

UNIVERSIDADE VILA VELHA – ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA E ESTUDO DE
ESTABILIDADE DE *Rubus idaeus* e *Rubus fruticosus* EM
MONODROGA E COMBINADAS**

LAYLA DE OLIVEIRA LOPES

VILA VELHA
FEVEREIRO/2025

UNIVERSIDADE VILA VELHA – ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA E ESTUDO DE
ESTABILIDADE INFUSÃO DE *Rubus idaeus* e *Rubus fruticosus* EM
MONODROGA E COMBINADAS**

Dissertação apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

LAYLA DE OLIVEIRA LOPES

VILA VELHA
FEVEREIRO/2025

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

L864a

Lopes, Layla de Oliveira.

Atividade antioxidante, anti-inflamatória e estudo de estabilidade de *Rubus idaeus* e *Rubus fruticosus* em monodroga e combinadas / Layla de Oliveira Lopes – 2025.

107 f. : il.

Orientadora: Denise Coutinho Endringer.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2025.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Antioxidante. 3. Anti-inflamatório.
I. Endringer, Denise Coutinho. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

LAYLA DE OLIVEIRA LOPES

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA E ESTUDO DE
ESTABILIDADE INFUSÃO DE *Rubus idaeus* e *Rubus fruticosus* EM
MONODROGA E COMBINADAS**

Dissertação apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2025.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Hildegardo Seibert Franca (IFES)

Prof. Dr. Marcio Fronza (UVV)

Prof. Dra. Denise Coutinho Endringer (UVV)

Orientadora

Documento original assinado eletronicamente, conforme MP 2200-2/2001, art. 10, § 2º, por:

MARCIO FRONZA

CIDADÃO

assinado em 09/09/2025 12:45:15 -03:00

DENISE COUTINHO ENDRINGER

CIDADÃO

assinado em 09/09/2025 12:11:24 -03:00

HILDEGARDO SEIBERT FRANÇA

CIDADÃO

assinado em 09/09/2025 12:14:30 -03:00



INFORMAÇÕES DO DOCUMENTO

Documento capturado em 09/09/2025 12:45:15 (HORÁRIO DE BRASÍLIA - UTC-3)

por LAYLA DE OLIVEIRA LOPES (CIDADÃO)

Valor Legal: ORIGINAL | Natureza: DOCUMENTO NATO-DIGITAL

A disponibilidade do documento pode ser conferida pelo link: <https://e-docs.es.gov.br/d/2025-CC6LLC>

Dedico aos meus pais, Claudia e Anderson.

*Dedico também a todos aqueles que, em meio as intempéries vividas, continuam
perseguindo seus sonhos com bondade e gentileza.*

“... E ainda que conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse o amor, nada seria...”

1ª carta do apóstolo Paulo aos Coríntios (13:2)

Bíblia sagrada

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua misericórdia em me sustentar e sua bondade ao colocar pessoas tão incríveis na minha jornada;

Aos meus pais e irmãs, vocês são o meu bem mais precioso! Sou grata pelo apoio, incentivo, compreensão e tudo o que fazem por mim. Sem vocês, não estaria realizando este sonho, tampouco seria quem sou;

À minha querida orientadora prof. Dra. Denise Endringer, que me acolheu, inspirou e ensinou tanto;

Ao professor Dr. Márcio Fronza por todos os ensinamentos e risadas;

À Danielle Portes, que abriu as portas da sua casa e família para mim, me “adotou” sem nem perguntar meu sobrenome. Você é um presente e um ser humano usado por Deus;

Aos meus amigos Alinne e Mário Porto, que também me receberam tantas noites ao longo desses dois anos. Agradeço não só pelo apoio e hospitalidade de vocês, mas por tornarem minhas noites mais leves e divertidas;

À Kariane Sousa e Tamires Cruz, minhas pós-docs maravilhosas! Vocês me ensinaram tantos experimentos, estatística (e muito mais), e ainda sim o que mais aprendi foi com a personalidade de cada uma! Hoje sou feliz em chamar de amigas mulheres que tanto admiro;

À Gabriela Aquino e Julia Galles, pela amizade tão leve e abençoada por Deus;

Ao Antônio Domingos, por toda ajuda e gargalhadas neste último semestre;

À Iana, Tuani, Denize, Lyvia, Priscila e Ana Carolina, pelos conhecimentos passados, companhia e amizade cultivada;

Aos alunos de iniciação científica que me ajudaram tantas vezes, Luís, Guilherme, Letícia e demais integrantes do laboratório de produtos naturais;

A todos os integrantes do laboratório de cultura de células;

Ao prof. Dr. Hildegardo França, prof. Dr. Wanderson Romão e todos do laboratório de toxicologia do IFES, em especial ao Alan, que me acompanhou durante as análises cromatográficas e tirou tantas dúvidas;

A todas as demais pessoas, familiares e amigos, que estiveram comigo, ajudaram e apoiaram durante este caminho. Não cabem nesta página o nome de todos, e a isto sou muito grata.

À FAPES, pelo fomento e viabilidade da execução desta pesquisa.

LISTA DE EQUAÇÕES E TABELAS

Equação 1. Cálculo de lipídios ou extrato etéreo

Equação 2. Cálculo de proteínas pelo método Kjeldahl modificado

Equação 3. Cálculo de diferença de absorbância para teor de antocianinas

Equação 4. Cálculo do conteúdo total de antocianinas

Equação 5. Cálculo do Limite de Quantificação (LQ)

Equação 6. Cálculo do Limite de Detecção (LD)

Tabela 1. Compostos identificados no fruto de *Rubus fruticosus* (amora)

Tabela 2. Atividades bioativas do fruto de *Rubus fruticosus* (amora)

Tabela 3. Compostos identificados no fruto de *Rubus idaeus* (framboesa)

Tabela 4. Atividades bioativas do fruto de *Rubus idaeus* (framboesa)

Tabela 5. Amostras pelo delineamento simplex-centroide

Tabela 6. Curvas analíticas, r^2 , limites de detecção e quantificação dos padrões.

Tabela 7. Efeito do tempo de secagem na atividade antioxidante (DPPH), teor de antocianinas e umidade das drogas vegetais de *R. fruticosus* e *R. idaeus*

Tabela 8. Composição centesimal dos frutos secos de *R. idaeus* e *R. fruticosus*

Tabela 9. Teores de Antocianinas, polifenóis, taninos e flavonóides dos infusos de *R. idaeus* e *R. fruticosus* como monodroga e combinados

Tabela 10. Identificação e quantificação de compostos fenólicos e flavonóides por HPLC dos infusos de *R. idaeus* e *R. fruticosus* como monodroga e combinados

Tabela 11. Atividade antioxidante por DPPH, ABTS e FRAP das infusões de *R. idaeus* e *R. fruticosus* monodroga e combinados.

Tabela 12. Identificação e quantificação de compostos fenólicos e flavonóides por HPLC dos infusos de *R. idaeus* e *R. fruticosus* como monodroga e combinados preparados a partir da droga vegetal incubada a a 40°C e 75%UR ao longo de 180 dias.

Tabela 13. Análises de segurança microbiológica expressas em limites microbianos.

Tabela 14. Análises de segurança microbiológica expressas em presença e ausência.

Tabela 15. Atividade antioxidante por DPPH dos infusos de *R. idaeus* e *R. fruticosus* como monodroga e combinados preparados a partir da droga vegetal incubada a a 40°C e 75%UR ao longo de 180 dias.

Tabela 16. Determinação da umidade dos frutos secos de *R. idaeus* e *R. fruticosus* incubados a 40°C e 75%UR ao longo de 180 dias.

Tabela 17. Exame sensorial de cor dos frutos secos de *R. idaeus* e *R. fruticosus* incubados a 40°C e 75%UR ao longo de 180 dias e os infusos gerados a partir destas drogas vegetais.

Tabela 18. Exame sensorial de odor dos infusos de *R. idaeus* e *R. fruticosus* em monodrogas e combinados após incubação de suas drogas vegetais a 40°C e 75%UR ao longo de 180 dias.

Tabela 19. Exame sensorial de sabor dos infusos de *R. idaeus* e *R. fruticosus* em monodrogas e combinados após incubação de suas drogas vegetais a 40°C e 75%UR ao longo de 180 dias.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Rubus fruticosus* (amora)

Figura 2. *Rubus idaeus* (framboesa)

Figura 3. Delineamento simplex-centroide

Figura 4. Desenho do capítulo I

Figura 5. Efeito das infusões de *R. idaeus*, *R. fruticosus* e suas combinações em diferentes concentrações na redução da produção de Óxido nítrico.

Figura 6. Efeito das infusões de *R. idaeus*, *R. fruticosus* e suas combinações em diferentes concentrações na redução da produção do ânion superóxido.

Figura 7. Efeito protetivo das infusões de *R. idaeus*, *R. fruticosus* e suas combinações em diferentes concentrações contra peróxido de hidrogênio.

Figura 8. Efeito das infusões de *R. idaeus*, *R. fruticosus* e suas combinações em diferentes concentrações na redução da produção de citocinas.

Figura 9. Desenho do capítulo II

Figura 10. Drogas vegetais e infusões de *R. idaeus* (A) e *R. fruticosus* (B)

LISTA DE ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$ - oxigênio singlete

ABTS - 2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico

ANOVA - análise de variância multifatorial

ANVISA - Agência Nacional da Vigilância Sanitária

DAD - matriz de Diodos.

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

ELISA - Ensaio imunoenzimático (do inglês “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”).

EROS - Espécies reativas de oxigênio

F – Infusão de *Rubus fruticosus* (amora) a 13,33 mg/mL.

F (DV) – *Rubus fruticosus* (amora) como droga vegetal.

F317 - Infusão de *Rubus fruticosus* e *Rubus idaeus* 3:7 a 13,33 mg/ mL.

F713 - Infusão de *Rubus fruticosus* e *Rubus idaeus* 7:3 a 13,33 mg/ mL.

FI – Infusão de *Rubus fruticosus* e *Rubus idaeus* 1:1 a 13,33 mg/ mL.

FRAP - Poder antioxidante de redução férrica (do inglês, “Ferric Reducing Antioxidant Power”)

H_2O_2 - peróxido de hidrogênio

$\text{HO}^\cdot$ - radical hidroxila

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, “High Performance Liquid chromatography”)

I - Infusão de *Rubus idaeus* (framboesa) a 13,33 mg/mL.

I (DV) - *Rubus idaeus* (framboesa) como droga vegetal.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LD - limites de detecção

L-NMMA - citrato de L-NG-monometil arginina

LPS - lipopolissacarídeo

LQ - limites de quantificação

MAPA - Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MTT - (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]),

NBT - cloreto de nitroazul de tetrazólio

NO - óxido nítrico

NO_2^- - nitrito

NO_3^- - nitrato

O₂•⁻ - ânion superóxido

ONOO⁻ - peroxinitrito

PNPMF - Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

QR - quinona redutase

RNS - espécies reativas de nitrogênio

T0 – Tempo de análise da estabilidade antes da incubação das drogas vegetais

T135 – Tempo de análise da estabilidade 135 dias após incubação das drogas vegetais

T180 – Tempo de análise da estabilidade 180 dias após incubação das drogas vegetais

T45 – Tempo de análise da estabilidade 45 dias após incubação das drogas vegetais

T90 – Tempo de análise da estabilidade 90 dias após incubação das drogas vegetais

TFA - ácido trifluoroacético

UV – Ultravioleta.

WHO – Organização Mundial da Saúde (do inglês, World Health Organization).

RESUMO

LOPES, Layla de Oliveira, Universidade Vila Velha – ES, fevereiro de 2025. **Atividade antioxidante, anti-inflamatória e estudo de estabilidade de *Rubus idaeus* e *Rubus fruticosus* em monodroga e combinadas.** Orientadora: Prof. Dra. Denise Coutinho Endringer.

Rubus fruticosus e *Rubus idaeus* são espécies cujos frutos, amora-preta e a framboesa, respectivamente, possuem notáveis propriedades bioativas. Essas frutas são amplamente consumidas na forma de chás, frequentemente comercializados como “chá de frutas vermelhas” e promovidos com alegações de alto potencial antioxidante. No entanto, a maioria dos estudos que comprovam suas atividades bioativas se baseiam no uso das folhas como monodrogas. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante, anti-inflamatória e quimiopreventiva de cânceres de infusões de *R. idaeus* e *R. fruticosus*, tanto isoladamente (monodrogas) quanto em combinações, bem como a igualdade química e biológica das infusões ao submeter suas drogas vegetais a estabilidade acelerada, a fim de avaliar o tempo seguro de armazenamento e validade das drogas secas para o preparo dos chás. Trata-se de um estudo pioneiro na análise de infusões de espécies combinadas. Os frutos foram adquiridos de fornecedor qualificado e realizadas análises de umidade, antioxidante (DPPH) e teor de antocianinas para definir o tempo de secagem ideal para os experimentos (24, 48 e 96h). Após essa etapa, foi determinada a composição centesimal dos frutos secos e então preparadas as infusões na concentração de 13,33 mg/mL com tempo de infusão de 5 minutos. Foram testadas infusões individuais de *R. idaeus* e *R. fruticosus* como monodrogas e três combinações dessas. As análises químicas incluíram a determinação total de antocianinas, flavonoides, polifenóis e taninos por métodos espectrofotométricos. A determinação de compostos fenólicos e flavonoides também foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A capacidade antioxidante foi avaliada por ensaios químicos pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP. Além disso, a atividade biológica foi investigada *in vitro* por meio de ensaios de citotoxicidade, redução de óxido nítrico e ânion superóxido, redução de citocinas inflamatórias, efeito protetor contra peróxido de hidrogênio e indução de quinona redutase. Para o estudo de estabilidade, as monodrogas foram mantidas em câmara climática (40° C; 70% UR) durante seis meses e, a cada 45 dias, foram submetidas à análise do aspecto, teor de umidade e qualidade microbiológica. Neste mesmo período, as infusões foram submetidas a atividade antioxidante total por DPPH e o teor de compostos fenólicos por HPLC. Os dados obtidos indicaram que todas as infusões apresentaram atividades antioxidante e anti-inflamatória, com resultados mais expressivos para as monodrogas em determinados parâmetros, como a *R. idaeus*, que apresentou maior inibição do ânion superóxido, enquanto *R. fruticosus* foi a única amostra a apresentar efeito protetivo contra peróxido de hidrogênio. Foi observado maiores atividades anti-inflamatórias também para as infusões de espécies isoladas, a saber, *Rubus fruticosus* sendo capaz de reduzir a expressão de citocinas IL-1 em 43% e *R. idaeus* como a amostra que mais reduziu óxido nítrico. Em relação ao estudo de estabilidade, foi possível observar diferentes comportamentos dos compostos fenólicos ao longo do estudo de estabilidade, enquanto o ácido gálico e ácido tânico aumentou com ao final da estabilidade, o ácido clorogênico foi degradado, inferindo na atividade antioxidante encontrada, que aumentou para todas as amostras. Em relação a segurança microbiológica, os resultados foram satisfatórios e no que tange ao exame sensorial, apesar de apresentar alterações ao longo do estudo, foi considerado como viável para consumo. O estudo de estabilidade foi conclusivo como

satisfatório, o que indica que as drogas vegetais secas dos frutos de amora e framboesa, pelos métodos utilizados, podem ser armazenadas em temperatura ambiente por até um ano, desde que vedadas e ao abrigo da luz, elevada temperatura e umidade, para a finalidade de realizar infusões com benefício antioxidante. Os achados deste estudo reforçam o potencial bioativo das infusões de *R. idaeus* e *R. fruticosus*, especialmente na modulação do estresse oxidativo e da inflamação, sendo mais ativas as suas infusões como monodrogas, desmistificando crenças populares que induzem os consumidores que “misturas potencializam efeitos terapêuticos”. A relevância dos dados observados alerta possíveis interações entre espécies vegetais no que tange a redução de efeitos terapêuticos e efeitos tóxicos, bem como sugere a necessidade de estudos adicionais para explorar a aplicabilidade terapêutica das monodrogas estudadas, incluindo investigações em modelos *in vivo* e ensaios clínicos. Além disso, considerando o uso popular dessas infusões e seu potencial funcional, pesquisas futuras poderiam avaliar a inclusão destas espécies na Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, bem como avaliar biodisponibilidade dos compostos bioativos e a estabilidade dessas substâncias a longo prazo e durante o processamento industrial.

PALAVRAS-CHAVES: *Rubus idaeus*, *Rubus fruticosus*, antioxidante, anti-inflamatório, estabilidade.

ABSTRACT

LOPES, Layla de Oliveira, Vila Velha University – ES, February 2025. **Antioxidant, anti-inflammatory activity and stability study of *Rubus idaeus* and *Rubus fruticosus* as single and combined infusions.** Advisor: Prof. Dr. Denise Coutinho Endringer.

Rubus fruticosus and *Rubus idaeus* are species whose fruits, blackberry and raspberry, respectively, have remarkable bioactive properties. These fruits are widely consumed in the form of infusions, often marketed in Brazil as “red fruit tea” and promoted with claims of high antioxidant potential. However, most studies that prove their bioactive activities are based on the use of the leaves as monodrugs. This study aimed to evaluate the antioxidant, anti-inflammatory and cancer chemopreventive activity of infusions of *R. idaeus* and *R. fruticosus*, both alone (monodrugs) and in combinations, as well as the chemical and biological equality of the infusions when subjecting their plant drugs to accelerated stability, to evaluate the shelf life of the dried drugs for the preparation of the infusions. This is a pioneering study in the analysis of infusions of combined species. The samples were purchased from a qualified supplier and moisture, antioxidant (DPPH) and anthocyanin content analyses were performed to define the ideal drying time for the experiments (24, 48 and 96h). After this step, the centesimal composition of the dried fruits was determined and then infusions were prepared at a concentration of 13.33 mg/mL with an infusion time of 5 minutes. Individual infusions of *R. idaeus* and *R. fruticosus* were tested as monodrugs and three combinations of these. Chemical analyses included the determination of total anthocynins, flavonoids, polyphenols and tannins by spectrophotometric methods. The determination of phenolic compounds and flavonoids was also performed by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). The antioxidant capacity was evaluated by chemical assays using the ABTS, DPPH and FRAP methods. In addition, biological activity was investigated *in vitro* by means of cytotoxicity, reduction of nitric oxide and superoxide anion, reduction of inflammatory cytokines, protective effect against hydrogen peroxide and induction of quinone reductase. For the stability study, the herbal drugs were incubated at 40°C and 70% of humidity for six months, with analyses being performed every 45 days, both herbal drugs and their infusions. The analyses that covered the scope of the stability study were the determination of moisture, antioxidant evaluation (DPPH), determination of phenolic compounds and flavonoids (HPLC), microbiological safety and sensory examination. The results indicated that all infusions presented antioxidant and anti-inflammatory activities, with more expressive effects for the monodrugs in certain parameters, such as *R. idaeus*, which presented greater inhibition of superoxide anion, while *R. fruticosus* was the only sample to present a protective effect against hydrogen peroxide. Greater anti-inflammatory activities were also observed for the infusions of isolated species, namely, *Rubus fruticosus* being able to reduce the expression of IL-1 cytokines by 43% and *R. idaeus* as the sample that most reduced nitric oxide. Regarding the stability study, it was possible to observe different behaviors of the phenolic compounds throughout the stability study, while gallic acid and tannic acid increased at the end of the stability study, chlorogenic acid was degraded, inferring in the antioxidant activity found, which increased for all samples. Regarding microbiological safety, the results were satisfactory and regarding the sensory examination, despite presenting changes throughout the study, it was considered viable for consumption. The stability study was conclusive as satisfactory, which indicates that the dried plant drugs of blackberry and

raspberry fruits, by the methods used, can be stored at room temperature for up to one year, as long as they are sealed and protected from sunlight, for the purpose of making infusions with antioxidant benefits. The findings of this study reinforce the bioactive potential of infusions of *R. idaeus* and *R. fruticosus*, especially in the modulation of oxidative stress and inflammation, with their infusions being more active as monodrugs. The relevance of the observed effects, particularly for monodrugs, suggests the need for further studies to explore their therapeutic applicability, including investigations *in vivo* models and clinical trials. Furthermore, considering the popular use of these infusions and their functional potential, future research could evaluate the inclusion of these species in the National Policy for Medicinal Plants and Phytotherapeutics, as well as assess the bioavailability of bioactive compounds and the stability of these substances in the long term and during industrial processing.

KEYWORDS: *Rubus idaeus*, *Rubus fruticosus*, antioxidant, anti-inflammatory, stability.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	21
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
2.1. <i>Rubus fruticosus</i> e <i>Rubus idaeus</i>	24
2.2. Estresse oxidativo e inflamação	30
2.3. Quimioprevenção de câncer	32
2.4. Estudo de estabilidade acelerado	34
3. OBJETIVOS	35
3.1. Objetivo Geral	35
3.2. Objetivos Específicos	35
4. REFERÊNCIAS I	36
5. CAPÍTULOS	40
5.1. CAPÍTULO I	40
5.1.1. MATERIAIS E MÉTODOS	42
5.1.1.1. Desenho do capítulo I	42
5.1.1.2. Material vegetal	43
5.1.1.2.1. Aquisição	43
5.1.1.2.2. Secagem	43
5.1.1.2.3. Preparo dos infusos	44
5.1.1.3. Composição centesimal	44
5.1.1.3.1. Umidade	44
5.1.1.3.2. Cinzas	45
5.1.1.3.3. Lipídios	45
5.1.1.3.4. Proteínas	45
5.1.1.3.5. Carboidratos	46
5.1.1.4. Flavonoides totais roxos: Antocianinas	46
5.1.1.5. Polifenóis totais	47
5.1.1.6. Taninos totais	47
5.1.1.7. Flavonoides totais amarelos	48
5.1.1.8. Teor de compostos fenólicos e flavonoides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	48
5.1.1.9. Potencial antioxidante pela captura do radical DPPH	50
5.1.1.10. Potencial antioxidante pelo sequestro do radical ABTS	51
5.1.1.11. Potencial antioxidante pela redução do ferro (FRAP)	51
5.1.1.12. Atividades bioativas em cultura celular	51
5.1.1.12.1. Citotoxicidade	51

5.1.1.12.2.	Redução da produção de Óxido Nítrico (NO)	52
5.1.1.12.3.	Redução do ânion superóxido (O ₂ ⁻)	
5.1.1.12.4.	Efeito protetor contra Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)	
5.1.1.12.5.	Redução da produção de Citocinas	53
5.1.1.12.6.	Indução da Quinona Redutase (QR)	54
5.1.1.13.	Análise estatística	55
5.1.2.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1.2.1.	Determinação do tempo de secagem	56
5.1.2.2.	Composição centesimal	57
5.1.2.3.	Antocianinas, polifenóis, flavonóides e taninos	58
5.1.2.4.	Identificação de flavonóides e compostos fenólicos por HPLC	60
5.1.2.5.	Potencial antioxidante	62
5.1.2.6.	Atividade bioativa em cultura celular	64
5.1.2.6.1.	Avaliação da Citotoxicidade	64
5.1.2.6.2.	Redução da produção de Óxido Nítrico (NO)	64
5.1.2.6.3.	Redução do ânion superóxido (O ₂ ⁻)	
5.1.2.6.4.	Efeito protetivo contra Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)	
5.1.2.6.5.	Redução da produção de Citocinas	69
5.1.2.6.6.	Indução da Quinona Redutase	71
5.1.3.	CONCLUSÃO	72
5.1.4.	REFERÊNCIAS II	74
5.2.	CAPÍTULO II	78
5.2.1.	MATERIAIS E MÉTODOS	80
5.2.1.1.	Desenho do capítulo II	80
5.2.1.2.	Material vegetal	81
5.2.1.2.1.	Aquisição	81
5.2.1.2.2.	Secagem	81
5.2.1.2.3.	Incubação das amostras	82
5.2.1.2.4.	Preparo dos infusos	82
5.2.1.3.	Determinação do teor compostos fenólicos e flavonóides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	82
5.2.1.4.	Segurança microbiológica	84
5.2.1.5.	Potencial antioxidante pela captura do radical DPPH	86
5.2.1.6.	Determinação de umidade	86
5.2.1.7.	Características organolépticas: Exame sensorial	87
5.2.1.8.	Análise estatística	87

5.2.2.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
5.2.2.1.	Determinação do tempo de secagem	88
5.2.2.2.	Determinação do teor compostos fenólicos e flavonóides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	89
5.2.2.3.	Segurança microbiológica	93
5.2.2.4.	Potencial antioxidante pela captura do radical DPPH	94
5.2.2.5.	Determinação de umidade	95
5.2.2.6.	Exame sensorial	95
5.2.3.	CONCLUSÃO	99
5.2.4.	REFERÊNCIAS III	99
6.	CONCLUSÃO FINAL	102
7.	MATERIAIS SUPLEMENTARES	104
7.1.	LAUDOS DOS FRUTOS	104

1. INTRODUÇÃO GERAL

O emprego da natureza como recurso terapêutico data de épocas remotas, em que o ser humano se empenhava, em prol da sua sobrevivência e disseminação da espécie, a inibir as crescentes manifestações anormais que o acometiam com os meios vigentes (TAYLOR, WERNEKE, 2018). Dentre os métodos naturais utilizados, encontram-se as espécies vegetais, compreendendo um notável arsenal de propriedades terapêuticas (TAYLOR, WERNEKE, 2018).

