium padifolium</i> , <i>Vaccinium cylindraceum</i> , <i>Sambucus lanceolata</i> e <i>Elaeagnus umbellata</i> . Resultados expressos em mg RE/ g extracto; valores apresentados média±desvio padrão.....	196
Figura 41 - Estudo do efeito da digestão <i>in vitro</i> no valor de TFC das bagas de <i>Rubus grandifolius</i> (Machico e Funchal), <i>Vaccinium padifolium</i> , <i>Vaccinium cylindraceum</i> , <i>Sambucus lanceolata</i> e <i>Elaeagnus umbellata</i> . Resultados expressos em mg RE/ g extracto; valores apresentados média±desvio padrão.....	198
Figura 42 - Estudo do efeito da digestão <i>in vitro</i> no valor de TFC das folhas de <i>Rubus grandifolius</i> (Machico e Funchal), <i>Vaccinium padifolium</i> , <i>Vaccinium cylindraceum</i> , <i>Sambucus lanceolata</i> e <i>Elaeagnus umbellata</i> . Resultados expressos em mg RE/ g extracto; valores apresentados média±desvio padrão.....	199
Figura 43 - Estudo da actividade antioxidante total, pelo ensaio ABTS, das amostras <i>não digeridas</i> , das diferentes partes morfológicas (bagas, folhas e folhas jovens) de <i>Rubus grandifolius</i> (Machico e Funchal), <i>Vaccinium padifolium</i> , <i>Vaccinium cylindraceum</i> , <i>Sambucus lanceolata</i> e <i>Elaeagnus umbellata</i> . Resultados expressos em mmol TE/ g extracto; valores apresentados média±desvio padrão.....	200
Figura 44 - Estudo da actividade antioxidante total, pelo ensaio DPPH, das amostras <i>não digeridas</i> , das diferentes partes morfológicas (bagas, folhas e folhas jovens) de <i>Rubus grandifolius</i> (Machico e Funchal), <i>Vaccinium padifolium</i> , <i>Vaccinium cylindraceum</i> ,	

	<i>Sambucus lanceolata</i> e <i>Elaeagnus umbellata</i> . Resultados expressos em mmol TE/ g extracto; valores apresentados média±desvio padrão.....	201
Figura 45 - Estudo do efeito da digestão <i>in vitro</i> na capacidade antioxidante, pelo ensaio ABTS, das bagas de <i>Rubus grandifolius</i> (Machico e Funchal), <i>Vaccinium padifolium</i> , <i>Vaccinium cylindraceum</i> , <i>Sambucus lanceolata</i> e <i>Elaeagnus umbellata</i> . Resultados expressos em mmol TE/ g extracto; valores apresentados média±desvio padrão.		203
Figura 46 - Estudo do efeito da digestão <i>in vitro</i> na capacidade antioxidante, pelo ensaio DPPH, das bagas de <i>Rubus grandifolius</i> (Machico e Funchal), <i>Vaccinium padifolium</i> , <i>Vaccinium cylindraceum</i> , <i>Sambucus lanceolata</i> e <i>Elaeagnus umbellata</i> . Resultados expressos em mmol TE/ g extracto; valores apresentados média±desvio padrão.		204
Figura 47 – Estudo do efeito da digestão <i>in vitro</i> na capacidade antioxidante, pelo ensaio ABTS, das folhas de <i>Rubus grandifolius</i> (Machico e Funchal), <i>Vaccinium padifolium</i> , <i>Vaccinium cylindraceum</i> , <i>Sambucus lanceolata</i> e <i>Elaeagnus umbellata</i> . Resultados expressos em mmol TE/ g extracto; valores apresentados média±desvio padrão.		205
Figura 48 – Estudo do efeito da digestão <i>in vitro</i> na capacidade antioxidante, pelo ensaio DPPH, das folhas de <i>Rubus grandifolius</i> (Machico e Funchal), <i>Vaccinium padifolium</i> , <i>Vaccinium cylindraceum</i> , <i>Sambucus lanceolata</i> e <i>Elaeagnus umbellata</i> . Resultados expressos em mmol TE/ g extracto; valores apresentados média±desvio padrão.		205
Figura 49 - Ensaio de inibição da α -amilase pelos extractos metanólicos das diferentes partes morfológicas das espécies estudadas (<i>Rubus grandifolius</i> de Machico e Funchal, <i>Vaccinium padifolium</i> e <i>Vaccinium cylindraceum</i>). A Acarbose foi utilizada como controlo positivo. Valores apresentados em IC ₅₀ (miligrama por mililitro de solução).		208
Figura 50 - Ensaio de inibição da α -amilase pelos extractos metanólicos das diferentes partes morfológicas das espécies estudadas (<i>Sambucus lanceolata</i> e <i>Elaeagnus umbellata</i>). A Acarbose foi utilizada como controlo positivo. Valores apresentados em IC ₂₅ (miligrama por mililitro de solução).		209
Figura 51 - Ensaio de inibição da α -glucosidase pelos extractos metanólicos das diferentes partes morfológicas das espécies estudadas (<i>Rubus grandifolius</i> de Machico e Funchal, <i>Vaccinium padifolium</i> e <i>Vaccinium cylindraceum</i>). A Acarbose foi utilizada como controlo positivo. Valores apresentados em IC ₅₀ (miligrama por mililitro de solução).		211
Figura 52 – Ensaio de inibição da α -glucosidase pelos extractos metanólicos das diferentes partes morfológicas das espécies estudadas (<i>Sambucus lanceolata</i> e <i>Elaeagnus umbellata</i>). A Acarbose foi utilizada como controlo positivo. Valores apresentados em IC ₂₅ (miligrama por mililitro de solução).		212

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Estrutura básica do ácido cinâmico e respectivas substituições que originam os diferentes ácidos hidroxicinâmicos. Adaptado de Martins <i>et al.</i> (2011) [9].....	7
Tabela 2 - Estrutura básica do ácido benzóico e respectivas substituições que originam os diferentes ácidos hidroxibenzóicos. Adaptado de Martins <i>et al.</i> (2011) [9].	8
Tabela 3 - Estrutura básica da antocianidina. As substituições em R ₁ e R ₂ dão origem às antocianidinas mais frequentes. Adaptado de Oroian <i>et al.</i> (2015) [7].	12
Tabela 4 - Compostos fenólicos em diferentes fontes alimentares. Revisto por Naczki e Shahidi (2006) [17].....	14
Tabela 5 - Factores endógenos e exógenos associados à biodisponibilidade dos compostos fenólicos. Adaptado de D'Archivio <i>et al.</i> (2010) [78].....	52
Tabela 6 - Amostras alvo de estudo, nome científico e nome comum, parte morfológica estudada, local e data da colheita.	59
Tabela 7 - Condições da análise do perfil fenólico por HPLC-DAD-ESI/MS ⁿ	63
Tabela 8 - Composição das diferentes soluções <i>stock</i> , utilizadas na digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> , com os respectivos componentes, os complementos e o diferente pH de cada meio fisiológico do organismo.	66
Tabela 9 - Conteúdo de cada componente nos ensaios de inibição enzimática.	71
Tabela 10 - Teor de humidade (%) das diferentes partes morfológicas estudadas. Amostras: <i>Rubus grandifolius</i> (Machico e Funchal), <i>Vaccinium padifolium</i> , <i>Vaccinium cylindraceum</i> , <i>Sambucus lanceolata</i> e <i>Elaeagnus umbellata</i>	76
Tabela 11 - Estrutura química das agliconas dos flavonóis.....	79
Tabela 12 - Estrutura química geral das principais agliconas das flavonas.....	79
Tabela 13 - Caracterização do perfil fenólico, por HPLC-DAD-ESI ⁻ /MS ⁿ , dos extractos metanólicos das diferentes partes morfológicas (bagas e folhas) de <i>Elaeagnus umbellata</i>	90
Tabela 14 - Caracterização do perfil fenólico, por HPLC-DAD-ESI ⁻ /MS ⁿ , dos extractos metanólicos das bagas de <i>Rubus grandifolius</i> , colhidas no Funchal e em Machico.....	106
Tabela 15 - Caracterização do perfil fenólico, por HPLC-DAD-ESI ⁻ /MS ⁿ , dos extractos metanólicos das folhas de <i>Rubus grandifolius</i> , colhidas no Funchal e em Machico.	119
Tabela 16 - Caracterização do perfil fenólico, por HPLC-DAD-ESI ⁻ /MS ⁿ , dos extractos metanólicos das diferentes partes morfológicas (bagas e folhas) de <i>Sambucus lanceolata</i>	137

Tabela 17 - Caracterização do perfil fenólico, por HPLC-DAD-ESI ⁻ /MS ⁿ , dos extractos metanólicos das diferentes partes morfológicas (bagas e folhas) de <i>Vaccinium padifolium</i>	152
Tabela 18 - Caracterização do perfil fenólico, por HPLC-DAD-ESI ⁻ /MS ⁿ , dos extractos metanólicos das diferentes partes morfológicas (bagas e folhas) de <i>Vaccinium cylindraceum</i>	169
Tabela 19 - Caracterização do perfil de antocianinas, por HPLC-DAD-ESI ⁺ /MS ⁿ , dos extractos metanólicos das bagas de <i>Rubus grandifolius</i> (colhidas no Funchal e em Machico).	180
Tabela 20 - Caracterização do perfil de antocianinas, por HPLC-DAD-ESI ⁺ /MS ⁿ , das bagas de <i>Sambucus lanceolata</i>	182
Tabela 21 – Caracterização do perfil de antocianinas, por HPLC-DAD-ESI ⁺ /MS ⁿ , das bagas de <i>Vaccinium padifolium</i>	185
Tabela 22 - Caracterização do perfil de antocianinas, por HPLC-DAD-ESI ⁺ /MS ⁿ , das folhas jovens de <i>Vaccinium padifolium</i>	188
Tabela 23 - Caracterização do perfil de antocianinas, por HPLC-DAD-ESI ⁺ /MS ⁿ , das bagas de <i>Vaccinium cylindraceum</i>	190

Lista de abreviaturas

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
BPC	Cromatograma de pico base (<i>Base Peak Chromatogram</i>)
CQA	Ácido clorogénico (<i>Chlorogenic acid</i>)
Da	<i>Dalton</i>
DAD	Detector de Arranjo de Díodos (<i>Diode Array Detector</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Desoxoribonucleic acid</i>)
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazil
ESI	Ionização por <i>electrospray</i> (<i>Electrospray Ionization</i>)
ESI ⁻	Modo de ionização negativo
ESI ⁺	Modo de ionização positivo
ET	Transferência de Electrões (<i>Electron Transfer</i>)
FTIR	Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier
GA	Ácido gálico (<i>Gallic Acid</i>)
GPX	Glutathione peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HCA	Ácidos hidroxicinâmicos (<i>Hydroxycinnamic acid</i>)
HAT	Transferência de átomos de Hidrogénio (<i>Hydrogen Atom Transfer</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
<i>m/z</i>	<i>razão massa/carga</i>
MAE	Extracção assistida por micro-ondas (<i>Microwave Assisted Extraction</i>)
MeOH	Metanol

mg/mL Miligrama por mililitro

MS Espectrometria de massa (*Mass Spectrometry*)

O₂^{•-} Radical superóxido

PLE Extracção por líquido pressurizado (*Pressurized Liquid Extraction*)

R Rutina

RNS Espécies reactivas de azoto (*Reactive Nitrogen Species*)

ROS Espécies reactivas de oxigénio (*Reactive Oxygen Species*)

SFE Extracção por fluido supercrítico (*Supercritical Fluid Extraction*)

SOD Superóxido dismutase

TFC Conteúdo total de flavonóides (*Total Flavonoids Content*)

TPC Conteúdo total de fenólicos (*Total Phenolic Content*)

t_R Tempo de retenção

TSS Conteúdo total de sólidos solúveis (*Total Soluble Solids*)

UAE Extracção assistida por Ultrassons (*Ultrassound Assisted Extraction*)

UV-Vis Ultravioleta-Visível

T1DM Diabetes mellitus tipo 1 (*Type-1 Diabetes mellitus*)

T2DM Diabetes mellitus tipo 2 (*Type-2 Diabetes mellitus*).

Nota introdutória

O presente trabalho, desenvolvido no Laboratório de Química Orgânica e Produtos Naturais (NatLab) do Centro de Química da Madeira, pretende contribuir para o aumento do conhecimento de aspectos químicos de algumas espécies produtoras de bagas. Assim, foram estudadas cinco espécies produtoras de bagas, das quais, três são espécies endémicas do Arquipélago da Madeira. Este estudo, foi levado a cabo tendo em vista uma possível valorização destas espécies como produtos alimentares e/ou fontes de nutracêuticos.

As amostras alvo de estudo foram as bagas e as folhas de cinco espécies, nomeadamente a *Elaeagnus umbellata* (Oliveira de Outono), a *Rubus grandifolius* (Silvado), a *Sambucus lancolata* (Sabugueiro), a *Vaccinium padifolium* (Uveira da Madeira) e a *Vaccinium cylindraceum* (Uveira dos Açores).

A dissertação encontra-se organizada em 6 capítulos. O Capítulo I consiste numa Introdução onde são abordadas detalhadamente as temáticas envolvidas, sobretudo na informação sobre estas espécies vegetais, os compostos bioactivos das plantas e as principais classes de compostos. Ainda neste capítulo são descritas algumas técnicas de extracção, quantificação e separação destes compostos bioactivos, para posterior avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante. No subcapítulo que aborda a avaliação antioxidante *in vitro*, é feita uma contextualização dos radicais livres e os principais riscos associados ao *stress* oxidativo, as defesas antioxidantes e de algumas metodologias que permitem a avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante.

É também descrito o interesse das simulações de digestão *in vitro*, nomeadamente as enzimas presentes neste processo, as principais propriedades farmacocinéticas dos compostos fenólicos e as modificações observadas após a absorção, metabolismo, excreção e biodisponibilidade. Este capítulo termina com a abordagem dos compostos fenólicos e o metabolismo dos hidratos de carbono, tendo em vista a possibilidade de utilização destes compostos bioactivos na prevenção e controlo da diabetes tipo II.

O Capítulo II, denominado “Metodologia experimental” compila os procedimentos efectuados desde a colheita até ao tratamento das amostras. Assim,

são referidas as metodologias utilizadas na caracterização físico-química das amostras, no processo pelo qual são extraídos os compostos fenólicos, que permitem a posterior determinação do perfil fenólico por HPLC-DAD-ESI/MSⁿ, nos modos de ionização negativo e positivo. As metodologias adoptadas no estudo da influência da digestão *in vitro* na actividade antioxidante dos extractos são também descritas. Por fim, encontram-se relatados os procedimentos tidos em conta no estudo do efeito inibitório dos extractos, sobre as enzimas do metabolismo dos hidratos de carbono.

No Capítulo III encontram-se descritos os resultados obtidos e a sua discussão. O Capítulo IV foi destinado às conclusões e às perspectivas futuras. Nos Capítulos finais V e VI, encontram-se as referências e os anexos, respectivamente.

I. Introdução

1. Compostos bioactivos nas plantas

As plantas produzem um vasto e diverso conjunto de compostos orgânicos, que não aparecem directamente ligados ao metabolismo fotossintético básico nem ao metabolismo respiratório. Estas substâncias são tradicionalmente conhecidas como metabolitos secundários [1].

Os metabolitos primários são substâncias químicas essenciais ao crescimento e desenvolvimento das plantas, onde se incluem os hidratos de carbono, ligninas, aminoácidos, proteínas e lípidos. Os metabolitos secundários, em combinação com os metabolitos primários, ajudam a planta a sobreviver e a ultrapassar os desafios locais e situações de *stress*, permitindo-lhe ainda a interação com o meio circundante [1,2].

As principais fontes de metabolitos secundários são plantas, bactérias, fungos e organismos marinhos. A produção de metabolitos secundários nestas espécies depende do seu ciclo de vida e da necessidade de cada espécie [1]. A título de exemplo, a cor vermelha, azul ou roxa, comum em algumas flores e frutos atrai os insectos para a sua polinização e fertilização. Estas cores são da responsabilidade das antocianinas, metabolitos secundários pertencentes à classe dos flavonóides [3].

Alguns destes metabolitos secundários manifestam efeitos nos sistemas biológicos animais, nomeadamente nos humanos. São por isso designados como compostos bioactivos. De acordo com Croteau *et al.* (2000) [1], os compostos bioactivos das plantas encontram-se divididos em três categorias principais: a) terpenos ou terpenóides, b) alcalóides e c) compostos fenólicos.

Ignat, Volf e Popa (2011) [4] reviram vários estudos sobre as propriedades bioactivas dos metabolitos secundários, demonstrando o papel importante que estes compostos desempenham no crescimento e reprodução das plantas. Estes compostos fornecem ainda uma eficiente protecção contra os agentes patogénicos e predadores, contribuindo também para as características sensoriais e organolépticas dos frutos e vegetais.

Estes compostos fazem face às exigências secundárias dos organismos que os produzem, nomeadamente na promoção da sobrevivência aquando da competição

inter-espécies. Fazem igualmente parte de mecanismos defensivos e facilitam os processos reprodutivos. Adicionalmente, podem ainda ter um grande impacto (positivo ou negativo) a nível da saúde dos organismos que os consomem [5]. De entre os vários estudos tem sido ainda destacado o seu papel como agentes antibacterianos ou antifúngicos, anticancerígenos, antidiabéticos, redutores de colesterol, imunossupressores e antiparasitários [2]. São ainda propostos como protectores contra os danos causados pelos radicais livres no DNA (Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Desoxoribonucleic acid*), membranas e componentes celulares que estão envolvidos na progressão das doenças. [6]

1.1. Principais classes de compostos fenólicos nas plantas

Os compostos fenólicos abrangem uma extensa variedade de moléculas que contêm, pelo menos, um anel aromático com um ou vários grupos hidroxilo ligados. Oroian e Escriche (2015) [7], verificaram que o crescente interesse por estes compostos prende-se com a sua capacidade antioxidante, bem como com as suas propriedades anti-inflamatória, anti-microbiana e anti-proliferativa.

Estes compostos encontram-se divididos em diferentes classes de acordo com o número de anéis aromáticos que contêm e com os elementos estruturais que os ligam entre si. Os principais grupos de polifenóis são ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, estilbenos e lignanos [4].

1.1.1. Ácidos fenólicos

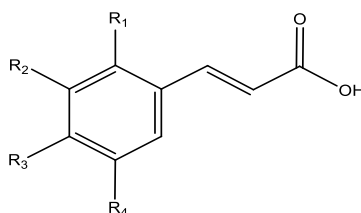
Os ácidos fenólicos constituem uma classe de compostos encontrados nas plantas, quer na sua forma livre, quer na sua forma ligada. Os fenólicos ligados podem encontrar-se associados a vários componentes, através de ligações éster, éter ou acetal. Estas diferentes formas influenciam as condições necessárias à sua extracção, assim como a sua susceptibilidade à degradação [8].

Os ácidos fenólicos predominantes estão divididos em duas categorias, dependendo da sua estrutura: derivados do ácido cinâmico (ou ácidos hidroxicinâmicos) e derivados do ácido benzóico (ou ácidos hidroxibenzóicos). Estes compostos diferem na forma como o grupo carboxílico se conjuga ao anel aromático

[7], podendo surgir directamente ligado ao anel – no caso dos ácidos hidroxibenzoicos – ou *via* ligação vinílica, como acontece nos ácidos hidroxicinâmicos.

Na Tabela 1 encontram-se representados os ácidos hidroxicinâmicos, onde se incluem os ácidos cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico [9].

Tabela 1 – Estrutura básica do ácido cinâmico e respectivas substituições que originam os diferentes ácidos hidroxicinâmicos. Adaptado de Martins *et al.* (2011) [9].



Substituição	Derivado Hidroxicinâmico
R ₁ = OH	Ácido <i>o</i> -cumárico
R ₂ = OH	Ácido <i>m</i> -cumárico
R ₃ = OH	Ácido <i>p</i> -cumárico
R ₃ = R ₄ = OH	Ácido cafeico
R ₂ = OCH ₃ , R ₃ = OH	Ácido ferúlico
R ₂ = R ₄ = OCH ₃ , R ₃ = OH	Ácido sinápico

Estas espécies podem também surgir na sua forma esterificada com ácidos não aromáticos, nomeadamente o quínico, chiquímico, málico, malónico ou tartárico. Por exemplo, os ácidos clorogénicos (Figura 1) são formados por condensação do ácido cafeico com esses ácidos. De acordo com a revisão de El-Seedi *et al* (2012) [10], o ácido 5-*O*-cafeoilquínico, resultante da esterificação do ácido cafeico com o ácido quínico, tem sido considerado o derivado hidroxicinâmico mais abundante nos alimentos, com particular ênfase para o café. Os ésteres di- e tricafeoilquínicos são também muito frequentes.

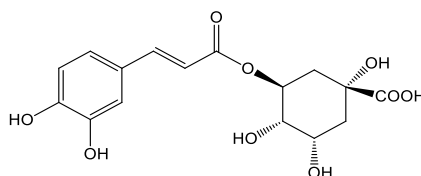
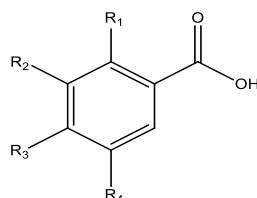


Figura 1 – Ácido clorogénico (ácido 5-*O*-cafeoilquínico).

Os ácidos hidroxibenzoicos foram compilados na Tabela 2, na qual estão presentes os ácidos gálico, vanílico e protocatecuico, como os mais representativos [9].

Tabela 2 - Estrutura básica do ácido benzóico e respectivas substituições que originam os diferentes ácidos hidroxibenzoicos. Adaptado de Martins *et al.* (2011) [9].



Substituição	Derivado Hidroxibenzoico
R ₃ = OH	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico
R ₃ = R ₄ = OH	Ácido protocatecuico
R ₂ = OCH ₃ , R ₃ = OH	Ácido vanílico
R ₂ = R ₃ = OCH ₃	Ácido verátrico
R ₂ = R ₃ = R ₄ = OH	Ácido gálico
R ₁ = R ₄ = OH	Ácido gentísico
R ₂ = R ₄ = OCH ₃ , R ₃ = OH	Ácido siríngico
R ₁ = OH, R ₄ = HSO ₃	Ácido 5-sulfosalicílico

1.1.2. Flavonóides

Os flavonóides constituem um enorme grupo de compostos fenólicos, presentes na maior parte dos tecidos vegetais, podendo ocorrer sob a forma de monómeros, dímeros e oligómeros. Têm como funções a protecção das plantas contra a radiação ultravioleta (UV), os parasitas fúngicos, agentes patogénicos e herbívoros [4].

Estes compostos possuem o esqueleto básico da estrutura dos fenilpropanóides (C6-C3-C6), consistindo em dois anéis aromáticos (anéis A e B) ligados por um anel heterocíclico (anel C). As diferentes substituições no anel C dão origem às principais classes de flavonóides – flavonas, isoflavonas, flavanóis (ou catequinas), flavanonas, flavonóis e antocianinas (Figura 2).

As substituições nos anéis A e B dão origem às diferentes formas, dentro de cada uma dessas classes. Estas substituições podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfonação [11].

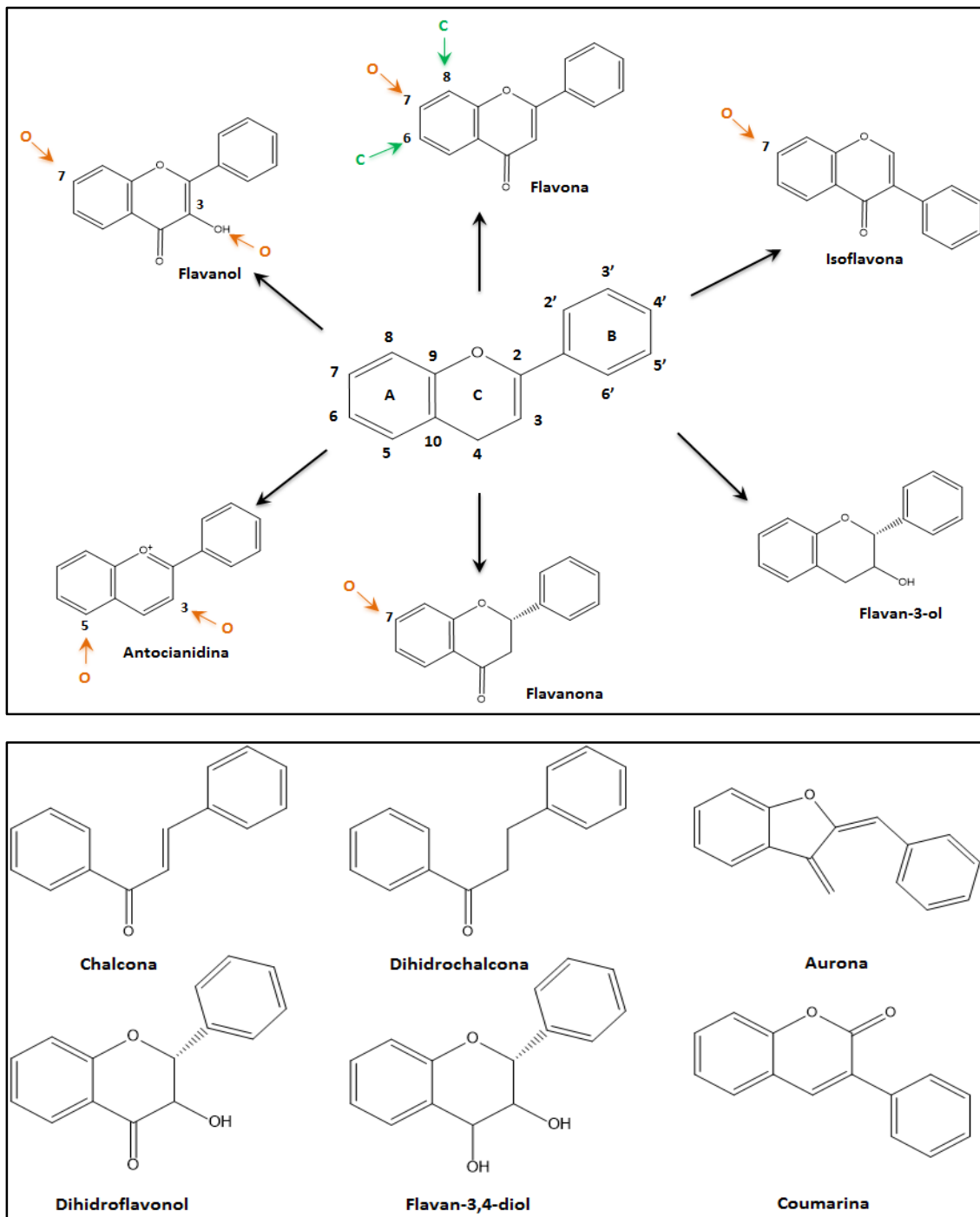


Figura 2 - Estrutura básica das diferentes classes de flavonóides. Representação das posições onde ocorrem as O- e C-glicosilações mais comuns. Adaptado de Castañeda-Ovando *et al.* (2009) [48].

Na natureza, os flavonóides podem ocorrer quer na sua forma livre ou conjugada. Nas plantas, estes compostos encontram-se maioritariamente na forma glicosilada, sob a forma de monossacáridos ou dissacáridos, ligados através dos grupos -OH (*O*-glicosídeo) ou através de ligações carbono-carbono (*C*-glicosídeo) (Figura 2), podendo também ocorrer na sua forma aglícica, sem a parte glícida [8].

✓ **Flavanonas**

As flavanonas são caracterizadas pela ausência da dupla ligação entre os carbonos C-2 e C-3, no anel C, originando um carbono assimétrico (C-2). A grande maioria das flavanonas apresenta o anel C ligado ao anel B na posição C-2, adquirindo uma configuração S no carbono quiral, designada por conjugação α [12].

Estes compostos são geralmente glicosilados por dissacarídeos, no anel A, na posição C-7 (Figura 2). Esta classe de compostos está presente em elevadas concentrações nos frutos cítricos, mas pode também ser encontrada em tomates e em certas plantas aromáticas, como a menta. As aglícicas mais importantes são as naringeninas encontradas nas toranjas, hesperetina nas laranjas e eriodictiol nos limões [4].

✓ **Flavonóis**

Os flavonóis são caracterizados pela dupla ligação entre C-2 e C-3 e pela presença de um grupo hidroxilo na posição 3 (Vide Figura 2). A glicosilação ocorre preferencialmente nas posições C-3 e C-7.

Encontram-se largamente distribuídos nas cerejas, maçãs, bagas, cebola, tomate, entre outros [8]. Os flavonóis predominantes são a quercetina, o canferol, a miricetina e isoramnetina e os seus glicósidos [7].

A quercetina, um dos flavonóis mais importantes, pode ser encontrada em frutos e vegetais. Apesar de ser encontrada nas diferentes partes morfológicas, ocorre maioritariamente nas folhas tanto na sua forma glicosilada, como na sua forma aglícica [7].

✓ **Flavonas**

As flavonas são estruturalmente semelhantes aos flavonóis. Possuem uma dupla ligação entre o C-2 e C-3, mas com ausência do grupo hidroxilo na posição 3. Estes compostos também podem sofrer substituições como hidroxilação, metilação e *O*- e *C*-alquilação e glicosilação [13].

Compostos como a apigenina e a luteolina são os mais encontrados nos alimentos incluídos na dieta humana, particularmente em cereais, vegetais e ervas aromáticas [14].

✓ **Isoflavonas**

As isoflavonas possuem semelhanças estruturais com o estrogénio, ou seja, possuem um grupo hidroxilo nas posições C-7 e C-4, como a molécula de estradiol. Têm sido associados a esta classe de compostos efeitos importantes a nível da saúde, como a prevenção ou tratamento de doenças prevalentes, nomeadamente a aterosclerose ou o cancro. Acredita-se que muitos destes efeitos fisiológicos são atribuídos à sua estrutura (semelhante à do β -estradiol), sendo as isoflavonas referidas ocasionalmente como fito-estrogénios [4].

Podem ser encontradas em muitas plantas e alimentos vegetais, principalmente em leguminosas, tanto na sua forma livre (aglicona) como na sua forma acetil- ou malonil-, etc.

✓ **Flavanóis (Flavan-3-óis)**

Esta é a classe mais complexa de flavonóides, já que variam de simples monómeros, (+)-catequinas e seus isómeros, (-)-epicatequinas, a proantocianidinas oligoméricas e poliméricas (taninos condensados) [8].

Os flavanóis, flavanonas e proantocianidinas são moléculas de baixa polaridade devido às suas ligações saturadas entre os carbonos C-2 e C-3, no anel C. São também vulneráveis a diversas reacções de degradação promovidas pelo calor, condições de pH elevado e pela presença de oxigénio [7].

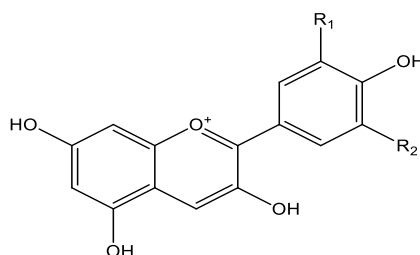
Estes compostos não apresentam formas glicosiladas nos alimentos mas podem ser hidroxilados para formar galocatequinas. Podem ainda ser esterificados com o ácido gálico. As catequinas são largamente encontradas no chá verde, bem como em frutos, vegetais, vinho tinto e chocolate [13].

✓ Antocianinas

As antocianinas são pigmentos solúveis em água, adquirindo cor vermelha, roxo ou azul, dependendo do pH. Podem ocorrer nas diferentes partes morfológicas das plantas (folhas, caules, raízes, flores e frutos).

As antocianidinas são a estrutura básica das antocianinas. Designam-se antocianinas quando as antocianidinas se encontram na sua forma glicosilada. Existem seis antocianidinas que ocorrem mais frequentemente nas plantas: a pelargonidina, a cianidina, a peonidina, a delphinidina, a petunidina e a malvidina (Tabela 3). Os açúcares que comumente se ligam às antocianidinas são monossacarídeos (glicose, galactose, ramnose e arabinose); e di- ou trissacarídeos. Para além disso, muitas antocianinas possuem resíduos de açúcares acilados com ácidos aromáticos ou alifáticos [7].

Tabela 3 - Estrutura básica da antocianidina. As substituições em R₁ e R₂ dão origem às antocianidinas mais frequentes. Adaptado de Oroian *et al.* (2015) [7].



Substituição	Derivados da Antocianidina
R ₁ = R ₂ = H	Pelargonidina
R ₁ = OH, R ₂ = H	Cianidina
R ₁ = R ₂ = OH	Delfinidina
R ₁ = OCH ₃ , R ₂ = H	Peonidina
R ₁ = OCH ₃ , R ₂ = OH	Petunidina
R ₁ = OCH ₃ , R ₂ = OCH ₃	Malvidina

As antocianinas isoladas são altamente instáveis e muito susceptíveis à degradação induzida por diferentes factores como o pH, temperatura, luz, oxigénio, solventes e a presença de enzimas, proteínas e iões metálicos [3].

1.1.3. Taninos

Os taninos ocorrem naturalmente nas plantas e encontram-se divididos em dois grupos, os taninos hidrolisáveis (galo- e elagitaninos) e condensados (ou proantocianidinas) [8].

Estes compostos têm diversos efeitos nos sistemas biológicos, devido à sua capacidade antioxidante e potencial como quelante de iões metálicos [4].

✓ Taninos hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis são derivados do ácido gálico (ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzóico). Este ácido é esterificado com um núcleo poliol e o grupo galoil pode ser posteriormente esterificado ou oxidativamente ligado, resultando em taninos hidrolisáveis mais complexos [4].

✓ Taninos condensados

Os taninos condensados são flavonóides polimerizados, não sendo ainda bem conhecidos os passos que levam a esta estrutura. Os mais estudados têm por base os flavan-3-óis, (-)-epicatequinas e (+)-catequinas [4].

Estes compostos são estruturalmente mais complexos e mais frequentes nas plantas do que o grupo anterior (taninos hidrolisáveis) [8], sendo responsáveis pela adstringência em vários frutos e em outras partes morfológicas vulgarmente utilizadas na alimentação [15].

1.1.4. Estilbenos

Os estilbenos são compostos fenólicos que apresentam dois anéis aromáticos ligados por um grupo eteno. São estruturalmente caracterizados pela presença de um núcleo de 1,2-diarileno com substituintes hidroxilo nos anéis aromáticos [8].

Poucos são os estilbenos presentes na dieta humana. O exemplo mais conhecido é o *trans*-resveratrol, presente na película das uvas [4].

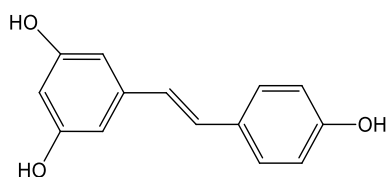


Figura 3 - Exemplo de um estilbeno, o *trans*-resveratrol.

Em resumo, na Tabela 4 encontram-se os principais compostos fenólicos e as respectivas fontes alimentares.

Tabela 4 - Compostos fenólicos em diferentes fontes alimentares. Revisto por Naczki e Shahidi (2006) [17].

Compostos fenólicos	Fontes alimentares
Ácidos fenólicos	
Ácidos hidroxicinâmicos	Damasco, mirtilos, cerejas, pêssegos, ameixas, frutos cítricos, cenouras, cereais, sementes oleaginosas, espinafre, tomate, beringela
Ácidos hidroxibenzóicos	Mirtilos, cereais, arandos, sementes oleaginosas
Flavonóides	
Antocianinas	Bagas, cerejas, uvas, morangos, couve roxa, café verde e vinho
Flavanóis	Maçãs, mirtilos, uvas, cebolas, alface e chá verde
Flavanonas	Frutos cítricos
Flavonóis	Uvas, maçãs, mirtilos, arandos, azeitona, feijão, trigo, endívias, alface, alho-porro, cebola, pimentos, tomate, vinho e chá verde.
Flavonas	Casca dos frutos cítricos, aipo, salsa e espinafre
Isoflavonas	Grãos de soja, lentilhas, feijão
Chalconas	Maçãs
Xantonas	Mango e mangostão
Taninos	
Condensados	Maçãs, uvas, pêssegos, ameixas, mangostão e pêra
Hidrolisados	Romã, framboesas

2. Espécies produtoras de bagas

Bagas são frutos pequenos e carnudos, comumente consumidos frescos ou processados (desidratados, sumos, compotas) [17,18]. As bagas têm sido consideradas um verdadeiro aliado de uma dieta saudável, devido ao seu conteúdo rico em ácidos fenólicos, ácidos orgânicos, taninos e flavonóides [17].

As folhas destas espécies também são consideradas grandes fontes de compostos bioactivos, entrando na dieta humana sob a forma de infusões. São poucos os estudos comparativos das propriedades bioactivas das bagas e das folhas. Tendo em conta as suas propriedades, as folhas podem complementar a acção das bagas, não só na sua utilização a nível da prevenção de doenças, como potenciando as características organolépticas dos alimentos [19].

2.1. Compostos fenólicos nas bagas

Os compostos fenólicos contribuem grandemente para a cor, sabor e aroma das bagas [17]. O conteúdo de compostos fenólicos é determinado por diversos factores, tanto bióticos como abióticos. Outros factores, que incluem a espécie, variedade, estado de maturação, as condições de armazenamento e o manuseamento após a colheita, também afectam o conteúdo de compostos fenólicos nas bagas [18].

As antocianinas são um grupo importante entre os vários compostos das bagas e podem ser encontradas maioritariamente no pericarpo. São encontradas sob a forma de mono-, di- ou tri- glicósidos. Estas substituições podem ser encontradas, em C-3, ou, ainda que menos frequente, em C-5 ou C-7. Prevaecem os glicósidos, galactósidos, ramnósidos, arabinósidos, rutinósidos e sambubiósidos. Os glicósidos de antocianinas podem aparecer esterificados ácidos, como o *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido malónico, ácido acético, entre outros [20].

Os ácidos fenólicos, quer os derivados do ácido cinâmico quer os do ácido benzóico, podem ocorrer muitas vezes como glicósidos. Os taninos, outro grupo importante nas bagas, desempenham um papel essencial nas propriedades sensoriais destes frutos [20].

Estes compostos variam entre as diferentes espécies de bagas, quer pelas propriedades físico-químicas, quer por todos os factores referidos anteriormente. A título de exemplo, Kähkönen e os seus colaboradores (2001) [21], verificaram grande diversidade nos compostos fenólicos contidos entre as diferentes espécies de bagas estudadas. Nas espécies de *Vaccinium*, as antocianinas são o maior subgrupo encontrado, enquanto nos géneros *Rubus* e *Fragaria*, predominam os elagitaninos.

2.2. Espécies endémicas da Macaronésia

As espécies produtoras de bagas consideradas no presente estudo foram colhidas no seu ambiente natural, sendo também designadas de frutos silvestres. Existem dados que demonstram que os frutos silvestres apresentam teores mais elevados de compostos fenólicos, assim como, maior capacidade antioxidante, comparativamente às culturas domésticas e derivados genéticos. Isto deve-se essencialmente às condições de crescimento sob *stress*, designadamente o *stress* ambiental e o *stress* hídrico [17].

2.2.1. Espécies endémicas da Madeira

A Madeira possui uma vasta e exuberante flora, que contribui para o seu elevado interesse a nível científico e socioeconómico. São várias as espécies endémicas, onde se inserem a *Rubus grandifolius*, a *Sambucus lanceolata* e a *Vaccinium padifolium* [22].

✓ *Rubus grandifolius*

O género *Rubus* tem ganho grande importância, dados os possíveis benefícios para a saúde provenientes dos seus fitoquímicos naturais. Alguns estudos [23] têm considerado os frutos de *Rubus* como um alimento nutritivo e saudável, devido ao seu conteúdo em compostos fenólicos, vitamina C, α -tocoferol, fibras, minerais e ácido linoléico e linolénico. O género *Rubus* compreende cerca de 130 espécies e a hibridização entre elas é comum [23].

A *Rubus grandifolius* Lowe (Figura 4) é tradicionalmente conhecida como “silvado”, sendo os frutos conhecidos como amoras. Esta variedade endémica é uma planta rara do Arquipélago da Madeira, pertencente à família *Rosaceae*.



Figura 4 - *Rubus grandifolius* (Pico do Arieiro).



Figura 5 – Amoras e silvado colhidos em Machico.

A utilização das folhas e frutos (Figura 5) da espécie *Rubus grandifolius* na alimentação e na etnofarmacologia da Madeira é antiga. Rivera e Obón (1995) [24], fizeram o levantamento desses usos: os frutos eram utilizados sob a forma de xarope para as crianças, também como remédio para a diabetes, como depurativo, diurético e analéptico¹, assim como para alívio da dor de garganta.

Esta espécie foi alvo de estudo por parte de Gouveia-Figueira e Castilho (2015) [25], que identificaram cerca de 40 compostos fenólicos na espécie selvagem (folhas, frutos e flores). De entre os compostos identificados, os flavonóides, as antocianinas, triterpenos e formas conjugadas de ácidos hidroxicinâmicos, foram os maioritários. Adicionalmente, concluíram que as flores são a parte morfológica com menor actividade antioxidante, já os frutos possuem maior capacidade antioxidante.

¹ Substância estimulante.

✓ ***Sambucus lanceolata***

A espécie *Sambucus lanceolata* (ou sabugueiro) é considerada um arbusto pertencente à família *Adoxaceae* e género *Sambucus*. Pode atingir até cerca de 6 metros de altura, desenvolvendo flores brancas entre Maio e Junho. As bagas, de cor violeta, ocorrem no final do verão (**Figura 7**) [22].



Figura 6 - Folhas de sabugueiro colhidas no Pico das Pedras.



Figura 7 - Bagas de sabugueiro colhidas no Pico das Pedras.

De acordo com a revisão de Mikuli-Petkovsek *et al.* (2015) [26], o sabugueiro representa um grupo heterogéneo de espécies selvagens, semi-domésticas ou cultivadas, com características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas comuns.

Poucos são os estudos sobre esta espécie em particular. Porém, na literatura foram encontrados vários estudos sobre outras espécies do género *Sambucus*. De acordo com a revisão de Sidor e Gramza-Michalowaska (2014) [27], o fruto do sabugueiro contém compostos com elevada actividade biológica, essencialmente polifenóis, como flavonóis, ácidos fenólicos, proantocianidinas e antocianinas. Estes

frutos são ricos em antocianinas, tais como a cianidina-3-glicósido, a cianidina-3-sambubiósido, a cianidina-3-sambubiósido-5-glicósido, cianidina-3,5-diglicósido, cianidina-3-rutinósido, pelargonidina-3-glucósido, pelargonidina-3-sambubiósido e delphinidina-3-rutinósido. O sabugueiro é também uma boa fonte de flavonóis e ácidos fenólicos, que podem aparecer na sua forma livre ou de glicósido. Os flavonóis predominantes são as quercetinas, canferóis e isoramnetinas.

Estudos epidemiológicos reportaram uma correlação significativa entre o consumo de bagas de sabugueiro e a ocorrência/ausência de várias doenças degenerativas, entre as quais se incluem as doenças cardiovasculares, cancro e a doença de *Alzheimer*. Estes efeitos encontram-se relacionados com o conteúdo de compostos bioactivos presentes nestas bagas [26].

✓ ***Vaccinium padifolium***

A espécie *Vaccinium padifolium* (ou uveira da Madeira, como é conhecida popularmente) pertence à família *Ericaceae*. É um arbusto que cresce até 6 metros de altura, sendo os ramos novos geralmente avermelhados, assim como as folhas (**Figura 8**) [22].

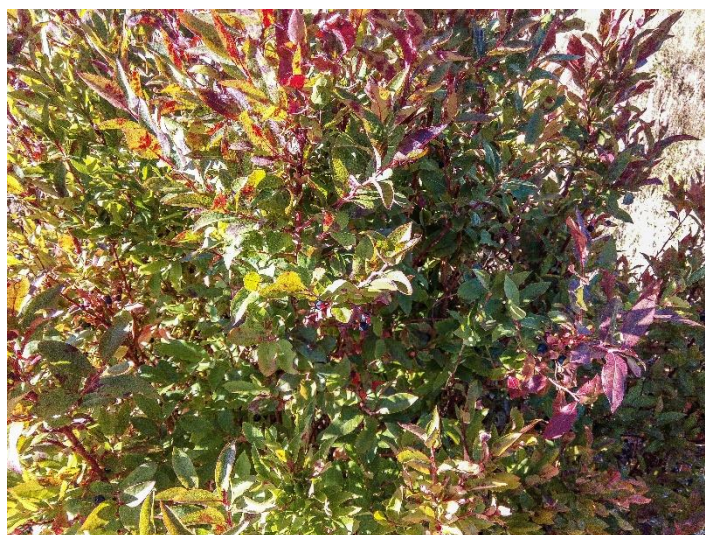


Figura 8 - Folhas verdes (maduras) e vermelhas (jovens) da uveira da Madeira.

Os frutos possuem forma quase ovóide, com cores que vão desde o preto ao azul (**Figura 9**). Têm sido utilizados como conservantes alimentares e em etnofarmacologia local, nomeadamente para o alívio da tosse, resfriados e bronquite [24].



Figura 9 - Bagas de uveira da Madeira.



Figura 10 – Corola de flores em forma de campânula da uveira da Madeira. Foto de Capelo (2003) [28].

Foi reportado na literatura [29] que as antocianinas presentes nas espécies de *Vaccinium* são galactósidos, glicósidos e arabinósidos das antocianidinas: delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina. As concentrações destas antocianinas variam significativamente entre as diferentes espécies do género *Vaccinium*.

A malvidina e delfinidina são as antocianinas maioritárias do género *Vaccinium*, constituindo cerca de 75% das antocianinas identificadas, embora a concentração de antocianinas seja variável com percentagens de delfinidina (27-40%), malvidina (22-33%), petunidina (19-26%), cianidina (6-14%) e peonidina (1-5%) [30].

Cabrita e Anderson (1999) [31] foram os primeiros a estudar as bagas desta espécie e conseguiram isolar 20 antocianinas a partir do extracto. No ano 2000 Cabrita,

Frøystein e Anderson [32] isolaram mais 5 antocianinas que não haviam sido reportadas na publicação anterior. Concluíram assim que esta é uma espécie constituída por uma mistura muito complexa de antocianinas.

2.2.2. Espécie endémica dos Açores

✓ *Vaccinium cylindraceum*

A espécie *Vaccinium cylindraceum* Sm., (ou uveira dos Açores) é uma planta endémica do Arquipélago dos Açores, também pertencente à família *Ericaceae*. É um arbusto que cresce até 3 metros de altura, com folhas caducas. As suas flores aparecem em Junho e os seus frutos entre Setembro/ Outubro (Figura 11). Esta planta é amplamente distribuída em todo o Arquipélago dos Açores à excepção da ilha Graciosa, crescendo principalmente em solos ácidos [33]



Figura 11 – Bagas, folhas e flores da uveira dos Açores. Fotos de Hélder Fraga [34]

Há alguns estudos referentes à morfologia e ao cultivo da planta mas, apesar de mencionados [35], não é possível encontrar qualquer estudo sobre o seu perfil fitoquímico na literatura da especialidade.

2.3. Outras espécies

✓ *Elaeagnus umbellata*

A espécie *Elaeagnus umbellata* (também conhecida por oliveira de Outono) é um arbusto nativo do sul da Europa e da Ásia Ocidental e Central. Foi introduzida nos Estados Unidos como planta ornamental por volta de 1830. Esta é uma espécie pouco cultivada e pouco valorizada; é considerada invasiva nos Estados Unidos [36]. Existem

alguns, poucos, *especimens* na Madeira, havendo interesse na sua replicação para produção de bagas.



Figura 12 - Bagas e folhas da oliveira de Outono.

Dependendo do cultivar, as suas bagas podem possuir pigmentação que varia entre o vermelho e o amarelo (Figura 12). As vermelhas são maioritariamente constituídas por licopeno. O cultivar “*Charlie’s Golden*”, que produz bagas de pigmentação amarela, possui menor quantidade de licopeno, porém contém elevada concentração de fitoeno² [37].

Pei *et al* (2015) [38] analisaram os compostos fenólicos e tocoferóis nas bagas vermelhas e amarelas, uma vez que até à data pouco se sabia acerca do teor de compostos bioactivos, com excepção do seu elevado conteúdo de licopeno. Para além de um alto teor de compostos fenólicos nas bagas vermelhas (434 mg GAE/ 100g de peso fresco), os autores reportaram um elevado teor em Vitamina E, superior ao dos morangos, mirtilos e amoras. Esta combinação de fitoquímicos tornam as bagas de *E. umbellata* uma fonte atractiva de ingredientes funcionais, que podem ser usados em alimentos e bebidas.

² Um precursor do licopeno

3. Extracção, quantificação e separação de compostos bioactivos

3.1. Técnicas de extracção de compostos bioactivos

A extracção é um passo crucial em qualquer estudo, quer de uma planta, quer na descoberta de novos fármacos, e desempenha um papel fundamental no resultado final [1,39]. O principal objectivo deste passo é a extracção completa dos compostos de interesse e a sua protecção contra a degradação [40]. O método de extracção deve ser seleccionado de acordo com o material vegetal e com a natureza dos compostos de interesse. Após o processo apropriado de extracção é possível passar aos passos seguintes, de separação, identificação e caracterização dos compostos bioactivos [1].

Aquando da extracção sólido-líquido são necessários alguns passos importantes como a pré-lavagem, secagem ou a liofilização e moagem, de modo a obter uma amostra homogénea, aumentar a superfície de contacto entre a amostra e o sistema de solvente e promover o aumento do rendimento de extracção [41]. Os factores comuns que podem afectar o processo de extracção são as propriedades da matriz, da parte morfológica da planta, o solvente, a temperatura, a pressão e o tempo [1].

O desenvolvimento das técnicas cromatográficas e espectrométricas tornaram a análise dos compostos bioactivos mais fácil. Contudo, o sucesso da análise continua a depender do método de extracção, dos parâmetros de extracção e da parte morfológica da planta a partir da qual é produzido o extracto [1].

Os compostos bioactivos podem ser extraídos a partir do material vegetal, por várias técnicas clássicas de extracção, convencionais ou não-convencionais. Em geral, as características dos solventes utilizados (em especial a polaridade), assim como a aplicação de aquecimento, estão na base destas técnicas.

A escolha do solvente (ou sistemas de solvente) depende da natureza dos compostos bioactivos de interesse. Como tal, o factor mais importante nesta decisão é a polaridade dos compostos-alvo. Outros factores como a afinidade molecular entre o solvente e o soluto, a transferência de massa, o uso de co-solventes, a segurança a

nível ambiental, a toxicidade e o custo, também são importantes na selecção do solvente para a extracção dos compostos bioactivos [1].

Estão disponíveis diferentes sistemas de solventes para extrair os compostos bioactivos a partir dos produtos naturais. Para a extracção de compostos hidrofílicos é imperativo o uso de solventes polares como o metanol, etanol e/ou água. Para a extracção dos compostos mais lipofílicos faz-se uso do diclorometano ou da mistura de diclorometano/metanol (1:1). Em alguns casos, a extracção com hexano é usada para desengordurar os extractos, removendo lípidos simples, ceras e terpenos [41].

3.1.1. Técnicas de extracção convencional

As técnicas convencionais para a obtenção dos compostos bioactivos das plantas são a extracção por *Soxhlet*, a maceração e hidrodestilação [1]. O primeiro passo desta técnica é a moagem da planta, de modo a aumentar a superfície de contacto e uma mistura adequada com o solvente [1].

A extracção por *Soxhlet* é, frequentemente, usada para o isolamento de flavonóides a partir de extractos brutos. Os solventes utilizados são misturas aquosas de metanol ou acetonitrilo [12].

A extracção por maceração é geralmente utilizada para extracção de compostos bioactivos que se degradam a temperaturas elevadas. Esta técnica é a mais antiga e a mais simples, pode ser realizada com ou sem agitação e é muito utilizada para a extracção de flavonóides a partir de amostras sólidas. Como solvente, geralmente, é utilizado o metanol ou acetonitrilo [40].

A hidrodestilação é um método tradicional para a extracção de óleos essenciais a partir das plantas. Não estão envolvidos solventes orgânicos e pode ser realizada antes da desidratação da planta [1].

Os maiores desafios destas técnicas são os longos tempos de extracção e os elevados custos associados à aquisição de solventes de alto grau de pureza. A evaporação da grande quantidade de solvente, a baixa selectividade de extracção e a decomposição térmica dos compostos são outros obstáculos que condicionam as técnicas referidas. De modo a superar estas limitações, foram introduzidas novas e

promissoras técnicas de extracção, referidas como técnicas de extracção não-convencionais [39].

3.1.2. Técnicas de extracção não-convencionais

Para além das metodologias convencionais de extracção, um variado leque de técnicas modernas têm sido introduzidas nas últimas décadas [39]. Estas novas técnicas incluem extracção assistida por ultrassons (UAE, do inglês *ultrassound assisted extraction*), extracção assistida por micro-ondas (MAE, do inglês *microwave assisted extraction*), extracção por fluido supercrítico (SFE, do inglês *supercritical fluid extraction*) e extracção por líquido pressurizado (PLE, do inglês *pressurized liquid extraction*) [39].

✓ Extracção assistida por ultrassons

O ultrassons é um tipo especial de onda de som, que vai para além do que o ouvido humano alcança. Induzido num meio líquido, este processo produz um fenómeno chamado cavitação, que envolve a produção, o crescimento e o colapso de bolhas. O mecanismo de extracção por ultrassons envolve dois tipos principais de fenómenos físicos: (1) a difusão que atravessa a parede celular e (2) a libertação do conteúdo após a sua destruição [1]. A composição da amostra, o tamanho das partículas e o solvente são factores determinantes para uma extracção eficiente. Não obstante, a temperatura, a pressão, a frequência e o tempo de extracção, são factores que regem a acção do ultrassons [1].

✓ Extracção assistida por micro-ondas

A extracção assistida por micro-ondas (MAE) é também considerado um “novo” método para a extracção a partir de diferentes materiais, usando a energia de micro-ondas [1]. As micro-ondas são combinadas com a tradicional extracção com solventes, aumentando permeabilidade da planta previamente triturada, e promovendo a dissolução dos compostos bioactivos [42]. As principais vantagens da MAE sobre os métodos convencionais são (1) a redução do tempo do processo extractivo e (2) a obtenção de uma eficiência de extracção semelhante [43].

✓ **Extração por fluido supercrítico**

A extração por fluido supercrítico (SFE) pode ser uma alternativa benéfica a nível ambiental, comparativamente às técnicas convencionais com solventes orgânicos. A SFE é uma técnica rápida, automática, selectiva e evita o uso de grandes quantidades de solventes potencialmente tóxicos. O dióxido de carbono (CO₂) tem sido o solvente mais utilizado. Por outro lado pode ser também benéfica para a extracção dos compostos bioactivos, já que a ausência de luz e ar durante o processo reduz a degradação que pode ocorrer durante a extracção com técnicas convencionais [44].

✓ **Extração por líquido pressurizado**

O conceito da extracção por líquido pressurizado (PLE) é aplicar elevadas pressões de forma a manter o solvente líquido para além do seu ponto de ebulição. A elevada pressão facilita o processo de extracção, diminuindo o tempo de extracção e a quantidade de solvente necessária. Esta técnica requer pequenas quantidades de solvente, dada a combinação da elevada pressão com a elevada temperatura, que proporcionam uma extracção mais rápida. Assim, a elevada temperatura de extracção promove a solubilidade dos analitos, pela diminuição da viscosidade e da tensão superficial do solvente [41].

A PLE tem sido aplicada, com sucesso, à extracção de compostos bioactivos a partir de diferentes plantas, bem como de fontes marinhas [41].

3.2. Extração de compostos polares das plantas

A extracção de compostos fenólicos das plantas pode envolver um grande número de solventes e distintas condições de extracção, dependendo ainda da complexidade da matriz. As condições são ajustadas pela variação dos diferentes rácios (amostra-solvente, solvente-solvente), temperatura e tempo de extracção [45]. Contudo, desenvolver um procedimento adequado para a extracção de todos os compostos fenólicos das plantas é um processo complexo.

Os extratos de origem vegetal são sempre uma mistura de compostos solúveis no sistema de solvente utilizado [16]. De acordo com Naczki e Shahidi (2006) [16], no âmbito da recuperação de polifenóis a partir das plantas, longos tempos de extracção

umentam a probabilidade de oxidação dos compostos fenólicos. Esta degradação pode ser evitada pela adição de agentes redutores aos solventes, nomeadamente o hidrogenossulfito de sódio (NaHSO₃).

São vários os sistemas de solventes utilizados para a extracção de composto fenólicos a partir das plantas. Como exemplos, são frequentemente utilizados o metanol, o etanol, o propanol, o acetato de etilo e a acetona, sendo comum as combinações entre eles. É também usual a utilização de diferentes concentrações destes solventes em água [16].

As antocianinas (moléculas polares) são geralmente extraídas com solventes orgânicos acidificados [16]. Os solventes mais eficientes são as misturas aquosas de acetona, metanol e etanol [46], embora a extracção com metanol acidificado tenha sido reportada como sendo a mais eficiente [46–48]. Estes sistemas de solventes destroem a membrana celular e simultaneamente solubilizam as antocianinas, estabilizando-as [16]. Durante a extracção com solventes, é necessário ponderar sobre que ácido utilizar, para evitar a hidrólise das antocianinas aciladas [48]. Já que este tratamento químico pode destruir a estrutura natural dos compostos de interesse, são geralmente utilizados ácidos orgânicos (ácido acético ou fórmico), em vez de ácidos minerais (0,1% HCl) [48].

Há que considerar o facto de estas metodologias implicarem também a co-extracção de substâncias não-fenólicas, como os açúcares, os ácidos orgânicos e proteínas [48].

3.3. Separação, quantificação e identificação de compostos bioactivos

3.3.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

De entre os diferentes métodos disponíveis para a separação e quantificação de compostos fenólicos, a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) é a preferida. Esta técnica oferece a oportunidade de separar e, simultaneamente, analisar os componentes, bem como os seus derivados e produtos de degradação [49].

Esta técnica é utilizada devido às características intrínsecas dos compostos, nomeadamente das agliconas de flavonóides (hidrofóbicos) e dos glicósidos de flavonóides (hidrofílicos), e a elevada massa molecular dos compostos [49].

As condições cromatográficas do método de HPLC incluem o uso, quase exclusivo, da coluna C18 de fase reversa, detector de arranjo de díodos (DAD, do inglês *Diode Array Detector*), UV-VIS e sistema de solvente binário contendo água acidificada (solvente A) e um solvente orgânico polar (solvente B). O HPLC de fase reversa acoplado à espectrometria de massa (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) tem-se tornado também uma ferramenta analítica importante na identificação de polifenóis [4].

No entanto, devido às desvantagens no limite de detecção e sensibilidade, os métodos de HPLC apresentam limitações especialmente em matrizes complexas, como os extractos de plantas em bruto – não sujeitos a purificação parcial. Daí ser essencial, antes da análise por HPLC, uma purificação dos polifenóis complexos, a partir da matriz, após o processo de extração. O objectivo deste passo é eliminar alguns possíveis compostos interferentes, simplificando a leitura dos cromatogramas [4]. Uma das técnicas mais utilizadas é a extração líquido-líquido.

✓ **Detecção ultravioleta**

Dada a existência de duplas ligações conjugadas e ligações aromáticas, todos os compostos fenólicos exibem elevada ou baixa absorção na região UV ou UV-Vis. Os ácidos fenólicos com a estrutura do ácido benzóico apresentam o seu máximo de absorção no intervalo entre 200 a 290 nm. A única excepção é o ácido gentísico, que tem uma absorvância que se estende até aos 355 nm. Os derivados do ácido cinâmico, devido à sua conjugação adicional, mostram uma banda entre os 270 a 360 nm [49].

Todas as agliconas de flavonóides contêm anéis aromáticos e, conseqüentemente, absorvem eficientemente na região do UV. O primeiro máximo é encontrado no intervalo de 240 a 285 nm devido ao anel A e o segundo máximo aparece no intervalo de 300 a 350 nm, devido ao padrão de substituição e conjugação do anel C [49].

✓ Detecção por espectrometria de massa (MS)

A análise UV-Vis é uma ferramenta analítica muito importante, mas não é suficiente para a completa identificação da composição de uma mistura complexa. Assim, o desenvolvimento das técnicas de espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida permitiu a separação e identificação de muitas classes de compostos polares, presentes em misturas complexas [50].

Os espectrómetros de massa baseiam-se na diferença da razão massa/carga (m/z) resultantes da ionização das moléculas, permitindo uma diferenciação entre elas. Esta técnica implica que os compostos a serem analisados sejam carregados, frequentemente pela desprotonação ou protonação, e separados pelos seus valores de m/z [12].

Esta técnica raramente é usada para a caracterização estrutural, mas fornece a massa molecular dos diferentes constituintes, contribuindo assim, para a adequada análise qualitativa ou a identificação de compostos em solução [51]. A ionização por *electrospray* (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*) fornece as massas moleculares de moléculas separadas cromatograficamente. Quando combinada com um analisador do tipo armadilha de iões (*ion trap*) que permite espectrometria de massa, fornece detalhes de compostos fenólicos não-voláteis e estáveis. Esta ionização pode ocorrer no modo positivo ou no modo negativo [51].

No modo negativo de ionização torna-se fácil a identificação dos ácidos fenólicos, hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos, dada a fácil desprotonação. No modo positivo, estes formam aductos com os catiões da amostra ou da fase móvel, por exemplo com os iões sódio [51].

Dependendo das condições cromatográficas, os flavonóis monoméricos e as proantocianidinas diméricas e triméricas, tanto podem protonar a iões positivos como podem desprotonar a iões negativos. Este último caso é facilitado dado o aumento das cadeias das proantocianidinas. Os glicósidos de flavonóis também exibem resposta em ambos os modos de ionização, negativo e positivo [50].

Quanto às antocianinas são maioritariamente identificadas no modo positivo de ionização, na sua forma nativa, no catião *flavilium* [51]. Segundo a revisão de Castañeda-Ovando (2009) [48], a análise das antocianinas por MS tem sido realizada por diferentes propósitos, entre eles a elucidação estrutural, o estudo da transformação durante o processo de envelhecimento do vinho tinto e a polimerização e reacção com outros flavonóides.

4. Radicais livres e defesas antioxidantes

4.1. Radicais livres

Os radicais livres são entidades químicas que possuem tempo de vida curto e podem conter um ou mais electrões desemparelhados, sendo deste modo muito instáveis e reactivos [52].

Estes radicais induzem danos nas células devido aos seus electrões desemparelhados, resultando assim na oxidação dos componentes celulares e de biomoléculas essenciais [52]. A título de exemplo, as espécies reactivas de azoto (RNS, *Reactive Nitrogen Species*) produzidos pelos neurónios actuam como neurotransmissores e os gerados pelos macrófagos actuam como mediadores da imunidade. Estes RNS são também responsáveis pela adesão leucócita, trombose, angiogénese e tonificação vascular. Da mesma forma, as espécies reactivas de oxigénios (ROS, *Reactive Oxygen Species*) estão envolvidas na transcrição genética, na transdução e regulação de outras actividades na célula [52].

Os radicais livres são gerados no processo aeróbio como a respiração celular, exposição a infecções microbianas que envolvem a activação de fagócitos, durante actividade física intensiva ou pela acção de poluentes/ toxinas, como são exemplos o fumo, o álcool e a radiação UV [53].

4.1.1. Espécies reactivas de oxigénio (ROS)

Sabe-se que o oxigénio é um dos componentes mais importantes da vida aeróbia. Porém, em algumas circunstâncias, pode ser o responsável pela morte celular [54].

O oxigénio pode ser parcialmente reduzido durante o normal metabolismo ou como resposta inflamatória originando moléculas reactivas, conhecidos como ROS [55]. Estes ROS podem conter número ímpar de electrões, como o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo (OH^{\cdot}), hidroxiperoxil (HOO^{\cdot}), peroxil (ROO^{\cdot}) e alcoxi (RO^{\cdot}). Por outro lado, alguns ROS podem conter número par de electrões como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e hidroxiperóxido lipídico ($ROOH$) [55].

Os ROS maioritários – radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogénio e o radical hidroxilo – são subprodutos do metabolismo, gerados continuamente pela mitocôndria no crescimento celular. Outras fontes intracelulares de ROS incluem enzimas do citocromo P450, flavoproteína oxidases e enzimas peroxissomais envolvidas no metabolismo dos ácidos gordos [54].

Os ROS (de natureza electrofílica), atacam os centros nucleofílicos nas células, causando peroxidação lipídica, oxidação e, mais importante, danos no DNA. Se não reparados, os danos no DNA podem resultar na mutação das bases ou na quebra de cadeias simples ou duplas, na conformação e em anomalias do DNA. Os danos irreversíveis do DNA são o passo inicial no processo de carcinogénese. Desta forma, a acção dos ROS tem sido associada a algumas doenças, incluindo diabetes, *Alzheimer* e outras doenças neuro-degenerativas, mas também aterosclerose, doenças cardiovasculares e cancro [55].

A formação de ROS é uma consequência natural do metabolismo aeróbio, sendo parte integrante na manutenção da homeostase do oxigénio dos tecidos [54]. A homeostase do oxigénio – equilíbrio entre oxidantes constitutivos e antioxidantes – é mantida através de séries de reacções naturais de redução-oxidação (*redox*). Estas reacções envolvem a transferência de electrões entre duas espécies químicas, nas quais existem compostos que perdem electrões (oxidados) e aqueles que recebem electrões (reduzidos). Quando a homeostase do oxigénio não é mantida, o ambiente celular torna-se oxidativamente *stressado* [54].

4.1.2. Espécies reactivas de azoto (RNS)

Tal como os ROS, as espécies reactivas de azoto podem também ser classificados como espécies radicais ou espécies não-radicaais. As espécies radicais incluem o óxido nítrico ($\cdot NO$) e o dióxido de azoto ($\cdot NO_2$). Por outro lado os RNS não-radicaais são peroxinitratos alquílicos ($RONOO^-$), óxido nitroso (HNO_2) e peroxinitrito ($ONOO^-$).

As espécies $N_2^{\cdot+}$, $\cdot NO$ e $ONOO^-$ são as mais estudadas e desempenham um papel preponderante nas complicações cardiovasculares. O óxido nítrico ($\cdot NO$) é responsável pela formação dos produtos finais envolvidos no *stress* oxidativo, quer directa ou indirectamente, após a reacção com oxigénio [56].

4.1.3. Oxidação dos lípidos

Os lípidos são mais susceptíveis ao processo oxidativo na presença de catalisadores, como o calor, a luz, as enzimas, os metais, as metaloproteínas e os microrganismos. Resultam na perda de sabor em alimentos, de aminoácidos essenciais, vitaminas lipossolúveis e outras moléculas bioactivas [57]. Quando ocorre no corpo humano, a oxidação dos lípidos é causada pelo *stress* oxidativo. Devido aos efeitos destrutivos que causam a nível celular, é associada a diversas fisiopatologias, entre as quais a inflamação e a aterosclerose [57].

Os ácidos gordos insaturados das membranas fosfolipídicas e colesterol, especialmente o colesterol LDL, são geralmente os mais afectados por estas reacções, causando danos celulares irreversíveis [57]. A oxidação dos lípidos pode ocorrer *via* autooxidação, fotooxidação e oxidação térmica ou enzimática [57].

4.2. *Stress* Oxidativo

O *stress* oxidativo é definido como uma falha no equilíbrio entre a existência de ROS/RNS e a capacidade do organismo em inibir a acção destas espécies, através dos sistemas de protecção antioxidante [53].

De um modo geral, sob condições de *stress* oxidativo, os radicais livres que não são reduzidos ou removidos do ambiente celular podem causar danos nas macromoléculas essenciais, incluindo os ácidos nucleicos, os lípidos e as proteínas. A oxidação dos lípidos pode causar alterações na estrutura e fluidez da membrana [58].

***Stress* oxidativo associado a algumas patologias**

Vários estudos têm apontado o *stress* oxidativo como o factor desencadeante de algumas patologias.

Pisoschi e Pop (2015) [53], reviram alguns estudos que associam o *stress* oxidativo ao cancro, a doenças inflamatórias, cardiovasculares, neurodegenerativas, a diabetes, entre outras.

✓ **Stress oxidativo e a diabetes**

Actualmente, têm sido reportadas evidências que suportam o papel do *stress* oxidativo na patogénese da diabetes, tanto no tipo 1 como no tipo 2 [52,59]. A formação excessiva dos radicais livres na diabetes é resultado da oxidação da glicose, da glicação não-enzimática das proteínas e subsequente degradação oxidativa de proteínas glicadas [59].

Na condição de aumento do *stress* oxidativo, o dano celular pode afectar a função das células- β pancreáticas que, dada a diminuída expressão de enzimas antioxidantes, são extraordinariamente sensíveis aos ROS e RNS [53]. Desta forma, o aumento do *stress* oxidativo tem sido aceite como responsável no desenvolvimento e progressão da diabetes e das suas complicações [60].

Os ROS são capazes de interagir com os substratos envolvidos na sinalização intracelular da insulina. A elevada carga energética nas células resulta maioritariamente da elevada quantidade de açúcar, aumentando o fluxo de coenzimas reduzidas (NADH e FADH₂) na cadeia transportadora de electrões [53].

4.3. Capacidade antioxidante

A exposição a estas diferentes formas de radicais livres, levou a que os organismos desenvolvessem um mecanismo de defesa, em forma de antioxidantes [58].

Os antioxidantes são compostos (ou sistemas de compostos) capazes de interagir com os radicais livres e terminar as reacções em cadeia causadas por estes [7]. Os antioxidantes podem actuar de diferentes formas na luta contra os radicais livres, nomeadamente como (1) mecanismo de prevenção, (2) mecanismo de reparação e (3) defesa antioxidante [58].

A eficiência destes compostos é geralmente influenciada por diversos factores, incluindo as suas características estruturais, concentração, temperatura, tipo de oxidação do substrato, estado físico do sistema, bem como a presença de pro-oxidantes e sinergismos [7,57].

Os antioxidantes podem ocorrer naturalmente nas plantas, animais e microrganismos ou podem ser sintetizados por meios químicos. As plantas são uma fonte natural de antioxidantes como tocoferóis e polifenóis, que apresentam efeitos sinérgicos e são usados directamente para inibir a oxidação *in vitro* e *in vivo* [57]. Os compostos fenólicos exibem muitos mecanismos de acção biologicamente importantes como a eliminação dos ROS e/ou inibição na sua produção. Possuem ainda impacto no ciclo celular, na supressão de tumores e na modelação do sinal de transdução e apoptose [20].

O corpo humano desenvolveu mecanismos para manter o seu equilíbrio e de modo a reduzir o *stress* oxidativo. Estes mecanismos incluem sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, que podem ser produzidos por diversos processos no organismo (endógenos) ou adquiridos pela dieta (exógenos) [20].

4.3.1. Antioxidantes endógenos

Os antioxidantes endógenos encontram-se divididos em sistemas enzimáticos e não-enzimáticos. De entre os sistemas enzimáticos destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutatona peroxidase (GPX).

As enzimas SOD constituem o sistema de defesa antioxidante contra o *stress* oxidativo e convertem o O_2^- em H_2O_2 . Existem três tipos de SOD nos tecidos dos mamíferos [53].

A CAT, a enzima envolvida na redução do H_2O_2 em água, é expressa em muitas células, órgãos e tecidos e é expressa em elevadas concentrações, no fígado e eritrócitos. Já a GPX catalisa a redução do H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos a água ou ao álcool correspondente [53].