A importância das plantas medicinais para a saúde humana foi reconhecida pela Organização Mundial da Saúde desde 1978, na Conferência Internacional sobre Atenção Primária em Saúde em Alma-Ata, expondo a importância e necessidade de políticas e regulamentações nacionais relativas à utilização de recursos terapêuticos tradicionais com comprovada eficácia (WHO, 1978).

Em decorrência, em 2006, sob o decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, foi aprovada no Brasil a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), visando garantir o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, bem como o acesso seguro por meio da disponibilização de fitoterápicos pela Atenção Básica à Saúde (BRASIL, 2006a; BRASIL, 2006b).

Os recursos terapêuticos tradicionais brasileiros se revelam distintos com o passar dos anos, sendo considerados parte de um patrimônio cultural inapreciável. Reconhecendo tal mérito, o poder legislativo brasileiro, em 2015, promulgou a lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015, que dispõe sobre a proteção e acesso ao patrimônio genético, imputando a devida importância ao conhecimento tradicional brasileiro, uma incontestável fonte a gênese de novos princípios ativos (BRASIL, 2015).

Apesar de não serem nativas do Brasil, as espécies vegetais estudadas neste trabalho são partícipes da cultura brasileira e fazem parte do conhecimento tradicional brasileiro, tendo seu uso descrito em literatura nacional desde o século XIX, utilizadas no preparo de xaropes, geleias e doces pelos seus sabores característicos (MARTIUS, 2023).

Dois órgãos federais atuantes no setor regulatório de chás, a Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA), advinda do Ministério da Saúde (MS), e o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), primando pela segurança e eficiência dos chás disponibilizados à população, publicam listas positivas de espécies vegetais autorizadas para a fabricação e comercialização de chás a âmbito nacional.

Dentre elas, tem-se a amora, *Rubus fruticosus* e a framboesa, *Rubus idaeus* (BRASIL, 2021; BRASIL, 2022).

A *R. fruticosus* é originada em uma região de alta biodiversidade, encontrada nos maquis do Mediterrâneo (MONTANARI et al., 2023). Também conhecida pela denominação “amora-preta”, é vastamente aplicada na medicina tradicional pelas propriedades antioxidantes e antimicrobianas de suas folhas, derivadas dos seus constituintes químicos, a saber, ácidos fenólicos, antocianinas, flavonoides, taninos, carotenoides e ácidos orgânicos (Montanari et al., 2023).

A framboesa, *R. idaeus*, foi objeto de estudo em um ensaio clínico randomizado buscando atividades antienvhecimento e clareadora, sendo causadora de efeitos positivos por meio do sinergismo com outras substâncias presentes no sêrum, a saber, 0,0005% de extrato das folhas de *R. idaeus*, 20% de vitamina C e 1% de vitamina E (RATTANAWIWATPONG et al., 2020).

Em razão do seu alto teor de polifenóis, como antocianinas e cetonas, essa espécie também é estudada para reduzir os níveis glicêmicos plasmáticos e estabilizar o perfil lipídico do sangue, obtendo como resultado efeito hipoglicemiante e estabilização de lipoproteínas de baixa densidade (PIÑA-CONTRERAS et al., 2022).

R. fruticosus e *R. idaeus* compreendem espécies portadoras de frutos com notáveis propriedades bioativas, sendo difundidas comercialmente com a denominação de “frutas vermelhas” sob diferentes formas alimentícias, em especial sob a forma de chás, comercializado como “chá de frutas vermelhas” e acompanhado, em sua maioria, por estratégias de marketing apelativas no que tange ao seu potencial antioxidante.

Contudo, a maior parte dos estudos comprovando as atividades bioativas se dão a partir das suas folhas como monodroga (MONTANARI et al., 2023; PIÑA-CONTRERAS et al., 2022; SOBEH et al., 2020), sendo em minoria os estudos com frutos e escassos os que exploram seus efeitos combinados.

Também não há evidências para quimioprevenção de câncer a partir dos seus frutos. A atividade quimiopreventiva de câncer visa reverter, inibir ou prevenir a progressão do câncer a partir do uso de um agente natural ou sintético (WATTEENBERG, 1985). Tal atividade já foi comprovada para os frutos de banana, uva e juçara (FREIRE et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2020; BARROSO et al., 2019).

Em vista da tamanha exposição social às propagandas apelativas no que tange a atividades bioativas de produtos naturais, em especial pela indústria de alimentos na tentativa de tornar terapêutico um produto alimentício, é primordial estudos buscando

desmistificar conceitos propagados. O presente estudo, de caráter pioneiro, busca elucidar o potencial antioxidante do chá de duas espécies de frutas vermelhas e a influência das suas combinações sobre seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. Além disso, a estabilidade analisada neste estudo, avaliando a influência do tempo e temperatura sobre as drogas vegetais de frutos para o preparo de infusões também tem caráter pioneiro.

Portanto, a hipótese do presente estudo foi que as infusões das combinações de *R. ideaus* e *R. fruticosus* demonstrariam maiores atividades bioativas, em detrimento de suas infusões como monodrogas, confirmando assim o conhecimento popular.

Os experimentos *in vitro* realizados nesta dissertação investigaram diferentes mecanismos e possibilidades pelos quais as infusões com os frutos de *R. ideaus* e *R. fruticosus* podem exercer efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. A redução da produção de óxido nítrico (NO) e do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) visam sugerir uma modulação do estresse oxidativo, um processo chave em diversas doenças inflamatórias. O efeito protetivo contra o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) reforça o potencial citoprotetor, prevenindo danos celulares induzidos por espécies reativas de oxigênio (EROs).

Além disso, a diminuição da produção de citocinas inflamatórias pode indicar uma ação imunomoduladora relevante no controle da resposta inflamatória. Por fim, a indução da quinona redutase aponta para um possível envolvimento das infusões na ativação de mecanismos de defesa celular, favorecendo a detoxificação de compostos oxidantes e eletrofílicos.

A presente dissertação segue o modelo de capítulos, sendo divididos e intitulados com os exatos conteúdos de submissões dos artigos científicos por ela gerados. Portanto, no capítulo I, intitulado “Atividade antioxidante e anti-inflamatória da infusão de *Rubus idaeus* e *Rubus fruticosus* em monodroga e combinadas”, tem-se a avaliação biológica feita em cultura de células das atividades antioxidante, anti-inflamatória e quimiopreventiva de câncer das infusões, bem como a caracterização química das infusões e composição centesimal das drogas vegetais.

No capítulo II, intitulado “Estabilidade acelerada de *Rubus idaeus* e *Rubus fruticosus* em monodroga e combinadas”, encontra-se a avaliação da igualdade química e biológica das infusões ao submeter suas drogas vegetais a estabilidade acelerada, em condições críticas de 40°C e 70% de umidade relativa do ar por seis meses, sendo os parâmetros avaliados a cada 45 dias, a fim de avaliar o tempo seguro de armazenamento e validade das drogas secas para o preparo dos chás.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. *Rubus fruticosus* e *Rubus idaeus*

Rubus L. é um dos gêneros mais ricos em espécies da família Rosaceae. A espécie vegetal *R. fruticosus*, conhecida como amoreira, dá origem ao seu fruto, amora-preta (**Figura 1**), uma baga, que compreende em um agregado de gotículas de 1 a 3 centímetros de diâmetro, que possuem sua coloração afetada pelas etapas de maturação, determinada pela presença de antocianinas, glicosídeos e antocianidinas, sendo a princípio verde, vermelho e preto, respectivamente. Trata-se de um fruto comumente consumido ao redor do mundo em virtude da sua palatabilidade (GIL-MARTÍNEZ et al., 2023; WU et al., 2023)

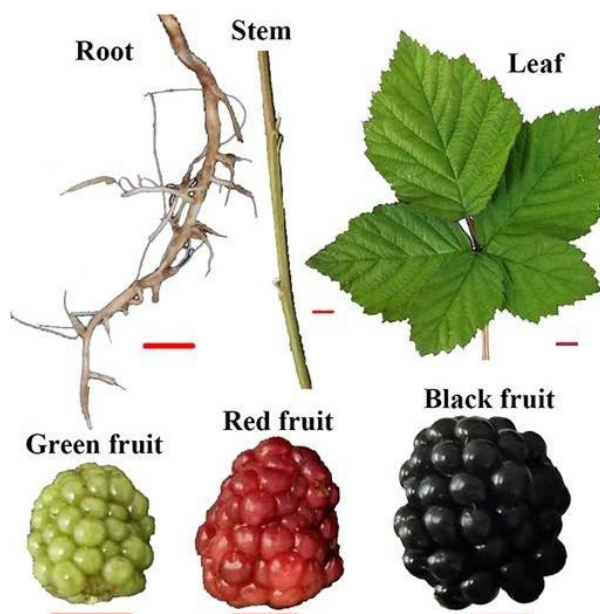


Figura 1. *Rubus fruticosus* (amora). Fonte: (Wu et al., 2023)

Essa espécie consiste em um arbusto perene frutífero nativo da Europa, comumente encontrado nos cinco continentes, em florestas temperadas e planaltos tropicais. O período de floração se concentra de maio a outubro, sendo produzido o fruto maduro do final do verão até o outono, tendo sua polinização maior no período noturno. Trata-se de uma espécie dentre 300 micro espécies de arbustos de demasiada importância a manutenção da biodiversidade do seu habitat natural uma vez que desempenha a conservação de táxons ameaçados e em declínio (ANDERSON, ROTHERAY E MATHEWS, 2023).

Devido ao longo período de floração dessa espécie, tornou-se importante fonte de pólen e néctar para abelhas, borboletas e demais invertebrados diurnos. Ademais,

assiste como local de nidificação e refúgio para aves e mamíferos. É conhecida por ser apomítica e parcialmente pseudogâmica, podendo reproduzir-se assexuadamente e eventualmente na ausência de pólen, o que garante a reprodução de plantas isoladas, obtendo um clone geneticamente idêntico como consequência (MACGREGOR E SCOTT-BROWN, 2020).

Apesar de comprovada a frutificação da *R. fruticosus* independente da presença ou ausência de insetos polinizadores, a presença destes é diretamente proporcional à incidência de diversidade genética, gerada a partir de polinização cruzada. Há diferença no tamanho médio e massa dos frutos desenvolvidos a partir de flores polinizadas por insetos, sendo estes maiores. A importância da polinização por insetos para o tamanho e a qualidade dos frutos foi demonstrada para as espécies de *R. fruticosus* e *R. idaeus* (COATES, BROWN E CUNNINGHAM, 2022; ANDRIKOPOULOS E CANE, 2018).

Dentre os metabólitos secundários encontrados no fruto dessa espécie (**Tabela 1**), a amora apresenta principalmente compostos fenólicos, a saber, antocianinas, flavonóis, elagitaninos e ácidos fenólicos, tendo sua bioatividade relacionada com o teor de compostos fenólicos. Em vista do seu arsenal de moléculas bioativas, como retinol, ácido ascórbico, carotenóides, esteróis, terpenóides e compostos fenólicos, nas últimas décadas, a amora tem sido proposta por autores como um “superalimento” (D’ANGELO et al., 2020).

Tabela 1. Compostos identificados no fruto de *Rubus fruticosus* (amora)

COMPOSTOS IDENTIFICADOS	MÉTODO	REFERÊNCIA
47 Compostos fenólicos, dentre eles: Ác cítrico; Ác. clorogênico; Ác. cumárico; Ác. hidroxibenzóico; Ác. málico; Catequina	UPLC-QToF-MS	D’Angelo et al., 2020.
Antocianidinas: cianidina-3-glicosídeo; cianidina-3-rutinosídeo.	UPLC-QToF-MS	D’Angelo et al., 2020.
31 terpenoides, dentre eles: Iridóide ebulosídeo; Cinamosídeo, rodosídeo A, Scrutalpin F, Tropeosídeo B1; Ác. hidroxitormênico; Ác. dihidroxirs-12-eno-23,28-dióico.	HPLC-MS	Gil-Martínez et al., 2023.

Os constituintes químicos do extrato hidroalcoólicos do fruto da amoreira foi determinado por meio de cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) acoplado a um analisador híbrido QToF-MS, espectrômetro de massa conectado por meio de interface de ionização por eletrospray. Os resultados obtidos demonstraram 47 compostos fenólicos, sendo derivados principalmente dos ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos (D’ANGELO et al., 2020).

Os benefícios da amora para a saúde humana são inúmeros, como a prevenção e tratamento da síndrome metabólica, atuação no sistema digestivo e imunológico, prevenção de doenças inflamatórias e cardiovasculares e protetora de cânceres gastrointestinais, devido a suas propriedades antioxidante e anti-inflamatória (**Tabela 2**). Todavia, os fatores agrogeoclimatológicos, como genótipo, condições ambientais, práticas agronômicas, época da colheita, armazenamento e técnicas de processamento inferem decisivamente em sua composição e, conseqüentemente, nas atividades bioativas (ALBERT et al., 2022).

Tabela 2. Atividades bioativas do fruto de *Rubus fruticosus* (amora)

ATIVIDADE BIOATIVA	TIPO DE ESTUDO	RESULTADO	REFERÊNCIA
Antioxidante	DPPH e FRAP	Inibição de radicais livres	D'Angelo et al., 2020.
Antimicrobiana	<i>In vitro</i> por difusão em meio sólido	Cepas de <i>E. faecalis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. sake</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>Z. bailii</i> foram sensíveis.	Gil-Martínez et al., 2023.
Anti-inflamatório	<i>In vitro</i> com células HT-29 e T-84	Inibição de IL-8	Gil-Martínez et al., 2023.
Prevenção de déficit de memória	<i>In vivo</i> com camundongos	Efeitos do extrato de amora foram semelhantes ao donepezil	Melo et al., 2023.

Em estudo realizado com o extrato hidroalcoólico de amora a 20%, foi demonstrado atividade anti-inflamatória significativa pela inibição de citocinas pró-inflamatórias. Essa atividade bioativa foi gerada não apenas aos compostos fenólicos, mas também aos terpenóides, obtendo um efeito combinado de vários fitoquímicos presentes no extrato (GIL-MARTÍNEZ et al, 2023).

A atividade antioxidante do extrato metanólico do fruto de *R. fruticosus* a 20% obteve resultado positivo significativo, a estrutura química dos compostos fenólicos, presentes em demasia, são capazes de interagir com enzimas e agir como antioxidante ao sequestrar radicais livres em processos oxidativos sob diferentes mecanismos, como transferência de átomo de hidrogênio, transferência de elétron único, poder redutor ou quelar metais, tendo o potencial de modular inúmeros processos biológicos (ALBERT et al, 2022).

Em um estudo para avaliar o efeito do extrato da amora sob a prevenção da memória realizado por Mello et al (2023), encontrou-se resultado similar para a ação

do extrato de amora de 100 a 200mg/kg comparado a donepezila 5mg/kg em modelos de camundongos com amnésia induzida por escopolamina 1mg/kg. A avaliação foi realizada mediante a análise comportamental de reconhecimento de objetos. Além de impedir o comprometimento da memória, o extrato de amora foi capaz de prevenir o aumento da atividade da acetilcolinesterase (LOPEZ-CORONA et al., 2022).

Outra espécie vegetal do gênero *Rubus* L. e família Rosaceae amplamente utilizada pela população como planta medicinal é a *R. idaeus*. Esta é presente em seis continentes, sendo a sua utilização mais remota a partir das folhas como adstringente para diarreia e cicatrização de feridas, bem como para dificuldades no decorrer do parto. O seu fruto também é utilizado terapeuticamente desde a antiguidade, em especial na medicina tradicional chinesa para tonificar e estabilizar os rins, preservar a energia e tratar insuficiência hepática e renal (TAO et al., 2023).

Botanicamente, *R. idaeus* (**Figura 2**) é um arbusto frutífero que se assemelha a uma trepadeira de um a dois metros de altura com ramos castanhos ou castanhos-avermelhados, espinhos esparsos e glabros. O fruto, conhecido como framboesa, é parcialmente esférico com diâmetro de 1 a 1,4cm, vermelho e succulento. Trata-se de um fruto com alto teor de vitaminas, minerais, ácidos graxos, proteínas, carboidratos e fibras alimentares (TAO et al., 2023).



Figura 2. *Rubus idaeus* (framboesa). Fonte: (Tao et al., 2023).

Os metabólitos secundários (**Tabela 3**) presentes na *R. idaeus* compreende polifenóis, a saber, ácido elágico, ácido salicílico, ácido clorogênico, p-cumárico, quercitrina, catequina e luteolina. Ademais, terpenoides, alcalóides, esteróides e ácidos graxos também se fazem presentes, conferindo-a propriedades antioxidante, hipoglicemiante, hipolipidêmico, anti-Alzheimer, anti-osteoporose, hepatoprotetor, anticancerígeno, neuroprotetor, antibacteriano e para cuidados com a pele (SONG et al., 2020).

Tabela 3. Compostos identificados no fruto de *Rubus idaeus* (framboesa)

COMPOSTOS IDENTIFICADOS	MÉTODO	REFERÊNCIA
Compostos fenólicos, dentre eles: Ác elágico; Ác. salicílico, Ác. clorogênico; Ác. cumárico Quercetina; Catequina; Luteolina	HPLC-PAD	Song et al., 2020.
Antocianidinas: cianidina-3-glicosídeo; cianidina-3-soforosídeo.	HPLC	Lopez-Corona et al., 2022.

As antocianinas são uma classe de extrema importância para essa espécie vegetal, sendo encontradas nos vacúolos das células vegetais. Nas framboesas, as antocianinas mais importantes são, a saber, cianidina-3-O-soforosídeo, cianidina-3-O-glicosilrutinosídeo. São absorvidas e em sua maioria metabolizadas no cólon. Assim que é encaminhada para o intestino, ao entrar em contato com a microbiota intestinal tem-se primeiro a separação das agliconas das antocianinas; a segunda fase ocorre com a clivagem do heterociclo das antocianidinas e a terceira etapa é a metabolização em derivados de sulfato, glicina, glicuronídeo e metilato (LOPEZ-CORONA et al., 2022).

Os compostos fenólicos são os mais abundantes em vista do papel biológico que desempenham, ainda assim, não são padronizados e podem variar a depender das condições às quais a espécie vegetal está submetida, como estágio de crescimento, condições climáticas e variedade de framboesa. Os polifenóis desempenham papel de proteção das plantas contra possíveis injúrias, ou seja, a concentração desses compostos pode se elevar à medida que a planta necessite de maior proteção em resposta a estresses bióticos e abióticos, pragas, bactérias, doenças, luz, ultravioleta, temperatura, seca (LOPEZ-CORONA et al., 2022).

Um dos constituintes responsáveis pelas atividades bioativas da framboesa é a sua cetona, possuindo propriedades lipolíticas, anti-obesidade e de perda de peso (**Tabela 4**). A biossíntese da cetona tem gênese na Cumaroil-CoA, que é transformada em p-hidroxibenzalacetona por catálise da enzima benzalacetona-sintase. A p-hidroxibenzalacetona é reduzida pela benzalacetona-redutase com a participação do NADPH, resultando na síntese da cetona da framboesa, que quando produzida de forma natural possui alto valor de compra agregado (LI et al., 2021).

Tabela 4. Atividades bioativas do fruto de *Rubus idaeus* (framboesa)

ATIVIDADE BIOATIVA	TIPO DE ESTUDO	RESULTADO	REFERÊNCIA
Anti-obesidade	<i>In vivo</i> com ratos	Redução de triglicerídeos e gordura a nível hepático, ganho de peso e tecido adiposo.	Attia et al., 2019.
Anti-adipogênico	<i>In vitro</i> com células 3T3-L1 de camundongos	Suprimiu o acúmulo de lipídeos durante a diferenciação de pré-adipócitos.	Uramaru et al., 2023.
Antimicrobiano	<i>In vitro</i> por difusão em poço de meio Ágar	Cepas de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> foram sensíveis.	Rippin, Sharma e Beniwal, 2023.
Estresse oxidativo	<i>In vivo</i> com <i>C. elegans</i>	Melhoria estresse oxidativo; Redução da expressão de espécies reativas a oxigênio.	Song et al., 2020.
Anti-inflamatório	<i>In vitro</i> por microglia estimulada por LPS	Aumentou a liberação da citocina anti-inflamatória IL-10. Marcadores e mediadores pró-inflamatórios atenuados CD40, NO, TNF- α e superóxido intracelular pelas vias NF- κ B, MAPK e NFAT.	Bibi, Du e Zhu., 2018.
Antioxidante	ABTS, FRAP e DPPH	Inibição dos radicais livres.	D'Angelo et al., 2020.

A suplementação de extrato cetônico de fruto framboesa, na concentração de 98%, em camundongos com dose de 55mg/kg, reduziu o ganho de peso, conteúdo de triglicerídeos a nível hepático e peso de tecido adiposo, bem como atuou na prevenção da obesidade e melhorou quadro de esteatose hepática por meio de alteração no metabolismo lipídico, especialmente no aumento de norepinefrina, induzindo lipólise dos adipócitos brancos (ATTIA et al., 2019).

Um estudo demonstrou que o extrato cetônico da framboesa suprimiu a diferenciação induzida pelo acúmulo de lipídeos de pré-adipócitos 3T3-L1 de maneira dose-dependente de 100 μ M, melhorando o metabolismo lipídico e reduzindo a inflamação do tecido adiposo. Ademais, a cetona reduzida para rododendrol em microsomas hepáticos suprimiu o acúmulo de lipídeos durante a diferenciação de pré-adipócitos (URAMARU et al., 2023).

Em estudo *in vitro* de difusão em meio Ágar para avaliação da atividade antimicrobiana do extrato do fruto da *R. idaeus*, com concentração de 250 μ g de taninos hidrolisáveis, foi observado que após a hidrólise enzimática do extrato pela

enzima tanino acil-hidrolase, a atividade antimicrobiana aumentou em demasia o halo de inibição, crescendo de 12mm para 35mm, o que prediz atividade antibiótica significativa (RIPPIN, SHARMA e BENIWAL, 2023).

Utilizando estimulação de micróglia de camundongos, avaliou-se a suplementação de framboesa enriquecido em elagitaninos e derivados do ácido elágico, na dose equivalente a dose humana de 0,48g/kg de framboesa liofilizada consistindo em 5% do peso total da ração. Resultou no aumento da liberação da citocina anti-inflamatória IL-10, marcadores e mediadores pró-inflamatórios atenuados CD40, NO, TNF- α e superóxido intracelular pelas vias NF- κ B, MAPK e NFAT (BIBI, DU e ZHU, 2018).

García e colaboradores (2020) realizaram um estudo de atividade antioxidante de extratos de framboesa obtidos com mistura de metanol/água deionizada/HCl (70:29:1) de acordo com as metodologias de captura dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), poder antioxidante de redução férrica (FRAP) e sal diamônico de 2,2-azinobis (ABTS). Foi obtido como resultado uma maior capacidade antioxidante para os ensaios ABTS e FRAP uma vez comparado ao DPPH. A média de resultados do método FRAP foi 20% superior à média dos resultados do ensaio com DPPH (GARCÍA et al., 2020).

2.2. Estresse oxidativo e inflamação

No processo de respiração celular, que ocorre no metabolismo mitocondrial das células animais, são produzidas as espécies reativas de oxigênio (EROS) e peróxidos orgânicos de forma natural. As EROS são importantes a nível de homeostase celular, desempenhando funções de transdução, expressão gênica e ativação de receptores. Quando o sistema antioxidante não é capaz de neutralizá-las, gera-se um excesso de EROS, podendo acarretar danos celulares a nível de material genético, proteínas e lipídeos, podendo induzir mutações somáticas e transformações pré-neoplásicas e neoplásicas (HUSSAIN et al., 2016).

O estresse oxidativo tem uma importante performance nas doenças inflamatórias crônicas. Proteínas oxidadas, peroxidação lipídica, produtos glicosados e demais danos do estresse oxidativo podem resultar em degenerações neuronais, principalmente em distúrbios cerebrais, neuroinflamação e morte celular e até perda de memória (POPA-WAGNER, 2013).

Durante o desenvolvimento de diversas doenças crônicas degenerativas, as espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) têm um papel crucial na

indução do estresse oxidativo celular. Esse fenômeno ocorre quando há um aumento anormal na produção dessas moléculas, superando a capacidade das defesas antioxidantes de neutralizá-las, resultando no acúmulo de radicais livres. Diferentes tipos de ROS, como ânion superóxido (O_2^-), oxigênio singlete (1O_2), radical hidroxila (HO^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), podem ser gerados em plantas devido a desequilíbrios na cadeia transportadora de elétrons ou nas reações de Calvin. Já os RNS, derivados do óxido nítrico, incluem espécies como nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) e peroxinitrito ($ONOO^-$), sendo altamente reativos (LOPEZ-CORONA, 2022).

A produção de ROS e RNS pode ser intensificada por fatores internos, relacionados às vias enzimáticas e bioquímicas, e externos, como poluição, uso de álcool, fármacos, exposição à radiação e hábitos alimentares. O acúmulo excessivo dessas espécies está associado ao envelhecimento e a diversas doenças crônicas, incluindo câncer e diabetes. Compostos antioxidantes são fundamentais para mitigar o estresse oxidativo, ao estabilizar os radicais livres e reduzir seus efeitos deletérios no organismo (LOPEZ-CORONA, 2022).