Por outro lado, os sistemas não-enzimáticos encontram-se representados pelos tióis, ácido úrico, bilirrubina, melatonina, co-enzima Q reduzida, ácido α -lipóico, selénio orgânico endógeno.

4.3.2. Antioxidantes exógenos

Os sistemas antioxidantes endógenos são complementados pela intervenção dos antioxidantes exógenos, presentes na dieta ou em suplementos nutricionais [53].

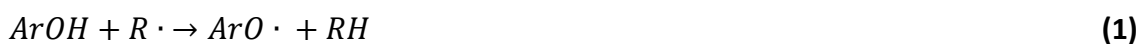
O ácido ascórbico, um dos antioxidantes hidrossolúveis, é dotado de grande capacidade antioxidante, sendo rapidamente oxidado a ácido desidroascórbico [53]. Por outro lado, a vitamina E (ou α -tocoferol) luta contra a peroxidação lipídica da membrana celular e é capaz de parar a reacção em cadeia pela formação de um derivado pouco reactivo, incapaz de atacar substratos lipídicos [53].

Os carotenóides e os compostos fenólicos também fazem parte do sistema antioxidante exógeno.

Todos estes antioxidantes funcionam de forma sinérgica contra os diferentes tipos de radicais livres. [60].

4.3.3. Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*

Os ensaios para a avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante dividem-se em duas categorias: ensaios baseados nas reacções de transferência de átomos de hidrogénio (HAT, do inglês *Hydrogen Atom Transfer*) e ensaios baseados na transferência de electrões (ET, do inglês *Electron Transfer*) [57]. Estes mecanismos encontram-se representado nas equações (1) e (2), respectivamente:



onde, *ArOH* representa o antioxidante e *R* o radical livre.

As espécies resultantes destas reacções são: espécies neutras (RH), um radical oxidado ($ArO \cdot$), um catião radicalar ($ArOH \cdot^+$) e espécies energeticamente estáveis (R^-) [7].

De entre as diferentes técnicas utilizadas para a análise da actividade antioxidante, incluem-se a espectrofotometria, a fluorimetria, a espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e a ressonância magnética nuclear (NMR) [57].

Os ensaios *in vitro* para a determinação da actividade antioxidante são simples, rápidos, automatizados e utilizados na análise e avaliação de novos compostos

antioxidantes ou extractos de produtos ou subprodutos naturais [57]. É frequente usar-se radicais sintéticos na avaliação de extractos e compostos puros.

✓ Ensaio da capacidade de neutralização do radical DPPH

O ensaio que visa a captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]) foi descrito pela primeira vez por Blois em 1958, a partir do qual tem sofrido algumas alterações por vários investigadores [61]. Este é um dos ensaios mais utilizados na determinação da capacidade antioxidante. Trata-se de um método baseado no mecanismo de HAT, de forma a neutralizar o radical DPPH [57].

De um modo geral, este ensaio é baseado na neutralização do radical DPPH, pela acção dos antioxidantes alvo de estudo. O radical DPPH é um radical cromogénico estável, com uma cor violeta escura (Figura 13). A reacção promove a mudança de cor do DPPH para amarelo claro, cuja absorvância é medida a 517 nm. Esta descoloração actua como indicador da eficácia do antioxidante [57].

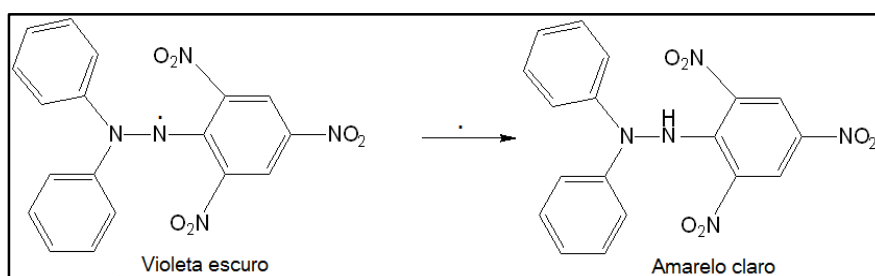


Figura 13 - Estrutura do radical DPPH (cor violeta escuro) e a sua forma reduzida (cor amarelo claro), após neutralização. Fonte: Gouveia (2011) [12].

Este ensaio é simples e requer apenas um espectrofotómetro UV-Vis. Tem sido reportado que a captura do DPPH não mimetiza o mecanismo de captura dos radicais pelos antioxidantes nos alimentos reais e nos sistemas biológicos. Isto acontece devido à deficiência de radicais de oxigénio no ensaio. Este método é amplamente baseado no facto da actividade antioxidante ser igual à capacidade de doar electrões, também designado de poder de redução [62].

Uma das maiores limitações do ensaio espectrofotométrico do DPPH é a sobreposição no espectro dos compostos que absorvem no mesmo intervalo de comprimento de onda. Por exemplo, as antocianinas possuem forte absorção no

intervalo 500-550 nm, assim como o DPPH. Isto pode levar a interferências nos resultados e na sua interpretação [57].

✓ **Ensaio da capacidade de neutralização do radical ABTS^{•+}**

O método de neutralização do radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS^{•+}) foi desenvolvido por Rice-Evans e Miller em 1994 e foi depois modificado por Re *et al.* em 1999 [61].

Este ensaio mede a capacidade dos antioxidantes em neutralizar o catião radical estável (ABTS^{•+}), um cromóforo azul-esverdeado com máximo de absorção a 734 nm, que decresce a sua intensidade na presença de antioxidantes. Este método é classificado como HAT [57].

O Trolox, um análogo da Vitamina E, é utilizado como controlo positivo, deste modo, a actividade é expressa em equivalente de Trolox [61]. A extensão da descoloração da cor depende da duração da reacção, da actividade antioxidante intrínseca e da concentração da amostra [57].

Este ensaio de descoloração mede a capacidade antioxidante total de substâncias lipofílicas e hidrofílicas [61], bem como substâncias puras, fluidos corporais e amostras vegetais [57].

✓ **Determinação do conteúdo total de fenólicos**

O conteúdo total de fenólicos (TPC, do inglês *Total Phenolic Content*) é uma forma de avaliar a capacidade redutora dos extractos. O método de Folin-Ciocalteu é um método bem conhecido e utilizado para a avaliação destes compostos, em extractos obtidos através de diferentes matrizes [57].

O ensaio de Folin-Ciocalteu é baseado na redução deste reagente pelos compostos fenólicos em meio alcalino. Ainda não é bem conhecida a natureza química deste reagente, mas acredita-se que contém uma mistura complexa dos ácidos fosfomolibdato/fosfotungstato, que são reduzidos e dão origem um cromóforo de cor azul com máximo de absorção a 765 nm [63]. Geralmente utiliza-se o ácido gálico

como padrão. Desta forma, os resultados são expressos em miligrama equivalente de ácido gálico por 100g de peso fresco (mg GAE/ 100g).

O método de Folin-Ciocalteu possui várias vantagens, tais como simplicidade no método, reprodutibilidade e robustez [57]. Porém, existem também alguns inconvenientes associados a este método: este teste é sensível ao pH, temperatura e tempo de reacção. Outro inconveniente associado é o facto de apresentar resultados superiores aos esperados, devendo-se essencialmente à contribuição de agentes redutores não-fenólicos, presentes em solução, que reduzem o reagente de Folin-Ciocalteu, nomeadamente açúcares redutores e alguns aminoácidos [64]. Assim, os resultados da determinação do TPC podem ser superiores quando comparados com os valores obtidos noutros métodos, como o HPLC [57]. Este ensaio é realizado em sistemas aquosos e a sua aplicação em fenólicos lipofílicos necessita de ajuste nos solventes utilizados [64].

✓ **Determinação do conteúdo total de flavonóides**

O conteúdo total de flavonóides (TFC, do inglês *Total Flavonoid Content*) é frequentemente determinado pelo ensaio espectrofotométrico baseado na formação do complexo de cloreto de alumínio. Este método foi proposto inicialmente por Christ e Müller em 1960, para a avaliação de matrizes alimentares ou amostras vegetais, e tem sofrido várias modificações ao longo do tempo [65].

O catião alumínio forma complexos estáveis com os flavonóides, em metanol (Figura 14), verificando-se assim, uma intensificação da banda de absorção e um desvio espectrofotométrico para comprimentos de onda maiores [66].

A leitura é realizada em espectrofotómetro a 415 nm, utilizando-se cloreto de alumínio em metanol. O complexo (flavonóide-Al) formado absorve num comprimento de onda superior ao dos flavonóides. Poderá existir a possibilidade de formação de complexos com os ácidos fenólicos, porém absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando assim, a interferências destes compostos [66].

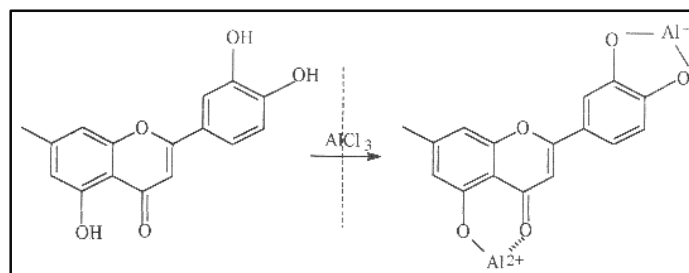


Figura 14 – Mecanismo proposto para a formação do complexo flavonóide-Al, em solução metanólica do cloreto de alumínio.

Este ensaio é uma opção simples, rápida, reprodutível e de baixo custo, mas tal como os outros métodos, o método do cloreto de alumínio para a determinação do TFC, também possui limitações. Este método não é indicativo da quantidade de flavonóides, podendo este valor ser inferior ou superior ao valor real. O valor resultante é apenas uma estimativa do conteúdo de flavonóides, sendo o valor proporcional ao número de flavonóides. O valor obtido é tanto mais próximo do valor real quanto maior o conteúdo de flavonóis e por outro lado é mais distanciado do valor real, tanto maior o número de flavonas. Isto deve-se ao facto de os complexos derivados de flavonas absorverem em comprimentos de onda inferiores, originando uma subestima dos valores [66].

✓ Outros ensaios químicos

Na literatura [67] encontram-se descritos dezenas de ensaios que permitem a avaliação, *in vitro* e *in vivo*, das propriedades antioxidantes de compostos bioactivos e extractos vegetais. Estes ensaios não serão desenvolvidos neste trabalho, já que objectivo não permite o seu desenvolvimento.

São exemplos de outras metodologias *in vitro*, a determinação da actividade quelante de metais, o ensaio de captura do radical peróxido de hidrogénio, do óxido nítrico, do anião superóxido, do radical hidroxilo, entre outros [29]. Já nos testes *in vivo*, as amostras são administradas e testadas em animais, como os ratos, em determinadas doses [67].

5. Digestão

Os vários estudos reportados anteriormente abordam os compostos bioactivos e os seus benefícios para a saúde, que abrangem a acção antioxidante, a inibição ou indução de enzimas, a inibição de actividade de receptores e a indução ou inibição da expressão de genes. Porém, quando os alimentos entram em contacto com os fluidos fisiológicos poderão ocorrer várias interações que podem afectar a biodisponibilidade destes compostos bioactivos [68].

Muitos polifenóis passam através do intestino delgado sem que ocorra a sua absorção, encontrando assim a microbiota intestinal. Isto conduz ao desenvolvimento de reacções mútuas entre os polifenóis e a microbiota intestinal. Por um lado os polifenóis são biotransformados nos seus metabolitos, resultando no aumento da sua biodisponibilidade. Por outro lado, os polifenóis modulam a composição da microbiota intestinal, principalmente pela inibição de bactérias patogénicas e na estimulação das bactérias benéficas. Assim, as interações entre os polifenóis e a microbiota podem resultar num impacto positivo na saúde do hospedeiro humano [69].

As bactérias do intestino não só ajudam a maximizar a absorção dos nutrientes, como também são essenciais para os mecanismos de defesa do organismo [70]. A microbiota protege contra agentes patogénicos gastrointestinais, processa os nutrientes e modula a resposta imune intestinal através do estímulo de citocinas. Adicionalmente, a microbiota biotransforma os polifenóis em metabolitos que podem possuir uma actividade biológica importante [69].

Assim, a microbiota intestinal é capaz de degradar agliconas e libertar compostos aromáticos simples, a partir de, principalmente, das flavanonas e flavanóis. Tornando-os disponíveis para subsequente absorção e conjugação [69].

Nos últimos tempos tem aumentado o interesse no uso de metodologias *in vitro* para estudar a digestão e a biodisponibilidade dos compostos bioactivos. Estes modelos visam mimetizar, *in vitro*, o processo que ocorre no tracto gastrointestinal. Desta forma, nestes modelos são simuladas as condições fisiológicas, nomeadamente, o pH, a composição química dos fluidos fisiológicos e o tempo de residência em cada um dos compartimentos (boca, estômago e intestinos) (Figura 15) [71].

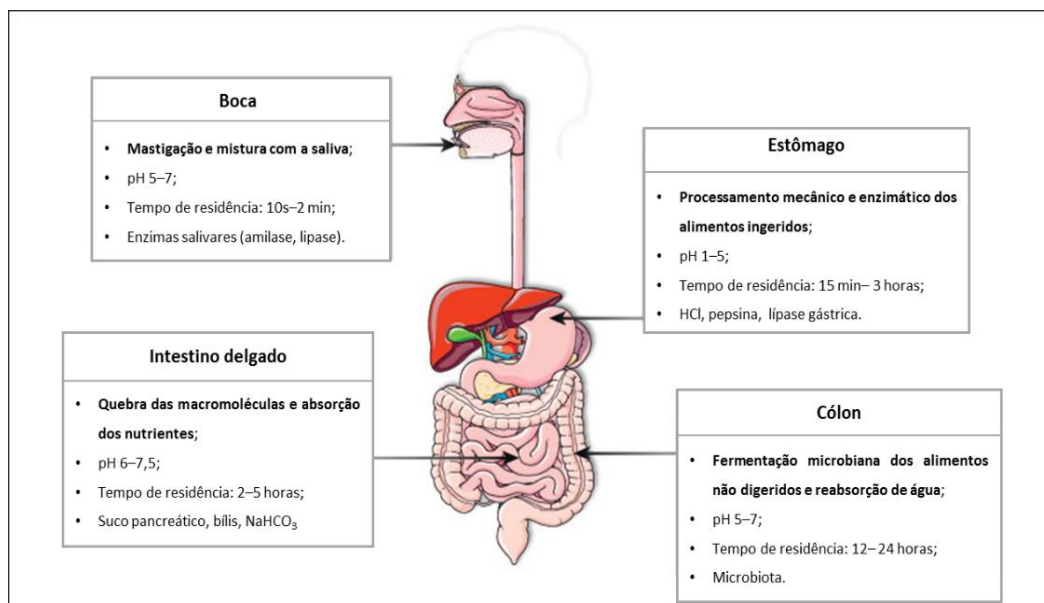


Figura 15 – Regiões específicas da digestão gastrointestinal humana. Adaptado de Versantvoort *et al.* (2004) [72].

Na literatura são descritos ensaios a 37 °C, a pH idêntico ao fisiológico para cada passo, tendo em conta o tempo de residência em cada compartimento [73,74]. A concentração e composição enzimática são outros factores importantes a considerar. Tipicamente, elevadas concentrações de enzimas aceleram a digestão e/ou a degradação dos componentes dos alimentos.

No sistema *in vivo* o tempo de digestão depende das características individuais, como a idade, o género, o estado de saúde, o estado mental e a hora do dia, bem como as propriedades do alimento e da microbiota de cada pessoa [73,74].

Vários investigadores, revistos por Hur *et al.* (2011) [73], usaram os métodos de digestão *in vitro* para analisar as mudanças estruturais, a biodisponibilidade e a digestibilidade de alimentos e fármacos. Contudo, têm sido observadas diferenças entre os modelos *in vitro* e *in vivo*. É importante, de facto, um estudo de correlação de modo a obter resultados *in vitro* mais realistas.

5.1. Enzimas presentes na digestão

Os estudos da digestão tendem a utilizar, conforme evoluem, uma gama mais ampla de enzimas digestivas, tais como a α -amilase, mucina, pepsina, pancreatina e lipase. É de notar que estas enzimas são geralmente adicionadas sequencialmente, de modo a simular os diferentes passos do processo digestivo. É importante referir que

estas enzimas requerem frequentemente componentes adicionais para funcionar eficientemente, nomeadamente os co-factores [73].

Muitos factores, como as características da amostra, actividade enzimática, composição iónica, utilização de *stress* mecânico e tempo de digestão, têm influência significativa nos resultados da digestão *in vitro*. Por outro lado, as condições *in vivo* nunca poderão ser completamente simuladas *in vitro*.

Boisen e Eggum (1991) [74] definiram a relação entre a digestão *in vitro* e a actividade enzimática. Reportaram ainda que as características da enzima são o factor mais importante neste modelo. Outros factores como a concentração, a temperatura, o pH, a estabilidade, os activadores ou os inibidores e o tempo de incubação afectam a actividade da enzima.

5.1.1. Lipase

As lipases encontram-se presentes no estômago (lipase gástrica) e no pâncreas (lipase pancreática), nas superfícies dos quais aparecem ligadas a lípidos emulsificados. Convertem triacilgliceróis e diacilgliceróis em monoacilgliceróis e em ácidos gordos. Estes produtos lipídicos digeridos são solubilizados no interior de micelas e vesículas que os transportam até ao epitélio celular, através da camada de muco [73].

A actividade da lipase pancreática depende da presença de co-lipase, sais biliares e cálcio. Alguns autores [75] defendem que o cálcio reage com os ácidos gordos libertados, pela designada complexação iónica, removendo-os assim a partir da superfície das gotículas lipídicas, prevenindo a inibição da lipase.

5.1.2. Amilase

A amilase está presente na boca e no estômago e é responsável pela conversão do amido a oligossacarídeos e monossacarídeos. A amilase é rotineiramente usada para estudos de digestão *in vitro* em amostras alimentares. Vários métodos têm sido desenvolvidos para prever a digestibilidade ou alterações fisiológicas nas amostras alimentares. Porém, esta é uma abordagem complexa, já que depende de vários factores. Geralmente, os métodos *in vitro* baseiam-se na digestão do amido pela α -

amilase, digestão dos lípidos pela lipase e/ou digestão proteica pela pepsina e tripsina [73].

5.1.3. Proteases

As proteases encontram-se maioritariamente no estômago (pepsina) e intestino delgado (tripsina e quimotripsina), sendo responsáveis pela quebra de proteínas/péptidos em pequenos péptidos e aminoácidos.

Hur *et al.* (2011) reviram que os métodos de digestão *in vitro* que fazem uso de complexos enzimáticos (como é o caso da mistura de saliva, do suco gástrico, suco duodenal ou suco biliar) têm vantagem e são mais reprodutíveis do que aqueles que usam apenas enzimas. Reportaram ainda que o número e o tipo de enzimas proteolíticas, as condições de digestão e a análise de hidrolisados proteicos utilizados na digestão *in vitro*, produzem diferentes resultados de digestibilidade. O aumento de proteínas na dieta induz um aumento na secreção de enzimas proteolíticas, assim como o aumento do amido ou lípidos ingeridos faz aumentar a secreção da amilase e lipase, respectivamente.

5.2. Biodisponibilidade dos compostos fenólicos

A biodisponibilidade é comumente definida como a quantidade do constituinte do alimento que está presente no intestino, como consequência da libertação desse constituinte, a partir da matriz sólida, estando disponível para atravessar a barreira intestinal. Diferentes passos contribuem directamente para este processo, nomeadamente a libertação, a absorção, a distribuição, o metabolismo e a excreção [76]. Assim, a biodisponibilidade depende da absorção dos compostos activos, o do seu metabolismo e excreção. Isto depende da disponibilidade a partir da matriz e o seu metabolismo. O efeito dos compostos e a farmacocinética são determinados pela sua concentração no sistema. A sua concentração varia no tempo e é determinada, por um lado, pela sua absorção e, por outro lado, pelo seu metabolismo e excreção [77].

O primeiro factor importante na biodisponibilidade é a bioacessibilidade, isto é, a fracção do composto que é libertado a partir da matriz alimentar, no *lumen*

gastrointestinal e se encontra disponível para a absorção intestinal, ou então, a quantidade de composto que atinge o enterócito na forma adequada para absorção [77].

Geralmente, os alimentos contêm misturas complexas de polifenóis, abordados nas secções anteriores. Existem variações na composição e concentração de compostos fenólicos em diferentes alimentos. Tem existido alguma controvérsia sobre a bioactividade dos polifenóis após o seu metabolismo [13].

5.2.1. Propriedades farmacocinéticas dos compostos fenólicos

Muitos estudos têm sido levados a cabo para compreender as propriedades farmacocinéticas dos compostos bioactivos.

D'Archivio *et al.* (2010) [78] descreveram que após a ingestão dos polifenóis provenientes da alimentação, a absorção de alguns, mas não de todos, ocorre no intestino delgado. Os polifenóis que não são absorvidos no intestino delgado atingem o cólon onde vão sofrer modificações estruturais. A microflora do cólon hidrolisa glicósidos em agliconas e degrada-os a ácidos fenólicos simples. Antes da passagem para a corrente sanguínea, as agora agliconas sofrem outras modificações estruturais devido ao processo de conjugação que tem lugar, maioritariamente, no fígado.

O primeiro passo no metabolismo dos compostos polifenólicos é maioritariamente a desglicosilação, antes da absorção no intestino delgado. A hidrólise de alguns glicósidos de flavonóides pode já ter ocorrido na cavidade oral, tanto pelas enzimas salivares como pela microbiota oral, dando origem às respectivas agliconas. A actividade hidrolítica inicia-se na boca e continua ao longo do trato digestivo até ao estômago, onde o tamanho das partículas é reduzido, promovendo assim a libertação dos compostos fenólicos. Tem sido estimado que 5-10% dos polifenóis ingeridos são absorvidos no intestino delgado, enquanto 90-95% atingem o cólon onde são degradados, pela microbiota, numa diversidade de metabolitos de compostos fenólicos bioactivos, que são posteriormente absorvidos [70].

✓ Absorção

Os ácidos mais estudados têm sido o cafeico, o ferúlico e os ácidos clorogénicos, uma vez que são os mais abundantes nos alimentos. A absorção dos compostos bioactivos ocorre no tracto gastrointestinal e depende essencialmente da sua estrutura [10].

Vários estudos, sobre a absorção destes compostos bioactivos, foram revistos pelos autores El-Seedi *et al.* (2012) [10]. Estes autores reportaram uma experiência em que o ácido cafeico foi incubado no estômago de ratos e foi absorvido pelo estômago e pelo intestino delgado, em 2 horas, sendo detectado na mucosa gástrica, sangue, bÍlis e urina. Estes resultados indicam que o ácido cafeico é sujeito a uma rápida absorção, de cerca de 1-2 horas após o consumo do alimento que o contenha. Por outro lado, tanto o ácido ferúlico como o ácido *p*-cumárico mostram uma absorção superior a 70% após 25 minutos de incubação. Estes ácidos foram também detectados na mucosa gástrica, sangue, bÍlis e urina. Este ensaio sugere que estes últimos estão sujeitos a uma absorção mais rápida do que o cafeico.

O ácido elágico é absorvido em pouco tempo, ao contrário dos ácidos clorogénicos. Este comportamento pode ser devido ao facto da absorção do ácido elágico ocorrer na parte superior do sistema gastrointestinal, no estômago e no intestino delgado. Os ácidos clorogénicos resultam da esterificação do ácido cafeico com outros ácidos, entre os quais o ácido quínico. Com base no estudo de Jimenez-Garcia *et al.* (2013) [20], sabe-se que o intestino delgado dos ratos metaboliza apenas uma pequena quantidade do ácido cafeoilquínico.

A absorção do ácido cafeoilquínico ocorre maioritariamente no cólon, após a hidrólise pelas esterases microbianas. Porém, não é claro se o ácido cafeoilquínico está presente no plasma humano na sua forma livre ou numa forma conjugada. Ainda assim, existe a possibilidade do ácido cafeoilquínico estar presente no plasma, mas a hipótese de este ser hidrolisado durante o tratamento da amostra não pode ser excluída [6].

Olthof, Hollmn e Katan (2001) [79] mostraram que cerca de 33% do ácido cafeoilquínico e 95 % do ácido cafeico ingeridos foram absorvidos a partir do intestino

delgado em humanos. Adicionalmente, foram encontrados vestígios do ácido cafeoilquínico e cerca de 11% de ácido cafeico na urina. Estes autores concluíram que parte do ácido cafeoilquínico foi absorvido intacto. Desta forma, concluíram que a absorção do ácido cafeoilquínico é cerca de três vezes menor do que o ácido cafeico.

Evidências experimentais indicam que, nas condições acídicas, prevalentes no compartimento gástrico, as antocianinas aparecem positivamente carregadas, ou seja, sob a forma de *flavilium*, enquanto todos os outros flavonóides permanecem na sua forma neutra. Após a ingestão, as antocianinas são prontamente detectadas no plasma, possibilitando a sua absorção através da parede gástrica. Estudos sobre a absorção das antocianinas indicam que, no estômago apenas se apresentam na sua forma nativa, enquanto em outros órgãos aparecem quer na sua forma nativa como na sua forma metilada, sendo ainda detectadas antocianidinas conjugadas (monoglucurónidos) [80].

Em geral, os flavonóides são absorvidos na sua forma aglícona, após hidrólise da parte glicosídica [77]. Os glicósidos de flavonóides são fracamente absorvidos até serem hidrolisados pelas enzimas bacterianas no intestino, pelo que, a forma aglícona pode ser absorvida. No entanto, estudos recentes sugerem que grande parte da absorção dos glicósidos de flavonóides pode também ocorrer no intestino delgado [40].

Em particular, os polifenóis glicosilados, como as antocianinas e os flavonóis, podem ser hidrolisados pelas glucosidases intestinais. Em contraste, os flavanóis monoméricos e os dímeros de proantocianidina podem ser absorvidos directamente no intestino delgado. Uma vez absorvidas, as aglíconas resultantes podem entrar nos enterócitos por difusão passiva. Assim, as aglíconas resultantes são rapidamente biotransformadas pelas enzimas em metabolitos conjugados (isto é, glucurónidos, *O*-metilésteres e/ou sulfatos) dentro dos enterócitos e novamente no fígado [70].

Outros polifenóis, maioritariamente flavanóis oligoméricos com elevado grau de polimerização e flavanóis poliméricos (proantocianidinas e taninos condensados), ésteres de ácidos hidroxicinâmicos e flavanóis conjugados com ramnose, como a rutina, não são absorvidos na sua forma nativa. Estes compostos atingem o cólon,

onde são submetidos à acção da microflora colónica e transformados nos vários ácidos e em outros metabolitos. Após a metilação, glucoronidação e sulfatação (fase II do metabolismo) podem atingir o cólon *via* circulação entero-hepática e são também susceptíveis à degradação pela microbiota intestinal. Finalmente, os metabolitos fenólicos são excretados pela urina e fezes [70].

✓ **Metabolismo**

Apesar do metabolismo dos polifenóis se iniciar na boca e prosseguir ao longo do tracto gastrointestinal, muitos dos polifenóis obtidos através da dieta atingem o cólon, onde são sujeitos à acção da microbiota intestinal, libertando assim agliconas que podem ser absorvidas e degradadas a derivados de fenólicos simples e outros metabolitos. Estes podem apresentar maior actividade no meio fisiológico, comparativamente aos precursores correspondentes [70]. Portanto, é claro que os polifenóis são extensivamente modificados, não só no intestino delgado e no cólon, mas principalmente no fígado, onde a maior parte da conjugação tem lugar.

A conjugação inclui a metilação, sulfatação e glucoronidação e representa um processo de desintoxicação metabólica (Vide Figura 16). Este procedimento é também comum em muitos compostos xenobióticos que restringe os seus potenciais efeitos tóxicos, facilitando a eliminação biliar e urinária, pelo aumento da solubilidade e peso molecular. Por um lado, o processo de conjugação produz metabolitos activos a partir da dieta. Por outro lado reduz a quantidade de polifenóis na corrente sanguínea, aumentando a excreção [81].

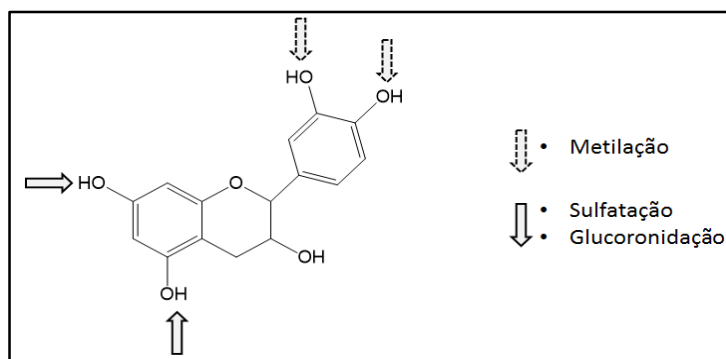


Figura 16 – Possíveis sítios de conjugação nos polifenóis. Estão representadas as possibilidades de metilação e de sulfatação ou glucoronidação. Adaptado de D'Archivio *et al.* (2010) [81].

menos de 1% das antocianinas ingeridas são tipicamente absorvidas, sendo excretadas pela urina [70].

De acordo com a revisão de Fernandes *et al.* (2014) [80] os benefícios associados nos estudos epidemiológicos do consumo de alimentos ricos em antocianinas contradizem a aparente baixa biodisponibilidade destes compostos. No entanto, a actividade biológica dos compostos absorvidos, dos seus metabolitos e a possível sinergia entre estes, poderia ser a resposta para o paradoxo da bioactividade das antocianinas. Ainda assim, estes autores defendem a existência de algumas lacunas no conhecimento e na investigação, no que concerne ao transporte através da barreira gástrica ou da barreira hematoencefálica. Estudos recentes revelam que foram identificados metabolitos de antocianinas (antocianinas metiladas e conjugados de glucurónidos) em vários órgãos, nomeadamente na bexiga, próstata, testículos, tecido cardíaco e tecido adiposo, de ratos alimentados com antocianinas de amoras, durante 12 dias [80]. Outros estudos demonstraram que o ácido protocatecuico é um dos compostos maioritários resultantes da degradação das antocianinas [69].

De um modo geral, os flavonóis são biotransformados pela abertura no anel C sofrendo reacções de desidroxilação, no intestino. Já as flavanonas possuem maior biodisponibilidade, comparativamente aos flavonóis e flavanóis. Isto pode ser explicado, em parte, devido à sua menor degradação pela microbiota intestinal e fácil acessibilidade para absorção no intestino. A primeira reacção nestes compostos é a deglicosilação e depois a clivagem no anel C, de forma a originar o ácido dihidrofenilpropiónico.

A biodisponibilidade dos lignanos está directamente associada ao metabolismo bacteriano intestinal. Estas reacções de biotransformação requerem a desmetilação e a deshidroxilação.

✓ **Excreção**

O rápido metabolismo dos ácidos hidroxicinâmicos resulta na baixa concentração e na rápida eliminação da circulação. Os metabolitos resultantes são excretados por uma de duas vias, biliar ou urinária. Metabolitos extensivamente conjugados podem ser excretados pela urina, mas é mais provável que sejam eliminados pela biliar. Como

tal, estes retornam ao tracto gastrointestinal e podem ser parcialmente reabsorvidos. Os compostos mais pequenos são preferencialmente excretados pela urina [73].

A via urinária da excreção dos ácidos hidrocínâmicos tem sido estudada extensivamente nos humanos e na revisão de El-Seedi *et al.* (2012) [10], é possível verificar alguns desses estudos. A excreção urinária é correntemente utilizada para estimar a taxa de absorção mínima, embora em casos onde a excreção biliar dos ácidos hidrocínâmicos seja significativa, pode resultar numa estimativa imprecisa da absorção total. As taxas relativas da excreção urinária dos ácidos cafeico e ferúlico, bem como dos seus metabolitos, encontra-se entre 5,9 e 27 %.

5.2.2. Factores que afectam a biodisponibilidade dos compostos fenólicos

A biodisponibilidade depende de vários factores, endógenos ou exógenos. Os factores endógenos são relacionados com o hospedeiro, com a actividade enzimática, excreção e biotransformação. Já os factores exógenos estão relacionados com a matriz alimentar, tamanho, e quantidade ingerida (Tabela 5). A estrutura química dos compostos fenólicos determina a taxa de absorção e a natureza dos derivados que circulam no plasma [20].

A visão geral da biodisponibilidade é complexa, dado o facto de os alimentos serem misturas complexas de vários compostos biactivos. Estes podem aparecer quer na sua forma livre, quer na sua forma conjugada, tornando-os diferentes em termos de biodisponibilidade, metabolismo e excreção [10].

Tabela 5 - Factores endógenos e exógenos associados à biodisponibilidade dos compostos fenólicos. Adaptado de D'Archivio *et al.* (2010) [78].

Factores Endógenos (relacionados com o hospedeiro)	Factores Exógenos (relacionados com o composto)
<ul style="list-style-type: none"> • Factores relacionados com o hospedeiro (género, idade, etc) • Factores intestinais: actividade enzimática, trânsito intestinal, microbiota; • Factores sistémicos; • Estado fisiopatológico do hospedeiro: desordens ou patologias, genética, condição física; • Excreção biliar ou urinária; • Biotransformação. 	<ul style="list-style-type: none"> • Estrutura química, concentração no alimento, quantidade ingerida; • Matriz do alimento; • Ligação a proteínas (albumina) ou com polifenóis; • Processamento do alimento: tratamento térmico, homogenização, liofilização, cozedura; • Métodos de preparação e armazenamento; • Factores ambientais: exposição solar, estado de maturação.

6. Os compostos fenólicos e o metabolismo dos hidratos de carbono

6.1. Metabolismo dos hidratos de carbono

Os hidratos de carbono são componentes importantes da dieta que, providenciam energia, mas também contribuem para o sabor e textura dos alimentos. A maior reserva de hidratos de carbono acontece no músculo-esquelético. Porém, esta reserva encontra-se sob a forma de glicogénio e não está imediatamente disponível. [83].

Os hidratos de carbono mais importantes, adquiridos na dieta, consistem em monossacarídeos (como a glucose, frutose e galactose), dissacarídeos (pares de monómeros ligados entre si, como a maltose, sacarose e lactose) e os polissacarídeos (como o amido³) [83].

O amido e a sacarose são considerados os hidratos de carbono principais na dieta humana. Acredita-se que a sua digestão, absorção e metabolismo possam ser influenciados pelos polifenóis e os seus metabolitos. Muitos dos hidratos de carbono da dieta são digeridos, na parte superior do tracto gastrointestinal.

As α -amilases, salivares e pancreáticas, catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4- internas do amido, resultando na maltose e maltotriose e em α -1,6-oligómeros. Após esta digestão, a α -glucosidase hidrolisa as ligações- α -1,4 terminais, dos resíduos de glucose. Assim, o passo final da digestão dos hidratos de carbono é a libertação da glucose e a sua absorção.

O metabolismo dos hidratos de carbono e a absorção da glucose são os alvos principais para o controlo da glicémia, após a ingestão de hidratos de carbono. As enzimas, α -amilase e α -glucosidase são as responsáveis pela digestão dos hidratos de carbono da dieta em glucose [84]. A inibição destas enzimas digestivas, ou dos

³ Consiste em longas cadeias de moléculas de glicose

transportadores de glucose, podem reduzir a taxa de glucose libertada e absorvida no intestino delgado e conseqüentemente suprimir a hiperglicémia *postprandial*⁴ [84].

6.2. Diabetes *mellitus*

A *Diabetes mellitus* (DM) é uma doença metabólica crónica, caracterizada por elevados níveis de glucose no sangue (hiperglicémia) [60].

A libertação descontrolada de glucose hepática, a redução da captura de glucose pelo músculo-esquelético, associadas à redução da síntese do glicogénio, levam à hiperglicémia. Danos a longo prazo e falha em diferentes órgãos têm sido associados à hiperglicémia crónica [85].

Para além da hiperglicémia, existem muitos outros factores que desempenham um papel importante na patogénese da diabetes, como a hiperlipidémia, elevados níveis de ácidos gordos livres. Isto conduz a um aumento da quantidade de produtos resultantes da glicação e a um aumento do *stress* oxidativo, levando a elevados riscos e complicações, entre os quais a cegueira [52,58].

Estas anomalias metabólicas associadas podem activar vias que são capazes de alterar a função e estrutura dos tecidos e vasos sanguíneos. Os pacientes com diabetes são quatro a cinco vezes mais predispostos ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, do que os indivíduos saudáveis [86].

Existem vários processos patogénicos envolvidos no desenvolvimento da diabetes. Isto inclui a destruição autoimune das células- β do pâncreas, resultando na deficiência em insulina⁵ e/ou anomalias que levam à resistência sobre a acção da insulina. A deficiência na insulina no tecido-alvo causa anomalias no metabolismo dos hidratos de carbono, gorduras e proteínas. Isto pode ser devido à secreção inadequada de insulina e/ou à diminuição na resposta dos tecidos à mesma [85].

⁴ Momento após a ingestão de alimentos.

⁵ A insulina é a hormona secretada pelas células- β pancreáticas em resposta ao nível de glucose no sangue. Participa igualmente na regulação do metabolismo, crescimento celular e diferenciação celular [88].

Em geral, estes pacientes podem apresentar também sintomas de hipertensão – conducente a danos renais progressivos –, assim como anomalias no metabolismo de lipoproteínas [85].

Existem dois tipos distintos de diabetes: a *Diabetes mellitus* tipo 1 (T1DM, do inglês, *Type-1 Diabetes mellitus*) e tipo 2 (T2DM, do inglês *Type-2 Diabetes mellitus*). A T1DM resulta no défice da secreção da insulina, enquanto a patogénese da T2DM está associada com a progressiva resistência à insulina no fígado e tecidos periféricos, reduzindo a massa de células- β e/ou secreção de insulina comprometida [87].

6.2.1. Diabetes mellitus Tipo 1

A T1DM é muitas das vezes desenvolvida na infância e progride com a idade. É também designada por *insulino-dependente*. O fenómeno básico na T1DM é a destruição autoimune das células ilhotas β do pâncreas.

6.2.2. Diabetes mellitus Tipo 2

Existem vários factores envolvidos na propagação da diabetes tipo 2: obesidade, idade, disfunção nas células- β , acumulação de tecido adiposo, *stress* oxidativo, *stress* no retículo endoplasmático nas células- β , inflamação do tecido e pouca actividade física [88].

6.3. Impacto dos compostos fenólicos no metabolismo dos hidratos de carbono

A dieta é importante quer para a prevenção, quer para o tratamento a todos os níveis da diabetes. Enquanto a insulina exógena e outros fármacos podem controlar muitos dos sintomas da DM, são várias as complicações afectas ao sistema vascular, rins, retina, nervos periféricos e pele. Estas condições revelam-se custosas em termos de longevidade e qualidade de vida [60].

Os inibidores da α -amilase e da α -glucosidase são abrangidos pela categoria de agentes hipoglicemiantes. Vários inibidores destas enzimas, como a acarbose e voglibose, controlam efectivamente os níveis de glicose no sangue após ingestão de alimentos. Estes fármacos desaceleram o processo de digestão e absorção dos hidratos

de carbono ao bloquear competitivamente a actividade destas enzimas, porém falham pelos seus efeitos colaterais, a nível do intestino [89].

A revisão efectuada por Surya *et al.* (2014) [85] sugere que muitos compostos fenólicos têm demonstrado eficiência na inibição da actividade das enzimas do metabolismo dos hidratos de carbono, pelo que é possível que estes produtos naturais possam vir a ser considerados complementos aos fármacos hipoglicemiantes sintéticos, evitando e/ou diminuindo assim os efeitos secundários. Algumas plantas são importantes fontes de compostos bioactivos, livres de efeitos secundários indesejados, dispondo ainda de uma forte acção farmacológica.

Um dos objectivos do presente trabalho passou exactamente pelo estudo da capacidade de inibição destas enzimas-chave por parte de extractos vegetais, obtidos a partir de plantas produtoras de bagas.

II. Metodologia Experimental

1. Materiais

1.1. Amostras

Neste estudo, foram analisadas cinco espécies produtoras de bagas (bagas e folhas), de entre as quais três são espécies endémicas do Arquipélago da Madeira, nomeadamente *Rubus grandifolius* (silvado), *Sambucus lanceolata* (sabugueiro) e *Vaccinium padifolium* (uveira da Madeira). A espécie *Rubus grandifolius* foi colhida em dois locais distintos, no Funchal e em Machico, de forma a comparar os perfis fitoquímicos. Outra espécie, *Vaccinium cylindraceum* (uveira dos Açores), um endemismo do arquipélago dos Açores, foi também estudada visto tratar-se de uma espécie de elevado interesse económico dessa região. Adicionalmente, a espécie *Elaeagnus umbellata* (oliveira de Outono) foi também estudada.

Tabela 6 - Amostras alvo de estudo, nome científico e nome comum, parte morfológica estudada, local e data da colheita.

Nome científico	Nome comum	Parte morfológica	Local da colheita	Data da colheita
<i>Rubus grandifolius</i>	Silvado	Bagas Folhas	Santo da Serra, Madeira Pico do Areeiro, Madeira	Setembro/2014
<i>Elaeagnus umbellata</i>	Oliveira de Outono	Bagas Folhas	Funchal, Madeira	Outubro/2014
<i>Sambucus lanceolata</i>	Sabugueiro	Bagas Folhas	Santana, Madeira	Outubro/2014
<i>Vaccinium padifolium</i>	Uveira da Madeira	Bagas Folhas maduras ⁶ Folhas jovens ⁷	Pico do Areeiro, Madeira	Setembro/2014
<i>Vaccinium cylindraceum</i>	Uveira dos Açores	Bagas Folhas	Ilha das Flores, Açores	Agosto/2014

⁶ Folhas verdes

⁷ Folhas vermelhas

Após a colheita, as amostras foram separadas nas diferentes partes morfológicas, tal como apresentado na **Tabela 6**, lavadas, congeladas (-80 °C), submetidas ao processo de liofilização, moídas e armazenadas a -20 °C até ao procedimento de extracção.

1.2. Reagentes, compostos de referência e equipamentos

Os reagentes, padrões e solventes estão descritos no Anexo 1. Os equipamentos utilizados são descritos no Anexo 2.

2. Caracterização físico-química das bagas

2.1. Determinação dos sólidos solúveis totais (°Brix)

O teor de sólidos solúveis totais (TSS), medido em grau Brix (°Brix), foi determinado para as bagas frescas. A fruta fresca foi colocada no liquidificador e reduzida a polpa. Após centrifugação (4000 rpm, por 20 minutos), analisou-se o sobrenadante no refractómetro ATAGO RX-1000 (Tóquio, Japão).

2.2. Determinação do teor de humidade

Aquando do processo de extracção (Vide secção 3 da “Metodologia experimental”), as amostras foram submetidas à liofilização, através do qual determinou-se o teor de humidade (%).

Para a determinação do teor de humidade pesou-se as amostras antes e depois do processo de liofilização calculou-se a % de humidade pela equação seguinte.

$$(\%) \textit{Humidade} = (m_{\text{pré-liofilização}} - m_{\text{pós-liofilização}}) \times 100$$

onde, $m_{\text{pré-liofilização}}$ é a massa antes da liofilização e $m_{\text{pós-liofilização}}$ a massa após a liofilização.

3. Extracção dos compostos fenólicos

A extracção dos compostos fenólicos foi realizada segundo Spínola *et al* (2014) [90]; por cada 1 g de amostra adicionou-se 25 mL de solvente e as amostras foram submetidas a um processo de extracção assistida por ultrassons (35 kHz, 200 W), durante 60 minutos à temperatura ambiente. Para as folhas, utilizou-se apenas metanol; nas bagas utilizou-se uma mistura de metanol e água acidificada (7% ácido acético) (80%:20 %; MeOH:H₂O).

Após a extracção, as amostras foram filtradas e o solvente evaporado num evaporador rotativo, sob pressão reduzida, a 40 °C. No caso das folhas, removeu-se as clorofilas das folhas com carvão activado. Para as bagas, após a evaporação do metanol, os extractos foram liofilizados de modo a remover a água. Finalmente, os extractos foram armazenados a 4 °C até posterior análise.

4. Determinação do perfil fenólico por HPLC-DAD-ESI/MSⁿ

O método utilizado para a análise por HPLC-DAD-ESI/MSⁿ foi descrito por Gouveia e Castilho (2011) [12], sendo seguidamente resumidos os aspectos essenciais.

4.1. Preparação da amostra

Os extractos das folhas foram preparados na concentração de 5 mg/mL em metanol e os extractos das bagas foram preparados na concentração de 40 mg/mL. Após a agitação vigorosa em vortex, os extractos foram filtrados através de um filtro de membrana (0,45 µm) antes da análise cromatográfica.

4.2. Cromatografia Líquida (HPLC)

A análise em HPLC foi realizada num instrumento Dionex ultimate 3000 series (Dionex, California, EUA), acoplado a uma bomba binária, um detector de arranjo de díodos (DAD, do inglês *Diode-array detector*), um auto-injector e um compartimento de coluna. As condições da análise encontram-se descritas na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Condições da análise do perfil fenólico por HPLC-DAD-ESI/MSⁿ.

Condições do HPLC	
Coluna	<i>Phenomenex Gemini C₁₈</i> (5 µm, 250 x 3,0 mm i.d.) - 20 °C
Fluxo	0,400 mL/min
Volume de injeção	5 µL (folhas: 5 mg/mL e bagas: 40mg/mL em MeOH)
Temperatura de análise	30 °C
Tempo de análise	55 minutos
Detecção	PDA (215-520 nm); MS (modo positivo e negativo) (ESI ⁻ e ESI ⁺)
Fase móvel	A: Acetonitrilo; B: 0.1% (v/v) água acidificada com ácido fórmico
Gradiente	20% A (0 min), 25% A (20 min), 50% A (40 min), 100% A (42-47 min), 20% A (49-55 min)

4.3. Espectrometria de Massa (MS)

Para a análise HPLC-ESI/MSⁿ utilizou-se um instrumento Bruker Esquire (Bremen, Germany) modelo 6000 com detector do tipo armadilha de iões (vulgarmente designados por *ion trap*), equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI). A aquisição de dados foi realizada usando o *software DataAnalysis* (versão 3.4). Os espectros de massa de iões negativos do eluato foram guardados no alcance m/z 100 – 1000 numa velocidade de scan de 13000 Da/s. O azoto (N₂) de alta pureza foi usado como gás de secagem, com um fluxo de 10,0 mL/min e também como gás nebulizador a uma pressão de 50 psi. A temperatura do nebulizador foi ajustada para 365 °C e o potencial do capilar a +4500 V. Como gás de colisão foi usado hélio (He) ultra-puro, a uma pressão de 1×10^{-5} mbar e a energia de colisão foi definida para 40 V.

A aquisição dos dados MSⁿ foi feita com modo auto MSⁿ. Para análise de MSⁿ o espectrómetro de massa foi sondado de 10 a 1000 m/z com amplitude de fragmentação de 1.0 V (MSⁿ até MS⁴) e dois iões precursores.

5. Estudo da influência da digestão gastrointestinal *in vitro* na actividade antioxidante dos extractos

5.1. Modelo de digestão gastrointestinal *in vitro*

Este modelo, que visa a mimetização da digestão, é baseado nas diferentes condições fisiológicas do tracto gastrointestinal. Para além da composição química dos fluídos digestivos, teve-se em conta outros factores como a temperatura (37 °C), o pH e o tempo de residência em cada um dos compartimentos (a boca, o estômago e intestino delgado). O modelo utilizado foi baseado em publicações prévias, com algumas modificações [91,92].

A composição das soluções *stock*, que simulam os diferentes sucos fisiológicos, *saliva*, *gástrico*, *duodeno* e *bilis*, encontram-se descritas na **Tabela 8**.

Para os ensaios de digestão *in vitro* foram preparados dois ensaios diferentes, designados de *digestão na ausência de enzimas* e *digestão na presença de enzimas* (Vide **Tabela 8**). As soluções *stock* utilizadas nos ensaios foram preparadas da mesma forma, porém o ensaio da *digestão na ausência de enzimas* foi privado da adição dos complementos enzimáticos. O processo de digestão *in vitro* foi realizado em duplicado.

Os liofilizados (aproximadamente 2 g) foram colocados em tubos tipo *falcon* e incubados a 37 °C num banho de água, com agitação e ao abrigo da luz. A simulação da digestão ocorreu sequencialmente da seguinte forma: boca – adicionou-se 4 mL de solução *stock* de *saliva* e incubou-se durante 5 minutos; estômago – adicionou-se 10 mL da solução *stock* de *suco gástrico* e deixou-se em agitação durante 2 horas e intestinos – adicionou-se 10 mL de solução *stock duodenal* e 4 mL de solução *stock* de *bilis* e deixou-se em agitação durante 2 horas. No ensaio da *digestão na presença de enzimas* o procedimento foi o mesmo, no entanto as soluções *stock* continham os complementos descritos na **Tabela 8**.

Após a simulação do processo de digestão *in vitro*, os tubos foram colocados a - 20 °C para posterior liofilização e extracção, de acordo com a secção 3, da “Metodologia experimental”.

Tabela 8 - Composição das diferentes soluções *stock*, utilizadas na digestão gastrointestinal *in vitro*, com os respectivos componentes, os complementos e o diferente pH de cada meio fisiológico do organismo.

Soluções <i>stock</i>				
Componentes	<i>Saliva</i>	<i>Suco gástrico</i>	<i>Duodenal</i>	<i>Bilis</i>
Água destilada	500 mL	500 mL	500 mL	500 mL
NaCl	58,50 mg	2,75 g	7,03 g	5,27 g
KCl	74,50 mg	0,82 g	0,57 g	0,38 g
NaHCO₃	1,06g	-	3,39 g	5,79g
CaCl₂.2H₂O	-	0,40 g	-	-
NaH₂PO₄	-	0,266 g	-	-
KH₂PO₄	-	-	80,30 mg	-
NH₄Cl	-	0,306 g	-	-
MgCl₂	-	-	50,40 mg	-
Ureia	0,20 g	0,09 g	0,10 g	0,26 g
HCl concentrado	-	6,50 mL	0,15 mL	0,15mL
Complementos				
-	0,50 g de mucina	2,50 g de pepsina	9,02 g de pancreatina	12,01 g de sais biliares
-	1,06g de α-amilase	3,00 g de mucina	1,50 g de lipase	-
pH⁸				
-	6,8	1,30	8,1	8,2

⁸ O pH foi ajustado com uma solução de HCl (1M) ou de NaOH (1M).

5.2. Determinação do conteúdo de fenólicos (TPC) e flavonóides totais (TFC) e da actividade antioxidante *in vitro* dos extractos

Estes ensaios foram realizados da mesma forma, quer nos extractos *não digeridos*, quer nos extractos obtidos pelos ensaios da digestão *in vitro*.

5.2.1. Conteúdo de fenólicos totais (TPC)

O conteúdo de compostos fenólicos das amostras foi determinado pelo método colorimétrico Folin-Ciocalteu, descrito por Zheng e Wang (2001) [93], com algumas modificações [94]. Este estudo foi levado a cabo utilizando um espectrofotómetro PERKIN ELMER UV-Vis (Germany), controlado pelo *software* Lambda 2.

Adicionou-se 50 µL de extracto (5 mg/mL) a 1,25 mL de reagente Folin-Ciocalteu (diluição na proporção de 1:10, em água destilada) e 1 mL de Na₂CO₃ (7,5%, m/v). Agitou-se a mistura e incubou-se à temperatura ambiente, durante 30 minutos, na ausência de luz. A absorvância foi medida aos 765 nm usando o espectrofotómetro UV-Vis. Todos os ensaios foram realizados em triplicado ($n = 3$).

O ácido gálico (GA) foi utilizado como padrão, deste modo os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de extracto (mg GAE/ g de extracto). Assim, para a construção da recta de calibração, procedeu-se do mesmo modo nas diferentes concentrações do ácido gálico.

5.2.2. Conteúdo de flavonóides totais (TFC)

O conteúdo de flavonóides totais foi avaliado pela utilização do método colorimétrico de cloreto de alumínio de acordo com Akkol *et al.* (2008) [95], com algumas modificações [94].

Resumidamente, 0,5 mL do extracto de cada extracto (5 mg/mL) foram misturados com 1,5 mL de metanol, 2,8 mL de água destilada, 0,1 mL de acetato de potássio (CH₃COOK, 1 M) e 0,1 mL de cloreto de alumínio (AlCl₃.6H₂O, 10% em metanol). A mistura ficou a reagir durante 30 minutos na ausência de luz e a absorvância foi medida a 415 nm.

Procedeu-se da mesma forma com soluções de rutina (substância padrão) em diferentes concentrações, para a construção da recta de calibração. Todos os ensaios foram realizados em triplicado ($n = 3$). Os resultados foram expressos em mg equivalente de rutina por grama de extracto (mg RE/ g extracto).

5.2.3. Actividade antioxidante *in vitro*

✓ Ensaio ABTS^{•+}

A capacidade antioxidante pelo método ABTS foi realizada de acordo com Re *et al.* (1999) [96], com algumas modificações [94]. Misturou-se 50 mL de solução ABTS (2 mM) com 200 μ L de de solução persulfato de potássio (70 mM) para a formação do radical ABTS^{•+}. Esta mistura permaneceu 16 h à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Antes da sua utilização, diluiu-se em tampão fosfato salino (PBS pH 7,4), de forma a obter a absorvância de $0,700 \pm 0,021$ a 734nm.

Para a determinação da capacidade da actividade antioxidante dos extractos metanólicos, fez-se reagir 40 μ L de cada um dos extractos (5 mg/mL⁹) com 980 μ L da solução ABTS^{•+} e mediu-se o decaimento da absorvância durante 6 minutos, a 734 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicado ($n = 3$). O Trolox foi utilizado como padrão e os resultados foram expressos em milimol de equivalente de Trolox/g de extracto (mmol TE/ g extracto).

✓ Ensaio DPPH

O método DPPH foi realizado segundo o descrito por Gordon *et al.* (2001) [97], com algumas modificações [94]. De um modo geral, este ensaio foi realizado pela adição de 100 μ L de soluções dos extractos metanólicos (5 mg/mL¹⁰) a 3,9 mL de solução DPPH (0,06 mM em metanol). Após 30 minutos a reagir, à temperatura ambiente e ausência de luz, a absorvância foi medida aos 516 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicado ($n = 3$). O Trolox foi utilizado como padrão e os resultados foram expressos em milimol de equivalente de Trolox/g de extracto (mmol TE/ g extracto).

⁹ Os extractos foram preparados na concentração (m/v) de 5 mg/mL, porém em alguns casos foi necessários proceder a diluições.

¹⁰ Os extractos foram preparados na concentração (m/v) de 5 mg/mL, porém em alguns casos foi necessários proceder a diluições.

6. Estudos *in vitro* do efeito inibitório dos extractos sobre as enzimas do metabolismo dos hidratos de carbono

6.1. Ensaios de inibição da α -amilase

✓ Estudo da capacidade de inibição pelas diferentes partes morfológicas

A α -amilase pancreática é uma endoglucosidase que catalisa a hidrólise do amido em maltose e maltotriose. Xiao *et al.* (2007) [98] desenvolveram o método amido-iodo, em microplacas, com o objectivo de medir a quantidade de amido degradado, determinando, assim, a actividade da α -amilase. Isto é, o amido que não é degradado pela α -amilase reage com o iodo formando o complexo amido-iodo. O comprimento de onda utilizado para medir o desenvolvimento da cor do complexo amido-iodo, varia de 580 a 700 nm. Estes autores concluíram ainda que a presença da maltose, originada pela degradação do amido, não altera o espectro do reagente iodo, nem o do complexo amido-iodo.

Os ensaios *in vitro* do efeito inibitório dos extratos sobre a α -amilase pancreática foram realizados em placas de 96 poços, de acordo com os procedimentos reportados na literatura [99,100].

Resumidamente, adicionou-se 40 μ L de solução de 0,2% (m/v) de amido de batata a 20 μ L de extracto e misturou-se com 20 μ L de enzima α -amilase pancreática (1U em tampão fosfato). Para cada amostra foram feitos controlos negativos, nos quais a enzima foi substituída por tampão fosfato (pH 6,9) (**Figura 18**).

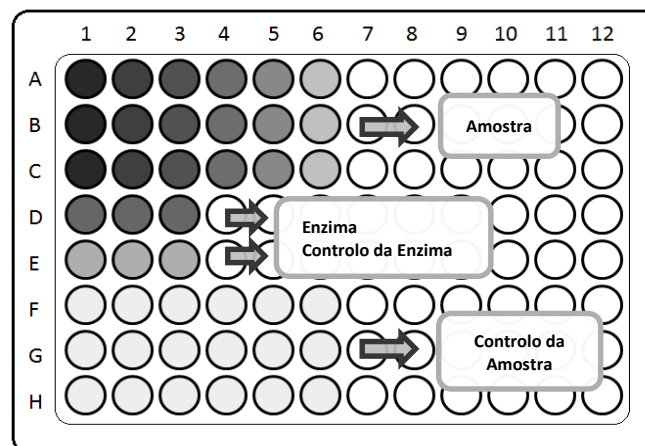


Figura 18 - Disposição dos diferentes componentes nos ensaios de inibição enzimática.

Após a incubação a 37 °C, por 20 minutos, adicionou-se 80 µL de solução 0,4 M de HCl, de forma a terminar a reacção, seguindo-se da adição de 100 µL de 5 mM de I₂ (em 5 mM KI). A leitura da absorvância foi feita a 620 nm, num leitor de microplacas. Os ensaios decorreram do mesmo modo para todas as amostras e em triplicados.

Construiu-se uma recta, com diferentes concentrações, para cada extracto (apresentadas no Anexo 3). Assim, pela Equação 3 determinou-se a percentagem de Inibição (%) e pela equação da recta calculou-se o valor de IC₅₀ (mg/ mL de extracto seco) e IC₂₅ (mg/ mL de extracto seco).

A acarbose foi usada como controlo positivo e procedeu-se do mesmo modo que para os extractos.

Equação 3 - Cálculo da (%) Inibição:

$$(\%) \text{ Inibição} = \left[\frac{(A_{enzima} - A_{controlo\ enzima}) - (A_{amostra} - A_{controlo\ amostra})}{(A_{enzima} - A_{controlo\ enzima})} \right] \times 100$$

onde A_{enzima} é a absorvância da actividade da enzima, $A_{controlo\ enzima}$ a absorvância do controlo da enzima, $A_{amostra}$ a absorvância da amostra e $A_{controlo\ amostra}$ a absorvância do controlo da amostra.

6.2. Ensaios de inibição da α-glucosidase

✓ Estudo da capacidade de inibição pelas diferentes partes morfológicas

Nos ensaios *in vitro* do efeito inibitório dos extratos sobre a α-glucosidase mediu-se a quantidade de glicose hidrolisada a partir do *p*-nitrofenil-α-D-glucopiranósido, que actua como substrato da enzima. O resultado desta reacção é um cromógeno que absorve radiação a 405 nm. O carbonato de sódio é adicionado para terminar a reacção da enzima [100].

Este ensaio foi realizado de acordo com Podszędek *et al.* (2014) [100], numa placa de 96 poços combinou-se 50 µL de extracto com 50 µL de 50 mM de *p*-nitrofenil-α-D-glucopiranósido (tampão fosfato a pH 7,06) e por fim adicionou-se a solução de enzima α-glucosidase (1 U/mL em tampão fosfato).

A mistura foi incubada a 37 °C, por 20 minutos. Finalmente, adicionou-se 100 µL de uma solução de 0,1 M de carbonato de sódio e leu-se a absorvância a 405 nm.

O tratamento dos resultados foi semelhante ao descrito anteriormente nos ensaios da α -amilase. Contruiu-se uma recta, com diferentes concentrações, para cada extracto (apresentadas no Anexo 3). Assim, pela Equação 3 determinou-se a percentagem de Inibição (%) e pela equação da recta calculou-se o valor de IC₅₀ (mg/ mL de extracto seco) e IC₂₅ (mg/ mL de extracto seco).

Na Tabela 9 estão disponíveis os conteúdos de cada componente dos ensaios enzimáticos. Pelo que é possível verificar que na “Amostra” foram adicionados: os extractos, com o substrato e a enzima. No “Controlo da amostra” (controlo negativo) a enzima foi substituída pelo tampão. Realizou-se também um controlo para a enzima, na ausência do inibidor, de modo a confirmar o bom funcionamento da enzima, a este controlo foram adicionados apenas a enzima, o substrato e o tampão. E por fim o “Branco da enzima” (controlo negativo) continha apenas o substrato e o tampão.

Tabela 9 - Conteúdo de cada componente nos ensaios de inibição enzimática.

Ensaio de inibição enzimática				
Componentes	Amostra	Branco da Amostra	Enzima	Branco da Enzima
Extracto	✓	✓	-	-
Substrato	✓	✓	✓	✓
Enzima	✓	-	✓	-
Tampão	-	✓	✓	✓

III. Resultados e Discussão

1. Caracterização física-química

1.1. Determinação dos sólidos solúveis totais (°Brix)

Com vista à determinação do teor dos sólidos solúveis totais, em °Brix, procedeu-se à leitura em refractómetro, das fracções líquidas obtidas das bagas frescas: após a colheita, os frutos foram triturados e centrifugados. Os sobrenadantes foram analisados, em triplicado. O °Brix das bagas encontra-se representado na Figura 19.

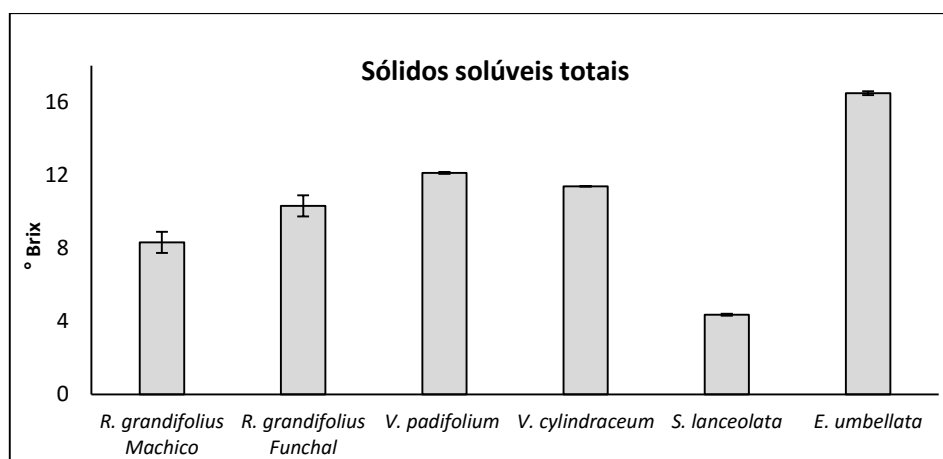


Figura 19 - Estudo dos sólidos solúveis totais (TSS) das bagas: *Rubus grandifolius* (Machico e Funchal), *Vaccinium padifolium*, *Vaccinium cylindraceum*, *Sambucus lanceolata* e *Elaeagnus umbellata*. Os resultados encontram-se expressos em °Brix.

Observa-se que os valores do °Brix variam entre $4,4 \pm 0,06$ e $16,5 \pm 0,10$, correspondentes às espécies *S. lanceolata* e *E. umbellata*, respectivamente. O baixo valor determinado para a espécie de *S. lanceolata* já era esperado, dado o estado de incompleta maturação em que as bagas se encontravam, aquando da sua colheita (como visível na Figura 7).

Relativamente à espécie de *R. grandifolius*, verifica-se uma pequena diferença entre as amostras colhidas em Machico e as colhidas no Funchal ($8,3 \pm 0,58$ e $10,3 \pm 0,58$ °Brix, respectivamente), obtendo-se um valor superior nas bagas colhidas no Funchal. Na literatura [101], o valor determinado para o género *Rubus* varia no intervalo 6,19 – 11,11 °Brix, verificando-se que os valores obtidos se encontram no referido intervalo.

Quanto às espécies do género *Vaccinium*, obteve-se o valor de $12,1 \pm 0,06$ para a *V. padifolium* e $11,4 \pm 0,00$ para a *V. cylindraceum*, igualmente dentro do intervalo

encontrado na literatura [51], para o género de *Vaccinium* (6,0 a 15,5 °Brix), não havendo valores reportados para estas espécies em particular.

1.2. Determinação do teor de humidade

O teor de humidade foi determinado pelo processo de liofilização, através da diferença de massas pré- e pós-liofilização. Os resultados obtidos foram compilados na Tabela 10.

Tabela 10 - Teor de humidade (%) das diferentes partes morfológicas estudadas. Amostras: *Rubus grandifolius* (Machico e Funchal), *Vaccinium padifolium*, *Vaccinium cylindraceum*, *Sambucus lanceolata* e *Elaeagnus umbellata*.

Amostra	Parte morfológica	Teor de humidade (%)
<i>R. grandifolius</i> (Machico)	Bagas	52,50
	Folha	47,41
<i>R. grandifolius</i> (Funchal)	Bagas	58,31
	Folha	48,32
<i>S. lanceolata</i>	Bagas	47,06
	Folha	25,17
<i>V. padifolium</i>	Bagas	40,00
	Folhas maduras	13,76
	Folhas jovens	10,35
<i>V. cylindraceum</i>	Bagas	27,82
	Folha	21,68
<i>E. umbellata</i>	Bagas	35,42
	Folha	17,84

Tal como previsto, em todas as espécies estudadas, as bagas apresentam maior teor de humidade do que as folhas. De acordo com a tabela anterior, os valores do teor de humidade variam, nas bagas no intervalo de 27,82 – 58,31% e nas folhas de 10,35 – 48,32%.

As bagas das espécies de *Rubus* são as que possuem um maior teor de humidade, para as quais foram determinados os valores de 52,50% para a variedade de Machico e 58,31% para a variedade do Funchal. De acordo com a tabela anterior, ambas as folhas de *V. padifolium* possuem menor teor de humidade.

2. Extracção dos compostos fenólicos

A extracção dos compostos fenólicos das folhas foi realizada segundo Spínola *et al* (2014) [90]. Os autores testaram a extracção com dois solventes diferentes, acetona e metanol (várias concentrações), e obtiveram maior eficiência com o metanol. Após optimização dos parâmetros de extracção, concluíram que a extracção por ultrassons, durante 60 minutos, com metanol a 100 %, seriam as condições óptimas para a extracção dos compostos bioactivos das folhas de *Myrica faya*, uma espécie endémica da Madeira. Assim, utilizou-se as mesmas condições de extracção para obter os compostos fenólicos das folhas das plantas em análise. De acordo com dados reportados da literatura [102], as bagas de *E. umbellata* foram submetidas à extracção com metanol, tal como as folhas.

No presente estudo, os compostos bioactivos das bagas foram extraídos com 80% de metanol, acidificado com ácido acético. Tal como revisto na literatura [7], o metanol é um solvente mais barato e mais eficiente a nível de extracção de compostos de interesse. O ácido acético tem como função a ruptura das membranas celulares, de forma a libertar as antocianinas. Castañeda-Ovando *et al.* (2009) [48] reportaram que, de forma a ser um tratamento menos agressivo para as antocianinas, é importante o uso de ácidos orgânicos (ácido fórmico ou ácido acético).

3. Determinação do perfil fenólico por HLPC-DAD-ESI/MSⁿ

A análise do perfil fenólico das cinco espécies produtoras de bagas foi realizada por HLPC-DAD-ESI/MSⁿ.

Os resultados desta análise serão apresentados para cada espécie individualmente, entre as partes morfológicas estudadas. Os compostos encontram-se numerados por ordem de eluição, logo o mesmo composto pode apresentar diferentes números em diferentes espécies. A identificação será apresentada nas secções seguintes, agrupando os compostos de acordo com a natureza das respectivas agliconas. De modo a facilitar a leitura, a discussão para cada composto será descrita apenas na primeira planta no qual está presente, não sendo repetido nas vezes seguintes.

A identificação dos picos foi realizada pela comparação dos espectros de fragmentação MSⁿ, pelos tempos de retenção¹¹ e pela comparação destes fragmentos com a literatura científica.

De um modo geral, as folhas apresentaram uma maior diversidade e quantidade de compostos comparados com as bagas. De acordo com a literatura [103], a concentração dos compostos fenólicos presentes nas folhas podem variar ao longo da época do ano.

Nas tabelas que se seguem (Tabela 11 e Tabela 12) encontram-se representadas as estruturas químicas dos compostos fenólicos maioritários nas amostras em estudos. A maioria dos compostos apresentam-se na sua forma glicosilada, podendo também aparecer na sua forma livre.

Nos extractos analisados foram também identificados ácidos fenólicos, que se encontram representados nas Figura 1, Tabela 1 e Tabela 2 apresentados nas secções anteriores.

¹¹ Dados alguns problemas técnicos, os tempos de retenção do mesmo composto podem variar entre análises das partes morfológicas da mesma espécie.

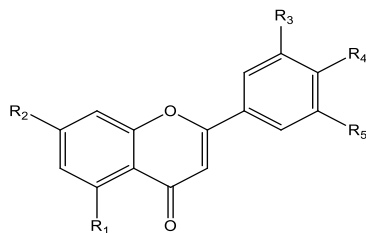


Tabela 11 - Estrutura química das aglíconas dos flavonóis.

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Aglícona
OH	OH	OH	OH	H	Quercetina
OH	OH	H	OH	H	Canferol
OH	OH	OCH ₃	OH	H	Isoramnetina

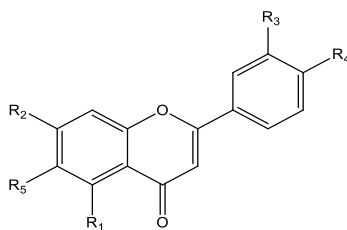


Tabela 12 - Estrutura química geral das principais aglíconas das flavonas.

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Aglícona
OH	OH	OH	OH	H	Luteolina
OH	OH	H	OH	H	Apigenina

3.1. Modo de ionização negativo

3.1.1. *Elaeagnus umbellata*

A análise do perfil fenólico, no modo negativo, da espécie de *E.umbellata* encontra-se representada na Figura 20 e na Tabela 13. A análise das diferentes partes morfológicas foi realizada em separado. Assim, do total de 71 compostos detectados na espécie de *E. umbellata*, nas bagas foram identificados 28 compostos e nas folhas foram identificados 42 compostos.

De um modo geral, verificou-se que esta espécie é pobre em ácidos hidroxicinâmicos. Nas bagas, os flavonóides foram a classe mais representativa, nomeadamente os derivados do canferol, da quercetina e isoramnetina, por esta ordem, bem como os sacarídeos e ácidos orgânicos (ácido cítrico e derivados e ácido cítrico). Nas folhas, a classe dos flavonóides também é predominante, sobretudo as isoramnetinas, os canferóis e as quercetinas, por esta ordem. Outros compostos, como o ácido elágico e derivados, sacarídeos, e outros ácidos orgânicos (ácido quínico, ácido cítrico e derivados), também foram predominantes nas folhas.

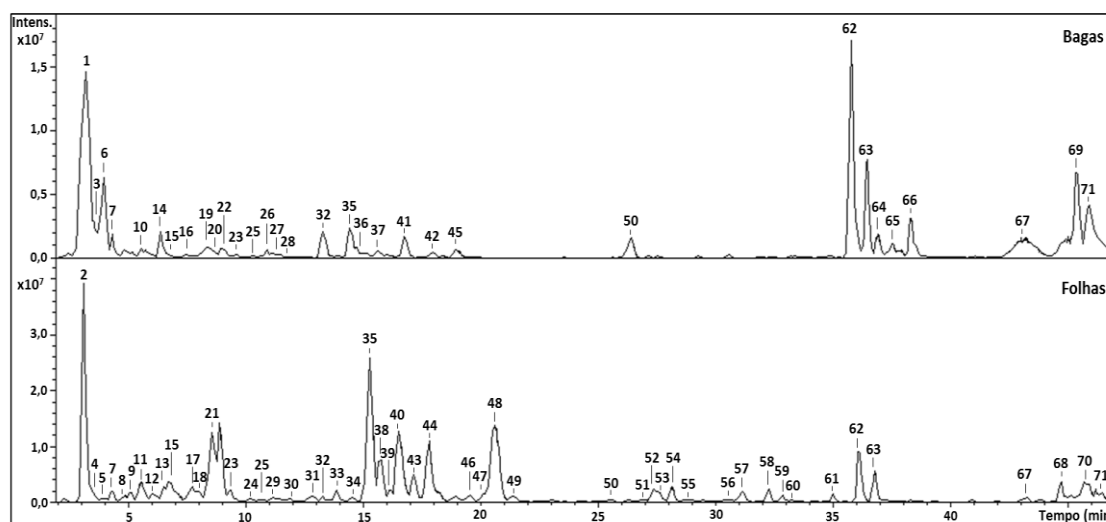


Figura 20 - Cromatogramas da análise do perfil fenólico, por HPLC-DAD-ESI⁺/MSⁿ, dos extractos metanólicos de *Elaeagnus umbellata* (bagas e folhas, respectivamente).

Pela Figura 20, verifica-se que os compostos maioritários nas bagas correspondem ao trissacarídeo (**1**) e aos isómeros de canferol-*O*-rutinosídeo (**62** e **63**). No caso das folhas, o polímero da hexose (**2**), a quercetina-*O*-(pentosil)hexósido (**35**) e a isoramnetina-*O*-(pentosil)hexósido (**48**), são os compostos dominantes.

✓ Ácidos hidroxicinâmicos

Pela análise da Tabela 13, foram identificados ácidos hidroxicinâmicos, nomeadamente derivados do ácido sinápico e ferúlico.

Ácido sinápico

O ácido sinápico é caracterizado pelo seu ião molecular a m/z 223 e pelos seus fragmentos característicos a m/z 208 e 164 [104]. Assim, os compostos **19**, **24**, **30** possuem o padrão de fragmentação MS^n [223→208], pelo que foram classificados como derivados do ácido sinápico, não sendo possível a sua caracterização completa. É importante referir que a grande maioria destes compostos foram detectados nas folhas de *E. umbellata*.

O composto **25** possui ião molecular a m/z 385 e a sua fragmentação originou um pico a m/z 223, $[M-H-162]^-$, caracterizado pela perda do glicósido (resíduo de hexósido). Assim, o composto **25** foi identificado como ácido sinápico-*O*-hexósido.

Quanto ao composto **60**, que exhibe o ião molecular a m/z 591, foi classificado como disinapóil-*O*-hexósido, de acordo com Engels *et al.* (2012) [105].

Ácido ferúlico

O ácido ferúlico, composto **71**, foi também identificado, tanto nas bagas como nas folhas. O ácido ferúlico é apresentado como molécula desprotonada, $[M-H]^-$, a m/z 193 e origina os fragmentos característicos a m/z 179, 149 e 109 [106].

✓ Flavonóides

Uma grande variedade de flavonóides foi detectada na espécie de *E. umbellata*, sendo representativa principalmente nas bagas.

Flavonóis

Quercetina

De acordo com a literatura [107], a quercetina apresenta o pico ião molecular a m/z 301 e fragmentos típicos a m/z 179 e 151.

O composto **33**, presente nas folhas, com $[M-H]^-$ a m/z 625 origina o fragmento resultante da MS^2 a m/z 301 como pico base. Nesta passagem de m/z 625 para m/z 301, perde-se um fragmento com 324 Da, correspondente a dois hexósidos (2 x 162 Da). Este composto foi identificado como quercetina-*O*-dihexósido.

O composto **49**, apresenta $[M-H]^-$ a m/z 839 e dá origem ao pico base a m/z 625 e toda a fragmentação característica da aglicona da quercetina. Como tal, foi classificado como um derivado do composto quercetina-*O*-dihexósido, uma vez que não foi possível identificar o fragmento $[M-H-214]^-$. Já o composto **36**, que apresenta $[M-H]^-$ a m/z 433, pela perda de 132 Da, foi identificado como quercetina-*O*-pentósido.

O composto **35**, mostra o $[M-H]^-$ a m/z 595 foi designado como quercetina-*O*-(pentosil)hexósido. De acordo com a literatura [108], a presença dos fragmentos de baixa intensidade a m/z 463 $[M-H-132]^-$, m/z 445 $[M-H-132-H_2O]^-$ e m/z 433 $[M-H-162]^-$, bem como a fragmentação padrão que representa a quercetina aglicona indicam que o composto **35** é uma quercetina diglicosilada.

O composto **9** é um derivado do composto anterior. Este composto apresenta $[M-H]^-$ a m/z 757 e perde uma hexose, $[M-H-162]^-$, pelo que, foi identificado como quercetina-*O*-(pentosil)dihexósido. Da mesma forma, o composto **22**, apresenta o ião molecular a m/z 741, perde um ramnósido, $[M-H-146 Da]^-$, sendo identificado como quercetina-*O*-(pentosil)hexósido-*O*-ramnósido.

Canferol

A aglicona do canferol possui como padrão de fragmentação um pico $[M-H]^-$ a m/z 285 e os fragmentos característicos resultantes da fragmentação MS^2 , a m/z 257, 229 e 151.

Os compostos **50** e **53**, presentes nas bagas e nas folhas, apresentam um ião molecular a m/z 447 que corresponde ao canferol-*O*-hexósido. A fragmentação MS² origina um pico base a m/z 285, que corresponde à perda de 162 Da [M-H-162]⁻ [109]. Por outro lado, o composto **37** mostra o [M-H]⁻ a m/z 609 e sofreu a perda de um fragmento [M-H-324 Da]⁻. Desta forma, o composto **37** foi identificado como canferol-*O*-dihexósido. Atendendo à fragmentação descrita, o composto **20**, que exhibe o ião molecular a m/z 755 e fragmentação MS² que origina o pico base a m/z 609, [M-H-146 Da]⁻, foi identificado como canferol-*O*-dihexósido-*O*-ramnósido. Os compostos **20** e **37** foram detectados apenas nas bagas.

O composto **47** foi classificado como canferol-*O*-(pentosil)hexósido. Este composto possui [M-H]⁻ a m/z 579 apresenta um fragmento a m/z 285, perda de 294 Da.

O composto **26**, detectado nas bagas, mostra ião molecular a m/z 449 e foi identificado como dihidroxi-canferol-*O*-hexósido, de acordo a literatura [110].

Os compostos **62** e **63** apresentam [M-H]⁻ a m/z 593, cuja fragmentação MS² origina o pico base a m/z 285. Logo, os compostos foram identificados como canferol-*O*-rutinósidos. Estes compostos foram detectados em ambas as partes morfológicas.

Isoramnetina

Justesen (2000) [111] descreveu que a perda de um grupo metil (CH₃), característica de estrutura dos flavonóides metoxilados, origina um anião radical estável [M-H-15]⁻. Este autor diferenciou a isoramnetina da ramnetina (Figura 21). O primeiro composto produz iões a m/z 300 resultantes da perda do radical *metil* da posição 3' do anel B, seguindo-se dos fragmentos a m/z 271, 151 e 107. Já a ramnetina, metoxilada na posição 7 do anel A, produz os fragmentos prominentes a m/z 165 e iões a m/z 315, 300, 271, 193 e 121.

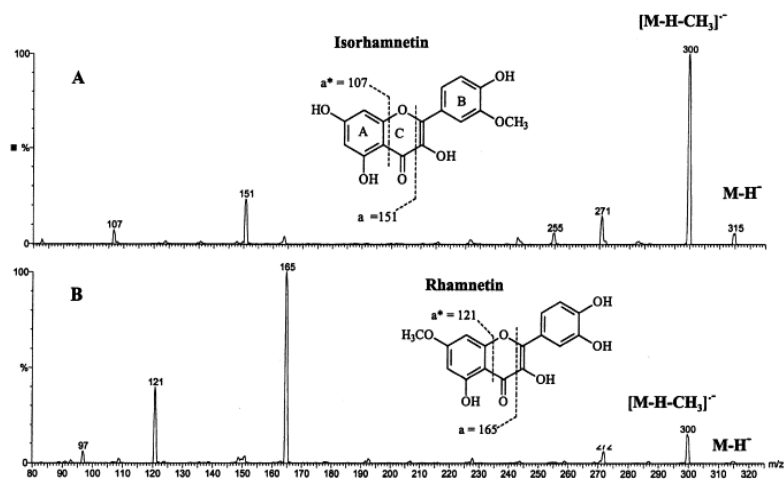


Figura 21 - Espectro de massa da isoramnetina e da ramnetina. Estão representados os fragmentos característicos. Fonte: [111].

Assim e com base nesta informação, foram encontrados vários derivados da isoramnetina, na espécie de *E. umbellata*.

O composto **52**, mostra o ião molecular a m/z 47, perdeu um fragmento de 162 Da, dando origem à aglicona da isoramnetina (m/z 315). Assim, foi identificado como isoramnetina-*O*-hexósido. Já o composto **39** foi classificado como isoramnetina-*O*-dihexósido, pelo que o ião $[M-H]^-$ com m/z 639 perde um fragmento de 324 Da dando origem ao fragmento com m/z 315 [112]. O composto **59** apresenta ião molecular a m/z 805 e foi classificado como derivado do composto anterior.

O composto **51** foi identificado como isoramnetina-*O*-sinapoil-*O*-dihexósido. Este apresenta um ião molecular a m/z 845, do qual perdeu um fragmento de 206 Da e originou o ião fragmento a m/z 639. O fragmento de 206 Da é associada à perda de um grupo sinapoil [113].

O composto **27** mostra $[M-H]^-$ a m/z 755, cuja fragmentação MS^2 dá origem à isoramnetina-*O*-(pentosil)hexósido, $[M-H-146]^-$. Deste modo, o composto **27**, foi identificado como isoramnetina-*O*-(pentosil)hexósido-*O*-ramnósido.

O composto **54** apresenta ião molecular a m/z 579 e deu origem à isoramnetina (m/z 315), após a perda do fragmento de 264 Da (132 + 132 Da), correspondente a um resíduo dipentósido. Então foi classificado como isoramnetina-*O*-dipentósido.

Os compostos **45** e **48**, apresentam ião molecular a m/z 609 e foram identificados como isómeros da isoramnetina-*O*-(pentosil)hexóxido, já que a perda do fragmento de 294 Da, dá origem à isoramnetina. Já o composto **55**, exibe $[M-H]^-$ a m/z 815, foi classificado de acordo com a literatura [104], como isoramnetina-*O*-dihexósido-*O*-glucurónido.

Miricetina

A aglicona da miricetina é caracterizada pelo seu ião molecular a m/z 317 e os seus fragmentos característicos a m/z 179 e m/z 151 [90].

O composto **28** apresenta ião molecular a m/z 611 e dá origem à aglicona da miricetina, pela perda de 294 Da. Logo, o composto foi identificado como miricetina-*O*-(hexosil)pentósido

✓ **Taninos**

Taninos hidrolisáveis

De acordo com a literatura [114,115] o ácido elágico, na sua forma aglicona, é caracterizado pelo ião molecular $[M-H]^-$ a m/z 301 e fragmentos a m/z 258, 229, 185.

Nas folhas e bagas de *E. umbellata* foram encontrados alguns derivados do ácido elágico. O composto **29** apresenta ião molecular $[M-H]^-$ a m/z 463, que após a fragmentação MS² dá origem ao ácido elágico. Deste modo, o composto **29** foi identificado como ácido elágico-*O*-hexósido [114].

Os compostos **16**, **18** e **31** exibem $[M-H]^-$ a m/z 633, 551 e 475, respectivamente, e foram classificados como derivados do ácido elágico.

O composto **5** exibe ião molecular a m/z 481 e a fragmentação origina o pico base a m/z 301. Este composto, detetado apenas nas folhas desta espécie, foi identificado como hexahidroxidifenoil-*O*-hexósido (HHDP-*O*-hexósido) [107].

O composto **17** apresenta ião molecular a m/z 633, que dá origem ao pico base a m/z 301, foi identificado como galoil-HHDP-*O*-hexósido [115]. Este composto foi detetado nas bagas e nas folhas.

Os compostos **8**, **11** e **15**, exibem íão $[M-H]^-$ a m/z 783. A perda de água, $[M-H-18]^-$, e do ácido elágico, $[M-H-301]^-$, originou os fragmentos a m/z 765 e m/z 481, respectivamente [115]. Assim, estes compostos foram classificados como isómeros do bis-HHDP-*O*-hexósido.

O composto **10** mostra íão molecular a m/z 305 e foi identificado como (+)-galocatequina, de acordo com a literatura [114].

✓ **Outros compostos**

Adicionalmente, foram identificados outros compostos, de origem não-fenólica, nas amostras de *E. umbellata*, nomeadamente, ácidos orgânicos (ácidos quínico, málico e cítrico) bem como alguns sacarídeos.

✓ **Sacarídeos**

Os compostos **1** e **2** foram caracterizados como oligossacarídeos. O composto **1** apresenta um íão $[M-H]^-$ a m/z 473 a partir do qual a fragmentação MS^2 deu origem a fragmentos a m/z 341 $[M-H-132]^-$ e m/z 179 $[M-H-132-162]^-$. Considerando este padrão de fragmentação, o composto foi identificado como trissacarídeo (2 hexoses + pentose) [116]. O composto **2** foi também considerado um oligossacarídeo já que apresenta íão molecular a m/z 683 e dispõe dos fragmentos a m/z 341 e 179, foi classificado como polímero da hexose [116].

Segundo Verardo *et al.* (2009) [116], a presença da hexose é confirmada pela fragmentação MS^4 , que exhibe um padrão com fragmentos a m/z 161, 143, 131, 119, 113, 89 e 71, tal como é possível verificar na Figura 22.

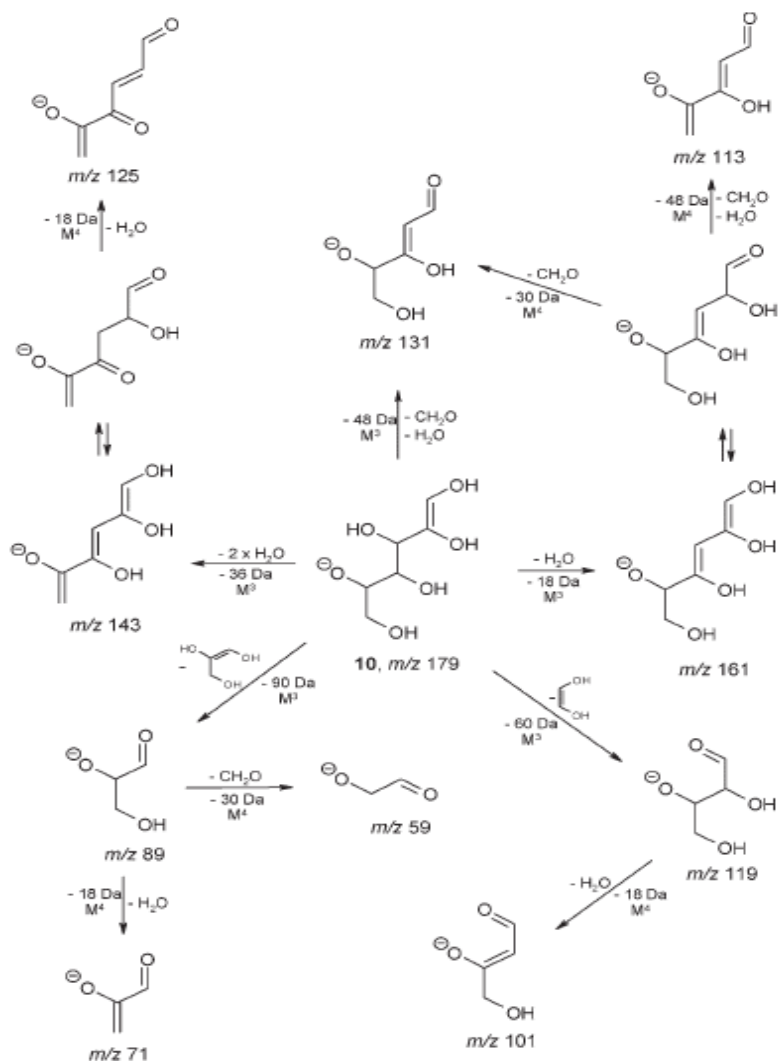


Figura 22 - Fragmentação dos sacarídeos. Fonte: Verardo *et al.* (2009) [116].

Embora não tenha sido possível concluir a sua identificação, foram detectados outros sacarídeos, (compostos **12**, **34**, **38**, **42**, **43**, **46**), principalmente nas folhas da espécie *E. umbellata*.

✓ Ácidos orgânicos

A fragmentação do composto com $[M-H]^-$ a m/z 533 dá origem ao ácido quínico, $[M-H]^-$ a m/z 191, com fragmentos característicos a m/z 127 e 109. Porém não foi possível identificar o fragmento perdido $[M-H-342]^-$, pelo que, o composto **4** foi identificado como derivado do ácido quínico.

O composto **6** com ião molecular a m/z 133 foi identificado como ácido málico, já que possui o seguinte padrão de fragmentação MS³ [133→115] [117]. Já o composto **3**

origina o ião molecular a m/z 295 e fragmento a m/z 133. De acordo com o que já foi descrito anteriormente, este composto foi identificado como ácido málico-*O*-hexósido.

O composto **7** foi classificado como ácido cítrico, que, apesar de ser semelhante à fragmentação do ácido quínico, segundo Flores *et al.* (2012) [117] elui a um tempo de retenção superior ao ácido quínico. Outro factor de distinção entre estes ácidos é o facto de o ácido quínico apresentar o fragmento de m/z 127, ausente no ácido cítrico.

✓ Terpenos

O composto **23** apresenta ião molecular a m/z 431, após a fragmentação MS² origina o pico base a m/z 385. Segundo a literatura [116] a perda de 46 Da pode ser considerada como a formação de aductos com o ácido fórmico proveniente da fase móvel. Deste modo, o composto **24** foi designado por roseosídeo (aducto – formato).

O composto **67** apresenta um ião molecular a m/z 503 e dá origem a um pico base a m/z 485, [M-H-H₂O]⁻. A fragmentação seguinte origina um fragmento a m/z 441, correspondente à perda de um fragmento de 44 Da, [M-H-CO₂]⁻. De acordo com a literatura [25], este composto foi caracterizado como ácido triterpénico. O composto **56** com ião molecular a m/z 711 foi classificado como ácido triterpénico-*O*-hexósido [25]. A perda de um fragmento de 208 Da [M-H-162-46]⁻ (corresponde ao hexósido com formação de aducto - formato).

O composto **68** foi identificado como ácido ursólico, um ácido que pertence à família de compostos hidroxi-triterpenos pentacíclicos [118]. O mecanismo de fragmentação deste composto encontra-se esquematizado na Figura 23. A fragmentação MS² deste composto, que exhibe ião molecular a m/z 455, apresenta fragmento a m/z 407, dada a perda de um fragmento de 48 Da, equivalente a [M-H-HCHO]⁻ e [M-H-H₂O]⁻. O padrão de fragmentação deste ácido apresenta fragmentos a m/z 391, 377, 363.

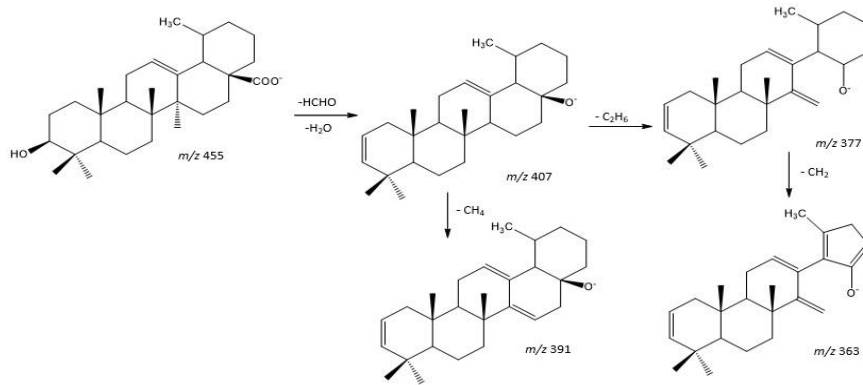


Figura 23 - Mecanismo de fragmentação do ácido ursólico. Adaptado de Che et al. (2011) [118].

✓ **Não identificados**

Para além de todas as classes de compostos anteriormente referidas e identificadas, muitos foram os compostos (**14, 21, 32, 40, 41, 44, 57, 58, 61, 65, 66, 69 e 70**), que dado o seu padrão de fragmentação, não foi possível identificar.

Tabela 13 - Caracterização do perfil fenólico, por HPLC-DAD-ESI⁻/MSⁿ, dos extractos metanólicos das diferentes partes morfológicas (bagas e folhas) de *Elaeagnus umbellata*.

Nº	t _R (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	HPLC-DAD-ESI/MS ⁿ m/z (% pico base)	Identificação	Parte morfológica
1	3,1	473	MS ² [473]: 342 (17,3), 341 (100), 221 (12,9), 179 (46,0), 132 (26,5) MS ³ [473→341]: 323(27,9), 281 (11,0), 179 (100), 161 (32,8), 143 (11,4) MS ⁴ [473→341→179]: 161 (13,5), 131 (53,7), 119 (37,6), 113 (19,6), 107 (23,3), 89 (100)	Trissacarídeo	Bagas
2	3,3	683	MS ² [683]: 342 (14,4), 341 (100) MS ³ [683→341]: 179 (100), 161 (30,2), 143 (18,1), 119 (13,2), 113 (20,3), 101 (14,3) MS ⁴ [683→341→179]: 161 (58,6), 143 (43,6), 131 (15,4), 119 (46,9), 113 (20,2), 101 (39,8), 89 (100), 71 (35,8), 59 (26,7)	Polímero da hexose	Folhas
3	3,4	295	MS ² [295]: 235 (13,0), 205 (15,5), 179 (100), 161 (14,3), 133 (77,7), 119 (12,4), 113 (14,4) MS ³ [295→179]: 161 (49,4), 149 (14,2), 143 (78,1), 131 (18,3), 119 (51,6), 113 (50,4), 101 (23,6), 89 (100), 87 (10,1), 71 (10,7) MS ⁴ [295→179→133]: 115 (37,1), 101 (100), 97 (87,6), 85 (18,8), 71 (60,0)	Ácido málico- <i>O</i> -hexósido	Bagas
4	3,5	533	MS ² [533]: 191 (100) MS ³ [533→191]: 127 (100), 109 (17,1), 94 (86,0), 93 (51,8), 85 (27,5)	Derivado do ácido quínico	Folhas
5	3,8	481	MS ² [481]: 302 (14,6), 301 (100), 275 (12,1) MS ³ [481→301]: 301 (19,5), 258 (100), 230 (27,0), 229 (54,2), 216 (12,4), 201 (21,4), 185 (12,4), 134 (10,7)	HHDP- <i>O</i> -hexósido	Folhas
6	4,1	133	MS ² [133]: 115 (100) MS ³ [133→115]: 71 (100)	Ácido málico	Bagas
7	4,4	191	MS ² [191]: 173 (13,2), 111 (100)	Ácido cítrico	Bagas Folhas
8	4,7	783	MS ² [783]: 765 (24,4), 765 (29,9), 721 (22,2), 482 (10,9), 481 (35,2), 341 (12,8), 302 (10,5), 301 (100), 299 (10,0), 275 (42,4) MS ³ [783→301]: 258 (100), 245 (28,1), 230 (12,9), 229 (45,5), 216 (53,8), 185 (36,6)	bis-HHDP- <i>O</i> -hexósido	Folhas

9	5,2	757	MS ² [757]: 596 (25,2), 595 (100), MS ³ [757→595]: 445 (17,9), 301 (49,8), 300 (100), 271 (14,9), 255 (11,0) MS ⁴ [757→595→301]: 273 (11,5), 272 (27,2), 271 (100), 256 (11,6), 255 (30,0), 201 (11,0), 179 (32,4), 151 (40,1)	Quercetina- <i>O</i> -(pentosil)dihexósido	Folhas
10	5,7	305	MS ² [305]: 261 (12,2), 222 (20,8), 221 (47,7), 220 (11,7), 219 (56,0), 180 (22,2), 179 (100), 165 (28,1), 164 (13,3), 137 (30,8), 125 (40,2) MS ³ [305→179]: 165 (66,9), 164 (53,2), 152 (35,0), 151 (100), 138 (31,5), 135 (76,1)	(+)-Galocatequina	Bagas
11	5,9	783	MS ² [783]: 481 (23,0), 302 (10,5), 301 (100), 275 (14,5) MS ³ [783→301]: 300 (47,2), 284 (14,6), 273 (48,2), 258 (100), 227 (10,9), 186 (41,3), 185 (77,6) MS ⁴ [783→301→258]: 185 (100)	bis-HHDP- <i>O</i> -hexósido	Folhas
12	6,1	583	MS ² [583]: 538(21,4), 537 (100) MS ³ [583→537]: 406 (16,9), 406 (12,8), 405 (100), 309 (11,7), 221 (12,0), 191 (30,3), 179 (17,7), 161 (18,9), 153 (18,9), 149 (51,5), 133 (13,1) MS ⁴ [583→537→405]: 327 (78,9), 243 (68,6), 179 (100)	Sacarídeo	Folhas
13	6,4	451	MS ² [451]: 406 (25,7), 405 (100), 167 (13,2) MS ³ [451→405]: 244 (22,9), 209 (19,8), 207 (11,0), 179 (16,8), 168 (17,3), 167 (100), 161 (37,3), 154 (43,2), 153 (18,0), 149 (66,8), 143 (14,4), 139 (15,9), 135 (12,8), 125 (17,7), 115 (12,2) MS ⁴ [451→405→167]: 149 (100)	Derivado do Ácido 3,4- Dihidroxifenilacético (Aducto – Formato)	Folhas
14	6,5	457	MS ² [457]: 278 (21,2), 277 (100), 233 (14,4), 215 (31,2), 191 (13,0), 189 (37,2), 179 (20,2), 171 (38,1), 161 (11,6), 143 (18,9), 131 (10,4) MS ³ [457→277]: 234 (43,1), 233 (46,2), 190 (63,2), 189 (100), 174 (19,3), 171 (74,2), 124 (36,3), 123 (63,2), 95 (38,2) MS ⁴ [457→277→189]: 121 (100)	Não identificado	Bagas
15	7,1	783	MS ² [783]: 481 (25,6), 302 (17,4), 301 (100), 275 (11,1) MS ³ [783→301]: 300 (28,7), 229 (22,9), 213 (82,2), 185 (100), 173 (26,4)	bis-HHDP- <i>O</i> -hexósido	Bagas Folhas
16	7,5	633	MS ² [633]: 301 (100) MS ³ [633→301]: 299 (53,5), 258 (100), 185 (28,2)	Derivado do ácido elágico	Bagas
17	7,8	633	MS ² [633]: 302 (10,9), 301 (100) MS ³ [633→301]: 301 (19,6), 284 (60,7), 289 (16,7), 258 (100), 241 (21,2), 229 (33,2), 201 (15,9), 185 (28,2)	Galoil-HHDP- <i>O</i> -hexósido	Bagas Folhas

			MS ⁴ [633→301→258]: 229 (100)		
18	8,0	551	MS ² [551]: 529 (100) MS ³ [551→529]: 467 (100), 458 (20,6), 457 (10,1), 301 (10,6) MS ⁴ [551→529→467]: 301 (100), 299 (53,0), 289 (14,3), 285 (50,0), 277 (43,5), 258 (84,6), 169 (98,1)	Derivado do ácido elágico	Folhas
19	8,6	563	MS ² [563]: 518 (24,4), 517 (100) MS ³ [563→517]: 387 (25,0), 385 (90,7), 365 (45,5), 293 (26,3), 223 (90,1), 208 (100), 164 (46,1), 153 (69,3), MS ⁴ [563→517→208]: 190 (100), 164 (51,1)	Derivado do ácido sinápico	Bagas
20	8,6	755	MS ² [755]: 610 (23,7), 609 (100) MS ³ [755→609]: 430 (11,9), 429 (57,4), 285 (100), 284 (55,4), 257 (17,2), 255 (15,2) MS ⁴ [755→609→285]: 258 (25,9), 257 (64,6), 256 (25,3), 255 (79,8), 241 (14,2), 229 (43,9), 164 (18,6), 151 (100)	Canferol- <i>O</i> -dihexósido- <i>O</i> -ramnósido	Bagas
21	8,8	563	MS ² [563]: 518 (23,1), 517 (100) MS ³ [563→517]: 385 (34,9), 206 (10,0), 205 (100), 190 (13,5), 153 (15,5), 152 (12,3) MS ⁴ [563→517→205]: 201 (86,1), 190 (100), 189 (12,5), 187 (77,7), 186 (36,1), 148 (18,9), 147 (43,1)	Não identificado	Folhas
22	8,9	741	MS ² [741]: 595 (100), 446 (12,0), 300 (17,0) MS ³ [741→595]: 463 (20,2), 445 (43,7), 368 (19,3), 343 (36,2), 301 (38,0), 300 (100), 273 (42,1), 257 (10,1), 185 (12,4), 179 (15,4) MS ⁴ [741→595→300]: 272 (100)	Quercetina- <i>O</i> -(pentosil)hexósido- <i>O</i> -ramnósido	Bagas
23	9,2	431	MS ² [431]: 386 (17,4), 385 (100), 223 (15,7) MS ³ [431→385]: 265 (14,9), 224 (12,7), 223 (49,6), 206 (21,6), 205 (89,4), 161 (13,3), 154 (11,7), 153 (100), 143 (16,8)	Roseosídeo (Aducto - Formato)	Bagas Folhas
24	10,3	489	MS ² [489]: 367 (10,2), 325 (11,1), 291 (18,6), 251 (13,0), 224 (16,8), 223 (100), 205 (78,3), 191 (14,1), 190 (45,6), 164 (41,6), 149 (33,8) MS ³ [489→223]: 208 (13,5), 165 (100), 164 (93,6), 149 (28,3) MS ⁴ [489→223→164]: 150 (76,3), 149 (100)	Derivado do ácido sinápico	Folhas

25	10,7	385	MS ² [385]: 326 (16,6), 325 (78,8), 296 (10,9), 295 (74,6), 223 (100), 220 (10,1) MS ³ [385→223]: 222 (31,2), 208 (100), 206 (32,7)	Ácido sinápico- <i>O</i> -hexósido	Bagas Folhas
26	11,0	449	MS ² [449]: 288 (10,2), 287 (100), 270 (13,5), 269 (46,7), 260 (14,2), 259 (53,9) MS ³ [449→287]: 260 (10,8), 259 (100), 125 (31,7) MS ⁴ [449→287→259]: 216 (31,2), 215 (100), 172 (22,0), 125 (71,9), 93 (41,8)	Dihidro-canferol- <i>O</i> -hexósido	Bagas
27	11,1	755	MS ² [755]: 610 (30,1), 609 (100) MS ³ [755→609]: 577 (13,7), 550 (15,3), 477 (22,8), 459 (25,7), 315 (100), 300 (13,4), 299 (13,6), 271 (16,9), 243 (13,3) MS ⁴ [755→609→315]: 301 (21,1), 300 (100), 299 (91,8), 298 (16,1), 259 (20,9)	Isoramnetina- <i>O</i> -(pentosil)hexósido- <i>O</i> -ramnósido	Bagas
28	11,2	611	MS ² [611]: 593 (14,2), 533 (10,8), 489 (12,9), 447 (13,9), 317 (100), 315 (11,3), 314 (11,7), 287 (20,3), 179 (24,3), 177 (13,3) MS ³ [611→317]: 288 (100), 287 (25,7), 271 (62,2), 270 (54,3), 242 (65,2), 179 (53,4), 169 (61,9) M21S ⁴ [611→317→179]: 151 (100)	Miricetina- <i>O</i> -(hexosil)pentósido	Bagas
29	11,3	463	MS ² [463]: 301 (100), 300 (35,6) MS ³ [463→301]: 300 (90,9), 257 (100), 229 (61,3), 207 (27,7), 172 (33,3)	Ácido elágico- <i>O</i> -hexósido	Folhas
30	11,8	503	MS ² [503]: 223 (100), 205 (56,7), 191 (22,0), 164 (14,1), 149 (25,9) MS ³ [503→223]: 179 (100), 164 (65,5), 149 (76,1)	Derivado do ácido sinápico	Folhas
31	12,8	475	MS ² [475]: 302 (12,7), 301 (100), 275 (14,7) MS ³ [475→301]: 257 (100), 229 (39,9), 186 (19,7), 157 (30,2), 145 (13,0)	Derivado do ácido elágico	Folhas
32	13,2	371	MS ² [371]: 250 (10,4), 249 (100) MS ³ [371→249]: 231 (40,1), 175 (31,3), 157 (13,3), 113 (100), 85 (28,2) MS ⁴ [371→249→113]: 95 (86,3), 85 (100)	Não identificado	Bagas Folhas
33	13,3	625	MS ² [625]: 581 (19,1), 506 (10,8), 505 (19,1), 463 (11,0), 445 (34,8), 429 (11,9), 406 (11,0), 355 (30,7), 302 (59,9), 301 (62,8), 301 (100), 299 (27,9) MS ³ [625→301]: 272 (24,4), 271 (100), 256 (13,1), 255 (45,5), 227 (26,1), 179 (15,0), 152 (21,7), 151 (50,6)	Quercetina- <i>O</i> -dihexósido	Folhas
34	14,3	725	MS ² [725]: 546 (20,4), 545 (100), 519 (11,0), 313 (15,3) MS ³ [725→545]: 351 (22,8), 313 (100), 296 (24,2), 295 (10,8), 249 (18,4), 229 (12,8), 229 (24,4), 206 (24,0), 205 (27,3), 179 (66,1), 161 (12,0) MS ⁴ [725→545→313]: 179 (100), 131 (85,9), 115 (40,7), 113 (63,4), 101 (63,4), 89 (49,0)	Sacarídeo	Folhas
35	14,4	595	MS ² [595]: 463 (12,3), 445 (17,2), 433 (14,2), 301 (100), 300 (43,9), 271 (16,3)		Bagas

			MS ³ [595→300]: 272 (20,5), 271 (100), 255 (50,5), 179 (25,2), 151 (35,5)	Quercetina- <i>O</i> -(pentosil)hexósido	Folhas
36	14,8	433	MS ² [433]: 301 (100), 300 (41,7) MS ³ [433→301]: 300 (100), 257 (40,7), 179 (53,8), 151 (55,5)	Quercetina- <i>O</i> -pentósido	Bagas
37	15,1	609	MS ² [609]: 429 (77,3), 323 (14,3), 286 (14,5), 285 (100), 284 (51,6), 257 (12,4), 255 (27,9), 229 (11,1), 227 (10,4) MS ³ [609→285]: 257 (100), 256 (41,0), 255 (76,3), 241 (73,5), 229 (21,8), 169 (43,2), 151 (45,7) MS ⁴ [609→285→257]: 255 (100)	Canferol- <i>O</i> -dihexósido	Bagas
38	15,8	551	MS ² [551]: 506 (25,8), 505 (100) MS ³ [551→505]: 374 (21,1), 373 (100), 161 (58,7) MS ⁴ [551→505→373]: 179 (12,5), 161 (100), 143 (10,3), 113 (13,9)	Sacarídeo	Folhas
39	16,2	639	MS ² [639]: 459 (15,1), 316 (13,6), 315 (100), 314 (28,3), 300 (17,2), 255 (10,2) MS ³ [639→315]: 301 (14,9), 300 (100), 299 (15,8) MS ⁴ [639→315→300]: 272 (60,1), 271 (75,9), 255 (100), 227 (16,7), 151 (19,7)	Isoramnetina- <i>O</i> -dihexósido	Folhas
40	16,5	547	MS ² [547]: 312 (11,2), 311 (100), 293 (17,5), 251 (12,1), 239 (11,3), 221 (11,3), 191 (34,6), 161 (30,6) MS ³ [547→311]: 293 (21,8), 221 (12,5), 191 (49,3), 161 (90,2), 149 (95,9), 143 (10,6), 131 (34,7), 113 (16,4), 101 (100) MS ³ [547→311]: 293 (21,8), 251 (15,1), 191 (42,5), 161 (94,3), 149 (100), 143 (15,3), 131 (18,2), 113 (10,3), 101 (76,3), 89 (22,0)	Não identificado	Folhas
41	16,6	597	MS ² [597]: 489 (10,4), 477 (43,5), 459 (22,2), 417 (15,4), 388 (11,3), 387 (62,4), 358 (19,6), 357 (100) MS ³ [597→357]: 209 (100), 167 (126), 165 (12,4), 123 (14,7), 121 (16,9) MS ⁴ [597→357→209]: 165 (25,6), 164 (10,6), 145 (16,7), 137 (20,5), 123 (100), 121 (26,1), 98 (15,5)	Não identificado	Bagas
42	18,0	415	MS ² [415]: 370 (20,1), 369 (11,8), 225 (19,2), 180 (20,0), 179 (100), 149 (11,2), MS ³ [415→179]: 161 (70,7), 131 (34,4), 113 (35,4), 89 (100), 71 (42,7)	Sacarídeo	Bagas
43	17,2	551	MS ² [551]: 506 (22,6), 505 (100) MS ³ [551→505]: 374 (18,8), 373 (100), 161 (18,4) MS ⁴ [551→505→373]: 162 (11,5), 161 (100), 159 (12,5), 113 (21,7)	Sacarídeo	Folhas
44	17,6	547	MS ² [547]: 501 (13,4), 312 (14,8), 311 (100), 310 (10,2), 293 (10,4), 221 (10,8), 191 (22,7), 161 (27,3)	Não identificado	Folhas

			MS ³ [547→311]: 293 (20,4), 251 (18,9), 239 (10,9), 221 (20,3), 191 (32,3), 161 (48,2), 149 (85,0), 143 (19,3), 131 (19,1), 119 (10,5), 101 (100) MS ⁴ [547→311→149]: 130 (54,2), 119 (39,6), 89 (100), 71 (100)		
45	18,8	609	MS ² [609]: 461 (11,7), 460 (10,8), 459 (20,7), 316 (24,0), 315 (100), 314 (85,8), 300 (22,3), 299 (29,5), 287 (14,3), 272 (12,3), 271 (16,5) MS ³ [609→315]: 300 (100), 299 (56,3), 272 (13,2) MS ⁴ [609→315→300]: 272 (26,2), 271 (100), 256 (19,3), 255 (45,6), 213 (10,1)	Isoramnetina- <i>O</i> -(pentosil)hexósido	Bagas
46	19,6	549	MS ² [549]: 504 (16,9), 503 (100) MS ³ [549→503]: 372 (28,9), 371 (100), 293 (17,3), 179 (15,4), 161 (22,3) MS ⁴ [549→503→371]: 179 (49,8), 161 (100), 131 (15,8), 119 (23,3), 113 (55,1)	Sacarídeo	Folhas
47	20,2	579	MS ² [579]: 429 (28,1), 339 (10,6), 285 (100), 284 (47,0), 257 (12,3), 255 (14,9) MS ³ [579→285]: 267 (27,5), 257 (94,1), 255 (100), 241 (69,2), 229 (83,2), 198 (28,9), 151 (54,8)	Canferol- <i>O</i> -(pentosil)hexósido	Folhas
48	20,5	609	MS ² [609]: 459 (30,7), 316 (14,1), 315 (100), 314 (76,2), 300 (16,6), 299 (25,8), 271 (17,8) MS ³ [609→315]: 301 (11,4), 300 (100), 299 (62,1), 271 (10,1) MS ⁴ [609→315→300]: 272 (37,0), 271 (100), 255 (36,5), 151 (15,2)	Isoramnetina- <i>O</i> -(pentosil)hexósido	Folhas
49	21,3	839	MS ² [839]: 639 (14,4), 625 (100), 300 (11,5) MS ³ [839→625]: 505 (26,6), 463 (11,8), 445 (67,8), 301 (55,2), 300 (100), 299 (11,1), 271 (45,6), 179 (22,3) MS ⁴ [839→625→301]: 271 (100), 257 (11,4), 179 (66,0), 151 (26,6)	Derivado da Quercetina- <i>O</i> -dihexósido	Folhas
50	26,1	447	MS ² [447]: 327 (10,2), 286 (16,6), 285 (100), 284 (72,4), 255 (26,6) MS ³ [447→285]: 267 (19,6), 257 (29,2), 256 (67,7), 255 (100), 241 (14,6), 199 (13,9) MS ⁴ [447→285→255]: 227 (100), 183 (40,6)	Canferol- <i>O</i> -hexósido	Bagas Folhas
51	26,9	845	MS ² [845]: 654 (13,7), 654 (13,2), 653 (82,1), 641 (10,4), 640 (42,7), 639 (100), 515 (18,0), 459 (12,8), 413 (11,1), 353 (11,1), 329 (11,0), 315 (23,0), 300 (10,4) MS ³ [845→639]: 608 (14,1), 607 (12,6), 491 (21,9), 477 (14,4), 460 (19,9), 459 (40,4), 417 (18,4), 393 (21,1), 316 (22,1), 315 (100), 314 (30,8), 300 (41,9), 287 (12,3), 280 (14,2), 254 (12,9), 227 (22,7), 215 (11,5) MS ⁴ [845→639→315]: 302 (10,3), 301 (24,4), 300 (100), 299 (49,6), 257 (13,2)	Isoramnetina- <i>O</i> -sinapoil- <i>O</i> -dihexósido	Folhas
52	26,9	477	MS ² [477]: 357 (10,3), 315 (100), 301 (10,5), 285 (27,4), 271 (14,1) MS ³ [477→315]: 301 (51,7), 300 (22,2), 299 (76,9), 286 (86,6), 285 (54,7), 271	Isoramnetina- <i>O</i> -hexósido	Folhas

			(100), 257 (52,6), 243 (23,3)		
53	27,7	447	MS ² [447]: 286 (15,8), 285 (100), 284 (69,7), 255 (38,4) MS ³ [447→285]: 257 (30,4), 256 (37,4), 255 (100), 227 (19,8) MS ⁴ [447→285→255]: 229 (21,3), 227 (100), 227 (98,3), 183 (71,9)	Canferol- <i>O</i> -hexósido	Folhas
54	27,9	579	MS ² [579]: 533 (14,3), 315 (100), 299 (13,4), 271 (14,8) MS ³ [579→315]: 300 (100), 299 (15,1), 271 (34,9), 151 (15,6)	Isoramnetina- <i>O</i> -dipentósido	Folhas
55	28,7	815	MS ² [815]: 654 (13,1), 653 (63,0), 640 (22,4), 639 (100), 485 (11,4), 329 (11,0), 315 (18,9), 314 (15,1) MS ³ [815→639]: 607 (18,8), 580 (23,4), 491 (20,7), 460 (16,8), 459 (46,1), 433 (18,3), 428 (10,1), 416 (13,8), 358 (28,5), 357 (53,8), 338 (14,1), 315 (100), 314 (58,3), 301 (25,7), 300 (46,2), 299 (16,1), 272 (11,0), 271 (26,5), 244 (56,2), 227 (15,0), 209 (20,0) MS ⁴ [815→639→315]: 300 (100), 299 (42,9), 285 (16,3)	Isoramnetina- <i>O</i> -dihexósido- <i>O</i> -glucurónido	Folhas
56	30,7	711	MS ² [711]: 665 (10,5), 505 (10,2), 503 (100) MS ³ [711→503]: 485 (55,0), 453 (100), 421 (78,3), 417 (61,3), 410 (53,2), 409 (92,0), 380 (50,4) MS ⁴ [711→503→453]: 409 (100)	Ácido triterpénico- <i>O</i> -hexósido (Aducto – Formato)	Folhas
57	31,2	727	MS ² [727]: 682 (34,2), 681 (100), 620 (12,4), 619 (36,0) MS ³ [727→681]: 620 (29,7), 619 (100) MS ⁴ [727→681→619]: 458 (20,0), 457 (100), 425 (24,5)	Não identificado	Folhas
58	32,1	711	MS ² [711]: 666 (34,8), 665 (100) MS ³ [711→665]: 622 (42,8), 621 (100), 459 (10,1) MS ³ [711→665→621]: 589 (37,2), 460 (36,6), 459 (100), 439 (10,0), 428 (17,8), 427 (27,3)	Não identificado	Folhas
59	32,7	805	MS ² [805]: 640 (12,8), 639 (97,1), 622 (10,6), 621 (38,6), 460 (12,8), 459 (34,4), 315 (100), 314 (22,5), 313 (10,5), 300 (22,5), 299 (17,6) MS ³ [805→639]: 608 (57,0), 607 (37,4), 477 (31,6), 369 (14,2), 357 (41,8), 342 (23,0), 316 (39,2), 315 (100), 314 (70,4), 301 (17,4), 299 (15,2), 287 (32,0), 285 (13,6), 283 (16,8) MS ⁴ [805→639→315]: 300 (100), 299 (22,2)	Derivado da Isoramnetina- <i>O</i> -dihexósido	Folhas
60	33,1	591	MS ² [591]: 568 (20,0), 544 (10,2), 367 (24,9), 313 (23,2), 295 (33,7), 265 (13,9), 223 (100), 205 (28,1), 190 (14,9), 164 (12,8)	Disinapoíl- <i>O</i> -hexósido	Folhas

			MS ³ [591→223]: 208 (88,8), 179 (17,0), 164 (100) MS ⁴ [591→223→164]: 149 (100)		
61	35,0	581	MS ² [581]: 558 (100), 535 (34,0), 533 (28,5), 477 (18,1), 207 (20,7) MS ³ [581→558]: 454 (100)	Não identificado	Folhas
62	35,7	593	MS ² [593]: 286 (12,5), 285 (100) MS ³ [593→285]: 258 (19,1), 257 (37,8), 256 (13,6), 241 (21,0), 229 (16,4), 213 (15,7), 163 (11,9), 151 (100), 123 (17,6), 107 (12,8)	Canferol-O-rutinósido	Bagas Folhas
63	36,3	593	MS ² [593]: 445 (10,5), 286 (12,5), 285 (100) MS ³ [593→285]: 258 (18,6), 257 (35,5), 241 (24,1), 229 (18,9), 213 (18,3), 151 (1000), 123 (11,9)	Canferol-O-(cumaroil)hexósido	Bagas Folhas
64	36,8	623	MS ² [623]: 520 (18,3), 462 (13,0), 429 (12,2), 418 (13,0), 323 (100), 315 (11,0), 301 (15,8), 299 (99,6), 285 (98,4), 263 (11,4), 243 (14,4), 221 (18,8), 203 (14,0), 195 (14,3), 193 (14,4), 177 (13,6) MS ³ [623→299]: 284 (100), 271 (40,4), 151 (47,3) MS ⁴ [623→299→284]: 256 (100), 162 (33,9)	Tectorigenina-O-dihexósido	Bagas
65	37,3	582	MS ² [582]: 463 (22,8), 462 (100), 436 (10,5), 342 (42,0) MS ³ [582→462]: 343 (30,8), 342 (100) MS ⁴ [582→462→342]: 299 (100), 298 (12,4), 257 (35,1), 159 (16,9), 145 (26,4), 117 (29,4)	Não identificado	Bagas
66	38,3	612	MS ² [612]: 493 (30,5), 492 (100), 477 (12,7), 476 (43,5), 466 (10,1), 462 (28,1), 342 (17,3) MS ³ [612→492]: 449 (100), 373 (11,0), 372 (80,9), 343 (12,2), 342 (20,2), 175 (18,0) MS ⁴ [612→492→449]: 299 (100), 298 (25,8), 260 (44,9), 185 (28,8), 175 (29,2), 172 (53,6), 145 (34,5)	Não identificado	Bagas
67	44,7	503	MS ² [503]: 485 (100), 459 (26,1), 441 (27,7), 337 (10,8) MS ³ [503→485]: 453 (41,1), 441 (77,8), 421 (57,2), 403 (35,9), 401 (100), 393 (27,9), 385 (14,7), 379 (13,4) MS ⁴ [503→485→441]: 385 (100)	Ácido triterpénico	Bagas Folhas
68	45,0	455	MS ² [455]: 408 (22,1), 407 (100), 393 (10,3) MS ³ [455→407]: 391 (81,2), 389 (31,3), 377 (100), 375 (82,1), 374 (60,0), 363 (78,6), 149 (23,8)	Ácido ursólico	Folhas
69	45,3	540	MS ² [540]: 481 (25,6), 480 (100)	Não identificado	Bagas

			MS ³ [540→480]: 256 (13,8), 255 (100)		
70	45,8	487	MS ² [487]: 470 (46,0), 469 (100), 409 (33,3) MS ³ [487→410]: 391 (59,0), 380 (25,6), 379 (100), 378 (17,4), 377 (28,0), 375 (32,9) MS ⁴ [487→410→379]: 363 (100)	Não identificado	Folhas
71	46,1	193	MS ² [193]: 179 (100), 149 (29,8), 109 (27,2)	Ácido ferúlico	Bagas Folhas

3.1.2. *Rubus grandifolius*

A análise do perfil fenólico desta espécie foi realizada em duas amostras colhidas em dois locais geograficamente diferentes da ilha da Madeira, Funchal e Machico. Os resultados foram compilados em tabelas, Tabela 14 e Tabela 15, separadas por parte morfológica da espécie, bagas e folhas, respectivamente.

3.1.2.1. Bagas

As bagas da espécie *R. grandifolius*, colhidas no Funchal e em Machico, são apresentados na Figura 24 e na Tabela 14.

A Figura 24 apresenta os cromatogramas das amostras colhidas em locais diferentes, de forma a estabelecer a análise comparativa dos mesmos. Verifica-se que os cromatogramas das das amostras são muito semelhantes, pelo que muitos dos compostos são partilhados. Assim, os picos maioritários são comuns aos dois locais de colheita: o polímero da hexose (**2**), o ácido triterpénico-*O*-hexósido (**35**) e os isómeros do ácido ganodérico-*O*-hexósido (**36** e **45**), são os compostos maioritários.

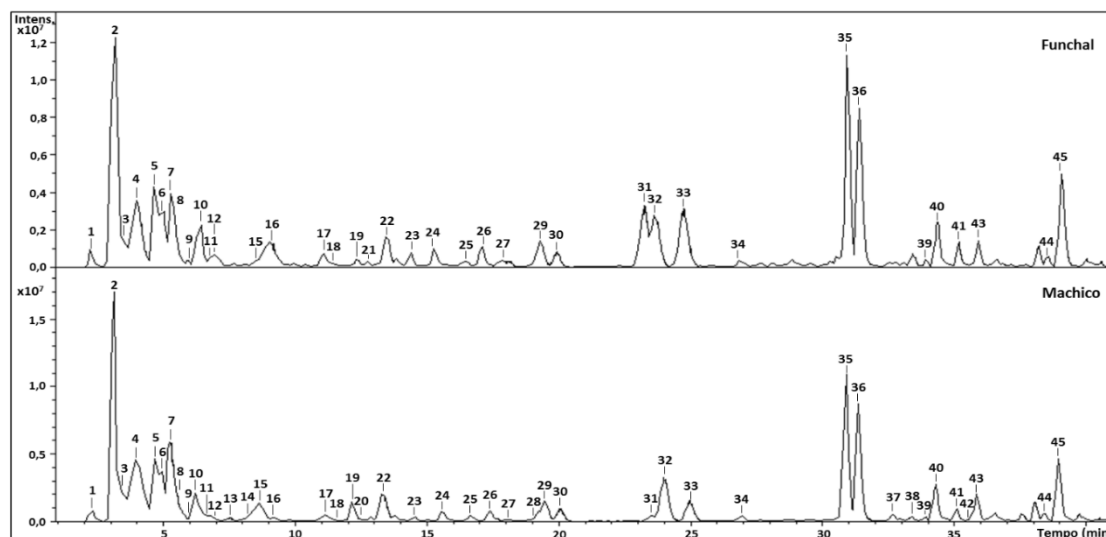


Figura 24 - Cromatogramas da análise do perfil fenólico, por HPLC-DAD-ESI⁺/MSⁿ, dos extractos metanólicos das bagas de *Rubus grandifolius* (colhidas no Funchal e em Machico, respectivamente).

No total foram detectados 45 compostos (Tabela 14). Nas bagas colhidas no Funchal foram identificados 33 compostos e nas bagas colhidas em Machico foram identificados 39 compostos.

Pela análise realizada verifica-se que, as bagas da espécie *R. grandifolius* são ricas em flavonóides, sendo as quercetinas e as luteolinas os compostos mais representativos. Estas bagas são pobres ácidos hidroxicinâmicos, sendo apenas identificados um derivado do ácido cafeico e dois isómeros do ácido cafeoilquínico, porém contendo sacarídeos e alguns derivados do ácido elágico (os elagitaninos) e de ácidos orgânicos.

Gouveia-Figueira e Castilho (2015) [25] analisaram extractos de diferentes partes morfológicas da mesma espécie e detectaram 17 compostos fenólicos nas bagas. Similarmente, a quercetina e canferol conjugados foram os componentes maioritários. Esta diferença pode ser resultante dos diferentes métodos de preparação e extracção das amostras.

De acordo com a revisão de Lee, Dossett e Finn (2012) [23], os ácidos fenólicos (livres ou conjugados), os flavonóis e os monómeros de flavanóis (catequina e epicatequina), constituem as três categorias de compostos fenólicos que têm sido reportados nas bagas das espécies de *Rubus*. Acrescentam que, estes compostos estão, tipicamente, em menor quantidade do que os elagitaninos ou as antocianinas. É importante referir que o nosso estudo não se encontra em completa concordância, com o reportado pelos autores, no seu artigo de revisão. Referem ainda que os frutos do género *Rubus* são ricos em elagitaninos (ou taninos hidrolisáveis) e pobres em proantocianidinas (ou taninos condensados), quando comparados com frutos de outros géneros, nomeadamente o género *Vaccinium*. Este dado já é corroborativo com os resultados obtidos neste estudo.

✓ **Ácidos hidroxicinâmicos**

Ácido cafeico

O ácido cafeico é caracterizado pelo seu ião molecular a m/z 179 e fragmentação MS^2 a m/z 135, como representado na Figura 25.

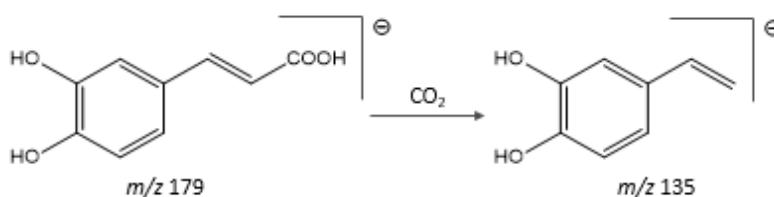


Figura 25 - Mecanismo de fragmentação do ácido cafeico. Adaptado de Liu *et al.* (2007) [119].

A fragmentação do composto **9**, que dispõe de ião molecular a m/z 341, dá origem ao pico base a m/z 179, correspondente à perda do hexósido, $[\text{M}-\text{H}-162]^-$. A fragmentação seguinte dá origem ao pico base a m/z 135. Este composto foi designado de ácido cafeico-*O*-hexósido [107].

Ácidos cafeoilquínicos

Os compostos **3** e **10**, presentes em ambas as amostras, apresentam $[\text{M}-\text{H}]^-$ a m/z 353 e representam ácidos cafeoilquínicos. O composto **3**, após a fragmentação MS^2 apresenta um pico base a m/z 173 e de acordo com Clifford, Knight e Kuhnert (2005) [120] trata-se do ácido 4-*O*-cafeoilquínico. Já o composto **10** apresenta o pico base, após fragmentação MS^2 , a m/z 191 e um pico pouco intenso a m/z 179, daí ser designado de ácido 1-*O*-cafeoilquínico [120,121].

✓ Flavonóides

Flavonóis

Quercetina

Nas bagas de *R. grandifolius* foram detectados 13 compostos derivados da quercetina. O composto **42**, presente apenas nas bagas de Machico, corresponde à quercetina aglicona, confirmada pelo seu $[\text{M}-\text{H}]^-$ a m/z 301 e pelos seus fragmentos característicos a m/z 179, 151, 107.

Os compostos **18**, **19** e **31** apresentam ião molecular a m/z 477 e foram designados como isómeros da quercetina-*O*-glucurónido [122], caracterizados pela perda de 176 Da, correspondente a um grupo glucoronil.

Os compostos **20**, **24** e **33**, exibem $[M-H]^-$ a m/z 433, originando um fragmento a m/z 301, a aglicona da quercetina, após a perda de 132 Da. Como tal, foram classificados como isómeros da quercetina-*O*-pentósido.

Os compostos **29** e **30** mostram o ião molecular a m/z 463 e a sua fragmentação MS^2 dá origem ao ião fragmento a m/z 301, $[M-H-162]^-$, são considerados isómeros da quercetina-*O*-hexósido.

O composto **23** apresenta o ião molecular a m/z 595 e a fragmentação MS^2 dá origem a dois picos bases importantes, um a m/z 463 $[M-H-132]^-$ e outro a m/z 301 $[M-H-162]^-$. Assim, o composto foi classificado como quercetina-*O*-(pentosil)hexósido.

O composto **32** dispõe de um $[M-H]^-$ a m/z 607, após a fragmentação MS^2 origina os fragmentos típicos da quercetina-*O*-hexósido, como referido anteriormente. A fragmentação MS^2 mostra dois fragmentos principais a m/z 505 $[M-H-102]^-$ e m/z 463 $[M-H-144]^-$. De acordo com a literatura [25], este composto foi identificado como metil-glutaroil da quercetina-*O*-hexósido. O composto **26**, que apresenta ião molecular a m/z 609, origina o fragmento a m/z 301, devido à perda de 308 Da. Este composto foi classificado como quercetina-*O*-rutinósido ou rutina [25]. Estes compostos já foram anteriormente identificados nesta espécie [25].

O composto **34**, presente apenas nas bagas colhidas no Funchal, apresenta um ião molecular a m/z 505. A fragmentação MS^2 origina a perda de um fragmento de 204 Da, pelo que dá origem ao pico base a m/z 301, conhecida como quercetina. De acordo com a literatura [122], o composto **34** foi identificado como quercetina-*O*-(acetil)hexósido.

Canferol

O composto **41** exhibe $[M-H]^-$ a m/z 593, perde um fragmento de 308 Da, dando origem ao ião com m/z 285. Tendo em conta a fragmentação apresentada, o composto foi identificado como canferol-*O*-rutinósido.

Isoramnetina

O composto **25** exibe $[M-H]^-$ a m/z 491 e foi classificado como isoramnetina-*O*-glucurónido [123].

Flavonas**Luteolina**

Os compostos **5** e **13** foram classificados como isómeros da luteolina-*O*-hexósido. Estes compostos apresentam ião molecular a m/z 447 e a fragmentação MS^2 dá origem ao pico base a m/z 285, cuja fragmentação é plausível com a aglicona da luteolina. Já os compostos **6** e **15** apresentam pico ião molecular a m/z 653 e 591, respectivamente, e deram origem ao fragmento a m/z 285, após a perda de diferentes resíduos, originando os compostos derivados da luteolina-*O*-hexósido. Já o composto **16** possui um ião molecular $[M-H]^-$ a m/z 609, perde um fragmento de 324 Da ($324 / 2 = 162$ Da), equivalente a duas hexoses, sendo designado de luteolina-*O*-dihexósido [121].

O composto **14** foi classificado como luteolina-*O*-(aceti)hexósido. Este composto apresenta o pico ião molecular a m/z 489 que deu origem ao pico base a m/z 285, após a perda de um fragmento de 204 Da.

O composto **12** dispõe de um ião molecular $[M-H]^-$ a m/z 417 e dá origem à luteolina, pela perda do fragmento de 132 Da. Assim, o composto foi identificado como luteolina-*O*-pentósido.

✓ **Taninos****Taninos hidrolisáveis**

Detectado apenas nas bagas de Machico, o composto **28**, que exibe ião molecular a m/z 301, foi classificado como ácido elágico dada a sua típica fragmentação relatada anteriormente [124].

O composto **11**, apresenta ião molecular a m/z 783, foi classificado como bis-HHDP-*O*-hexósido, tal como reportado anteriormente nas bagas de *E. umbellata*.*O*

composto **22** apresenta um $[M-H]^-$ a m/z 935 e origina os fragmentos a m/z 633, $[M-H\text{-galoil-HHDP-}O\text{-hexósido}]^-$ e a m/z 301 $[M-H\text{-ácido elágico}]^-$. Então o composto foi identificado como galoil-bis-HHDP-*O*-hexósido [115].

✓ **Outros compostos**

Nas bagas de *R. grandifolius* foram encontrados alguns compostos que não se adequavam às classes de compostos anteriormente referidas.

✓ **Sacarídeo**

O composto **2** foi caracterizado como polímero de hexoses, como reportado na amostra de *E. umbellata*.

Foram ainda detectados outros sacarídeos (**1** e **21**), tendo em conta o seu padrão de fragmentação.

✓ **Ácidos orgânicos**

Nas bagas de *R. grandifolius* identificou-se o ácido cítrico (composto **4**) e seus derivados (composto **7** e **8**), já descrito anteriormente.

✓ **Terpenos**

Os compostos **35** e **37** exibem o mesmo íão molecular desprotonado a m/z 711 e foram classificados como isómeros do ácido triterpénico-*O*-hexósido (aducto – formato).

Os compostos **36**, **40** e **45** apresentam o mesmo íão molecular, a m/z 679 e a fragmentação MS^2 origina um pico base a m/z 517 (perda de 162 Da). No espectro MS^2 é expelida uma molécula de água (-18 Da), formando um íão fragmento a m/z 499. O íão a m/z 499 foi posteriormente sujeito à fragmentação MS^3 e obteve-se sinal a m/z 481 (-18 Da), m/z 455 (-44 Da), correspondente à perda de H_2O e CO_2 , respectivamente. Este padrão de fragmentação foi descrito como ácido ganodérico C2, [125]. Assim, de acordo com a literatura [25] os compostos foram classificados como isómeros do ácido ganodérico C2-*O*-hexósido.

O composto **38** apresenta o ião molecular desprotonado a m/z 839, após a perda de 162 Da, dá origem ao pico base a m/z 677. A fragmentação MS^3 origina o ião m/z 503, classificado anteriormente como ácido triterpénico. Como não foi possível identificar o fragmento perdido, o composto **38** foi identificado como derivado do ácido triterpénico-*O*-hexósido.

✓ **Não identificados**

Os compostos, cuja fragmentação não permitiu a sua completa identificação, foram classificados como não identificados (**17, 27, 39, 43 e 44**).

Tabela 14 - Caracterização do perfil fenólico, por HPLC-DAD-ESI⁻/MSⁿ, dos extractos metanólicos das bagas de *Rubus grandifolius*, colhidas no Funchal e em Machico.

Nº	t _R (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	HPLC-DAD-ESI/MS ⁿ m/z (% pico base)	Identificação	Local de colheita (Bagas)
1	2,3	273	MS ² [273]: 161 (10,9), 160 (16,4), 159 (100), 131 (16,8), MS ³ [273→159]: 132 (18,3), 131 (100) MS ⁴ [273→159→131]: 105 (26,7), 103 (100)	Sacarídeo	Funchal Machico
2	3,2	683	MS ² [683]: 341 (100) MS ³ [683→341]: 179 (100), 161 (23,0), 143 (33,1), 119 (16,9), 113 (45,2)	Polímero de hexoses	Funchal Machico
3	3,8	353	MS ² [353]: 173 (100), 155 (11,5), 111 (21,5) MS ³ [353→173]: 155 (17,9), 111 (100)	Ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquinico	Funchal Machico
4	4,0	191	MS ² [191]: 173 (100), 111 (36,5) MS ³ [191→173]: 155 (21,2), 111 (100)	Ácido cítrico	Funchal Machico
5	4,7	447	MS ² [447]: 285 (100) MS ³ [447→285]: 257 (97,7), 243 (52,2), 241 (97,6), 217 (74,4), 213 (28,1), 197 (25,2), 175 (25,1), 163 (70,7), 125 (100)	Luteolina- <i>O</i> -hexósido	Funchal Machico
6	5,0	653	MS ² [653]: 447 (100), 205 (18,1) MS ³ [653→447]: 299 (14,6), 285 (100), 284 (45,0) MS ⁴ [653→447→285]: 257 (89,2), 243 (59,5), 231 (77,0), 217 (69,0), 215 (88,5), 213 (40,5), 185 (51,7), 163 (100), 148 (44,0)	Derivado da Luteolina- <i>O</i> -hexósido	Funchal Machico
7	5,3	173	MS ² [173]: 155 (24,5), 111 (100) MS ³ [173→111]: 88 (22,9), 80 (10,8), 78 (20,3), 75 (52,7), 74 (100), 67 (14,1)	Fragmento do ácido cítrico	Funchal Machico
8	5,7	369	MS ² [369]: 191 (11,8), 173 (100), 111 (23,2) MS ³ [369→173]: 155 (16,1), 111 (100)	Derivado do ácido cítrico	Funchal Machico
9	6,3	341	MS ² [341]: 203 (11,4), 179 (100), 161 (57,2), 135 (18,8) MS ³ [341→179]: 136 (14,1), 135 (100)	Ácido cafeico- <i>O</i> -hexósido	Funchal Machico
10	6,5	353	MS ² [353]: 191 (100), 179 (45,8), 135 (15,3) MS ³ [353→191]: 174 (19,6), 173 (92,5), 127 (100), 126 (11,7), 111 (37,5), 109 (22,3), 93 (35,8), 87 (32,3), 85 (50,0) MS ⁴ [353→191→127]: 109 (100)	Ácido 1- <i>O</i> -cafeoilquinico	Funchal Machico
11	6,7	783	MS ² [783]: 618 (10,3), 617 (45,1), 481 (15,0), 302 (14,2), 301 (100), 257 (24,9) MS ³ [783→301]: 284 (70,2), 257 (100)	bis-HHDP- hexósido	Funchal Machico

12	7,1	417	MS ² [417]: 286 (15,4), 285 (100) MS ³ [417→285]: 257 (100), 241 (37,4), 229 (15,3), 213 (19,8), 199 (28,8), 175 (15,0), 163 (820,4), 147 (19,8), 125 (15,6)	Luteolina- <i>O</i> -pentósido	Funchal Machico
13	7,6	447	MS ² [447]: 286 (16,1), 285 (100), 284 (32,4) MS ³ [447→285]: 257 (31,3), 243 (45,5), 242 (34,0), 241 (100), 240 (26,7), 229 (15,2), 217 (23,0), 199 (45,7), 199 (46,9), 175 (45,7), 174 (36,2), 151 (33,7), 125 (21,0)	Luteolina- <i>O</i> -hexósido	Machico
14	8,4	489	MS ² [489]: 285 (100), 284 (31,5) MS ³ [489→285]: 257 (100), 243 (46,4), 241 (48,8), 213 (21,0), 199 (29,8), 175 (21,8), 163 (29,2), 147 (22,1)	Luteolina- <i>O</i> -(acetil)hexósido	Machico
15	8,8	591	MS ² [591]: 489 (26,3), 448 (22,2), 447 (100), 285 (23,3) MS ³ [591→447]: 286 (14,1), 285 (100), 284 (53,8) MS ⁴ [591→447→285]: 257 (52,0), 256 (16,1), 244 (13,0), 241 (100), 240 (24,8), 239 (31,8), 229 (21,7), 213 (56,2), 207 (19,2), 189 (21,4), 176 (22,5), 175 (22,8), 167 (11,0), 155 (22,7)	Derivado da Luteolina- <i>O</i> -hexósido	Funchal Machico
16	8,9	609	MS ² [609]: 547 (15,1), 499 (12,1), 484 (11,2), 483 (20,8), 473 (15,6), 465 (24,3), 339 (10,1), 303 (12,8), 286 (23,3), 285 (100), 243 (19,0) MS ³ [609→285]: 267 (15,4), 242 (12,2), 243 (100), 217 (13,8), 213 (13,8), 199 (11,6), 197 (11,7), 149 (44,4)	Luteolina- <i>O</i> -dihexósido	Funchal Machico
17	11,1	565	MS ² [565]: 324 (11,8), 323 (100), 211 (15,2) MS ³ [565→323]: 280 (12,0), 262 (11,4), 211 (100), 152 (11,6), 139 (17,5), 124 (15,9)	Não identificado	Funchal Machico
18	11,2	477	MS ² [477]: 302 (22,8), 301 (100) MS ³ [477→301]: 257 (100), 245 (40,4), 230 (19,3)	Quercetina- <i>O</i> -glucurónido	Funchal Machico
19	12,4	477	MS ² [477]: 302 (22,8), 301 (100) MS ³ [477→301]: 257 (100), 245 (40,4), 230 (19,3)	Quercetina- <i>O</i> -glucurónido	Funchal Machico
20	12,5	433	MS ² [433]: 301 (100), 300 (62,7) MS ³ [433→301]: 257 (100)	Quercetina- <i>O</i> -pentósido	Machico
21	12,8	393	MS ² [393]: 358 (25,2), 348 (21,5), 347 (100), 289 (14,9), 179 (21,5) MS ³ [393→347]: 329 (71,6), 161 (100), 161 (56,7)	Sacarídeo	Funchal
22	13,5	934	MS ² [934]: 916 (12,3), 915 (15,2), 898 (19,8), 897 (31,2), 634 (25,2), 633 (100), 631	Galoil-bis-HHDP- <i>O</i> -hexósido	Funchal

			(27,0), 302 (13,5), 301 (80,2) MS ³ [934→633]: 469 (11,8), 315 (12,8), 302 (14,7), 301 (100) MS ⁴ [934→633→301]: 300 (17,5), 285 (29,8), 257 (56,1), 229 (100), 201 (50,9), 186 (53,5)			Machico
23	14,4	595	MS ² [595]: 464 (24,2), 463 (100), 434 (12,1), 433 (47,5), 301 (18,5) MS ³ [595→463]: 302 (10,6), 301 (100) MS ⁴ [595→463→301]: 179 (100), 151 (73,8)	Quercetina- <i>O</i> -(pentosil)hexósido		Funchal Machico
24	15,3	433	MS ² [433]: 302 (20,3), 301 (100), 300 (53,4) MS ³ [433→301]: 158 (10,7), 300 (74,7), 258 (12,1), 257 (100), 229 (49,4), 217 (17,3), 202 (17,5), 202 (16,0), 185 (17,8), 183 (11,7),	Quercetina- <i>O</i> -pentósido		Funchal Machico
25	16,6	491	MS ² [491]: 316 (20,5), 315 (100), 300 (25,6) MS ³ [491→315]: 301 (25,5), 300 (100)	Isoramnetina- <i>O</i> -glucurónido		Funchal Machico
26	17,0	609	MS ² [609]: 301 (100), 300 (50,8) MS ³ [609→301]: 194 (12,9), 180 (15,5), 179 (54,3), 151 (100)	Quercetina- <i>O</i> -rutinósido		Funchal Machico
27	17,8	509	MS ² [509]: 491 (100), 473 (30,0), 461 (42,3), 367 (64,3), 313 (22,7), 311 (36,1), 163 (28,8), 162 (14,3) MS ³ [509→367]: 339 (100), 314 (61,2), 313 (25,1), 149 (58,4) MS ³ [509→491]: 473 (100), 462 (25,7), 461 (87,1)	Não identificado		Funchal Machico
28	19,2	301	MS ² [301]: 257 (100), 229 (61,8), 217 (22,0), 185 (95,4), 146 (47,3), 119 (25,7) MS ³ [301→258]: 186 (100)	Ácido elágico		Machico
29	19,2	463	MS ² [463]: 302 (13,8), 301 (100), 300 (35,6) MS ³ [463→301]: 273 (12,3), 271 (32,7), 257 (11,7), 255 (19,3), 179 (82,4), 152 (14,9), 151 (100)	Quercetina- <i>O</i> -hexósido		Funchal Machico
30	20,0	463	MS ² [463]: 323 (100), 301 (89,6), 233 (87,7), 229 (95,4) MS ³ [463→301]: 257 (100)	Quercetina- <i>O</i> -hexósido		Funchal Machico
31	23,0	477	MS ² [477]: 302 (15,7), 301 (100) MS ³ [477→301]: 229 (12,3), 179 (74,2), 151 (100), 107 (19,4) MS ⁴ [477→301→151]: 107 (100)	Quercetina- <i>O</i> -glucurónido		Funchal Machico
32	23,6	607	MS ² [607]: 505 (15,6), 464 (17,8), 463 (100) MS ³ [607→463]: 302 (16,5), 301 (100), 300 (37,2) MS ⁴ [607→463→301]: 271 (39,0), 255 (17,8), 179 (90,5), 151 (100)	Metil-glutaroil da Quercetina- <i>O</i> -hexósido		Funchal Machico
33	24,4	433	MS ² [433]: 302 (22,3), 301 (100), 300 (90,7), MS ³ [433→301]: 272 (18,5), 271 (100), 257 (13,7), 255 (51,9), 179 (67,5), 151	Quercetina- <i>O</i> -pentósido		Funchal Machico

			(60,8)		
34	26,9	505	MS ² [505]: 464 (14,2), 463 (53,7), 302 (17,9), 301 (100), 300 (87,0) MS ³ [505→301]: 273 (19,4), 255 (37,2), 239 (100), 179 (79,1), 152 (17,5), 151 (100), 149 (11,3), 107 (12,7)	Quercetina- <i>O</i> -(acetil)hexósido	Funchal Machico
35	30,5	711	MS ² [711]: 665 (10,7), 504 (30,2), 503 (100) MS ³ [711→503]: 486 (29,9), 485 (100), 454 (10,7), 453 (32,7) MS ⁴ [711→503→485]: 441 (100), 421 (16,5), 403 (11,8), 385 (19,2)	Ácido triterpénico- <i>O</i> -hexósido (Aducto – Formato)	Funchal Machico
36	31,3	679	MS ² [679]: 518 (27,8), 517 (100), 499 (31,3), 455 (13,7) MS ³ [679→517]: 500 (22,5), 499 (100), 481 (13,9), 473 (19,6), 455 (42,2), 441 (31,6), 437 (42,1), 397 (13,4), 379 (17,1) MS ⁴ [679→517→499]: 481 (14,5), 456 (24,1), 455 (70,6), 453 (11,2), 442 (40,6), 441 (100), 437 (16,0), 425 (15,5), 409 (11,4), 397 (46,3), 393 (11,1), 381 (13,7), 379 (10,9)	Ácido ganodérico- <i>O</i> -hexósido	Funchal Machico
37	32,7	711	MS ² [711]: 665 (14,1), 503 (100) MS ³ [711→503]: 485 (100), 443 (10,8), 441 (11,6) MS ⁴ [711→503→485]: 441 (38,1), 405 (18,3), 403 (25,3), 393 (81,0), 387 (58,2), 385 (16,9), 363 (26,1)	Ácido triterpénico- <i>O</i> -hexósido	Machico
38	33,4	839	MS ² [839]: 677 (100), 503 (36,5) MS ³ [839→677]: 503 (100) MS ⁴ [839→677→503]: 485 (100), 453 (30,2), 441 (19,0), 428 (10,8), 409 (15,4), 403 (11,7)	Derivado do Ácido triterpénico- <i>O</i> -hexósido (Aducto – Formato)	Machico
39	34,0	709	MS ² [709]: 502 (24,7), 501 (100) MS ³ [709→501]: 472 (22,9), 471 (11,9), 457 (60,5), 455 (14,2), 439 (30,3), 422 (31,4), 421 (100), 420 (28,3), 419 (16,3), 404 (13,1), 403 (72,8), 401 (10,5), 387 (11,2), 386 (30,1), 361 (13,9)	Não identificado	Funchal Machico
40	35,2	679	MS ² [679]: 519 (11,5), 518 (24,7), 517 (100) MS ³ [679→517]: 500 (14,9), 499 (100), 473 (20,0), 455 (10,8) MS ⁴ [679→517→499]: 455 (52,1), 441 (27,1), 419 (35,3), 403 (100), 379 (36,0)	Ácido ganodérico- <i>O</i> -hexósido	Funchal Machico
41	35,9	593	MS ² [593]: 447 (11,4), 286 (14,2), 285 (100) MS ³ [593→285]: 257 (97,8), 256 (11,5), 255 (23,7), 241 (100), 240 (20,8), 229 (14,8), 213 (40,2), 164 (26,8), 163 (25,0), 154 (37,4), 152 (61,9), 151 (96,5)	Canferol- <i>O</i> -rutinósido	Funchal Machico
42	36,2	301	MS ² [301]: 273 (15,0), 235 (10,8), 179 (40,4), 151 (100)	Quercetina	Machico

			MS ³ [301→151]: 107 (100)		
43	37,3	695	MS ² [695]: 649 (10,4), 488 (30,4), 487 (100), 485 (12,4) MS ³ [695→487]: 467 (28,5), 425 (55,3), 423 (100), 406 (23,2), 391 (39,0) MS ³ [695→487]: 469 (100), 427 (33,7), 425 (40,7), 423 (17,0), 408 (16,3), 373 (16,5)	Não identificado	Funchal Machico
44	38,5	663	MS ² [663]: 503 (12,4), 502 (31,6), 501 (100), 484 (11,6), 483 (56,9), 439 (15,8) MS ³ [663→502]: 484 (16,4), 483 (100), 465 (10,2), 457 (22,8), 455 (30,9) MS ⁴ [663→502→483]: 465 (100), 455 (22,0), 438 (59,4), 437 (22,6), 391 (87,2), 367 (65,7)	Não identificado	Funchal Machico
45	38,9	679	MS ² [679]: 633 (10,7), 518 (16,2), 517 (62,4), 499 (22,2), 472 (29,6), 471 (100) MS ³ [679→517]: 500 (61,8), 499 (100), 473 (72,6), 455 (15,1), 380 (36,8) MS ⁴ [679→517→499]: 455 (89,8), 442 (81,9), 437 (20,5), 425 (13,0), 398 (75,8), 397 (26,5), 395 (50,2), 393 (85,1), 381 (100)	Ácido ganodérico- <i>O</i> -hexósido	Funchal Machico

3.1.2.2. Folhas

Tal como aconteceu nas bagas de *R. grandifolius*, as folhas da mesma espécie, foram sujeitas à mesma análise comparativa. O estudo do perfil fitoquímico desta parte morfológica foi compilado na Figura 26 e na Tabela 16.