Durante o processo inflamatório, a ativação dos macrófagos é intermediada por mediadores e sinalizadores da inflamação, dentre eles, NO, O_2^- , IL-6, TNF- α (MAN et al., 2022). O óxido nítrico (NO) desempenha diferentes funções na regulação celular, dependendo de sua concentração. Em níveis fisiológicos, é essencial para o funcionamento normal das células. No entanto, quando produzido em excesso, pode prejudicar diversas funções celulares. Por exemplo, quantidades reduzidas de NO podem favorecer o aumento do débito cardíaco, enquanto concentrações elevadas podem comprometer a função cardíaca (MASSION et al., 2003).

O NO é sintetizado por três isoformas da enzima NO sintase (NOS): nNOS (NOS1), iNOS (NOS2) e eNOS (NOS3). Essas enzimas estão presentes em diversos tipos celulares e tecidos, onde convertem a arginina em citrulina, liberando NO no processo. Para sua atividade, as NOS utilizam cofatores como mononucleotídeo de flavina, dinucleotídeo de flavina adenina, fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina e (6R-)5,6,7,8-tetra-hidro-L-biopterina. Apesar de estarem amplamente distribuídas, cada isoforma apresenta uma expressão predominante em determinados tecidos (MATTILA, THOMAS, 2014).

A nNOS é majoritariamente encontrada em neurônios e no cérebro, enquanto a eNOS é mais abundante em células endoteliais, embora ambas sejam expressas de forma constitutiva em diferentes tecidos. Já a iNOS, em condições normais, apresenta baixos níveis de expressão na maioria dos tecidos. Nos queratinócitos,

todas as três isoformas estão presentes, e células do sistema imune, como macrófagos, neutrófilos, células T e fibroblastos, também expressam diferentes formas de NOS (MATTILA, THOMAS, 2014).

O óxido nítrico (NO) está diretamente envolvido na inflamação extracutânea, com níveis elevados associados a doenças inflamatórias intestinais, como doença de Crohn e colite ulcerativa. A inibição da iNOS demonstrou reduzir edema, infiltração de neutrófilos e a produção de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6), enquanto aumentou citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10). Estudos também mostraram que a inibição da NOS impacta a inflamação em diferentes tecidos, incluindo pulmões e articulações, além de regular a resposta inflamatória na pele *in vitro* e *in vivo* (MAN et al., 2022).

2.3. Quimioprevenção de câncer

O câncer compreende um grupo de doenças gerada pelo crescimento desordenado e incontrolável de células anormais, podendo invadir tecidos e órgãos e comprometer a homeostase orgânica (KELLOFF et al., 1994). O atraso no diagnóstico e tratamento favorece o aumento da mortalidade desta doença, o que ocorreu na pandemia ocasionada pelo SARS-CoV-19 em razão do fechamento de estabelecimentos de saúde preventiva e interrupções de emprego (SIEGEL et al., 2023).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o câncer abrange a segunda principal causa de morte no mundo, sendo responsável por 9,6 milhões de mortes no ano de 2018. A nível mundial, uma em cada seis mortes estão relacionadas ao câncer, sendo que 70% das mortes têm incidência em países de baixa e média renda. As estatísticas apontam que a incidência de câncer aumentará em aproximadamente 60% nas próximas duas décadas, com previsão de 30 milhões de novos casos até 2040 (WHO, 2023).

As estratégias de prevenção de câncer corroboram para redução da sua mortalidade, sendo existentes duas estratégias promissoras, a primária e a secundária. A prevenção primária se baseia em evitar o contato com agentes carcinogênicos exógenos, a saber, radiação e substâncias químicas carcinogênicas, entre outros (WATTEENBERG, 1985).

A carcinogênese compreende na etapa inicial do câncer, bem como em sua progressão em pré-câncer e câncer, caracterizada por alterações moleculares específicas, acarretando uma destruição genotípica, associada a alterações

fenotípicas. A estratégia de prevenção de câncer secundária é baseada no uso de um agente natural ou sintético para reverter, inibir ou prevenir a progressão do câncer ou processo da carcinogênese, sendo denominada quimioprevenção (WATTEENBERG, 1985, KELLOFF et al., 1994).

A fim de serem considerados agentes quimiopreventivos, estas substâncias devem não apenas reverter, inibir ou prevenir a progressão do câncer, mas também demonstrar reduzidos efeitos colaterais, baixa toxicidade e serem capazes de neutralizar as células carcinogênicas (KELLOFF et al., 1994). Esses agentes terapêuticos são classificados de acordo com estágio da carcinogênese em que atuam, sendo, de forma geral, classificados como agentes bloqueadores ou supressores (WATTEENBERG, 1985).

Os agentes bloqueadores e supressores agem, respectivamente, nos estágios de promoção e progressão por meio dos mecanismos de inibição do metabolismo do ácido araquidônico, a saber, inibição da ornitina carboxilase, indução da diferenciação celular, entre outros; prevenindo a iniciação por meio de vários mecanismos, tais como a inibição da iniciação carcinogênica ou a indução de enzimas de destoxificação. (WATTEENBERG, 1985).

Baseando-se no estágio da carcinogênese são empregados ensaios biológicos na pesquisa de produtos naturais com potencial quimiopreventivo de câncer com a função de monitorar a inibição da carcinogênese em seus diferentes estágios (KINGHORN et al., 2004; PEZZUTO et al., 2005). Para o estágio de iniciação podem ser empregados ensaios, em cultura de células, para avaliar a atividade indutora da enzima NAD(P)H, a quinona redutase (QR) e indução dos elementos de resposta antioxidante, os quais participam do processo de destoxificação (KINGHORN et al., 2004; PEZZUTO et al., 2005).

Para o estágio de promoção da carcinogênese podem ser empregados ensaios *in vitro* de inibição das enzimas ciclooxigenase-1 e -2 e ensaios em cultura de células, a saber, inibição de atividade das enzimas ornitina descarboxilase e de NF- κ B. Para o estágio de progressão podem ser empregados os ensaios *in vitro* de inibição da aromatase e, em cultura de células, de inibição de NF- κ B, citado anteriormente (KINGHORN et al., 2004; PEZZUTO et al., 2005).

A avaliação do potencial quimiopreventivo também engloba os ensaios de citotoxicidade em cultura de células tumorais, os quais os resultados são analisados em conjunto com os ensaios de quimioprevenção supracitados (KINGHORN et al., 2003). Isto em razão de que os agentes quimiopreventivos de câncer devem ser

capazes de atuar de forma específica na inibição ou indução das vias/enzimas alvo dos ensaios, sem, no entanto, inibir o crescimento das linhagens tumorais de forma inespecífica (SPORN, 1991; KELLOFF et al., 1994; SPORN; SUH, 2000).

De acordo com Newman e Cragg (2020), de todas as drogas aprovadas como medicamentos de 1981 a 2019, 18,9% são derivados de produtos naturais, 11,5% são imitações de produtos naturais e 3,8% são produtos naturais inalterados. Em relação aos medicamentos anticancerígenos, 81% compreendem medicamentos de imitação a produtos naturais, 43% dos medicamentos são derivados de produtos naturais, 18% produtos naturais inalterados.

2.4. Estudo de estabilidade acelerado

O objetivo de um estudo de estabilidade acelerado é sujeitar o produto a condições de armazenamento mais críticas, de modo a induzir potenciais reações e interações em um menor intervalo de tempo. Para tanto, o armazenamento do produto é realizado em temperaturas mais elevadas do que o armazenamento esperado no mercado (BRASIL, 2024).

Os estudos de estabilidade acelerados são realizados para determinar a taxa de degradação obtida com o aumento da temperatura. Em geral, a taxa de uma reação química dobra com o aumento de aproximadamente 10°C de temperatura. No entanto, em alguns casos, a degradação pode triplicar ou mesmo ser menor que o dobro (BRASIL, 2024).

Partindo de um pressuposto de média de temperatura ambiente de 30°C, o armazenamento das amostras neste estudo acelerado foi de 40°C e umidade relativa do ar de 75%.

Segundo o Guia de Validade de alimentos da ANVISA, ao obter resultados satisfatórios no estudo de estabilidade acelerado, isto é, que o produto cumpra o que lhe é determinado com segurança e qualidade asseguradas, é possível pleitear a validade com o dobro do tempo do estudo realizado, visto que será armazenado em temperatura ambiente, até que o estudo de estabilidade completo do produto – durante todo o prazo de validade pré-determinado seja apresentado (BRASIL, 2024).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antioxidante, anti-inflamatória e quimiopreventiva de câncer de infusões dos frutos de *Rubus idaeus* e *Rubus fruticosus* combinados e em monodroga, bem como a equalidade química e biológica das infusões ao submeter suas drogas vegetais a estabilidade acelerada, a fim de avaliar o tempo seguro de armazenamento e validade das drogas secas para o preparo dos chás.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a composição centesimal dos frutos secos;
- Preparar as infusões de *R. idaeus* e *R. fruticosus* em monodroga e combinadas;
- Avaliar o conteúdo de antocianinas, polifenóis, taninos e flavonóides das infusões de *R. idaeus* e *R. fruticosus* em monodroga e combinadas;
- Quantificar compostos fenólicos e flavonoides das infusões de *R. idaeus* e *R. fruticosus* em monodroga e combinadas por HPLC;
- Avaliar o potencial antioxidante das infusões de *R. idaeus* e *R. fruticosus* em monodroga e combinadas por DPPH, ABTS e FRAP;
- Avaliar a citotoxicidade infusões de *R. idaeus* e *R. fruticosus* em monodroga e combinadas;
- Avaliar a atividade antioxidante das infusões de *R. idaeus* e *R. fruticosus* em monodroga e combinadas *in vitro*;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória das infusões de *R. idaeus* e *R. fruticosus* em monodroga e combinadas *in vitro*;
- Avaliar a atividade quimiopreventiva de câncer das infusões de *R. idaeus* e *R. fruticosus* em monodroga e combinadas *in vitro*;
- Avaliar a estabilidade de compostos fenólicos e flavonóides das infusões de *R. idaeus* e *R. fruticosus* em monodroga e combinadas por HPLC após submeter as drogas à incubação no modelo de estabilidade acelerada;
- Avaliar a segurança microbiológica das infusões após submeter as drogas à incubação no modelo de estabilidade acelerada;
- Avaliar as características sensoriais das amostras durante estabilidade.

4. REFERÊNCIAS I

ALBERT C et al. 2022. Study of antioxidante activity of Garden blackberries (*Rubus fruticosus* L.) extracts obtained with different extraction solvents. Applied Sciences 12(1), 4004-4019.

ANDERSON M, ROTHERAY EL, MATHEWS F. 2023. Marvellous moths! Pollen deposition rate of bramble (*Rubus futicosus* L. agg.) is greater at night than day. PLoS ONE 18(3).

ANDRIKOPOULUS CJ E CANE JH. 2018. Comparative pollination efficacies of five bee species on raspberry. Journal of economic entomology 116(6), 2513-2519.

ATTIA RT, ET AL. 2019. Raspberry ketone and *Garcinia Cambogia* rebalanced disrupted insulin resistance and leptin signaling in rats fed high fat fructose diet. Biomedicine & Pharmacotherapy 110(1), 500-509.

BARROSO MES ET AL. 2019. Phytochemical profile of genotypes of *Euterpe edulis* Martius – Juçara palm fruits, Food Research International 116(1) 985-993.

BIBI S, DU M, ZHU M. 2018. Dietary Red Raspberry Reduces Colorectal Inflammation and Carcinogenic Risk in Mice with Dextran Sulfate Sodium–Induced Colitis. The journal of Nutrition 148(1), 667-674.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. 2006. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, 60p, 1º ed – Brasília: Ministério da Saúde. 2006a.

BRASILb. Poder Legislativo. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília. 2006b.

BRASIL. Poder Legislativo. Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015. Dispõe sobre o patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria MAPA nº 123, de 13 de março de 2021. Estabelece os padrões de identidade e qualidade para bebida composta, chá pronto para o consumo, refresco, refrigerante, soda e, quando couber, os respectivos preparados sólidos e líquidos. Gabinete da Ministra, Brasília, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 159, de 1 de julho de 2022. Estabelece as listas de partes de espécies vegetais autorizadas para o preparo de chás e para o uso como especiarias. Diário Oficial da União nº156, de 6 de julho de 2022, Brasília. 2022.

COATES JM, BROWN J, CUNNINGHAM SA. 2022. Wild bees nest in the stems of cultivates *Rubus* plants and act as effective crop pollinators. 325, 107741. ISSN 0167-8809.

D'ANGELO RW et al. 2020. UPLC-QToF-MS Characterization of Blackberry extracts of cultivars 'Tupy', 'Guarani', and 'Xavante': Development of extract-loaded niosomes. *Revista Brasileira de farmacognosia* 30(1), 519-527.

FREIRE DRGC et al. 2022. Cancer chemopreventive and antioxidant activities of seed, skin, and pulp of Maximo hybrid grapes (IAC 138-22) at five different ripening stages. *Ciência Rural* 52(3).

GARCÍA AV et al. AB. 2020. Authentication of "Adelita" Raspberry Cultivar Based on Physical Properties, Antioxidant Activity and Volatile Profile. *Antioxidants* 9(1), 593-607.

GIL-MARTÍNEZ L et al. 2023. Phytochemicals determination and antioxidante, antimicrobial, anti-inflammatory and anticâncer activities of blackberry fruits. *Foods* 12(1), 1505-1522.

HUSSAIN T, et al. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:7432797.

KELLOFF GJ, et al. 1994. Mechanistic consideration in chemopreventive drug development. *J. Cell.Biochem. Suppl.*, 20(1), 1 – 24.

KELLOFF GJ, Hawk ET, Sigman CC. 2005. Totowa. Human Press 2(1), 3 – 37.

KINGHORN AD, et al. 2004. Natural inhibitors of carcinogenesis. *Planta Medica* 70(1) 691 – 705.

LI X. et al. 2021. Potencial metabolic activities of raspberry ketone. *Journal of Food Biochemistry* 46(1), 1-10.

LOPEZ-CORONA AV. et al.. 2022. Antioxidant, Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activity of Phenolic Compound Family Extracted from Raspberries (*Rubus idaeus*): A General Review. *Antioxidants* 11(1), 1192-1211.

MACGREGOR C, SCOTT-BROWN AS. 2020. Nocturnal pollination: an overlooked ecosystem service vulnerable to environmental change. *Emerging Topics in Life Sciences* 4(1), 19-32.

MAN, M.-Q. et al. Regulatory Role of Nitric Oxide in Cutaneous Inflammation. *Inflammation*, 30 jun. 2022. v. 45, n. 3, p. 949–964.

MATTILA JT, AND THOMAS AC. 2014. Nitric oxide synthase: Non-canonical expression patterns. *Frontiers in Immunology* 5: 478.

MASSION PB, et al. 2003. Nitric oxide and cardiac function: Ten years after, and continuing. *Circulation Research* 93 (5): 388–398.

MONTANARI C, et al. 2023. Survival, growth, and biogenic amine production of *Enterococcus faecium* FC12 in response to extracts and essencial oils of *Rubus fruticosus* and *Juniperus oxycedrus*. *Frontiers in Nutrition* 9(1).

NEWMAN DJ e CRAGG GM. 2020. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products* 83(3), 770-803.

OLIVEIRA BG, et al. 2020. Phenolic and glycidic profiling of bananas *Musa* sp associated with maturation stage and cancer chemoprevention activities. *Microchemical Journal* 153 (1).

PEZZUTO JM, et al. 2005. In *Cancer Chemoprevention (2): Strategies for Cancer Chemoprevention*.

PIÑA-CONTRERAS N, et al. 2022. Raspberry (*Rubus idaeus* L.), a Promising Alternative in the Treatment of Hyperglycemia and Dyslipidemias. *Journal of Medicinal Food* 25(2), 121-129.

POPA-WAGNER A., et al. ROS e doenças cerebrais: o bom, o mau e o feio. *Medicina oxidativa e longevidade celular*. 2013;2013:14.

RATTANAWIWATPONG P, et al. 2020. Anti-aging and brightening effects of a topical treatment containing vitamin C, vitamin E, and raspberry leaf cell culture extract: A split-face, randomized controlled trial. *Journal of Cosmetic Dermatology* 19(3), 671-676.

RIPPIN, SHARMA AK, BENIWAL V. 2023. Reconnoitring the antioxidant and antibacterial potential of different fruits after tannin acyl hydrolase mediated biotransformation. *Biotechnology applied biochemistry*, 1-11.

SOBEH M, et al. 2020. A Polyphenol-Rich Fraction from *Eugenia uniflora* Exhibits Antioxidant and Hepatoprotective Activities In Vivo. *Pharmaceuticals* 13(5), 84.

SONG B, ZHENG B, LI T, LIU RH. 2020. Raspberry extract ameliorates oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* via the SKN-1/Nrf2 pathway. *Journal of Functional Foods* 70(1).

SPORN MB. 1991. Carcinogenesis and cancer: different perspectives on the same disease. *Cancer Research* 51(1), 6215 – 6218.

SPORN MB, SUH N. 2000. Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis* 21(1), 525 – 530.

SIEGEL RL, MILLER KD, EAGLE NS, JEMAL A. 2023. Cancer statistics. *Cancer Journal for Clinicians* 73(1), 17-48.

SUNG H. 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: Cancer Journal for Clinicians* 71(3), 209-249.

TAO Y et al. 2023. Ethnopharmacology of *Rubus idaeus* Linnaeus: A critical review on ethnobotany, processing methods, phytochemicals, pharmacology and quality control. *Journal of Ethnopharmacology*. 10(1), 302.

TAYLOR DM, Werneke U. 2018. Ethnopharmacology. *Nordic Journal of Psychiatry* 72(1), 30-32.

URAMARU N, et al. 2023. Rhododendrol, a reductive metabolite of raspberry ketone, suppresses the differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes, *Molecular medicine reports* 27(1), 51-59.

WATTEENBERG LW. 1985. Chemoprevention of cancer. *Cancer Research* 45(1), 1 – 8.

WHO - World Health Organization. 1978. International Conference on Primary Health Care, Alma-Ata, USSR.

WHO – World Health Organization. 2023. Future trends about cancer. Available on < <https://www.paho.org/en/campaigns/world-cancer-day-2023-close-care-gap#:~:text=Globally%2C%20there%20were%20an%20estimated,health%20systems%2C%20people%20and%20communities> >

WU Y, et al. 2023. Analysis of flavonoid-related metabolites in different tissues and fruit developmental stages of blackberry based on metabolome analysis. *Food Research International* 163 (1), 112313.

5. CAPÍTULOS

5.1. CAPÍTULO I

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE e ANTI-INFLAMATÓRIA DA INFUSÃO DE *Rubus idaeus* e *Rubus fruticosus* EM MONODROGA E COMBINADAS

RESUMO

Rubus fruticosus e *Rubus idaeus* são espécies cujos frutos, amora-preta e a framboesa, respectivamente, possuem notáveis propriedades bioativas. Essas frutas são amplamente consumidas na forma de chás, frequentemente comercializados como “chá de frutas vermelhas” e promovidos com alegações de alto potencial antioxidante. No entanto, a maioria dos estudos que comprovam suas atividades bioativas se baseiam no uso das folhas como monodrogas. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante, anti-inflamatória e quimiopreventiva de câncer de infusões dos frutos de *R. idaeus* e *R. fruticosus*, tanto isoladamente (monodrogas) quanto em combinações. Os frutos congelados foram adquiridos de fornecedor qualificado e submetidos a secagem nos tempos 24, 48 e 96 horas sendo avaliados parâmetros de umidade relativa, atividade antioxidante (DPPH) e teor de antocianinas para definir o tempo de secagem ideal para os experimentos. Após essa etapa, foi determinada a composição centesimal dos frutos secos e então preparadas as infusões na concentração de 13,33 mg/mL com tempo de infusão de 5 minutos. Foram testadas infusões individuais de *R. idaeus* e *R. fruticosus* como monodrogas e três combinações dessas. As análises químicas incluíram a determinação total de antocianinas, flavonoides, polifenóis e taninos por métodos espectrofotométricos. A determinação de compostos fenólicos e flavonoides também foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A capacidade antioxidante foi avaliada por ensaios químicos pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP. Além disso, a atividade biológica foi investigada *in vitro* por meio de ensaios de citotoxicidade, redução de óxido nítrico e ânion superóxido, redução de citocinas inflamatórias, efeito protetor contra peróxido de hidrogênio e indução de quinona redutase. Os resultados indicaram que todas as infusões apresentaram atividades antioxidante e anti-inflamatória, com efeitos mais expressivos para as monodrogas em determinados parâmetros, como a *R. idaeus*, que apresentou maior inibição do ânion superóxido, enquanto *R. fruticosus* foi a única amostra a apresentar efeito protetivo contra peróxido de hidrogênio. Foi observado maiores atividades anti-inflamatórias também para as infusões de espécies isoladas, a saber, *Rubus fruticosus* sendo capaz de reduzir a expressão de citocinas IL-1 em 43% e *R. idaeus* como a amostra que mais reduziu óxido nítrico. Os achados deste estudo reforçam o potencial bioativo das infusões de *R. idaeus* e *R. fruticosus*, especialmente na modulação do estresse oxidativo e da inflamação, sendo mais ativas as suas infusões como monodrogas. A relevância dos efeitos observados, particularmente para as monodrogas, sugere a necessidade de estudos adicionais para explorar sua aplicabilidade terapêutica, incluindo investigações em modelos *in vivo* e ensaios clínicos. Além disso, considerando o uso popular dessas infusões e seu potencial funcional, pesquisas futuras poderiam avaliar a inclusão destas espécies na Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, bem como avaliar biodisponibilidade dos compostos bioativos e a estabilidade dessas substâncias a longo prazo e durante o processamento industrial.

PALAVRAS-CHAVES: *Rubus idaeus*, *Rubus fruticosus*, antioxidante, anti-inflamatório, quimioprevenção.

ABSTRACT

Rubus fruticosus and *Rubus idaeus* are species whose fruits, blackberry and raspberry, respectively, have remarkable bioactive properties. These fruits are widely consumed in the form of infusions, often marketed in Brazil as “red fruit tea” and promoted with claims of high antioxidant potential. However, most studies that prove their bioactive activities are based on the use of the leaves as monodrugs. This study aimed to evaluate the antioxidant, anti-inflammatory and cancer chemopreventive activity of infusions of *R. idaeus* and *R. fruticosus*, both alone (monodrugs) and in combinations. The samples were purchased from a qualified supplier and moisture, antioxidant (DPPH) and anthocyanin content analyses were performed to define the ideal drying time for the experiments (24, 48 and 96h). After this step, the centesimal composition of the dried fruits was determined and then infusions were prepared at a concentration of 13.33 mg/mL with an infusion time of 5 minutes. Individual infusions of *R. idaeus* and *R. fruticosus* were tested as monodrugs and three combinations of these. Chemical analyses included the determination of total anthocynins, flavonoids, polyphenols and tannins by spectrophotometric methods. The determination of phenolic compounds and flavonoids was also performed by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). The antioxidant capacity was evaluated by chemical assays using the ABTS, DPPH and FRAP methods. In addition, biological activity was investigated *in vitro* by means of cytotoxicity, reduction of nitric oxide and superoxide anion, reduction of inflammatory cytokines, protective effect against hydrogen peroxide and induction of quinone reductase. The results indicated that all infusions presented antioxidant and anti-inflammatory activities, with more expressive effects for the monodrugs in certain parameters, such as *R. idaeus*, which presented greater inhibition of superoxide anion, while *R. fruticosus* was the only sample to present a protective effect against hydrogen peroxide. Greater anti-inflammatory activities were also observed for the infusions of isolated species, namely, *Rubus fruticosus* being able to reduce the expression of IL-1 cytokines by 43% and *R. idaeus* as the sample that most reduced nitric oxide. The findings of this study reinforce the bioactive potential of infusions of *R. idaeus* and *R. fruticosus*, especially in the modulation of oxidative stress and inflammation, with their infusions being more active as monodrugs. The relevance of the observed effects, particularly for monodrugs, suggests the need for further studies to explore their therapeutic applicability, including investigations *in vivo* models and clinical trials. Furthermore, considering the popular use of these infusions and their functional potential, future research could evaluate the inclusion of these species in the National Policy for Medicinal Plants and Phytotherapeutics, as well as assess the bioavailability of bioactive compounds and the stability of these substances in the long term and during industrial processing.

KEYWORDS: *Rubus idaeus*, *Rubus fruticosus*, antioxidant, anti-inflammatory, chemoprevention.

5.1.1. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1.1. Desenho do capítulo I

Trata-se de um estudo experimental *in vitro* em cultura celular para avaliação de atividade antioxidante e anti-inflamatória de infusões de *Rubus idaeus* e *Rubus fruticosus* em monodroga e combinadas submetidos ao delineamento simplex centroide (CORNELL, 2002) (**Tabela 5** e **Figura 3**).

Tabela 5. Amostras pelo delineamento simplex-centroide

	<i>Rubus idaeus</i>	<i>Rubus fruticosus</i>
AMOSTRA I (I)	100%	-
AMOSTRA II (F)	-	100%
AMOSTRA III (FI)	50%	50%
AMOSTRA IV (F7I3)	30%	70%
AMOSTRA V (F3I7)	70%	30%



Figura 3. Delineamento simplex-centroide

Foram preparadas cinco amostras, sendo elas: extrato aquoso obtido por infusão de *R. idaeus* a 13,33 mg/mL (I); extrato aquoso obtido por infusão de *R. fruticosus* a 13,33 mg/mL (F); extrato aquoso obtido por infusão de *R. idaeus* e *R. fruticosus* a 13,33 mg/mL na proporção 1:1 (FI); extrato aquoso obtido por infusão de *R. fruticosus* e *R. idaeus* a 13,33 mg/mL na proporção 7:3, respectivamente (F7I3); extrato aquoso obtido por infusão de *R. fruticosus* e *R. idaeus* a 13,33 mg/mL na proporção 3:7, respectivamente (F3I7) (**Tabela 5**).

A partir da obtenção das amostras descritas, foram realizados ensaios químicos de determinação de flavonoides, polifenóis, taninos, compostos fenólicos, composição centesimal, atividade antioxidante e ensaios e cultura de células conforme o desenho do estudo (**Figura 4**).

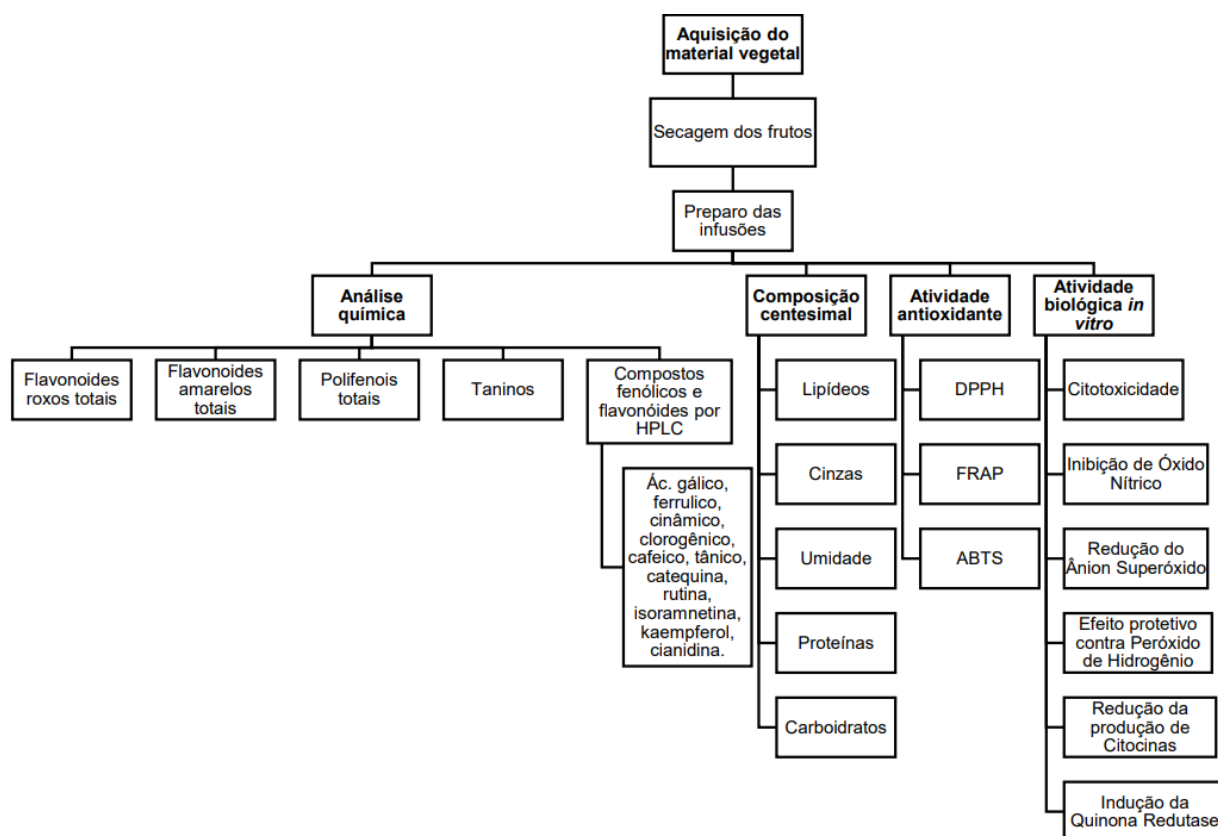


Figura 4. Desenho do capítulo I

5.1.1.2. Material vegetal

5.1.1.2.1. Aquisição

O material vegetal de *R. fruticosus* e *R. idaeus* foi adquirido in natura, submetido a técnica de conservação de congelamento, da empresa Demarchi®, identificados e documentados através de laudos de controle de qualidade (**material suplementar 1**).

5.1.1.2.2. Secagem

O material foi seco em estufa com circulação de ar a 60 °C de acordo com Silva e colaboradores (2021) por 24 horas. Para determinar o tempo de secagem, foram realizadas análises de determinação de umidade conforme procedimento de determinação de água em drogas vegetais da Farmacopéia Brasileira pelo método gravimétrico (BRASIL, 2019), atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre DPPH conforme Scherer e Godoy (2009) e quantificação de antocianinas pelo método de diferença de pH de acordo com Giusti e Wrolstad (2001) em três tempos de secagens diferentes, 24 horas, 48 horas e 96 horas.

Para a determinação de umidade foi utilizada a droga vegetal in natura congelada. Após as amostras secarem, foram utilizadas para a determinação de antocianinas como extrato aquoso a frio a 13,33 mg/mL e para os ensaios de DPPH foram realizados os chás das drogas vegetais a 13,33 mg/mL.

5.1.1.2.3. Preparo dos infusos

As amostras foram preparadas na proporção de 2 gramas dos frutos secos para 150 mL de água por infusão de 5 minutos, recomendação média indicada pelo Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira para infusões de frutos (BRASIL, 2021), resultando em uma concentração de 13,33 mg/mL.

Foram feitas as infusões de *R. fruticosus* e *R. idaeus* na concentração de 13,33 mg/mL, e posteriormente realizada as diluições para a aquisição das demais amostras e aliqüotadas em microtubos de 4 mL, obtendo em cada frasco: No frasco da amostra “I”, 100% de *R. idaeus* e 0% *R. fruticosus*, no frasco da amostra “F” 100% de *R. fruticosus* e 0% de *R. idaeus*, no frasco da amostra “FI” 50% de *R. idaeus* e 50% de *R. fruticosus*, no frasco da amostra “F3I7” 70% de *R. idaeus* e 30% de *R. fruticosus* e no frasco da amostra “F7I3” 70% de *R. fruticosus* e 30% de *R. idaeus*.

As alíquotas foram armazenadas em freezer a -80°C até a realização dos experimentos de antocianinas, polifenóis, taninos, flavonóides e atividade antioxidante DPPH, FRAP e ABTS. Para os experimentos em cultura de células e cromatografia líquida foram realizadas infusões novas no momento antes das análises. Todas as infusões foram realizadas com o mesmo lote das drogas vegetais.

5.1.1.3. Composição centesimal

5.1.1.3.1. Umidade

A determinação de umidade foi realizada de acordo com metodologia de análise de drogas vegetais da 6ª edição da Farmacopéia Brasileira, de acordo com o método gravimétrico, em que as amostras foram reduzidas por corte de forma a limitar a dimensão a aproximadamente 3 mm de espessura, pesado em torno de 2 gramas e transferidas para pesa-filtro previamente pesado e dessecado nas mesmas condições da amostra, durante 30 minutos. Foi transferido para estufa de ventilação forçada a 105°C por cinco horas até peso constante. Foi calculado a porcentagem de água em relação à droga úmida ao ar (BRASIL, 2019). Este ensaio foi realizado em triplicata das amostras recebidas (frutos in natura congelados) de *R. idaeus* e *R. fruticosus*.

5.1.1.3.2. Cinzas

A determinação de cinzas totais foi realizada de acordo com metodologia de análise de drogas vegetais da 6ª edição da Farmacopéia Brasileira, em que foram pesadas cerca de 3 g da amostra seca e incinerado aumentando a temperatura gradativamente até no máximo $600 \pm 50^{\circ}\text{C}$, sendo 30 minutos a 200°C , 60 minutos a 400°C e 90 minutos a 600°C , até que todo carvão foi eliminado. Ao término do ensaio, as amostras foram colocadas no dessecador e pesadas e o cálculo foi realizada em porcentagem de cinzas em relação à droga seca (BRASIL, 2019). Este ensaio foi realizado em triplicata das amostras secas de *R. idaeus* e *R. fruticosus*.

5.1.1.3.3. Lipídios

A determinação de lipídios foi realizada pelo método de extração direta em Soxhlet de acordo com método padronizado da Associação Oficial de Química Analítica, com adaptações. Foram pesadas cerca de 2 g das amostras secas em cartucho de Soxhlet e transferidas para o aparelho extrator tipo Soxhlet. Foram acoplados copos do extrator dessecados a 105°C e tarados, adicionado hexano e foi mantido sob aquecimento por cerca de 8 horas ou até secar o hexano e a gordura se tornar visível no copo. O copo foi retirado e resfriado em dessecador, pesado e foi realizado o cálculo conforme **Equação 1** (AOAC, 1995). Este ensaio foi realizado em triplicata das amostras secas de *R. idaeus* e *R. fruticosus*.

Equação 1. Cálculo de lipídios ou extrato etéreo

$$\text{Lipídeos} \left(\% \frac{m}{m} \right) = \frac{100 \times N}{P}$$

Onde: N= Peso de lipídios presentes no copo (diferença do peso do copo final e inicial); P = peso da amostra em gramas.

5.1.1.3.4. Proteínas

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995) modificado de acordo com Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). As amostras foram pesadas cerca de 1 g cada e transferidas para o tubo do digestor, onde foi adicionado 25 mL de ácido sulfúrico e 6 g de mistura catalítica para a digestão, que levou cerca de 12 horas em aquecimento constante, até se tornar uma solução azul-esverdeada e livre de material não digerido. Após esfriado, cada tubo foi transferido para o

destilador. Foi adicionado 25 mL de solução de ácido bórico 0,033M em frasco Erlenmeyer com 4 gotas de indicador vermelho de metila 1% e acoplado ao destilador. Foi adicionado cerca de 25 mL de solução de hidróxido de sódio 30% no destilador, acionado a ebulição e aberto a válvula de vazão do hidróxido de sódio 30% até que o líquido ficasse preto, momento em que a ebulição do destilador era desligada, retirado o destilado no frasco Erlenmeyer e levado diretamente para titulação manual usando ácido clorídrico 0,1 M como titulante e indicador vermelho de metila 1%. O teor de proteínas foi calculado conforme **Equação 2**. Este ensaio foi realizado em triplicata das amostras secas de *R. idaeus* e *R. fruticosus*.

Equação 2. Cálculo de proteínas pelo método Kjeldahl modificado

$$Protídeos \left(\% \frac{m}{m} \right) = \frac{V \times 0,14 \times fc \times f}{P}$$

Onde: V= volume de ácido clorídrico 0,1 M gasto na titulação; fc = fator de correção do ácido clorídrico (1,103); f= fator de conversão para o tipo de amostra (6,25); P = peso da amostra em gramas.

5.1.1.3.5. Carboidratos

A determinação de carboidratos foi realizada pelo método de diferença entre 100 e a soma do conteúdo de proteínas, lipídios, umidade e cinzas, de acordo com a Associação Oficial de Química Analítica (AOAC, 1995).

5.1.1.4. Flavonoides totais roxos: Antocianinas

A determinação do total de antocianinas monoméricas foi realizada pelo método de diferença de pH e mensurada por espectrofotometria UV-Visível de acordo com Giusti e Wrolstad (2001). As amostras foram diluídas 10 vezes para estar dentro do intervalo linear do espectrofotômetro. As diluições foram feitas em tampão de cloreto de potássio 0,025M pH 1,0 e tampão de acetato de sódio 0,4M pH 4,5. Esperou-se 40 minutos para a extração das antocianinas e início das leituras, que foram realizadas a 520nm e 700nm por espectrofotômetro UV/Vis (Tecnal®, Metash, China). Foi realizado o cálculo de diferença das absorbâncias encontradas (**Equação 3**) e então calculado o conteúdo total de antocianinas (**Equação 4**). Foi considerado o teor do pigmento como cianidina-3-glicosídeo, visto que é a principal forma de antocianina encontrada em frutos amora e framboesa (Mota, 2006). Este ensaio foi realizado em

triplicata (n=3) das amostras secas de *R. idaeus* e *R. fruticosus* e das infusões F, I, FI, F3I7 e F7I3.

Equação 3. Cálculo de diferença de absorbância para teor de antocianinas

$$A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH\ 1.0} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH\ 4.5}$$

Onde: A= absorbância.

Equação 4. Cálculo do conteúdo total de antocianinas

$$\text{Antocianina } \left(\frac{mg}{l}\right) = \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\epsilon}$$

Onde: A= diferença das absorbâncias resultadas pela equação 1; MW= Peso molecular da cianidina-3-glicosídeo (449,2 g/mol); DF= Fator de diluição da amostra (10); ϵ = Coeficiente de extinção molar da cianidina-3-glicosídeo (26900 L/mol.cm).

5.1.1.5. Polifenóis totais

A análise do teor de polifenóis totais e taninos totais dos infusos das monodrogas e combinações foi realizada conforme metodologia da Farmacopéia Brasileira para *Phyllanthus niruri* L., modificada por Krepsky e colaboradores (2012). Em microplaca de 96 poços e lidos por espectrofotômetro de microplacas Multiskan SkyHigh UV/Vis (thermoscientific®, Estados Unidos), foram adicionados 25µl de amostra, 10µl de folin-ciocalteu 10% e 215µl de carbonato de sódio 10,6% (p/v), foi esperado 3 minutos e realizado a leitura em 715 nm. O resultado foi calculado baseado na curva padrão de polifenóis, realizada com ácido gálico (BRASIL, 2024). Este ensaio foi realizado em triplicata (n=3) das infusões F, I, FI, F3I7 e F7I3.

5.1.1.6. Taninos totais

Para a quantificação de taninos totais foi empregada a mesma metodologia de polifenóis, mas com a adição de 5 mg de polivinilpirrolidona (PVPP) junto com as amostras para adsorção dos taninos e consequentemente sua precipitação. Após este passo, foi seguida a mesma metodologia de polifenóis, conforme Farmacopéia Brasileira para *Phyllanthus niruri* L., modificada por Krepsky e colaboradores (2012). O resultado calculado corresponde a diferença da absorbância dos polifenóis totais e não precipitados. Para confirmação de taninos, foi realizada nova curva de calibração com ácido tânico. Foi lido por espectrofotômetro de microplacas Multiskan SkyHigh

UV/Vis (thermoscientific®, Estados Unidos). Este ensaio foi realizado em triplicata (n=3) das infusões F, I, FI, F3I7 e F7I3.

5.1.1.7. Flavonoides totais amarelos

A análise de teor de flavonóides amarelos totais foi realizada de acordo com Xu e Chang (2017) com modificações. Em microplaca de 96 poços foram adicionados 180 µl de amostra, 15 µl de nitrito de sódio 2,5%, aguardou 6 minutos e foram adicionados 15 µl de cloreto de alumínio 10%. Após 5 minutos foram adicionados 50 µl de hidróxido de sódio 1M e foi realizado a leitura a 415 nm após 10 minutos em espectrofotômetro de microplacas Multiskan SkyHigh UV/Vis (Thermoscientific®, Estados Unidos). O resultado foi calculado baseado na curva padrão de quercetina. Este ensaio foi realizado em triplicata (n=3) das infusões F, I, FI, F3I7 e F7I3.

5.1.1.8. Teor de compostos fenólicos e flavonoides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A identificação e quantificação de compostos fenólicos e flavonoides nas infusões foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplada a detectores Ultravioleta (UV) e de Matriz de Diodos (DAD). Os compostos fenólicos analisados foram ácido gálico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, ácido clorogênico, ácido cafeico e taninos (representados pelo ácido tânico), enquanto os flavonoides analisados foram catequina e cianidina. Todos os padrões utilizados para construção das curvas analíticas e os reagentes de grau HPLC para a fase móvel foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (Steinheim, Alemanha).

Foram preparadas soluções-mãe de 10 mg/mL de cada padrão, diluídas em metanol, e posteriormente utilizadas para a construção das curvas analíticas, cujas concentrações variaram de 10 a 500 µg/mL (n = 12 pontos). As amostras F, I, FI, F3I7 e F7I3 foram preparadas por infusão a 13,33 mg/mL e filtradas em filtros PTFE hidrofílico (diâmetro 13 mm, poro 0,45 µm, Analítica, China). Foram injetados 10 µL de cada amostra por corrida no sistema HPLC-DAD, utilizando as mesmas condições empregadas para a análise dos padrões.

A separação cromatográfica foi realizada em sistema gradiente, utilizando como fase móvel água acidificada com ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% e acetonitrila, sendo utilizado metanol para a limpeza entre as análises, conforme metodologia descrita por Al-Taie et al. (2018), com modificações. Antes da injeção no sistema

cromatográfico, as fases móveis foram submetidas a ultrassonificação em banho ultrassônico Elmasonic Easy 180H (Elma®, Portugal) por 30 minutos a 25°C, de acordo com Al-Taie et al. (2018). O gradiente linear do solvente A foi ácido trifluoroacético (TFA) a 0,1% em água deionizada programada de 0% A - 100% A por 10 minutos, enquanto solvente B foi um gradiente de acetonitrila programado de 0% B - 100% B por 2 minutos, em seguida foi passado um gradiente dos solventes A e B 1:1 por 2 minutos, seguido para 60 segundos de corrida apenas com o solvente A e por último o gradiente C, metanol, por 1 minuto. A taxa de fluxo adotada foi de 1 mL/min e as corridas foram programadas a 280 nm para ácidos fenólicos e 254nm para flavonoides. As mesmas condições de análise foram utilizadas tanto para as amostras quanto para os padrões, sendo realizadas três injeções por vial. A separação foi realizada em uma coluna de fase reversa Phenomenex C18 (100×4,6 mm D.I, tamanho de partícula de 3 µm) com 18 carbonos. A identificação dos compostos foi feita com base nos espectros UV, considerando os limites de detecção (LD), e a quantificação foi realizada com base nas curvas analíticas e nos limites de quantificação (LQ), conforme apresentado na **Tabela 6**.

As análises foram realizadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) Agilent 1260 Infinity II (Agilent®, Estados Unidos) acoplado a um detector DAD. A aquisição e processamento dos dados cromatográficos foram realizados por meio do software OpenLab (versão 3.6).

Para a análise estatística, foi realizado cálculo de regressão linear, calculando-se a equação da reta (curva analítica) e o coeficiente de determinação (r^2), sendo adotada a recomendação do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) de coeficiente aceitável $>0,9$ (Brasil, 2003), estabelecendo nível de confiança de 95%. Para garantir a confiabilidade da detecção e quantificação através do método empregado, foram calculados os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) baseados em parâmetros da curva analítica e de regressão linear, sendo os cálculos de LD e LQ conforme **equações 5 e 6**, respectivamente (Aragão, Veloso, Andrade, 2009). Todos os cálculos deste método foram realizados no software Microsoft Excel®.

Tabela 6. Curvas analíticas, r^2 , limites de detecção e quantificação dos padrões.

Padrões	r^2	Curva analítica (CLAE – UV/Vis)	LQ	LD
Ác. Gálico	0,9891	$y = 30,327x - 25,742$	7,824 µg/mL	2,582 µg/mL
Ác. Cafeico	0,9811	$y = 30,327x - 25,742$	79,729 µg/mL	26,310 µg/mL
Ác. Ferrulico	0,9862	$y = 4,0958x + 1,1239$	10,847 µg/mL	3,579 µg/mL
Ác. Clorogênico	0,9799	$y = 0,7319x - 8,6262$	67,179 µg/mL	22,169 µg/mL
Ác. Cinâmico	0,9992	$y = 5,3504x - 4,2707$	11,378 µg/mL	3,754 µg/mL
Catequina	0,9881	$y = 0,561x + 3,568$	78,318 µg/mL	25,845 µg/mL
Cianidina	0,9884	$y = 3,7024x + 71,958$	85,993 µg/mL	28,378 µg/mL
Ác. Tânico	0,9878	$y = 0,6789x + 62,539$	108,371 µg/mL	35,762 µg/mL

y:área de pico; x:concentração (µg mL), r^2 :coeficiente de determinação.

Equação 5. Cálculo do Limite de Quantificação (LQ)

$$LQ = 10 \times (s \div a)$$

Onde: s = estimativa do erro padrão do coeficiente linear da equação; a = coeficiente angular da curva analítica.

Equação 6. Cálculo do Limite de Detecção (LD)

$$LD = 3,3 \times (s \div a)$$

Onde: s = estimativa do erro padrão do coeficiente linear da equação; a = coeficiente angular da curva analítica.

5.1.1.9. Potencial antioxidante pela captura do radical DPPH

A determinação do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) foi realizada pelo método estabelecido por Scherer e Godoy (2009). Foram adicionados 20 µl das infusões a 13,33 mg/mL e 280 µl da solução de DPPH na concentração de 40 µg/mL em metanol em microplaca de 96 poços. Foi aguardado a reação por 60 minutos e lido a 517nm por espectrofotômetro de microplacas Multiskan SkyHigh UV/Vis (Thermoscientific®, Estados Unidos). Os resultados foram expressos em IC₅₀

(concentração que inibe 50% dos radicais livres), que foi calculado através da equação da reta obtida com diferentes concentrações da amostra dentro da faixa de linearidade da curva de calibração. Foram realizados ensaios com as amostras F, I, FI, F3I7 e F7I3 em triplicata (n=3).

5.1.1.10. Potencial antioxidante pelo sequestro do radical ABTS

A determinação do sequestro do radical livre 2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) foi determinada pelos métodos colorimétricos do sequestro do radical livre ABTS a 734 nm (Re et al., 1999, modificado). Foram adicionados 30 µl das infusões a 13,33 mg/mL e 270 µl da solução de ABTS em microplaca de 96 poços. Foi aguardado a reação por 6 minutos e lido por espectrofotômetro de microplacas Multiskan SkyHigh UV/Vis (Thermoscientific®, Estados Unidos). Os resultados foram expressos em IC₅₀ (concentração que inibe 50% dos radicais livres) e calculado através da equação da reta obtida com diferentes concentrações da amostra dentro da faixa de linearidade da curva de calibração. Foram realizados ensaios com as amostras F, I, FI, F3I7 e F7I3 em triplicata (n=3).

5.1.1.11. Potencial antioxidante pela redução do ferro (FRAP)

A metodologia "Ferric Reducing Antioxidant Power" (FRAP) se baseia na capacidade redutora do íon Fe³⁺ para o íon Fe²⁺, baseada no método determinado por Benzie et al. (1996) com modificações. Esta reação ocasiona uma mudança na tonalidade da solução reagente, passando de roxo claro para um roxo mais intenso em um comprimento de onda a 595nm. Foram adicionados 30 µl das infusões a 13,33 mg/mL e 270 µl da solução de FRAP, que consiste na mistura dos reagentes tampão de acetato de sódio 0,3M, TPTZ em HCl 40mM, cloreto férrico 20mM na proporção de 10:1:1, respectivamente. O experimento reagiu por 10 minutos e foi realizada a leitura por espectrofotômetro de microplacas Multiskan SkyHigh UV/Vis (Thermoscientific®, Estados Unidos). Os resultados foram expressos em IC₅₀ (concentração que inibe 50% dos radicais livres), calculado através da equação da reta obtida com diferentes concentrações da amostra dentro da faixa de linearidade da curva de calibração. Foram realizados ensaios com as amostras F, I, FI, F3I7 e F7I3 em triplicata (n=3).

5.1.1.12. Atividades bioativas em cultura celular

5.1.1.12.1. Citotoxicidade

Foi realizado ensaio de citotoxicidade celular pelo método colorimétrico MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]), que consiste na redução deste sal a cristais de formazana, ao entrar na mitocôndria celular e sofrer redução pela enzima succinato desidrogenase, de coloração azul. Foram utilizadas culturas de células fibroblastos L929, macrófagos RAW 264.7 e J774A.1; As células foram incubadas overnight na concentração de 70.000 células/mL, após foram adicionadas as amostras nas concentrações de 13,33 mg/mL, 6,66 mg/mL, 3,33 mg/mL, 1,66 mg/mL e 0,83 mg/mL por 24h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após, a cultura foi incubada com o MTT por 2h. O excesso de MTT foi aspirado e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido). A absorbância proporcional ao número de células viáveis foi medida em 595 nm usando um espectrofotômetro de microplacas Multiskan SkyHigh UV/Vis (Thermoscientific®, Estados Unidos). (Mosmann, 1983). Foram realizados ensaios com as amostras F, I, FI, F3I7 e F7I3 em triplicata (n=3).

5.1.1.12.2. Redução da produção de Óxido Nítrico (NO)

O ensaio de quantificação de nitrito foi realizado com células RAW 264.7, em que as células foram plaqueadas sob uma concentração de 5×10^4 a $6,5 \times 10^4$ células/mL e incubadas por 24 h, sendo utilizado meio de cultura sem fenol. Ao atingirem 70% a 80% de confluência, foram adicionados os tratamentos e após uma hora foram estimuladas a inflamação com lipopolissacarídeo (LPS) a 1 µg/mL, ficando incubadas sob exposição ao LPS por 24 h. O sobrenadante celular foi então retirado e realizado a quantificação de nitrito pela adição da solução de Greiss (sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% e diidrocloreto de naftiletlenodiamina 0,1 % em água na proporção de 1:1). Foi realizado uma curva padrão de nitrito de sódio e usado citrato de L-NG-monometil arginina (L-NMMA) como controle positivo. A quantificação ocorreu pela leitura da placa no espectrofotômetro de microplacas Multiskan SkyHigh UV/Vis (Thermoscientific®, Estados Unidos) a 540nm (GUIDONI et al., 2023, MAIA et al., 2010). Os resultados foram expressos em concentração de óxido nítrico. Foram realizados ensaios com as amostras F, I, FI, F3I7 e F7I3 em triplicata (n=3).