Pela análise da Tabela 16, é possível verificar que o número de compostos detectados nas folhas superam o número detectado nas bagas. Sendo as folhas uma matriz muito mais complexa, no que toca a compostos fenólicos, quando comparadas com as bagas. Nas folhas foram detectados, no total, 98 compostos. Nas folhas colhidas no Funchal foram identificados 68 compostos e nas folhas colhidas em Machico foram identificados 76 compostos.

Contrariamente às bagas, as folhas são pobres em flavonóides, porém ricas em ácidos hidroxicinâmicos, nomeadamente ácidos cafeoilquínicos e derivados do ácido cafeico. Os triterpenóides (ácidos triterpénicos e ácidos ganodéricos), os sacarídeos e os elagitaninos são outras classes de compostos bem representativas nas folhas estudadas. Apesar da semelhança entre os cromatogramas, as folhas de Machico possuem derivados da catequina e alguns ácidos orgânicos (ácidos cítrico e málico), que as diferencia das folhas colhidas no Funchal.

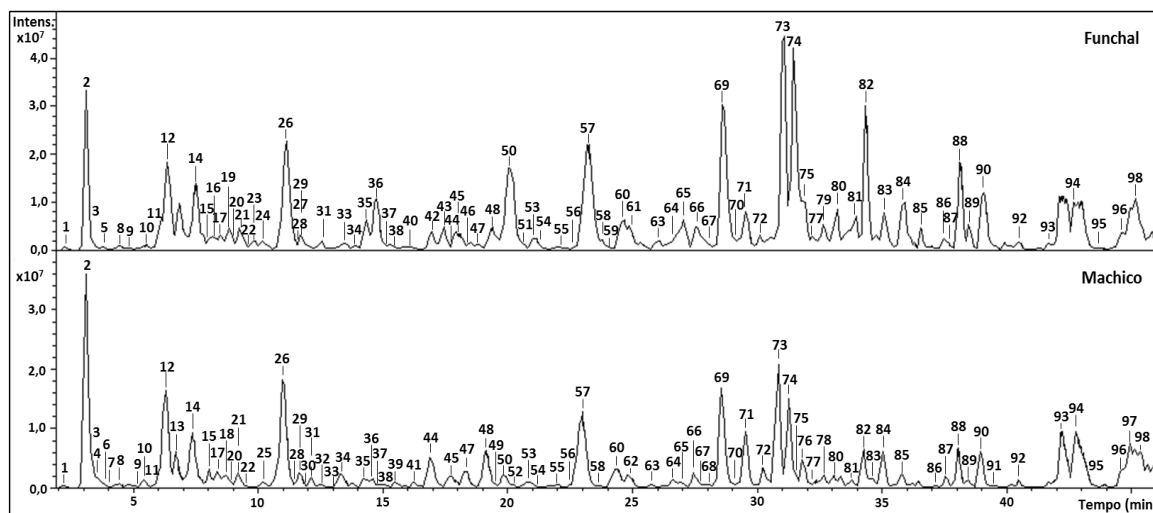


Figura 26 - Cromatogramas da análise do perfil fenólico, por HPLC-DAD-ESI⁺/MSⁿ, dos extractos metanólicos das folhas de *Rubus grandifolius* (colhidas no Funchal e em Machico, respectivamente).

Pela Figura 26, os picos maioritários referem-se ao polímero da hexose (**2**), ao ácido cafeoilquínico (**12**), ao ácido ferúlico-*O*-hexósido (**26**), à quercetina-*O*-glucurónido (**57**), ao ácido cafeico-*O*-dihexósido (**69**), ao ácido triterpénico-*O*-hexósido (**73**) e ao ácido ganodérico-*O*-hexósido (**74**).

✓ **Ácidos hidroxicinâmicos**

Ácido cafeico

Pela Tabela 16, é possível contabilizar 23 compostos derivados do ácido cafeico. Os compostos **5**, **11** e **14** apresentam ião molecular a m/z 341, após perda de 162 Da dão origem ao ácido cafeico. Deste modo, estes compostos foram designados de isómeros do ácido cafeico-*O*-hexósido. Já os compostos **36**, **66**, **71** e **75** foram classificados como derivados do ácido cafeico-*O*-hexósido. Apesar da diferença no ião molecular, todos os compostos possuem em comum os fragmentos a m/z 341 e 179.

Foram também identificados isómeros do ácido cafeico-*O*-dihexósido, os compostos **51**, **59** e **63**, apresentam $[M-H]^-$ a m/z 503. Em geral, no espectro de fragmentação MS^2 observa-se um pico base a m/z 179, $[M-H-324]^-$, e um outro pico importante a m/z 341 $[M-H-162]^-$, que sugerem a perda de dois resíduos de hexose. O composto **63**, apresenta ainda, na fragmentação MS^2 um pico base a m/z 323, provavelmente devido à esterificação de apenas uma hexose com o cafeoil [25].

Nas folhas foram também identificados vários derivados do ácido cafeico, cuja identificação não foi concluída. Estes compostos (**8**, **15**, **28**, **32**, **35**, **43**, **46**, **48**, **53**, **77** e **81**) apresentam diferentes padrões de fragmentação, porém exibem o ião fragmento a m/z 179 [ácido cafeico-H] $^-$.

O composto **20** apresenta $[M-H]^-$ a m/z 457 e sofre perda de um fragmento neutro de 116 Da, correspondente ao ácido málico, originando o ião fragmento a m/z 341. Este composto foi classificado como ácido cafeico-*O*-(maloil)hexósido [126].

Ácido ferúlico

O composto **26**, mostra $[M-H]^-$ a m/z 355, após fragmentação dá origem ao pico base a m/z 162. Assim, este composto perde um fragmento de 193 Da, pelo que o composto foi classificado como ácido ferúlico-*O*-hexósido. O composto **27**, com $[M-H]^-$ a m/z 637 foi identificado como derivado do composto **26** (derivado do ácido ferúlico-*O*-hexósido) tendo em conta a sua fragmentação.

Ácido cumárico

O ácido cumárico (composto **91**) é caracterizado pelo seu ião molecular a m/z 163 e a fragmentação MS^2 dá origem ao pico base a m/z 119 [127].

Ácidos cafeoilquínicos

Mono-cafeoilquínicos

O composto **12** e **17** apresentam iões moleculares a m/z 353 cuja fragmentação MS^2 dá origem ao pico base a m/z 191. De acordo com a literatura [120], existem várias possibilidades de classificação dos ácidos cafeoilquínicos, porém com o padrão de fragmentação apresentado é possível confirmar a presença do ácido 3-*O*-cafeoilquínico. Já os compostos **9** e **19** exibem o ião molecular a m/z 707 e são designados por dímeros dos ácidos cafeoilquínicos. Confirmou-se esta designação pela presença do fragmento a m/z 353.

Outros derivados do ácido cafeoilquínico, os compostos **16** e **18**, apresentam $[M-H]^-$ a m/z 537 e dão origem aos fragmentos a m/z 353, não sendo possível concluir a sua caracterização.

Di-cafeoilquínicos

Os ácidos di-cafeoilquínicos foram diferenciados pela comparação com a literatura [120]. O ião molecular a m/z 515 é característico dos ácidos di-cafeoilquínicos, que após fragmentação são distinguidos pelo padrão de fragmentação apresentado. Deste modo, os compostos **61** e **64** foram classificados como ácido 4,5-*O*-di-cafeoilquínico e ácido 3,5-*O*-di-cafeoilquínico, respectivamente.

✓ Ácidos hidroxibenzóicos

O composto **67** mostra um $[M-H]^-$ a m/z 477, a fragmentação MS^2 origina o fragmento a m/z 315. A fragmentação seguinte dá origem ao pico base a m/z 153, que é característico do ácido protocatecuico [104]. Ambas as fragmentações originaram a perda de fragmentos de 162 Da, pelo que, o composto é classificado como ácido protocatecuico-*O*-di-hexósido.

✓ Flavonóides

Flavonóis

Quercetinas

O composto **50** exhibe $[M-H]^-$ a m/z 463 e foi identificado como quercetina-*O*-hexósido confirmado pela perda de 162 Da [25]. O composto **37**, apresenta $[M-H]^-$ a m/z 595 e origina o pico base a m/z 301, após a perda do fragmento de 294 Da, sendo identificado como quercetina-*O*-(pentosil)hexósido.

O composto **44** mostra um $[M-H]^-$ a m/z 609 e foi caracterizado como quercetina-*O*-rutinósido [25].

A quercetina-*O*-glucurónido (composto **57**) apresenta um ião molecular a m/z 477, cuja fragmentação dá origem aos fragmentos característicos da quercetina [25].

Canferol

Os compostos **52**, **58** e **85**, apresentam iões moleculares a m/z 593 e foram identificados como canferol-*O*-rutinósido. Outros compostos derivados do canferol foram identificados, nomeadamente o canferol-*O*-glucurónido (composto **56**), dada a perda do resíduo a m/z 176.

No composto **65**, o ião molecular é apresentado a m/z 447 e fragmento principal a m/z 285, pelo que, o composto foi classificado como canferol-*O*-hexósido. Por outro lado, o composto **70** perde um fragmento de 132 Da, sendo assim classificado como canferol-*O*-pentósido.

Flavonas

Apigenina

Nas folhas de *Rubus* foi encontrada a apigenina-*O*-glucurónido (composto **72**), que mostra $[M-H]^-$ a m/z 445. A fragmentação MS^2 dá origem à perda de um fragmento de 176 Da, resultando no pico base a m/z 269, que corresponde à apigenina [12].

Flavona

O composto **54** apresenta o íão molecular a m/z 523 e após fragmentação apresenta o pico a m/z 475 (perda de 48 Da). A fragmentação MS^3 dá origem ao fragmento de 146 Da (provavelmente um grupo cumaroil) e ao pico base a m/z 328. Após estas fragmentações origina a perda sucessiva de três fragmentos de 15 Da, grupos *metil*, a m/z 329, m/z 314, m/z 298. Tendo em conta a fragmentação apresentada, o composto foi classificado como derivado da dihidroxi-trimetoxi-cumaroil-flavona [94].

Flavanóis

Os monómeros de catequina são caracterizados por apresentarem $[M-H]^-$ a m/z 289 e originar os seus fragmentos característicos a m/z 245, 203 e 187 [104]. Os compostos **29**, **30**, **31** e **49**, presentes apenas nas amostras de Machico, são considerados derivados da catequina.

O composto **21** apresenta $[M-H]^-$ a m/z 577 e foi identificado como proantocianidina do tipo B ((epi)-catequina-(epi)-catequina) (Figura 27)[107].

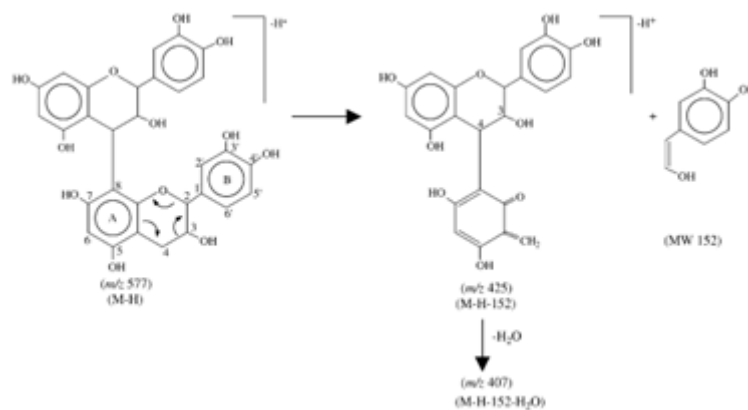


Figura 27 - Fragmentação das proantocianidinas do tipo B. Adaptado de Soong et al. (2005) [128].

✓ Taninos

Taninos hidrolisáveis

Os compostos **10** e **13** apresentam um $[M-H]^-$ a m/z 783 e foram identificados como bis-HHDP-*O*-hexósido. Já o composto **34**, que exibe $[M-H]^-$ a m/z 935, foi classificado como galoil-bis-HHDP-*O*-hexósido [107]. As fragmentações MS² deste composto originam o pico base a m/z 633, pela perda de um fragmento de 302 Da (perda de HHDP) e a m/z 301, pela perda de 332 Da.

O composto **33** exibe $[M-H]^-$ a m/z 493 e após a fragmentação MS² dá origem ao pico ião molecular a m/z 331 (perda de 162 Da). Desta forma, foi designado de mono(galoil)-*O*-dihexósido [128]. De acordo com a literatura [129], o composto **24**, $[M-H]^-$ a m/z 635 e foi classificado como tri(galoil)-*O*-hexósido.

O composto **38** e **60** apresentam ião molecular a m/z 433 e a sua fragmentação MS² dá origem ao ácido elágico. Portanto o composto foi designado de ácido elágico-*O*-pentósido [25]. O composto **41** foi classificado como derivado do ácido elágico, já que apresenta os fragmentos característicos deste composto.

✓ Triterpenóides

Os compostos **94** e **96**, exibem o mesmo $[M-H]^-$ a m/z 503, dando origem a um pico base, após fragmentação, a m/z 485 (-18 Da). Assim, o padrão de fragmentação destes compostos é corroborativo ao padrão do ácido triterpénico [25].

Os compostos **55**, **68**, **73**, **78**, **83**, **87** e **88** exibem o mesmo íão molecular a m/z 711 e foram classificados como isómeros do ácido triterpénico-*O*-hexósido (aducto – formato).

Os compostos **74** e **84**, mostram o $[M-H]^-$ a m/z 679 e o espectro de fragmentação MS^2 apresenta um pico base a m/z 517, originado pela perda de um fragmento de 162 Da. No espectro MS^2 , uma molécula de água foi expelida (-18 Da) formando um íão fragmento de m/z 499. O íão a m/z 499 foi posteriormente sujeito a análise MS^3 e obteve sinal a m/z 481 (-18 Da), m/z 455 (-44 Da). Este padrão de fragmentação foi descrito como ácido ganodérico C2 (compostos **93**, **95** e **97**) [125]. Assim, os compostos **74** e **84** foram classificados como ácido ganodérico C2-*O*-hexósido, dado o seu pico íão molecular a m/z 679 [25]. Por outro lado o composto **90**, apesar da diferente fragmentação, acredita-se tratar-se do mesmo composto, ácido ganodérico C2-*O*-hexósido.

O composto **98**, apresenta o pico íão molecular a m/z 501, após a perda de 18 Da (- H₂O) dá origem ao pico base a m/z 483. Este composto foi caracterizado como ácido ganolucídico B [125]. O composto **89** mostra $[M-H]^-$ a m/z 663, pela perda de 162 Da (resíduo de hexósido) dá origem ao íão fragmento m/z 501. Assim, o composto foi classificado como ácido ganolucídico B-*O*-hexósido.

O composto **92** exhibe $[M-H]^-$ a m/z 533 e foi identificado como ácido 12-hidroxi-ganodérico C2, por comparação com a literatura [125].

✓ Outros compostos

Adicionalmente, foram identificados nas folhas de *R. grandifolius* outros compostos não-fenólicos, como ácidos orgânicos e sacarídeos.

Sacarídeos

Verifica-se a presença do composto **2**, polímero da hexose, que foi também identificados nas bagas de *R. grandifolius*. Foram ainda, identificados outros sacarídeos (**1**, **3**, **23** e **40**), dada a presença de hexoses e/ou pentoses e pelo padrão de

fragmentos anteriormente referidos, porém não foi possível concluir a caracterização dos mesmos.

Ácidos orgânicos e terpenóides

O derivado do ácido quínico (composto **4**), o ácido cítrico (composto **6**) e málico (composto **7**) foram já caracterizados anteriormente. Estes compostos foram apenas encontrados nas amostras colhidas em Machico. O mesmo sucede com o composto **22**, identificado como roseosídeo.

✓ Não identificados

Outros compostos (**25, 39, 42, 45, 47, 62, 76, 79, 80, 82 e 86**) foram classificados como não identificados, visto não ser possível a sua caracterização.

Tabela 15 - Caracterização do perfil fenólico, por HPLC-DAD-ESI⁻/MSⁿ, dos extractos metanólicos das folhas de *Rubus grandifolius*, colhidas no Funchal e em Machico.

Nº	t _R (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	HPLC-DAD-ESI/MS ⁿ m/z (% pico base)	Identificação	Local de colheita (Folhas)
1	2,4	273	MS ² [273]: 159 (100), 131 (16,3) MS ³ [273→159]: 132 (17,5), 131 (100)	Sacarídeo	Funchal Machico
2	3,2	683	MS ² [683]: 341 (100) MS ³ [683→341]: 179 (100), 161 (23,0), 143 (33,1), 119 (16,9), 113 (45,2)	Polímero da hexose	Funchal Machico
3	3,4	515	MS ² [515]: 341 (100) MS ³ [515→341]: 179 (100), 161 (33,9), 149 (15,2), 143 (46,9), 131 (25,1), 113 (28,5), 98 (19,4)	Sacarídeo	Funchal Machico
4	3,5	533	MS ² [533]: 191 (100) MS ³ [533→191]: 173 (100), 153 (18,0), 127 (91,3), 109 (36,1), 93 (55,0), 85 (99,5)	Derivado do ácido quínico	Machico
5	3,6	341	MS ² [341]: 179 (100), 161 (34,0), 149 (23,7), 143 (33,5), 131 (13,1), 119 (22,6), 113 (46,3), 101 (40,0) MS ³ [341→179]: 161 (70,2), 143 (100), 135 (42,8), 131 (34,5), 125 (17,6), 119 (50,8), 113 (11,7), 101 (18,9), 89 (55,6), 87 (21,0), 71 (32,8), 59 (10,5)	Ácido cafeico-O-hexósido	Funchal
6	3,7	191	MS ² [191]: 173 (100), 111 (38,3) MS ³ [191→173]: 111 (100)	Ácido cítrico	Machico
7	4,0	133	MS ² [133]: 115 (100) MS ³ [133→115]: 71 (100)	Ácido málico	Machico
8	4,5	371	MS ² [371]: 353 (82,6), 197 (49,2), 191 (47,7), 179 (12,8), 173 (48,5), 153 (22,8), 135 (100) MS ³ [371→197]: 179 (77,7), 153 (100), 135 (88,1)	Derivado do ácido cafeico	Funchal Machico
9	5,6	707	MS ² [707]: 615 (27,4), 533 (48,1), 353 (100), 339 (37,7), 315 (38,3), 271 (62,7), 243 (11,2) MS ³ [707→353]: 191 (100), 179 (30,3)	Dímero do ácido cafeoilquínico	Machico
10	5,7	783	MS ² [783]: 617 (14,7), 481 (43,0), 301 (100), 275 (11,0)	bis-HHDP-O-hexósido	Funchal

			MS ³ [783→301]: 257 (100), 257 (47,0), 185 (86,0)		Machico
11	6,2	341	MS ² [341]: 251 (20,5), 233 (27,2), 203 (19,0), 179 (100), 161 (27,3), 135 (19,6) MS ³ [341→179]: 135 (100)	Ácido cafeico- <i>O</i> -hexósido	Funchal Machico
12	6,5	353	MS ² [353]: 191 (100), 179 (43,5), 135 (17,2) MS ³ [353→191]: 173 (48,4), 127 (100), 109 (16,5), 93 (68,1), 85 (70,8)	Ácido 3-cafeoilquínico	Funchal Machico
13	6,7	783	MS ² [783]: 617 (18,6), 481 (18,4), 301 (100), 275 (23,1) MS ³ [783→301]: 273 (11,4), 257 (35,4), 245 (32,3), 229 (39,9), 201 (24,3), 185 (59,7), 163 (38,8)	bis-HHDP- <i>O</i> -hexósido	Machico
14	7,4	341	MS ² [341]: 281 (93,1), 251 (100), 221 (31,9), 179 (76,6) MS ³ [341→251]: 179 (100) MS ⁴ [341→251→179]: 135 (100)	Ácido cafeico- <i>O</i> -hexósido	Funchal Machico
15	8,2	297	MS ² [297]: 179 (100), 135 (15,9) MS ³ [297→179]: 135 (100)	Derivado do ácido cafeico	Funchal Machico
16	8,6	537	MS ² [537]: 354 (16,9), 353 (100), 191 (15,7), 183 (10,3) MS ³ [537→353]: 191 (100) MS ⁴ [537→353→191]: 173 (16,1), 171 (79,5), 127 (100), 85 (16,6), 83 (13,7)	Derivado do Ácido cafeoilquínico	Funchal
17	8,7	353	MS ² [353]: 191 (100), 173 (17,2) MS ³ [353→173]: 93 (100) MS ³ [353→191]: 173 (94,5), 127 (100), 111 (36,9), 93 (299), 85 (69,9)	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	Funchal Machico
18	8,7	537	MS ² [537]: 353 (100), 191 (12,3), 183 (11,0) MS ³ [537→353]: 191 (100) MS ⁴ [537→353→191]: 173 (58,0), 127 (100), 111 (51,5), 93 (53,9), 85 (45,5)	Derivado do Ácido cafeoilquínico	Funchal Machico
19	9,0	707	MS ² [707]: 354 (11,3), 353 (100) MS ³ [707→353]: 191 (31,7), 179 (62,2), 173 (100), 135 (38,4) MS ⁴ [707→353→173]: 155 (27,9), 129 (46,1), 127 (17,0), 111 (97,6), 93 (100), 67 (92,1)	Dímero do Ácido cafeoilquínico	Funchal
20	9,2	457	MS ² [457]: 439 (37,2), 341 (100), 281 (34,1), 275 (1,2), 251 (17,3), 179 (16,8) MS ³ [457→341]: 281 (80,1), 251 (100), 221 (20,9), 179 (20,9) MS ⁴ [457→341→251]: 179 (100), 135 (35,0)	Ácido cafeico- <i>O</i> -(maloil)hexósido	Funchal Machico
21	9,5	577	MS ² [577]: 519 (11,4), 451 (32,6), 425 (100), 407 (96,4), 289 (20,0) MS ³ [577→425]: 407 (100), 339 (18,8), 285 (25,4) MS ⁴ [577→425→407]: 285 (100), 251 (10,9), 228 (19,2)	Proantocianidina tipo B	Machico

22	9,5	431	MS ² [431]: 385 (100), 223 (12,2) MS ³ [431→385]: 223 (33,1), 205 (40,5), 161 (13,3), 153 (100)	Roseosídeo (Aducto – Formato)	Funchal Machico
23	10,0	565	MS ² [565]: 520 (19,7), 519 (100), 388 (10,8), 387 (44,7) MS ³ [565→519]: 388 (18,3), 387 (100) MS ⁴ [565→519→387]: 225 (10,8), 161 (100), 159 (25,0), 113 (25,0)	Sacarídeo	Funchal
24	10,3	635	MS ² [635]: 466 (24,3), 465 (100) MS ³ [635→465]: 314 (11,6), 313 (100), 241 (12,5), 235 (10,2), 211 (12,8), 169 (63,3) MS ⁴ [635→465→313]: 252 (39,3), 211 (48,6), 205 (22,6), 193 (46,6), 169 (100), 125 (35,6)	Trigaloil- <i>O</i> -hexósido	Funchal
25	10,4	373	MS ² [373]: 337 (100), 319 (23,0), 293 (10,4), 277 (27,9) MS ³ [373→337]: 293 (100), 277 (90,4), 237 (82,9), 219 (62,8), 177 (38,0), 165 (17,1)	Não identificado	Machico
26	11,0	355	MS ² [355]: 162 (100) MS ³ [355→162]: 133 (100), 117 (10,9)	Ácido ferúlico- <i>O</i> -hexósido	Funchal Machico
27	11,3	637	MS ² [637]: 356 (10,0), 355 (100), 281 (18,3) MS ³ [637→355]: 162 (100), 133 (14,4) MS ⁴ [637→355→162]: 133 (100), 101 (26,8)	Derivado do Ácido ferúlico- <i>O</i> -hexósido	Funchal
28	11,6	537	MS ² [537]: 519 (100), 343 (11,1), 281 (14,5), 179 (100) MS ³ [537→519]: 357 (12,9), 343 (67,4), 341 (76,0), 325 (51,4), 295 (77,4), 281 (49,7), 179 (100) MS ⁴ [537→519→179]: 135 (100)	Derivado do ácido cafeico	Funchal Machico
29	11,7	401	MS ² [401]: 301 (20,3), 289 (100), 215 (10,6) MS ³ [401→289]: 245 (100), 205 (52,2), 203 (13,2), 179 (16,6) MS ⁴ [401→289→245]: 227 (15,7), 203 (100), 161 (43,6), 123 (11,0), 109 (10,6)	Derivado da Catequina	Machico
30	12,0	513	MS ² [513]: 433 (20,2), 401 (100), 301 (14,1), 291 (10,3), 257 (8,8), 215 (15,0) MS ³ [513→401]: 301 (52,6), 289 (100), 215 (16,9), 195 (20,5) MS ⁴ [513→401→289]: 245 (100), 188 (15,6), 175 (26,0), 151 (18,6)	Derivado da Catequina	Machico
31	12,3	557	MS ² [557]: 513 (19,6), 445 (100), 255 (21,5), 211 (14,5) MS ³ [557→445]: 383 (28,1), 301 (47,0), 289 (100), 257 (35,2), 247 (22,9), 215 (47,8), 205 (20,4), 196 (12,1) MS ⁴ [557→445→289]: 245 (100), 205 (71,4)	Derivado da Catequina	Machico
32	12,5	537	MS ² [537]: 519 (100)	Derivado do ácido cafeico	Machico

			MS ³ [537→519]: 281 (69,6), 265 (22,3), 217 (22,1), 179 (100) MS ⁴ [537→519→179]: 135 (100)		
33	13,1	493	MS ² [493]: 449 (22,0), 331 (100), 315 (14,5), 299 (26,7), 287 (32,1), 271 (37,4), 193 (20,7), 169 (31,3) MS ³ [493→331]: 170 (11,1), 169 (100), 125 (17,3) MS ⁴ [493→331→169]: 125 (100)	Mono-galoil- <i>O</i> -dihexósido	Funchal Machico
34	13,3	935	MS ² [935]: 915 (17,8), 897 (32,1), 633 (100), 301 (81,9) MS ³ [935→633]: 469 (14,0), 301 (100) MS ⁴ [935→633→301]: 271 (12,8), 257 (100), 246 (42,0), 229 (46,6), 185 (52,3), 145 (53,9)	Galoil-bis-HHDP- <i>O</i> -hexósido	Funchal Machico
35	14,4	537	MS ² [537]: 519 (44,5), 490 (26,1), 489 (100), 323 (24,3) MS ³ [537→489]: 324 (12,3), 323 (100), 221 (26,7), 179 (26,6), 177 (17,8), 175 (12,7), 161 (53,0) MS ⁴ [537→489→323]: 263 (16,1), 243 (16,5), 233 (17,0), 221 (51,0), 203 (12,0), 179 (100), 161 (31,0), 135 (33,1)	Derivado do ácido cafeico	Funchal Machico
36	14,9	493	MS ² [493]: 433 (20,1), 425 (10,6), 341 (57,1), 232 (26,3), 281 (62,9), 251 (81,3), 221 (45,7), 179 (100) MS ³ [493→179]: 135 (100)	Derivado do Ácido cafeico- <i>O</i> -hexósido	Funchal Machico
37	15,1	595	MS ² [595]: 463 (15,5), 301 (27,9), 300 (100), 271 (18,3), 199 (14,5) MS ³ [595→301]: 271 (45,5), 179 (50,2), 151 (100)	Quercetina- <i>O</i> -(pentosil)hexósido	Funchal Machico
38	15,5	433	MS ² [433]: 301 (100), 300 (50,9) MS ³ [433→301]: 257 (45,9), 215 (34,3), 185 (100)	Ácido elágico- <i>O</i> -pentósido	Funchal Machico
39	15,7	739	MS ² [739]: 629 (17,1), 587 (100), 569 (21,2), 449 (15,4), 435 (40,8), 417 (16,2), 339 (22,0), 289 (14,5) MS ³ [739→587]: 570 (22,6), 569 (54,8), 477 (32,4), 459 (30,9), 435 (93,1), 417 (100), 339 (43,4), 325 (35,1), 299 (21,0), 177 (23,0) MS ⁴ [739→587→339]: 337 (100), 177 (87,6)	Não identificado	Machico
40	15,9	457	MS ² [457]: 296 (13,2), 295 (100) MS ³ [457→295]: 180 (18,7), 179 (37,0), 149 (24,7), 133 (39,4), 125 (37,7), 119 (100), 113 (57,4), 101 (78,2), 89 (495), 85 (56,5)	Sacarídeo	Funchal
41	16,4	513	MS ² [513]: 427 (100), 361 (49,5), 301 (52,4), 300 (19,1), 289 (80,4), 257 (29,7) MS ³ [513→301]: 257 (21,1), 215 (100)	Derivado do ácido elágico	Machico

42	16,9	549	MS ² [549]: 504 (29,8), 503 (100), 311 (28,7), 221 (15,1), 191 (22,3) MS ³ [549→503]: 459 (26,5), 312 (20,6), 311 (53,2), 293 (28,4), 281 (18,0), 275 (30,0), 262 (10,1), 251 (13,3), 239 (36,2), 221 (100), 191 (35,3), 161 (10,4), 149 (40,8), 143 (18,0)	Não identificado	Funchal
43	17,5	645	MS ² [645]: 476 (21,2), 475 (100), 301 (23,9) MS ³ [645→475]: 324 (14,4), 323 (97,1), 313 (100), 169 (29,7), 161 (22,7) MS ⁴ [645→475→323]: 179 (12,8), 161 (100), 135 (22,7)	Derivado do ácido cafeico	Funchal
44	17,1	609	MS ² [609]: 301 (100), 300 (52,8), 271 (14,3) MS ³ [609→301]: 299 (71,4), 271 (13,1), 255 (100), 179 (50,3), 151 (94,9)	Quercetina- <i>O</i> -rutinósido (Rutina)	Funchal Machico
45	17,9	509	MS ² [509]: 491 (86,2), 473 (46,8), 461 (41,3), 367 (100), 179 (42,7), 163 (28,8) MS ³ [509→367]: 339 (22,8), 313 (100), 223 (15,9), 193 (16,1), 167 (16,3), 121 (16,8)	Não identificado	Funchal Machico
46	18,3	477	MS ² [477]: 323 (100), 221 (22,4), 179 (25,6), 177 (15,0), 161 (14,0) MS ³ [477→323]: 275 (12,5), 263 (39,2), 221 (41,2), 203 (37,5), 179 (100), 179 (18,8), 177 (73,2), 161 (49,3), 135 (50,2) MS ⁴ [477→323→179]: 162 (10,6), 135 (100), 107 (39,1)	Derivado do ácido cafeico	Funchal
47	18,5	451	MS ² [451]: 341 (100) MS ³ [451→341]: 323 (11,7), 231 (25,0), 219 (29,2), 217 (100), 189 (17,5), 177 (19,3) MS ⁴ [451→341→217]: 191 (88,7), 189 (100), 153 (10,1)	Não identificado	Funchal Machico
48	18,7	463	MS ² [463]: 337 (11,4), 324 (13,9), 323 (98,1), 221 (19,4), 179 (32,9), 177 (20,4), 161 (100), 135 (12,5), 133 (10,8) MS ³ [463→323]: 263 (100), 245 (17,3), 221 (46,1), 203 (45,4), 201 (31,1), 189 (77,8), 179 (97,8), 177 (34,1), 162 (27,8), 161 (89,9), 135 (35,6) MS ⁴ [463→323→179]: 135 (100)	Derivado do ácido cafeico	Funchal Machico
49	19,8	483	MS ² [483]: 451 (17,1), 341 (23,6), 289 (100) MS ³ [483→289]: 245 (100), 205 (20,1), 203 (56,8), 187 (22,5), 179 (10,6), 161 (13,6), 137 (28,4), 123 (19,7)	Derivado da Catequina	Machico
50	20,1	463	MS ² [463]: 301 (100) MS ³ [463→301]: 271 (12,2), 179 (83,8), 151 (100)	Quercetina- <i>O</i> -hexósido	Funchal Machico
51	20,4	503	MS ² [503]: 471 (13,4), 341 (13,9), 329 (29,7), 323 (21,4), 179 (100), MS ³ [503→179]: 135 (100)	Ácido cafeico- <i>O</i> -dihexósido	Funchal
52	20,9	593	MS ² [593]: 285 (100), 255 (18,1)	Canferol- <i>O</i> -rutinósido	Machico

			MS ³ [593→285]: 257 (100), 241 (40,5), 229 (53,4), 227 (22,9), 199 (22,8), 195 (35,6), 185 (17,0)		
53	21,0	491	MS ² [491]: 323 (100), 179 (12,6) MS ³ [491→323]: 263 (30,2), 251 (22,2), 221 (84,5), 203 (43,1), 179 (100), 135 (94,9) MS ⁴ [491→323→179]: 135 (100)	Derivado do ácido cafeico	Funchal Machico
54	21,2	523	MS ² [523]: 476 (28,0), 475 (100) MS ³ [523→475]: 460 (14,3), 443 (24,2), 415 (14,5), 399 (10,1), 387 (11,2), 341 (34,0), 330 (26,9), 329 (100), 327 (25,2), 326 (19,0), 315 (43,3), 314 (25,1), 297 (10,7), 283 (38,7), 272 (15,6), 195 (18,9), 150 (65,4) MS ⁴ [523→475→329]: 315 (16,3), 314 (100), 298 (10,0), 296 (10,7), 282 (10,4), 164 (15,4), 149 (26,5), 147 (15,0), 132 (35,6)	Derivado da dihidroxi-trimetoxi- <i>O</i> -cumaroil- <i>O</i> -flavona	Funchal Machico
55	22,1	711	MS ² [711]: 665 (11,9), 503 (100) MS ³ [711→503]: 439 (100), 427 (70,9), 409 (44,2), 368 (20,4) MS ⁴ [711→503→439]: 421 (31,1), 411 (47,2), 409 (100), 393 (25,0), 384 (75,0)	Ácido triterpénico- <i>O</i> -hexósido (Aducto – Formato)	Funchal Machico
56	22,9	461	MS ² [461]: 285 (100) MS ³ [461→285]: 267 (46,0), 255 (43,2), 217 (67,8), 213 (23,4), 199 (18,5), 175 (100), 129 (78,3) MS ⁴ [461→285→255]: 213 (100)	Canferol- <i>O</i> -glucurónido	Funchal Machico
57	23,1	477	MS ² [477]: 301 (100) MS ³ [477→301]: 273 (10,2), 179 (91,1), 151 (100)	Quercetina- <i>O</i> -glucurónido	Funchal Machico
58	24,0	593	MS ² [593]: 286 (13,4), 285 (100) MS ³ [593→285]: 284 (12,4), 268 (10,0), 267 (35,6), 258 (15,3), 257 (100), 255 (12,9), 241 (35,1), 229 (75,6), 224 (13,6), 223 (32,8), 213 (36,9), 197 (44,1), 195 (25,3), 167 (32,1), 163 (34,4), 151 (17,5) MS ⁴ [593→285→257]: 239 (100), 229 (37,9), 212 (26,5), 189 (50,2), 163 (83,4)	Canferol- <i>O</i> -rutinósido	Funchal Machico
59	24,1	503	MS ² [503]: 459 (28,0), 433 (14,5), 323 (100), 251 (10,5), 180 (11,9), 179 (52,2), 177 (10,6), 161 (15,1) MS ³ [503→179]: 135 (100)	Ácido cafeico- <i>O</i> -dihexósido	Funchal
60	24,6	433	MS ² [433]: 301 (100), 300 (96,8) MS ³ [433→301]: 271 (100), 255 (78,2), 254 (11,3), 179 (75,6), 151 (87,9)	Ácido elágico- <i>O</i> -pentósido	Funchal Machico
61	24,8	515	MS ² [515]: 354 (11,5), 353 (100), 335 (13,7), 191 (11,1), 179 (22,0), 173 (40,1) MS ³ [515→353]: 191 (39,9), 179 (62,6), 173 (100), 135 (22,3)	Ácido 4,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico	Funchal

			MS ⁴ [515→353→173]: 155 (17,6), 111 (100), 94 (13,5), 93 (90,1), 67 (15,2)		
62	25,1	321	MS ² [321]: 303 (100), 259 (11,2), 215 (11,5) 179 (59,1), 159 (22,1), 135 (10,6) MS ³ [321→303]: 259 (100), 215 (25,1), 149 (11,7) MS ⁴ [321→303→259]: 241 (56,9), 215 (100), 213 (23,1), 187 (10,0), 172 (22,0), 143 (11,5), 135 (18,4), 109 (49,4)	Não identificado	Machico
63	26,2	503	MS ² [503]: 337 (10,4), 323 (100), 221 (10,9), 179 (29,9) MS ³ [503→323]: 263 (20,4), 221 (34,4), 179 (100), 135 (29,9) MS ⁴ [503→323→179]: 135 (100)	Ácido cafeico- <i>O</i> -dihexósido	Funchal Machico
64	26,8	515	MS ² [515]: 353 (100) MS ³ [515→353]: 191 (100), 179 (44,7), 135 (12,5) MS ⁴ [515→353→191]: 173 (56,0), 127 (34,7), 111 (56,7), 85 (61,7)	Ácido 3,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico	Funchal Machico
65	27,2	447	MS ² [447]: 285 (100), 284 (68,1), 255 (28,9) MS ³ [447→285]: 255 (100) MS ⁴ [447→285→255]: 229 (100), 227 (78,8), 212 (33,3), 168 (50,2)	Canferol- <i>O</i> -hexósido	Funchal Machico
66	27,7	547	MS ² [547]: 341 (100), 281 (67,2), 251 (33,6), 221 (15,3), 179 (30,5) MS ³ [547→341]: 281 (100), 251 (75,8), 221 (21,8), 179 (68,2) MS ⁴ [547→341→281]: 221 (19,3), 179 (100), 135 (27,3)	Derivado do Ácido cafeico- <i>O</i> -hexósido	Funchal Machico
67	27,9	477	MS ² [477]: 433 18,8, 315 (100) MS ³ [477→315]: 153 (100), 136 (11,1), 109 (36,0), 101 (10,1)	Ácido Protocatecuico- <i>O</i> -dihexósido	Funchal Machico
68	28,2	711	MS ² [711]: 503 (100) MS ³ [711→503]: 487 (13,2), 485 (100), 383 (24,8), 343 (19,7) MS ⁴ [711→503→485]: 419 (100), 411 (64,5), 409 (78,1), 381 (47,3), 347 (53,8), 343 (50,9), 135 (43,2)	Ácido triterpénico- <i>O</i> -hexósido (Aducto – Formato)	Machico
69	28,7	503	MS ² [503]: 341 (96,6), 281 (71,5), 251 (73,6), 221 (40,0), 179 (100) MS ³ [503→341]: 323 (11,9), 281 (36,0), 251 (57,4), 221 (29,6), 179 (100), 135 (30,0) MS ⁴ [503→341→179]: 135 (100)	Ácido cafeico- <i>O</i> -dihexósido	Funchal Machico
70	28,9	417	MS ² [417]: 285 (100), 255 (10,8) MS ³ [417→285]: 255 (100), 229 (10,2), 227 (29,4), 163 (13,3)	Canferol- <i>O</i> -pentósido	Funchal Machico
71	29,5	547	MS ² [547]: 387 (12,0), 341 (19,6), 281 (20,0), 179 (26,3), 161 (100) MS ³ [547→341]: 281 (100), 179 (57,4), 135 (27,5) MS ⁴ [547→341→281]: 179 (100)	Derivado do Ácido cafeico- <i>O</i> -hexósido	Funchal Machico
72	30,0	445	MS ² [445]: 314 (14,5), 269 (100), 175 (16,2)	Apigenina- <i>O</i> -glucurónido	Funchal

			MS ³ [445→269]: 225 (49,5), 201 (40,7), 169 (100)		Machico
73	30,8	711	MS ² [711]: 503 (100) MS ³ [711→503]: 485 (100), 453 (34,7) MS ⁴ [711→503→485]: 453 (100), 439 (18,8), 421 (12,3), 409 (17,4), 407 (23,9), 386 (11,7)	Ácido triterpénico- <i>O</i> -hexósido (Aducto – Formato)	Funchal Machico
74	31,3	679	MS ² [679]: 517 (100), 499 (25,6), 455 (16,3), 437 (11,6) MS ³ [679→517]: 499 (100), 455 (36,6), 441 (26,2), 437 (25,6), 397 (13,8), 379 (15,4) MS ⁴ [679→517→499]: 481 (11,2), 455 (57,8), 441 (100), 397 (34,3)	Ácido ganodérico C2- <i>O</i> -hexósido	Funchal Machico
75	31,5	459	MS ² [459]: 297 (100), 135 (19,6) MS ³ [459→297]: 179 (14,4), 135 (100)	Derivado do Ácido cafeico	Funchal Machico
76	31,9	451	MS ² [451]: 341 (100) MS ³ [451→341]: 231 (22,1), 219 (24,4), 217 (100), 189 (18,5), 177 (16,2) MS ⁴ [451→341→217]: 191 (97,0), 189 (100), 145 (10,9)	Não identificado	Machico
77	32,3	487	MS ² [487]: 451 (31,7), 341 (70,6), 323 (61,3), 281 (36,9), 251 (35,3), 179 (100) MS ³ [487→179]: 135 (100)	Derivado do ácido cafeico	Funchal Machico
78	32,6	711	MS ² [711]: 503 (100) MS ³ [711→503]: 485 (100), 459 (16,4) MS ⁴ [711→503→485]: 441 (97,4), 421 (100), 419 (49,4), 401 (43,7), 391 (24,6), 379 (28,4), 223 (57,6)	Isómero do Ácido triterpénico- <i>O</i> -hexósido (Aducto – Formato)	Machico
79	32,8	493	MS ² [493]: 448 (18,6), 447 (80,1), 179 (48,3), 177 (14,8), 161 (100) MS ³ [493→161]: 133 (49,9), 129 (29,5), 111 (100) MS ³ [493→161]: 315 (100), 233 (17,4), 193 (14,4), 161 (68,8), 149 (17,1) MS ⁴ [493→447→315]: 193 (100)	Não identificado	Funchal
80	33,4	695	MS ² [695]: 487 (100) MS ³ [695→487]: 469 (100), 427 (11,4), 407 (21,3) MS ⁴ [695→487→469]: 451 (43,9), 437 (28,5), 423 (59,6), 407 (100), 405 (44,2), 371 (21,5)	Não identificado	Funchal Machico
81	33,7	548	MS ² [548]: 281 (32,0), 251 (27,6), 221 (12,6), 180 (16,0), 179 (59,7), 161 (100) MS ³ [548→179]: 148 (14,4), 135 (100)	Derivado do ácido cafeico	Funchal
82	33,8	709	MS ² [709]: 501 (100)	Não identificado	Funchal

			MS ³ [709→501]: 483 (11,3), 471 (100), 453 (32,3) MS ⁴ [709→501→471]: 453 (100), 428 (11,0), 423 (13,9), 412 (11,8), 356 (12,9), 325 (18,6)		Machico
83	34,8	711	MS ² [711]: 665 (12,6), 504 (27,0), 503 (100), 502 (13,5), 501 (29,7) MS ³ [711→503]: 486 (31,3), 485 (100), 484 (27,5), 483 (63,7), 453 (18,3), 439 (15,4) MS ⁴ [711→503→485]: 453 (44,0), 439 (20,1), 421 (57,5), 419 (100), 408 (62,1), 403 (15,2), 402 (11,8), 401 (21,0), 385 (25,3)	Ácido triterpénico- <i>O</i> -hexósido (Aducto – Formato)	Funchal Machico
84	35,1	679	MS ² [679]: 517 (100) MS ³ [679→517]: 499 (100), 473 (14,4), 455 (14,6) MS ⁴ [679→517→499]: 455 (100)	Ácido ganodérico C2- <i>O</i> -hexósido	Funchal Machico
85	35,8	593	MS ² [593]: 285 (100) MS ³ [593→285]: 257 (42,2), 255 (45,1), 229 (28,1), 223 (35,7), 213 (25,4), 183 (17,3), 171 (18,3), 163 (21,0), 151 (100)	Canferol- <i>O</i> -rutinósido	Funchal Machico
86	37,4	695	MS ² [695]: 649 (17,9), 487 (100) MS ³ [695→487]: 469 (12,8), 443 (100), 411 (40,3), 385 (34,6), 369 (29,3) MS ⁴ [695→487→425]: 407 (97,1), 393 (100)	Não identificado	Funchal Machico
87	37,5	711	MS ² [711]: 503 (100) MS ³ [711→503]: 485 (100), 459 (13,0), 455 (18,2), 441 (53,2) MS ⁴ [711→503→485]: 455 (29,5), 440 (100), 423 (12,1)	Ácido triterpénico- <i>O</i> -hexósido (Aducto – Formato)	Funchal Machico
88	37,9	709	MS ² [709]: 501 (100) MS ³ [709→501]: 483 (11,3), 471 (100), 453 (32,3) MS ⁴ [709→501→471]: 453 (100), 428 (11,0), 423 (13,9), 412 (11,8), 356 (12,9), 325 (18,6)	Não identificado	Funchal Machico
89	38,5	663	MS ² [663]: 501 (100), 483 (32,7), 439 (10,2) MS ³ [663→501]: 483 (100), 465 (12,2), 455 (14,0), 439 (19,2), 412 (13,3) MS ⁴ [663→501→483]: 465 (15,6), 455 (16,6), 439 (100), 425 (10,1), 367 (18,8)	Ácido ganolucídico B- <i>O</i> -hexósido	Funchal Machico
90	39,0	679	MS ² [679]: 633 (12,0), 517 (54,9), 471 (100) MS ³ [679→471]: 453 (100) MS ⁴ [679→471→453]: 437 (12,1), 407 (16,5), 397 (100), 371 (19,2), 221 (17,8)	Ácido ganodérico C2- <i>O</i> -hexósido	Funchal Machico
91	39,9	163	MS ² [163]: 119 (100)	Ácido <i>p</i> -cumárico	Machico
92	40,1	533	MS ² [533]: 485 (100), 471 (15,4) MS ³ [533→485]: 467 (100), 441 (83,8), 425 (22,3), 423 (30,2), 381 (31,2), 310	Ácido 12-Hidroxi-ganodérico C2	Funchal Machico

			(14,0) MS ⁴ [533→485→441]: 423 (100), 379 (49,0)		
93	41,6	517	MS ² [517]: 499 (81,1), 487 (100), 469 (81,6), 451 (72,0), 425 (16,9), 407 (24,1) MS ³ [517→487]: 469 (100), 451 (28,5), 427 (10,3) MS ⁴ [517→485→441]: 423 (100), 379 (49,0)	Ácido ganodérico C2	Funchal Machico
94	42,6	503	MS ² [503]: 485 (100), 453 (26,2) MS ³ [503→485]: 471 (60,0), 453 (100), 439 (23,6), 437 (11,0), 368 (15,3) MS ⁴ [503→485→453]: 435 (100), 422 (88,9), 409 (98,5), 379 (16,3), 375 (19,6)	Ácido triterpénico	Funchal Machico
95	43,7	517	MS ² [517]: 499 (100), 471 (11,3), 455 (25,3), 441 (30,5), 437 (10,8) MS ³ [517→499]: 481 (16,4), 454 (70,1), 442 (66,5), 441 (100), 439 (42,6), 423 (32,4), 397 (22,9), 381 (33,4), 365 (10,0), 341 (19,4) MS ⁴ [517→499→441]: 425 (100), 381 (31,8), 365 (22,7), 363 (20,9), 175 (58,9)	Ácido ganodérico C2	Funchal Machico
96	44,5	503	MS ² [503]: 486 (30,1), 485 (100), 483 (25,8), 471 (12,7), 442 (12,0), 441 (39,7), 439 (10,7), 421 (11,7) MS ³ [503→485]: 453 (24,5), 441 (100), 440 (13,5), 439 (21,7), 422 (21,4), 421 (55), 419 (10,9), 403 (17,0), 393 (20,2) MS ⁴ [503→485→441]: 422 (15,1), 422 (27,6), 421 (66,8), 410 (28,0), 409 (66,4), 407 (39,2), 309 (100)	Ácido triterpénico	Machico
97	44,7	517	MS ² [517]: 455 (100), 437 (75,0) MS ³ [517→455]: 437 (58,1), 408 (12,7), 395 (100), 377 (10,2) MS ⁴ [517→455→395]: 376 (81,4), 353 (100)	Ácido ganodérico C2	Machico
98	45,0	501	MS ² [501]: 483 (100), 471 (37,1), 453 (37,5), 441 (14,1), 439 (17,4), 421 (38,4), 409 (20,0) MS ³ [501→483]: 453 (100), 439 (15,5), 407 (29,6), 397 (10,1) MS ⁴ [501→483→453]: 435 (100)	Ácido ganolucídico B	Funchal Machico

3.1.3. *Sambucus lanceolata*

Pela Tabela 16 verifica-se que nesta espécie, contrariamente ao apresentado nas espécies anteriores, as bagas possuem maior número de compostos identificados. Do total de 82 compostos detectados na espécie *S. lanceolata*, 48 compostos foram identificados nas bagas e 36 compostos nas folhas. Porém, há que considerar o facto de as bagas terem sido analisadas numa concentração de 40 mg/mL.

Na caracterização das bagas de *S. lanceolata* foi detectada a presença de alguns derivados dos ácidos cafeoilquínicos e de flavonóides, nomeadamente da quercetina, da isoramnetina, do canferol, da luteolina, da apigenina e da narigenina, por esta ordem. Ainda nas bagas, foram identificados alguns sacarídeos e os ácidos oxodi(hidroxi)-octadecanóico e tri(hidroxi)-octadecanóico. Já nas folhas, predominam a classe dos ácidos hidroxicinâmicos, com especial destaque para os ácidos cafeoilquínicos e derivados do ácido cafeico e cumárico. Verifica-se ainda, a presença de ácidos orgânicos (derivados do ácido quínico, cítrico e málico) e de sacarídeos.

De acordo com a Figura 28, os picos mais intensos, nas bagas, foram identificados como trissacarídeo (**1**), ácido cítrico (**5**), derivado da luteolina (**16**), dímero do ácido cafeoilquínico (**23**) e quercetina-*O*-rutinósido (**47**). Nas folhas, os picos mais intensos são o plímero de hexoses (**2**), o dímero do ácido cafeoilquínico (**23**), a quercetina-*O*-(ramnosil)rutinósido (**37**) e a quercetina-*O*-rutinósido (**47**).

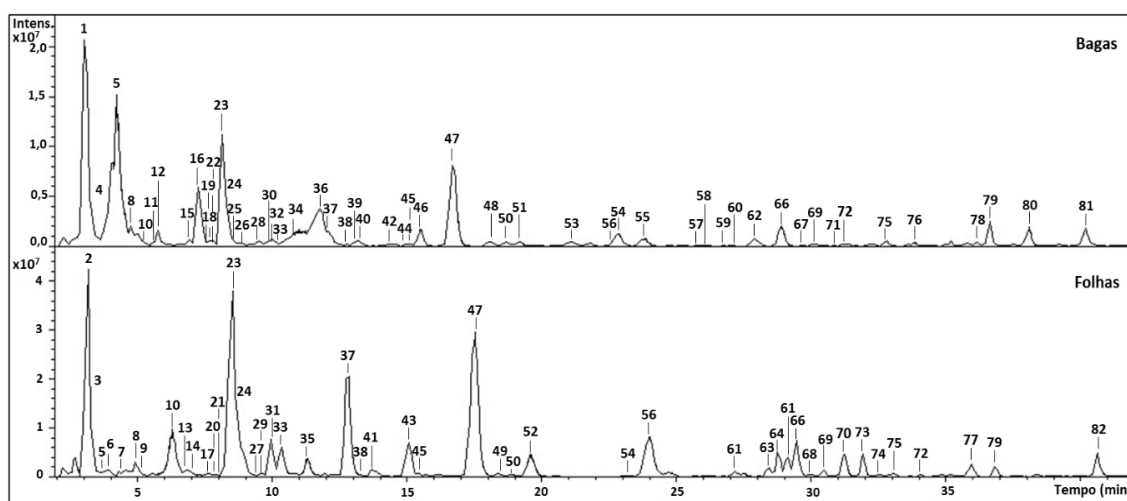


Figura 28 - Cromatogramas da análise do perfil fenólico, por HPLC-DAD-ESI⁻/MSⁿ, dos extractos metanólicos de *Sambucus lanceolata* (bagas e folhas, respectivamente).

Mikulic-Petkovsek *et al.* (2015) [26], analisaram a composição fenólica de diferentes espécies e híbridos de várias espécies de sabugueiro. Verificaram que, os ácidos cafeoilquínicos e a quercetina-*O*-rutinosídeo foram os compostos maioritários encontrados nestes frutos. Estes autores detectaram nas suas amostras vários compostos identificados pela primeira vez em alguns genótipos de sabugueiro, nomeadamente: ácido 3-*O*-feruilquínico, ácido *p*-cumárico-*O*-hexósido, quercetina-*O*-(pentosil)hexósido, quercetin-*O*-(acetil)hexósido e isoramnetina-*O*-(acetil)hexósido. Estes compostos foram, detectados também no nosso estudo.

✓ **Ácido hidroxicinâmicos e derivados**

Ácido cafeico

O ácido cafeico-*O*-hexósido, que exibe ião molecular a m/z 341, foi detectado nas bagas e nas folhas desta espécie (compostos **17** e **26**).

O composto **63** foi classificado como derivado do ácido cafeico, pelo que não foi possível determinar a natureza do resíduo perdido (344 Da).

Ácido cumárico

Os compostos **61**, **64**, **65**, **68**, **70** e **73** foram classificados como derivados do ácido cumárico, presentes especificamente nas folhas. Não foi possível caracterizar na totalidade os compostos, dada a dificuldade em identificar os resíduos perdidos. Exclusivamente nas bagas, foi detectado o composto **45**, que exibe $[M-H]^-$ a m/z 323, foi também classificado como derivado do ácido cumárico.

O ácido cumárico-*O*-hexósido apresenta ião molecular a m/z 325 (composto **21**) e foi detectado nas bagas e folhas.

Ácido ferúlico

O composto **13** foi identificado como ácido ferúlico-*O*-hexósido, pois exibe $[M-H]^-$ a m/z 355, como descrito anteriormente. A fragmentação MS^2 dá origem ao pico base a m/z 193 e ao fragmento a m/z 149 (ácido ferúlico).

De acordo com a literatura [130], o composto **38**, que apresenta $[M-H]^-$ a m/z 367, foi identificado como ácido feruloilquínico. Este composto foi detectado em ambas as partes morfológicas do sabugueiro. Nas folhas, foi ainda, detectado o composto **74** designado como derivado do ácido ferúlico.

Ácido sinápico

O composto **20** apresenta íão molecular a m/z 433 e foi classificado como derivado do ácido sinápico-*O*-hexósido.

Ácidos cafeoilquínicos

Uma das classes maioritariamente encontrada na espécie de *S. lanceolata* foi a dos ácidos cafeoilquínicos.

Os compostos **4**, **24** e **33** apresentam o mesmo $[M-H]^-$ a m/z 353, mas diferentes padrões de fragmentação. O composto **4** foi classificado como ácido 4-*O*-cafeoilquínico e os compostos **24** e **33** como isómeros do ácido 3-*O*-cafeoilquínicos [120].

Os compostos **10**, **14** e **23**, exibem íão molecular a m/z 707 e foram designados como dímeros do ácido cafeoilquínico. Os compostos **10** e **23** foram detectados nas bagas e folhas, enquanto o composto **15** foi detectado apenas nas folhas de *S. lanceolata*.

Foi ainda identificado, nas bagas, um derivado do ácido 3-*O*-cafeoilquínico, (composto **32**), que mostra $[M-H]^-$ a m/z 451.

✓ **Ácidos hidroxibenzóicos**

O ácido siríngico é caracterizado pelo seu íão molecular a m/z 197 e pelos seus fragmentos padrão a m/z 182, 153 e 135 [131]. O composto **9**, exibe um $[M-H]^-$ a m/z 397 e a fragmentação deu origem ao pico base a m/z 197. Assim sendo, o composto **9** foi identificado como derivado do ácido siríngico.

✓ Flavonóides

Flavonóis

Quercetinas

O composto **78**, que mostra $[M-H]^-$ a m/z 301 foi classificado como quercetina. O composto **37** apresenta $[M-H]^-$ a m/z 755 e dá origem ao ião fragmento a m/z 301, pela perda de 454 Da (146 + 308). Este composto foi caracterizado como quercetina-*O*-(ramnosil)rutinósido [104], detectado nas bagas e nas folhas. Foi também identificada, em ambas as partes morfológicas, a rutina ou quercetina-*O*-rutinósido (composto **47**), que exhibe ião molecular a m/z 609.

Nas bagas, o composto **42** apresenta $[M-H]^-$ a m/z 595 e foi caracterizado como quercetina-*O*-(pentosil)hexósido. Já o composto, **51** apresenta ião molecular a m/z 463, foi identificado como quercetina-*O*-hexósido.

O composto **57**, exhibe o ião molecular a m/z 505, foi identificado nas bagas e classificado como quercetina-*O*-(acetil)hexósido. O composto **58** apresenta $[M-H]^-$ a m/z 549 e foi classificado como derivado do composto anteriormente discutido, pelo que dispõe um resíduo extra (44 Da).

Canferol

O composto **56**, exhibe um $[M-H]^-$ a m/z 593, cuja fragmentação MS^2 deu origem ao pico base a m/z 285. Desta forma, o composto foi denominado de canferol-*O*-rutinósido [132].

Outro composto identificado apenas nas bagas, o canferol-*O*-hexósido (composto **59**), apresenta o ião molecular a m/z 447.

Isoramnetina

Nas bagas foram encontrados alguns derivados da isoramnetina. O composto **60** exhibe o ião molecular a m/z 477 e de acordo com o padrão de fragmentação foi identificado como isoramnetina-*O*-hexósido.

A isoramnetina-*O*-rutinósido (composto **55**) é caracterizada pelo seu íão molecular a m/z 623 e pela perda do fragmento de 308 Da, que dá origem ao pico base a m/z 315.

O composto **72** mostra íão molecular a m/z 519 e originou a perda de um resíduo de 204 Da (42 + 162 Da), de modo que foi identificado como isoramnetina-*O*-(acetil)hexósido.

Foram ainda encontrados dois derivados da isoramnetina-*O*-pentósido, os compostos **69** e **75**, apresentam íão molecular a m/z 613 e foram detectados em ambas as partes morfológicas.

Miricetina

A aglicona da miricetina é caracterizada pelo íão molecular a m/z 317 e os seus fragmentos característicos a m/z 179 e m/z 151 [90].

O composto **49** exhibe íão molecular a m/z 463 e foi identificado como miricetina-*O*-ramnósido. O composto **39** apresenta $[M-H]^-$ a m/z 679 e foi classificado como derivado da miricetina [90].

Flavonas

Luteolina

Nas bagas de sabugueiro foi identificado um derivado da luteolina, este apresenta $[M-H]^-$ a m/z 597 (composto **16**) e os fragmentos característicos da luteolina.

Apigenina

O composto **11** exhibe íão molecular a m/z 617 e foi identificado como derivado da apigenina, pois origina o fragmento característico a m/z 269.

Narigenina

Pela comparação com a literatura [133], o composto **71** foi caracterizado como narigenina-*O*-hexósido. Apresenta o $[M-H]^-$ a m/z 433 e sofre perda de um fragmento

de 162 Da que dá origem ao pico base a m/z 271. Este composto corresponde à aglicona da narigenina.

Flavonas

De acordo com a literatura [94], os compostos que apresentam íão molecular a m/z 491 são classificados como dihidroxi-dimetoxi-*O*-hexósido flavona. Porém o composto **34** exibe $[M-H]^-$ a m/z 537 e dá origem ao pico base a m/z 491 pela perda do fragmento de 46 Da. Assim, apresenta o padrão de fragmentação plausível com a dihidroxi-dimetoxi-*O*-hexósido flavona, pelo que, foi identificado como dihidroxi-dimetoxi-*O*-hexósido flavona com formação de aducto (formato).

Flavanóis

A catequina (composto **25**) e o dímero de proantocianidina do tipo B (composto **19**) foram os flavanóis detectados nas bagas.

Flavanona

O composto **44** apresenta $[M-H]^-$ a m/z 567 e foi classificado como derivado da dimetoxil-flavanona [134]. Este composto foi detectado nas bagas e nas folhas.

✓ Taninos

Taninos hidrolisáveis

Nas bagas foram identificados alguns compostos provenientes do ácido elágico (aglicona a m/z 301), nomeadamente o ácido elágico-*O*-(pentosil)hexósido (composto **46**) e seus derivados (os compostos **22** e **30**).

O composto **76**, presente em ambas as partes morfológicas, foi identificado como derivado do ácido elágico.

O composto **40**, presente nas bagas, foi classificado como ácido tetrametil-elágico-*O*-hexósido, de acordo com a literatura [109].

✓ **Lignanos**

De acordo com a literatura [135], o siringaresinol é caracterizado pelo seu ião molecular a m/z 417 e fragmentos característicos a m/z 181 e m/z 166. O composto **15** apresenta $[M-H]^-$ a m/z 463. A fragmentação MS^2 dá origem ao pico base a m/z 417 e à perda do fragmento de 46 Da. Este composto foi classificado como siringaresinol (aducto – formato).

O composto **67** exibe um ião molecular a m/z 561, apresenta uma perda neutra de 204 Da, dando origem ao pico base a m/z 357. O ião fragmento a m/z 357 sofre ainda outras fragmentações, originando os fragmentos a m/z 342 $[357-CH_3]^-$, 151 $[357-206]^-$ e 136 $[151-CH_3]^-$, característicos do pinosresinol [126]. Desta forma, este composto foi designado como pinosresinol-*O*-(acetil)hexósido.

✓ **Outros compostos**

✓ **Sacarídeos**

Foram detectados outros compostos não fenólicos, nomeadamente sacarídeos, na espécie de *S. lanceolata* (composto **1**, **2**, **28**, **36**, **48**, **52** e **58**).

✓ **Ácidos orgânicos**

O ácido cítrico (composto **5**) e seu derivado (composto **18**) foram detectados nas bagas e nas folhas.

Outros compostos foram igualmente identificados nas folhas, tais como o ácido málico (composto **6**) e derivados do ácido quínico (compostos **3** e **7**).

O composto **8** foi classificado como hidroxitirosol-*O*-hexósido. De acordo com o que foi reportado na literatura [131], o hidroxitirosol é identificado pelo seu ião molecular a m/z 153 e fragmento característico a m/z 123.

Nas folhas, foi identificado também o roseosídeo (composto **29**). Este composto apresenta um $[M-H]^-$ a m/z 385, apresenta a formação o aducto formato $[M-H+HCOO]^-$. Nas folhas de sabugueiro foi também detectado o dihidro-roseosídeo (composto **27**), que exibe $[M-H]^-$ a m/z 433 [136].

O composto **80** foi identificado como ácido oxo-dihidroxi-octadecanóico, de acordo com a literatura [90]. Este composto apresenta $[M-H]^-$ a m/z 327 e fragmentação MS^2 dá origem à perda de um fragmento de 98 Da, , que corresponde à perda do grupo terminal $HO-CH=CH(CH_2)_3CH_3$ da molécula de oxilipina. O composto **81**, apresenta $[M-H]^-$ a m/z 329 e foi identificada como ácido trihidroxi-octadecanóico [137].

✓ **Não identificados**

Vários compostos, presentes nas bagas e nas folhas, não foram caracterizados (compostos **12, 31, 35, 41, 43, 50, 54, 62, 66, 73, 75, 82**).

Tabela 16 - Caracterização do perfil fenólico, por HPLC-DAD-ESI⁻/MSⁿ, dos extractos metanólicos das diferentes partes morfológicas (bagas e folhas) de *Sambucus lanceolata*.