5.1.1.12.3. Redução do ânion superóxido (O₂^{•-})

O ensaio da avaliação da redução do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) foi utilizado para determinar o efeito das infusões sobre a inibição do radical superóxido em cultura de macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS conforme Choi e colaboradores (2006). As células foram plaqueadas sob uma concentração de 5×10^4 a $6,5 \times 10^4$ células/mL e incubadas por 24 h, sendo utilizado meio de cultura sem fenol. Ao atingirem 70% a 80% de confluência, foram adicionados os tratamentos e após uma hora foram estimuladas a inflamação com lipopolissacarídeo (LPS) a 1 μ g/mL, ficando incubadas sob exposição ao LPS por 24 h. Foi removido o sobrenadante e adicionado cloreto de nitroazul de tetrazólio (NBT) (1 mg/mL) e incubado por 2 h. Após isso, as células passaram pela lavagem com metanol, secagem e então os cristais de formazana formados foram dissolvidos e a densidade óptica mensurada a 630 nm. Foi usado espectrofotômetro de microplacas Multiskan SkyHigh UV/Vis (Thermoscientific®, Estados Unidos) (GUIDONI et al., 2023, CHOI, 2006). Os resultados foram expressos em porcentagem de produção de ânion superóxido. Foram realizados ensaios com as amostras F, I, FI, F3I7 e F7I3 em triplicata (n=3).

5.1.1.12.4. Efeito protetor contra Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

O efeito protetor das amostras contra o dano oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi realizado em linhagens de fibroblastos L929 e macrófagos RAW 264.7 de acordo com metodologia descrita por Lorençoni e colaboradores (2021). O plaqueamento foi realizado a uma densidade de $7,0 \times 10^4$ células/poço. Após 24 horas as células foram expostas a diferentes concentrações da amostra (13,33 mg/mL, 6,66 mg/mL, 3,33 mg/mL, 1,66 mg/mL e 0,83 mg/mL) e foi adicionado H_2O_2 600 μ M. Após 24 horas de incubação, a viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico MTT e resultados lidos por espectrofotômetro de microplacas Multiskan SkyHigh UV/Vis (Thermoscientific®, Estados Unidos). Foram realizados ensaios com as amostras F, I, FI, F3I7 e F7I3. Os experimentos foram realizados em triplicata (n = 3) e os resultados foram expressos como média $\pm$ DP de viabilidade celular (%).

5.1.1.12.5. Redução da produção de Citocinas

A linhagem celular de macrófagos RAW 264.7 foi cultivada em microplacas de 96 poços sob uma concentração de 5×10^4 a $6,5 \times 10^4$ e incubados até atingir de 70-80% de confluência. Foram adicionados os tratamentos e após uma hora foram

estimuladas a inflamação com lipopolissacarídeo (LPS) a 1 µg/mL, ficando incubadas sob exposição ao LPS por 24 h. Foi removido o sobrenadante e destinado para determinação de citocinas IL-1 e IL-10 empregando o ensaio imunoenzimático (ELISA – do inglês “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”). A citocina foi detectada por meio de anticorpos de captura, e anticorpos biotinilados e amplificados com estreptoavidina-peroxidase de acordo com as instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific®). Foi utilizado o substrato o-Phenylenediamine ou tetrametilbenzidina e a reação foi bloqueada com adição de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 1M) aos poços. As leituras foram feitas em espectrofotômetro de microplacas Multiskan SkyHigh UV/Vis (Thermoscientific®, Estados Unidos) com filtro de 420 nm. A concentração de cada citocina foi determinada pela equação da reta comparando-se as absorbâncias das concentrações conhecidas da curva padrão para cada citocina com as absorbâncias obtidas nas amostras. Foram realizados ensaios com as amostras F, I, FI, F3I7 e F7I3. Os experimentos foram realizados em duplicata (n = 2) e os resultados foram expressos como média ± DP.

5.1.1.12.6. Indução da Quinona Redutase (QR)

O ensaio de indução da quinona redutase foi realizado conforme Prochaska e Santamaria (1988), com modificações de Gerhauser et al. (1997), utilizando a linhagem de hepatoma de rato Hepa1c1c7. As células foram semeadas em duas placas de 96 poços, designadas como “Proteína” e “QR ensaio”, e incubadas por 24 horas. Após a remoção do meio inicial, adicionou-se 190 µL de novo meio de cultura, seguido por 10 µL da amostra (0,4 mg/mL), da curva de diluição de 4'-bromoflavona (50,0 µM a 0,4 µM) ou de DMSO a 10% (controle negativo). As placas foram incubadas por 48 horas em estufa de CO₂. Na placa “Proteína”, o meio foi substituído por 200 µL de cristal violeta a 2% em etanol. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, o cristal violeta foi removido, e a placa foi lavada e seca. Em seguida, adicionou-se 200 µL de SDS a 0,5% em etanol 50%, incubando sob agitação por 5 a 10 minutos. A absorbância foi medida a 595 nm, sendo o valor do controle negativo ajustado para 1,0. Na placa “QR ensaio”, após a remoção do meio, adicionou-se 50 µL de digitonina a 0,8% (exceto no branco) e incubou-se a 37 °C por 10 minutos. Após nova incubação sob agitação, adicionou-se 200 µL de mistura enzimática reacional e a absorbância foi lida a 595 nm por espectrofotômetro de microplacas Multiskan SkyHigh UV/Vis (Thermoscientific®, Estados Unidos), com o controle negativo

ajustado para 0,4. Foram realizados ensaios com as amostras F, I, FI, F3I7 e F7I3. Os experimentos foram realizados em duplicata ($n = 2$).

5.1.1.13. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (San Diego, CA, EUA 176) versão 8.2.1. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e/ou desvio padrão (DP). Variações estatísticas entre os grupos foram determinadas usando a análise de variância multifatorial (ANOVA) de uma via seguidas de teste post hoc de Turkey. Para comparações de duas médias foi utilizado teste t. Foram considerados significativos valores $p < 0,05$ com intervalo de confiança estabelecido em 95%.

5.1.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1.2.1. Determinação do tempo de secagem

Estudos prévios sobre técnicas de secagem de frutas indicam que a temperatura de 60 °C promove maior preservação da atividade antioxidante e mantém teores mais elevados de antocianinas nos frutos (SILVA et al., 2021). Vimercati et al. (2019) observaram que temperaturas mais altas, de 75 °C, promoveu maior degradação de antocianinas, sendo um risco à atividade antioxidante, enquanto a temperatura de 60°C apresentou menor degradação de antocianinas. Com base nesses achados, essa temperatura foi selecionada para o presente trabalho.

Para determinar o melhor tempo de secagem, foram realizados ensaios para avaliar a umidade, a atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH e o conteúdo de antocianinas em amostras submetidas a três períodos de secagem (24h, 48h e 96h) a 60 °C.

Os resultados obtidos, conforme apresentados na **Tabela 7**, mostraram que a atividade antioxidante, medida pelo método DPPH, não apresentou diferença significativa entre os tempos de secagem para nenhuma das amostras analisadas. Isso sugere que, independentemente do tempo de secagem, as propriedades antioxidantes das amostras de *R. idaeus* e *R. fruticosus* foram preservadas de maneira semelhante, o que é consistente com Madrau e colaboradores (2009), que indicam que com o aumento da temperatura há formação de compostos fenólicos, que influenciam a manter ou até mesmo potencializar a atividade antioxidante (MADRAU et al., 2009).

Para a análise do teor de antocianinas, foi observada uma redução com o aumento do tempo de secagem. No tratamento F, o teor de antocianinas foi de 0,84 mg (24h) para 0,59 mg (96h), sendo essa diferença estatisticamente significativa. No tratamento I, a redução foi maior, com um decréscimo de 0,55 mg para 0,33 mg ao longo do período avaliado. Estes resultados vão de encontro aos encontrados por Huarancca-Huarcaya e colaboradores (2022), que observaram a degradação das antocianinas com a exposição a temperatura de 60 °C (HUARANCCA-HUARCAYA et al., 2022).

Quanto à análise de umidade, foi observada diminuição significativa nas amostras de *R. fruticosus* (F) após 96 horas de secagem, com redução de 15% para 10,16%, enquanto para *R. idaeus* (I) não apresentou diferenças significativas entre os diferentes tempos de secagem. Isso sugere que, embora o aumento do tempo de

secagem resulte em maior perda de água, esse efeito pode ser mais pronunciado em algumas frutas do que em outras, dependendo da sua composição e estrutura celular, (EGEA, LOBATO, 2014).

Diante disso, foi descartada a opção de secagem no tempo de 96 horas pelo significativo decréscimo do teor de antocianinas. Entre os tempos de 24h e 48h, não foram observadas nenhuma diferença significativa, portanto foi escolhido o tempo de secagem de 24 horas em razão do melhor custo-benefício, visto que reduz consideravelmente o uso da estufa, energia e otimiza uma futura transposição em escala.

Tabela 7. Efeito do tempo de secagem na atividade antioxidante (DPPH), teor de antocianinas e umidade das drogas vegetais de *R. fruticosus* e *R. idaeus*

	DPPH IC ₅₀ (mg/mL)	Antocianinas (mg/100mL)	Umidade (%)
F 24h	10,53±2,51 ^a	0,84±0,18 ^a	15,00±2,86 ^a
F 48h	10,29±0,84 ^a	0,73±0,54 ^a	13,56±0,46 ^a
F 96h	9,23±1,97 ^a	0,59±0,32 ^b	10,16±0,09 ^b
I 24h	15,17±3,53 ^A	0,55±0,23 ^A	12,57±0,33 ^A
I 48h	14,48±2,72 ^A	0,50±0,78 ^A	13,56±0,46 ^A
I 96h	14,63±3,85 ^A	0,33±0,66 ^B	10,16±0,09 ^A

Dados expressos em média ± desvio padrão para as amostras de *R. fruticosus* (F) e *R. idaeus* (I) submetidas à secagem por 24h, 48h e 96h. Letras diferentes em cada coluna indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,5$) de acordo com análise de comparação de média realizada por ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os tempos (24h, 48h e 96h) para *R. fruticosus* (F) na mesma coluna. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas durante os tempos (24h, 48h e 96h) para *R. idaeus* (I) na mesma coluna.

5.1.2.2. Composição centesimal

A composição centesimal dos frutos secos de *R. idaeus* e *R. fruticosus* foi analisada quanto ao conteúdo de umidade, cinzas, proteínas e lipídios, sendo o conteúdo de carboidratos determinado por diferença.

Os resultados indicaram que não houve diferença estatística significativa entre as amostras para umidade, lipídios e proteínas, sugerindo que esses parâmetros estão presentes em proporções semelhantes nos frutos secos de *R. idaeus* e *R. fruticosus* (**Tabela 8**). Entretanto, diferenças significativas foram observadas para os conteúdos de cinzas e carboidratos. A *R. idaeus* apresentou um teor de cinzas significativamente maior (3,02%) em comparação com a *R. fruticosus* (2,56%), indicando uma maior concentração de minerais. Por outro lado, o teor de carboidratos foi superior na amora (73,94%) em relação à framboesa (69,14%), evidenciando uma diferença significativa entre as espécies analisadas;

Hirsch e colaboradores (2012) investigou a composição centesimal de diferentes frutos do gênero *Rubus* de diversos cultivares e encontrou resultados semelhantes para todos, assim como no presente estudo, onde apenas os parâmetros de carboidratos e cinzas foram divergentes entre as espécies de *Rubus sp.* estudadas.

Os ensaios de composição centesimal do presente estudo foram realizados com os frutos secos em virtude de serem matéria-prima das infusões, diferente do que é realizado em estudos deste cunho para frutos, em que os experimentos são realizados a partir do fruto in natura (HIRSCH et al., 2012, SILVEIRA et al., 2023).

No presente estudo as amostras apresentam em torno de 15% de umidade, enquanto nos estudos encontrados a média é de 90% de umidade (HIRSCH et al., 2012, SILVEIRA et al., 2023). Aplicando um cálculo proporcional, os resultados de proteínas, lipídios e cinzas estão similares aos obtidos por Hirsch e colaboradores (2012) e Silveira e colaboradores (2023).

Em relação ao teor de carboidratos, não é possível comparar entre os estudos encontrados visto que na metodologia executada neste trabalho não houve diferenciação entre fibras alimentares e carboidratos, sendo incluído as fibras como carboidratos não digeríveis, como são categorizadas por definição (AOAC, 1995).

Tabela 8. Composição centesimal dos frutos secos de *R. idaeus* e *R. fruticosus*

	Umidade (%)	Cinzas (%)	Lipídios (%)	Proteínas (%)	Carboidratos (%)
F	15,00±2,86 ^a	3,02±0,03 ^a	1,98±0,32 ^a	10,84±1,3 ^a	69,14±1,81 ^b
I	12,57±0,33 ^a	2,56±0,11 ^b	1,64±0,13 ^a	9,27±0,39 ^a	73,94±0,78 ^a

Dados expressos em média ± desvio padrão para as amostras de *R. fruticosus* (F) e *R. idaeus* (I) nos diferentes ensaios de composição centesimal. Letras iguais na mesma coluna representam que não houve diferença significativa entre as amostras e letras diferentes na mesma coluna representam significativas diferenças estatísticas ($p < 0,5$) de acordo com análise de comparação de média realizada por ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey.

5.1.2.3. Antocianinas, polifenóis, flavonóides e taninos

A análise do conteúdo de antocianinas, polifenóis totais, taninos e flavonoides foi realizada por infusão, a partir de *R. idaeus*, *R. fruticosus* e suas combinações em diferentes proporções (**Tabela 9**).

Os resultados demonstraram que o teor de antocianinas foi significativamente maior nos infusos de F (1,17 mg/100 mL), *R. fruticosus* pura, e na mistura de sua maior concentração F7I3 (1,47 mg/100 mL), enquanto a *R. idaeus* apresentou o menor conteúdo (0,74 mg/100 mL). Qader e Yaman (2023) utilizaram o mesmo método que o presente estudo para quantificar o teor total de antocianinas com base

na cianidina-3-glicosídeo e foi resultado em 7,73 mg/kg no extrato seco da amora. Comparando-se o encontrado em um quilo do extrato seco (7,73 mg) e um litro da infusão obtida no presente estudo (11,7 mg), é observado que a infusão contribuiu para uma maior extração da cianidina-3-glicosídeo, sugerindo que o método de infusão pode ser mais eficaz na extração desses compostos bioativos comparados a secagem do fruto.

Outra evidência que corrobora com esta afirmação é a comparação entre o teor de antocianinas da infusão de *R. fruticosus* (1,17 mg/100mL) (**Tabela 9**) e o teor no fruto de *R. fruticosus* submetido a secagem por 24 horas (0,84 mg/100mL) (**Tabela 7**). As diluições utilizadas nos experimentos foram as mesmas, na concentração de 13,33 mg/mL, demonstrando que a infusão de amora foi capaz de extrair um maior conteúdo de antocianinas em detrimento da diluição do seu fruto seco a frio. Essa diferença destaca a importância da infusão como uma forma eficiente de extração de compostos bioativos, como observado para as antocianinas, quando comparada ao fruto seco, o que pode ser uma consideração relevante ao utilizar esses compostos em tratamentos terapêuticos ou funcionais.

Em relação aos polifenóis totais, a *R. fruticosus* pura também apresentou os maiores conteúdos (90,89 mg/100 mL), seguida da mistura FI (85,58 mg/100 mL) e F3I7 (86,49 mg/100 mL). A *R. idaeus* apresentou um significativamente inferior (75,57 mg/100 mL) indicando que a *R. fruticosus* contribui para um maior potencial antioxidante dos infusos. Apesar das suas similaridades, o teor de polifenóis totais já foi descrito como divergentes entre as bagas amora e framboesa, sendo justificado pelos fatores ambientais, incidência de luz, temperatura e práticas agrônômicas nas etapas de cultivo e colheita (SKROVANKOVA et al., 2015).

Em relação aos taninos, foi observado diferenças significativas entre os tratamentos de *R. idaeus* e *R. fruticosus*, já com os infusos F (12,81 mg/100 mL), FI (14,39 mg/100 mL), F3I7 (13,21 mg/100 mL) e F7I3 (12,24 mg/100 mL) foram estatisticamente iguais entre si. A framboesa isolada apresentou um menor teor de taninos (6,83 mg/100 mL), enquanto o teor encontrado na amora foi aproximadamente duas vezes maior (12,81 mg/100 mL), sugerindo que a amora tem maior influência na presença desse composto bioativo.

Para os flavonoides, a *R. fruticosus* demonstrou o maior conteúdo (29,41 mg/100 mL), enquanto a *R. idaeus* apresentou o menor (3,38 mg/100 mL). As misturas FI, F3I7 e F7I3 mostraram teores intermediários, sendo que F7I3 teve um conteúdo

elevado (16,48 mg/100 mL), indicando que uma maior proporção de amora na mistura favorece a manutenção de flavonoides na infusão.

Tabela 9. Teores de Antocianinas, polifenóis, taninos e flavonóides dos infusos de *R. idaeus* e *R. fruticosus* como monodroga e combinados

	Antocianinas	Polifenóis (mg/100mL)	Taninos	Flavonóides
F	1,17±0,01 ^a	90,89±6,07 ^a	12,81±6,25 ^a	29,41±0,00 ^a
I	0,74±0,00 ^e	75,57±5,88 ^e	6,83±13,22 ^b	3,38±0,02 ^d
FI	0,98±0,00 ^b	85,58±3,23 ^c	14,39±4,76 ^a	11,07±0,00 ^{bc}
F3I7	0,84±0,01 ^c	86,49±11,72 ^{bc}	13,21±26,07 ^a	5,87±0,00 ^{cd}
F7I3	1,47±0,00 ^a	80,62±7,92 ^d	12,24±10,17 ^a	16,48±0,04 ^b

Dados expressos em média ± desvio padrão para as infusões *R. fruticosus* (F), *R. idaeus* (I) e suas combinações FI, F3I7 e F7I3 quanto aos teores de antocianinas, polifenóis, taninos e flavonoides. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,5$) de acordo com análise de comparação de média realizada por ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey.

5.1.2.4. Identificação de flavonóides e compostos fenólicos por HPLC

A análise por HPLC permitiu a identificação e quantificação de diferentes compostos fenólicos e flavonoides presentes nos infusos de *R. idaeus*, *R. fruticosus* e suas combinações (**Tabela 10**).

Os resultados indicam que o ácido gálico apresentou maiores concentrações na *R. idaeus* isolada (12,52 µg/mL), sendo este significativamente igual as combinações F3I7 (12,40 µg/mL) e F7I3 (12,32 µg/mL), enquanto a *R. fruticosus* isolada apresentou o menor teor (11,43 µg/mL).

Estudos anteriores quantificaram o ácido gálico em *Rubus fruticosus* (145,85 mg/100g) no fruto de amora moído em nitrogênio líquido e dissolvido em metanol (JACQUES et al., 2014), bem como no extrato da polpa do fruto de *Rubus idaeus*, apresentando concentração de 339,45 µg/g (WU et al., 2019). Esses resultados confirmam a presença e abundância do ácido gálico nos frutos de *R. idaeus* e *R. fruticosus*, corroborando dados previamente reportados na literatura.

O ácido cafeico apresentou resultados abaixo dos limites de detecção, o que pode ser explicado pelo fato de o método de quantificação ser baseado na curva analítica, uma ferramenta matemática contínua. No entanto, ao serem calculados e aplicados os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para a análise dos dados, verificou-se que estavam abaixo dos valores considerados confiáveis, sendo, portanto, considerados como não detectados. Diferentemente deste estudo, o ácido cafeico já foi encontrado no extrato metanólico do fruto de amora (JACQUES et al., 2014),

sugerindo que sua não detecção pode estar associada às especificações do método empregado e ao tipo do extrato por infusão, incomum para análise cromatográfica.

Em contrapartida, o ácido ferúlico apresentou resultados entre os limites de detecção e quantificação para as infusões F, I e FI, enquanto para as infusões F3I7 e F7I3 apresentou resultados abaixo do nível de detecção, sendo considerado não detectado nessas amostras. Esse composto já foi quantificado no extrato metanólico da amora (JACQUES et al., 2014), bem como no extrato metanólico da framboesa (Lopez-Corona et al., 2022), corroborando sua presença nos resultados analisados (**Tabela 10**).

O ácido clorogênico apresentou sua maior concentração na infusão de amora isolada (373,64 µg/mL), seguida da combinação cuja amora se apresenta em maior concentração, F7I3 (331,32 µg/mL). Já a *R. ideaus* isolada apresentou o menor conteúdo (158,08 µg/mL), sugerindo que a *R. fruticosus* pode ser a principal responsável pela presença desse composto nos infusos.

Como encontrado nos presentes dados, resultados semelhantes foram observados em estudos anteriores, nos quais o ácido clorogênico já foi detectado e quantificado (0,084 mg/kg) no fruto de *R. fruticosus* liofilizado e ressuspendido em metanol (QADER, YAMAN, 2023), bem como no extrato cetônico do fruto de *R. ideaus* (SONG et al., 2020).

O ácido cinâmico e a cianidina não foram detectados em nenhum dos tratamentos pelo método utilizado. No entanto, a cianidina já foi quantificada no fruto de amora extraída com diferentes solventes, etanol-água (7/3 v/v) e acetona-água (7/3 v/v) (D'ANGELO et al, 2020). A presença de antocianinas no extrato da framboesa também foi quantificada em diferentes estudos (SONG et al., 2020; WU et al., 2019), em especial a cianidina-3-glicosídeo (SPARZAK et al., 2010).

Em relação a catequina, sua presença nos frutos de *R. fruticosus* e *R. ideaus* já foi relatada em diferentes estudos (MANNINO et al., 2022; D'ANGELO et al, 2020; SONG et al., 2020). No presente estudo, os resultados não foram diferentes, sendo detectada nas infusões FI e F7I3 e quantificada nas demais infusões, apresentando sua maior concentração na *R. fruticosus* isolada (253,04 µg/mL), enquanto a *R. ideaus* isolada teve um conteúdo significativamente menor (104,54 µg/mL). Nas combinações, a única quantificada foi a F3I7, que resultou em uma concentração intermediária comparada as infusões como monodrogas (83,04 µg/mL).

Por outro lado, o ácido tânico apresentou maior conteúdo na *R. ideaus* isolada (553,67 µg/mL), sendo estatisticamente igual ao conteúdo na combinação de F3I7

(542,34 µg/mL), e o menor na *R. fruticosus* isolada (457,92 µg/mL), ficando com teores intermediários as combinações F7I3 (524,17 µg/mL) e FI (525,12 µg/mL), que são estatisticamente iguais, demonstrando que dentre as espécies analisadas, a *R. idaeus* é a maior responsável pela presença do ácido tânico.

A presença de taninos na amora e framboesa foi confirmado por mais de dez estudos experimentais diferentes conforme revisão realizada por Skrovankova e colaboradores (2015).

Outros compostos fenólicos e flavonoides, como ácido cumárico, elágico, rutina, quercetina e kaempferol também foram encontrados nos frutos de amora e framboesa (WU et al., 2019; SKROVANKOVA et al., 2015), contribuindo em conjunto para as atividades bioativas encontradas.

Tabela 10. Identificação e quantificação de compostos fenólicos e flavonóides por HPLC dos infusos de *R. idaeus* e *R. fruticosus* como monodroga e combinados.

	F	I	FI	F3I7	F7I3
Ác. Gálico (µg/mL)	11,43±0,15 ^c	12,52±0,10 ^a	12,10±0,21 ^b	12,4±0,02 ^a	12,32±0,09 ^{ab}
Ác. Cafeico (µg/mL)	ND	ND	ND	ND	ND
Ác. Ferúlico (µg/mL)	D	D	D	ND	ND
Ác. Clorogênico (µg/mL)	373,64±9,3 ^a	158,08±2,7 ^e	220,68±0,27 ^c	168,13±0,24 ^e	331,32±3,02 ^b
Ác. Cinâmico (µg/mL)	ND	ND	ND	ND	ND
Catequina (µg/mL)	253,04±4,57 ^a	104,54±0,85 ^b	D	83,04±0,59 ^c	D
Cianidina (µg/mL)	ND	ND	ND	ND	ND
Ác. Tânico (µg/mL)	457,92±0,57 ^d	553,67±4,37 ^a	525,12±1,85 ^{bc}	542,34±1,38 ^a	524,17±6,06 ^c

Dados expressos em média ± desvio padrão para as infusões *R. fruticosus* (F), *R. idaeus* (I) e suas combinações FI, F3I7 e F7I3 quanto aos teores de flavonoides e compostos fenólicos por HPLC. Letras diferentes em cada linha indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,5$) de acordo com análise de comparação de média realizada por ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey. ND: Não detectado (ausente ou abaixo do limite de detecção do método aplicado); D: Detectado pois se encontra abaixo do limite de quantificação do método aplicado.

5.1.2.5. Potencial antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante das infusões de *R. idaeus* e *R. fruticosus*, tanto isoladas quanto as combinadas, demonstrou variabilidade conforme os métodos empregados: DPPH, ABTS e FRAP (**Tabela 11**).