Nº	t _R (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	HPLC-DAD-ESI/MS ⁿ m/z (% pico base)	Identificação	Parte morfológica
1	3,0	473	MS ² [473]: 341 (100) MS ³ [473→341]: 179 (100), 161 (23,0), 143 (33,1), 131 (10,3) 119 (16,9), 113 (45,2)	Trissacarídeo	Bagas
2	3,2	683	MS ² [683]: 341 (100) MS ³ [683→341]: 179 (100), 161 (23,0), 143 (33,1), 119 (16,9), 113 (45,2)	Polímero da hexose	Folhas
3	3,3	533	MS ² [533]: 191 (100) MS ³ [533→191]: 173 (100), 153 (18,0), 127 (91,3), 109 (36,1), 93 (55,0), 85 (99,5)	Derivado do Ácido quínico	Folhas
4	3,5	353	MS ² [353]: 173 (100), 111 (76,2) MS ³ [353→173]: 111 (100)	Ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico	Bagas
5	3,7	191	MS ² [191]: 173 (100), 111 (38,3) MS ³ [191→173]: 111 (100)	Ácido cítrico	Bagas Folhas
6	4,0	133	MS ² [133]: 115 (100) MS ³ [133→115]: 71 (100)	Ácido málico	Folhas
7	4,7	371	MS ² [371]: 353 (45,8), 341 (18,6), 191 (100), 173 (19,3) MS ³ [371→191]: 173 (50,3), 127 (68,5), 111 (45,1), 109 (54,8), 93 (84,1), 85 (100)	Derivado do Ácido quínico	Folhas
8	4,9	315	MS ² [315]: 153 (100), 135 (14,7), 123 (21,6) MS ³ [315→153]: 123 (100)	Hidroxitirosol- <i>O</i> -hexósido	Bagas Folhas
9	5,2	397	MS ² [397]: 559 (81,8), 361 (100), 359 (89,8), 234 (32,8), 198 (82,8), 197 (25,9)	Derivado do	Folhas

			MS ³ [397→361]: 197 (100), 168 (11,0), 139 (47,7) MS ⁴ [397→361→197]: 182 (100), 167 (16,4), 123 (12,8)	Ácido siríngico	
10	5,4	707	MS ² [707]: 674 (66,2), 671 (25,0), 533 (47,8), 515 (35,1), 413 (41,6), 353 (100), 324 (15,3), 321 (10,4), 269 (60,1), 205 (37,0) MS ³ [707→353]: 191 (100), 173 (20,5)	Dímero do Ácido cafeoilquínico	Bagas Folhas
11	5,7	617	MS ² [617]: 581 (100) MS ³ [617→581]: 269 (100) MS ⁴ [617→581→269]: 241 (94,7), 225 (67,5), 214 (16,2), 201 (25,6), 169 (22,7), 155 (15,7)	Derivado da Apigenina	Bagas
12	5,9	401	MS ² [401]: 239 (100), 179 (25,4) MS ³ [401→239]: 179 (100) MS ⁴ [401→239→179]: 164 (100), 137 (67,6)	Não identificado	Bagas
13	6,9	355	MS ² [355]: 193 (100) MS ³ [355→193]: 178 (39,2), 149 (100), 134 (20,0)	Ácido ferúlico- <i>O</i> -hexósido	Folhas
14	6,9	707	MS ² [707]: 533 (100), 515 (32,3), 353 (48,3), 341 (26,8), 323 (18,8), 271 (22,7), 242 (18,0) MS ³ [707→353]: 191 (100), 135 (29,3)	Dímero do Ácido cafeoilquínico	Folhas
15	7,0	463	MS ² [463]: 417 (100), 235 (13,3), 181 (10,8) MS ³ [463→417]: 235 (41,0), 181 (100), 166 (41,2), 161 (24,4) MS ⁴ [463→417→181]: 166 (100)	Siringaresinol (Aducto-formato)	Bagas
16	7,3	597	MS ² [597]: 487 (14,9), 285 (100), 241 (14,9) MS ³ [597→285]: 243 (28,4), 241 (100), 217 (27,2), 215 (16,5), 199 (15,6), 149 (38,6)	Derivado da Luteolina	Bagas
17	7,6	341	MS ² [341]: 251 (20,5), 233 (27,2), 203 (19,0), 179 (100), 161 (27,3), 135 (19,6) MS ³ [341→179]: 135 (100)	Ácido cafeico- <i>O</i> -hexósido	Folhas
18	7,7	391	MS ² [391]: 373 (15,0), 283 (14,1), 217 (100), 199 (10,1), 173 (10,8), 111 (42,0) MS ³ [391→217]: 111 (100)	Derivado do ácido cítrico	Bagas
19	7,7	577	MS ² [577]: 451 (18,4), 425 (96,8), 407 (100), 351 (11,8), 289 (23,2) MS ³ [577→425]: 407 (100), 339 (16,4) MS ⁴ [577→425→407]: 390 (17,1), 321 (16,9), 283 (100), 271 (17,6), 264 (28,2)	Dímero de proantocianidina do tipo B	Bagas

			255 (25,6)		
20	7,8	433	MS ² [433]: 503 (96,5), 385 (100), 340 (44,0), 271 (37,0), 223 (49,7), 199 (16,6), 179 (74,6), 164 (25,8) MS ³ [433→385]: 223 (100), 179 (35,7)	Derivado do Ácido sinápico- <i>O</i> -hexósido	Folhas
21	7,9	325	MS ² [325]: 163 (100), 119 (18,4) MS ³ [325→163]: 119 (100)	Ácido cumárico- <i>O</i> -hexósido	Folhas
22	7,9	627	MS ² [627]: 595 (100) MS ³ [627→595]: 433 (10,5), 343 (13,5), 301 (100), 283 (12,8), 257 (58,6) MS ⁴ [627→595→301]: 257 (100)	Derivado do Ácido elágico- <i>O</i> -(pentosil)hexósido	Bagas
23	8,3	707	MS ² [707]: 353 (100) MS ³ [707→353]: 191 (100) MS ⁴ [707→353→191]: 173 (12,7), 127 (67,7), 109 (19,9), 93 (100), 85 (11,5)	Dímero do ácido cafeoilquínico	Bagas Folhas
24	8,6	353	MS ² [353]: 485 (57,5), 297 (39,2), 289 (35,0), 271 (70,7), 241 (13,6), 181 (100), 179 (48,0) MS ³ [353→191]: 173 (63,1), 127 (100), 111 (47,1), 109 (42,7), 93 (48,5), 85 (50,9)	Ácido 3-cafeoilquínico	Bagas Folhas
25	8,6	289	MS ² [289]: 271 (13,4), 245 (100), 231 (15,4), 205 (31,1), 179 (18,7), 167 (15,2), 151 (16,3) MS ³ [289→245]: 203 (100), 188 (13,0)	Catequina	Bagas
26	8,7	341	MS ² [341]: 251 (20,5), 233 (27,2), 203 (19,0), 179 (100), 161 (27,3), 135 (19,6) MS ³ [341→179]: 135 (100)	Isómero do Ácido cafeico- <i>O</i> -hexósido	Bagas
27	8,8	433	MS ² [433]: 387 (100), 179 (25,4), 161 (22,2), 143 (10,1) MS ³ [433→387]: 207 (100), 189 (12,8), 179 (56,0), 161 (49,7), 159 (25,8), 131 (16,5)	Dihidro-roseosídeo	Folhas
28	9,4	427	MS ² [427]: 381 (100) MS ³ [427→381]: 249 (100), 161 (25,2) MS ⁴ [427→381→249]: 161 (100), 113 (19,3), 101 (18,7), 97 (12,5), 85 (24,3)	Sacarídeo	Bagas
29	9,5	431	MS ² [431]: 385 (100), 223 (12,2) MS ³ [431→385]: 223 (33,1), 205 (40,5), 161 (13,3), 153 (100)	Roseosídeo	Folhas
30	9,9	627	MS ² [627]: 595 (100) MS ³ [627→595]: 433 (10,5), 343 (13,5), 301 (100), 283 (12,8), 257 (58,6) MS ⁴ [627→595→301]: 257 (100)	Derivado do Ácido elágico- <i>O</i> -(pentosil)hexósido	Bagas

31	10,0	435	MS ² [435]: 389 (33,9), 227 (100) MS ³ [435→227]: 101 (100)	Não identificado	Folhas
32	10,1	451	MS ² [451]: 353 (57,6), 191 (100) MS ³ [451→353]: 191 (100), 135 (12,7)	Derivado do Ácido cafeoilquínico	Bagas
33	10,4	353	MS ² [353]: 191 (100) MS ³ [353→191]: 339 (10,1), 173 (36,6), 127 (100), 111 (47,0), 93 (42,1), 85 (69,5)	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	Folhas
34	10,6	537	MS ² [537]: 491 (100), 179 (19,9) MS ³ [537→491]: 476 (14,9), 357 (78,0), 329 (100), 314 (11,1), 301 (36,7), 297 (27,0), 255 (22,2), 181 (88,8), 150 (13,8) MS ⁴ [537→491→329]: 314 (100), 283 (68,0), 264 (29,5), 183 (32,3), 164 (17,8)	Dihidroxi-dimetoxi- <i>O</i> -hexósido flavona (Aducto-formato)	Bagas
35	11,2	435	MS ² [435]: 390 (27,4), 389 (100) MS ³ [435→389]: 436 (51,6), 321 (23,4), 311 (27,9), 161 (43,8), 159 (100), 147 (31,4), 143 (11,3), 113 (58,1)	Não identificado	Folhas
36	11,7	539	MS ² [539]: 491 (10,3), 179 (100), 161 (11,1) MS ³ [539→179]: 161 (43,1), 131 (34,5), 119 (48,5), 113 (24,2), 101 (50), 89 (100)	Sacarídeo	Bagas
37	12,7	755	MS ² [755]: 609 (34,4), 591 (66,6), 489 (23,9), 343 (14,0), 301 (100), 271 (25,3) MS ³ [755→301]: 271 (100), 255 (56,5), 179 (19,3), 151 (19,2)	Quercetina- <i>O</i> -(ramnosil)rutinósido	Bagas Folhas
38	13,2	367	MS ² [367]: 191 (100), 173 (15,8) MS ³ [367→191]: 127 (100), 111 (30,1), 93 (20,6), 85 (38,4)	Ácido feruloilquínico	Bagas Folhas
39	13,3	679	MS ² [679]: 649 (10,4), 647 (19,8), 619 (16,2), 575 (23,2), 335 (100), 275 (11,2), 273 (30,4) MS ³ [679→335]: 317 (100), 299 (14,3), 273 (64,7), 245 (11,8), 229 (21,6) MS ⁴ [679→335→317]: 273 (100), 256 (27,1), 229 (58,2), 213 (63,1), 186 (40,9), 152 (20,4)	Derivado da Miricetina	Bagas
40	13,4	521	MS ² [521]: 359 (100), 344 (11,0) MS ³ [521→359]: 344 (100), 313 (16,6) MS ⁴ [521→359→344]: 329 (22,2), 313 (100), 265 (29,6), 255 (13,7), 219 (12,7),	Ácido tetra-metileláxico- <i>O</i> -hexósido	Bagas

			203 (25,2), 189 (18,3), 159 (54,9)		
41	13,8	611	MS ² [611]: 431 (100), 251 (83,9), 207 (19,7) MS ³ [611→431]: 269 (16,6), 251 (100), 207 (24,2), 189 (12,7) MS ⁴ [611→431→251]: 208 (49,3), 189 (100)	Não identificado	Folhas
42	14,6	595	MS ² [595]: 548 (11,7), 511 (11,9), 475 (14,7), 463 (35,6), 445 (26,9), 301 (34,5), 300 (100), 295 (13,9), 271 (49,2), 255 (15,1), 227 (19,0) MS ³ [595→301]: 271 (48,8), 255 (23,9), 179 (100), 151 (51,0)	Quercetina- <i>O</i> -(pentosil)hexósido	Bagas
43	15,1	739	MS ² [739]: 593 (15,3), 575 (100), 327 (12,7), 284 (45,6), 255 (11,5) MS ³ [739→575]: 547 (11,2), 429 (53,6), 393 (73,8), 369 (26,8), 339 (100), 327 (30,5), 323 (20,3), 309 (49,3), 297 (22,9), 285 (22,2), 283 (17,5), 227 (25,5), 192 (10,2)	Não identificado	Folhas
44	15,9	567	MS ² [567]: 535 (13,9), 521 (15,8), 447 (14,8), 341 (100), 330 (11,9), 329 (86,0) MS ³ [567→341]: 325 (40,5), 324 (29,4), 312 (10,5) MS ⁴ [567→341→325]: 311 (100), 309 (10,8), 145 (15,5)	Derivado da di(metoxil)-flavanona	Bagas Folhas
45	15,3	323	MS ² [323]: 305 (64,0), 203 (41,0), 163 (100), 145 (57,5), 119 (22,5) MS ³ [323→163]: 119 (100)	Derivado do ácido cumárico	Bagas
46	15,5	595	MS ² [595]: 475 (10,7), 343 (30,2), 301 (100), 283 (24,7), 255 (13,9) MS ³ [595→301]: 258 (16,9), 257 (100), 255 (35,6)	Ácido elágico- <i>O</i> -(pentosil)hexósido	Bagas
47	17,4	609	MS ² [609]: 301 (100), 300 (19,2) MS ³ [609→301]: 271 (34,7), 255 (26,2), 229 (27,4), 179 (85,0), 151 (100)	Quercetina- <i>O</i> -rutinósido	Bagas Folhas
48	18,1	521	MS ² [521]: 341 (35,1), 271 (14,3), 179 (100) MS ³ [521→179]: 88 (100)	Sacarídeo	Bagas
49	18,5	463	MS ² [463]: 316 (100) MS ³ [463→316]: 287 (22,8), 272 (21,9), 271 (100), 242 (11,8), 179 (43,3), 163 (11,6), 151 (48,6)	Miricetina- <i>O</i> -ramnósido	Folhas
50	18,6	405	MS ² [405]: 226 (13,0), 225 (100), 181 (16,5) MS ³ [405→225]: 182 (10,1), 181 (100) MS ⁴ [405→225→181]: 163 (100)	Não identificado	Bagas
51	19,1	463	MS ² [463]: 301 (100), 300 (18,0) MS ³ [463→301]: 271 (12,8), 257 (62,3), 255 (25,1), 213 (13,5), 193 (22,8), 179 (92,8), 151 (100)	Quercetina- <i>O</i> -hexósido	Bagas
52	19,7	415	MS ² [415]: 370 (23,1), 281 (11,6), 255 (11,5), 179 (100), 162 (10,0), 143 (32,0), 119 (11,2)	Sacarídeo	Folhas

			MS ³ [415→179]: 161 (24,1), 143 (81,2), 131 (77,8), 119 (100), 97 (27,7), 89 (18,1)		
53	21,0	567	MS ² [567]: 521 (100), 179 (78,5) MS ³ [567→179]: 161 (100), 149 (11,7), 113 (33,5)	Sacarídeo	Bagas
54	22,9	663	MS ² [663]: 647 (35,2), 633 (48,4), 615 (27,2), 605 (100), 587 (28,3), 573 (30,7), 508 (16,3) MS ³ [663→587]: 570 (30,2), 569 (100), 558 (27,0), 551 (11,0), 5111 (25,7), 446 (23,3), 415 (23,2), 281 (31,3)	Não identificado	Bagas Folhas
55	23,7	623	MS ² [623]: 315 (100), 300 (20,9), 271 (18,4), 255 (10,9) MS ³ [623→315]: 301 (18,3), 300 (100)	Isoramnetina- <i>O</i> -rutinósido	Bagas
56	24,0	593	MS ² [593]: 285 (100) MS ³ [593→285]: 267 (75,3), 257 (100), 255 (31,0), 241 (47,8), 229 (65,4), 213 (52,0), 199 (23,0), 197 (38,4), 195 (17,6), 174 (14,3), 169 (15,9), 163 (38,8)	Canferol- <i>O</i> -rutinósido	Bagas ¹² Folhas
57	25,8	505	MS ² [505]: 463 (14,4), 301 (100), 300 (38,0), 271 (18,3), 151 (16,5) MS ³ [505→301]: 271 (22,5), 255 (70,6), 179 (29,2), 151 (100)	Quercetina- <i>O</i> -(acetil)hexósido	Bagas
58	26,0	549	MS ² [549]: 505 (100) MS ³ [549→505]: 463 (100), 301 (88,4), 300 (21,0) MS ⁴ [549→505→301]: 179 (54,1), 151 (100)	Derivado da Quercetina- <i>O</i> -(acetil)hexósido	Bagas
59	26,3	447	MS ² [447]: 285 (100), 255 (28,2), 221 (25,2), 157 (20,0), 151 (17,2) MS ³ [447→285]: 255 (100), 243 (31,6), 239 (14,0), 187 (20,2)	Canferol- <i>O</i> -hexósido	Bagas
60	27,0	477	MS ² [477]: 406 (20,4), 315 (100), 300 (19,9), 286 (41,9), 271 (33,6), 270 (36,1), 205 (22,5), 176 (28,4), 151 (29,7) MS ³ [477→315]: 300 (14,4), 299 (13,1), 285 (100), 271 (71,2)	Isoramnetina- <i>O</i> -hexósido	Bagas
61	27,3	815	MS ² [815]: 507 (100) MS ³ [815→507]: 345 (57,6), 288 (19,2), 287 (19,2), 201 (15,5), 163 (100) MS ⁴ [815→507→163]: 119 (100)	Derivado do ácido cumárico	Folhas
62	27,9	447	MS ² [447]: 375 (100), 207 (18,3) MS ³ [447→375]: 327 (18,0), 195 (64,9), 191 (20,9), 179 (100), 146 (24,9) MS ⁴ [447→375→179]: 164 (48,7), 161 (100), 147 (47,5), 146 (32,9), 122 (18,9)	Sacarídeo	Bagas
63	28,4	523	MS ² [523]: 361 (57,9), 303 (100), 217 (10,9), 179 (76,8) MS ³ [523→179]: 135 (100)	Derivado do ácido cafeico	Folhas

¹² Diferença no tempo de retenção entre as perles morfológicas.

64	28,7	653	MS ² [653]: 507 (100) MS ³ [653→507]: 345 (59,3), 287 (44,6), 163 (100) MS ⁴ [653→507→163]: 119 (100)	Derivado do ácido cumárico	Folhas
65	29,2	699	MS ² [699]: 653 (53,7), 507 (100) MS ³ [699→507]: 345 (66,2), 287 (31,1), 163 (100) MS ⁴ [699→507→163]: 119 (100)	Derivado do ácido cumárico	Folhas
66	29,4	663	MS ² [663]: 632 (82,3,4), 631 (64,9), 587 (100), 569 (19,0) MS ³ [663→587]: 569 (100), 557 (11,8), 327 (15,0) MS ⁴ [663→587→569]: 551 (56,4), 509 (45,2), 447 (23,4), 429 (10,6), 327 (100), 309 (35,7), 280 (12,6), 215 (25,4)	Não identificado	Bagas Folhas
67	29,6	561	MS ² [561]: 545 (10,2), 533 (11,1), 358 (43,9), 357 (100) MS ³ [561→357]: 342 (17,5), 151 (34,8), 136 (100)	Pinoresinol- <i>O</i> -(acetil)hexósido	Bagas
68	29,9	551	MS ² [551]: 520 (11,5), 507 (22,0), 505 (60,7), 480 (21,3), 449 (16,7), 325 (39,2), 265 (100), 243 (44,4), 235 (25,6), 206 (24,6), 187 (15,3), 163 (53,4) MS ³ [551→265]: 187 (10,5), 163 (100), 119 (80,3)	Derivado do ácido cumárico	Folhas
69	30,6	613	MS ² [613]: 447 (100), 429 (68,3) MS ³ [613→447]: 403 (39,8), 315 (40,4), 271 (65,5), 207 (89,3), 193 (74,9), 189 (36,9), 177 (71,9), 263 (46,0), 161 (100), 153 (73,8), 143 (36,4), 135 (63,6)	Derivado da isoramnetina- <i>O</i> -pentósido	Bagas Folhas
70	31,2	507	MS ² [507]: 345 (99,0), 287 (42,2), 163 (100), 145 (14,7) MS ³ [507→163]: 119 (100)	Derivado do ácido cumárico	Folhas
71	31,3	433	MS ² [433]: 271 (100), 151 (13,5) MS ³ [433→271]: 227 (11,5), 169 (10,6), 151 (100)	Naringenina- <i>O</i> -hexósido	Bagas
72	31,3	519	MS ² [519]: 315 (100) MS ³ [519→315]: 301 (16,9), 300 (100), 271 (18,6), 255 (14,0) MS ⁴ [519→315→300]: 271 (100), 255 (78,5)	Isoramnetina- <i>O</i> -(acetil)hexósido	Bagas
73	31,9	507	MS ² [507]: 345 (97,5), 163 (100), MS ³ [507→163]: 119 (100)	Derivado do ácido cumárico	Folhas
74	32,5	537	MS ² [537]: 522 (32,7), 519 (20,6), 491 (36,3), 375 (66,2, 362 (12,7), 317 (54,6), 285 (20,6), 202 (34,0), 193 (100) MS ³ [537→193]: 134 (100)	Derivado do ácido ferúlico	Folhas
75	32,8	615	MS ² [615]: 447 (100), 429 (80,7), 297 (11,3) MS ³ [615→447]: 315 (47,9), 271 (55,7), 225 (15,4), 179 (12,1), 163 (47,6), 159	Derivado da isoramnetina- <i>O</i> -pentósido	Bagas Folhas

			(61,9), 152 (75,8)		
76	34,1	645	MS ² [645]: 613 (23,4), 570 (12,4), 569 (15,1), 343 (25,5), 325 (13,3), 301 (100), 258 (22,6), 257 (54,2), 242 (11,0) MS ³ [645→301]: 258 (16,8), 257 (100)	Derivado do ácido elágico	Bagas Folhas
77	35,9	629	MS ² [629]: 598 (35,5), 597 (80,0), 579 (12,2), 554 (31,2), 553 (100), 535 (38,8) MS ³ [629→331]: 313 (100), 182 (65,4), 150 (47,1), 125 (27,9) MS ³ [629→553]: 535 (100), 523 (11,0), 413 (10,2), 293 (23,2) MS ⁴ [629→553→535]: 517 (40,2), 503 (18,3), 437 (15,0), 413 (18,0), 412 (39,5), 293 (100), 277 (10,3), 215 (26,6)	Não identificado	Folhas
78	36,1	301	MS ² [301]: 257 (11,6), 229 (22,2), 179 (70,3), 151 (100), 121 (10,3)	Quercetina	Bagas
79	36,7	631	MS ² [631]: 599 (100), 581 (18,9), 555 (21,5), 537 (24,6), 508 (31,2) MS ³ [631→599]: 581 (68,9), 555 (20,8), 537 (34,0), 477 (100), 460 (10,3), 459 (26,9) MS ⁴ [631→599→477]: 462 (48,1), 459 (100), 444 (36,6), 434 (26,0), 403 (30,3), 337 (34,1), 293 (15,1)	Não identificado	Bagas Folhas
80	37,0	327	MS ² [327]: 291 (49,0), 229 (100), 221 (23,7), 211 (49,0), 209 (19,6), 193 (15,0), 171 (76,0), 165 (10,9), 155 (10,4) MS ³ [327→171]: 127 (100), 125 (15,6) MS ⁴ [327→171→127]: 83 (100)	Ácido oxo-di(hidroxi)-octadecanóico	Bagas
81	40,1	329	MS ² [329]: 311 (25,3), 293 (18,7), 229 (100), 211 (74,2), 171 (25,4) MS ³ [329→229]: 213 (17,8), 211 (69,1), 209 (21,8), 193 (20,7), 185 (14,1), 183 (14,1), 171 (19,8), 167 (37,9), 125 (100)	Ácido tri(hidroxi)-octadecanóico	Bagas
82	40,6	629	MS ² [629]: 597 (88,2), 554 (27,6), 553 (100), 535 (32,4) MS ³ [629→597]: 579 (60,9), 567 (13,5), 555 (13,0), 553 (100), 535 (50,1)	Não identificado	Folhas

3.1.4. *Vaccinium padifolium*

Após a análise dos compostos fenólicos, por HPLC-DAD-MSⁿ, da espécie *V. padifolium* foram detectados 89 compostos: 40 foram identificados nas bagas, 60 nas folhas jovens e 58 identificados nas folhas maduras. É de notar que alguns destes compostos encontram-se presentes tanto nas bagas como nas folhas.

Os resultados obtidos desta análise encontram-se representados na **Figura 29** e na Tabela 17. Pela Figura 29 verifica-se que os cromatogramas das bagas e das folhas são muito semelhantes, embora com diferentes intensidades.

Na espécie *V. padifolium* a classe predominante de polifenóis é a dos ácidos hidroxicinâmicos, nomeadamente os ácidos cafeoilquínicos, e derivados do ácido cumárico, entre outros, encontra-se o cumaroil iridoide. Em particular nas bagas, para além dos compostos mencionados foram identificados sacarídeos, derivados dos ácidos orgânicos (ácido málico, ácido quínico e ácido cítrico), bem como alguns flavonóides, particularmente quercetinas, miricetinas e laricitrinas conjugadas. Quanto às folhas, foram também detectados sacarídeos, quercetinas e canferóis conjugados e cinchonina I.

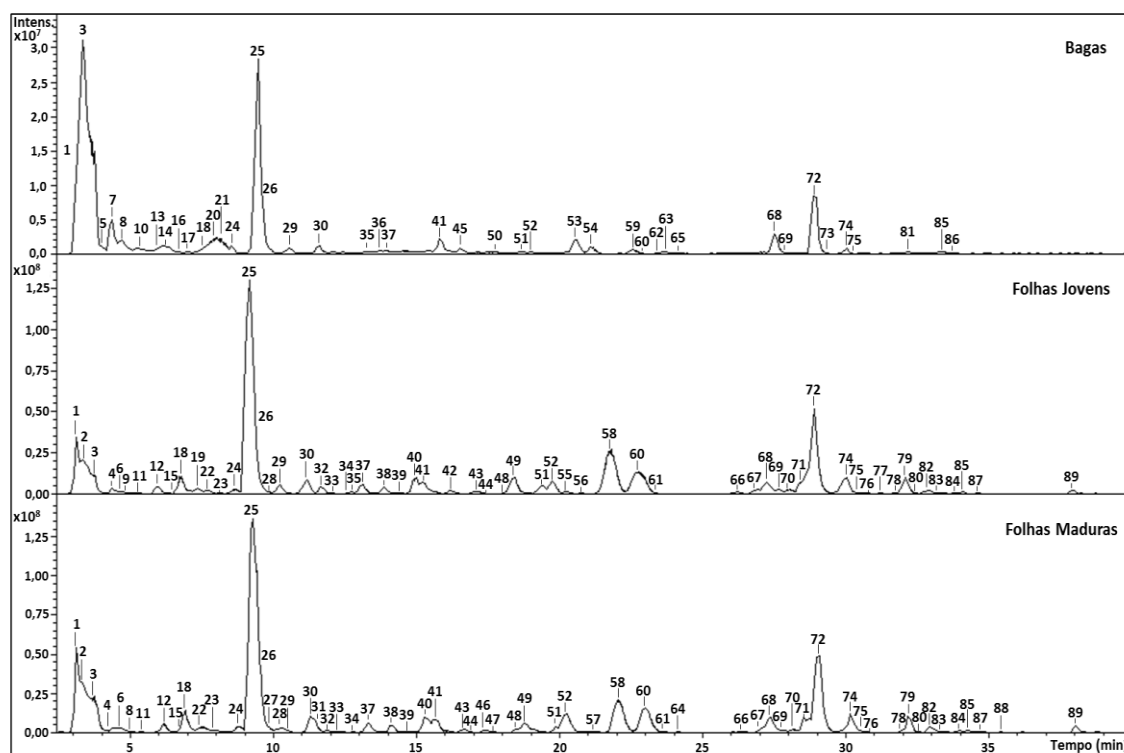


Figura 29 - Cromatogramas da análise do perfil fenólico, por HPLC-DAD-ESI⁻/MSⁿ, dos extractos metanólicos de *Vaccinium padifolium* (bagas e folhas jovens e folhas maduras, respectivamente).

Pela Figura 29, é possível observar que o dímero do ácido cafeoilquínico (**25**) e o derivado do ácido cumárico (**72**), são os compostos com os picos maioritários, tanto nas bagas como nas folhas. Para além deste, outros compostos foram encontrados nas bagas, nomeadamente, o trissacarídeo (**1**) e o derivado do ácido quínico (**3**).

Nas folhas, o polímero da hexose (**1**), a quercetina-*O*-hexósido (**58**) são visivelmente picos intensos, de entre os compostos identificados.

Estes resultados são consistentes com estudos anteriores [138], que reportaram que a maior classe de compostos fenólicos das espécies de *Vaccinium* são os ácidos cafeoilquínicos e os glicósidos da quercetina.

Como referido anteriormente, as folhas jovens, foram as que revelaram um maior número de compostos fenólicos.

Vrhovsek *et al.* (2012) [139], identificaram e quantificaram os flavonóis presentes em diferentes variedades do género de *Vaccinium*. Estes autores reportaram que o flavonol mais abundante foi a quercetina seguida pela mirecitrina, siringentina e laricitrina. Verificaram ainda, níveis baixos de canferóis e isoramnetinas nas espécies estudadas. Toda esta informação vai ao encontro dos resultados obtidos no estudo das bagas de *V. padifolium*.

Jaakola *et al.* (2004) [140] identificaram nas folhas da espécie de *Vaccinium myrtillus* L., derivados do canferol e da quercetina, sendo as quercetinas e miciretinas os compostos maioritários nas bagas. Estes autores reportaram, ainda, que nas folhas jovens, a concentração de flavonóis e de ácidos hidroxicinâmicos conjugados é superior, quando comparado com as folhas maduras e com os frutos.

✓ Ácidos hidroxicinâmicos

Ácido cafeico

Nas amostras estudadas da espécie de *V. padifolium*, foi detectado o composto **24**, que exhibe ião molecular a *m/z* 341 e foi designado por ácido cafeico-*O*-hexósido.

Ácido cumárico

De acordo com a literatura [122], o composto **37**, que apresenta $[M-H]^-$ a m/z 337, foi identificado como ácido cumaroilquínico. Já os compostos **48**, **52** e **54**, exibem ião molecular a m/z 535 e foram caracterizados como isómeros do cumaroil iridoide. Estes compostos foram previamente identificados em extractos de bagas de outras espécies de *Vaccinium* [122].

Outros derivados do ácido cumárico foram detectados nas bagas e folhas desta espécie (compostos **49**, **53**, **61**, **68**, **72**, **74**, **75**, **85** e **88**).

Ácido ferúlico

Os compostos **41** e **47**, apresentam $[M-H]^-$ a m/z 367 e origina os fragmentos a m/z 191, pelo que foram identificados como isómeros do ácido feruloilquínico.

O composto **50**, exhibe $[M-H]^-$ a m/z 355, foi identificado como ácido ferúlico-*O*-hexósido. A fragmentação MS^2 dá origem ao pico base a m/z 193 (perda de 162 Da).

Ácidos cafeoilquínicos

De acordo com a literatura [120], os compostos **26**, **27** e **31**, apresentam ião molecular a m/z 353 e fragmento a m/z 191, foram caracterizados como isómeros do ácido 1-*O*-cafeoilquínico. Os compostos **23** e **56** exibem ião molecular a m/z 353, pelo que foram identificados como derivados do ácido cafeoilquínico.

Já os compostos **12**, **18**, **25** e **30**, mostram o $[M-H]^-$ a m/z 707 e a fragmentação MS^2 dá origem ao pico base a m/z 353. Pelo que, confirma-se a presença de dímeros dos ácidos cafeoilquínicos.

Ácidos hidroxibenzóicos

O composto **15**, apresenta um $[M-H]^-$ a m/z 447, após fragmentação origina o fragmento a m/z 315 (perda de 132 + 162 Da); sendo classificado como protocatecuico-*O*-(pentosil)hexósido.

✓ Flavonóides

Flavonóis

Quercetinas

Nas diferentes partes morfológicas da espécie *V. padifolium*, foram detectados alguns derivados da quercetina. Nomeadamente, a quercetina-*O*-dihexósido (composto **39**), quercetina-*O*-(pentosil)hexósido (composto **44**), quercetina-*O*-rutinósido (composto **51**), quercetina-*O*-hexósido (compostos **58**, **60** e **63**) e seu derivado (composto **42**), quercetina-*O*-pentósido (compostos **66** e **69**), quercetina-*O*-(acetil)hexósido (composto **71** e **76**) e o derivado hidroxi-dimetoxi-quercetina (composto **87**).

O composto **81**, detectado apenas nas bagas, mostra o $[M-H]^-$ a m/z 549. A fragmentação dá origem ao pico base a m/z 345, pela perda de um fragmento de 204 Da, correspondente a um resíduo (acetil)hexósido. As fragmentações seguintes originam a perda de fragmentos de 15 Da, grupos metilo. O composto foi classificado como (trimetoxi)quercetina-*O*-(acetil)hexósido, de acordo com a literatura [141].

Canferol

Alguns derivados do canferol foram encontrados, principalmente, nas folhas jovens e maduras, o canferol-*O*-rutinósido (composto **67**), o canferol-*O*-pentósido (composto **78**), o canferol-*O*-(acetil)hexósido (os compostos **79** e **84**), o canferol-*O*-(malonil)hexósido (o composto **80**), e um derivado do canferol (composto **83**).

Miricetina

Os compostos **45** e **59**, apresentam o ião molecular a m/z 479 e a m/z 463, respectivamente, após a fragmentação ambos os compostos dão origem ao pico base a m/z 317 (miricetina). De acordo com a natureza dos resíduos, os compostos foram classificados como miricetina-*O*-hexósido e miricetina-*O*-ramnósido, respectivamente.

Laricitrina

A laricitrina foi detectada apenas nas bagas. O composto **62** apresenta um ião molecular a m/z 493 e foi classificado como laricitrina-*O*-hexósido [142]. Já o composto **73** exhibe o $[M-H]^-$ a m/z 477 e a fragmentação dá origem ao pico base a m/z 331 pela perda do fragmento de 146 Da. Desta forma, o composto **73** foi identificado como laricitrina-*O*-ramnósido.

Flavanóis

A catequina (composto **32**) é caracterizada pelo seu $[M-H]^-$ a m/z 289 e os seus iões fragmentos característicos a m/z 245, 203 e 187 [104].

Os compostos **19** e **29** apresentam um $[M-H]^-$ a m/z 577 e foram identificados como dímeros de proantocianidinas do tipo B, (epi)-catequina-(epi)-catequina [107]. Foram encontrados maioritariamente nas folhas jovens.

O composto **65**, presente apenas nas bagas, foi classificado como dímero de proantocianidina do tipo A. Apresenta um padrão de fragmentação semelhante aos compostos **19** e **29**, porém exhibe um $[M-H]^-$ a m/z 575. A diferença de 2 Da é devida à existência de duas ligações inter-catequinas [128].

Nas bagas e folhas jovens, foi ainda encontrado um trímero da proantocianidina, o composto **35**, que exhibe o $[M-H]^-$ a m/z 575 [107].

Flavonas

Luteolina

Nas folhas jovens foi detectado um derivado da luteolina, o composto **9**, apresenta um $[M-H]^-$ a m/z 465 e após a fragmentação MS^2 origina a luteolina (a m/z 285).

Nas bagas, detectou-se a luteolina-*O*-hexósido (composto **13**). Este composto apresenta um $[M-H]^-$ a m/z 447, a perda do fragmento de 162 Da origina o pico base a m/z 285, característico da luteolina.

Outras

Os compostos **20**, **21**, **34** e **36**, possuem em comum os fragmentos a m/z 329, 314 e 299, que caracterizam as flavonas [94].

Os compostos **21** e **36**, exibem ião molecular ou o fragmento a m/z 491, foram classificados como isómeros da dihidroxi-dimetoxi-*O*-hexósido flavona, de acordo com a literatura [94]. Já o composto **34**, mostra o $[M-H]^-$ a m/z 539 e foi classificado como derivado dos compostos anteriores. Da mesma forma, o compostos **20**, que exhibe $[M-H]^-$ a m/z 509 foi classificado como trihidroxi-dimetoxi-*O*-hexósido flavona.

✓ **Taninos**

Taninos hidrolisáveis

Nas bagas, foram encontrados vários derivados do ácido elágico, o composto **8**, que apresenta um ião molecular a m/z 481 e a fragmentação dá origem ao pico base a m/z 301. Outro derivado, o composto **10**, exhibe $[M-H]^-$ a m/z 451, foi classificado como ácido tergalélagico [143].

De acordo com a literatura [109], a fragmentação do ião a m/z 315, originando o pico base a m/z 300 e os iões fragmentos a m/z 272, 271 e 244 confirmam a identidade do ácido metilelágico. Então, os compostos **14** e **17**, apresentam os $[M-H]^-$ a m/z 495 e 465, foram identificados como derivados do ácido metilelágico, pelas razões apresentadas. O composto **16**, apresenta um $[M-H]^-$ a m/z 447 e um ião fragmento a m/z 315 (após a perda de 132 Da). Este composto foi designado de ácido metilelágico-*O*-pentósido.

✓ **Lignanós**

De acordo com a literatura [135], o composto **64**, que exhibe $[M-H]^-$ a m/z 579, resultando no fragmento a m/z 417 (perda de 162 Da). Este composto foi classificado como siringaresinol-*O*-hexósido.

✓ **Outros compostos**

Os compostos **55**, **70**, **82**, apresentam o íão molecular a m/z 451, foram classificados como isómeros da cinchonina I. De acordo com a literatura [144], apresenta o padrão de fragmentos característico a m/z 341, 321, 289, 231, 217, 189 e 177, no modo negativo. Este composto foi anteriormente reportado nas folhas de várias espécies de *Vaccinium* [144].

Ainda nas folhas, foram detectados o hidroxitirosol-*O*-hexósido (composto **11**), o protocatecuico-*O*-(pentosil)hexósido (composto **15**) e o roseosídeo (aducto – formato) (composto **28**).

✓ **Sacarídeos**

Os compostos **1**, **4**, **57** foram identificados como sacarídeos. Estes compostos foram detectados nas bagas e folhas jovens e maduras.

✓ **Ácidos orgânicos**

Nas bagas, foram detectados o ácido málico (composto **5**) e um derivado do ácido cítrico (composto **7**). Foi ainda detectado o ácido quínico (composto **3**) nas duas partes morfológicas e, maioritariamente nas folhas, foram detectados vários derivados deste composto (compostos **2**, **6**, **22**, **33**, **38**, **40**, **43** e **77**).

✓ **Não identificados**

Outros compostos **46**, **86** e **89**, foram classificados como não identificados, visto não ter sido possível a sua completa caracterização.

Tabela 17 - Caracterização do perfil fenólico, por HPLC-DAD-ESI⁻/MSⁿ, dos extractos metanólicos das diferentes partes morfológicas (bagas e folhas) de *Vaccinium padifolium*.

Nº	t _R (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	HPLC-DAD-ESI/MS ⁿ m/z (% pico base)	Identificação	Parte morfológica
1	3,2	683	MS ² [683]: 341 (100.0) MS ³ [683→341]: 179 (100.0), 161 (16.5), 143 (26.8), 119 (21.4), 113 (25.9), 101 (13.2) MS ⁴ [683→341→179]: 161 (28.9), 149 (16.9), 143 (62.9), 131 (30.8), 145 (17.2), 119 (39.0), 113 (40.1), 101 (22.7), 89 (100.0)	Polímero da hexose	Bagas Folhas jovens Folhas maduras
2	3,4	533	MS ² [533]: 191 (100) MS ³ [533→191]: 173 (13,5), 127 (100), 111 (32,7), 93 (46,4), 85 (26,8), 83 (26,0)	Derivado do ácido quínico	Folhas jovens Folhas maduras
3	3,5	191	MS ² [191]: 173 (76,9), 171 (13,8), 127 (100), 111 (77,5) MS ³ [191→127]: 109 (100), 85 (22,9)	Ácido quínico	Bagas Folhas jovens Folhas maduras
4	4,0	337	MS ² [337]: 277 (10,6), 225 (14,5), 179 (100), 143 (13,1), 113 (12,0) MS ³ [337→179]: 161 (35,9), 149 (11,6), 143 (76,1), 131 (23,0), 119 (38,8), 114 (10,3), 113 (36,0), 101 (10,4), 89 (100)	Sacarídeo	Folhas jovens Folhas maduras
5	4,1	133	MS ² [133]: 115 (100)	Ácido málico	Bagas
6	4,5	371	MS ² [371]: 353 (36,5), 341 (11,0), 191 (100) MS ³ [371→191]: 173 (40,4), 155 (18,0), 137 (14,7), 127 (100), 111 (33,3), 109 (11,5), 94 (23,4), 93 (67,0), 85 (47,9)	Derivado do ácido quínico	Folhas jovens Folhas maduras
7	4,6	405	MS ² [405]: 191 (100) MS ³ [405→191]: 111 (100), 112 (11,6), 173 (10,8)	Derivado do ácido cítrico	Bagas
8	5,0	481	MS ² [481]: 301 (100), 257 (18,5), 175 (36,9) MS ³ [481→301]: 283 (45,9), 257 (95,7), 239 (88,4), 215 (40,5), 191 (41,0), 175 (85,8)	Derivado do ácido elágico	Bagas
9	5,1	465	MS ² [465]: 285 (100), 241 (42,1)	Derivado da Luteolina	Folhas jovens

			MS ³ [465→285]: 267 (34,9), 243 (16,9), 241 (100), 215 (12,4), 213 (17,8), 149 (52,3)		
10	5,2	451	MS ² [451]: 325 (22,3), 302 (19,3), 301 (100), 257 (11,1), 175 (17,0) MS ³ [451→301]: 283 (47,5), 275 (10,8), 273 (33,6), 259 (100), 258 (43,1), 257 (91,9), 234 (10,5), 233 (74,2), 218 (12,6), 215 (21,6), 191 (22,3), 176 (27,4), 175 (76,5), 149 (88,7) MS ⁴ [451→301→257]: 214 (33,8), 173 (100), 161 (88,1)	Ácido tergalalágico	Bagas
11	5,3	315	MS ² [315]: 153 (100) MS ³ [315→153]: 123 (100), 109 (35,6), 108 (11,7)	Hiroxitirosol-O-hexósido	Folhas jovens Folhas maduras
12	5,9	707	MS ² [707]: 533 (12,9), 515 (29,3), 354 (10,8), 353 (100), 341 (11,8), 323 (14,4) MS ³ [707→353]: 191 (100) MS ⁴ [707→353→191]: 173 (34,6), 171 (43,9), 93 (100), 85 (44,9)	Dímero do Ácido cafeoilquínico	Folhas jovens Folhas maduras
13	6,1	447	MS ² [447]: 301 (10,5), 286 (19,3), 285 (100), 284 (19,3), 243 (11,7) MS ³ [447→285]: 257 (43,8), 243 (95,1), 241 (22,8), 228 (15,3), 198 (17,2), 185 (44,0), 175 (20,3), 164 (20,3), 147 (41,4), 125 (100), 109 (23,7)	Luteolina-O-hexósido	Bagas
14	6,3	495	MS ² [495]: 369 (29,6), 316 (14,8), 315 (100), 300 (10,6) MS ³ [495→315]: 301 (23,3), 300 (100), 273 (20,0), 272 (19,2), 271 (67,7), 256 (19,1), 229 (10,5), 149 (37,1) MS ⁴ [495→315→300]: 283 (19,9), 282 (33,7), 272 (69,3), 257 (100), 244 (38,8), 241 (24,7), 231 (25,9), 228 (27,3), 212 (50,6), 177 (23,7)	Derivado do Ácido metilelágico	Bagas
15	6,7	447	MS ² [447]: 315 (62,8), 153 (100) MS ³ [447→315]: 153 (100), 109 (33,6)	Protocatecuico-O- (pentosil)hexósido	Folhas jovens Folhas maduras
16	6,8	447	MS ² [447]: 357 (11,8), 329 (10,9), 315 (50,8), 315 (100), 301 (28,7), 300 (25,3) MS ³ [447→315]: 358 (15,7), 349 (40,8), 300 (100), 299 (90,6), 299 (79,0), 298 (14,1), 272 (15,5), 271 (17,6), 257 (26,1), 255 (37,8), 215 (10,2), 148 (12,0), 147 (42,9), 137 (17,1) MS ⁴ [447→315→300]: 273 (14,9), 272 (26,0), 271 (40,3), 259 (23,5), 255 (100), 254 (35,0), 244 (43,3), 243 (13,5), 199 (17,2), 176 (16,7)	Ácido metilelágico-O-pentósido	Bagas
17	6,8	465	MS ² [465]: 421 (10,2), 419 (15,1), 340 (16,4), 339 (100), 315 (42,0), 313 (62,7), 302 (13,5), 301 (89,8), 257 (18,1), 175 (89,2), 145 (17,3) MS ⁴ [465→315→300]: 257 (100)	Derivado do Ácido metilelágico	Bagas
18	7,3	707	MS ² [707]: 533 (100), 515 (74,4), 463 (63,6), 353 (38,9), 323 (78,8), 321 (12,6)	Dímero do	Bagas

			MS ³ [707→463]: 289 (80,4), 271 (17,9), 191 (100), 173 (19,4)	Ácido cafeoilquínico	Folhas jovens Folhas maduras
19	7,1	577	MS ² [577]: 451 (21,2), 426 (22,4), 425 (92,7), 408 (16,6), 407 (100), 289 (22,1) MS ³ [577→425]: 407 (100) MS ⁴ [577→425→407]: 297 (18,6), 285 (100), 283 (31,4), 282 (10,6), 270 (14,9), 269 (22,4), 243 (17,3), 227 (21,2)	Dímero de proantocianidina B	Folhas jovens
20	7,6	509	MS ² [509]: 329 (100), 314 (10,5), 261 (15,0), 193 (17,9) MS ³ [509→329]: 314 (100), 299 (18,2), 149 (20,1) MS ⁴ [509→329→314]: 300 (100), 299 (98,3), 286 (14,8), 211 (26,4), 189 (44,9), 150 (51,3)	Trihidroxi-dimetoxi- <i>O</i> -hexósido flavona	Bagas
21	7,7	491	MS ² [491]: 330 (13,4), 329 (100), 328 (12,8) MS ³ [491→329]: 314 (100), 313 (40,5), 299 (15,0), 285 (12,2), 270 (10,1), 147 (10,7) MS ⁴ [491→329→314]: 300 (27,7), 299 (100), 298 (50,7), 271 (25,7), 254 (21,5), 147 (12,2)	Dihidroxi-dimetoxi- <i>O</i> -hexósido flavona	Bagas
22	8,1	533	MS ² [533]: 487 (13,1), 442 (14,9), 360 (17,5), 359 (62,8), 340 (19,2), 315 (16,2), 271 (38,5), 243 (39,4), 242 (20,2), 192 (15,7), 191 (100) MS ³ [533→191]: 127 (100), 96 (72,4), 85 (46,0)	Derivado do ácido quínico	Folhas jovens Folhas maduras
23	7,7	527	MS ² [527]: 353 (34,6), 191 (100) MS ³ [527→353]: 191 (100), 135 (25,1), 127 (15,4)	Derivado do Ácido cafeoilquínico	Folhas jovens Folhas maduras
24	8,3	341	MS ² [341]: 179 (100), 135 (27,2) MS ³ [341→179]: 135 (100)	Ácido cafeico- <i>O</i> -hexósido	Bagas Folhas jovens Folhas maduras
25	9,1	707	MS ² [707]: 353 (100) MS ³ [707→353]: 191 (100) MS ⁴ [707→353→191]: 173 (52,8), 171 (11,6), 128 (10,1), 127 (100), 111 (67,3), 109 (27,0), 93 (39,8), 87 (13,5), 85 (55,5)	Dímero do Ácido cafeoilquínico	Bagas Folhas jovens Folhas maduras
26	9,4	353	MS ² [353]: 191 (100) MS ³ [353→191]: 173 (69), 171 (18,3), 128 (13,1), 127 (82,8), 111 (63,2), 109 (25,8), 99 (11,3), 94 (11,8), 93 (48,4), 87 (25,7), 85 (100), 71 (16,7) MS ⁴ [353→191→127]: 109 (100), 99 (14,7), 85 (62,2)	Ácido 1- <i>O</i> -cafeoilquínico	Bagas Folhas jovens Folhas maduras
27	9,6	353	MS ² [353]: 191 (100) MS ³ [353→191]: 173 (10,,0), 171 (57,5), 155 (91,2), 127 (98,3), 111 (44,4), 109	Isómero do Ácido 1- <i>O</i> -cafeoilquínico	Folhas maduras

			(12,3), 98,9 (31,2), 93 (41,4), 87 (46,2), 85 (84), 69 (18,6) MS ⁴ [353→191→127]: 83 (100)		
28	10,0	431	MS ² [431]: 386 (21,4), 385 (100) MS ³ [431→385]: 223 58,9(, 205 (66,0), 161 (38,5), 159 (10,0), 153 (100) MS ⁴ [431→385→153]: 138 (100), 137 (89,3), 136 (40,5)	Roseosídeo (Aducto – Formato)	Folhas jovens Folhas maduras
29	10,3	577	MS ² [577]: 451 (19,0), 426 (17,6), 425 (100), 408 (16,6), 407 (84,3), 289 (21,1) MS ³ [577→407]: 389 (100), 298 (72,1), 267 (16,3) MS ⁴ [577→425→407]: 389 (17,0), 297 (15,6), 285 (100), 284 (13,6), 283 (18,9), 282 (17,8), 281 (83,2), 269 (11,3), 256 (18,7), 255 (20,8), 243 (18,3)	Dímero de proantocianidina B	Bagas Folhas jovens Folhas maduras
30	10,8	707	MS ² [707]: 354 (13,9), 353 (100) MS ³ [707→353]: 191 (100) MS ⁴ [707→353→191]: 390 (10,0), 389 (47,1), 321 (19,5), 297 (13,7), 297 (26,6), 286 (24,5), 285 (173 (73,6), 171 (10,9), 127 (100), 111 (33,4), 109 (48,2), 93 (39,2), 85 (53,6), 83 (12,3)	Dímero do Ácido cafeoilquínico	Folhas maduras
31	11,1	353	MS ² [353]: 191 (100) MS ³ [353→191]: 173 (49,4), 171 (19,2), 145 (11,1), 127 (100), 111 (63,5), 109 (40,1), 93 (43,3), 85 (55,2)	Isómero do Ácido 1- <i>O</i> -cafeoilquínico	Bagas Folhas jovens Folhas maduras
32	11,6	289	MS ² [289]: 246 (11,1), 245 (100), 205 (37,6), 203 (15,1), 179 (13,6), 125 (11,1) MS ³ [289→245]: 227 (20,2), 204 (19,4), 203 (100), 188 (31,7), 187 (29,3), 175 (16,9), 162 (11,1), 161 (23,1)	Catequina	Folhas jovens Folhas maduras
33	11,8	517	MS ² [517]: 473 (25,0), 343 (50,9), 255 (34,9), 191 (100) MS ³ [517→191]: 173 (100), 127 (54,6), 113 (26,7), 109 (51,3), 88 (55,3), 81,1 (14,7)	Derivado do ácido quínico	Folhas jovens Folhas maduras
34	12,1	539	MS ² [539]: 491 (100) MS ³ [539→491]: 329 (100), 314 (29,2), 285 (10,9), 235 (18,0), 182 (16,4) MS ⁴ [539→491→329]: 314 (42,1), 263 (100), 164 (33,6)	Derivado da Dihidroxi-dimetoxi- <i>O</i> -hexósido flavona	Folhas jovens Folhas maduras
35	12,7	865	MS ² [865]: 847 (10,9), 739 (40,9), 695 (100), 578 (23,8), 577 (79,2), 575 (33,0), 543 (31,0), 525 (11,8), 451 (49,7), 449 (27,1), 425 (24,1), 408 (10,4), 407 (64,6), 405 (24,6), 289 (12,2), 287 (39,7) MS ³ [865→695]: 676 (24,4), 677 (54,8), 658 (25,3), 568 (17,2), 543 (100), 529 (30,6), 526 (31,7), 525 (97,6), 451 (33,0), 407 (22,3), 405 (14,9), 391 (13,7), 363 (21,5), 289 (13,1), 256 (31,9), 243 (84,5) MS ⁴ [865→695→525]: 403 (100), 361 (50,0)	Trímero de proantocianidina	Bagas Folhas jovens

36	12,8	491	MS ² [491]: 329 (100), 330 (24,1), 331 (10,9), 345 (27,3) MS ³ [491→329]: 147 (14,3), 148 (24,5), 161 (10,2), 270 (35,7), 271 (11,6), 271 (11,8), 285 (18,6), 299 (19,6), 313 (100), 315 (27,3) MS ⁴ [491→329→313]: 271 (18,0), 283 (15,0), 298 (23,8), 299 (100), 300 (10,1) MS ³ [491→329]: 257 (17,3), 285 (32,1), 288 (45,3), 314 (66,2), 313 (100) MS ⁴ [493→329→313]: 227 (69,5), 298 (10,0), 299 (100)	Dihidroxi-dimetoxi- <i>O</i> -hexósido flavona	Bagas
37	13,0	337	MS ² [337]: 191 (100) MS ³ [337→191]: 173 (27,3), 171 (19,3), 127 (100), 111 (17,2), 109 (39,1), 93 (37,3), 85 (57,7) MS ⁴ [337→191→127]: 111 (16,8), 109 (100)	Ácido cumaroilquínico	Bagas Folhas jovens Folhas maduras
38	13,8	791	MS ² [791]: 680 (31,9), 679 (100), 619 (37,0), 589 (11,3), 517 (38,5) MS ³ [791→679]: 619 (35,3), 589 (12,6), 559 (17,7), 518 (19,1), 517 (100), 473 (13,2), 353 (15,8), 191 (11,5) MS ⁴ [792→679→517]: 474 (22,1), 473 (100), 191 (80,9), 173 (14,2)	Derivado do ácido quínico	Folhas jovens Folhas maduras
39	14,2	625	MS ² [625]: 505 (11,2), 463 (27,8), 445 (37,8), 369 (11,4), 368 (14,0), 356 (10,5), 343 (12,6), 301 (100), 273 (11,3), 272 (10,4), 271 (20,6), 255 (11,2), 179 (14,0) MS ³ [625→300]: 273 (26,5), 272 (74,8), 271 (85,3), 257 (34,0), 255 (20,4), 255 (21,2), 229 (52,4), 193 (43,8), 179 (100), 151 (55,3)	Quercetina- <i>O</i> -dihexósido	Folhas jovens Folhas maduras
40	15,0	791	MS ² [791]: 680 (33,7), 679 (100), 620 (20,5), 619 (63,6), 589 (20,7), 559 (16,0), 517 (38,4) MS ³ [792→679]: 620 (26,4), 619 (100), 589 (74,3), 559 (37,6), 518 (15,8), 517 (86,1), 227 (11,8), 191 (20,9) MS ⁴ [792→679→517]: 473 (55,2), 343 (48,0), 255 (67,6), 191 (100), 173 (21,3)	Derivado do ácido quínico	Folhas jovens Folhas maduras
41	15,3	367	MS ² [367]: 191 (14,8), 179 (100), 161 (12,0), 135 (47,3) MS ³ [367→179]: 135 (100)	Ácido feruloilquínico	Bagas Folhas jovens Folhas maduras
42	15,9	635	MS ² [635]: 463 (100), 301 (12,9) MS ³ [635→463]: 301 (100), 151 (45,1)	Derivado da quercetina- <i>O</i> -hexósido	Folhas jovens
43	16,3	791	MS ² [791]: 680 (32,4), 679 (100), 620 (18,7), 619 (57,4), 589 (15,3), 559 (15,3), 518 (10,8), 517 (48,4) MS ³ [791→679]: 621 (15,2), 620 (11,0), 619 (100), 590 (10,7), 589 (19,2), 559 (23,7), 518 (33,1), 517 (78,3), 191 (15,6) MS ⁴ [791→679→619]: 560 (29,7), 560 (29,9), 559 (84,4), 517 (56,1), 343 (66,9),	Derivado do ácido quínico	Folhas jovens Folhas maduras

			341 (20,0), 325 (11,8), 289 (28,4), 226 (31,8), 191 (100), 173 (17,3)		
44	16,4	595	MS ² [595]: 463 (34,3), 344 (12,6), 301 (58,5), 300 (100), 272 (11,7), 271 (15,8), 255 (25,9) MS ³ [595→300]: 273 (12,3), 272 (24,4), 271 (100), 257 (29,9), 256 (28,5), 255 (25,5), 151 (86,9)	Quecercina- <i>O</i> -(pentosil)hexósido	Folhas jovens Folhas maduras
45	16,9	479	MS ² [479]: 318 (11,6), 317 (62,2), 316 (100) MS ³ [479→317]: 299 (10,4), 287 (25,1), 273 (17,8), 272 (23,5), 271 (95,2), 270 (35,7), 192 (11,1), 179 (100), 151 (22,8), 107 (16,4)	Miricetina- <i>O</i> -hexósido	Bagas
46	17,2	739/40	MS ² [740]: 629 (15,9), 588 (31,6), 587 (100), 569 (32,1), 459 (16,9), 451 (12,9), 449 (18,9), 435 (33,1), 417 (17,3), 339 (28,4), 289 (16,4) MS ³ [740→588]: 570 (48,6), 569 (49,3), 525 (11,2), 478 (19,7), 477 (30,2), 477 (10,6), 460 (38,2), 459 (46,3), 449 (33,1), 448 (23,3), 447 (13,5), 436 (23,4), 435 (74,0), 433 (21,8), 418 (26,4), 417 (100), 405 (19,3), 339 (63,1), 240 (10,8), 229 (40,3), 217 (19,8), 203 (16,9), 177 (35,9) MS ⁴ [740→588→417]: 345 (50,2), 314 (30,0), 308 (37,3), 307 (59,6), 255 (100)	Não identificado	Folhas maduras
47	17,9	367	MS ² [367]: 179 (100), 135 (57,8), 134 (16,1) MS ³ [367→179]: 135 (100)	Ácido feruloilquínico	Folhas maduras
48	18,2	535	MS ² [535]: 491 (31,0), 373 (53,9), 371 (95,2), 329 (100), 327 (10,4), 311 (30,5), 239 (27,2), 191 (75,1), 179 (10,8), 165 (42,5), 164 (25,8), 163 (90,8) MS ³ [535→371]: 208 (19,4), 191 (28,9), 165 (33,0), 163 (30,6), 147 (60,7), 136 (100), 135 (36,9), 122 (24,3), 119 (42,0)	Cumaroil iridoide	Folhas jovens Folhas maduras
49	18,4	455	MS ² [455]: 326 (10,3), 325 (42,5), 266 (10,4), 265 (99,3), 235 (100), 205 (12,3), 163 (27,2) MS ³ [455→235]: 163 (100), 118 (10,5) MS ³ [455→265]: 206 (12,2), 205 (100), 163 (59,8), 161 (48,4), 145 (22,2), 119 (24,9) MS ⁴ [455→265→205]: 162 (15,6), 161 (100), 133 (10,0)	Derivado do ácido cumárico	Folhas jovens Folhas maduras
50	19,0	355	MS ² [355]: 194 (11,5), 193 (100) MS ³ [355→193]: 162 (35,8), 134 (100)	Ácido ferúlico- <i>O</i> -hexósido	Bagas
51	19,5	609	MS ² [609]: 302 (12,0), 301 (100), 300 (30,3) MS ³ [609→301]: 273 (12,0), 272 (16,3), 271 (23,7), 255 (14,2), 193 (10,6), 179 (83,1), 151 (100), 107 (16,3)	Quercetina- <i>O</i> -rutinósido	Bagas Folhas jovens Folhas maduras

52	19,8	535	MS ² [535]: 491 (13,0), 373 (52,5), 372 (18,4), 371 (73,5), 330 (15,9), 329 (95,0), 311 (28,6), 267 (11,4), 239 (15,9), 191 (100), 166 (13,6), 165 (54,3), 164 (11,5), 163 (92,1) MS ³ [535→329]: 267 (41,7), 165 (86,7), 164 (12,2), 163 (100), 147 (18,2), 145 (13,2), 123 (19,0), 119 (26,1)	Isómero do Cumaroil iridoide	Bagas Folhas jovens Folhas maduras
53	19,9	455	MS ² [455]: 325 (43,7), 265 (79,1), 235 (100), 205 (18,1), 163 (25,7) MS ³ [455→235]: 164 (18,5), 163 (100) MS ⁴ [455→235→163]: 120 (17,3), 119 (100)	Derivado do ácido cumárico	Bagas
54	20,2	535	MS ² [535]: 491 (10,7), 373 (38,4), 372 (18,1), 371 (100), 330 (12,9), 329 (67,2), 311 (13,0), 267 (12,5), 191 (62,7), 165 (40,9), 163 (95,3) MS ³ [535→372]: 329 (54,7), 327 (20,9), 191 (29,6), 165 (100), 149 (12,6), 148 (14,3), 147 (10,5), 147 (60,1), 135 (22,4), 123 (12,2), 121 (24,5), 119 (11,7)	Isómero do Cumaroil iridoide	Bagas
55	20,4	451	MS ² [451]: 315 (15,4), 341 (100) MS ³ [451→341]: 323 (13,2), 297 (12,5), 232 (12,2), 231 (31,8), 229 (10,3), 219 (35,6), 218 (11,6), 217 (100), 189 (27,7), 177 (30,8) MS ⁴ [451→341→217]: 191 (79,1), 190 (67,5), 189 (100), 147 (21,3), 146 (10,1)	Cinchonina I	Folhas jovens
56	20,5	689	MS ² [689]: 527 (100), 353 (48,4) MS ³ [689→527]: 353 (76,6), 191 (100), 179 (23,8), 173 (26,6)	Derivado do Ácido cafeoilquínico	Folhas jovens
57	20,9	415	MS ² [415]: 180 (13,5), 179 (100), 161 (13,7) MS ³ [415→179]: 161 (25,1), 143 (42,9), 131 (42,6), 119 (52,2), 113 (24,2), 101 (94,0), 89 (100)	Sacarídeo	Folhas maduras
58	21,5	463	MS ² [463]: 302 (19,4), 301 (100), 300 (30,5) MS ³ [463→301]: 272 (15,1), 271 (31,7), 255 (16,6), 179 (100), 151 (83,4) MS ⁴ [463→301→179]: 169 (14,8), 151 (100)	Quercetina- <i>O</i> -hexósido	Folhas jovens Folhas maduras
59	21,6	463	MS ² [463]: 317 (55,5), 316 (100) MS ³ [463→317]: 287 (22,8), 272 (36,1), 271 (74,1), 270 (45,7), 242 (11,1), 242 (11,8), 179 (100), 151 (29,5), 137 (24,6) MS ⁴ [463→317→179]: 151 (100)	Miricetina- <i>O</i> -ramnósido	Bagas
60	22,6	463	MS ² [463]: 302 (18,3), 301 (100), 300 (19,9) MS ³ [463→301]: 273 (13,8), 271 (15,5), 255 (12,9), 179 (93,7), 151 (100), 107 (14,3) MS ⁴ [463→301→151]: 169 (47,0), 107 (100)	Quercetina- <i>O</i> -hexósido	Bagas Folhas jovens Folhas maduras
61	23,3	535	MS ² [535]: 517 (11,5), 503 (10,9), 473 (17,0), 371 (23,2), 355 (100), 354 (26,9),	Derivado do ácido cumárico	Folhas jovens

			349 (27,2), 329 (70,2), 312 (11,2), 311 (36,1), 307 (21,6), 285 (18,5), 245 (11,3), 239 (11,0), 201 (32,8), 189 (18,3), 163 (16,3), 156 (18,4), 147 (22,6) MS ³ [535→355]: 163 (96,3), 163 (100), 147 (18,7)		Folhas maduras
62	23,8	493	MS ² [493]: 475 (14,2), 343 (21,2), 331 (100), 330 (42,3), 315 (13,5), 151 (13,3) MS ³ [493→331]: 316 (100), 301 (23,8), 299 (93,8), 271 (25,0), 179 (26,0), 151 (56,6) MS ⁴ [493→331→316]: 299 (13,9), 271 (66,9), 258 (85,8), 244 (45,8), 179 (100), 151 (10,8)	Laricitrina-O-hexósido	Bagas
63	24,1	463	MS ² [463]: 301 (100), 300 (27,1), MS ³ [463→301]: 273 (10,4), 271 (27,8), 257 (28,7), 256 (14,4), 256 (11,6), 255 (23,4), 229 (20,0), 179 (100), 151 (45,7), 107 (27,8) MS ⁴ [463→301→179]: 169 (55,5), 151 (100), 107 (50,3)	Quercetina-O-hexósido	Bagas
64	24,3	579	MS ² [579]: 418 (20,9), 417 (100) MS ³ [579→417]: 402 (19,0), 181 (100), 166 (30,8), 151 (17,3) MS ⁴ [579→417→181]: 167 (16,3), 166 (100)	Siringaresinol-O-hexósido	Folhas maduras
65	24,4	575	MS ² [575]: 449 (100), 424 (21,8), 423 (46,9), 289 (10,4), 285 (17,4) MS ³ [575→449]: 287 (100)	Dímero de proantocianidina do tipo A	Bagas
66	26,1	433	MS ² [433]: 301 (18,8), 301 (100), 300 (16,9) MS ³ [433→301]: 273 (11,9), 271 (17,9), 229 (12,5), 179 (100), 151 (68,3), 107 (18,6)	Quercetina-O-pentósido	Folhas jovens Folhas maduras
67	26,7	593	MS ² [593]: 286 (11,2), 285 (100) MS ³ [593→285]: 257 (100), 255 (32,8), 241 (19,8), 229 (34,6), 227 (17,6), 223 (12,3), 213 (29,7), 199 (31,1), 197 (30,6), 195 (18,6), 169 (13,7), 165 (14,4), 151 (13,7), MS ⁴ [593→285→257]: 255 (10,2), 229 (100), 203 (16,6), 173 (18,7), 164 (12,1)	Canferol-O-rutinósido	Folhas jovens Folhas maduras
68	27,0	469	MS ² [469]: 326 (11,9), 325 (86,6), 265 (90,9), 235 (100), 163 (17,8) MS ³ [469→235]: 163 (100) MS ⁴ [469→235→163]: 120 (11,0), 119 (100)	Derivado do ácido cumárico	Bagas Folhas jovens Folhas maduras
69	27,3	433	MS ² [433]: 302 (18,0), 301 (100), 300 (92,7) MS ³ [433→301]: 273 (11,4), 272 (38,0), 271 (100), 256 (15,9), 255 (62,7), 179 (78,7), 151 (95,5) MS ⁴ [433→301→271]: 245 (32,8), 243 (23,1), 229 (100), 227 (14,7), 211 (24,0), 199 (13,0), 185 (13,0), 163 (18,5), 158 (10,7)	Quercetina-O-pentósido	Bagas Folhas jovens Folhas maduras

70	27,5	451	MS ² [451]: 342 (16,2), 341 (100), 217 (10,6) MS ³ [451→341]: 231 (31,9), 219 (37,0), 218 (11,3), 217 (100), 189 (20,6), 177 (20,2) MS ⁴ [451→341→217]: 191 (59,0), 189 (100), 147 (18,7)	Cinchonina I	Folhas jovens Folhas maduras
71	28,4	505	MS ² [505]: 463 (23,7), 302 (14,3), 301 (100), 300 (51,4) MS ³ [505→301]: 273 (13,3), 271 (33,8), 256 (10,1), 255 (28,8), 179 (69), 151 (100) MS ⁴ [505→301→151]: 167 (46,1), 107 (100)	Quercetina- <i>O</i> -(acetil)hexósido	Folhas jovens Folhas maduras
72	28,7	437	MS ² [437]: 325 (47,2), 266 (10,2), 265 (94,8), 235 (100), 163 (25,3) MS ³ [437→235]: 163 (100) MS ⁴ [437→235→163]: 119 (100)	Derivado do ácido cumárico	Bagas Folhas jovens Folhas maduras
73	29,8	477	MS ² [477]: 437 (10,2), 331 (100), 315 (13,1), 287 (14,6), 271 (10,1) MS ³ [477→331]: 316 (100), 298 (12,4), 287 (10,8), 272 (11,6), 151 (13,1) MS ⁴ [477→331→316]: 287 (100), 179 (89,3)	Laricitrina- <i>O</i> -ramnósido	Bagas
74	30,0	437	MS ² [437]: 325 (66,6), 265 (69,0), 235 (100), 163 (25,5) MS ³ [437→235]: 163 (100), 119 (11,1) MS ⁴ [437→235→163]: 119 (100)	Derivado do ácido cumárico	Bagas Folhas jovens Folhas maduras
75	30,1	473	MS ² [473]: 438 (20,3), 437 (100), 325 (58,2), 265 (19,2), 235 (41,0) MS ³ [473→437]: 325 (78,6), 265 (87,5), 236 (20,3), 235 (100), 205 (14,2), 163 (23,2) MS ⁴ [473→437→235]: 163 (100), 119 (13,5)	Derivado do ácido cumárico	Bagas Folhas jovens Folhas maduras
76	30,4	505	MS ² [505]: 463 (17,7), 446 (13,6), 445 (82,8), 302 (19,9), 301 (100), 300 (82,5), 271 (12,1) MS ³ [505→301]: 272 (49,0), 271 (100), 257 (21,5), 256 (15,5), 255 (47,1), 227 (11,1), 193 (19,0), 179 (37,6), 151 (71,4) MS ⁴ [505→301→151]: 107 (100)	Quercetina- <i>O</i> -(acetil)hexósido	Folhas jovens Folhas maduras
77	31,1	791	MS ² [791]: 629 (100), 465 (11,4) MS ³ [791→629]: 455 (53,2), 325 (38,9), 265 (24,0), 191 (68,7), 173 (21,0)	Derivado do ácido quínico	Folhas jovens
78	31,8	417	MS ² [417]: 285 (100) MS ³ [417→285]: 267 (24,1), 257 (54,9), 255 (100), 240 (79,3), 228 (39,0), 200 (74,8)	Canferol- <i>O</i> -pentósido	Folhas jovens Folhas maduras
79	31,9	489	MS ² [489]: 286 (15,0), 285 (100) MS ³ [489→285]: 267 (36,5), 258 (12,3), 257 (100), 256 (16,8), 255 (20,6), 241	Canferol- <i>O</i> -(acetil)hexósido	Folhas jovens Folhas maduras

			(27,6), 239 (20,2), 229 (39,4), 223 (14,0), 213 (27,0), 199 (17,9), 195 (11,8), 185 (11,1), 169 (10,9), 163 (60,2)		
80	32,4	533	MS ² [533]: 489 (100) MS ³ [533→489]: 285 (100), 267 (18,9), 257 (1,0), 241 (12,6), 229 (41,1), 213 (10,7), 167 (12,3)	Canferol-O-(malonil)hexósido	Folhas jovens Folhas maduras
81	32,9	549	MS ² [549]: 346 (18,4), 345 (100), 344 (10,7), 330 (18,4) MS ³ [549→345]: 330 (100), 316 (11,4), 316 (11,3), 315 (42,5) MS ⁴ [549→345→330]: 315 (100), 301 (16,2), 285 (15,6), 271 (19,1)	Trimetoxi-quercetina-O-(acetil)hexósido	Bagas
82	32,9	451	MS ² [451]: 342 (17,3), 341 (100) MS ³ [451→341]: 323 (10,1), 297 (12,4), 289 (12,1), 231 (21,0), 219 (33,6), 218 (14,8), 217 (100), 189 (17,5), 177 (20,8) MS ⁴ [451→341→217]: 191 (62,3), 190 (17,0), 189 (100)	Cinchonina I	Folhas jovens Folhas maduras
83	32,9	613	MS ² [613]: 504 (29,9), 503 (100), 451 (10,4), 393 (18,8), 341 (14,0) MS ³ [613→503]: 394 (16,1), 393 (100), 379 (12,9), 351 (13,7), 342 (11,9), 341 (73,8), 217 (14,4) MS ⁴ [613→503→393]: 375 (30,7), 351 (22,0), 285 (22,3), 284 (100), 269 (28,8), 255 (19,9), 243 (20,1), 242 (67,5), 229 (35,8), 214 (30,3)	Derivado do Canferol	Folhas jovens Folhas maduras
84	33,4	489	MS ² [489]: 429 (48,8), 286 (17,1), 285 (100), 284 (29,1), 255 (12,9) MS ³ [489→285]: 267 (29,1), 257 (94,8), 256 (10,5), 255 (11,3), 255 (100), 229 (52,8), 213 (12,7), 213 (21,1), 199 (16,6), 197 (12,0), 195 (11,8), 195 (12,3), 192 (11,6), 169 (13,7), 164 (19,0), 163 (26,0), 143 (11,0) MS ⁴ [489→285→255]: 229 (100) MS ⁴ [489→285→257]: 171 (100), 170 (51,2)	Canferol-O-(acetil)hexósido	Folhas jovens Folhas maduras
85	33,9	471	MS ² [471]: 308 (11,9), 307 (100), 163 (13,4), 145 (21,1) MS ³ [471→307]: 205 (12,6), 163 (28,3), 145 (100), 119 (11,7)	Derivado do ácido cumárico	Bagas Folhas jovens Folhas maduras
86	34,0	439	MS ² [439]: 424 (100), 395 (46,5), 371 (23,6), 360 (24,8), 359 (44,5), 344 (15,6), 313 (16,4), 302 (26,2), 267 (30,7), 175 (21,4), 171 (17,0) MS ³ [439→359]: 108 (100)	Não identificado	Bagas
87	34,5	585	MS ² [585]: 539 (11,7), 538 (32,1), 537 (62,7), 372 (16,7), 372 (13,7), 371 (47,2), 359 (32,0), 358 (19,2), 357 (26,3), 346 (24,3), 345 (100), 344 (12,7), 342 (15,8) MS ³ [585→345]: 330 (100), 315 (11,2), 180 (11,7) MS ⁴ [585→345→330]: 316 (100), 315 (49,2), 313 (19,3), 297 (90,2), 272 (10,2),	Derivado da Hidroxi-dimetoxi-quercetina	Folhas jovens Folhas maduras

			256 (35,8), 225 (22,4), 212 (47,0)		
88	35,5	479	MS ² [479]: 307 (100), 289 (11,6), 265 (11,6), 235 (44,8), 163 (54,2), 145 (10,4) MS ³ [479→307]: 259 (17,1), 235 (31,4), 217 (19,7), 215 (15,6), 163 (100), 162 (10,6), 119 (18,1)	Derivado do ácido cumárico	Folhas maduras
89	38,0	763	MS ² [763]: 344 (13,6), 343 (100), 328 (11,4) MS ³ [763→343]: 329 (17,1), 328 (100) MS ⁴ [763→343→328]: 224 (11,0), 211 (99,0), 183 (100), 164 (28,4), 151 (34,6), 138 (16,6)	Não identificado	Folhas jovens Folhas maduras

3.1.5. *Vaccinium cylindraceum*

A análise do perfil fenólico, por HPLC-DAD-MSⁿ no modo de ionização negativa, da espécie *V. cylindraceum*, encontra-se representada na Figura 30 e Tabela 18. Verifica-se que foram detectados 86 compostos, dos quais, 38 compostos foram identificados nas bagas e 59 compostos identificados nas folhas.

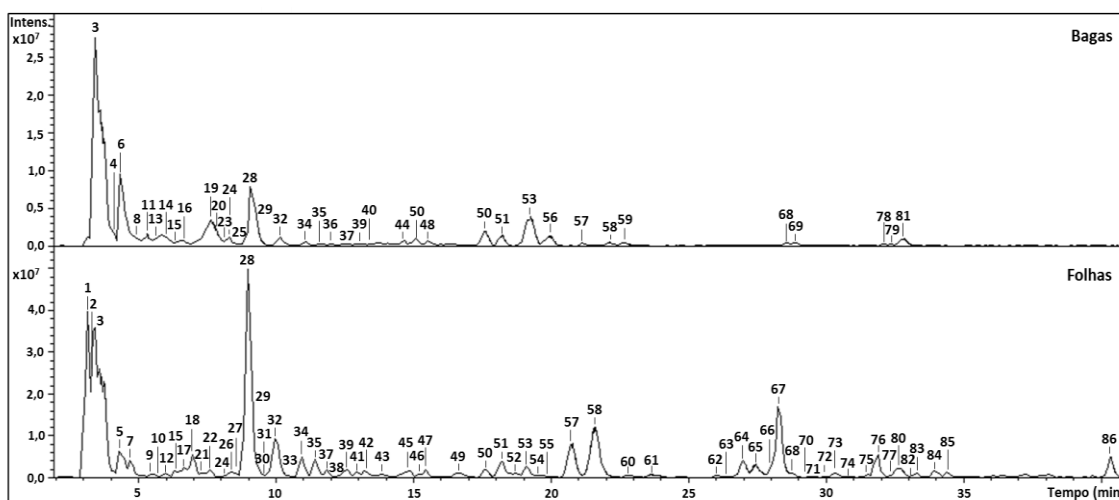


Figura 30 - Cromatogramas da análise do perfil fenólico, por HPLC-DAD-ESI⁻/MSⁿ, dos extractos metanólicos de *Vaccinium cylindraceum* (bagas e folhas, respectivamente).

Nas bagas, as classes de compostos predominantes foram a dos flavonóides, principalmente as quercetinas conjugadas, e os derivados do ácido cafeoilquínico, bem como os ácidos orgânicos (derivados dos ácidos cítrico, quínico e málico), derivados do ácido elágico e flavonas.

Nas folhas, os ácidos hidroxicinâmicos, especialmente dos ácidos cafeoilquínicos e derivados do ácido cumárico foram os compostos com maior representatividade. No caso dos flavonóides, verificou-se grande frequência dos conjugados da quercetina e do canferol.

Os compostos maioritários, identificados nas bagas, foram o ácido quínico (**3**), o ácido cítrico (**6**), o dímero do ácido cafeoilquínico (**28**) e um derivado do ácido cumárico (**53**). Quanto às folhas, o polímero da hexose (**1**), o ácido quínico (**3**), o dímero do ácido cafeoilquínico (**28**), os isómeros da quercetina-O-hexósido (**57** e **58**) e o canferol-O-hexósido (**67**) foram maioritários.

✓ Ácidos hidroxicinâmicos

Ácido cafeico

Nas diferentes partes morfológicas da amostra estudada, foram encontrados alguns conjugados do ácido cafeico, particularmente ácido cafeico-*O*-hexósido (composto **24**), e outros derivados (compostos **38** e **50**).

O composto **36**, presente nas bagas, apresenta $[M-H]^-$ a m/z 335 e a fragmentação originada é compatível com a perda da molécula de H_2O da molécula do ácido cafeoilquínico (ião molecular a m/z 353). O ácido quínico desidratado (ácido chiquímico, massa molecular 174 Da) pode criar esterificação com o ácido cafeico e originar o ácido cafeoilchiquímico [145].

Ácido cumárico

Foram detectados alguns derivados do ácido cumárico na espécie *V. cylindraceum* (compostos **50**, **53**, **61**).

Os compostos **41** e **45** exibem iões moleculares a m/z 337, cujas fragmentações dão origem aos fragmentos a m/z 191. De acordo com a literatura [107], estes compostos foram identificados como ácido coumaroilquínico.

Ácido ferúlico

O composto **71** foi classificado como derivado do ácido ferúlico, por apresentar os fragmentos característicos a m/z 193 e 149.

Ácidos cafeoilquínicos

Os ácidos cafeoilquínicos presentes na *V. cylindraceum* são o ácido 4-*O*-cafeoilquínico (composto **4**), detectado nas bagas, e o ácido 1-*O*-cafeoilquínico (compostos **29** e **34**).

Os compostos **12**, **17** e **28**, mostram $[M-H]^-$ a m/z 707, são caracterizados como dímeros do ácido cafeoilquínico.

✓ Ácidos hidroxibenzóicos

O composto **15** apresenta um $[M-H]^-$ a m/z 315, cuja fragmentação é corroborativa com o ácido protocatecuico-*O*-hexósido [104]. Já o composto **22** foi identificado como derivado do ácido protocatecuico.

✓ Flavonóides

Flavonóis

Quercetinas

A presença da quercetina já foi discutida nas amostras anteriores. Na espécie *V. cylindraceum* foram, também detectados derivados da quercetina, tais como, a quercetina-*O*-rutinósido (composto **52**), a quercetina-*O*-hexósido (composto **57**, **58**), a quercetina-*O*-pentósido (composto **63** e **65**), a quercetina-*O*-(acetil)hexósido (compostos **66** e **72**), a quercetina-*O*-ramnósido (composto **68**) e a dimetoxiquercetina-*O*-ramnósido (composto **79**).

O composto **69**, mostra $[M-H]^-$ a m/z 507, foi identificado como hidroxidimetoxiquercetina-*O*-hexósido, de acordo com a literatura [146]. Da mesma forma, os compostos **79** e **85** foram identificados como derivados da hidroxidimetoxiquercetina-*O*-hexósido.

Canferol

Nas amostras de *V. cylindraceum* foram encontrados o canferol-*O*-rutinósido (composto **62**), canferol-*O*-hexósido (composto **67**), canferol-*O*-(acetil)hexósido (compostos **76** e **82**) e canferol-*O*-(malonil)hexósido (composto **77**).

Isoramnetina

Pelo que foi referido anteriormente, o composto **70** exhibe $[M-H]^-$ a m/z 477 e foi classificado como isoramnetina-*O*-hexósido.

Miricetina

Nas bagas de *V. cylindraceum* foram detectados os compostos **48** e **56**, apresentam $[M-H]^-$ a m/z 479 e 463, respectivamente, foram caracterizados como miricetina-*O*-hexósido e miricetina-*O*-ramnósido, respectivamente.

Flavanóis

A catequina, (composto **35**) e o seu derivado (composto **33**), foram detectados nas folhas.

Alguns compostos detectados na espécie de *V. padifolium* foram também detectados na espécie de *V. cylindraceum*. Nomeadamente, os dímeros de proantocianina do tipo B (compostos **18**, **26**, **32**, **43** e **47**), o dímero de proantocianina do tipo A (composto **59**), os trímeros de proantocianina B (composto **39** e **52**).

Flavonas

Nas bagas, foi detectado um derivado da viscidulina III (composto **25**). De acordo com a literatura [147], a viscidulina III apresenta $[M-H]^-$ a m/z 345 e a fragmentação MS² origina fragmentos a m/z 330, 315, 299, 287, 165, 149, 139, 137.

Contrariamente à espécie de *V. padifolium*, as bagas da espécie *V. cylindraceum* são, particularmente, ricas em flavonas. Os compostos **19**, **20**, **23**, **37** e **40** apresentam os fragmentos típicos a m/z 329, 314 e 299, que caracterizam esta subclasse dos flavonóides.

✓ Taninos

O composto **13**, presente nas bagas, apresenta um $[M-H]^-$ a m/z 447 e a fragmentação MS² produziu o ácido elágico a m/z 301 (pela perda de 146 Da). De acordo com Kajdžanoska, Gjamovski e Stefova (2010) [107], a perda de 146 Da pode ser atribuído ao resíduo de desoxi-hexósido. Neste caso, o composto adquiriu a designação de ácido elágico-*O*-(desoxi)hexósido. Já o composto **14**, detectado exclusivamente nas bagas, foi identificado como derivado do ácido elágico.

Nas bagas, foi detectado o ácido tergalélgico (composto **8**), cuja fragmentação foi descrita na literatura [143]. Este composto apresenta um ião molecular a m/z 451 e fragmentação MS² dá origem ao pico base a m/z 301, ácido elágico.

✓ Outros compostos

Entre outros, foi detectada a floretina-*O*-hexósido (composto **73**) nas folhas. Este composto possui ião molecular a m/z 435 e origina os fragmentos característicos a m/z 273 e 167 e 123 [104].

Outros compostos presentes na *V. padifolium* foram também identificados nas folhas de *V. cylindraceum*, nomeadamente: os isómeros de cinchonina I (compostos **55**, **64**, **74** e **80**).

A presença do ácido cítrico (composto **6**) e seus derivados (compostos **11** e **16**) foi reportada anteriormente, nas bagas de outras amostras analisadas neste estudo. Adicionalmente, foram detectados alguns sacarídeos (compostos **1**, **5** e **21**) na espécie de *V. cylindraceum*, alguns deles já caracterizados anteriormente.

Os compostos **9** e **10**, detectados nas folhas, foram classificados como isómeros do hidroxitirosol-*O*-hexósido.

✓ Ácido quínico

O ácido quínico (composto **3**) foi detectado nas bagas e nas folhas, e seus derivados (compostos **2**, **7** e **27**), foram detectados maioritariamente nas folhas.

✓ Lignanos

O composto **60** apresenta [M-H]⁻ a m/z 579 e a fragmentação MS² origina o pico base a m/z 417. Este composto foi classificado como siringaresinol-*O*-hexósido.

✓ Terpenos

O composto dihidroxi-roseosídeo (composto **30**), o roseosídeo (composto **31**), ligados ao formato (46 Da) foram também identificados nas folhas de *V. cylindraceum* e *S. lanceolata*.

O composto **83**, já descrito anteriormente na espécie *R. grandifolius*, possui um $[M-H]^-$ a m/z 711 e foi classificado como ácido triterpénico-*O*-hexósido (aducto – formato).

✓ **Cumarinas**

A esculina é caracterizada pela presença do ião molecular a m/z 177 [133]. De acordo, com esta informação, o composto **42** foi classificado como derivado da esculina.

✓ **Não identificados**

Outros compostos (**44**, **47**, **49**, **75**, **81**, **84** e **86**) foram classificados como não identificados.

Tabela 18 - Caracterização do perfil fenólico, por HPLC-DAD-ESI⁻/MSⁿ, dos extractos metanólicos das diferentes partes morfológicas (bagas e folhas) de *Vaccinium cylindraceum*.

Nº	t _R (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	HPLC-DAD-ESI/MS ⁿ m/z (% pico base)	Identificação	Parte morfológica
1	3,2	683	MS ² [683]: 342 (14,2), 341 (100) MS ³ [683→341]: 179 (100), 161 (21,8), 143 (21,1), 119 (22,5), 115 (10,89; 113 (41,0), 101 (16,3) MS ⁴ [683→341→179]: 161 (69,4), 143 (100), 131 (43,0), 119 (60,9), 113 (17,4), 101 (18,6), 89 (66,6), 71 (23,5)	Polímero da hexose	Folhas
2	3,4	533	MS ² [533]: 191 (100) MS ³ [533→191]: 173 (69,7), 127 (100), 111 (42,1), 109 (25,4), 93 (30,7), 85 (89,5)	Derivado do ácido quínico	Folhas
3	3,5	191	MS ² [191]: 173 (34,4), 127 (100), 111 (18,0), 93 (76,7) MS ³ [191→127]: 99 (100)	Ácido quínico	Bagas Folhas
4	4,3	353	MS ² [353]: 111 (76,1), 173 (100) MS ³ [353→173]: 111 (100)	Ácido 4-O-cafeoilquínico	Bagas
5	4,4	337	MS ² [337]: 277 (100), 225 (20,1), 179 (90,6), 161 (11,3), 143 (12,2), 119 (17,0), 113 (11,6) MS ³ [337→179]: 161 (5,7), 143 (51,9), 131 (13,3), 119 (19,7), 89 (100)	Sacarídeo	Folhas
6	4,6	191	MS ² [191]: 111 (100), 173 (17,1) MS ³ [191→111]: 67 (100)	Ácido cítrico	Bagas
7	4,8	370	MS ² [370]: 353 (24,0), 341 (17,3), 225 (16,9), 191 (100), 179 (72,6) MS ³ [370→191]: 173 (69,7), 127 (100), 93 (70,1), 85 (58,3), 85 (70,5)	Derivado do ácido quínico	Folhas
8	4,9	451	MS ² [451]: 325 (17,0), 316 (10,4), 301 (100), 299 (12,3), 257 (18,1), 213 (15,8) MS ³ [451→301]: 283 (43,6), 273 (100), 257 (77,9), 242 (14,4), 149 (36,4)	Ácido tergalélagico	Bagas
9	5,2	315	MS ² [315]: 153 (100), 123 (14,6) MS ³ [315→153]: 123 (100)	Hidroxitirosol-O-hexósido	Folhas
10	5,4	351	MS ² [351]: 315 (100), 313 (33,5), 153 (22,7) MS ³ [351→315]: 153 (100), 123 (29,4)	Derivado do Hidroxitirosol-O-hexósido	Folhas

11	5,4	205	MS ² [205]: 111 (100), 173 (34,0) MS ³ [205→111]: 67 (100)	Derivado do ácido cítrico	Bagas
12	5,9	707	MS ² [707]: 533 (27,6), 353 (100), 322 (45,1), 265 (14,5) MS ³ [707→353]: 191 (100), 179 (32,8)	Dímero do ácido cafeoilquínico	Folhas
13	6,0	447	MS ² [447]: 315 (22,0), 301 (100), 300 (35,0) MS ³ [447→301]: 283 (83,4), 273 (69,7), 272 (51,7), 257 (59,0), 231 (30,7), 229 (33,7), 215 (100)	Ácido elágico-O-(desoxi)hexósido	Bagas
14	6,3	465	MS ² [465]: 175 (100), 192 (11,2), 193 (12,2), 215 (10,1), 239 (11,6), 257 (30,2), 301 (97,3), 302 (14,7), 313 (52,0), 315 (32,6), 319 (24,7), 339 (74,3), 422 (13,9) MS ³ [465→301]: 283 (33,4), 273 (68,6), 257 (55,7), 233 (17,0), 200 (100), 175 (42,5), 151 (28,7)	Derivado do ácido elágico	Bagas
15	6,4	315	MS ² [315]: 108 (14,4), 152 (24,1), 153 (100) MS ³ [315→153]: 109 (100)	Ácido Protocatecuico-O-hexósido	Bagas Folhas
16	6,6	391	MS ² [391]: 111 (100), 173 (42,2), 191 (22,2), 216 (25,1), 217 (71,5), 373 (22,6)	Derivado do ácido cítrico	Bagas
17	6,6	707	MS ² [707]: 515 (23,9), 353 (100), 323 (10,9) MS ³ [707→353]: 191 (100), 135 (10,2) MS ⁴ [707→353→191]: 173 (100), 93 (23,8), 87 (100)	Dímero do ácido cafeoilquínico	Folhas
18	7,0	577	MS ² [577]: 508 (11,7), 426 (28,6), 425 (34,6), 407 (100), 381 (20,6), 289 (25,7) MS ³ [577→407]: 389 (10,7), 303 (14,3), 285 (100), 283 (80,6), 281 (65,7), 277 (62,4), 255 (16,8), 253 (10,0) MS ⁴ [577→407→285]: 257 (100), 256 (38,5), 213 (29,7)	Dímeros de proantocianina do tipo B	Folhas
19	7,2	509	MS ² [509]: 356 (13,8), 355 (53,8), 348 (22,8), 347 (83,4), 330 (19,2), 329 (100), 193 (19,4), MS ³ [509→329]: 315 (18,7), 314 (100), 149 (30,8) MS ⁴ [509→329→314]: 300 (11,7), 299 (100), 271 (13,6), 160 (10,7)	Derivado da Dihidroxi-dimetoxil-O-hexósido flavona	Bagas
20	7,4	491	MS ² [491]: 330 (13,4), 329 (100), 328 (12,8) MS ³ [491→329]: 314 (100), 313 (40,5), 299 (15,0), 285 (12,2), 270 (10,1), 147 (10,7) MS ⁴ [491→329→314]: 300 (27,7), 299 (100), 298 (50,7), 271 (25,7), 254 (21,5), 147 (12,2)	Dihidroxi-dimetoxi-O-hexósido flavona	Bagas
21	7,4	451	MS ² [451]: 405 (100), 289 (24,5) MS ³ [451→405]: 243 (99,7), 179 (100), 161 (73,8), 131 (82,4), 113 (88,2)	Sacarídeo	Folhas
22	7,7	613	MS ² [613]: 459 (16,2), 406 (15,4), 405 (100), 297 (54,6)	Derivado do ácido Protocatecuico	Folhas

			MS ³ [613→405]: 297 (12,2), 153 (100), 135 (16,4) MS ⁴ [613→405→153]: 109 (100)		
23	7,9	479	MS ² [479]: 329 (100) MS ³ [479→329]: 314 (100), 299 (45,0) MS ⁴ [479→329→314]: 300 (27,7), 299 (100), 298 (50,7), 271 (26,1), 254 (20,9), 147 (14,3)	Derivado da Dihidroxi-dimetoxi flavona	Bagas
24	8,1	341	MS ² [341]: 179 (100), 135 (23,3) MS ³ [341→179]: 135 (100)	Ácido cafeico- <i>O</i> -hexósido	Bagas Folhas
25	8,3	479	MS ² [479]: 353 (16,6), 345 (18,4), 330 (18,0), 329 (80,1), 315 (100), 299 (15,4), 271 (21,4), 193 (11,2), MS ³ [479→315]: 299 (20,7), 267 (16,3), 271 (100), 258 (28,7), 149 (16,1), MS ³ [479→330]: 377 (19,2), 315 (100), 299 (13,0), 164 (23,8), 149 (57,9)	Derivado da viscidulina III	Bagas
26	8,3	577	MS ² [577]: 559 (12,6), 451 (22,3), 426 (37,9), 425 (100), 407 (95,1), 381 (10,9), 289 (30,8), 243 (10,8) MS ³ [577→407]: 389 (32,1), 374 (14,1), 363 (31,5), 285 (100), 283 (48,4), 257 (38,8), 243 (77,9), 228 (13,3)	Dímero de proantocianidina do tipo B	Folhas
27	8,3	533	MS ² [533]: 515 (10,2), 359 (74,1), 243 (51,2), 191 (100) MS ³ [533→191]: 173 (100), 127 (23,6), 109 (53,7), 93 (42,9)	Derivado do ácido quínico	Folhas
28	9,0	707	MS ² [707]: 353 (100) MS ³ [707→353]: 191 (100) MS ⁴ [707→353→191]: 173 (83,4), 127 (100), 109 (24,1), 93 (47,7), 85 (65,6)	Dímero do ácido cafeoilquínico	Bagas Folhas
29	9,2	353	MS ² [353]: 191 (100) MS ³ [353→191]: 173 (24,7), 127 (100), 111 (16,1), 109 (28,7), 93 (46,4), 85 (50,1) MS ⁴ [353→191→127]: 109 (100), 85 (17,0)	Ácido 1- <i>O</i> -cafeoilquínico	Bagas Folhas
30	9,7	433	MS ² [433]: 387 (100) MS ³ [433→387]: 205 (100), 153 (95,6), 131 (24,9), 113 (61,1) MS ³ [433→387]: 225 (52,4), 179 (80,9), 161 (28,7), 143 (100), 113 (19,5) MS ⁴ [433→387→205]: 201 (76,8), 147 (100)	Dihidroxi-roseosídeo (Aducto-formato)	Folhas
31	9,9	431	MS ² [433]: 385 (100), 223 (12,9) MS ³ [431→385]: 223 (63,0), 205 (81,2), 161 (32,0), 153 (100), 138 (10,5) MS ⁴ [431→385→153]: 139 (97,2), 138 (100), 136 (89,1), 111 (13,6), 97 (29,1)	Roseosídeo (Aducto-formato)	Bagas Folhas
32	10,2	577	MS ² [577]: 451 (21,6), 426 (21,0), 425 (100), 408 (17,5), 407 (68,6), 289 (10,7) MS ³ [577→425]: 408 (20,6), 407 (100)	Dímero de proantocianidina do tipo B	Bagas Folhas

			MS ³ [577→407]: 297 (54,5), 285 (100), 281 (76,7), 255 (31,3), 243 (20,5) MS ⁴ [577→407→285]: 283 (25,9), 257 (100), 213 (29,1)		
33	10,8	469	MS ² [469]: 423 (69,2), 415 (23,7), 315 (34,8), 289 (100), 229 (22,2) MS ³ [469→289]: 245 (77,4), 231 (45,0), 205 (86,6), 203 (100), 179 (25,5), 125 (17,0), 123 (20,0)	Derivado da Catequina	Folhas
34	11,0	353	MS ² [353]: 191 (100) MS ³ [353→191]: 173 (37,3), 127 (100), 111 (71,9), 93 (67,3), 85 (94,4)	Ácido 1- <i>O</i> -cafeoilquínico	Bagas Folhas
35	11,5	289	MS ² [289]: 245 (100), 205 (38,2), 203 (18,1), 179 (16,1) MS ³ [289→245]: 227 (18,5), 204 (20,2), 203 (100), 188 (14,7), 175 (11,2), 161 (18,1)	Catequina	Bagas Folhas
36	11,6	335	MS ² [335]: 291 (19,1), 179 (74,5), 161 (100), 135 (52,0)	Ácido cafeoil-chiquímico	Bagas
37	11,9	539	MS ² [539]: 491 (100) MS ³ [539→491]: 476 (15,2), 357 (67,1), 330 (16,4), 329 (100), 314 (19,9), 181 (17,5), 149 (10,2) MS ⁴ [539→491→329]: 314 (100), 282 (33,7), 266 (13,3), 208 (21,4), 164 (61,0), 149 (31,4)	Derivado da Dihidroxi-dimetoxi- <i>O</i> -hexósido flavona	Bagas Folhas
38	12,2	553	MS ² [553]: 389 (100), 347 (10,8) MS ³ [553→389]: 227 (100), 209 (98,9), 191 (75,8), 179 (35,5), 165 (97,6), 147 (52,3), 135 (54,7), 119 (46,0), 109 (24,1)	Derivado do ácido cafeico	Folhas
39	12,6	865	MS ² [865]: 739 (29,8), 713 (16,6), 695 (100), 577 (85,3), 543 (28,6), 451 (29,6), 425 (31,9), 407 (41,3), 287 (15,2), 245 (10,7) MS ³ [865→695]: 677 (34,1), 568 (18,9), 543 (100), 525 (49,3), 407 (25,3), 391 (20,0), 289 (36,2), 255 (18,9), 243 (48,6) MS ⁴ [865→695→543]: 525 (100), 391 (36,4), 243 (19,5)	Trímero de proantocianina do tipo B	Bagas Folhas
40	12,7	539	MS ² [539]: 343 (12,6), 491 (100), 492 (29,8) MS ³ [539→491]: 329 (50,0), 357 (100) MS ⁴ [539→491→357]: 314 (100), 299 (43,2)	Derivado da Dihidroxi-dimetoxi- <i>O</i> -hexósido flavona	Bagas
41	13,0	337	MS ² [337]: 191 (100) MS ³ [337→191]: 173 (85,7), 127 (100), 111 (24,6), 93 (41,7), 85 (63,8)	Ácido coumaroilquínico	Folhas
42	13,3	739	MS ² [739]: 629 (10,5), 587 (100), 451 (21,4), 435 (41,1), 339 (23,4), 289 (16,9) MS ³ [739→587]: 569 (69,7), 477 (50,9), 449 (24,5), 417 (33,3), 339 (100), 177 (15,7) MS ⁴ [739→587→339]: 177 (100)	Derivado da esculina	Folhas

43	13,8	577	MS ² [577]: 425 (100), 407 (94,0), 289 (93,3), 287 (20,3), 245 (15,0), 231 (11,3) MS ³ [577→289]: 271 (28,4), 245 (100), 203 (14,7), 179 (26,7), 165 (34,2), 151 (48,4), 125 (70,4)	Dímero de proantocianidina do tipo B	Folhas
44	14,6	575	MS ² [575]: 431 (100), 432 (13,7) MS ³ [575→431]: 143 (38,7), 159 (11,5), 161 (79,9), 221 (14,9), 268 (25,9), 269 (100) MS ⁴ [575→431→269]: 113 (100), 158 (10,0), 161 (34,4)	Não identificado	Bagas
45	15,0	337	MS ² [337]: 191 (100) MS ³ [337→191]: 173 (85,7), 127 (100), 111 (24,6), 93 (41,7), 85 (63,8)	Ácido coumaroilquínico	Folhas
46	15,2	367	MS ² [367]: 191 (17,5), 179 (100), 161 (12,3), 135 (60,3) MS ³ [367→179]: 135 (100)	Derivado do ácido cafeico	Bagas Folhas
47	15,5	391	MS ² [391]: 329 (16,6), 289 (41,5), 221 (16,2), 161 (26,7), 143 (35,0), 125 (100) MS ³ [391→289]: 125 (100)	Não identificado	Folhas
48	15,6	479	MS ² [479]: 316 (100), 317 (77,7), 318 (24,2) MS ³ [479→317]: 151 (23,9), 179 (49,7), 270 (28,0), 271 (100), 272 (21,2), 273 (22,6), 287 (31,2), 299 (10,4) MS ⁴ [479→317→271]: 214 (85,4), 242 (100), 243 (80,7)	Miricitina- <i>O</i> -hexósido	Bagas
49	16,8	739	MS ² [739]: 629 (16,6), 587 (100), 569 (44,0), 435 (37,1), 339 (32,0) MS ³ [739→587]: 569 (100), 417 (99,0), 339 (75,0), 325 (22,6), 229 (23,6) MS ⁴ [739→587→569]: 459 (100), 447 (22,3), 417 (41,4), 407 (14,1), 337 (31,4)	Não identificado	Folhas
50	17,6	535	MS ² [535]: 491 (18,5), 373 (60,7), 329 (90,6), 191 (66,6), 163 (100) MS ³ [535→329]: 311 (12,0), 285 (41,0), 163 (100), 145 (36,9), 119 (38,8) MS ⁴ [535→329→163]: 119 (100)	Derivado do ácido cumárico	Bagas Folhas
51	18,1	413	MS ² [413]: 369 (12,1), 351 (36,9), 311 (100), 269 (34,0), 143 (32,4), 125 (66,8) MS ³ [413→311]: 269 (100)	Apigenina C-hexósido (Vitexina)	Bagas Folhas
52	18,4	609	MS ² [609]: 301 (100) MS ³ [609→301]: 271 (10,5), 179 (61,1), 151 (100)	Quercetina- <i>O</i> -rutinósido	Folhas
53	19,1	535	MS ² [535]: 491 (25,1), 374 (12,0), 373 (35,0), 372 (10,8), 371 (60,3), 329 (64,5), 311 (11,4), 265 (10,9), 191 (68,7), 165 (30,9), 163 (100) MS ³ [535→163]: 119 (100)	Derivado do ácido cumárico	Bagas Folhas
54	19,4	577	MS ² [577]: 425 (100), 407 (63,1), 289 (12,8) MS ³ [577→425]: 407 (100), 273 (20,2) MS ⁴ [577→425→407]: 285 (100), 281 (79,3), 253 (27,9), 237 (41,0), 200 (22,8)	Dímero de proantocianina B	Folhas

55	19,8	451	MS ² [451]: 341 (100) MS ³ [451→341]: 323 (13,3), 297 (10,5), 217 (100), 177 (15,0) MS ⁴ [451→341→217]: 191 (100), 189 (90,7)	Cinchonina I	Folhas
56	19,8	463	MS ² [463]: 317 (100), 316 (54,4), MS ³ [463→317]: 288 (22,4), 287 (25,3), 272 (30,8), 271 (100), 270 (32,2), 193 (18,1), 179 (42,7), 164 (11,0), 151 (28,7), 137 (12,1) MS ⁴ [463→317→271]: 243 (51,3), 242 (100), 215 (52,1), 214 (98,5)	Miricetina- <i>O</i> -ramnósido	Bagas
57	20,6	463	MS ² [463]: 301 (100) MS ³ [463→301]: 271 (24,7), 179 (100), 151 (94,5)	Quercetina- <i>O</i> -hexósido	Bagas Folhas
58	21,8	463	MS ² [463]: 302 (14,4), 301 (100), 300 (24,6) MS ³ [463→301]: 271 (16,0), 179 (96,8), 151 (100)	Quercetina- <i>O</i> -hexósido	Bagas Folhas
59	22,6	575	MS ² [575]: 540 (15,5), 449 (31,1), 423 (100), 411 (18,4), 407 (13,6), 289 (12,3), 287 (13,2) MS ³ [575→423]: 313 (40,1), 301 (17,6), 297 (36,5), 285 (100) MS ⁴ [575→423→285]: 241 (92,0), 163 (100)	Dímero da proantocianina do tipo A	Bagas
60	22,7	579	MS ² [579]: 417 (100) MS ³ [579→417]: 403 (15,1), 372 (10,2), 181 (100), 166 (41,3), 151 (15,6) MS ⁴ [579→417→181]: 172 (12,3), 166 (100)	Siringaresinol- <i>O</i> -hexósido	Folhas
61	24,1	417	MS ² [417]: 371 (32,5), 331 (12,4), 307 (100), 163 (10,3), 119 (10,5) MS ³ [417→307]: 163 (45,7), 145 (100), 119 (25,3)	Derivado do ácido cumárico	Folhas
62	26,1	593	MS ² [593]: 285 (100) MS ³ [593→285]: 267 (49,6), 257 (100), 241 (52,0), 229 (41,3), 213 (70,2), 197 (57,2), 163 (68,9)	Canferol- <i>O</i> -rutinósido	Folhas
63	26,6	433	MS ² [433]: 301 (100) MS ³ [433→301]: 271 (100), 255 (58,5), 179 (95,7), 151 (55,0)	Quercetina- <i>O</i> -pentósido	Folhas
64	26,9	451	MS ² [451]: 341 (100) MS ³ [451→341]: 323 (17,0), 231 (21,2), 218 (15,5), 217 (100), 177 (20,1) MS ⁴ [451→341→217]: 191 (39,8), 189 (12,5), 189 (100)	Cinchonina I	Folhas
65	27,8	433	MS ² [433]: 301 (100) MS ³ [433→301]: 271 (100), 255 (58,5), 179 (95,7), 151 (55,0)	Quercetina- <i>O</i> -pentósido	Folhas
66	28,0	505	MS ² [505]: 463 (27,0), 301 (100)	Quercetina- <i>O</i> -(acetil)hexósido	Bagas

			MS ³ [505→301]: 273 (15,3), 271 (52,4), 255 (31,9), 179 (86,5), 151 (100)		Folhas
67	28,3	447	MS ² [447]: 327 (11,8), 286 (11,8), 285 (100), 284 (77,9), 255 (30,9) MS ³ [447→285]: 255 (100), 227 (11,4) MS ⁴ [447→285→255]: 227 (100), 211 (30,6), 187 (15,8), 164 (24,3), 163 (80,6), 135 (13,0)	Canferol- <i>O</i> -hexósido	Folhas
68	28,5	447	MS ² [447]: 301 (81,00), 300 (22,1), 285 (11,1) MS ³ [447→301]: 272 (12,8), 179 (100), 151 (69,6)	Quercetina- <i>O</i> -ramnósido	Bagas
69	28,7	507	MS ² [507]: 345 (100), 273 (12,0) MS ³ [507→345]: 330 (100), 315 (58,9), 301 (58,8), 287 (34,8), 273 (58,8), 241 (15,3), 163 (12,5)	Hidroxi-dimetoxiquercetina- <i>O</i> -hexósido	Bagas
70	28,8	477	MS ² [477]: 357 (19,5), 315 (100), 285 (15,9), 271 (18,2) MS ³ [477→315]: 299 (45,5), 287 (15,1), 286 (36,2), 285 (100), 272 (16,6), 271 (68,6), 257 (14,0), 243 (28,7)	Isoramnetina- <i>O</i> -hexósido	Bagas Folhas
71	29,4	467	MS ² [467]: 355 (13,1), 265 (100), 235 (23,1), 193 (30,9) MS ³ [467→265]: 221 (13,4), 217 (29,5), 193 (100), 178 (55,5) MS ⁴ [467→265→193]: 149 (100)	Derivado do ácido ferúlico	Folhas
72	30,0	505	MS ² [505]: 301 (100), 299 (56,9) MS ³ [505→301]: 271 (93,3), 255 (16,4), 179 (100), 151 (75,6)	Quercetina- <i>O</i> -(acetil)hexósido	Folhas
73	30,5	435	MS ² [435]: 273 (100) MS ³ [435→273]: 167 (100) MS ⁴ [435→273→167]: 123 (100)	Florentina- <i>O</i> -hexósido (Florizina)	Folhas
74	30,7	451	MS ² [451]: 341 (100), 217 (10,8) MS ³ [451→341]: 323 (14,9), 282 (11,1), 255 (12,7), 231 (32,4), 229 (15,2), 217 (100), 189 (30,8), 177 (25,4)	cinchonina I	Folhas
75	31,5	711	MS ² [711]: 665 (12,3), 504 (27,2), 503 (100) MS ³ [711→503]: 486 (31,5), 485 (100), 454 (11,8), 453 (31,2) MS ⁴ [711→503→485]: 453 (100); 387 (100)	Não identificado	Folhas
76	31,9	489	MS ² [489]: 285 (100) MS ³ [489→285]: 255 (68,4), 257 (100), 229 (40,1), 213 (23,2), 197 (26,0)	Canferol- <i>O</i> -(acetil)hexósido	Folhas
77	31,9	533	MS ² [533]: 490 (25,3), 489 (100) MS ³ [533→489]: 285 (100) MS ⁴ [533→489→285]: 257 (100), 241 (32,0), 229 (4,8)	Canferol- <i>O</i> -(malonil)hexósido	Folhas

78	32,1	549	MS ² [549]: 345 (100), 330 (12,5) MS ³ [549→345]: 330 (100), 315 (22,9) MS ⁴ [549→345→330]: 315 (100), 301 (25,2), 287 (15,9), 285 (29,6), 269 (17,0), 259 (11,7)	Derivado da Hidroxi-dimetoxiquercetina- <i>O</i> - hexósido	Bagas
79	32,2	491	MS ² [491]: 345 (100), 323 (12,4) MS ³ [491→345]: 330 (100), 315 (27,7), 301 (28,2), 287 (15,3), 274 (20,3), 273 (38,4), 245 (12,1) MS ⁴ [491→345→330]: 315 (100), 287 (35,2), 285 (13,4), 271 (23,9)	Dimetoxiquercetina- <i>O</i> -ramnósido	Bagas
80	32,6	451	MS ² [451]: 342 (16,6), 341 (100) MS ³ [451→341]: 323 (16,4), 231 (22,6), 231 (14,0), 219 (36,3), 217 (100), 189 (30,8), 177 (27,1) MS ⁴ [451→341→217]: 191 (59,8), 189 (100), 147 (12,3)	cinchonina I	Folhas
81	32,6	439	MS ² [439]: 424 (72,8), 359 (100), 343 (10,9), 315 (29,4), 300 (16,7), 203 (12,1) MS ³ [439→359]: 345 (47,8), 343 (15,9), 311 (100) MS ⁴ [439→359→345]: 159 (100)	Não identificado	Bagas
82	33,2	489	MS ² [489]: 285 (100) MS ³ [489→285]: 267 (100), 257 (70,5), 227 (51,0)	Canferol- <i>O</i> -(acetil)hexósido (Aducto – Formato)	Folhas
83	33,2	711	MS ² [711]: 665 (12,3), 504 (27,2), 503 (100) MS ³ [711→503]: 486 (31,5), 485 (100), 454 (11,8), 453 (31,2) MS ⁴ [711→503→485]: 441 (28,7), 439 (100), 423 (19,9), 421 (18,7), 419 (54,8), 387 (15,4)	Ácido triterpénico- <i>O</i> - (acetil)hexósido	Folhas
84	34,1	543	MS ² [543]: 497 (100) MS ³ [543→497]: 335 (100), 273 (12,3), 161 (41,8) MS ⁴ [543→497→335]: 333 (40,9), 317 (29,5), 273 (100), 257 (63,4), 237 (40,4), 152 (57,3), 137 (45,5)	Não identificado	Folhas
85	34,3	585	MS ² [585]: 371 (41,2), 359 (45,4), 357 (71,0), 345 (100) MS ³ [585→345]: 330 (100), 299 (14,2) MS ⁴ [585→345→330]: 315 (35,6), 297 (100), 256 (37,4), 251 (14,5), 213 (16,4)	Derivado da Hidroxi-dimetoxiquercetina- <i>O</i> - hexósido	Folhas
86	40,3	517/518	MS ² [517]: 499 (17,0), 487 (26,3), 470 (29,8), 469 (100), 451 (17,1) MS ³ [517→469]: 452 (28,4), 451 (100), 407 (13,3) MS ⁴ [517→469→451]: 408 (32,9), 407 (27,5), 390 (19,9), 378 (100), 375 (24,5)	Não identificado	Folhas

3.2. Modo de ionização positivo

As antocianinas são uma classe de compostos polifenólicos responsáveis pelas cores de muitas flores e frutos. Estes compostos são geralmente analisados por HPLC-ESI/MS em modo positivo, visto que, se obtém uma melhor resposta na fragmentação [25].

Assim, as bagas alvo de estudo foram também submetidas à análise do perfil de antocianinas pelo método de HPLC-DAD-ESI⁺/MSⁿ. Para além desta parte morfológica, analisou-se as folhas jovens da espécie *V. padifolium*, por se suspeitar que a sua cor deriva da presença destes compostos.

Como esperado, constatou-se que a espécie de *E. umbellata* não possui antocianinas; a análise não será apresentada.

Como esta era apenas uma parte deste trabalho, foram identificadas apenas as antocianinas maioritárias, não havendo a preocupação de desenvolver um método analítico que permitisse a total resolução dos picos dos cromatogramas. Assim, é possível que várias substâncias não tenham sido identificadas por co-eluírem com compostos mais abundantes.

3.1.3. *Rubus grandifolius*

Na figura seguinte, estão representados os perfis de antocianinas encontradas na espécie de *R. grandifolius*, nas diferentes variedades. Apesar de se tratar da mesma espécie, pela Figura 31 observa-se a existência de ligeiras variações entre as amostras colhidas em diferentes locais.

As antocianinas identificadas nos frutos de *Rubus* são predominantemente derivadas da cianidina; este resultado vai ao encontro dos apresentados na literatura [23,148].

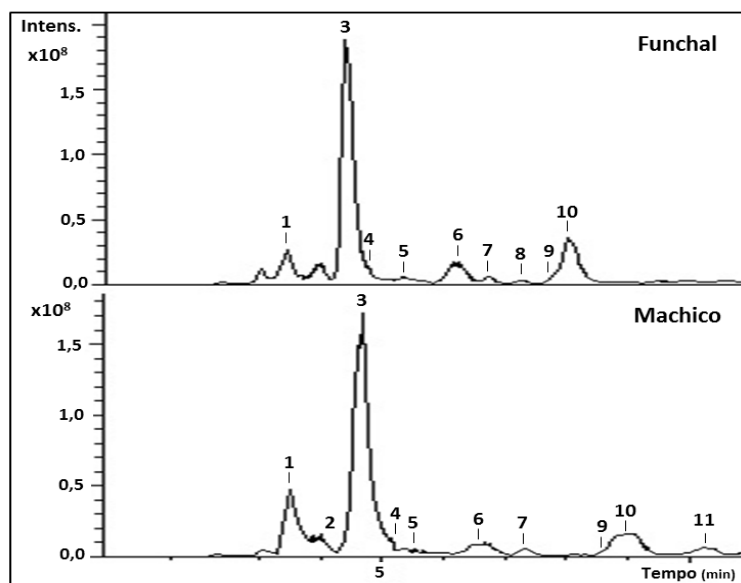


Figura 31 - Análise do perfil de antocianinas, por HPLC-DAD-ESI⁺/MSⁿ, das bagas de *Rubus grandifolius*.

De acordo com a Tabela 19, um total de 11 antocianinas foram detectadas nas bagas de *R. grandifolius*. Alguns destes compostos foram partilhados pelas duas amostras, enquanto outros apenas foram detectados numa colheita.

As antocianinas identificadas com os números **1**, **3**, **5**, **7** e **8** apresentam o ião molecular protonado a m/z 449, cuja fragmentação MS² origina um pico a m/z 287, a aglicona da cianidina. Verifica-se a perda do fragmento de 162 Da [M+H-162 Da]⁺, correspondente à hexose. Assim, foram classificadas como isómeros da cianidina-*O*-hexósido. Pela Figura 31, verifica-se que o pico maioritário corresponde a um destes isómeros (**3**). Esta informação está de acordo com a literatura [23], que menciona a cianidina-*O*-glucósido como a antocianina maioritária de outras espécies de *Rubus*.

As antocianinas **4** e **6**, mostram [M+H]⁺ a m/z 419. A fragmentação MS² revela a clivagem neutra de 132 Da, originando a fragmentação típica da cianidina a m/z 287. Assim, estas antocianinas foram caracterizadas como isómeros da cianidina-*O*-pentósido.

A antocianina **9** apresenta um [M+H]⁺ a m/z 535. Para dar origem à aglicona da cianidina perde um fragmento de 248 Da identificado como (malonil)hexósido [25], pelo que foi classificada como cianidina-*O*-(malonil)hexósido.

De acordo com a literatura [149], a antocianina **10**, mostra o $[M+H]^+$ a m/z 593 e posterior fragmentação MS^2 que origina a aglicona da cianidina. Assim, é classificada como cianidina-*O*-(dioxaloil)hexósido.

As antocianinas **2** e **11** foram detectadas apenas na variedade de Machico e foram classificadas como cianidina-*O*-(xilosil)hexósido e cianidina-*O*-(acetil)hexósido, respectivamente [149]. Embora sejam raras as espécies de *Rubus* que contenham antocianinas acetiladas, a espécie *Rubus grandifolius* contém algumas destas antocianinas, que são características das espécies selvagens [138].

Gouveia-Figueira e Castilho (2015) [25] caracterizaram as antocianinas das bagas de *R. grandifolius*, extraídas por dois solventes diferentes, água e etanol, e obtiveram um perfil de antocianinas diferente. Para além de derivados da cianidina, detectaram também derivados da delphinina e da petunidina, ainda que em baixa concentração. Esta diferença deve-se aos diferentes métodos de extracção e aos solventes utilizados, bem como ao período de colheita, atendendo que as plantas foram colhidas em locais, anos e meses diferentes.

Tabela 19 - Caracterização do perfil de antocianinas, por HPLC-DAD-ESI⁺/MSⁿ, dos extractos metanólicos das bagas de *Rubus grandifolius* (colhidas no Funchal e em Machico).

Nº	t _R (min)	[M+H] ⁺ (m/z)	HPLC-DAD-(+)ESI/MS ⁿ m/z (% pico base)	Identificação	Local de colheita
1	3,6	449	MS ² [449]: 317 (17,4), 303 (61,9), 287 (100) MS ³ [449→287]: 241 (82,2), 213 (100), 175 (57,6), 161 (87,3), 153 (78,9), 137 (24,6), 109 (19,2)	Cianidina-O-hexósido	Funchal Machico
2	4,5	581	MS ² [581]: 449 (51,9), 287 (100) MS ³ [419→287]: 241 (82,2), 213 (100), 175 (57,6), 161 (87,3), 153 (78,9), 137 (24,6), 109 (19,2)	Cianidina-O-(xilossil)hexósido	Machico
3	4,9	449	MS ² [449]: 317 (17,4), 303 (61,9), 287 (100) MS ³ [449→287]: 241 (82,2), 213 (100), 175 (57,6), 161 (87,3), 153 (78,9), 137 (24,6), 109 (19,2)	Cianidina-O-hexósido	Funchal Machico
4	5,4	419	MS ² [419]: 317 (17,4), 303 (61,9), 287 (100) MS ³ [419→287]: 241 (82,2), 213 (100), 175 (57,6), 161 (87,3), 153 (78,9), 137 (24,6), 109 (19,2)	Cianidina-O-pentósido	Funchal Machico
5	6,2	449	MS ² [449]: 317 (17,4), 303 (61,9), 287 (100) MS ³ [449→287]: 241 (82,2), 213 (100), 175 (57,6), 161 (87,3), 153 (78,9), 137 (24,6), 109 (19,2)	Cianidina-O-hexósido	Funchal Machico
6	6,6	419	MS ² [419]: 317 (17,4), 303 (61,9), 287 (100) MS ³ [419→287]: 241 (82,2), 213 (100), 175 (57,6), 161 (87,3), 153 (78,9), 137 (24,6), 109 (19,2)	Cianidina-O-pentósido	Funchal Machico
7	7,5	449	MS ² [449]: 317 (17,4), 303 (61,9), 287 (100) MS ³ [449→287]: 241 (82,2), 213 (100), 175 (57,6), 161 (87,3), 153 (78,9), 137 (24,6), 109 (19,2)	Cianidina-O-hexósido	Funchal Machico
8	8,7	449	MS ² [449]: 317 (17,4), 303 (61,9), 287 (100) MS ³ [449→287]: 241 (82,2), 213 (100), 175 (57,6), 161 (87,3), 153 (78,9), 137 (24,6), 109 (19,2)	Cianidina-O-hexósido	Funchal
9	8,9	535	MS ² [535]: 449 (51,3), 287 (100) MS ³ [449→287]: 257 (100), 213 (55,1), 175 (57,6), 161 (87,3), 153 (78,9), 137 (24,6), 109 (19,2)	Cianidina-O-(malonil)hexósido	Funchal Machico
10	9,1	593	MS ² [593]: 287 (100) MS ³ [593→287]: 257 (82,2), 213 (100), 175 (57,6), 161 (87,3), 153 (78,9), 137 (24,6), 109 (19,2)	Cianidina-O-(dioxaloil)hexósido	Funchal Machico
11	10,3	491	MS ² [491]: 449 (31,4), 287 (100) MS ³ [449→287]: 241 (82,2), 213 (100), 175 (57,6), 161 (87,3), 153 (78,9), 137 (24,6), 109 (19,2)	Cianidina-O-(acetil)hexósido	Machico

3.1.4. *Sambucus lanceolata*

Os resultados obtidos da análise do perfil de antocianinas, por HPLC-DAD-ESI⁺/MSⁿ das bagas de *S. lanceolata* encontram-se representados na Figura 32 e Tabela 20.

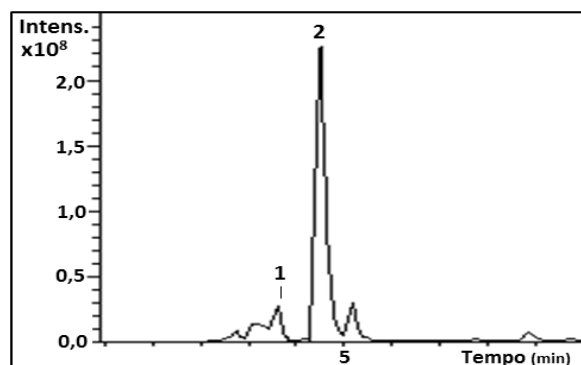


Figura 32 - Análise do perfil de antocianinas, por HPLC-DAD-ESI⁺/MSⁿ, das bagas de *Sambucus lanceolata*.

Nas bagas de *S. lanceolata*, foi detectada a presença de dois isómeros da cianidina-*O*-(xilosil)hexósido [149]. Os picos 1 e 2 apresentam o íão molecular protonado a m/z 581. A fragmentação MS² dá origem à perda de um fragmento neutro de m/z 294 e a um pico base a m/z 287.

Foi reportado na literatura [27], que os extractos de espécies de sabugueiro possuem elevado conteúdo de compostos fenólicos, para além daqueles detectados neste estudo, dos quais as antocianinas são o maior grupo.

Veberic *et al.* (2009) [150], detectaram cinco antocianinas na espécie *Sambucus nigra* L., a cianidina-3-*O*-sambubiosil-5-*O*-glucósido, a cianidina-3,5-*O*-diglucósido, a cianidina-3-*O*-sambubiósido, a cianidina-3-*O*-glucósido e a cianidina-3-*O*-rutinósido. Assim, as antocianinas derivadas da cianidina são as predominantes nestas bagas.

Olejnik *et al.* (2016) [151], identificaram nove antocianinas na mesma espécie. Para além daquelas descritas anteriormente, detectaram a presença da pelargonidina-3-*O*-glucósido, pelargonidina-3-*O*-sambubiósido, peonidina-3-*O*-sambubiósido e peonidina-3-*O*-glucósido.

Como verificado na literatura, as espécies de sabugueiro reportadas possuem um número superior de antocianinas, comparativamente às antocianinas detectadas no

presente estudo. Uma das justificações encontradas deve-se ao estado de maturação das bagas *S. lanceolata*. Apesar da colheita ter sido feita em Outubro, as bagas não se encontravam em pleno estado de maturação e possuíam uma cor pouco intensa, algumas ligeiramente avermelhadas (Figura 7) e predominantemente verdes, as quais foram excluídas do estudo. Este dado foi comprovado com o valor de ° Brix, discutido anteriormente.

É de notar que a antocianina detectada no presente estudo não se encontra entre as antocianinas detectadas em outras espécies de *Sambucus*. Assim, seria conveniente uma nova colheita das bagas de sabugueiro e repetição da análise do perfil de antocianinas, o que iria permitir a comparação do perfil da espécie de *Sambucus lanceolata*, endémica do Arquipélago da Madeira, com outras espécies, descritas na literatura.

Tabela 20 - Caracterização do perfil de antocianinas, por HPLC-DAD-ESI⁺/MSⁿ, das bagas de *Sambucus lanceolata*.

Nº	t _R (min)	[M-H] ⁺ (m/z)	HPLC-DAD-ESI/MS ⁿ m/z (% pico base)	Identificação
1	3,7	581	MS ² [581]: 287 (100) MS ³ [581→287]: 257 (34,3), 241 (100), 232 (31,0), 213 (46,6), 200 (36,7), 189 (83,5), 185 (34,5), 171 (11,6), 162 (10,3), 157 (42,9), 149 (16,5), 143 (54,8), 137 (51,3), 128 (54,5), 111 (93,5)	Cianidina-O-(xilosil)hexósido
2	4,6	581	MS ² [581]: 287 (100) MS ³ [581→287]: 269 (21.1), 257 (31.7), 241 (100), 232 (27.0), 213 (36.1), 189 (73.8), 185 (34.5), 171 (11.6), 162 (10.3), 157 (42.9), 149 (16.5), 143 (54.8), 137 (51.3), 128 (54.5), 111 (93.5)	Cianidina-O-(xilosil)hexósido

3.1.5. *Vaccinium padifolium*

Bagas

A análise do perfil de antocianinas das bagas de *V. padifolium* encontra-se representada na Figura 33 e na Tabela 21. Foram detectadas 10 antocianinas glicosiladas, analisadas em seguida.

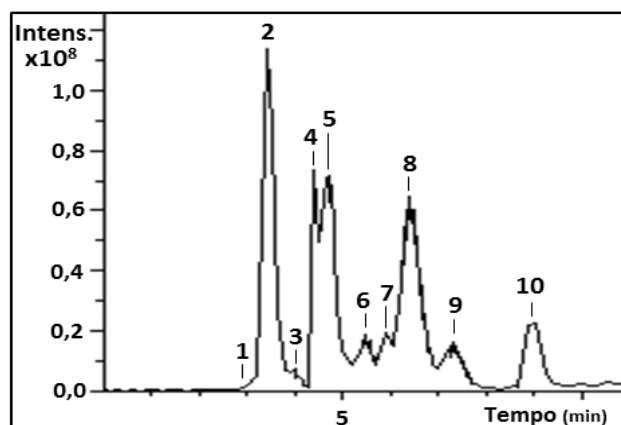


Figura 33 - Análise do perfil de antocianinas, por HPLC-DAD-ESI⁺/MSⁿ, das bagas de *Vaccinium padifolium*.

O pico **1** apresenta o ião molecular protonado a m/z 597 e um pico base a m/z 303 após a fragmentação MS² [152]. Assim, a perda do resíduo neutro com m/z 294 Da é classificado como (pentosil)hexóxido.

O ião [M+H]⁺ a m/z 303 é característico da aglicona da delphinidina [152]. A antocianina **1** foi classificada como delphinidina-*O*-(pentosil)hexósido. As antocianinas **2** e **4** foram classificadas como delphinidina-*O*-hexósido e delphinidina-*O*-pentósido, respectivamente. Esta classificação teve por base a parte glicosídica que perde após a fragmentação MS².

A aglicona da petunidina é caracterizada por apresentar o seu [M+H]⁺ a m/z 317. Os picos **3** e **5** apresentam ião molecular protonado a m/z 479 e o pico base a m/z 317, após fragmentação. O fragmento neutro de 162 Da é associada à perda de uma hexose. Assim, estes compostos foram classificados como isómeros da petunidina-*O*-hexósido. O pico **6** apresenta [M+H]⁺ a m/z 449 e perde um fragmento neutro de 132 Da, pelo que, foi classificado como petunidina-*O*-pentósido.

A malvidina aglicona exhibe o $[M+H]^+$ a m/z 331 [152]. As antocianinas identificadas com os números **7**, **8** e **10** foram identificadas como isómeros da malvidina-*O*-hexósido. Estes isómeros apresentam íão molecular protonado a m/z 493, cuja fragmentação MS² origina um pico base a m/z 331, com a perda de uma hexose (162 Da). A antocianina **9** exhibe um pico íão molecular protonado a m/z 463 e foi identificada como malvidina-*O*-pentósido.

Ao contrário das espécies anteriores (*R. grandifolius* e *S. lanceolata*), as bagas de *V. padifolium* não apresentam antocianinas derivados da cianidina.

Pela Tabela 21, confirma-se que as antocianinas mais representativas são derivadas da malvidina e da delphinidina, o que corrobora os resultados da literatura [153].

O perfil de antocianinas da *V. padifolium* foi caracterizado, pela primeira vez, por Cabrita e Andersen (1999) [31]. Estes autores identificaram 20 antocianinas, nomeadamente 4 derivados glicosídicos (com vários tipos de açúcares) de cada uma das antocianinas: cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina e malvidina. Interessantemente, no presente estudo, não foram detectadas derivados da cianidina nem da peonidina. O facto de os autores terem realizado o isolamento das antocianinas por coluna em fracionamento, pode ter contribuído para uma maior variedade de antocianinas identificadas.

Müller, Schantz e Richling (2012) [154], caracterizaram as antocianinas presentes nas bagas da *V. corymbosum* e *V. myrtilus*. Estes autores detectaram 15 compostos, particularmente a cianidina, a delphinidina, a petunidina, a peonidina e a malvidina, com grande variedade de glucósidos.

Chen *et al.* (2014) [149], analisaram o perfil de antocianinas de 12 espécies de bagas, entre as quais encontrava-se a *V. corymbosum*. Identificaram um perfil de antocianinas muito semelhante ao descrito pelos autores Müller, Schantz e Richling (2012) [154].

O estudo de vários cultivares da espécie *V. uliginosum*, realizado por Su *et al.* (2016) [153], demonstrou que a antocianina mais abundante, em todas as amostras,

foi o glucósido de malvidina, seguido dos glucósidos de delphinidina, da petunidina, da cianidina e da peonidina. No total, estes autores detectaram 16 antocianinas na espécie de *V. uliginosum*.

Tabela 21 – Caracterização do perfil de antocianinas, por HPLC-DAD-ESI⁺/MSⁿ, das bagas de *Vaccinium padifolium*.

Nº	t _R (min)	[M+H] ⁺ (m/z)	HPLC-DAD-ESI/MS ⁿ m/z (% pico base)	Identificação
1	3,5	597	MS ² [597]: 303 (100) MS ³ [597→303]: 257 (59,9), 229 (41,0), 201 (26,8), 159 (46,6), 150 (25,7)	Delfinidina-O-(pentosil)hexósido
2	3,6	465	MS ² [465]: 303 (100) MS ³ [465→303]: 257 (100), 229 (42,2), 201 (26,8), 159 (46,6), 150 (25,7) MS ⁴ [465→303→257]: 229 (100), 213 (54,2), 201 (19,9), 147 (21,1), 117 (10,1)	Delfinidina-O-hexósido
3	4,1	479	MS ² [479]: 317 (100) MS ³ [479→317]: 302 (100) MS ⁴ [479→317→302]: 275 (12,6), 274 (100), 246 (15,4), 229 (11,7), 228 (10,3)	Petunidina-O-hexósido
4	4,6	435	MS ² [435]: 303 (100) MS ³ [435→303]: 257 (100), 229 (42,2), 201 (26,8), 159 (46,6), 150 (25,7) MS ⁴ [435→303→257]: 229 (100), 213 (54,2), 201 (19,9), 147 (21,1), 117 (10,1)	Delfinidina-O-pentósido
5	5,2	479	MS ² [479]: 317 (100) MS ³ [479→317]: 303 (100), 274 (57,3), 257 (14,4), 245 (24,3), 229 (34,4), 218 (33,1), 203 (27,1), 150 (27,2)	Petunidina-O-hexósido
6	5,3	449	MS ² [449]: 317 (100), 303 (47,7) MS ³ [449→317]: 303 (100), 274 (57,3), 257 (14,4), 245 (24,3), 229 (34,4), 218 (33,1), 203 (27,1), 150 (27,2)	Petunidina-O-pentósido
7	5,9	493	MS ² [493]: 331 (100) MS ³ [493→331]: 315 (100), 299 (66,5), 298 (28,1), 287 (50,3), 271 (15,9), 242 (13,4), 179 (27,7)	Malvidina-O-hexósido
8	6,9	493	MS ² [493]: 331 (100) MS ³ [493→331]: 315 (53,1), 299 (100), 287 (21,3), 271 (15,9), 242 (13,4), 179 (27,7)	Malvidina-O-hexósido
9	7,4	463	MS ² [463]: 331 (100) MS ³ [463→331]: 315 (53,1), 299 (100), 287 (21,3), 271 (15,9), 242 (13,4), 179 (27,7)	Malvidina-O-pentósido
10	9,6	493	MS ² [493]: 331 (100) MS ³ [493→331]: 299 (100), 287 (21,3), 271 (15,9), 242 (13,4), 179 (27,7)	Malvidina-O-hexósido

Folhas jovens

As folhas mais jovens de *V. padifolium* apresentavam coloração avermelhada, pelo que se considerou possível a presença de antocianinas. Assim, realizou-se a análise do perfil de antocianinas pelo HPLC-DAD-ESI⁺/MSⁿ sobre o extracto metanólico destas folhas.

Foram detectadas 4 antocianinas com base em cianidina, apresentadas e analisadas na Figura 34 e Tabela 22.

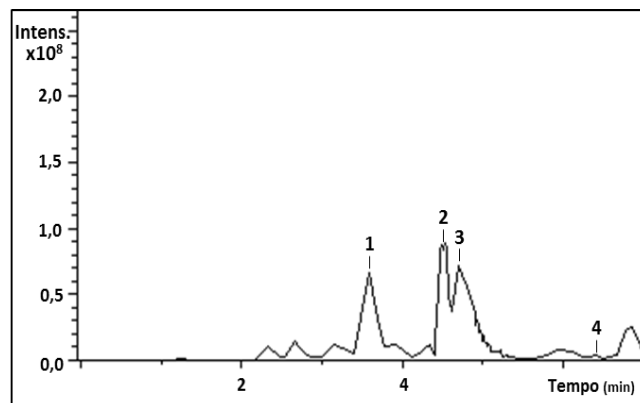


Figura 34 - Análise do perfil de antocianinas, por HPLC-DAD-ESI⁺/MSⁿ, das folhas jovens de *Vaccinium padifolium*.

Os picos **1**, **2** e **4** foram classificados como cianidina-*O*-hexósido. Já a antocianina **3**, foi identificada como cianidina-*O*-pentósido, de acordo com o padrão de fragmentação apresentado.

Routray e Orsat (2014) [155], verificaram que as folhas de *V. myrtillus* L., adquirem uma cor vermelha, dada a acumulação de antocianinas e perda de clorofilas, na estação do Outono. Estes autores referem que a extensão da cor vermelha pode variar com o cultivar, pelo que o padrão de variação da cor das folhas pode estar associado à variedade, ao tempo de colheita das folhas ou até mesmo outra característica relevante a esta espécie. Nas espécies analisadas, estes autores reportaram que os valores mais elevados no conteúdo de fenólicos, antocianinas monoméricas e elevada capacidade antioxidante foi obtida para as folhas de *Vaccinium* colhidas em Outubro.

Jaakola et al. (2004) [140] analisaram o efeito da radiação solar nas folhas de *Vaccinium myrtillus* L. Estes autores concluíram que a expressão dos elevados níveis de

antocianinas nas folhas jovens é explicado pelo facto de estas folhas terem sido expostas a elevados níveis de radiação solar. Determinaram que o perfil de antocianinas das folhas jovens é diferente do perfil das bagas e semelhante ao perfil das flores desta espécie (Aakola *et al.* 2002 [156]). Enquanto a composição de antocianinas dos frutos é mais variada, apenas detectaram cianidina-3-*O*-glucósido nas folhas que cresceram sob acção da radiação solar.

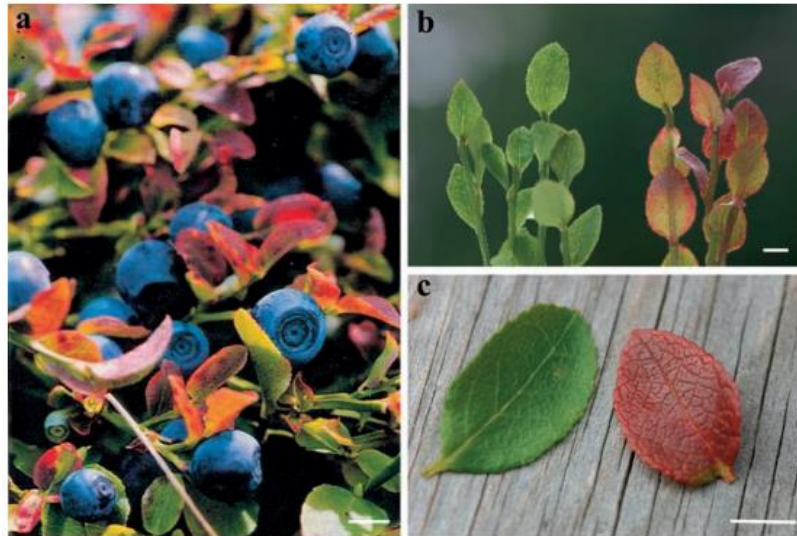


Figura 35 - Estudo da acção da radiação solar da espécie *Vaccinium myrtillus* L., pelos autores Jaakola *et al.* (2004) [140]. Em a) frutas e folhas; b) e c) folhas maduras e folhas jovens.

Estes autores [140], confirmaram que a activação da biossíntese dos flavonóides é consequência da elevada radiação solar. A importância da biossíntese dos flavonóides na protecção contra a radiação UV está bem patente na literatura [157]. Tendo por base estes resultados, sugeriram que os flavonóis e a cianidina-3-*O*-glucósido simultaneamente com ácidos hidroxicínâmicos desempenham um papel predominante na defesa contra a elevada radiação solar nas folhas de *Vaccinium*.

Oszmiański *et al.* (2016) [19] realizaram o estudo comparativo das bagas e folhas da espécie *V. macrocarpon* L.. Nas folhas, detectaram cinco antocianinas: a cianidina-3-*O*-galactósido, a cianidina-3-*O*-glucósido, a cianidina-3-*O*-arabinósido, a peonidina-3-*O*-glucósido e a malvidina-3-*O*-arabinósido.

Pensa-se que, no caso da espécie *V. padifolium* a cor vermelha poderá dever-se ao facto de as folhas serem muito jovens e localizarem-se na ponta dos ramos, muito expostas à luz, e de ainda não desenvolverem clorofilas. Estudos revelam [157] que a

regulação da biossíntese dos flavonóides, incluindo desenvolvimento de flores, amadurecimento das bagas e pigmentação das folhas é induzida pelo *stress* e tem sido relacionada com a regulação da produção dos flavonóides.

Tabela 22 - Caracterização do perfil de antocianinas, por HPLC-DAD-ESI⁺/MSⁿ, das folhas jovens de *Vaccinium padifolium*.

Nº	t _R (min)	[M+H] ⁺ (m/z)	HPLC-DAD-ESI/MS ⁿ m/z (% pico base)	Identificação
1	3,6	449	MS ² [449]: 317 (17,4), 303 (61,9), 287 (100) MS ³ [449→287]: 241 (82,2), 213 (100), 175 (57,6), 161 (87,3), 153 (78,9), 137 (24,6), 109 (19,2)	Cianidina-O-hexósido
2	4,9	449	MS ² [449]: 317 (17,4), 303 (61,9), 287 (100) MS ³ [449→287]: 241 (82,2), 213 (100), 175 (57,6), 161 (87,3), 153 (78,9), 137 (24,6), 109 (19,2)	Cianidina-O-hexósido
3	5,1	419	MS ² [419]: 317 (17,4), 303 (61,9), 287 (100) MS ³ [419→287]: 241 (82,2), 213 (100), 175 (57,6), 161 (87,3), 153 (78,9), 137 (24,6), 109 (19,2)	Cianidina-O-pentósido
4	6,7	449	MS ² [449]: 317 (17,4), 303 (61,9), 287 (100) MS ³ [449→287]: 241 (82,2), 213 (100), 175 (57,6), 161 (87,3), 153 (78,9), 137 (24,6), 109 (19,2)	Cianidina-O-hexósido

3.1.6. *Vaccinium cylindraceum*

Na figura e tabela seguintes (Figura 36 e Tabela 23, respectivamente) encontra-se a análise do perfil de antocianinas da espécie *V. cylindraceum*. Após a análise, verificou-se a presença de 9 antocianinas.

Como já referido, esta espécie é endémica do arquipélago dos Açores e apresenta algumas diferenças comparativamente à espécie de *V. padifolium*.

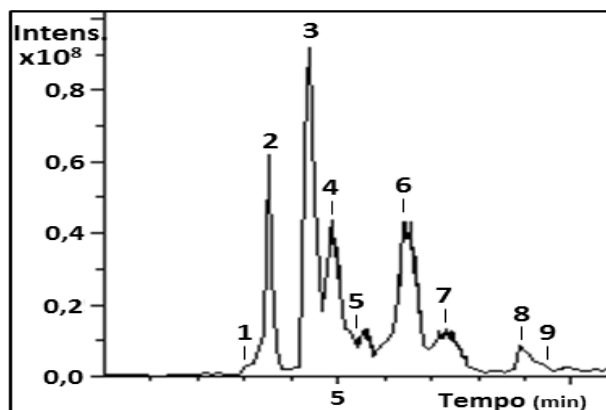


Figura 36 - Análise do perfil de antocianinas, por HPLC-DAD-ESI⁺/MSⁿ, das bagas de *Vaccinium cylindraceum*.

O pico **1**, **2** e **3** foram classificados como delphinidina-*O*-(pentosil)hexósido, delphinidina-*O*-hexósido e delphinidina-*O*-pentósido, respectivamente. Estes são compostos em comum com a espécie *V. padifolium*.

Na análise da espécie de *V. padifolium* não foram detectados derivados da cianidina nem da peonidina. Pelo contrário, na espécie de *V. cylindraceum*, as antocianinas identificadas com os números **4** e **7** foram classificadas como cianidina-*O*-hexósido e peonidina-*O*-hexósido, respectivamente. A aglicona da peonidina é caracterizada pelo seu ião molecular protonado a m/z 301 [19].

A antocianina **5** apresenta ião molecular protonado a m/z 479 e pico base a m/z 317. Assim, este composto foi classificados como petunidina-*O*-hexósido.

Por fim, as antocianinas identificadas com os números **6**, **8** e **9** foram identificados como malvidina-*O*-hexósido, malvidina-*O*-ramnósido e malvidina-*O*-pentósido, respectivamente.

Tabela 23 - Caracterização do perfil de antocianinas, por HPLC-DAD-ESI⁺/MSⁿ, das bagas de *Vaccinium cylindraceum*.