Para o DPPH, as concentrações de IC_{50} variaram de 8,90 mg (F7I3) a 10,72 mg (I). A ausência de diferença estatística significativa no método DPPH indica que ambas as espécies, bem como suas combinações, possuem capacidades semelhantes na neutralização do radical livre DPPH (**Tabela 11**). Com isso, torna-se aplicável a substituição dos frutos de amora e framboesa no que tange a atividade antioxidante, sendo viável a sua mistura sem influenciar em seu poder antioxidante, sendo uma alternativa para situações de escassez ou sazonalidade de uma das frutas.

A capacidade antioxidante pelo método de captura do radical ABTS apresentou diferenças significativas entre os tratamentos (**Tabela 11**). A infusão de *R. idaeus* isolada (I), demonstrou menor eficiência na neutralização desse radical, com uma IC_{50} de 3,81 mg/mL. Em contrapartida, a combinação F3I7 (maior proporção de *R. idaeus*) demonstrou significativamente a melhor atividade antioxidante ($IC_{50} = 0,49$ mg/mL), sugerindo um possível efeito sinérgico quando essa espécie é combinada com *R. fruticosus*.

A *R. fruticosus* isolada apresentou um conteúdo intermediário (1,3 mg). Esses achados sugerem que a combinação dessas infusões pode potencializar a atividade antioxidante, em consonância com estudos que demonstram a interação entre diferentes compostos bioativos na otimização da eliminação de radicais livres (BIANCHI, ANTUNES, 1999).

Um melhor desempenho na atividade antioxidante para a infusão de *R. fruticosus* ($IC_{50} = 1,3$ mg/mL), comparada com a *R. idaeus* ($IC_{50} = 3,81$ mg/mL), já era previsto, em vista do maior conteúdo de polifenóis totais, flavonoides e antocianinas encontrados na amora (**Tabela 9**). Skrovankova e colaboradores (2015) também observou a relação entre a atividade de eliminação de radicais livres e o teor de polifenóis totais como determinantes para inferir a atividade antioxidante, qualificando tal relação.

Adicionalmente, no método FRAP, que avalia a capacidade de redução de íons férricos, verificou-se que as infusões isoladas de *R. idaeus* e *R. fruticosus*, bem como as combinações F3I7 e FI apresentaram atividade antioxidante significativamente iguais, demonstrando mais atividade antioxidante que a combinação F7I3. Estudo recente, como o de Pimentel et al. (2024), também demonstram variações na atividade antioxidante dependendo do método utilizado, reforçando a importância de empregar múltiplas abordagens para uma avaliação mais abrangente.

Tabela 11. Atividade antioxidante por DPPH, ABTS e FRAP das infusões de *R. idaeus* e *R. fruticosus* monodroga e combinados.

	DPPH	ABTS IC ₅₀ (mg/mL)	FRAP
F	9,15±0,91 ^a	1,3±0,07 ^{de}	2,94±1,57 ^a
I	10,72±0,49 ^a	3,81±0,31 ^a	1,28±0,25 ^{ac}
FI	9,88±0,29 ^a	2,2±0,61 ^{bd}	1,15±5,24 ^c
F3I7	10,67±0,33 ^a	0,49±0,16 ^e	1,66±4,49 ^{ac}
F7I3	8,90±0,44 ^a	1,6±0,51 ^{cd}	1,44±1,33 ^b

Dados expressos em média ± desvio padrão para as infusões *R. fruticosus* (F), *R. idaeus* (I) e suas combinações FI, F3I7 e F7I3 quanto aos ensaios antioxidantes. Letras diferentes em cada coluna indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,5$) de acordo com análise de comparação de média realizada por ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey.

5.1.2.6. Atividade bioativa em cultura celular

5.1.2.6.1. Avaliação da Citotoxicidade

As infusões de *R. idaeus* e *R. fruticosus* (F, I, FI, F3I7 e F7I3) foram testadas quanto à citotoxicidade em diferentes concentrações (13,33 mg/mL, 6,66 mg/mL, 3,33 mg/mL, 1,66 mg/mL e 0,83 mg/mL) utilizando três linhagens celulares: fibroblastos L929, macrófagos RAW 264.7 e J774A.1. Os resultados indicaram ausência de citotoxicidade em todas as concentrações avaliadas nas linhagens celulares testadas. Dessa forma, as infusões de *R. idaeus* e *R. fruticosus* demonstram perfil de segurança celular, sugerindo seu potencial para aplicações terapêuticas sem risco de toxicidade para essas células.

5.1.2.6.2. Redução da produção de Óxido Nítrico (NO)

O ensaio de avaliação do óxido nítrico (NO) foi relacionado a sua influência em várias reações orgânicas envolvidas na homeostase do corpo humano, como ação a nível de neurotransmissores, na agregação plaquetária, atividade bactericida, mediador de processos inflamatórios, dentre outros (MAIA et al., 2010). O ensaio de redução da produção de óxido nítrico pode ser realizado para testar atividade anti-inflamatória, como feito no presente estudo, visto que compreende um mediador pró-inflamatório.

As infusões de *Rubus idaeus*, *Rubus fruticosus* e suas combinações FI, F3I7 e F7I3, foram testadas nas concentrações de 13,33, 6,66 e 3,33 mg/mL em linhagem

celular de macrófagos RAW 264.7 e todas as amostras resultaram na capacidade de reduzir a produção de óxido nítrico quando comparadas com o controle de LPS 1 µg/mL (**Figura 5**), sendo observado maior redução de óxido nítrico pela *R. idaeus* nas concentrações de 13,33 e 6,66 mg/mL. A inibição do óxido nítrico pelas amostras infere no efeito das infusões em modular processos inflamatórios e estresses oxidativos. A atividade bioativa evidenciada de redução da concentração de óxido nítrico é diretamente relacionada a presença de substâncias bioativas identificadas nas amostras, antocianinas, polifenóis, flavonóides e taninos (**Tabelas 9 e 10**).

Assim como encontrado no presente trabalho, Yahfoufi e colaboradores (2018) obtiveram resultados semelhantes ao trabalhar com extratos brutos de framboesa fresca na dose de 200 mg/mL em ensaio de inibição de óxido nítrico com macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS. Foi concluído eficiência da framboesa na supressão da síntese de óxido nítrico, bem como na redução dos níveis de CX-2, IL-1β e IL-6. Outros estudos também demonstraram atividade anti-inflamatória da *Rubus idaeus* (RISS et al., 2004) e *Rubus fruticosus* (GIL-MARTÍNEZ et al., 2023).

Figura 5. Efeito das infusões de *R. idaeus*, *R. fruticosus* e suas combinações em diferentes concentrações na redução da produção de Óxido nítrico.

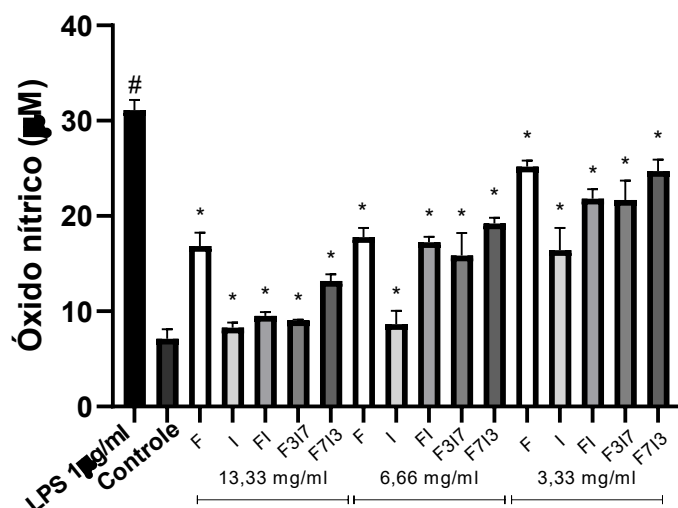


Figura 5. Infusões testadas nas concentrações de 13,33, 6,66 e 3,33 mg/mL sobre a produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (1 µg/mL) após 24h de tratamento. Os resultados foram expressos como média ± DP de três experimentos independentes. Análise de comparação de média realizada por ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey. Significância estatística para $p < 0,05$. # grupo controle basal comparado ao grupo estimulado com LPS. *grupo tratado comparado ao grupo LPS.

5.1.2.6.3. Redução do ânion superóxido (O_2^-)

Para o ensaio de redução do ânion superóxido, O_2^- , as infusões de *Rubus idaeus*, *Rubus fruticosus* e suas combinações FI, F3I7 e F7I3 foram testadas na concentração de 13,33 mg/mL em diferentes linhagens celulares de macrófagos, RAW 264.7 (**Figura 6A**) e J774A (**Figura 6B**). Com a linhagem de macrófagos RAW 264.7, todas as infusões na concentração de 13,33 mg/mL apresentaram redução na produção do radical ânion superóxido comparadas ao controle LPS 1 μ g/mL, sendo que a infusão de framboesa apresentou a maior inibição (22,4%), seguida da infusão de amora (8,1%), enquanto a infusão com 50% de *R. idaeus* e 50% de *R. fruticosus* (FI) apresentou a menor inibição em relação ao LPS (4,9%).

O ensaio realizado com a linhagem celular de macrófagos J774A (**Figura 6B**) apresentou redução na produção do O_2^- apenas para os infusos de framboesa, amora e para a combinação com 30% de amora e 70% de framboesa (F3I7), sendo a maior redução apresentada pela framboesa (21,3%), seguida da amora (7,8%) e F3I7 (7,6%) em relação ao LPS 1 μ g/mL.

Apesar do ânion superóxido também estar envolvido no processo inflamatório, e as atividades antioxidantes e anti-inflamatórias estarem intimamente relacionadas, estudos demonstram que a sua redução está mais envolvida na atividade antioxidante (LOPEZ-CORONA, 2022).

Nota-se uma divergência entre os resultados encontrados com o presente método e os métodos bioquímicos de ABTS, DPPH e FRAP (**Tabela 11**), enquanto no ABTS e FRAP as maiores atividades antioxidantes foram demonstradas pelas combinações de *R. idaeus* e *R. fruticosus*, na redução do ânion superóxido a maior atividade foi para framboesa como monodroga (**Figura 6A** e **Figura 6B**).

É importante considerar múltiplas abordagens para uma compreensão abrangente dos efeitos bioativos, incluindo métodos bioquímicos preliminares e ensaios em cultura de células, sendo que os métodos *in vitro* oferecem uma perspectiva mais próxima das condições fisiológicas, permitindo a avaliação da atividade antioxidante de forma mais fidedigna àquela sujeita a acontecer no organismo humano (ALVES et al., 2010).

Foram observados em outros estudos a capacidade antioxidante dos frutos de *R. idaeus* e *R. fruticosus*, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho (D'ANGELO et al., 2020; GARCÍA et al., 2020).

Figura 6. Efeito das infusões de *R. idaeus*, *R. fruticosus* e suas combinações em diferentes concentrações na redução da produção do ânion superóxido.

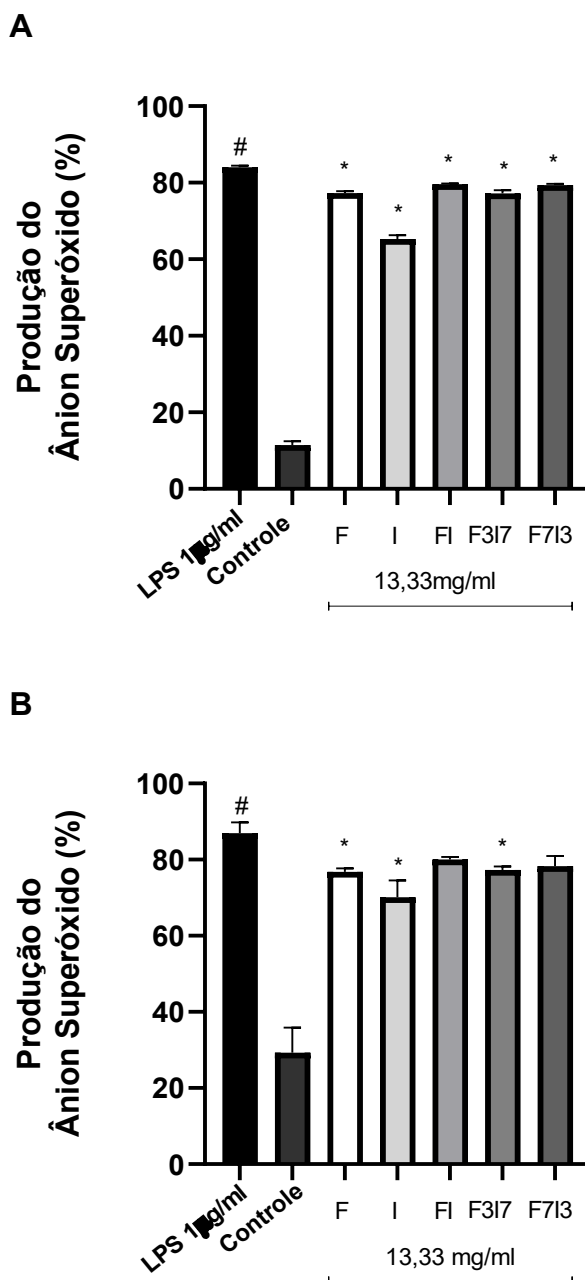


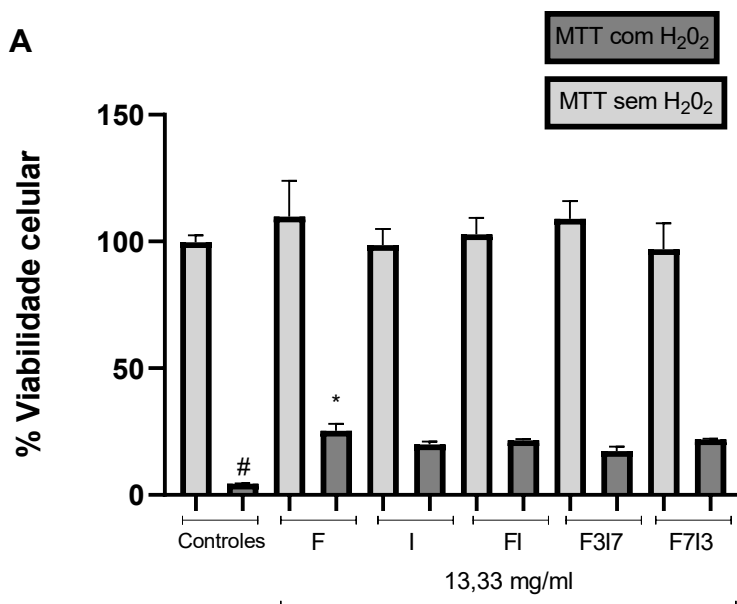
Figura 6. Efeito dos infusos na concentração de 13,33 mg/mL sobre a concentração do radical ânion superóxido (O_2^-) em cultura de macrófagos RAW 264.7 (A) e J774A (B) estimulados com LPS (1 µg/mL) após 24 h de tratamento. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP de dois experimentos independentes. Análise de comparação de média realizada por ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey. Significância estatística para $p < 0,05$. # grupo controle basal comparado ao grupo estimulado com LPS. *grupo tratado comparado ao grupo LPS.

5.1.2.6.4. Efeito protetivo contra Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

O efeito protetivo contra peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) foi avaliado nas infusões F, I, FI, F3I7 e F7I3 na concentração de 13,33 mg/mL com as linhagens de macrófagos RAW 264.7 (**Figura 7A**) e fibroblastos L929 (**figura 7B**). Na linhagem RAW 264.7 a infusão de amora a 13,33 mg/mL foi a única amostra que demonstrou uma diferença de viabilidade celular significativa em relação ao controle, ou seja, foi a única infusão com efeito protetor contra os danos oxidativos causados pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na concentração de 600 µM. No ensaio com fibroblastos L929, não foi visto efeito protetor em nenhuma das amostras testadas.

O efeito protetivo contra peróxido de hidrogênio visto no tratamento de *R. fruticosus* pode ser explicado pela sua maior capacidade antioxidante que a *R. idaeus* obtido no método de sequestro do radical ABTS (**Tabela 11**), bem como pela amora possuir maior conteúdo dos compostos fenólicos e flavonóides encontrados (**Tabela 10**), visto que estes compostos são fatores determinantes nas atividades bioativas (YAHFOUFI et al., 2018).

Figura 7. Efeito protetivo das infusões de *R. idaeus*, *R. fruticosus* e suas combinações em diferentes concentrações contra peróxido de hidrogênio.



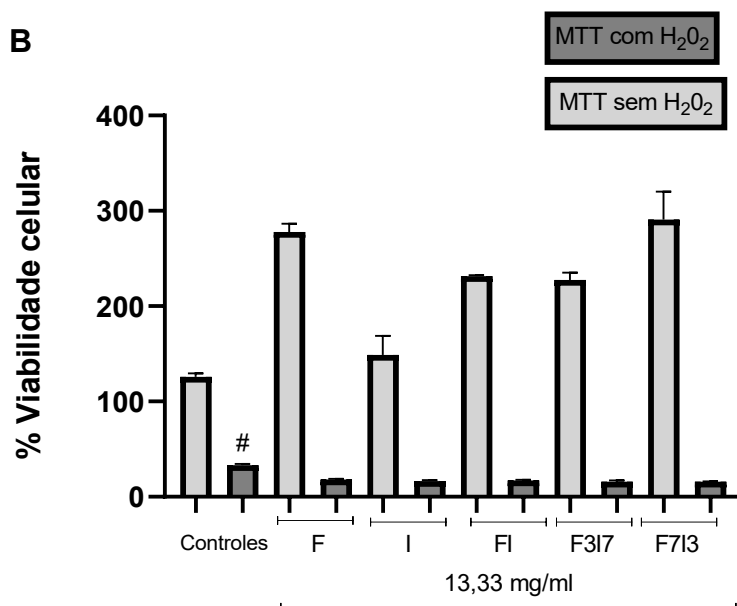


Figura 7. Comparativo entre o efeito dos infusos na concentração de 13,33 mg/mL sobre a viabilidade celular e o efeito protetor contra os danos oxidativos causados pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em macrófagos RAW 264.7 (A) e fibroblastos L929 (B). As células foram expostas aos tratamentos na presença e ausência de H₂O₂. Os resultados são expressos em porcentagem média $\pm$ DP de células viáveis na presença do peróxido de hidrogênio, comparada ao grupo controle, de três experimentos independentes (n=3). Análise de comparação de média realizada por ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey. Significância estatística para $p < 0,05$. # grupo controle positivo comparado ao grupo controle negativo sem H₂O₂. *grupo tratado comparado ao grupo controle com H₂O₂.

5.1.2.6.5. Redução da produção de Citocinas

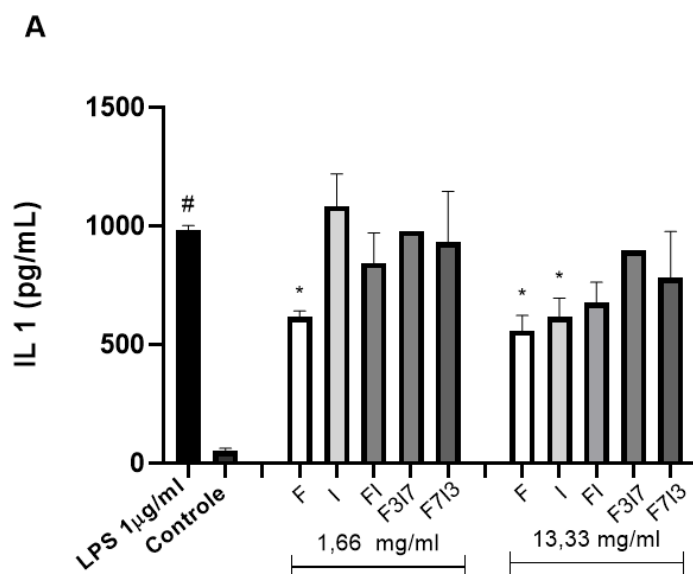
Na determinação da redução de citocinas, foram realizados ensaios em cultura de macrófagos RAW 267.4 estimulados com LPS 1 μ g/mL e avaliados a inibição das citocinas pelas infusões nas concentrações de 13,33 mg/mL e 1,66 mg/mL em relação ao controle de LPS. Foram escolhidas para os ensaios uma citocina pró-inflamatória, IL-1 (**Figura 8A**) e uma anti-inflamatória, IL-10 (**Figura 8B**). As infusões de *Rubus fruticosus* nas concentrações de 13,33 mg/mL e 1,66 mg/mL foram capazes de reduzir significativamente a produção de IL-1, apresentando uma redução de 43% e 37,3%, respectivamente, em relação ao controle LPS. Além da amora, a infusão de *R. idaeus* na maior concentração testada, 13,33 mg/mL também apresentou uma redução das citocinas significativa (37,2%).

Diferente do ensaio com IL-1, no ensaio de redução da Interleucina IL-10, as maiores reduções desta citocina ocorreram pelas combinações de *R. idaeus* e *R. fruticosus*, sendo a mistura com 50% de amora e 50% de framboesa a 13,33 mg/mL a amostra responsável pela maior inibição de IL-10, reduzindo 27,6% em relação ao

controle LPS. A mesma infusão na concentração de 1,66 mg/mL também teve inibição significativa, de 26,5%. A infusão com 70% de amora e 30% de framboesa (F7I3) na concentração de 13,33 mg/mL também demonstrou efeito na inibição de IL-10 com 27,3% de diferença em relação ao LPS.

É importante ressaltar que foi visto maior redução da citocina pró-inflamatória, IL-1, sendo as amostras capazes de reduzir sua expressão em 43% e 37,3%, enquanto para IL-10, citocina anti-inflamatória, as inibições foram de 26,5%, 27,3% e 27,6%. Estes resultados indicam uma maior redução de IL-1, corroborando para uma expressiva atividade anti-inflamatória das infusões de *R. fruticosus* e *R. idaeus* nas concentrações de 13,33 mg/mL e 1,66 mg/mL. Yahfoufi e colaboradores (2018) também obtiveram resultados de redução de Interleucinas pró-inflamatórias com frações de *Rubus idaeus* em linhagem celular de macrófagos RAW 264.7.

Figura 8. Efeito das infusões de *R. idaeus*, *R. fruticosus* e suas combinações em diferentes concentrações na redução da produção de citocinas.



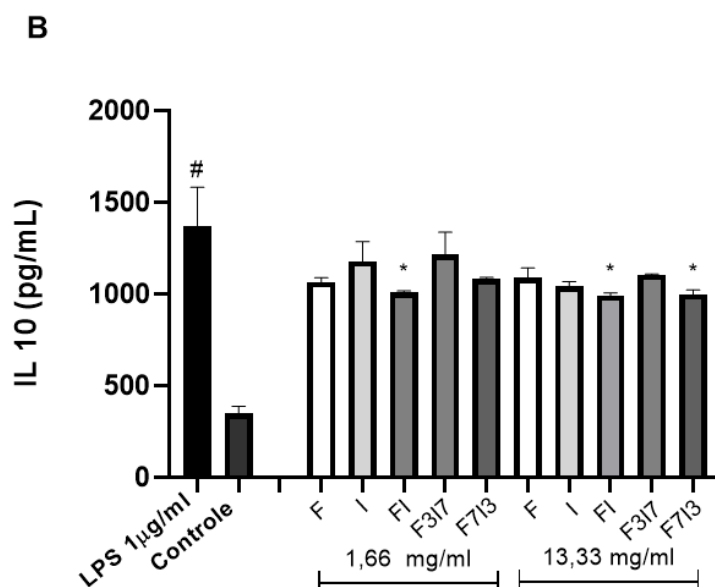


Figura 8. Efeito dos infusos na concentração de 13,33 mg/mL e 1,66 mg/mL sobre a concentração da citocina pró-inflamatória Interleucina-1 (IL-1) (A) e citocina anti-inflamatória Interleucina-10 (IL-10) (B) em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (1 µg/mL) após 24 h de tratamento. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP de dois experimentos independentes. Significância estatística para $p < 0,05$. # grupo controle basal comparado ao grupo estimulado com LPS. *grupo tratado comparado ao grupo LPS.

5.1.2.6.6. Indução da Quinona Redutase

As infusões de *R. idaeus* e *R. fruticosus* (F, I, FI, F3I7 e F7I3) foram avaliadas quanto à capacidade de induzir a quinona redutase, uma enzima de fase II, em concentrações de 13,33, 6,66, 3,33 e 1,66 mg/mL. Foram realizados dois experimentos independentes, e em nenhuma das concentrações testadas apresentaram capacidade de induzir a quinona redutase, não demonstrando atividade quimiopreventiva de câncer para as amostras aqui estudadas mediante a este método. Contudo, é importante destacar que o ensaio de indução de quinona redutase também avalia citotoxicidade. Os resultados mostraram que, em todas as concentrações e amostras testadas, não houve citotoxicidade, indicando que as infusões de *R. idaeus* e *R. fruticosus* são seguras para a linhagem celular Hepa 1c1c7.

5.1.3. CONCLUSÃO

O presente estudo, de caráter pioneiro, elucidou que a combinação das infusões de duas espécies de frutas vermelhas, amora e framboesa, não potencializa suas atividades antioxidantes.