Nº	t _R (min)	[M+H] ⁺ (m/z)	HPLC-DAD-ESI/MS ⁿ m/z (% pico base)	Identificação
1	3,5	597	MS ² [597]: 303 (100) MS ³ [597→303]: 257 (59,9), 229 (41,0), 201 (26,8), 159 (46,6), 150 (25,7)	Delfinidina- <i>O</i> - (pentosil)hexósido
2	3,6	465	MS ² [465]: 303 (100) MS ³ [465→303]: 275 (16,9), 257 (100), 229 (29,4), 201 (25,3), 165 (24,3), 161 (21,8), 151 (10,3) MS ⁴ [465→303→257]: 229 (100), 202 (29,8), 201 (29,8), 187 (11,7), 173 (19,8), 117 (21,8)	Delfinidina- <i>O</i> -hexósido
3	4,3	435	MS ² [435]: 303 (100) MS ³ [435→303]: 257 (100), 229 (42,2), 201 (26,8), 159 (46,6), 150 (25,7) MS ⁴ [435→303→257]: 229 (100), 213 (54,2), 201 (19,9), 147 (21,1), 117 (10,1)	Delfinidina- <i>O</i> -pentósido
4	4,5	449	MS ² [449]: 317 (17,4), 303 (61,9), 287 (100) MS ³ [449→287]: 241 (82,2), 213 (100), 175 (57,6), 161 (87,3), 153 (78,9), 137 (24,6), 109 (19,2)	Cianidina- <i>O</i> -hexósido
5	5,4	479	MS ² [479]: 317 (100) MS ³ [479→317]: 303 (100), 274 (57,3), 257 (14,4), 245 (24,3), 229 (34,4), 218 (33,1), 203 (27,1), 150 (27,2)	Petunidina- <i>O</i> -hexósido
6	6,0	493	MS ² [493]: 331 (100) MS ³ [493→331]: 315 (67,0), 299 (84,8), 287 (100), 270 (44,7), 242 (23,4), 179 (26,4)	Malvidina- <i>O</i> -hexósido
7	6,3	463	MS ² [463]: 301 (100) MS ³ [463→301]: 287 (100)	Peonidina- <i>O</i> -hexósido
8	9,6	477	MS ² [477]: 331 (100) MS ³ [477→331]: 315 (77,2), 299 (100), 287 (83,0), 270 (37,8), 269 (10,4), 242 (40,4), 179 (26,5)	Malvidina- <i>O</i> -ramnósido
9	9,7	463	MS ² [463]: 331 (100) MS ³ [463→331]: 315 (100), 299 (76,8), 287 (84,3), 270 (24,4), 242 (16,7), 230 (17,7), 179 (27,7), 166 (11,5)	Malvidina- <i>O</i> -pentósido

4. Estudo da influência da digestão gastrointestinal *in vitro* na actividade antioxidante dos extractos

A digestão é um processo complexo, onde os alimentos ingeridos são quebrados em espécies mais pequenas, permitindo assim a sua absorção. Durante este processo, há que considerar dois processos que ocorrem em simultâneo: (i) a transformação mecânica que reduz o tamanho das partículas dos alimentos e (ii) a transformação enzimática, onde as macromoléculas são degradadas, para posterior absorção [72].

4.1. Modelo de digestão gastrointestinal *in vitro*

Estes ensaios foram realizados com o intuito de avaliar o efeito da digestão gastrointestinal *in vitro*, sobre as plantas produtoras de bagas estudadas. Para este estudo, os liofilizados foram sujeitos a um modelo *in vitro* que mimetiza as condições fisiológicas. Posteriormente, realizou-se o estudo da actividade antioxidante dos extractos resultantes. As amostras *não digeridas* foram incluídas no estudo, de forma a comparar com as amostras sujeitas ao processo de digestão *in vitro*¹³.

4.2. Actividade antioxidante

A composição fenólica dos extractos analisados está associada às suas propriedades antioxidantes [25].

4.2.1. Determinação do conteúdo de fenólicos e flavonóides totais e da capacidade antioxidante dos extractos

✓ Conteúdo de fenólicos totais (TPC)

O conteúdo de fenólicos totais foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu e expresso em miligrama equivalente ácido gálico por grama de extracto (mg GAE/ g extracto). A recta de calibração foi executada com diferentes soluções, de concentrações conhecidas, de ácido gálico e obteve-se um coeficiente de correlação muito próximo de 1 ($R^2 = 0,9989$). Assim, determinou-se o conteúdo de fenólicos pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu.

¹³ Estava previsto a realização do estudo comparativo da composição dos extractos pré e pós digestão gastrointestinal *in vitro*; tal não foi possível por avaria do equipamento.

O ensaio de Folin-Ciocalteu não é específico para os compostos fenólicos, uma vez que se baseia no poder redutor dos componentes dos extratos mas continua a ser o reagente mais utilizado para "quantificar" o conteúdo em compostos fenólicos. [158]. Este reagente dá resultado positivo com outros compostos para além dos polifenóis, particularmente todos os redutores, como alguns derivados do tiol, açúcares redutores, algumas vitaminas, especialmente a vitamina C, e aminoácidos aromáticos. Adicionalmente, a resposta dos compostos fenólicos a este ensaio é afectada tanto pela posição como pelo grau de hidroxilação dos compostos fenólicos[100].

Estudo do TPC nas diferentes partes morfológicas

Na Figura 37 encontram-se representados os resultados obtidos na análise do TPC das diferentes partes morfológicas de todas as espécies alvo.

O intervalo de valores obtidos no caso das bagas foi $27,73 \pm 1,00$ a $103,42 \pm 1,63$ mg GAE/ g extracto. O intervalo de valores obtido para as folhas foi $90,65 \pm 3,11$ a $341,25 \pm 2,27$ mg GAE/ g extracto, confirmando, desta forma, que as folhas são a parte morfológica com maior poder redutor.

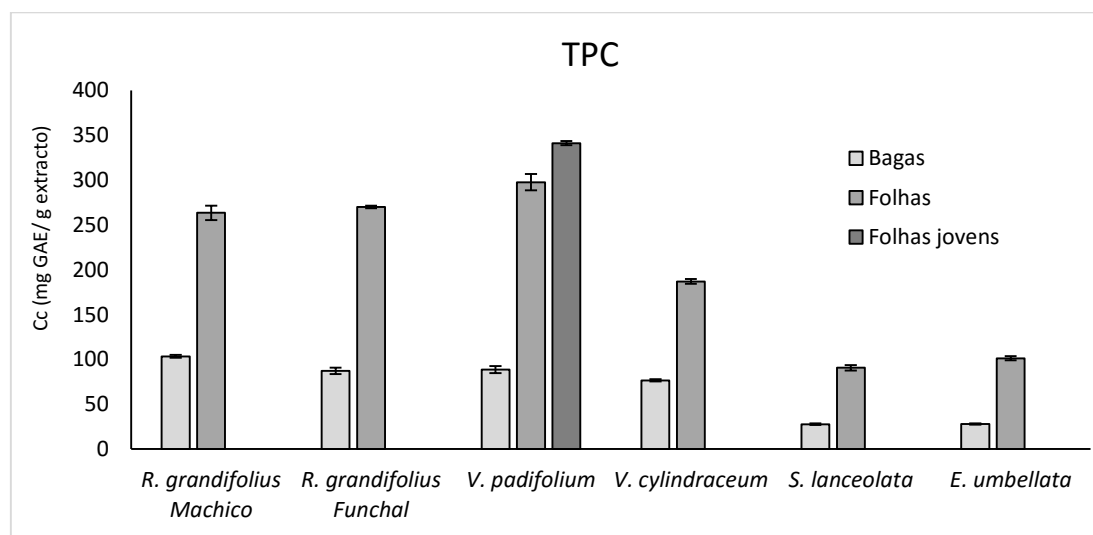


Figura 37 - Estudo do TPC das amostras *não digeridas*, das diferentes partes morfológicas (bagas, folhas e folhas jovens) de *Rubus grandifolius* (Machico e Funchal), *Vaccinium padifolium*, *Vaccinium cylindraceum*, *Sabucus lanceolata* e *Elaeagnus umbellata*. Resultados expressos em mg GAE/ g extracto; valores apresentados média±desvio padrão.

Tendo em conta que na espécie *V. padifolium* foram estudadas dois tipos de folhas, as jovens foram as que atingiram o valor mais elevado no TPC $341,25 \pm 2,27$ mg GAE/ g extracto. As bagas de sabugueiro (*S. lanceolata*) foram a amostra com menor conteúdo de compostos fenólicos; $27,73 \pm 1,00$ mg GAE/ g extracto.

As espécies *S. lanceolata* e *E. umbellata* foram as que obtiveram menor valor de TPC; $27,73 \pm 1,00$ e $28,02 \pm 0,70$ mg GAE/ g extracto, respectivamente. A literatura é escassa em dados sobre a *E. umbellata*, porém Pei *et. al* (2015) [38], determinaram o valor do TPC para as bagas de *E. umbellata* e obtiveram valores no intervalo de 190-434 mg GAE/100 g de peso fresco, pelo que não será possível comparar com os nossos, já que são expressos de formas diferentes.

Para as bagas de *R. grandifolius*, obteve-se valores mais elevados de TPC. As amostras colhidas em Machico apresentaram um valor mais elevado de fenólicos totais do que aquelas colhidas no Funchal; $103,42 \pm 1,63$ e $87,20 \pm 3,44$ mg GAE/ g extracto, respectivamente. Quanto ao género *Vaccinium*, verifica-se uma diferença entre as espécies estudadas: obteve-se o valor de $88,57 \pm 4,01$ mg GAE/ g extracto para a espécie *V. padifolium* e $76,63 \pm 1,30$ mg GAE/ g extracto para a espécie *V. cylindraceum*.

Podšedek *et al.* (2014) [100], no seu estudo sobre o conteúdo de fenólicos totais de algumas bagas dos géneros *Vaccinium* e *Rubus*, obtiveram um valor de TPC mais elevado nas bagas do género *Vaccinium* (337,05 – 540,04 mg GAE/ 100g de peso fresco e 288,82 mg GAE/ 100g de peso fresco, para os géneros *Vaccinium* e *Rubus*, respectivamente).

Estudo do efeito da digestão nas diferentes partes morfológicas no TPC

Com o objectivo de compreender o efeito da digestão no conteúdo de compostos fenólicos, determinou-se o TPC dos diferentes ensaios e compilou-se os resultados Figura 38 e Figura 39, bagas e folhas, respectivamente.

Pela Figura 38, relativamente ao estudo das bagas, verifica-se que a amostra tal qual, isto é *não digerida*, apresenta maior conteúdo de fenólicos, em todas as espécies. Como já constatado anteriormente, as amoras (*R. grandifolius*) colhidas em

Machico são a espécie com maior conteúdo. A *S. lanceolata* é a que detém o menor conteúdo.

Assim, é possível constatar que os compostos fenólicos sofrem degradação durante o processo digestivo.

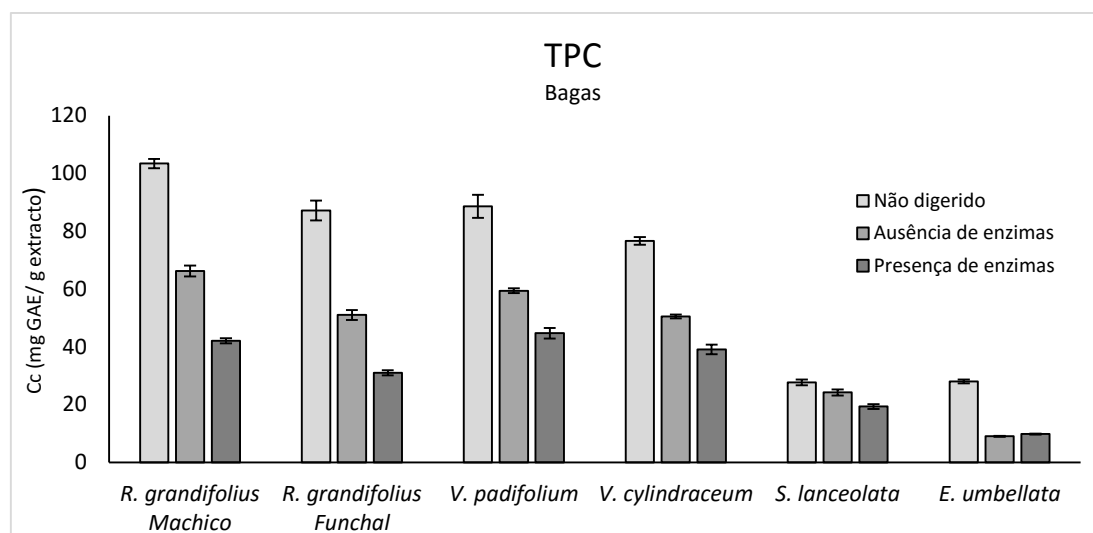


Figura 38 - Estudo do efeito da digestão *in vitro* no valor de TPC das bagas de *Rubus grandifolius* (Machico e Funchal), *Vaccinium padifolium*, *Vaccinium cylindraceum*, *Sambucus lanceolata* e *Elaeagnus umbellata*. Resultados expressos em mg GAE/ g extracto; valores apresentados média±desvio padrão.

De um modo geral, o padrão apresentado é muito semelhante em todas as espécies analisadas (*não digeridos* > *digeridos na ausência de enzimas* > *digeridos na presença de enzimas*), verificando-se apenas uma diferença pouco significativa na espécie *E. umbellata* (*não digeridos* > *digeridos na ausência de enzimas* < *digeridos na presença de enzimas*).

Chiang *et al.* (2012) [159], estudaram a variação do TPC após a digestão *in vitro* na espécie *Ribes* “uva-crispa”. Estes autores verificaram que o valor do TPC aumentou nas amostras sujeitas à digestão *in vitro*. Deste modo, concluíram que o processo de digestão gastrointestinal *in vitro*, ao qual as amostras foram sujeitas, parece não destruir ou reduzir o conteúdo de composto fenólicos. Esta observação pode ser uma consequência da falta de especificidade do ensaio de Folin-Ciocalteu. No processo de digestão há hidrólise dos compostos glicosilados, podendo aumentar significativamente o conteúdo de açúcares livres e serem estes os responsáveis pela variação do TPC.

Estudos prévios [160] mostraram que os compostos fenólicos são altamente sensíveis a condições de pH alcalino, causando a sua degradação. Assim, é provável que se verifique uma diminuição no valor de TPC após a digestão *in vitro*. Porém, há a possibilidade de que a exposição a estas condições possa originar compostos fenólicos com diferentes estruturas químicas, logo diferentes actividades biológicas.

No que respeita às folhas (Figura 39) o resultado é muito semelhante ao das bagas: o TPC inicial (extrato não digerido) é mais elevado, diminuindo com a digestão quer na presença quer na ausência de enzimas.

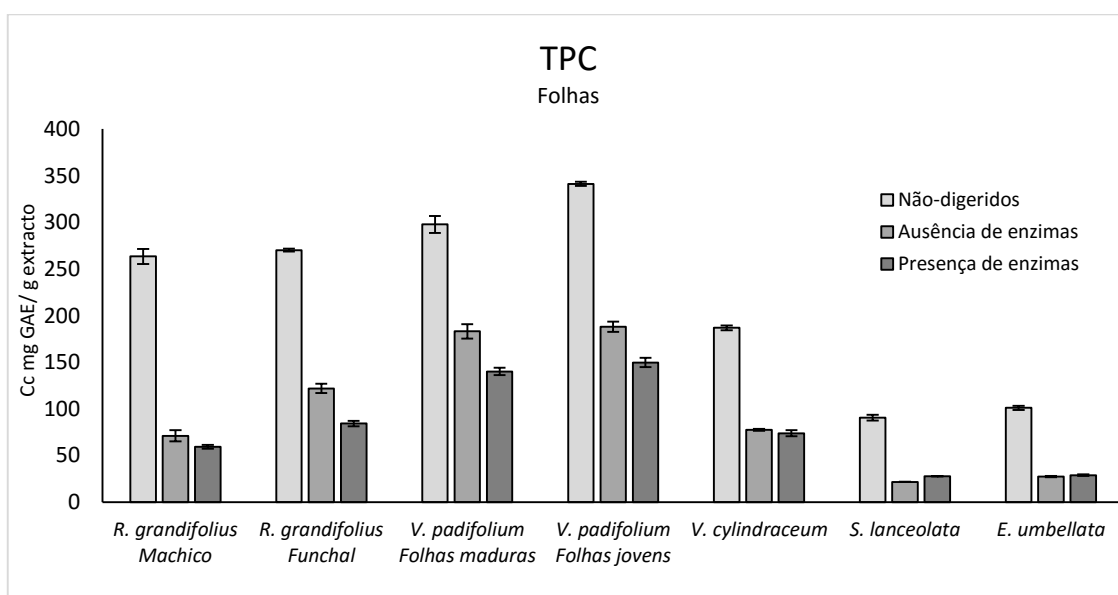


Figura 39 - Estudo do efeito da digestão *in vitro* no valor de TPC das folhas de *Rubus grandifolius* (Machico e Funchal), *Vaccinium padifolium*, *Vaccinium cylindraceum*, *Sambucus lanceolata* e *Elaeagnus umbellata*. Resultados expressos em mg GAE/ g extracto; valores apresentados média±desvio padrão.

As folhas da espécie *V. padifolium* destacam-se entre as outras espécies, por possuírem valores superiores aos das outras espécies, principalmente as folhas jovens.

Quando examinados os efeitos da digestão *in vitro* nos polifenóis da dieta, a luz (embora os ensaios tenham decorrido, tanto quanto possível, na ausência de luz) e o oxigénio são dois factores importantes a considerar, já que podem alterar a estrutura e as propriedades dos compostos fenólicos, devido à degradação oxidativa [161] e a reacções de polimerização [162].

✓ Conteúdo de flavonóides totais

No estudo do conteúdo de flavonóides totais, determinado pelo método colorimétrico do cloreto de alumínio, utilizou-se a rutina como padrão. A partir desta, construiu-se uma recta de calibração com diferentes concentrações (10-200 mg/L) e obteve-se um coeficiente de correlação muito próximo de 1 ($R^2= 0,9993$). Deste modo, os resultados foram expressos em miligrama de equivalente de rutina por grama de extracto (mg RE/ g extracto).

Estudo do TFC nas diferentes partes morfológicas

Determinou-se o conteúdo de flavonóides totais das diferentes partes morfológicas e os resultados encontram-se na Figura 40.

A Figura 40 revela que os valores de TFC das folhas são consideravelmente superiores aos valores das bagas.

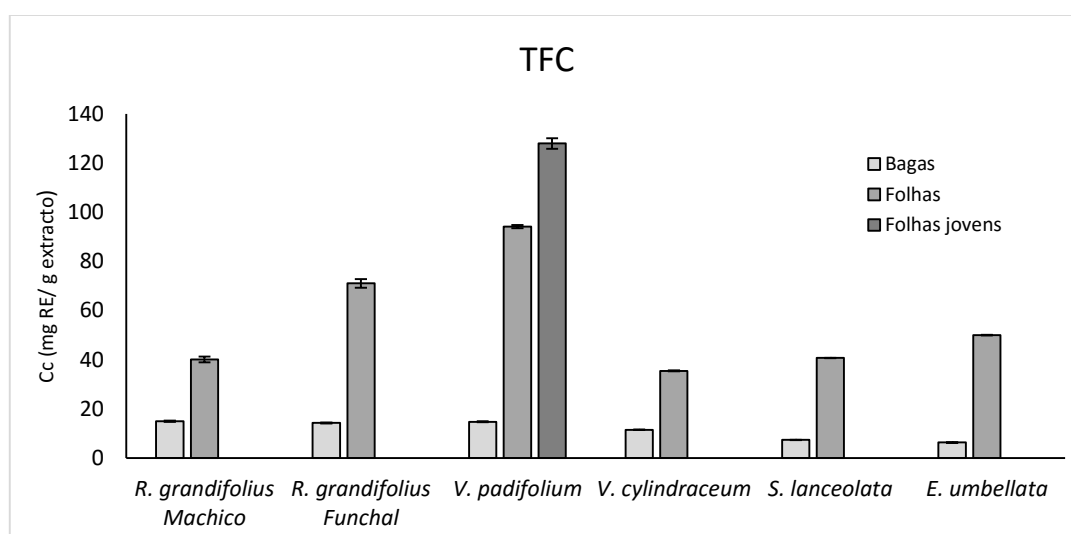


Figura 40 - Estudo do TFC das amostras *não digeridas*, das diferentes partes morfológicas (bagas, folhas e folhas jovens) de *Rubus grandifolius* (Machico e Funchal), *Vaccinium padifolium*, *Vaccinium cylindraceum*, *Sabucus lanceolata* e *Elaeagnus umbellata*. Resultados expressos em mg RE/ g extracto; valores apresentados média±desvio padrão.

Nos resultados obtidos para as espécies de *R. grandifolius*, verifica-se que o valor de TFC das bagas foi muito semelhante entre as amostras colhidas em Machico (14,88±0,27 mg RE/ g extracto) e no Funchal (14,25±0,20 mg RE/ g extracto). Nas folhas, observa-se uma diferença maior, tendo em conta que a amostra do Funchal o

valor obtido foi de $71,01 \pm 1,80$ mg RE/ g extracto e na variedade de Machico $40,11 \pm 1,19$ mg RE/ g extracto.

Entre as amostras do género *Vaccinium*, verifica-se que a espécie *V. padifolium* possui maior conteúdo de flavonóides do que a espécie *V. cylindraceum*, tanto nas bagas ($14,67 \pm 0,19$ e $11,45 \pm 0,08$ mg RE/ g extracto, respectivamente) como nas folhas. Relativamente às folhas, verifica-se que na primeira espécie, os valores TFC são muito superiores do que na segunda. Mais uma vez, as folhas jovens da espécie *V. padifolium* foram a parte morfológica com maior teor de flavonóides, de entre as espécies estudadas.

Quanto às espécies com menor valor de TFC, a *S. lanceolata* e a *E. umbellata* apresentam valores muito próximos nas diferentes partes morfológicas: bagas ($7,35 \pm 0,05$ e $6,31 \pm 0,05$ mg RE/ g extracto, respectivamente) e folhas ($40,66 \pm 0,09$ e $49,96 \pm 0,10$ mg RE/ g extracto, respectivamente).

Li *et al.* (2012) [138] demonstraram também que os valores TPC e TFC, das folhas da espécie *Vaccinium ashei* foram significativamente superiores aos resultados obtido nas bagas.

Estudo do efeito da digestão das diferentes partes morfológicas no TFC

Na Figura 41 estão representados os valores obtidos da análise do conteúdo total de flavonóides nos extractos de bagas, *digeridos* e *não digeridos*.

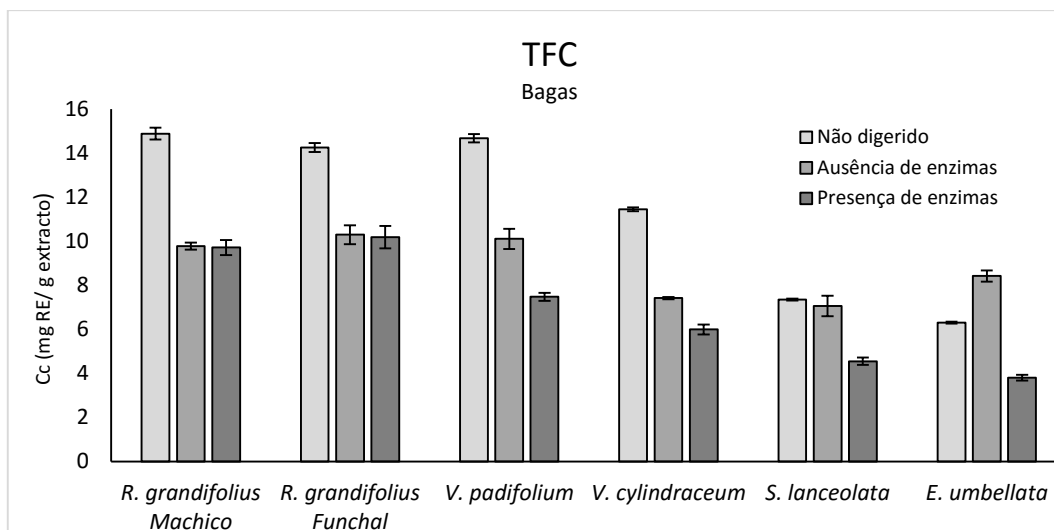


Figura 41 - Estudo do efeito da digestão *in vitro* no valor de TFC das bagas de *Rubus grandifolius* (Machico e Funchal), *Vaccinium padifolium*, *Vaccinium cylindraceum*, *Sambucus lanceolata* e *Elaeagnus umbellata*. Resultados expressos em mg RE/ g extracto; valores apresentados média±desvio padrão.

A tendência é muito semelhante à obtida nos ensaios anteriores (TPC). Assim, verifica-se que as amostras *não digeridas* possuem um valor de TFC mais elevado do que as amostras sujeitas à digestão, à excepção da espécie de *E. umbellata*.

Quanto às amostras sujeitas à digestão, nas espécies de *R. grandifolius* não se verifica variação entre os extractos da *digestão na ausência* e na *presença de enzimas*. Nas restantes espécies, esta variação é verificada, embora não se trate de uma variação acentuada, como na espécie de *E. umbellata*.

As folhas jovens de *V. padifolium* são a amostra que se destaca na Figura 42, como sendo aquelas que possuem maior conteúdo de flavonóides totais. Um dado interessante de constatar nas folhas jovens é que no ensaio da digestão na *ausência de enzimas* o valor de TFC é inferior ao do ensaio na *presença de enzimas*, pelo que se verifica um aumento no teor de flavonóides após o tratamento enzimático, conseqüente da digestão *in vitro*. Esta mesma tendência é observada na espécie *S. lanceolata*, porém com valores inferiores (*ausência de enzimas*: 6,65±0,07 mg RE/g extracto e *presença de enzimas*: 10,65 ±0,27 mg RE/g extracto).

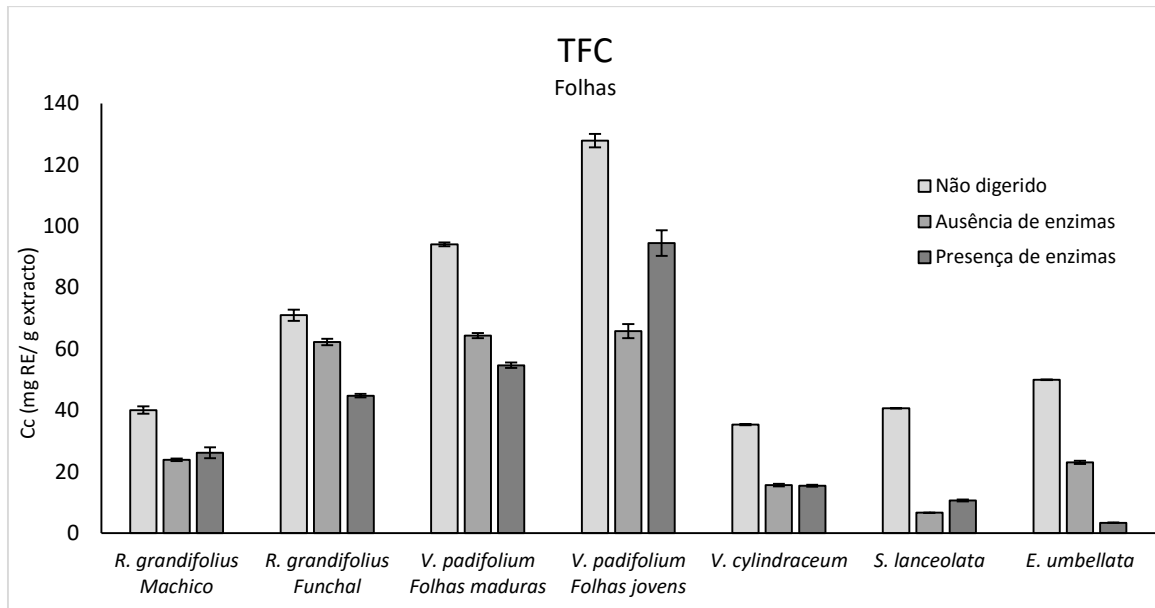


Figura 42 - Estudo do efeito da digestão *in vitro* no valor de TFC das folhas de *Rubus grandifolius* (Machico e Funchal), *Vaccinium padifolium*, *Vaccinium cylindraceum*, *Sambucus lanceolata* e *Elaeagnus umbellata*. Resultados expressos em mg RE/ g extracto; valores apresentados média±desvio padrão.

✓ **Estudo da capacidade antioxidante total, pelos métodos ABTS, das diferentes partes morfológicas**

A capacidade antioxidante total das diferentes amostras foi determinada através de dois testes: ABTS e DPPH. Estes testes medem a capacidade dos extractos em neutralizar os radicais induzidos nas reacções *in vitro*. Estes testes diferem nos radicais e na sensibilidade do método, daí obter-se valores absolutos superiores no ensaio do ABTS, comparativamente ao ensaio do DPPH.

Contudo, verifica-se que a tendência entre as amostras é muito semelhante nos dois testes analisados.

De forma a obter os resultados procedeu-se à construção das rectas de calibração, para cada um dos ensaios, com diferentes concentrações de Trolox. Os resultados finais foram expressos em milimol de equivalente de Trolox por grama de extracto (mmol TE/g extracto).

Em concordância com os testes anteriores, é possível observar pela **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** e que, em ambos os testes, as folhas foram a parte morfológica com maior capacidade de neutralização dos radicais.

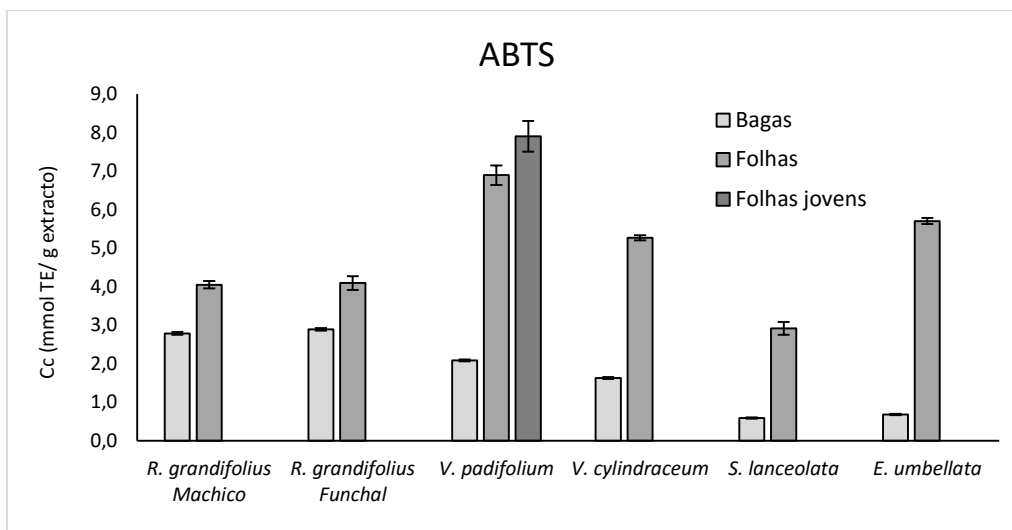


Figura 43 - Estudo da actividade antioxidante total, pelo ensaio ABTS, das amostras *não digeridas*, das diferentes partes morfológicas (bagas, folhas e folhas jovens) de *Rubus grandifolius* (Machico e Funchal), *Vaccinium padifolium*, *Vaccinium cylindraceum*, *Sabucus lanceolata* e *Elaeagnus umbellata*. Resultados expressos em mmol TE/ g extracto; valores apresentados média±desvio padrão.

No que respeita ao ensaio da capacidade antioxidante pelo método ABTS (Figura 43), verifica-se que os extractos das bagas variam no intervalo de $0,59 \pm 0,02$ a $2,89 \pm 0,03$ mmol TE/ g extracto, correspondentes à espécie de *S. lanceolata* e à espécie de *R. grandifolius* (Funchal), respectivamente. O valor inferior da capacidade antioxidante, no caso das folhas, corresponde à espécie de *S. lanceolata* ($2,92 \pm 0,17$ mmol TE/ g extracto). As folhas jovens da espécie *V. padifolium* apresentam a maior capacidade antioxidante ($7,91 \pm 0,40$ mmol TE/ g extracto). Este resultado foi já constatado anteriormente, as folhas jovens da espécie *V. padifolium*, são as que possuem maior capacidade antioxidante.

Quanto ao ensaio da capacidade antioxidante pelo método DPPH (Figura 44), verifica-se que os extractos das bagas variam no intervalo de $0,13 \pm 0,00$ a $0,77 \pm 0,02$ mmol TE/ g extracto, correspondentes à espécie de *S. lanceolata*, e à espécie de *R. grandifolius* (Machico), respectivamente. No que concerne às folhas, o valor mais baixo da capacidade antioxidante é novamente atribuído à espécie de *S. lanceolata* ($0,64 \pm 0,01$ mmol TE/ g extracto). Por outro lado, as folhas jovens da espécie *V. padifolium* e as folhas de *R. grandifolius* (Machico) possuem o valor de actividade antioxidante mais elevado ($1,60$ mmol TE/ g extracto)

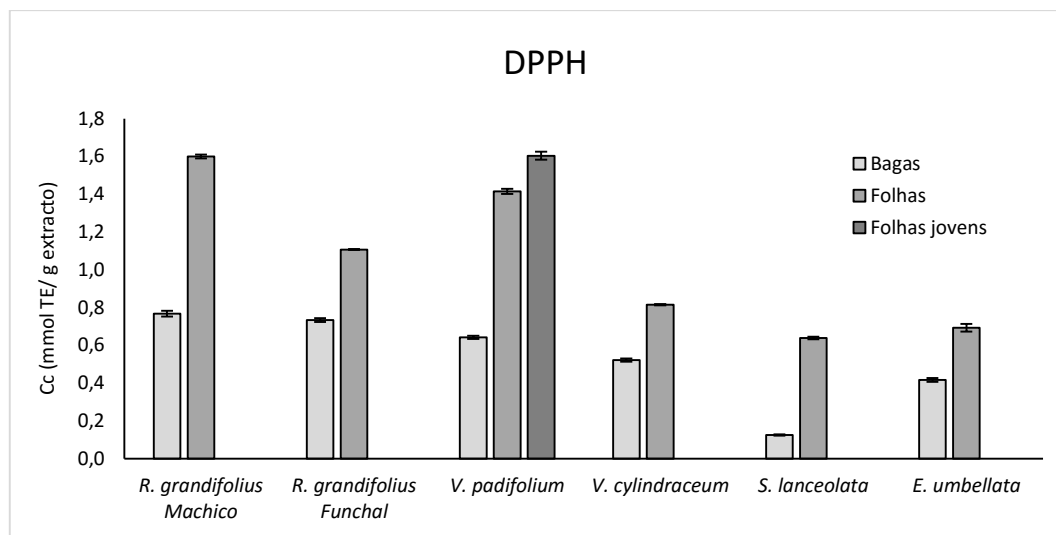


Figura 44 - Estudo da actividade antioxidante total, pelo ensaio DPPH, das amostras *não digeridas*, das diferentes partes morfológicas (bagas, folhas e folhas jovens) de *Rubus grandifolius* (Machico e Funchal), *Vaccinium padifolium*, *Vaccinium cylindraceum*, *Sabucus lanceolata* e *Elaeagnus umbellata*. Resultados expressos em mmol TE/ g extracto; valores apresentados média±desvio padrão.

Na análise das diferentes variedades da espécie de *R. grandifolius*, verifica-se que no ensaio do ABTS, a amostra do Funchal é a que apresenta maior capacidade antioxidante (bagas: $2,89 \pm 0,03$ mmol TE/ g extracto e folhas: $4,09 \pm 0,18$ mmol TE/ g extracto). No DPPH a tendência inverte-se, passando a variedade de Machico a apresentar valores de capacidade antioxidante ligeiramente mais elevados (bagas: $0,77 \pm 0,02$ mmol TE/ g extracto e folhas: $1,60 \pm 0,01$ mmol TE/ g extracto).

Na literatura [25], foram apresentados resultados da capacidade antioxidante pelos ensaios de ABTS e DPPH, correspondentes à espécie de *Rubus grandifolius*. Contrariamente aos nossos resultados, os extractos metanólicos das bagas possuem maior capacidade antioxidante do que qualquer outra parte morfológica desta espécie.

Nas bagas, de um modo geral, observa-se pelas Figura 45 e Figura 46, que ambas as variedades de amoras (*R. grandifolius*) são mais eficiente no que toca à capacidade neutralização dos radicais livres induzidos nos ensaios ABTS e DPPH do que as bagas do género *Vaccinium* (*V. padifolium* e *V. cylindraceum*). A mesma tendência foi verificada por Souza *et al.* (2014) [5], cujo estudo demonstrou que as espécies de *Rubus* apresentam maior capacidade antioxidante do que as espécies de *Vaccinium*, pelos mesmos métodos. Oszmiański *et al.* (2016) [163], determinaram que a actividade

antioxidante, pelos métodos ABTS e DPPH, das folhas de *Vaccinium macrocarpon* L. possuem valores 2 a 4 vezes superiores do que as bagas.

Verificou-se que a espécie *V. padifolium* é mais eficiente a neutralizar os radicais ABTS, do que a espécie *V. cylindraceum*. Estas espécies apresentam valores muito semelhantes na capacidade em neutralizar o radical DPPH. Em ambos os ensaios, verificou-se que as espécies *S. lanceolata* e *E. umbellta* são as espécies com menor capacidade antioxidante.

✓ **Estudo do efeito da digestão *in vitro*, das diferentes partes morfológicas, na capacidade antioxidante total**

Após a digestão *in vitro* das diferentes partes morfológicas das espécies em estudo, determinou-se a capacidade antioxidante pelos ensaios ABTS e DPPH dos extractos digeridos (na *ausência* e na *presença de enzimas*) e comparou-se com os dados relativos às amostras não digeridas.

Os resultados relativos aos estudos das bagas foram compilados na Figura 45 e na Figura 46.

À excepção das bagas de *S. lanceolata*, no ensaio do ABTS os extractos *não digeridos* apresentam valores mais elevados do que aqueles sujeitos à digestão. Estes resultados foram verificados tanto nas bagas, como nas folhas.

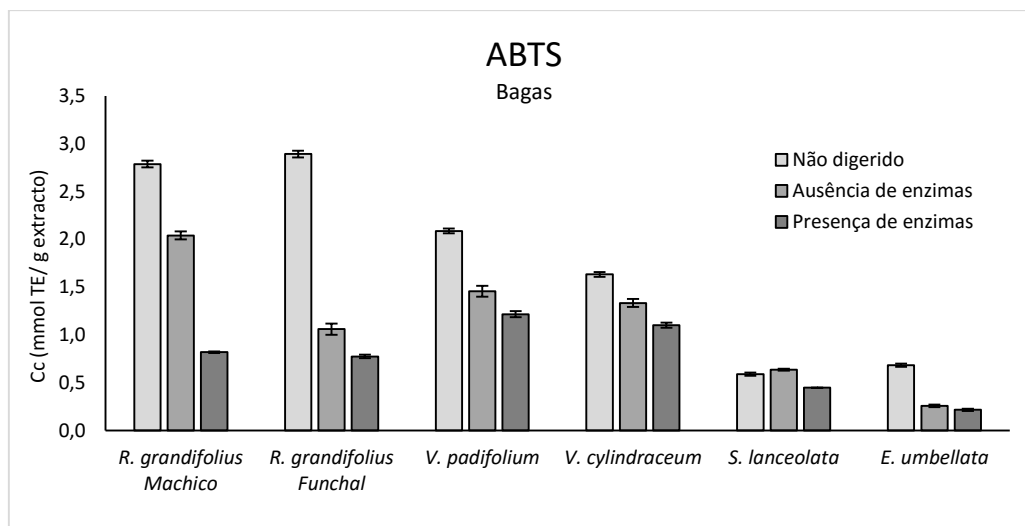


Figura 45 - Estudo do efeito da digestão *in vitro* na capacidade antioxidante, pelo ensaio ABTS, das bagas de *Rubus grandifolius* (Machico e Funchal), *Vaccinium padifolium*, *Vaccinium cylindraceum*, *Sambucus lanceolata* e *Elaeagnus umbellata*. Resultados expressos em mmol TE/ g extracto; valores apresentados média±desvio padrão.

Na espécie de *R. grandifolius* colhida no Funchal, verifica-se que uma grande variação entre a capacidade antioxidante dos extractos *não digeridos* e os extractos submetidos à digestão (*não digeridos*: $2,89 \pm 0,03$ e *digeridos na ausência de enzimas*: $1,06 \pm 0,06$ e na *presença de enzimas*: $0,77 \pm 0,02$ mmol TE/g extracto). Este resultado foi verificado nas espécies de *V. padifolium* ($2,09 \pm 0,02$; $1,46 \pm 0,06$ e $1,22 \pm 0,03$ mmol TE/g extracto, respectivamente), *V. cylindraceum* ($1,63 \pm 0,03$; $1,33 \pm 0,04$ e $1,10 \pm 0,03$ mmol TE/g extracto, respectivamente), embora seja uma variação menor. Nas amostras colhidas em Machico, verifica-se que esta diferença foi superior entre os extractos submetidos à digestão, ensaios com e sem enzimas ($2,04 \pm 0,04$ e $0,82 \pm 0,01$ mmol TE/g extracto, respectivamente).

Na espécie de *S. lanceolata*, verifica-se que os extractos *não digeridos* resultaram numa menor capacidade antioxidante ($0,59 \pm 0,02$ mmol TE/g extracto) do que os extractos *digeridos na presença de enzimas* ($0,64 \pm 0,01$ mmol TE/g extracto). Serão necessários testes complementares para compreender estes resultados.

Após a digestão, a actividade antioxidante dos extractos de *E. umbellata* é notavelmente afectada.

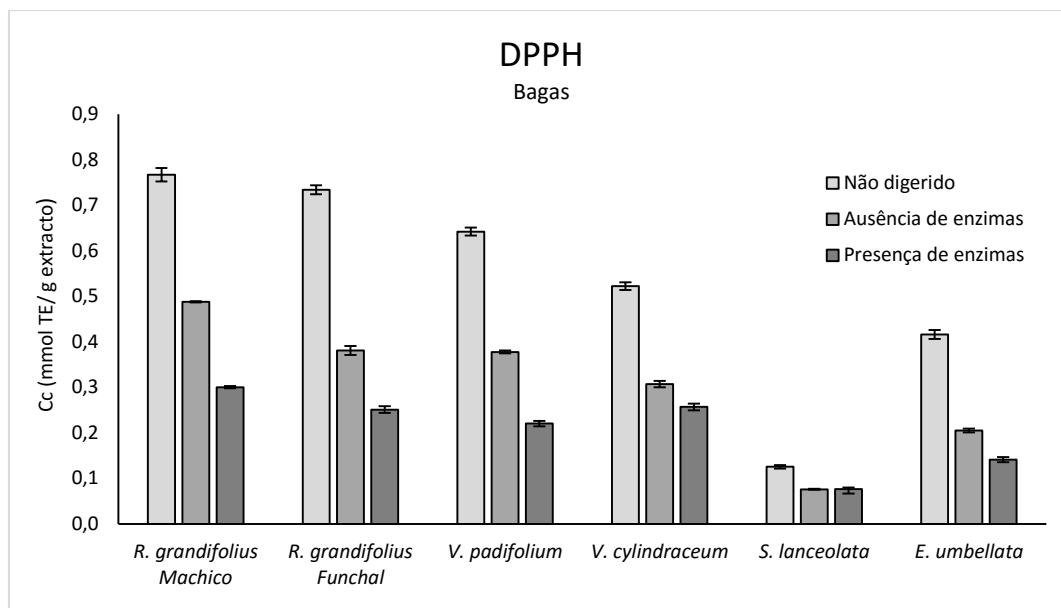


Figura 46 - Estudo do efeito da digestão *in vitro* na capacidade antioxidante, pelo ensaio DPPH, das bagas de *Rubus grandifolius* (Machico e Funchal), *Vaccinium padifolium*, *Vaccinium cylindraceum*, *Sambucus lanceolata* e *Elaeagnus umbellata*. Resultados expressos em mmol TE/ g extracto; valores apresentados média±desvio padrão.

Quanto ao ensaio do DPPH, verificou-se a mesma tendência entre as espécies de *R. grandifolius*, *V. padifolium*, *V. cylindraceum* e *E. umbellata*. Nestas espécies, a actividade antioxidante diminuiu cerca de 50% após a digestão. No caso da *S. lanceolata* esta variação foi menor. Na *S. lanceolata*, praticamente não se verificou diferença entre a actividade antioxidante dos ensaios resultantes da digestão (na ausência de enzimas e presença de enzimas: $0,077 \pm 0,00$ e $0,076 \pm 0,01$ mmol TE/g extracto).

Os resultados dos ensaios do ABTS e DPPH respeitantes às folhas encontram-se apresentados na Figura 47 e na Figura 48, respectivamente. No ensaio do ABTS os resultados não demonstraram um padrão consistente que permitisse retirar uma conclusão. Deste modo, seria importante a repetição de algumas amostras. Já no DPPH foi possível verificar a existência de uma diferença considerável entre a análise dos extractos *não digeridos* e aqueles que foram sujeitos à digestão *in vitro*.

Assim, comparando os dois métodos de determinação da actividade antioxidante das folhas, verifica-se que os compostos das folhas responsáveis pela actividade sobre o DPPH são muito mais sensíveis ao pH do que às enzimas.

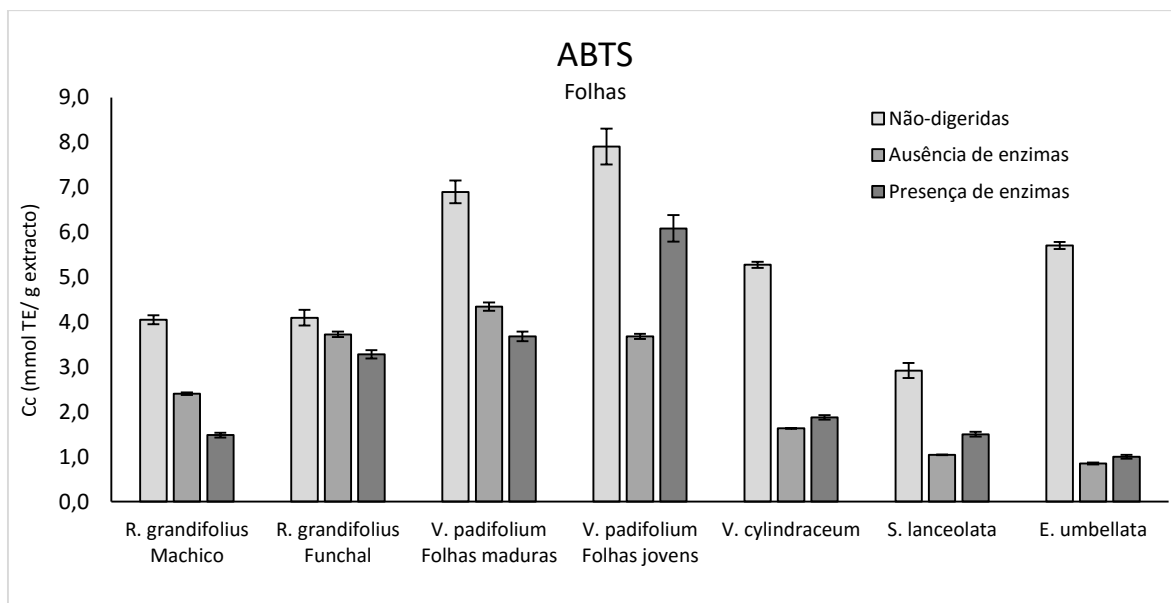


Figura 47 – Estudo do efeito da digestão *in vitro* na capacidade antioxidante, pelo ensaio ABTS, das folhas de *Rubus grandifolius* (Machico e Funchal), *Vaccinium padifolium*, *Vaccinium cylindraceum*, *Sambucus lanceolata* e *Elaeagnus umbellata*. Resultados expressos em mmol TE/ g extracto; valores apresentados média±desvio padrão.

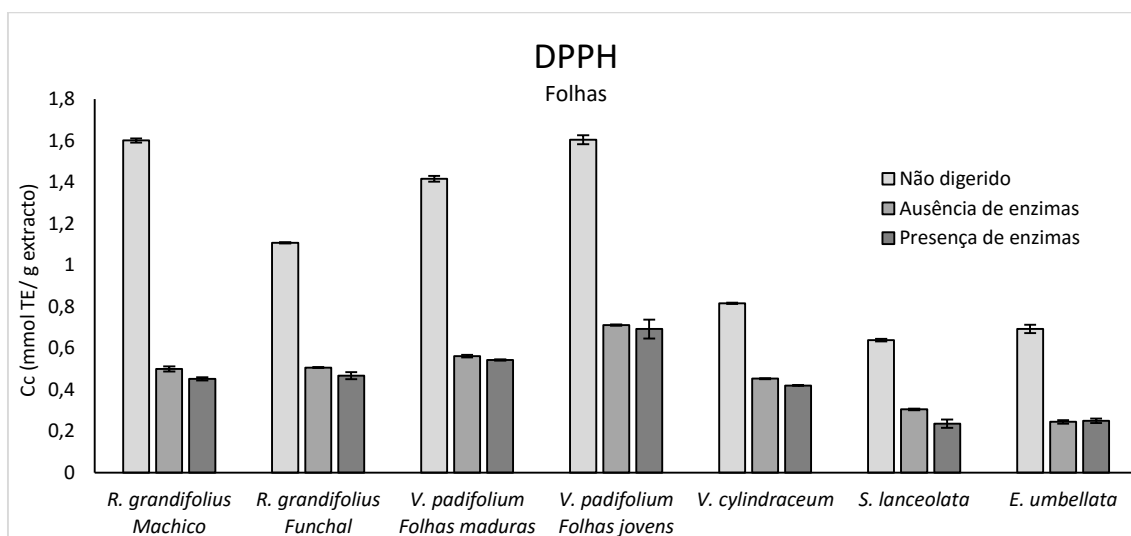


Figura 48 – Estudo do efeito da digestão *in vitro* na capacidade antioxidante, pelo ensaio DPPH, das folhas de *Rubus grandifolius* (Machico e Funchal), *Vaccinium padifolium*, *Vaccinium cylindraceum*, *Sambucus lanceolata* e *Elaeagnus umbellata*. Resultados expressos em mmol TE/ g extracto; valores apresentados média±desvio padrão.

Não estão disponíveis na literatura muitos estudos que façam uma análise comparativa entre a capacidade antioxidante das folhas e frutos da mesma espécie. Este facto dificulta a discussão dos resultados obtidos neste estudo. Outro factor que complicou a análise dos resultados foi o facto de algumas das plantas alvo de estudo serem endémicas da Macaronésia, algumas delas foram aqui estudadas pela primeira vez, sendo possível apenas um estudo comparativo com outras amostras da mesma espécie ou género, no caso das *Vaccinium*. Um dado importante seria a análise do perfil fenólico por HPLC-DAD-ESI/MSⁿ, dos extractos submetidos à digestão, de modo a compreender o verdadeiro efeito da digestão sobre as diferentes partes morfológicas, ou seja, averiguar o conteúdo polifenólico após o processo de digestão.

De um modo geral, verificou-se que as folhas possuem maior actividade antioxidante do que as bagas. De acordo com a literatura [163], [163], a actividade antioxidante das folhas de várias espécies é cerca de 2 a 10 vezes superior do que os frutos e seus produtos derivados. Outro estudo comparativo das propriedades antioxidantes das folhas e dos frutos confirma que as folhas possuem elevada capacidade antioxidante, pelos métodos ABTS e FRAP. Entre as espécies estudadas encontravam-se a *Vaccinium myrtillus* L. e a *Vaccinium macrocarpon* L. [164].

Os ensaios da simulação da digestão *in vitro* tiveram como principal objectivo a comparação da actividade antioxidante dos extractos *digeridos* (na *presença* ou *ausência de enzimas*) com a dos extractos *não digeridos*. Verificou-se, em geral, que existe diferença na actividade antioxidante dos extractos *não digeridos* e os extractos *digeridos*, embora se verifique uma variação superior entre ambos os ensaios da digestão *in vitro*.

Este resultado era já esperado, dada a influência do pH, da agitação mecânica, da degradação enzimática e até mesmo da força iónica. Assim sendo, o ensaio dos extractos sujeitos à *digestão na ausência de enzimas* teve um papel fundamental neste estudo, permitiu-nos concluir que a diminuição da actividade antioxidante, nos diferentes estudos, não foi atribuída maioritariamente à degradação enzimática. Acredita-se na possibilidade de degradação dos compostos, porém verifica-se que o pH

e a força iónica exerceram um papel mais importante do que as enzimas na estabilização dos compostos.

Com a modificação do pH e incubação, não só se observa uma diminuição da actividade antioxidante dos extratos sujeitos ao processo de digestão como se verifica uma diminuição acentuada do conteúdo em compostos fenólicos (TPC), logo, a hipótese de haver um simples processo de protonação, reversível conforme o pH do meio fisiológico, antes da absorção nas paredes do intestino parece estar afastada. O estudo (previsto) do perfil químico pós-digestão será valioso para se poder entender que moléculas estão disponíveis para penetrar na corrente sanguínea.

Apesar de virem aumentando em complexidade, os modelos de digestão gastrointestinal *in vitro* continuam a ser considerados processos minimalistas do processo que ocorre *in vivo*. Estes métodos não consideram os mecanismos de *feedback*, a microflora residente, o sistema imunitário ou até mesmo os controlos hormonais, entre outros factores [72]. Naturalmente que a actividade biológica dos fitoquímicos, encontrados nas amostras, são muito mais afectados pelo metabolismo e biodisponibilidade destas moléculas no organismo vivo [165], uma vez que a simulação *in vitro* não inclui todos os passos, nem considera todos os factores que podem influenciar a digestão gastrointestinal *in vivo*. Porém, o método de digestão *in vitro* é relativamente simples, acessível e reprodutível. Durante o processo digestivo, os compostos bioactivos podem sofrer alterações estruturais e químicas, que podem resultar em alterações na actividade biológica [165].

5. Estudo *in vitro* da inibição da actividade enzimática

De acordo com vários estudos [166–168], a inibição de algumas enzimas responsáveis pelo metabolismo dos hidratos de carbono, nomeadamente a α -amilase e a α -glucosidase, é uma estratégia importante no controlo da hiperglicémia associada à diabetes tipo 2.

Assim, neste estudo avaliou-se a capacidade dos extractos na inibição destas duas enzimas importantes no metabolismo dos hidratos de carbono.

5.1. Inibição da α -amilase

Nos ensaios de inibição da α -amilase, os resultados são apresentados em valor IC_{50} (mg de extracto/ mL), que indicam a quantidade de extracto (em mg) necessária para inibir 50% da actividade da enzima. Assim, quanto menor o valor de IC_{50} obtido para um determinado extracto, maior será a sua capacidade em inibir 50% da actividade da enzima.

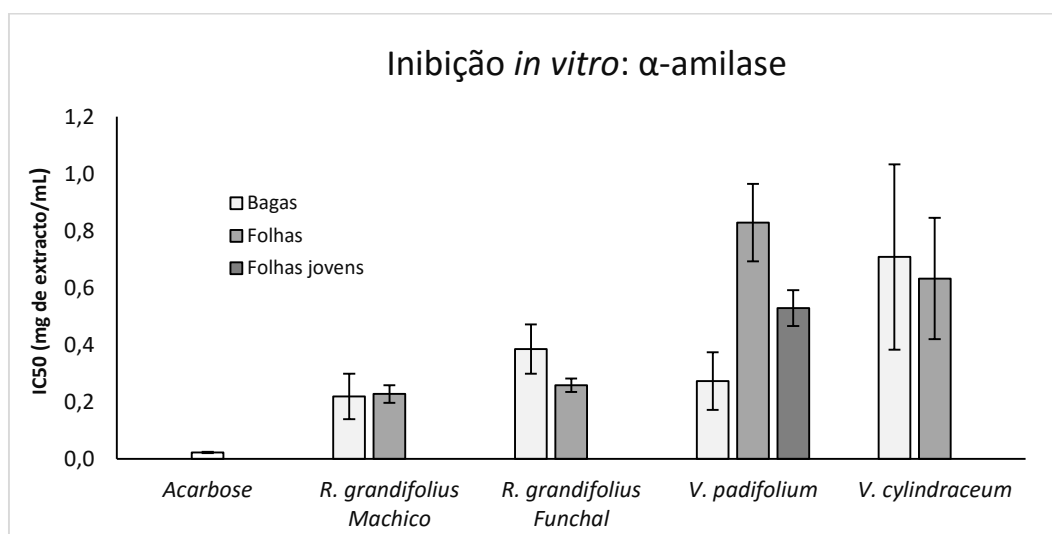


Figura 49 - Ensaio de inibição da α -amilase pelos extractos metanólicos das diferentes partes morfológicas das espécies estudadas (*Rubus grandifolius* de Machico e Funchal, *Vaccinium padifolium* e *Vaccinium cylindraceum*). A Acarbose foi utilizada como controlo positivo. Valores apresentados em IC_{50} (miligrama por mililitro de solução).

Tendo em conta o valor da acarbose (controlo positivo), IC_{50} de 0,023 mg/mL, a Figura 49 mostra que de entre as espécies estudadas a *R. grandifolius* (Machico) apresenta um menor valor de IC_{50} ($0,219 \pm 0,075$ mg/mL). Este resultado faz desta amostra a mais eficiente no que toca a inibição da α -amilase, não se tendo verificado uma grande variação entre as diferentes partes morfológicas. Na espécie colhida no

Funchal, essa diferença existe, sendo as folhas mais eficientes do que as bagas (0,259±0,024 e 0,385±0,086 mg/mL, respectivamente).

Na espécie *V. padifolium*, verificou-se um menor IC₅₀ para as bagas (0,273±0,101 mg/mL), seguindo-se as folhas jovens e verdes, para as quais se obteve um valor IC₅₀ de 0,529±0,063 e 0,828±0,136 mg/mL, respectivamente. Finalmente, para a espécie *V. cylindraceum* os resultados mostram que não existe uma diferença considerável entre bagas e folhas. Dado o valor de IC₅₀ obtido para ambas as partes morfológicas, esta foi a espécie menos eficiente na inibição enzimática ¹⁴.

Devido ao elevado valor de IC₅₀ obtido para determinadas amostras (nomeadamente *S. lanceolata* e *E. umbellata*), determinou-se o seu IC₂₅ (expresso em miligrama de extracto por mililitro de solução). Os resultados obtidos foram compilados na Figura 50. Tendo como controlo o valor de IC₂₅ da acarbose (0,008±0,001 mg/mL), é possível verificar que as espécies em estudo são fracos inibidores.

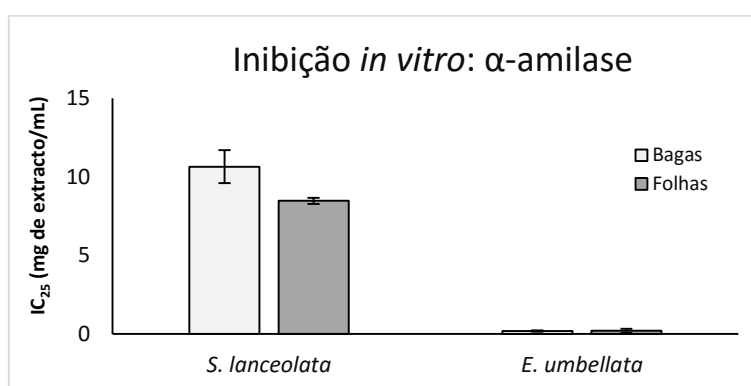


Figura 50 - Ensaio de inibição da α -amilase pelos extractos metanólicos das diferentes partes morfológicas das espécies estudadas (*Sambucus lanceolata* e *Elaeagnus umbellata*). A Acarbose foi utilizada como controlo positivo. Valores apresentados em IC₂₅ (miligrama por mililitro de solução).

Neste estudo não foi possível confirmar quais os compostos fenólicos responsáveis pela inibição da enzima α -amilase. Como analisado anteriormente, estes extractos são misturas complexas de compostos bioactivos. Mas verifica-se que as antocianinas das bagas e das folhas jovens da espécie de *Vaccinium padifolium*

¹⁴ Os ensaios com esta planta deveriam ser repetidos dados os enormes desvios encontrados, tal não foi possível por falta de tempo e de material vegetal.

desempenham um papel importante, já que estas partes morfológicas possuem menor valor de IC₅₀, comparativamente às folhas maduras.

Akkarachiyasit *et al.* (2010) [168] estabeleceram que a cianidina e os seus glicósidos podem interagir sinergeticamente com baixas concentrações de acarbose e aumentar o efeito inibitório da α -glucosidase intestinal e da α -amilase pancreática. Estes autores verificaram que quando a cianidina ou a cianidina-3-*O*-glucósido é adicionada à acarbose, a percentagem de inibição da α -amilase aumentou significativamente, sugerindo que este efeito sinérgico poderá ser proveitoso, uma vez que será possível a redução da dosagem da acarbose e, conseqüentemente, dos seus efeitos adversos.

Estes autores verificaram que a cianidina é um fraco inibidor da actividade da α -amilase mas a cianidina-3-*O*-glucósido é um forte inibidor. Este resultado indica que a glicosilação é importante para este efeito inibitório da cianidina.

O estudo de Grussu *et al.* (2011)[167] confirma que os extractos de bagas, ricos em polifenóis, podem inibir *in vitro* a enzima α -amilase mesmo a baixas concentrações. Estes autores concluíram que os elagitaninos, presentes na espécie *Rubus idaeus*, são os componentes mais activos no que toca à inibição da α -amilase. Propõem ainda que a presença das antocianinas potencia a acção dos ellagitaninos.

No presente estudo confirma-se, pelo perfil fenólico apresentado na secção 3, que as bagas de *R. grandifolius* são ricas em flavonóides e elagitaninos e contêm 10 antocianinas. Porém, verifica-se que as folhas desta mesma espécie possuem actividade inibitória semelhante às bagas sobre a enzima α -amilase. Ora, as folhas são pobres em elagitaninos e em flavonóides, mas ricas em ácidos hidroxicinâmicos e triterpenóides que podem ter algum efeito sobre a enzima.

5.2. Inibição da α -glucosidase

Procedeu-se da mesma forma para o estudo da capacidade de inibição dos extractos sobre a enzima α -glucosidase; os resultados estão disponíveis nas figuras seguintes (Figura 51 e Figura 52).

Neste ensaio, a acarbose foi também utilizada como controlo positivo, apresentando o valor de IC_{50} de $1,712 \pm 0,184$ mg/ mL. Verifica-se que todas as amostras analisadas são mais eficientes, já que os seus valores de IC_{50} são inferiores ao do controlo. Este resultado foi também obtido por Lordan *et al.* (2013)[166], em que os extractos analisados revelaram-se mais eficientes na inibição da α -glucosidase.

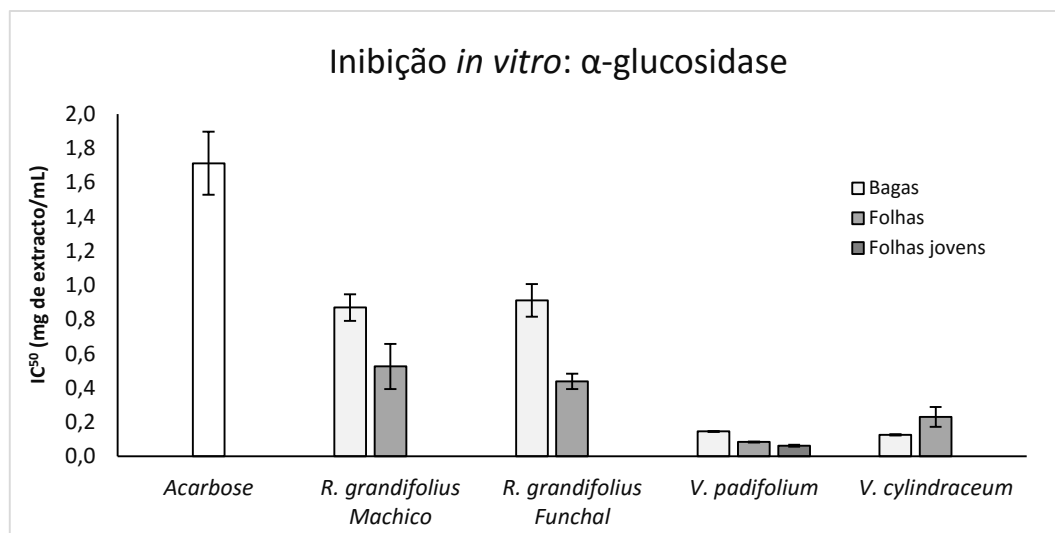


Figura 51 - Ensaio de inibição da α -glucosidase pelos extractos metanólicos das diferentes partes morfológicas das espécies estudadas (*Rubus grandifolius* de Machico e Funchal, *Vaccinium padifolium* e *Vaccinium cylindraceum*). A Acarbose foi utilizada como controlo positivo. Valores apresentados em IC_{50} (miligrama por mililitro de solução).

Em geral, as folhas demonstraram possuir uma maior capacidade de inibição da α -glucosidase, com especial atenção para as folhas da espécie *V. padifolium*. Estas revelam ser as mais eficientes na inibição da enzima, com um valor de IC_{50} de $0,084 \pm 0,003$ e $0,062 \pm 0,006$ mg de extracto/mL, respectivamente. De acordo com o perfil fenólico, estas folhas são ricas em ácidos hidroxicinâmicos, especialmente ácidos cafeoilquínicos e derivados do ácido cumárico, e cinchonina. Estes compostos podem ser os principais responsáveis pelos resultados obtidos.

O facto de as folhas serem mais efectivas na inibição da actividade da α -glucosidase permite-nos assumir que as antocianinas, compostos que diferenciam as folhas das bagas, não desempenham o papel mais importante na inibição desta enzima. A excepção verifica-se para a espécie *V. cylindraceum*, na qual as bagas ($0,126 \pm 0,003$ mg/mL) apresentam um valor inferior de IC_{50} , quando comparado com o das folhas ($0,231 \pm 0,058$ mg/mL).

Nas bagas, as amostras do género *Vaccinium*, quer da Madeira (*V. padifolium*) quer dos Açores (*V. cylindraceum*), foram as que resultaram num menor valor de IC₅₀: 0,146±0,003 e 0,126±0,003 mg/mL, respectivamente.

O valor de IC₂₅ foi calculado para as espécies menos activas *S. lanceolata* e *E. umbellata*, tal como nos ensaios de capacidade de inibição da actividade da α-amilase

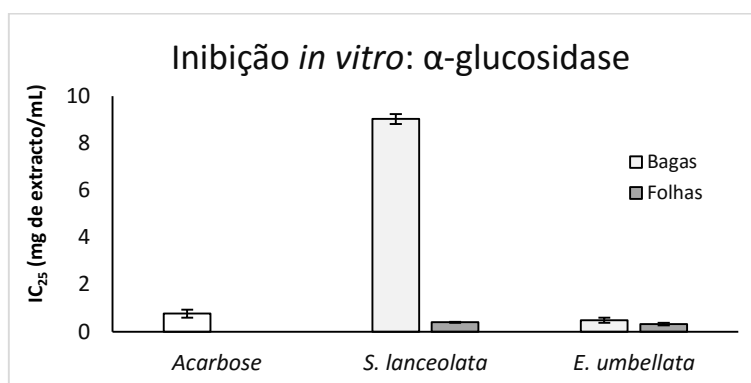


Figura 52 – Ensaio de inibição da α-glucosidase pelos extractos metanólicos das diferentes partes morfológicas das espécies estudadas (*Sambucus lanceolata* e *Elaeagnus umbellata*). A Acarbose foi utilizada como controlo positivo. Valores apresentados em IC₂₅ (miligrama por mililitro de solução).

De acordo com a Figura 52, o valor de IC₂₅ das bagas de sabugueiro (*S. lanceolata*) é o mais elevado; 9,027±0,214 mg de extracto/ mL, pelo que é o extracto com menor capacidade de inibição da enzima α-glucosidase; pelo contrário, todos os outros extractos possuem valores inferiores ao do controlo: 0,768±0,169 mg/mL. As folhas, de ambas as espécies foram a parte morfológica com menor valor de IC₂₅ relativamente às bagas. Verifica-se que estas espécies são mais ricas em glicosídeos de flavonóides e pobres em ácidos hidroxicinâmicos. Conclui-se desta forma que na inibição da enzima α-glucosidase a presença dos derivados destes ácidos é muito mais importante do que a presença dos flavonóides glicosilados.

Estudos anteriores indicam que extractos ricos em polifenóis são capazes de inibir estas duas enzimas (α-amilase e α-glucosidase) envolvidas na digestão do amido: [100,169].

Podsedek et al. (2014) [100], analisaram o efeito inibitório de alguns frutos comumente consumidos, dos quais alguns pertencem aos géneros *Rubus* e *Vaccinium*. Os valores apresentados para a capacidade de inibição enzimática são

superiores aos valores obtidos no presente estudo, mantendo-se a tendência: na inibição da α -glucosidase, as amostras do género *Vaccinium* mostram maior capacidade (menor valor de IC_{50}) de inibição quando comparado com o género *Rubus* (Figura 51).

Estes autores verificaram ainda que, apesar destes frutos apresentarem forte actividade inibitória da α -glucosidase, são fracos inibidores da actividade da α -amilase. O mesmo sucede com os extractos avaliados neste estudo (Figura 49).

Qa'dan *et al.* (2009) [170] isolaram o composto cinchonina da espécie *Eriobotrya japonica* e investigaram o seu mecanismo anti-hiperglicémico em modelos in vivo. Estes autores concluíram que o composto poderá ser o responsável por este efeito, sendo considerado como agente insulinoatrópico, ajudando assim no controlo da diabetes do tipo 2. Na análise do perfil fenólico das folhas da espécie *V. padifolium* verificou-se a presença deste composto, cinchonina I, pelo que poderá contribuir para o seu efeito benéfico, no que toca à inibição das enzimas do metabolismo dos hidratos de carbono.

Tendo em conta os resultados obtidos, as espécies *R. grandifolius* e *V. padifolium* apresentam um potencial poder hipoglicemiante, benéfico para o controlo dos níveis de glucose nos pacientes diabéticos. Estas plantas podem oferecer um complementonatural, a incorporar na dieta, em conjunto com inibidores sintéticos auxiliar na prevenção e controlo da diabetes.

O facto de os extractos não serem tão eficazes na inibição da actividade da α -amilase não é um aspecto negativo. Segundo Kumar *et al* (2011) [171] é apenas recomendada uma inibição parcial da α -amilase, para prevenir a fermentação bacteriana no cólon dos hidratos de carbono não digeridos que resultam em flautulência e diarreia. É devido à elevada inibição da degradação dos açúcares que a acarbose, apesar dos seus benefícios, apresenta efeitos secundários indesejáveis a nível intestinal.

IV. Conclusão e Perspectivas futuras

Este estudo teve como principal objectivo a determinação do perfil fitoquímico de algumas espécies produtoras de bagas, sendo três endémicas do arquipélago da Madeira (*Rubus grandifolius*, *Sambucus lanceolata* e *Vaccinium padifolium*), incidindo sobre duas partes morfológicas destas espécies as bagas e as folhas.

Os extractos analisados são misturas complexas de compostos fenólicos. Tal como esperado, o perfil fenólico apresenta variações inter- mas também intra-espécies, nomeadamente diferenças entre as partes morfológicas estudadas. Assim, este estudo sugere que a composição fenólica dos extratos tem grande importância quer na actividade antioxidante, quer no efeito inibitório das enzimas digestivas. Adicionalmente, a existência de efeitos sinérgicos e antagónicos, entre estes compostos pode influenciar também os resultados obtidos [100].

A determinação do perfil fitoquímico permitiu concluir que, em geral, as folhas são a parte morfológica com maior número de compostos fenólicos, à excepção da espécie *Sambucus lanceolata*. Nas bagas de *S. lanceolata* foram identificados 48 compostos e nas folhas 36 compostos. As bagas apresentam alguns ácidos cafeoilquínicos e flavonóides, como a quercetina, a isoramnetina, os canferóis e ainda alguns sacarídeos. Nas folhas predominam os ácidos hidroxicinâmicos com especial destaque para os ácidos cafeoilquínicos e derivados dos ácidos cafeico e cumárico.

Na espécie de *E. umbellata* foram detectados 71 compostos fenólicos, dos quais 28 foram identificados nas bagas e 42 identificados nas folhas. Esta espécie é pobre em ácidos hidroxicinâmicos, mas rica em flavonóides, tais como as quercetinas, os canferóis e as isoramnetinas. Foram detectados sacarídeos e derivados do ácido elágico e de ácidos orgânicos. Por outro lado, as folhas apresentaram uma matriz mais complexa do que as bagas; ricas em ácidos hidroxicinâmicos, nomeadamente os ácidos cafeoilquínicos e alguns derivados do ácido cafeico. A classe do triterpenóide foi também representativa nas folhas desta espécie.

A espécie de *R. grandifolius* foi colhida em dois locais geograficamente diferentes, no Funchal e em Machico. Apesar desse factor, o perfil fenólico não apresentou grandes variações. Nas bagas, foram detectados 45 compostos fenólicos (33 compostos identificados na amostra do Funchal e 39 identificados na amostra

colhida em Machico): nomeadamente os flavonóides, em particular derivados da quercetina e luteolina e ainda alguns compostos não fenólicos, sacarídeos e ácidos orgânicos.

Na espécie *V. padifolium* foram analisadas as bagas, as folhas maduras e as folhas jovens, que apresentaram um perfil fenólico qualitativo muito semelhante. Assim, os ácidos hidroxicinâmicos (em particular os derivados do ácido cumárico, como o coumaroil iridoide) foram os compostos dominantes nesta espécie. No caso das bagas, verificou-se a presença de flavonóides (quercetina, miricetina, laricitrina e flavonas) e outros compostos de natureza não-fenólica (sacarídeos e ácidos orgânicos). Nas folhas, também foram identificados flavonóides, especialmente derivados da quercetina, para além destes compostos foram identificados isómeros da cinchonina I, detectado apenas nesta espécie.

Por fim, na análise da espécie *V. cylindraceum* foram detectados 86 compostos, dos quais, 38 compostos foram identificados nas bagas e 59 identificados nas folhas. Nas bagas, predominam as classes dos flavonóides (principalmente as quercetinas conjugadas, derivados do ácido elágico e flavonas) e os derivados do ácido cafeoilquínico, bem como os ácidos orgânicos (derivados dos ácidos cítrico, quínico e málico). Nas folhas, a classe predominante foi a dos ácidos hidroxicinâmicos, especialmente os ácidos cafeoilquínicos e derivados do ácido cumárico; para o caso dos flavonóides, verificou-se a grande frequência dos conjugados da quercetina e do canferol.

A análise das bagas e das folhas, pelo modo de ionização positivo, permitiu complementar o perfil fenólico das espécies estudadas com a identificação de antocianinas. Tal como esperado, verificou-se que a espécie *E. umbellata* não apresentava esta classe de compostos.

Nas bagas de *R. grandifolius* foram detectadas no total 10 antocianinas, distribuídas pelas amostras colhidas no Funchal e em Machico. Nesta espécie, apenas foram detectadas conjugados glicosídicos da cianidina.

Nas bagas de *S. lanceolata* apenas foram identificadas duas antocianinas, isómeros da cianidina-*O*-(xilosil)hexósido. Pelos motivos já descritos anteriormente, deveria ser realizada uma nova colheita e uma nova análise com bagas completamente maduras. Possivelmente o perfil de antocianinas obtido seria muito mais completo, como reportado na literatura para o género *Sambucus*.

Nas bagas da espécie *V. padifolium*, não foram identificados derivados da cianidina e da peonidina, contrariamente às da espécie *V. cylindraceum*. Ambas possuem um perfil de antocianinas muito variado, nomeadamente glicósidos de delphinidina, de petunidina, de peonidina e de malvidina.

Este estudo permitiu confirmar a presença de antocianinas derivadas em cianidina nas folhas jovens da espécie *V. padifolium*, nomeadamente a cianidina-*O*-hexósido e a cianidina-*O*-pentósido. Acredita-se que a presença destes compostos se deve ao facto de as folhas ainda não possuírem clorofilas suficientes para protecção contra a radiação solar a que estas folhas são expostas.

A simulação do processo de digestão gastrointestinal *in vitro* teve como objectivo estudar os efeitos do processo de digestão na actividade antioxidante dos extractos. Para tal, determinou-se o conteúdo de fenólicos totais (TPC), o conteúdo de flavonoides totais (TFC) e a capacidade antioxidante (ABTS e DPPH) das amostras antes e depois de sujeitos às simulações de digestão.

Os ensaios do TPC e do TFC permitiram concluir que as folhas possuem maior actividade antioxidante do que as bagas. Estes dados vão de acordo com o perfil fitoquímico estabelecido anteriormente. A mesma tendência foi verificada nos ensaios da determinação da actividade antioxidante pelos métodos do DPPH e do ABTS.

O ensaio do DPPH permitiu-nos concluir que na digestão *in vitro*, o pH e a força iónica desempenham papéis mais importantes do que as próprias enzimas digestivas na degradação dos compostos fenólicos das espécies estudadas. Já o ensaio do ABTS não se revelou tão conclusivo, dada a existência de algumas discrepâncias entre os extractos analisados. Isto pode estar relacionado com as diferentes sensibilidades dos

métodos além do que os compostos podem apresentar diferenças significativas nas suas respostas aos diferentes radicais.

Com todas estas limitações dos modelos *in vitro* e todos os cuidados aquando da interpretação dos resultados derivados a partir destes métodos que simulam algumas condições *in vivo*, a simulação da digestão gastrointestinal mantém-se uma ferramenta útil na investigação dos efeitos essenciais do processo fisiológico pode ter no destino de componentes bioactivos dos alimentos, como os compostos fenólicos [172]. Ainda assim, existem discrepâncias entre os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* e estas diferenças indicam que os métodos *in vitro* têm de ser melhorados e validados *in vivo*, com mais estudos em animais e humanos [172].

De entre as várias estratégias para controlo e tratamento da diabetes do tipo 2, a inibição das enzimas do metabolismo dos hidratos de carbono tem sido uma estratégia eficiente. Para tal, estudou-se o efeito inibitório *in vitro* dos extractos sobre a actividade de enzimas responsáveis pelo metabolismo dos hidratos de carbono, a α -amilase e a α -glucosidase.

O estudo da inibição da actividade da α -amilase, *in vitro*, permitiu verificar que os extractos estudados no presente trabalho são menos eficientes do que a acarbose (controlo positivo). De entre as espécies estudadas, as folhas apresentaram maior poder inibitório do que as bagas, à excepção da espécie *V. padifolium*. De entre as espécies estudadas, o extracto das bagas *R. grandifolius* (Machico), foi o mais eficiente com o menor valor de IC₅₀ (0,219±0,075 mg/mL). Por outro lado, as espécies *S. lanceolata* e *E. umbellata* foram as espécies menor actividade inibitória.

No estudo *in vitro* da inibição da α -glucosidase, verificou-se que, em geral, os extractos estudados foram mais eficientes do que a acarbose (1,712±0,184 mg/mL). A excepção verificou-se no caso das bagas da espécie *S. lanceolata*. Tendo em conta o potencial poder inibitório das espécies *R. grandifolius* e *V. padifolium*, estas poderão constituir uma forma complementar para o controlo da diabetes do tipo 2.

Em relação às simulações *in vitro* da digestão gastrointestinal, verificou-se a necessidade de um novo estudo da digestão que permita compreender qual o pH que

degrada estes compostos bioactivos, se o pH do estômago, se o pH do duodeno. Assim, na adição das diferentes soluções *stock*, no processo de digestão *in vitro*, seria interessante a colheita de *alíquotas* de cada amostra e posterior análise da actividade antioxidante.

De modo a compreender melhor qual o efeito da digestão *in vitro* na composição fitoquímica das amostras, seria importante a análise qualitativa e quantitativa, por HPLC-DAD-ESI/MSⁿ dos ensaios da digestão *in vitro*.

Dos compostos detectados nestas espécies, não foi possível estabelecer qual deteve o papel de maior importância na inibição destas enzimas. São necessários ensaios complementares de modo a confirmar qual das classes de compostos é a mais importante na inibição destas enzimas.

Futuramente pretende-se realizar a quantificação dos compostos fenólicos identificados por HPLC-DAD, de modo a identificar os compostos maioritários e compreender a sua influência nas propriedades bioactivas das espécies estudadas.

V. Referências

1. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed a., Sahena F, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. 2013;117(4):426–36.
2. Vaishnav P, Demain AL. Unexpected applications of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 2011;29(2):223–9.
3. Zhang Y, Butelli E, Martin C. Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 2014;19:81–90.
4. Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 2011;126(4):1821–35.
5. De Souza VR, Pereira PAP, Da Silva TLT, De Oliveira Lima LC, Pio R, Queiroz F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*. 2014;156:362–8.
6. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2005;81(1):230S – 242.
7. Oroian M, Escriche I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*. 2015;74:10–36.
8. Huang W-Y, Cai Y-Z, Zhang Y. Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention. *Nutrition and Cancer*. 2009;62(1):1–20.
9. Martins S, Mussatto SI, Martínez-Avila G, Montañez-Saenz J, Aguilar CN, Teixeira JA. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*. 2011;29(3):365–73.
10. El-Seedi HR, El-Said AMA, Khalifa SAM, Göransson U, Bohlin L, Borg-Karlson A-K, et al. Biosynthesis, Natural Sources, Dietary Intake, Pharmacokinetic Properties, and Biological Activities of Hydroxycinnamic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(44):10877–95.
11. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 2006;99(1):191–203.
12. Sandra Cristina Gonçalves Gouveia. Phytochemical studies of bioactive *Asteraceae* plants endemic from Madeira archipelago. PhD Thesis, University of Madeira, 2011.
13. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Society for Clinical Nutrition*. 2004;79(5):727–47.
14. Zhang Y, Cao J, Chen W, Yang J, Hao D, Zhang Y, et al. Reproducibility and relative validity of a food frequency questionnaire to assess intake of dietary flavonol and flavone in Chinese university campus population. *Nutrition*

- Research. 2015;30(8):520–6.
15. Testai L. Flavonoids and mitochondrial pharmacology: A new paradigm for cardioprotection. *Life Sciences*. 2015;135:68–76.
 16. Naczki M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006;41(5):1523–42.
 17. Paredes-López O, Cervantes-Ceja M, Vigna-Pérez M, Hernández-Pérez T. Berries: Improving Human Health and Healthy Aging, and Promoting Quality Life—A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2010;65(3):299–308.
 18. Seeram NP. Berry Fruits: Compositional Elements, Biochemical Activities, and the Impact of Their Intake on Human Health, Performance, and Disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56(3):627–9.
 19. Oszmiański J, Wojdyło A, Lachowicz S, Gorzelany J, Matłok N. Comparison of bioactive potential of cranberry fruit and fruit-based products versus leaves. *Journal of Functional Foods*. 2016;22:232–42.
 20. Jimenez-Garcia SN, Guevara-Gonzalez RG, Miranda-Lopez R, Feregrino-Perez AA, Torres-Pacheco I, Vazquez-Cruz MA. Functional properties and quality characteristics of bioactive compounds in berries: Biochemistry, biotechnology, and genomics. *Food Research International*. 2013;54(1):1195–207.
 21. Kähkönen MP, Hopia AI, Heinonen M. Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001;49(8):4076–82.
 22. Jardim R, Francisco D. Flores da Ilha da Madeira. 2005.
 23. Lee J, Dossett M, Finn CE. Rubus fruit phenolic research: The good, the bad, and the confusing. *Food Chemistry*. 2012;130(4):785–96.
 24. Rivera D, Obón C. The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Islands, a review. *Journal of Ethnopharmacology*. 1995;46(2):73–93.
 25. Gouveia-Figueira SC, Castilho PC. Phenolic screening by HPLC–DAD–ESI/MSn and antioxidant capacity of leaves, flowers and berries of *Rubus grandifolius* Lowe. *Industrial Crops and Products*. 2015;73:28–40.
 26. Mikulic-Petkovsek M, Ivancic A, Todorovic B, Veberic R, Stampar F. Fruit Phenolic Composition of Different Elderberry Species and Hybrids. *Journal of Food Science*. 2015;80(10):C2180–90.
 27. Sidor A, Gramza-Michałowska A. Advanced research on the antioxidant and health benefit of elderberry (*Sambucus nigra*) in food - a review. *Journal of Functional Foods*. 2014;
 28. Capelo J. *Vaccinium padifolium* & *Vaccinium cylindraceum* (Ericaceae). 2009 [cited 2016 May 18]. Available from: <http://bit.ly/25Bzwct>
 29. Scalzo J, Stevenson D, Hedderley D. Blueberry estimated harvest from seven new cultivars: fruit and anthocyanins. *Food Chemistry*. 2013;139(1-4):44–50.
 30. Michalska A, Łysiak G. Bioactive Compounds of Blueberries: Post-Harvest Factors

- Influencing the Nutritional Value of Products. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(8):18642–63.
31. Cabrita L, Andersen ØM. Anthocyanins in blue berries of *Vaccinium padifolium*. *Phytochemistry*. 1999;52(8):1693–6.
 32. Cabrita L, Andersen M. Anthocyanin trisaccharides in blueberries of *Vaccinium padifolium*. *Food Chemistry*. 2009;69:33–6.
 33. Anónimo. Plants For A Future. *Vaccinium cylindraceum* - Sm. 2012.
 34. Fraga H. *Vaccinium cylindraceum*. Available from: <http://bit.ly/1TQw3B4>
 35. Anónimo. NATURMARIENSE. MIRTILO DOS AÇORES (UVA-DA-SERRA) É UMA ESPÉCIE ENDÉMICA COM BASTANTE POTENCIAL ECONÓMICO. 2013 [cited 2016 Apr 20]. Available from: <http://goo.gl/alnD9F>
 36. Moore MR, Buckley DS, Klingeman WE, Saxton AM. Distribution and growth of autumn olive in a managed forest landscape. *Forest Ecology and Management*. 2013;310:589–99.
 37. Fordham I, Clevidence B, Wiley E. Fruit of Autumn Olive: A Rich Source of Lycopene. *HortScience*. 2001;36(6).
 38. Pei R, Yu M, Bruno R, Bolling BW. Phenolic and tocopherol content of autumn olive (*Elaeagnus umbellata*) berries. *Journal of Functional Foods*. 2015;16:305–14.
 39. Brusotti G, Cesari I, Dentamaro A, Caccialanza G, Massolini G. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: the role of analysis in the ethnopharmacological approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;87:218–28.
 40. Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*. 2007;30(18):3268–95.
 41. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Yoga Latha L. Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants' Extracts. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*. 2011;8(1):1–10.
 42. Zhang H-F, Yang X-H, Wang Y. Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. *Trends in Food Science & Technology*. 2011;22(12):672–88.
 43. Wijngaard H, Hossain MB, Rai DK, Brunton N. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Research International*. 2012;46(2):505–13.
 44. Bleve M, Ciurlia L, Erroi E, Lionetto G, Longo L, Rescio L, et al. An innovative method for the purification of anthocyanins from grape skin extracts by using liquid and sub-critical carbon dioxide. *Separation and Purification Technology*. 2008;64(2):192–7.
 45. Kim HK, Verpoorte R. Sample preparation for plant metabolomics.

- Phytochemical Analysis. 2010;21(1):4–13.
46. Boulekbache-Makhlouf L, Medouni L, Medouni-Adrar S, Arkoub L, Madani K. Effect of solvents extraction on phenolic content and antioxidant activity of the byproduct of eggplant. *Industrial Crops and Products*. 2013;49:668–74.
 47. Razali N, Mat-Junit S, Abdul-Muthalib AF, Subramaniam S, Abdul-Aziz A. Effects of various solvents on the extraction of antioxidant phenolics from the leaves, seeds, veins and skins of *Tamarindus indica* L. *Food Chemistry*. 2012;131(2):441–8.
 48. Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández M de L, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 2009;113(4):859–71.
 49. Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*. 2007;30(18):3268–95.
 50. Stobiecki M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry*. 2000;54(3):237–56.
 51. Määttä KR, Kamal-Eldin A, Törrönen AR. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of phenolic compounds in berries with diode array and electrospray ionization mass spectrometric (MS) detection: ribes species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003;51(23):6736–44.
 52. Asmat U, Abad K, Ismail K. *Diabetes mellitus* and oxidative stress—A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2015;
 53. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;97:55–74.
 54. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2007;18(9):567–79.
 55. Issa AY, Volate SR, Wargovich MJ. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006;19(5):405–19.
 56. Banerjee M, Vats P. Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in Type 2 *diabetes mellitus*. *Redox Biology*. 2013;2C:170–7.
 57. Shahidi F, Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*. 2015;18:757–81.
 58. Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2014;1840(9):2709–29.
 59. Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasaiah U, et al. Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 2014;436:332–47.
 60. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and

- antioxidants: A review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2003;17(1):24–38.
61. Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*. 2011;89(3):217–33.
 62. Plank DW, Szyplka J, Sapirstein H, Woollard D, Zapf CM, Lee V, et al. Determination of antioxidant activity in foods and beverages by reaction with 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH): collaborative study First Action 2012.04. *Journal of AOAC International*. 95(6):1562–9.
 63. Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*. 2008;613(1):1–19.
 64. Huang D, Boxin OU, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53(6):1841–56.
 65. Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods*. 2014;7(9):1776–82.
 66. Marcucci M, Woisky R, Salatino A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. 1998 [cited 2016 Apr 20]. Available from: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/46/artigo.htm>
 67. Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013;21(2):143–52.
 68. Carbonell-Capella JM, Buniowska M, Barba FJ, Esteve MJ, Frígola A. Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2014;13(2):155–71.
 69. Ozdal T, Sela DA, Xiao J, Boyacioglu D, Chen F, Capanoglu E. The Reciprocal Interactions between Polyphenols and Gut Microbiota and Effects on Bioaccessibility. *Nutrients*. 2016;8(2):78.
 70. Dueñas M, Cueva C, Muñoz-González I, Jiménez-Girón A, Sánchez-Patán F, Santos-Buelga C, et al. Studies on Modulation of Gut Microbiota by Wine Polyphenols: From Isolated Cultures to Omic Approaches. *Antioxidants*. 2015;4(1):1–21.
 71. Versantvoort C, Kamp E van de, Rempelberg C. Development and Applicability of an *In Vitro* Digestion Model in Assessing the Bioaccessibility of Contaminants from Food. 2004;
 72. Guerra A, Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Denis S, Blanquet-Diot S, Alric M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*. 2012;30(11):591–600.
 73. Hur SJ, Lim BO, Decker EA, McClements DJ. *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*. 2011;125(1):1–12.

74. Boisen S, Eggum BO. Critical evaluation of *in vitro* methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutrition Research Reviews*. 1991;4(1):141–62.
75. Fatouros DG, Mullertz A. *In vitro* lipid digestion models in design of drug delivery systems for enhancing oral bioavailability. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2007;
76. Martins N, Barros L, Ferreira ICFR. *In vivo* antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. *Trends in Food Science & Technology*. 2016;48:1–12.
77. Walle T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004;36(7):829–37.
78. D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Masella R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010;11(4):1321–42.
79. Olthof MR, Hollman PC, Katan MB. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *The Journal of Nutrition*. 2001;131(1):66–71.
80. Fernandes I, Faria A, Calhau C, de Freitas V, Mateus N. Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of Functional Foods*. 2014;7:54–66.
81. D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Masella R. Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010;11(4):1321–42.
82. Nardini M, Cirillo E, Natella F, Scaccini C. Absorption of Phenolic Acids in Humans after Coffee Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50(20):5735–41.
83. Maughan R. Carbohydrate metabolism. *Surgery (Oxford)*. 2013;31(6):273–7.
84. Hanhineva K, Törrönen R, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykkänen H, et al. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010;11(4):1365–402.
85. Surya S, Salam AD, Tomy DV, Carla B, Kumar RA, Sunil C. *Diabetes mellitus* and medicinal plants-a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2014;4(5):337–47.
86. Domingueti CP, Dusse LMS, Carvalho M das G, de Sousa LP, Gomes KB, Fernandes AP. *Diabetes mellitus*: The linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. *Journal of Diabetes and its Complications*. 2015;30(4):738–45.
87. Bahmani M, Golshahi H, Saki K, Rafieian-Kopaei M, Delfan B, Mohammadi T. Medicinal plants and secondary metabolites for *diabetes mellitus* control. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2014;4:S687–92.
88. Akash MSH, Rehman K, Chen S. Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 *diabetes mellitus*. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2013;114(3):525–31.

89. Yin Z, Zhang W, Feng F, Zhang Y, Kang W. α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Science and Human Wellness*. 2014;3(3-4):136–74.
90. Spínola V, Llorent-Martínez EJ, Gouveia S, Castilho PC. *Myrica faya*: a new source of antioxidant phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014;62(40):9722–35.
91. Hur SJ, Decker EA, McClements DJ. Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during *in vitro* digestion. *Food Chemistry*. 2009;114(1):253–62.
92. Flores FP, Singh RK, Kerr WL, Phillips DR, Kong F. *In vitro* release properties of encapsulated blueberry (*Vaccinium ashei*) extracts. *Food Chemistry*. 2015;168:225–32.
93. Zheng W, Wang SY. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001;49(11):5165–70.
94. Gouveia S, Castilho PC. Antioxidant potential of *Artemisia argentea* L'Hér alcoholic extract and its relation with the phenolic composition. *Food Research International*. 2011;44:1620–31.
95. Akkol EK, Göger F, Kosar M, Baser KHC. Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey. *Food Chemistry*. 2008;108(3):942–9.
96. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;26(9-10):1231–7.
97. Gordon MH, Paiva-Martins F, Almeida M. Antioxidant Activity of Hydroxytyrosol Acetate Compared with That of Other Olive Oil Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001;49(5):2480–5.
98. Xiao Z, Storms R, Tsang A. “A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities” [Anal. Biochem. 351 (2006) 146-148] (DOI:10.1016/j.ab.2006.01.036). *Analytical Biochemistry*. 2007;362(1):154.
99. Xiao Z, Storms R, Tsang A. Corrigendum to ““ A quantitative starch – iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities.”” *Analytical Biochemistry*. 2006;362:146–8.
100. Podsędek A, Majewska I, Redzyna M, Sosnowska D, Koziółkiewicz M. *In Vitro* Inhibitory Effect on Digestive Enzymes and Antioxidant Potential of Commonly Consumed Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014;62(20):4610–7.
101. de Souza VR, Pereira PAP, da Silva TLT, de Oliveira Lima LC, Pio R, Queiroz F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*. 2014;156:362–8.
102. Khatkhat KF. Free radical scavenging activity, phytochemical composition and nutrient analysis of *Elaeagnus umbellata* berry. *Journal of Medicinal Plants*

Research. 2012. p. 5196–203.

103. Vagiri M, Conner S, Stewart D, Andersson SC, Verrall S, Johansson E, *et al.* Phenolic compounds in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves relative to leaf position and harvest date. *Food Chemistry*. 2015;172:135–42.
104. Spínola V, Pinto J, Castilho PC. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD–ESI-MSn and screening for their antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2015;173:14–30.
105. Engels C, Schieber A, Ganzle MG. Sinapic acid derivatives in defatted Oriental mustard (*Brassica juncea* L.) seed meal extracts using UHPLC-DAD-ESI-MSn and identification of compounds with antibacterial activity; ; *European Food Research and Technology*; *European Food Research and Technology*. 2012;234(3):535.
106. Gayosso-García Sancho LE, Yahia EM, González-Aguilar GA. Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (*Carica papaya* L., cv. Maradol) fruit determined by HPLC-DAD-MS/MS-ESI. *Food Research International*. 2011;44(5):1284–91.
107. Kajdžanoska M, Gjamovski V, Stefova M. HPLC-DAD-ESI-MSn identification of phenolic compounds in cultivated strawberries from Macedonia. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 2010 [cited 2015 Oct 21]. p. 181–94.
108. Engels C, Gräter D, Esquivel P, Jiménez VM, Gänzle MG, Schieber A. Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Food Research International*. 2012;46(2):557–62.
109. Sun J, Liu X, Yang T, Slovin J, Chen P. Profiling polyphenols of two diploid strawberry (*Fragaria vesca*) inbred lines using UHPLC-HRMS(n). *Food Chemistry*. 2014;146:289–98.
110. Milbury PE, Chen C-Y, Dolnikowski GG, Blumberg JB. Determination of Flavonoids and Phenolics and Their Distribution in Almonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(14):5027–33.
111. Justesen U. Negative atmospheric pressure chemical ionisation low-energy collision activation mass spectrometry for the characterisation of flavonoids in extracts of fresh herbs. *Journal of Chromatography A*. 2000;902(2):369–79.
112. Kühn S, Wollseifen HR, Galensa R, Schulze-Kaysers N, Kunz B. Adsorption of flavonols from onion (*Allium cepa* L.) processing residues on a macroporous acrylic resin. *Food Research International*. 2014;65:103–8.
113. Cuyckens F, Claeys M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry : JMS*. 2004;39(1):1–15.
114. Mena P, Calani L, Dall’Asta C, Galaverna G, García-Viguera C, Bruni R, *et al.* Rapid and Comprehensive Evaluation of (Poly)phenolic Compounds in Pomegranate (*Punica granatum* L.) Juice by UHPLC-MSn. *Molecules*. 2012;17(12):14821–40.

115. Fischer UA, Carle R, Kammerer DR. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS(n). *Food Chemistry*. 2011;127(2):807–21.
116. Verardo G, Duse I, Callea A. Analysis of underivatized oligosaccharides by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry with post-column addition of formic acid. *Rapid Communications in Mass Spectrometry : RCM*. 2009;23(11):1607–18.
117. Flores P, Hellín P, Fenoll J. Determination of organic acids in fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2012;132(2):1049–54.
118. Chen Q, Zhang Y, Zhang W, Chen Z. Identification and quantification of oleanolic acid and ursolic acid in Chinese herbs by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *Biomedical Chromatography : BMC*. 2011;25(12):1381–8.
119. Liu A-H, Guo H, Ye M, Lin Y-H, Sun J-H, Xu M, *et al.* Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*. 2007;1161(1-2):170–82.
120. Clifford MN, Knight S, Kuhnert N. Discriminating between the Six Isomers of Dicafeoylquinic Acid by LC-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53(10):3821–32.
121. Lin L-Z, Harnly JM. Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Food Chemistry*. 2010;120(1):319–26.
122. Ieri F, Martini S, Innocenti M, Mulinacci N. Phenolic Distribution in Liquid Preparations of *Vaccinium myrtillus* L. and *Vaccinium vitis idaea* L. *Phytochemical Analysis*. 2013;24(5):467–75.
123. Carazzone C, Mascherpa D, Gazzani G, Papetti A. Identification of phenolic constituents in red chicory salads (*Cichorium intybus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2013;138(2-3):1062–71.
124. Mullen W, Yokota T, Lean MEJ, Crozier A. Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC–MSn. *Phytochemistry*. 2003;64(2):617–24.
125. Yang M, Wang X, Guan S, Xia J, Sun J, Guo H, *et al.* Analysis of triterpenoids in ganoderma lucidum using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2007;18(5):927–39.
126. Llorent-Martínez EJ, Spínola V, Gouveia S, Castilho PC. HPLC-ESI-MSn characterization of phenolic compounds, terpenoid saponins, and other minor compounds in *Bituminaria bituminosa*. *Industrial Crops and Products*. 2015;69:80–90.

127. Ibrahim RM, El-Halawany AM, Saleh DO, Naggat EMB El, El-Shabrawy AE-RO, El-Hawary SS. HPLC-DAD-MS/MS profiling of phenolics from *Securigera securidaca* flowers and its anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2015;25(2):134–41.
128. Soong YY, Barlow PJ. Isolation and structure elucidation of phenolic compounds from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2005;1085(2):270–7.
129. Bresciani L, Calani L, Cossu M, Mena P, Sayegh M, Ray S, et al. (Poly)phenolic characterization of three food supplements containing 36 different fruits, vegetables and berries. *PharmaNutrition*. 2015;3(2):11–9.
130. Han J, Ye M, Qiao X, Xu M, Wang B-R, Guo D-A. Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug *Artemisia annua* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008;47(3):516–25.
131. Araújo M, Pimentel F, Alves RC, Oliveira MBPP. Phenolic compounds from olive mill wastes: health effects, analytical approach and application as food antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*. 2015;45(2):200–11.
132. Boath AS, Stewart D, McDougall GJ. Berry components inhibit α -glucosidase *in vitro*: synergies between acarbose and polyphenols from black currant and rowanberry. *Food Chemistry*. 2012;135(3):929–36.
133. Sánchez-Rabaneda F, Jáuregui O, Lamuela-Raventós RM, Bastida J, Viladomat F, Codina C. Identification of phenolic compounds in artichoke waste by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2003;1008(1):57–72.
134. Gouveia S, Castilho PC. Characterisation of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of *Helichrysum obconicum* by a RP-HPLC–DAD–(–)–ESI–MSn method. *Food Chemistry*. 2011;129(2):333–44.
135. Eklund PC, Backman MJ, Kronberg LA, Smeds AI, Sjöholm RE. Identification of lignans by liquid chromatography-electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry : JMS*. 2008;43(1):97–107.
136. Shen Y, Terazawa M. Dihydroroseoside, a new cyclohexanone glucoside, from the leaves of shirakamba (*Betula platyphylla* Sukatchev var. japonica Hara). *Journal of Wood Science*. 2001;47(2):145–8.
137. Püssa T, Raudsepp P, Toomik P, Pällin R, Mäeorg U, Kuusik S, et al. A study of oxidation products of free polyunsaturated fatty acids in mechanically deboned meat. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2009;22(4):307–14.
138. Li C, Feng J, Huang W-Y, An X-T. Composition of Polyphenols and Antioxidant Activity of Rabbiteye Blueberry (*Vaccinium ashei*) in Nanjing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013;61(3):523–31.
139. Vrhovsek U, Masuero D, Palmieri L, Mattivi F. Identification and quantification of flavonol glycosides in cultivated blueberry cultivars. *Journal of Food*

- Composition and Analysis. 2012;25(1):9–16.
140. Jaakola L, Määttä-Riihinen K, Kärenlampi S, Hohtola A. Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L) leaves. *Planta*. 2004;218(5):721–8.
 141. Mikulic-Petkovsek M, Slatnar A, Stampar F, Veberic R. HPLC-MSn identification and quantification of flavonol glycosides in 28 wild and cultivated berry species. *Food Chemistry*. 2012;135(4):2138–46.
 142. Simirgiotis MJ, Bórquez J, Schmeda-Hirschmann G. Antioxidant capacity, polyphenolic content and tandem HPLC-DAD-ESI/MS profiling of phenolic compounds from the South American berries *Luma apiculata* and *L. chequén*. *Food Chemistry*. 2013;139(1-4):289–99.
 143. Cantos E, Espín JC, López-Bote C, de la Hoz L, Ordóñez JA, Tomás-Barberán FA. Phenolic Compounds and Fatty Acids from Acorns (*Quercus* spp.), the Main Dietary Constituent of Free-Ranged Iberian Pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003;51(21):6248–55.
 144. Hokkanen J, Mattila S, Jaakola L, Pirttilä AM, Tolonen A. Identification of Phenolic Compounds from Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.), Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and Hybrid Bilberry (*Vaccinium x intermedium* Ruthe L.) Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(20):9437–47.
 145. Bravo L, Goya L, Lecumberri E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. *Food Research International*. 2007;40(3):393–405.
 146. Zanutto FV, Boldrin PK, Varanda EA, Fernandes de Souza S, Sano PT, Vilegas W, *et al.* Characterization of flavonoids and naphthopyranones in methanol extracts of *Paepalanthus chiquitensis* Herzog by HPLC-ESI-IT-MSn and their mutagenic activity. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2012;18(1):244–62.
 147. Seo ON, Kim G-S, Kim Y-H, Park S, Jeong SW, Lee SJ, *et al.* Determination of polyphenol components of Korean *Scutellaria baicalensis* Georgi using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Contribution to overall antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*. 2013;5(4):1741–50.
 148. Zhang L, Zhou J, Liu H, Khan MA, Huang K, Gu Z. Compositions of anthocyanins in blackberry juice and their thermal degradation in relation to antioxidant activity. *European Food Research and Technology*. 2012;235(4):637–45.
 149. Chen L, Xin X, Yuan Q, Su D, Liu W. Phytochemical properties and antioxidant capacities of various colored berries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014;94(2):180–8.
 150. Veberic R, Jakopic J, Stampar F, Schmitzer V. European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chemistry*. 2009;114(2):511–5.
 151. Olejnik A, Olkowicz M, Kowalska K, Rychlik J, Dembczyński R, Myszka K, *et al.* Gastrointestinal digested *Sambucus nigra* L. fruit extract protects *in vitro*

- cultured human colon cells against oxidative stress. *Food Chemistry*. 2016;197(Pt A):648–57.
152. M. Monica Giusti †, Luis E. Rodríguez-Saona †, Donald Griffin ‡ and, Ronald E. Wrolstad* †. *Electrospray and Tandem Mass Spectroscopy As Tools for Anthocyanin Characterization*. 1999;
 153. Su S, Wang L-J, Feng C-Y, Liu Y, Li C-H, Du H, *et al.* Fingerprints of anthocyanins and flavonols of *Vaccinium uliginosum* berries from different geographical origins in the Greater Khingan Mountains and their antioxidant capacities. *Food Control*. 2016;64:218–25.
 154. Müller D, Schantz M, Richling E. High performance liquid chromatography analysis of anthocyanins in bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.), blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.), and corresponding juices. *Journal of Food Science*. 2012;77(4):C340–5.
 155. Routray W, Orsat V. Variation of phenolic profile and antioxidant activity of North American highbush blueberry leaves with variation of time of harvest and cultivar. *Industrial Crops and Products*. 2014;62:147–55.
 156. Jaakola L, Määttä K, Pirttilä AM, Törrönen R, Kärenlampi S, Hohtola A. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiology*. 2002;130(2):729–39.
 157. Agati G, Brunetti C, Di Ferdinando M, Ferrini F, Pollastri S, Tattini M. Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française de Physiologie Végétale*. 2013;72:35–45.
 158. Everette JD, Bryant QM, Green AM, Abbey YA, Wangila GW, Walker RB. Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin–Ciocalteu Reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(14):8139–44.
 159. Chiang C, Kadouh H, Zhou K. Phenolic compounds and antioxidant properties of gooseberry as affected by *in vitro* digestion. *LWT - Food Science and Technology*. 2013;51:417–22.
 160. Chen G, Chen S, Zhao Y, Luo C, Li J, Gao Y. Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after *in vitro* digestion. *Industrial Crops & Products*. 2014;57:150–7.
 161. Jorgensen EM, Marin AB, Kennedy JA. Analysis of the Oxidative Degradation of Proanthocyanidins under Basic Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(8):2292–6.
 162. Talcott ST, Howard LR. Phenolic Autoxidation Is Responsible for Color Degradation in Processed Carrot Puree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999;47(5):2109–15.
 163. Lapornik B, Prosek M, Golc WA. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food*

- Engineering. 2005;71:214–22.
164. Teleszko M, Wojdyło A. Comparison of phenolic compounds and antioxidant potential between selected edible fruits and their leaves. *Journal of Functional Foods*. 2015;14:736–46.
 165. Celep E, Charehsaz M, Akyüz S, Acar ET, Yesilada E. Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the bioavailability of phenolic components and the antioxidant potentials of some Turkish fruit wines. *Food Research International*. 2015;78:209–15.
 166. Lordan S, Smyth TJ, Soler-Vila A, Stanton C, Paul Ross R. The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food Chemistry*. 2013;141:2170–6.
 167. Grussu D, Stewart D, McDougall GJ. Berry Polyphenols Inhibit α -Amylase in Vitro: Identifying Active Components in Rowanberry and Raspberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(6):2324–31.
 168. Akkarachiyasit S, Charoenlertkul P, Yibchok-Anun S, Adisakwattana S. Inhibitory activities of cyanidin and its glycosides and synergistic effect with acarbose against intestinal α -glucosidase and pancreatic α -amylase. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010;11(9):3387–96.
 169. McDougall GJ, Shpiro F, Dobson P, Smith P, Blake A, Stewart D. Different Polyphenolic Components of Soft Fruits Inhibit α -Amylase and α -Glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53(7):2760–6.
 170. Qa'dan F, Verspohl EJ, Nahrstedt A, Petereit F, Matalka KZ. Cinchonain Ib isolated from *Eriobotrya japonica* induces insulin secretion *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009;124(2):224–7.
 171. Kumar S, Narwal S, Kumar V, Prakash O. α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy Reviews*. 2011;5(9):19–29.
 172. Bermudezsoto M, Tomasbarberan F, Garciaconesa M. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*. 2007;102(3):865–74.

VI. Anexos

1. Reagentes e compostos de referência

Tabela 1.1 – Reagentes e compostos de referência.

Nome	Fornecedor (pureza)
ABTS	SIGMA-ALDRICH (≥ 98%)
Acarbose (Comprimidos)	GENERIS (100 mg)
Acetonitrilo	LABSCAN (n.a.*)
Ácido fórmico	SIGMA-ALDRICH (n.a.*)
Ácido gálico	PANREAC (99%)
Amido	MERCK (n.a.*)
Carbonato de sódio	SIGMA-ALDRICH (≥ 99,8%)
Cloreto de amónia	RIEDEL-DE HÄEN (For analyse)
Cloreto de cálcio di-hidratado	MERCK (n.a.*)
Cloreto de sódio	SIGMA-ALDRICH (≥ %)
Cloreto de potássio	PANREAC (For analyse)
DPPH	FLUKA CHEMIKA (≥ 98%)
Hidrogenocarbonato de potásio	EMSURE (VWR), for analysis
Hidrogenofosfato de potásio	RIEDEL-DE HAËN (n.a.*)
Lipase	SIGMA-ALDRICH (tipo II, 100-500 units/mg proteína)
Metanol	FISHER SCIENTIFIC (99,99%)
Mucina	SIGMA-ALDRICH (tipo II)
Pancreatina	SIGMA-ALDRICH (n.a.*)
Pepsina	SIGMA-ALDRICH (≥ 250 units/mg sólido)
<i>p</i> -nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo	SIGMA-ALDRICH (≥ 99%)
Reagente de Folin-Ciocalteu	PANREAC (n.a.*)
Rutina	FLUKA CHEMIKA (≥ 98%)
Sacarose	HIMEDIA (99,5%)
Sais biliares	SIGMA-ALDRICH (n.a.*)
Trolox	FLUKA CHEMIKA (≥ 98%)
Ureia	HARNSTOFF (> 99%)
α -amilase (pâncreas de porco)	SIGMA-ALDRICH (tipo VI-B ≥10 units/mg sólido)
α -glucosidase (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	SIGMA-ALDRICH (≥125 units/mg proteína)

*n.a. indica não se aplica

2. Equipamentos

Tabela 2.1 - Equipamentos.

Equipamentos	Fornecedor
Aparelho cromatográfico	DIONEX ULTIMATE 3000 series California, EUA
Balança analítica	METTLER TOLEDO AB204
Banho Ultrassons	BRANDSON 2510, Alemanha
Centrifugadora	SIGMA 3K30
Espectrómetro de massa	ION TRAP BRUCKER ESQUIRE, Alemanha
Espectrofotómetro UV-Vis	PERKIN ELMER UV-Vis
Evaporador rotativo	BUCHI Waterbath B-480
Leitor de microplacas	VICTOR ³ PERKIN-ELMER, Alemanha
Liofilizador	CHRIST Alpha 1-2 LD Plus
Liquidificadora	KENWOOD EXCEL
Medidor de pH	HANNA HI 83141
Placa de agitação e aquecimento	HEIDOLPH MR Hei-Standard
Refractómetro	ATAGO RX-1000
Filtros 0,45 µm	CHROMAFIL Xtra PTFE – 45/25

3. Rectas de calibração

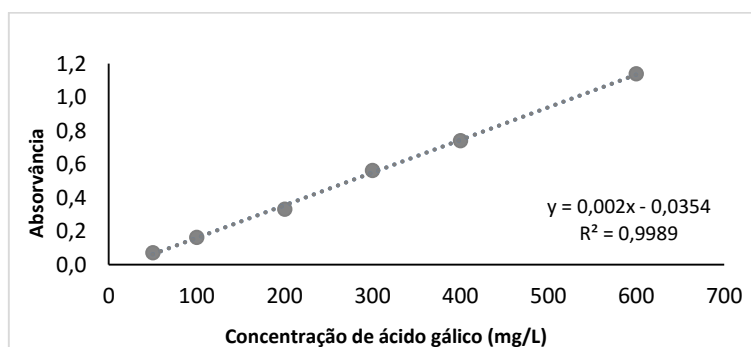


Figura 3.1 – Recta de calibração para a determinação do conteúdo total de fenólicos pelo método Folin-Ciocalteu.

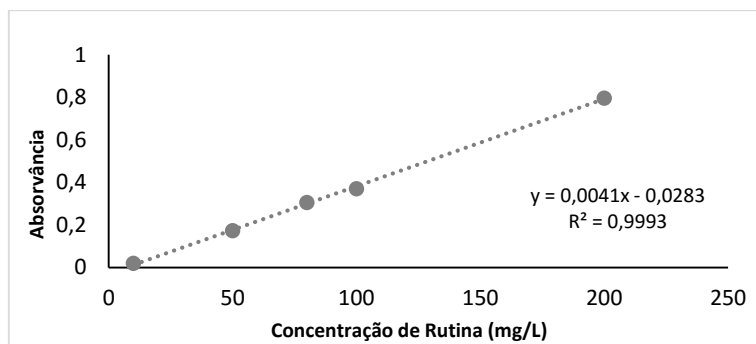


Figura 3.2 - Recta de calibração para determinação do conteúdo total de flavonóides pelo método colorimétrico de cloreto de alumínio.

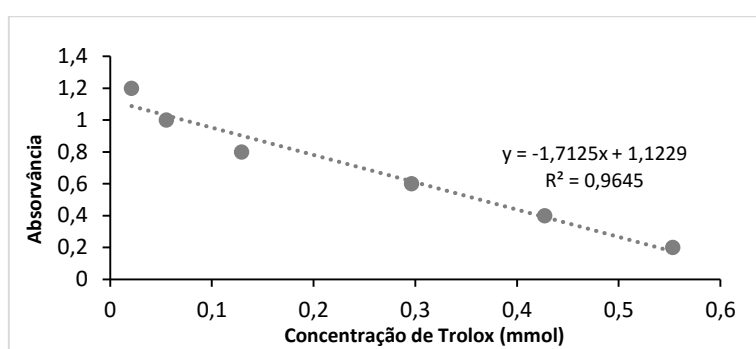


Figura 3.3 - Recta de calibração para a determinação da capacidade antioxidante pelo método do DPPH.

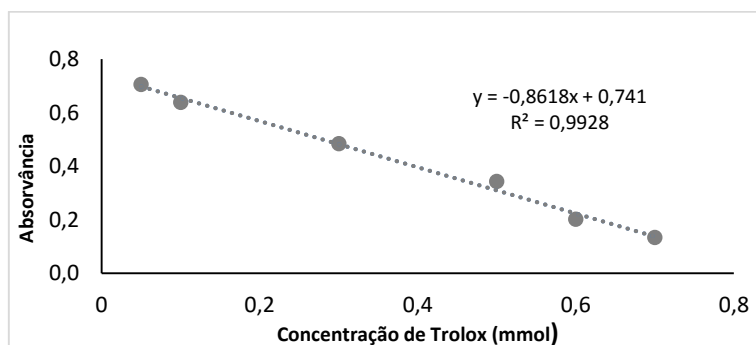


Figura 3.4 - Recta de calibração para a determinação da capacidade antioxidante pelo método do ABTS.

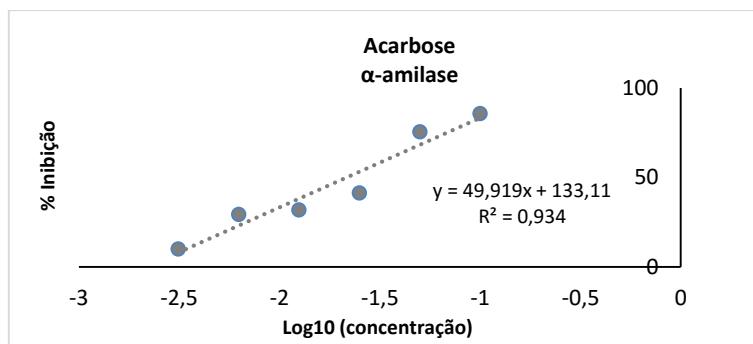


Figura 3.5 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC₅₀ da acarbose, nos ensaios de inibição *in vitro* da α-amilase.

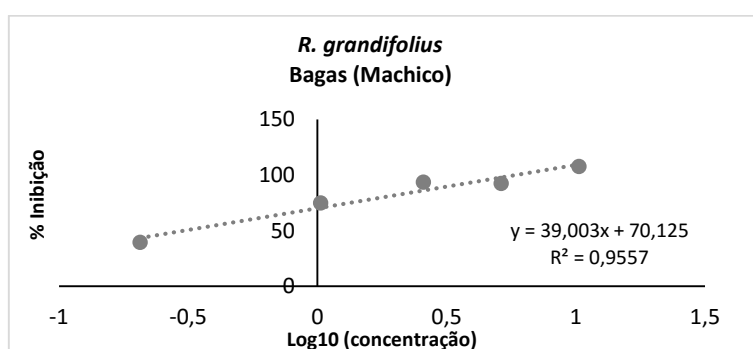


Figura 3.6 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC₅₀ das bagas de *Rubus grandifolius* (colhidas em Machico), nos ensaios de inibição *in vitro* da α-amilase.

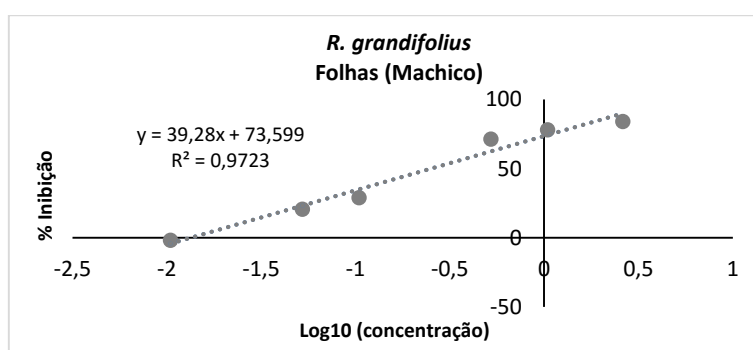


Figura 3.7 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC₅₀ das folhas de *Rubus grandifolius* (colhidas em Machico), nos ensaios de inibição *in vitro* da α-amilase.

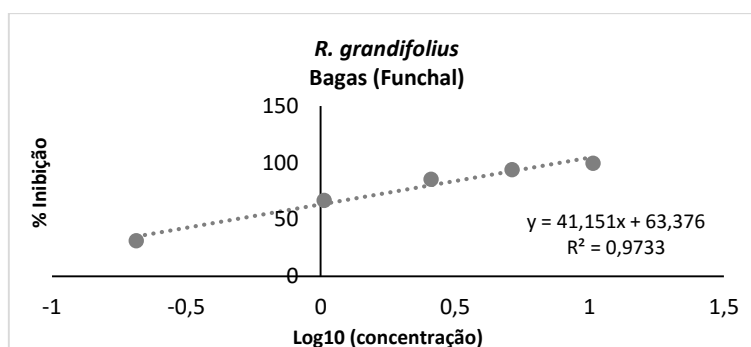


Figura 3.8 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC_{50} das bagas de *Rubus grandifolius* (colhidas no Funchal), nos ensaios de inibição *in vitro* da α -amilase.

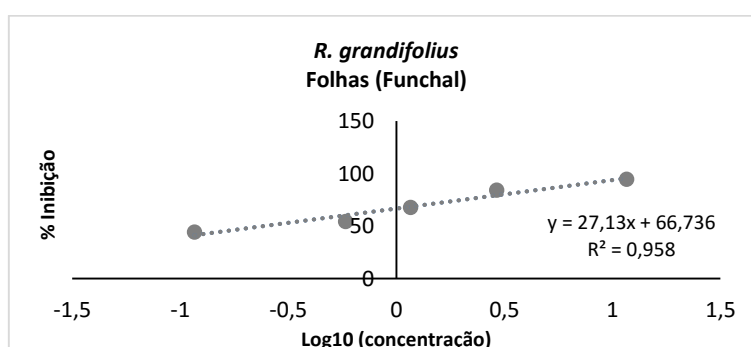


Figura 3.9 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC_{50} das folhas de *Rubus grandifolius* (colhidas no Funchal), nos ensaios de inibição *in vitro* da α -amilase.

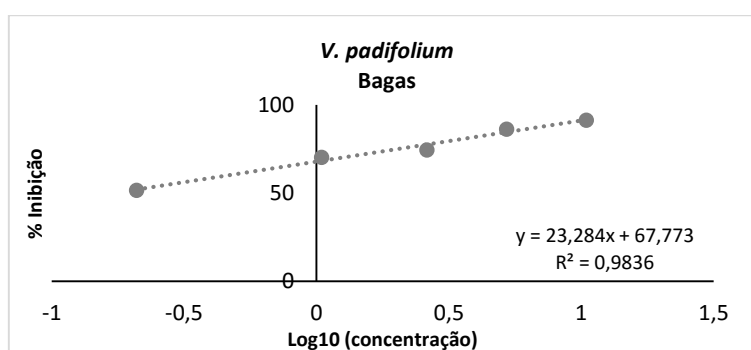


Figura 3.10 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC_{50} das bagas de *Vaccinium padifolium*, nos ensaios de inibição *in vitro* da α -amilase.

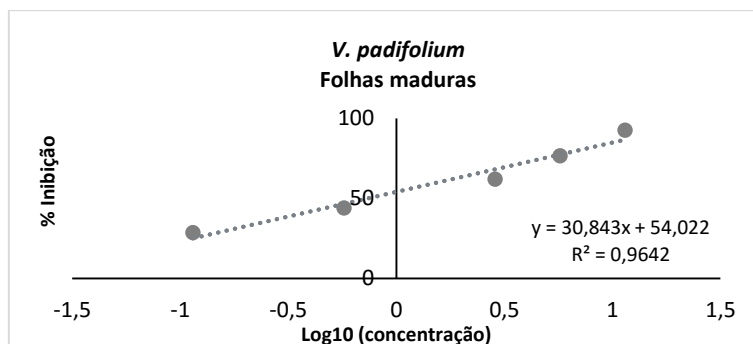


Figura 3.11 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC₅₀ das folhas maduras de *Vaccinium padifolium*, nos ensaios de inibição *in vitro* da α -amilase.

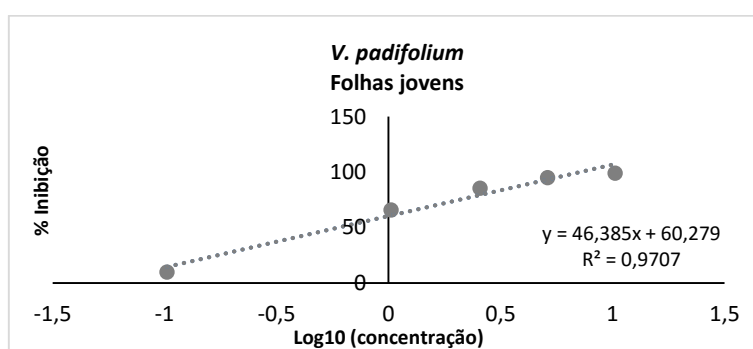


Figura 3.12 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC₅₀ das folhas jovens de *Vaccinium padifolium*, nos ensaios de inibição *in vitro* da α -amilase.

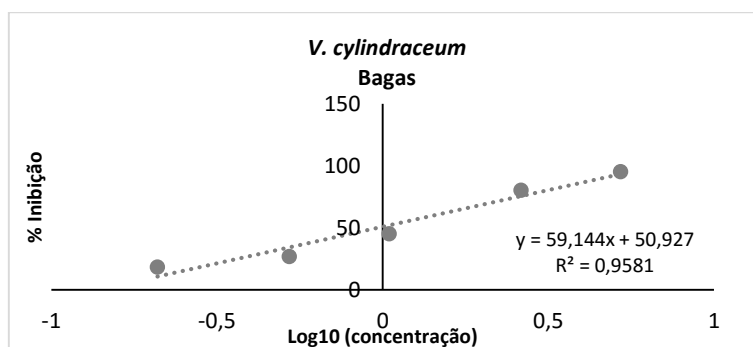


Figura 3.13 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC₅₀ das bagas de *Vaccinium cylindraceum*, nos ensaios de inibição *in vitro* da α -amilase.

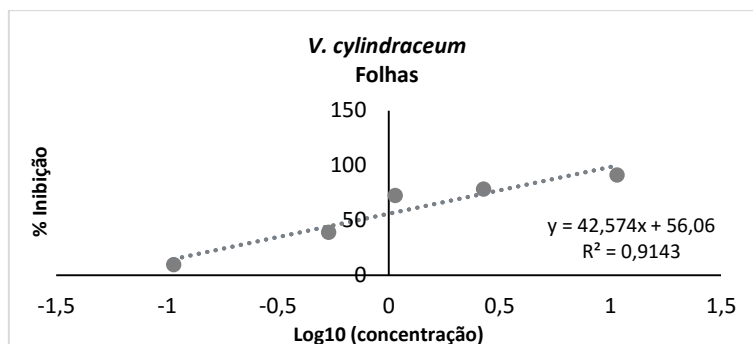


Figura 3.14 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC_{50} das folhas de *Vaccinium cylindraceum*, nos ensaios de inibição *in vitro* da α -amilase.

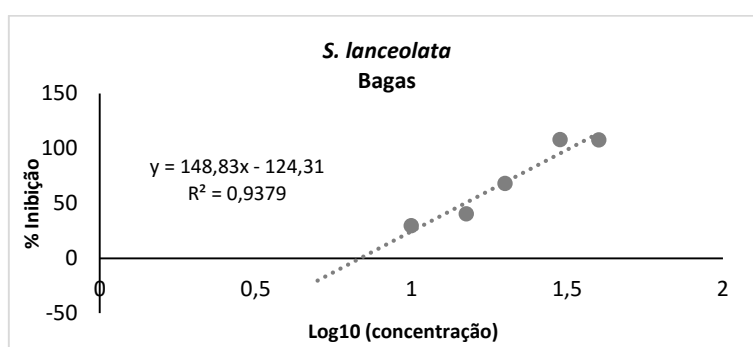


Figura 3.15 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC_{25} das bagas de *Sambucus lanceolata*, nos ensaios de inibição *in vitro* da α -amilase.

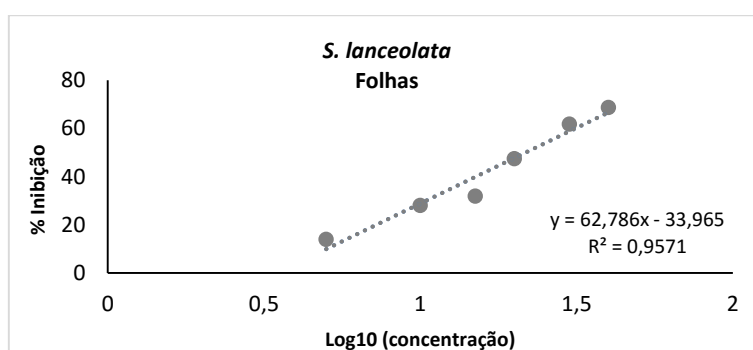


Figura 3.15 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC_{25} das folhas de *Sambucus lanceolata*, nos ensaios de inibição *in vitro* da α -amilase.

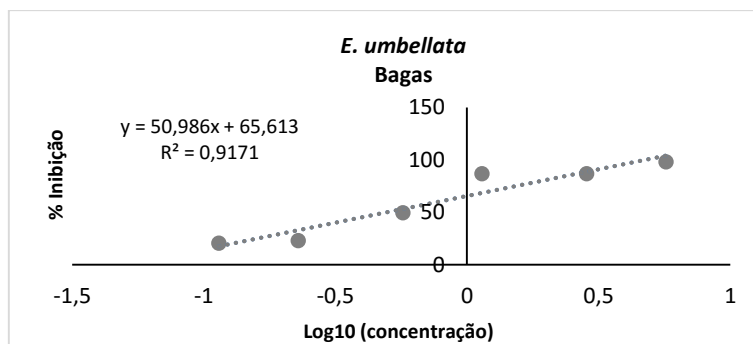


Figura 3.16 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC₂₅ das bagas de *Elaeagnus umbellata*, nos ensaios de inibição *in vitro* da α -amilase.

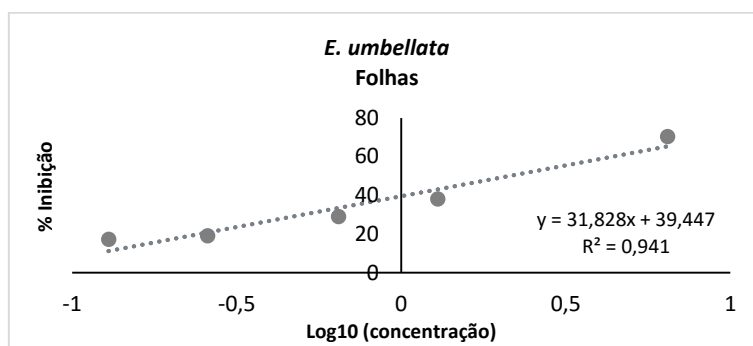


Figura 3.17 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC₂₅ das bagas de *Elaeagnus umbellata*, nos ensaios de inibição *in vitro* da α -amilase.

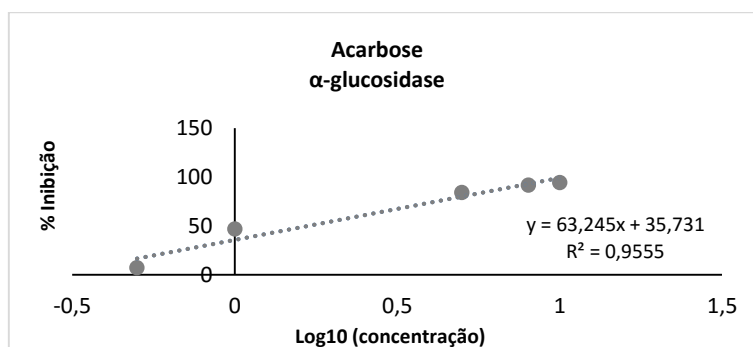


Figura 3.18 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC₅₀ da acarbose, nos ensaios de inibição *in vitro* da α -glucosidase.

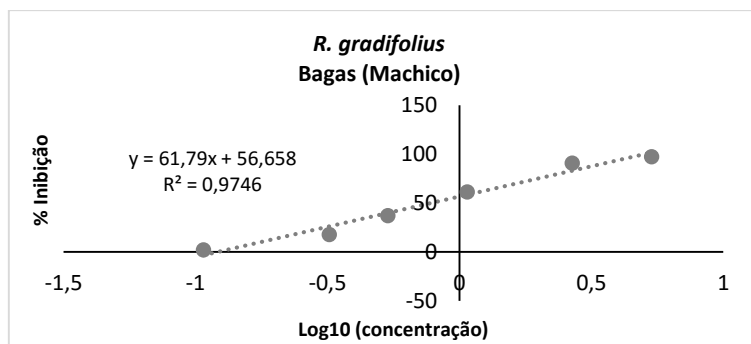


Figura 3.19 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC_{50} das bagas de *Rubus grandifolius* (colhidas em Machico), nos ensaios de inibição *in vitro* da α -glucosidase.

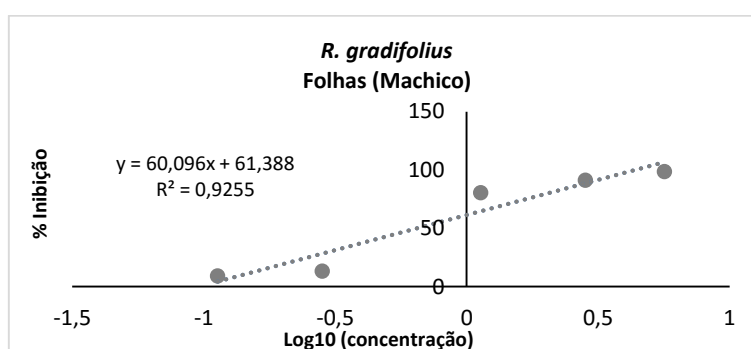


Figura 3.20 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC_{50} das folhas de *Rubus grandifolius* (colhidas em Machico), nos ensaios de inibição *in vitro* da α -glucosidase.

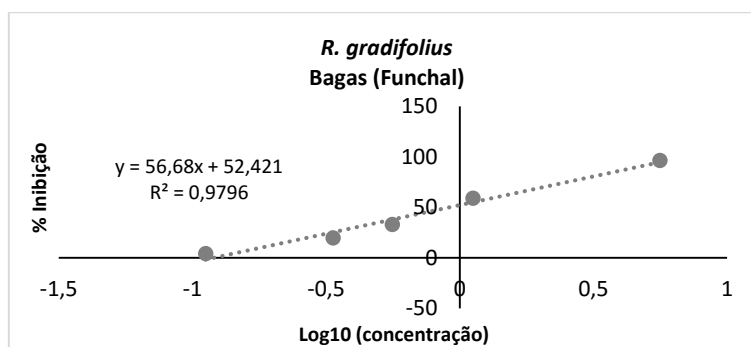


Figura 3.21 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC_{50} das bagas de *Rubus grandifolius* (colhidas no Funchal), nos ensaios de inibição *in vitro* da α -glucosidase.

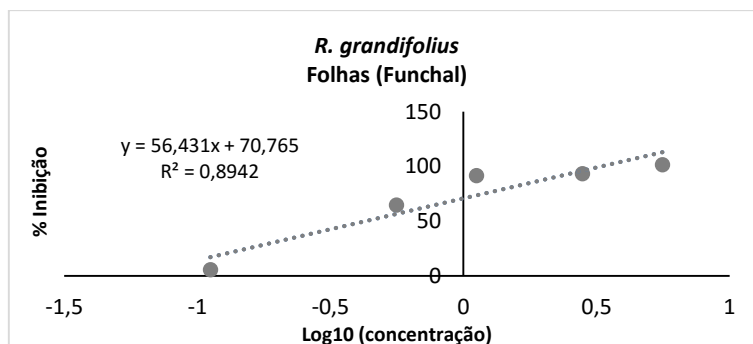


Figura 3.22 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC₅₀ das folhas de *Rubus grandifolius* (colhidas no Funchal), nos ensaios de inibição *in vitro* da α -glucosidase.

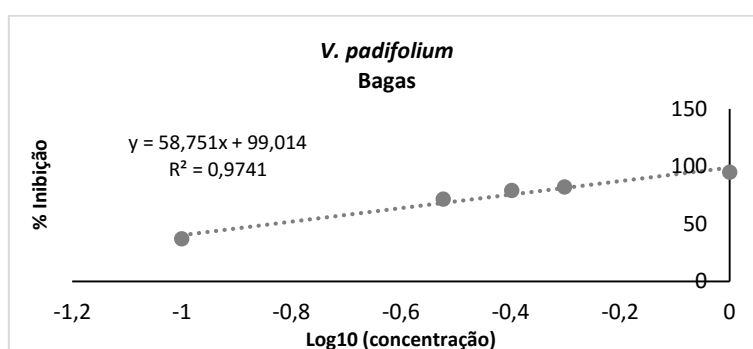


Figura 3.23 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC₅₀ das bagas de *Vaccinium padifolium*, nos ensaios de inibição *in vitro* da α -glucosidase.

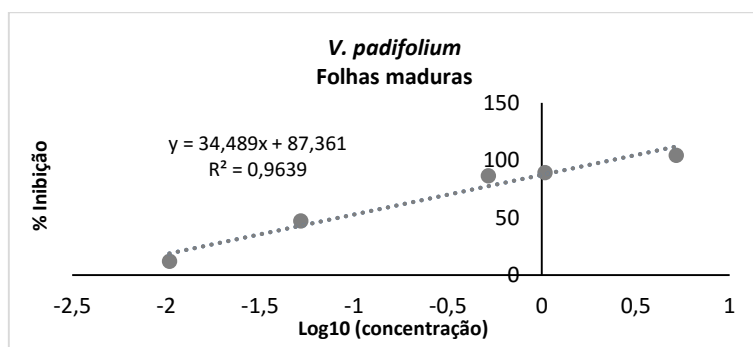


Figura 3.24 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC₅₀ das folhas maduras de *Vaccinium padifolium*, nos ensaios de inibição *in vitro* da α -glucosidase.

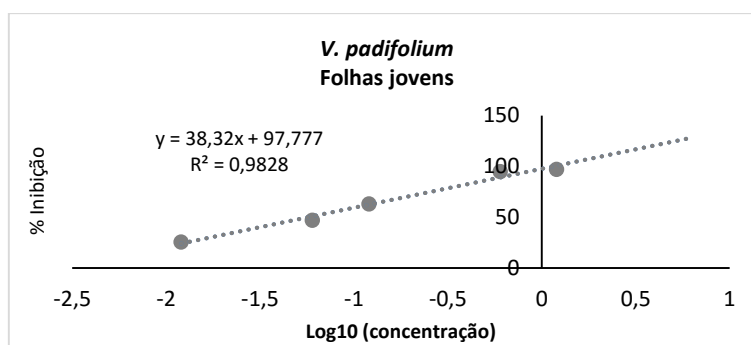


Figura 3.25 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC_{50} das folhas jovens de *Vaccinium padifolium*, nos ensaios de inibição *in vitro* da α -glucosidase.

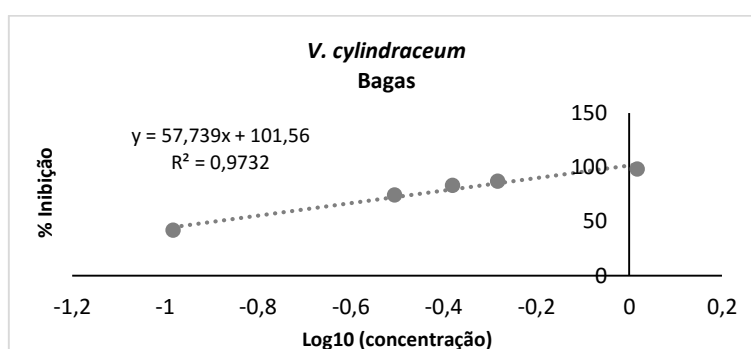


Figura 3.26 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC_{50} das bagas de *Vaccinium cylindraceum*, nos ensaios de inibição *in vitro* da α -glucosidase.

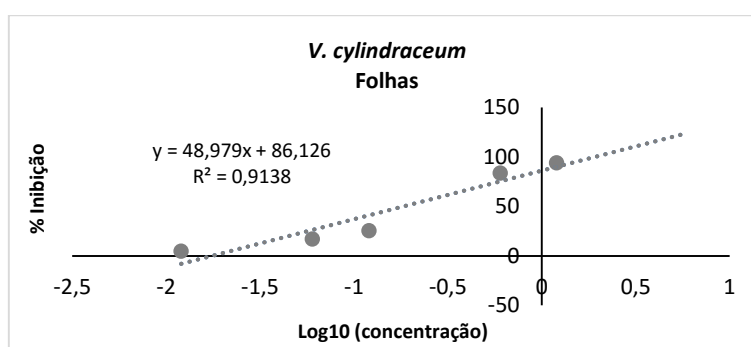


Figura 3.27 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC_{50} das folhas de *Vaccinium cylindraceum*, nos ensaios de inibição *in vitro* da α -glucosidase.

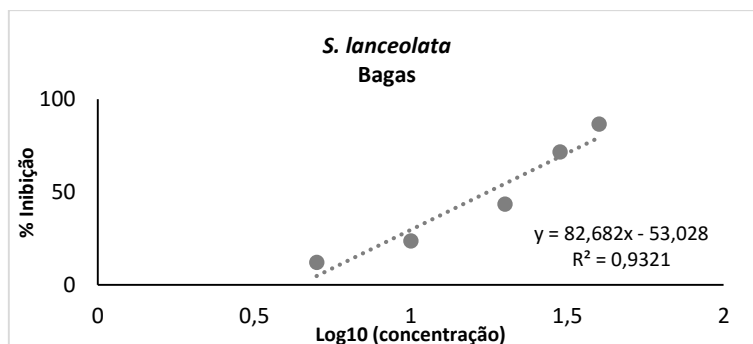


Figura 3.28 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC₂₅ das bagas de *Sambucus lanceolata*, nos ensaios de inibição *in vitro* da α -glucosidase.

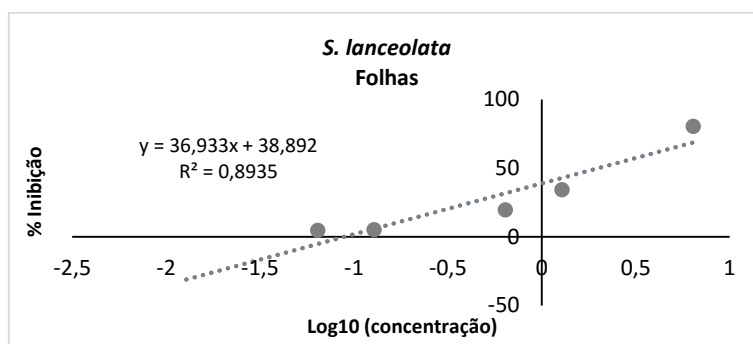


Figura 3.29 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC₂₅ das folhas de *Sambucus lanceolata*, nos ensaios de inibição *in vitro* da α -glucosidase.

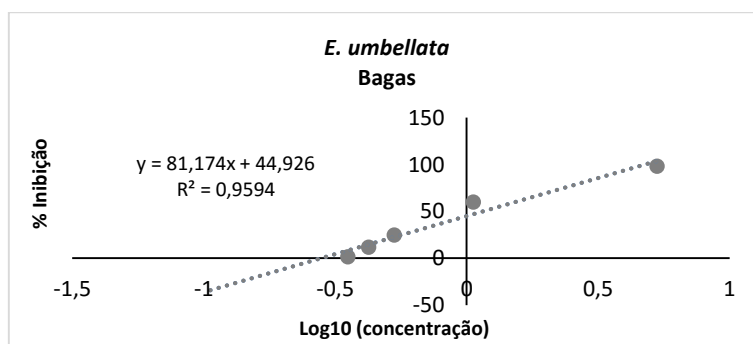


Figura 3.30 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC₂₅ das bagas de *Elaeagnus umbellata*, nos ensaios de inibição *in vitro* da α -glucosidase.

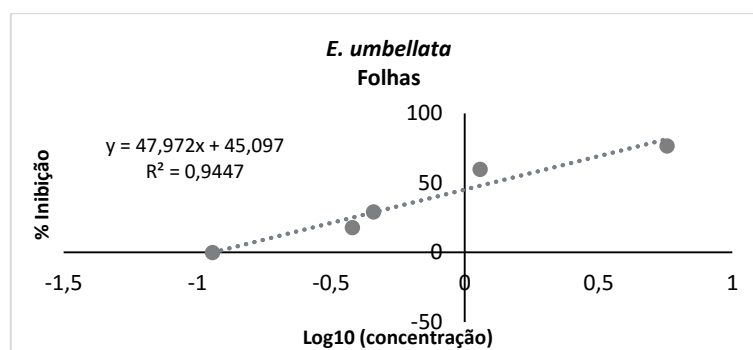


Figura 3.31 - Recta de calibração para a determinação do valor de IC25 das bagas de *Elaeagnus umbellata*, nos ensaios de inibição in vitro da α -glucosidase.