A secagem é uma etapa crucial no processamento de plantas medicinais, pois pode afetar significativamente a composição química e as atividades biológicas das extrações. No caso das infusões de *R. idaeus* e *R. fruticosus*, compreender como o tempo de secagem das drogas influencia esses parâmetros é essencial para otimizar suas propriedades terapêuticas e garantir sua eficácia. Este estudo iniciou investigando a relação entre o tempo de secagem e as características químicas e biológicas dessas plantas, fornecendo insights valiosos para o desenvolvimento de chás comerciais à base de *R. idaeus* e *R. fruticosus* com potencial antioxidante e anti-inflamatório.

A presença significativa de substâncias bioativas, como antocianinas, polifenóis, flavonoides, destacando-se para a abundância de taninos nas infusões de amora, framboesa e suas combinações, está diretamente relacionada à capacidade antioxidante e anti-inflamatória dessas infusões.

A segurança das infusões foi confirmada para diferentes linhagens celulares nas concentrações testadas, reforçando seu potencial para aplicações terapêuticas.

A avaliação da atividade antioxidante confirmou que apenas a infusão de amora, *R. fruticosus*, apresentou efeito protetor contra os danos oxidativos causados pelo peróxido de hidrogênio, enquanto todas as infusões demonstraram atividade antioxidante pela redução na produção do ânion superóxido, sendo que a framboesa, *R. idaeus*, se destacou. As combinações, apesar de antioxidantes, não demonstraram efeito em potencializar a atividade antioxidante, sendo menos ativas que as infusões em monodrogas.

No que se refere à atividade anti-inflamatória, todas as infusões foram anti-inflamatórias sendo capazes de reduzir a produção de óxido nítrico, sendo que framboesa apresentou maior atividade em todas as concentrações testadas. As infusões em monodrogas, amora e framboesa, também tiveram maior impacto sobre a redução da expressão da citocina IL-1, sendo que neste método a amora apresentou melhor efeito anti-inflamatório.

Dessa forma, os achados deste estudo evidenciam que as infusões de *R. idaeus* e *R. fruticosus* são fontes naturais promissoras de compostos bioativos com

propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, sendo suas infusões em monodrogas com maiores atividades antioxidantes e anti-inflamatórias que suas combinações, contrapondo o conhecimento popular e marketing apelativo sobre o potencial antioxidante do chá de frutas vermelhas.

Esses resultados abrem perspectivas para futuras investigações sobre a aplicação terapêutica da *R. fruticosus* e *R. ideaus* como chás medicinais, incluindo investigações em modelos *in vivo* e ensaios clínicos. Além disso, considerando o uso popular dessas infusões e seu potencial funcional, pesquisas futuras poderiam avaliar a inclusão destas espécies na Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, bem como na aprovação dessas espécies vegetais pela ANVISA para uso como Suplementos alimentares pelos seus notáveis conteúdos de compostos fenólicos. Ademais, esses resultados podem ser os precursores da avaliação da biodisponibilidade dos compostos bioativos e a possível implementação em estratégias terapêuticas antioxidantes e anti-inflamatórias.

5.1.4. REFERÊNCIAS II

ALVES CQ. Et al. Methods for determination of in vitro antioxidant activity for extracts and organic compounds. *Química Nova* 33(10). 2010.

AL-TAIE GRI et al. A comparative study of the phenolic compounds of some Brassicaceae taxa by High-performance liquid chromatography (HPLC) technique. **Tikrit journal of pure science**. v. 23, n. 2. 2018.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 920.39,C). Arlington: A.O.A.C., 1995, cap 33. p. 10-12.

ARAGÃO NM; VELOSO MCC; ANDRADE JB. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9. 2009.

BENZIE I. F. F; STRAIN J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1): 70-76.

BIANCHI MLP, ANTUNES LMG. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Revista de Nutrição**, 12(2):123-130.1999.

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INIMETRO). **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. 6.ed. v. 1. 874p. Brasília. 2019. p. 317.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. 7.ed. v. 2. 764p. Brasília. 2024. p. 434-436.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos. **Farmacopéia Brasileira**. 2.ed. v. 1. 764p. Brasília. 2021. p. 224p.

CHOI HS. et al. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 2006. v. 27, p. 31–44.

CORNELL JA. Experiments with mixtures: designs, models, and the analysis of mixture data. [s.l.] Wiley, 2002. v. 3.

D'ANGELO RW, GONÇALVES MM, FACHI MM, VILHENA RO, PONTAROLO R, MALUF DF. 2020. UPLC-QToF-MS Characterization of Blackberry extracts of cultivars ‘Tupy’, ‘Guarani’, and ‘Xavante’: Development of extract-loaded niosomes. *Revista Brasileira de farmacognosia* 30(1), 519-527.

EGEA MB, Lobato LP. A desidratção osmótica como pré-tratamento para frutas e hortaliças. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 2014, 73(4):316-24.
García AV, Pérez SEM, Butsko M, Moya MSP, Sanahuja AB. 2020. Authentication of “Adelita” Raspberry Cultivar Based on Physical Properties, Antioxidant Activity and Volatile Profile. *Antioxidants* 9(1), 593-607.

GERHÄUSER, C; YOU, M; LIU, J; HAWTHORNE, M; METHA, R. G; MOON, R; PEZZUTO, J. M. (1997) Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drug-metabolizing enzymes. *Cancer Research*, 57: 272 – 278.

GIL-MARTÍNEZ L, MUT-SALUD N, RUIZ-GARCÍA JÁ, FALCÓN-PIÑEIRO A, MAIJÓ-FERRÉ AB, TORRE-RAMÍREZ JML, GUILLAMÓN E, VERARDO V, GÓMEZ-CARAVACA AM. 2023. Phytochemicals determination and antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and anticancer activities of blackberry fruits. *Foods* 12(1), 1505-1522.

GIUSTI, M, WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. **Food Analytical Chemistry**. 2001.

GUIDONI, M., SOUSA JÚNIOR, A.D. DE, ARAGÃO, V.P.M., E SILVA, M.V.T., BARTH, T., CLARINDO, W.R., ENDRINGER, D.C., SCHERER, R., FRONZA, M., 2023. Plant stem cell extract from *Coffea canephora* shows antioxidant, anti-inflammatory, and skin regenerative properties mediated by suppression of nuclear factor- κ B. *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. medicas e Biol.* 56, e12849.

HIRSCH, G. E. et al. Caracterização físico-química de variedades de amora-preta da região sul do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 5, p. 942-947. 2012.

HUARANCCA-HUARCAYA E. ET AL. KINETIC OF THERMAL DEGRADATION OF ALAYBILÍ (*VACCINIUM FLORIBUNDUM* KUNTH) AND MACHA-MACHA (*Gaultheria glomerata* (Cav.) Sleumer) anthocyanins. **Brazilian Journal of Food and Technology**, v. 25. 2022.

IAL.INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea - São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, p. 1020. cap 4. p. 124-125.

JACQUES, A. C. et al. Bioactive and volatile organic compounds in Southern Brazilian blackberry (*Rubus fruticosus*) fruit cv. Tupy. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 34, n. 3, p. 636-643. 2014.

KREPSKY, P. B. et al. Chemical composition and vasodilatation induced by *Cuphea carthagenensis* preparations. **Phytomedicine**. v. 19. p. 953-957. 2012.

LOPEZ-CORONA AV, VALENCIA-ESPINOSA I, GONZÁLEZ-SÁNCHEZ FA, SÁNCHEZ-LÓPEZ AL, GARCIA-AMEZQUITA LE, GARCIA-VARELA R. 2022. Antioxidant, Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activity of Phenolic Compound Family Extracted from Raspberries (*Rubus idaeus*): A General Review. *Antioxidants* 11(1), 1192-1211.

LORENÇONI, M.F., Silva, R.S., Azevedo Júnior, R., Fronza, M., 2021. Effect of pasteurization on the antioxidant and oxidant properties of human milk. Rev. Paul. Pediatr. 39. <https://doi.org/10.1590/1984-0462/2021/39/2019165>

MADRAU MA et al. Effect of drying temperature on polyphenolic content and antioxidant activity of apricots. European Food Research and Technology (2009) 228:441-448.

MAIA, R. M; MOURA, C. W; BISPO, V. S; SANTOS, J. L; SANTANA, R. S; MATOS, H. R. (2010). Evaluation of nitric oxide (NO) scavenging for the metanol extract of the alga *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe. Revista Brasileira de Farmacognosia, 20: 489-493.

MANNINO, G. et al. Phytochemical Profile and Antioxidant, Antiproliferative, and Antimicrobial Properties of *Rubus idaeus* Seed Powder. **Foods**, v. 11, n. 17. 2022.

MARTIUS, Karl Friedrich Philipp von. Plantas usadas pelos brasileiros e suas substâncias medicinais. Belo Horizonte: Fino Traço. ed. 1. 2023.

MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods, 65: 55-63.

MOTA, R. V. Caracterização do suco de amora-preta elaborado em extrator caseiro. **Ciência e tecnologia de alimentos**, Campinas, n. 2, v. 26, p. 303-308. 2006.

PIMENTEL, E. F. et al. Polyphenols, antioxidants, and wound healing of *Lecythis pisonis* seed coats. **Planta Medica**, v. 14. 2024.

PROCHASKA H. J; SANTAMARIA A. B. 1988. Direct measurement of NAD(P)H:quinone reductase from cell cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzymes inducers. Analytical Biochemistry 169(1), 328-336.

QADER, A. F; YAMAN, M. Phytochemical Profile, Antioxidant Properties, Column Chromatographic Fractionation, and High-performance Liquid Chromatography Analysis of Phenolic Compounds. **ARO-The Scientific Journal of Koya University**, v. 11, n. 2. 2023.

RE R; PELLEGRINI N; PANNALA A; YANG M; RICE-EVANS C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology & Medicine, 26(1): 9-10.

RISS, T.; NILES, A.; MORAVEC, R.; KARASSINA, N.; VIDUGIRIENE, J. *Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells*; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda, MD, USA, 2004.

SCHERER R; GODOY H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. Food Chemistry, 112(1): 654-658.

SILVA, A. B. S. et al. Técnicas de secagem de frutas: uma revisão. **Scientific Electronic Archives**, v. 14, n. 10. 2021.

SILVEIRA, M. L. R. et al. Características físico-químicas, compostos bioativos e potencial antioxidante de frutos de framboesa vermelha (*Rubus idaeus* L.). **Observatorio de la economia latino-americana**, Curitiba, v. 21, n. 9, p. 12241-12262. 2023.

SKROVANKOVA, S. et al. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 24673-24706. 2015.

SONG, B. et al. Raspberry extract promoted longevity and stress tolerance via insulin/IGF signaling pathway and DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*. **Food & Function**, v. 11, n. 4, 2020.

SPARZAK, B. et al. HPLC analysis of polyphenols in the fruits of *Rubus idaeus* L. (Rosaceae). **Natural Products Research**, v. 24. N. 19, p. 1811-1822. 2010.

VIMERCATI, W. C. et al. Efeito da temperatura na cinética de secagem em leito de espuma e na degradação de antocianina em morango. **Brazilian Journal of food technology**, v. 22, p. 2018221, 2019.

WU, L. et al. HPLC-ESI-qTOF-MS/MS Characterization, Antioxidant Activities and Inhibitory Ability of Digestive Enzymes with Molecular Docking Analysis of Various Parts of Raspberry (*Rubus idaeus* L.). **Antioxidants**, v. 3, n. 8. 2019.

XU, B.J., CHANG, S.K.C., 2007. A Comparative Study on Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Legumes as Affected by Extraction Solvents. **J. Food Sci.** 72, S159–S166.

YAHFOUFI, N.; ALSADI, N.; Jambi, M.; Matar, C. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. **Nutrients** **2018**, 10, 1618.

5.2. CAPÍTULO II

ESTABILIDADE ACELERADA DE *Rubus idaeus* e *Rubus fruticosus* EM MONODROGA E COMBINADAS

RESUMO

O estudo de estabilidade acelerado compreende em sujeitar a amostra a condições de armazenamento mais críticas, de modo a induzir potenciais reações e interações em um menor intervalo de tempo. Ao ser estável em seis meses sob condições de 40°C e 70%UR, pode-se estimar uma validade do dobro deste tempo para o armazenamento em temperatura ambiente. *Rubus fruticosus* e *Rubus idaeus* foram escolhidas para este estudo pois compreendem espécies portadoras de frutos com notáveis propriedades bioativas, a amora e a framboesa, respectivamente, sendo amplamente difundidas sob a forma de chás, comercializado como “chá de frutas vermelhas” com validade de dois anos. No entanto, ao investigar o material vegetal comercializado, tem-se em sua maioria folhas dessas espécies, e não frutos. O objetivo deste estudo foi avaliar a igualdade química e biológica das infusões de *R. idaeus* e *R. fruticosus* ao submeter suas drogas vegetais a estabilidade acelerada, a fim de avaliar o tempo seguro de armazenamento e validade das drogas secas para o preparo dos chás. As amostras foram adquiridas de fornecedor qualificado e realizadas análises de umidade, antioxidante (DPPH) e teor de antocianinas para definir o tempo de secagem ideal para os experimentos (24, 48 e 96h). Após essa etapa, as drogas vegetais foram incubadas a 40°C e 70%UR por seis meses, sendo realizadas análises a cada 45 dias, tanto das drogas vegetais quanto das suas infusões, sendo as infusões de *R. idaeus* e *R. fruticosus* isoladas como monodrogas e três combinações dessas. As análises que abrangeram o escopo do estudo de estabilidade foram a determinação de umidade, avaliação antioxidante (DPPH), determinação de compostos fenólicos e flavonóides (HPLC), segurança microbiológica e exame sensorial. Os resultados indicaram que foi possível observar diferentes comportamentos dos compostos fenólicos ao longo do estudo de estabilidade, enquanto o ácido gálico e ácido tânico aumentou com ao final da estabilidade, o ácido clorogênico foi degradado, inferindo na atividade antioxidante encontrada, que aumentou para todas as amostras. Em relação a segurança microbiológica, não houve contaminação em nenhum tempo de análise, e no que tange ao exame sensorial, apesar de apresentar alterações ao longo do estudo, foi considerado como viável para consumo. O estudo de estabilidade foi conclusivo como satisfatório, o que indica que as drogas vegetais secas dos frutos de amora e framboesa, pelos métodos utilizados, podem ser armazenadas em temperatura ambiente por até um ano, desde que vedadas e ao abrigo do sol, para a finalidade de realizar infusões com benefício antioxidante. Considerando o uso popular dessas infusões e seu potencial funcional, pesquisas futuras poderiam avaliar a inclusão destas espécies na Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, bem como avaliar biodisponibilidade dos compostos bioativos e a estabilidade dessas substâncias a longo prazo e durante o processamento industrial, dando continuidade aos resultados do presente estudo.

PALAVRAS-CHAVES: *Rubus idaeus*, *Rubus fruticosus*, estabilidade, prazo de validade, chás.

ABSTRACT

The accelerated stability study involves subjecting the sample to more critical storage conditions to induce potential reactions and interactions in a shorter period. Since it is stable for six months under conditions of 40°C and 70% of humidity, a shelf life of twice this time can be estimated for storage at room temperature. *Rubus fruticosus* and *Rubus idaeus* were chosen for this study because they are species that contains fruits with notable bioactive properties, blackberries and raspberries, respectively, and are widely distributed in the form of infusions, marketed in Brazil as “red fruit infusion” with a shelf life of two years. However, when investigating the commercialized plant material, most of these species are found as leaves and not their fruits. The objective of this study is to evaluate the chemical and biological equality of the infusions when subjecting their plant drugs to accelerated stability, to evaluate the shelf life of the dried drugs for the preparation of the infusions. This is a pioneering study in the analysis of infusions of combined species. The samples were purchased from a qualified supplier and moisture, antioxidant (DPPH) and anthocyanin content analyses were performed to define the ideal drying time for the experiments (24, 48 and 96h). After this step, the herbal drugs were incubated at 40°C and 70% of humidity for six months, with analyses being performed every 45 days, both herbal drugs and their infusions. The analyses that covered the scope of the stability study were the determination of moisture, antioxidant evaluation (DPPH), determination of phenolic compounds and flavonoids (HPLC), microbiological safety and sensory examination. The results indicated it was possible to observe different behaviors of the phenolic compounds throughout the stability study, while gallic acid and tannic acid increased at the end of the stability study, chlorogenic acid was degraded, inferring in the antioxidant activity found, which increased for all samples. Regarding microbiological safety, the results were satisfactory and regarding the sensory examination, despite presenting changes throughout the study, it was considered viable for consumption. The stability study was conclusive as satisfactory, which indicates that the dried plant drugs of blackberry and raspberry fruits, by the methods used, can be stored at room temperature for up to one year, as long as they are sealed and protected from sunlight, for the purpose of making infusions with antioxidant benefits. Considering the popular use of these infusions and their functional potential, future research could evaluate the inclusion of these species in the National Policy for Medicinal Plants and Phytotherapeutics, as well as assess the bioavailability of bioactive compounds and the stability of these substances in the long term and during industrial processing, to this study be continued.

KEYWORDS: *Rubus idaeus*, *Rubus fruticosus*, stability, shelf life, infusions.

5.2.1. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1.1. Desenho do capítulo II

Trata-se de um estudo experimental para avaliação da estabilidade química e biológica de infusões de *Rubus idaeus* e *Rubus fruticosus* em monodroga e combinadas submetidos ao delineamento simplex centroide (CORNELL, 2002) (**Tabela 5** e **Figura 3**) após submeter suas drogas vegetais a estabilidade acelerada (**Figura 9**).

Tabela 5. Amostras pelo delineamento simplex-centroide

	<i>Rubus idaeus</i>	<i>Rubus fruticosus</i>
AMOSTRA I (I)	100%	-
AMOSTRA II (F)	-	100%
AMOSTRA III (FI)	50%	50%
AMOSTRA IV (F7I3)	30%	70%
AMOSTRA V (F3I7)	70%	30%



Figura 3. Delineamento simplex-centroide

Foram preparadas cinco amostras, sendo elas: extrato aquoso obtido por infusão de *R. idaeus* a 13,33 mg/mL (I); extrato aquoso obtido por infusão de *R. fruticosus* a 13,33 mg/mL (F); extrato aquoso obtido por infusão de *R. idaeus* e *R. fruticosus* a 13,33 mg/mL na proporção 1:1 (FI); extrato aquoso obtido por infusão de *R. fruticosus* e *R. idaeus* a 13,33 mg/mL na proporção 7:3, respectivamente (F7I3); extrato aquoso obtido por infusão de *R. fruticosus* e *R. idaeus* a 13,33 mg/mL na proporção 3:7, respectivamente (F3I7) (**Tabela 5**).

Para a obtenção dessas infusões, as drogas vegetais foram submetidas a condições climáticas de uma estabilidade acelerada conforme ANVISA, sendo 40°C e 70% UR. Foram realizadas análises em função do tempo, nos tempos 0, 45, 90, 135 e 180 dias de incubação. As análises consistiram em atividade antioxidante por DPPH, determinação de compostos fenólicos e flavonóides por HPLC, segurança

microbiológica, umidade e características organolépticas conforme o desenho do estudo (**Figura 9**).

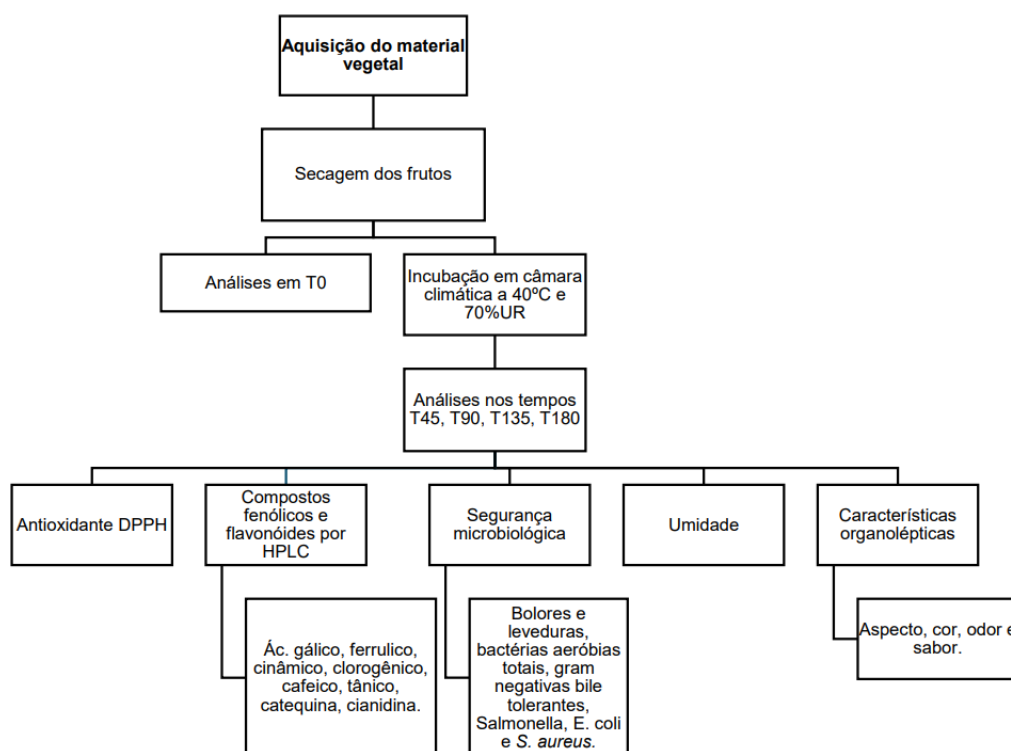


Figura 9. Desenho do capítulo II

5.2.1.2. Material vegetal

5.2.1.2.1. Aquisição

O material vegetal de *R. fruticosus* e *R. idaeus* foi adquirido in natura, submetido a técnica de conservação de congelamento, da empresa Demarchi®, identificados e documentados através de laudos de controle de qualidade (**material suplementar 1**).

5.2.1.2.2. Secagem

O material foi seco em estufa com circulação de ar a 60°C de acordo com Silva e colaboradores (2021) por 24 horas. Para determinar o tempo de secagem, foram realizadas análises de determinação de umidade conforme procedimento de determinação de água em drogas vegetais da Farmacopéia Brasileira pelo método gravimétrico (BRASIL, 2019), atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre DPPH conforme Scherer e Godoy (2009) e quantificação de antocianinas

pelo método de diferença de pH de acordo com Giusti e Wrolstad (2001) em três tempos de secagens diferentes, 24 horas, 48 horas e 96 horas.

Para a determinação de umidade foi utilizada a droga vegetal in natura congelada. Após as amostras secarem, foram utilizadas para a determinação de antocianinas como extrato aquoso a frio a 13,33 mg/mL e para os ensaios de DPPH foram realizados os chás das drogas vegetais a 13,33 mg/mL.

5.2.1.2.3. Incubação das amostras

As drogas vegetais foram incubadas após a secagem em câmara climática Nova Ética 1200L (Ethik®, Brasil) sob condições de temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa $75\% \pm 5\%$, de acordo com método de estabilidade acelerada da ANVISA (BRASIL, 2018).

5.2.1.2.4. Preparo dos infusos

As amostras foram preparadas na proporção de 2 gramas dos frutos secos para 150 ml de água por infusão de 5 minutos, recomendação média indicada pelo Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira para infusões de frutos (BRASIL, 2019), resultando em uma concentração de 13,33 mg/mL.

Foram feitas as infusões de *R. fruticosus* e *R. idaeus* na concentração de 13,33 mg/mL, e posteriormente realizada as diluições para a aquisição das demais amostras.

As infusões foram preparadas no momento antes das análises de HPLC, segurança microbiológica, características organolépticas e atividade antioxidante por DPPH. Para a determinação da umidade ao longo do tempo, foram utilizadas as drogas vegetais recém retiradas da câmara climática.

5.2.1.3. Determinação do teor compostos fenólicos e flavonóides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A identificação e quantificação de compostos fenólicos e flavonoides nas infusões foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplada a detectores Ultravioleta (UV) e de Matriz de Diodos (DAD). Os compostos fenólicos analisados foram ácido gálico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, ácido clorogênico, ácido cafeico e taninos (representados pelo ácido tânico), enquanto os flavonoides analisados foram catequina e cianidina. Todos os padrões utilizados para

construção das curvas analíticas e os reagentes de grau HPLC para a fase móvel foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (Steinheim, Alemanha).

Foram preparadas soluções-mãe de 10 mg/mL de cada padrão, diluídas em metanol, e posteriormente utilizadas para a construção das curvas analíticas, cujas concentrações variaram de 10 a 500 µg/mL (n = 12 pontos). As amostras F, I, FI, F3I7 e F7I3 foram preparadas por infusão a 13,33 mg/mL e filtradas em filtros PTFE hidrofílico (diâmetro 13 mm, poro 0,45 µm, Analítica, China). Foram injetados 10 µL de cada amostra por corrida no sistema HPLC-DAD, utilizando as mesmas condições empregadas para a análise dos padrões.

A separação cromatográfica foi realizada em sistema gradiente, utilizando como fase móvel água acidificada com ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% e acetonitrila, sendo utilizado metanol para a limpeza entre as análises, conforme metodologia descrita por Al-Taie et al. (2018), com modificações. Antes da injeção no sistema cromatográfico, as fases móveis foram submetidas a ultrassonificação em banho ultrassônico Elmasonic Easy 180H (Elma®, Portugal) por 30 minutos a 25°C, de acordo com Al-Taie et al. (2018). O gradiente linear do solvente A foi ácido trifluoroacético (TFA) a 0,1% em água deionizada programada de 0% A - 100% A por 10 minutos, enquanto solvente B foi um gradiente de acetonitrila programado de 0% B - 100% B por 2 minutos, em seguida foi passado um gradiente dos solventes A e B 1:1 por 2 minutos, seguido para 60 segundos de corrida apenas com o solvente A e por último o gradiente C, metanol, por 1 minuto. A taxa de fluxo adotada foi de 1 mL/min e as corridas foram programadas a 280 nm para ácidos fenólicos e 254nm para flavonoides. As mesmas condições de análise foram utilizadas tanto para as amostras quanto para os padrões, sendo realizadas três injeções por vial. A separação foi realizada em uma coluna de fase reversa Phenomenex C18 (100×4,6 mm D.I, tamanho de partícula de 3 µm) com 18 carbonos. A identificação dos compostos foi feita com base nos espectros UV, considerando os limites de detecção (LD), e a quantificação foi realizada com base nas curvas analíticas e nos limites de quantificação (LQ), conforme apresentado na **Tabela 6**.

As análises foram realizadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) Agilent 1260 Infinity II (Agilent®, Estados Unidos) acoplado a um detector DAD. A aquisição e processamento dos dados cromatográficos foram realizados por meio do software OpenLab (versão 3.6).

Para a análise estatística, foi realizado cálculo de regressão linear, calculando-se a equação da reta (curva analítica) e o coeficiente de determinação (r^2), sendo

adotada a recomendação do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) de coeficiente aceitável $>0,9$ (Brasil, 2003), estabelecendo nível de confiança de 95%. Para garantir a confiabilidade da detecção e quantificação através do método empregado, foram calculados os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) baseados em parâmetros da curva analítica e de regressão linear, sendo os cálculos de LD e LQ conforme **equações 5 e 6**, respectivamente (Aragão, Veloso, Andrade, 2009). Todos os cálculos deste método foram realizados no software Microsoft Excel®.

Tabela 6. Curvas analíticas, r^2 , limites de detecção e quantificação dos padrões.

Padrões	r^2	Curva analítica (CLAE – UV/Vis)	LQ	LD
Ác. Gálico	0,9891	$y = 30,327x - 25,742$	7,824 µg/mL	2,582 µg/mL
Ác. Cafeico	0,9811	$y = 30,327x - 25,742$	79,729 µg/mL	26,310 µg/mL
Ác. Ferrulico	0,9862	$y = 4,0958x + 1,1239$	10,847 µg/mL	3,579 µg/mL
Ác. Clorogênico	0,9799	$y = 0,7319x - 8,6262$	67,179 µg/mL	22,169 µg/mL
Ác. Cinâmico	0,9992	$y = 5,3504x - 4,2707$	11,378 µg/mL	3,754 µg/mL
Catequina	0,9881	$y = 0,561x + 3,568$	78,318 µg/mL	25,845 µg/mL
Cianidina	0,9884	$y = 3,7024x + 71,958$	85,993 µg/mL	28,378 µg/mL
Ác. Tânico	0,9878	$y = 0,6789x + 62,539$	108,371 µg/mL	35,762 µg/mL

y: área de pico; x: concentração (µg mL), r^2 : coeficiente de determinação.

Equação 5. Cálculo do Limite de Quantificação (LQ)

$$LQ = 10 \times (s \div a)$$

Onde: s = estimativa do erro padrão do coeficiente linear da equação; a = coeficiente angular da curva analítica.

Equação 6. Cálculo do Limite de Detecção (LD)

$$LD = 3,3 \times (s \div a)$$

Onde: s = estimativa do erro padrão do coeficiente linear da equação; a = coeficiente angular da curva analítica.

5.2.1.4. Segurança microbiológica

A avaliação de segurança microbiológica foi realizada conforme limites microbianos para chás alimentos conforme Instrução Normativa nº 161, de 1º de julho de 2022, que estabelece os padrões microbiológicos para alimentos (BRASIL, 2022), bem como para chás medicinais conforme Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2019).

Foram realizadas análises para detecção de contagem total de bactérias aeróbias, contagem total de fungos, bactérias gram negativas bile tolerantes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*, de acordo com metodologia adaptada da Farmacopéia Brasileira, desde a preparação das amostras, plaqueamento e leitura de resultados conforme limites estabelecidos.

As amostras foram preparadas nas diluições de 1:10, 1:100 e 1:1000 das infusões de *R. fruticosus* (F), *R. idaeus* (I), combinações de *R. fruticosus* e *R. idaeus* 1:1 (FI), 3:7 (F3I7) e 7:3 (F7I3), respectivamente. As diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} foram preparadas em Água Peptonada (Kasvi®). Cada amostra foi preparada nas três diluições e em três repetições cada.

Para todos os microrganismos foi adotado o método de superfície, em que foram preparadas as placas de petri com 15 ml do meio de cultura e após secas foi adicionado à superfície a quantidade de 100 µl de amostra por placa. Antes da adição das amostras, foi adotado o método farmacopeico de pré-incubação das amostras, sendo o tempo e condições de temperatura específicas para cada microrganismo.

Para a contagem total de bactérias aeróbias não foi necessária uma pré-incubação das amostras, sendo transferidas para as placas de petri logo após a preparação das amostras. Foi utilizado o meio de cultura Standard Methods Agar (PCA) ISO/APHA (Kasvi®), sendo incubada por 5 dias a 32°C.

Para a contagem de bolores e leveduras também não se fez necessária uma pré-incubação das amostras, sendo transferidas para as placas com meio de cultura Ágar Sabouraud Chloramphenicol Dextrose EP/USP/ISO (Kasvi®) e submetidas a 22,5°C por 7 dias. Para a contagem de bactérias gram negativas bile tolerantes foi realizada incubação prévia das amostras por 2 horas a 22°C, sendo após este tempo transferidas para as placas com meio de cultura MacConkey Agar EP/USP/ISO (Kasvi®) e incubadas a 32°C por 48 horas.

Para a avaliação de presença de *Escherichia coli* foi realizada pré-incubação das amostras por 24 horas a 32°C, sendo após isso transferidas para placas de petri contendo meio de cultura MacConkey Agar EP/USP/ISO (Kasvi®) e incubadas a 43°C

por 48 horas. Para a presença de *Salmonella* foi realizada pré-incubação das amostras por 24 horas a 32°C, sendo após isso transferidas para placas de petri contendo meio de cultura Hektoen Enteric Agar ISO (Kasvi®) e incubadas a 32°C por 24 horas.

Para a presença de *Staphylococcus aureus* foi realizada pré-incubação das amostras por 24 horas a 32,5°C, sendo após isso transferidas para placas de petri contendo meio de cultura Mannitol Salt Agar (Kasvi®) e incubadas a 32°C por 72 horas.

Após decorridos os devidos tempos de incubação, as placas de petri foram retiradas das estufas e analisadas de acordo com os parâmetros da Farmacopéia Brasileira, sendo os resultados de contagem expressos por unidades formadoras de colônias (UFC) para cada ml (UFC/ml) para os limites de Contagem de bactérias aeróbias totais, bolores e leveduras e gram negativas bile tolerantes. Enquanto os resultados das bactérias patogênicas (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*) foram expressos por presença ou ausência.

5.2.1.5. Potencial antioxidante pela captura do radical DPPH

A determinação do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) foi realizada pelo método estabelecido por Scherer e Godoy (2009). Foram adicionados 20 µl dos tratamentos e 280 µl da solução de DPPH na concentração de 40 µg/mL em metanol em microplaca de 96 poços. Foi aguardado a reação por 60 minutos e lido a 517nm por espectrofotômetro de microplacas Multiskan SkyHigh UV/Vis (Thermoscientific®, Estados Unidos). Os resultados foram expressos em IC₅₀ (concentração que inibe 50% dos radicais livres), que foi calculado através da equação da reta obtida com diferentes concentrações da amostra dentro da faixa de linearidade da curva de calibração. Foram realizados ensaios com as amostras F, I, FI, F3I7 e F7I3 em triplicata (n=3) para cada tempo do estudo.

5.2.1.6. Determinação de umidade

A determinação de umidade foi realizada de acordo com metodologia de análise de drogas vegetais da 6ª edição da Farmacopéia Brasileira, de acordo com o método gravimétrico, em que as amostras foram reduzidas por corte de forma a limitar a dimensão a aproximadamente 3 mm de espessura, pesado em torno de 2 gramas e

transferidas para pesa-filtro previamente pesado e dessecado nas mesmas condições da amostra, durante 30 minutos. Foi transferido para estufa de ventilação forçada a 105°C por cinco horas até peso constante. Foi calculado a porcentagem de água em relação à droga úmida ao ar (BRASIL, 2019). Este ensaio foi realizado em triplicata das amostras secas (recém retiradas da câmara) de *R. idaeus* e *R. fruticosus*. Este ensaio foi realizado em triplicata (n = 3) para cada tempo do estudo.

5.2.1.7. Características organolépticas: Exame sensorial

A identidade e qualidade vegetal macroscópica foi realizada mediante a exame sensorial de acordo com a Farmacopéia Brasileira, com modificações (BRASIL^B, 2019). Foram realizadas análises de cor, odor e sabor. O ensaio de cor foi realizado antes de submeter a amostra a qualquer tratamento, à luz do dia e com fundo branco.

Para a análise de odor, foi colocada uma pequena amostra na palma da mão e inalado devagar e repetidamente. Foi determinado a intensidade do odor e classificado segundo as características: nenhum, fraco, distinto ou forte; e, logo após, em relação à sensação causada pelo odor: aromático, frutado, mofado ou rançoso. Em relação ao exame de sabor, foi experimentado as infusões na concentração usual de 13,33 mg/mL de todas as amostras e comparadas entre si, tendo como referencial as amostras do T0.

5.2.1.8. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (San Diego, CA, EUA 176) versão 8.2.1. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e/ou desvio padrão (DP). Variações estatísticas entre os grupos foram determinadas usando a análise de variância multifatorial (ANOVA) de uma via seguidas de teste post hoc de Tukey. Para comparações de duas médias foi utilizado teste t. Foram considerados significativos valores $p < 0,05$ com intervalo de confiança estabelecido em 95%.

5.2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.2.1. Determinação do tempo de secagem

Estudos prévios sobre técnicas de secagem de frutas indicam que a temperatura de 60 °C promove maior preservação da atividade antioxidante e mantém teores mais elevados de antocianinas nos frutos (SILVA et al., 2021). Vimercati et al. (2019) observaram que temperaturas mais altas, de 75 °C, promoveu maior degradação de antocianinas, sendo um risco à atividade antioxidante, enquanto a temperatura de 60°C apresentou menor degradação de antocianinas. Com base nesses achados, essa temperatura foi selecionada para o presente trabalho.

Para determinar o melhor tempo de secagem, foram realizados ensaios para avaliar a umidade, a atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH e o conteúdo de antocianinas em amostras submetidas a três períodos de secagem (24h, 48h e 96h) a 60 °C.

Os resultados obtidos, conforme apresentados na **Tabela 7**, mostraram que a atividade antioxidante, medida pelo método DPPH, não apresentou diferença significativa entre os tempos de secagem para nenhuma das amostras analisadas. Isso sugere que, independentemente do tempo de secagem, as propriedades antioxidantes das amostras de *R. idaeus* e *R. fruticosus* foram preservadas de maneira semelhante, o que é consistente com Madrau e colaboradores (2009), que indicam que com o aumento da temperatura há formação de compostos fenólicos, que influenciam a manter ou até mesmo potencializar a atividade antioxidante (MADRAU et al., 2009).

Para a análise do teor de antocianinas, foi observada uma redução com o aumento do tempo de secagem. No tratamento F, o teor de antocianinas foi de 0,84 mg (24h) para 0,59 mg (96h), sendo essa diferença estatisticamente significativa. No tratamento I, a redução foi maior, com um decréscimo de 0,55 mg para 0,33 mg ao longo do período avaliado. Estes resultados vão de encontro aos encontrados por Huarancca-Huarcaya e colaboradores (2022), que observaram a degradação das antocianinas com a exposição a temperatura de 60 °C (HUARANCCA-HUARCAYA et al., 2022).

Quanto à análise de umidade, foi observada diminuição significativa nas amostras de *R. fruticosus* (F) após 96 horas de secagem, com redução de 15% para 10,16%, enquanto para *R. idaeus* (I) não apresentou diferenças significativas entre os

diferentes tempos de secagem. Isso sugere que, embora o aumento do tempo de secagem resulte em maior perda de água, esse efeito pode ser mais pronunciado em algumas frutas do que em outras, dependendo da sua composição e estrutura celular, (EGEA, LOBATO, 2014).

Diante disso, foi descartada a opção de secagem no tempo de 96 horas pelo significativo decréscimo do teor de antocianinas. Entre os tempos de 24h e 48h, não foram observadas nenhuma diferença significativa, portanto foi escolhido o tempo de secagem de 24 horas em razão do melhor custo-benefício, visto que reduz consideravelmente o uso da estufa, energia e otimiza uma futura transposição em escala.

Tabela 7. Efeito do tempo de secagem na atividade antioxidante (DPPH), teor de antocianinas e umidade das drogas vegetais de *R. fruticosus* e *R. idaeus*

	DPPH IC ₅₀ (mg/mL)	Antocianinas (mg/100mL)	Umidade (%)
F 24h	10,53±2,51 ^a	0,84±0,18 ^a	15,00±2,86 ^a
F 48h	10,29±0,84 ^a	0,73±0,54 ^a	13,56±0,46 ^a
F 96h	9,23±1,97 ^a	0,59±0,32 ^b	10,16±0,09 ^b
I 24h	15,17±3,53 ^A	0,55±0,23 ^A	12,57±0,33 ^A
I 48h	14,48±2,72 ^A	0,50±0,78 ^A	13,56±0,46 ^A
I 96h	14,63±3,85 ^A	0,33±0,66 ^B	10,16±0,09 ^A

Dados expressos em média ± desvio padrão para as amostras de *R. fruticosus* (F) e *R. idaeus* (I) submetidas à secagem por 24h, 48h e 96h. Letras diferentes em cada coluna indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,5$) de acordo com análise de comparação de média realizada por ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os tempos (24h, 48h e 96h) para *R. fruticosus* (F) na mesma coluna. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas durante os tempos (24h, 48h e 96h) para *R. idaeus* (I) na mesma coluna.

5.2.2.2. Determinação do teor compostos fenólicos e flavonóides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A análise por HPLC permitiu avaliar a influência da temperatura e umidade excessivas (40°C e 70% UR) durante 6 meses. As drogas vegetais foram incubadas em câmara climática e retiradas após 45, 90, 135 e 180 dias, feitas as infusões e avaliadas quanto a identificação e quantificação de compostos fenólicos e flavonoides presentes nos infusos de *R. idaeus*, *R. fruticosus* e suas combinações (**Tabela 12**).

Os resultados indicam que o ácido gálico apresentou variação de teor durante os tempos de análise, obtendo um aumento considerável ao comparar os resultados do T0 e T180, para todas as infusões. Apesar de não ser o comportamento mais conservador para compostos fenólicos em geral, tal fato pode ser explicado por diversos fatores, dentre eles, pela hidrólise de taninos hidrolisáveis, que são

decompostos por hidrólise térmica liberando diversos compostos, dentre eles o ácido gálico. Portanto, a temperatura e umidade elevadas podem favorecer a hidrólise dos taninos já presentes na amostra, resultando em aumento do ácido gálico (YANG, LIU, 2014).

Uma relação inversa entre o conteúdo de compostos fenólicos e condições climáticas como atividade de água e temperatura foi exposta por Teles e colaboradores (2018), encontrando que quanto maior a temperatura e menor a atividade de água, maior o conteúdo de polifenóis encontrados na uva seca. Tal evidência corrobora com os resultados encontrados no presente estudo, em que com a influência de alta temperatura e decréscimo da umidade (**Tabela 16**), obteve-se aumento no conteúdo de ácido gálico nas infusões das frutas estudadas.

Em estudo realizado com diferentes tempos de secagem de diversos cultivares de damasco investigou a variação de polifenóis e atividade antioxidante, encontrando também um aumento do teor de polifenóis na temperatura de secagem mais elevada (75°C), resultando em um produto com mais compostos fenólicos que a damasco in natura (MADRAU et al., 2009).

Diferente do comportamento visto no ácido gálico, o ácido clorogênico se apresentou como os resultados mais comumente encontrado na literatura, obtendo uma relação diretamente proporcional entre o seu teor e o tempo, demonstrando diminuição em seu teor a medida em que as amostras permaneciam mais tempo sob condições altas de temperatura e umidade. Essa degradação do ácido clorogênico por influência do tempo e temperatura é vista em diversos estudos (SANTOS et al., 2018; VIGNOLI et al., 2011; PERRONE et al., 2008).

Em relação ao ácido cafeico, cinâmico e cianidina, não foi possível detectar ou quantificar pois os resultados se mostraram abaixo dos limites de detecção, fato possível visto que o método de quantificação é baseado na curva analítica, que compreende uma ferramenta matemática contínua. No entanto, quando calculados e aplicados LD e LQ para a análise dos dados, foi observado que eles estavam abaixo dos limites considerados confiáveis, sendo, portanto, considerados como não detectados.

O ácido tânico apresentou comportamento similar ao ácido gálico, sendo possível observar variações em seu teor nos diferentes tempos de análise, sendo que o último tempo quantificado, 180 dias, foi o momento de análise com maior quantificação de ácido tânico para todos os tratamentos. *R. fruticosus* apresentou um acréscimo de 341,13mg/mL do primeiro tempo de análise para o último, enquanto *R.*

ideaus apresentou um acréscimo de 25,76mg/mL, FI de 170,19 mg/mL, 79,37 mg/mL para F3I7 e 152,46 mg/mL para F7I3.

Corroborando para este resultado, Kaspchak e colaboradores (2022) também encontrou maiores teores de ácido tânico quando as amostras eram submetidas a temperaturas extremas durante a reação de Maillard, atingindo temperaturas de 200°C.

Em relação a catequina, só foi possível quantificar no primeiro tempo de análise, onde foi observado maior teor para a infusão de *R. fruticosus*, seguida de *R. ideaus* e a combinação com maior proporção de *Rubus ideaus*. Para os demais tempos, os teores resultaram abaixo do limite de detecção, sendo alguns detectados, mas não quantificados, sendo estes, FI e F7I3 no T0, em T45, a catequina foi detectada em F, I, FI e F3I7. No T90, foi detectada em I, enquanto no T135, foi detectada em I, FI e F7I3, e no T180 foram detectadas em todas as infusões. É determinante que as amostras cuja catequina foi detectada apresenta maiores concentrações quando comparadas as que não foram detectadas, sugerindo uma variância na sua concentração conforme o tempo.

Tabela 12. Identificação e quantificação de compostos fenólicos e flavonóides por HPLC dos infusos de *R. idaeus* e *R. fruticosus* como monodroga e combinados preparados a partir da droga vegetal incubada a a 40°C e 75%UR ao longo de 180 dias.

		F	I	FI	F3I7	F7I3
Ácido gálico (µg/mL)	T0	11,43±0,15 ^{Cc}	12,52±0,10 ^{Ca}	12,10±0,21 ^{Cb}	12,4±0,02 ^{Ca}	12,32±0,09 ^{BCab}
	T45	12,14±0,03 ^{Be}	13,07±0,16 ^{Ba}	12,41±0,00 ^{Bcd}	12,51±0,03 ^{BCbcd}	12,15±0,02 ^{Cde}
	T90	8,96±0,02 ^{Ed}	9,21±0,02 ^{Dcd}	9,37±0,03 ^{Ebcd}	10,61±0,03 ^{Da}	DNQ
	T135	9,48±0,08 ^{Da}	DNQ	9,54±0,03 ^{DEa}	8,73±0,22 ^{Ebc}	8,6±0,15 ^{Dc}
	T180	20,36±0,05 ^{Aa}	17,32±0,02 ^{Ae}	19,13±0,07 ^{Ac}	18,01±0,01 ^{Ad}	19,47±0,01 ^{Ab}
Ácido cafeico (µg/mL)	T0	ND	ND	ND	ND	ND
	T45	ND	ND	ND	ND	ND
	T90	ND	ND	ND	ND	ND
	T135	ND	ND	ND	ND	ND
	T180	ND	ND	ND	ND	ND
Ácido clorogênico (µg/mL)	T0	373,64±9,30 ^{Aa}	158,08±2,73 ^{Ae}	220,68±0,27 ^{Ac}	168,13±0,24 ^{Ade}	331,32±3,02 ^{Ab}
	T45	121,11±10,66 ^{Ba}	DNQ	85,08±0,07 ^{BCc}	DNQ	103,80±0,21 ^{Bb}
	T90	DNQ	DNQ	DNQ	68,63±13,05 ^B	DNQ
	T135	DNQ	DNQ	DNQ	DNQ	DNQ
	T180	94,71±0,24 ^{Ca}	76,68±5,73 ^{Bb}	80,22±1,18 ^{Cab}	81,51±0,03 ^{Bab}	DNQ
Ácido ferrulico (µg/mL)	T0	DNQ	DNQ	DNQ	ND	ND
	T45	ND	ND	ND	ND	ND
	T90	ND	ND	ND	ND	ND
	T135	ND	ND	ND	ND	ND
	T180	DNQ	ND	DNQ	DNQ	DNQ
Ácido cinâmico (µg/mL)	T0	ND	ND	ND	ND	ND
	T45	ND	ND	ND	ND	ND
	T90	ND	ND	ND	ND	ND
	T135	ND	ND	ND	ND	ND
	T180	ND	ND	ND	ND	ND
Catequina (µg/mL)	T0	253,04±4,57 ^a	104,54±0,85 ^b	DNQ	83,04±0,59 ^c	DNQ
	T45	DNQ	DNQ	DNQ	DNQ	ND
	T90	ND	DNQ	ND	ND	ND
	T135	ND	DNQ	DNQ	ND	DNQ
	T180	DNQ	DNQ	DNQ	DNQ	DNQ
Cianidina (µg/mL)	T0	ND	ND	ND	ND	ND
	T45	ND	ND	ND	ND	ND
	T90	ND	ND	ND	ND	ND
	T135	ND	ND	ND	ND	ND
	T180	ND	ND	ND	ND	ND
Ácido tânico (µg/mL)	T0	457,92±0,57 ^{Bd}	553,67±4,37 ^{Ba}	525,12±1,85 ^{Bbc}	542,34±1,38 ^{Ba}	524,17±6,06 ^{Bc}
	T45	415,27±2,89 ^{Ce}	468,23±0,88 ^{Ca}	436,97±1,14 ^{Cc}	445,06±2,33 ^{Cbc}	418,41±1,53 ^{Cd}
	T90	249,01±0,00 ^{Ebd}	257,51±0,87 ^{Ecd}	262,53±0,33 ^{Ebc}	306,76±2,07 ^{Da}	194,79±1,57 ^{Ee}
	T135	275,55±4,89 ^{Da}	260,99±0,16 ^{DEbc}	286,67±1,39 ^{Da}	250,38±11,14 ^{Ec}	243,56±12,81 ^{Dd}
	T180	799,05±5,74 ^{Aa}	579,43±1,29 ^{Ae}	695,31±6,18 ^{Ab}	621,71±3,94 ^{Ad}	676,63±0,86 ^{Ac}

Dados expressos em média ± desvio padrão para as infusões *R. fruticosus* (F), *R. idaeus* (I) e suas combinações FI, F3I7 e F7I3 quanto aos teores de flavonoides e compostos fenólicos por HPLC. Análise de comparação de média realizada por ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey para cada padrão. Dentro de cada padrão, a estatística é representada por letras maiúsculas para análises na mesma coluna e minúsculas para análises na mesma linha. Estatísticas rodadas no programa Prisma considerando p<0,05. ND=Não Detectado;DNQ=Detectado mas não quantificado;

5.2.2.3. Segurança microbiológica

A segurança microbiológica das infusões foi avaliada em todos os tempos de análises (**Tabelas 13 e 14**), assim que as drogas vegetais eram retiradas da câmara climática e feita as infusões, com o objetivo de avaliar uma possível contaminação com altas temperaturas e aumento da umidade. As análises microbiológicas em estabilidade acelerada visam pleitear uma validade do alimento proporcional ao dobro do tempo que foram submetidas as condições adversas (BRASIL, 2024).

Em vista dos resultados apresentados (**Tabelas 13 e 14**), é evidente a segurança das infusões em todos os tempos avaliados, podendo considerar as drogas vegetais como seguras para serem armazenadas para a finalidade de chás por pelo menos um ano, o dobro do tempo da estabilidade acelerada executada (BRASIL, 2024).

Tabela 13. Análises de segurança microbiológica expressas em limites microbianos.

INFUSO	Contagem total de fungos (UFC/mL)					Contagem total de bactérias aeróbias (UFC/mL)					Gram negativas bile tolerantes (UFC/mL)				
	T0	T45	T90	T135	T180	T0	T45	T90	T135	T180	T0	T45	T90	T135	T180
F	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²
I	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²
FI	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²
F7I3	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²
F3I7	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²

Dados expressos em média dos resultados obtidos em unidades formadoras de colônias, realizados em triplicata (n=3).

Tabela 14. Análises de segurança microbiológica expressas em presença e ausência.

INFUSO	<i>Escherichia coli</i> (UFC/mL)					<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/mL)					<i>Salmonella</i> (UFC/10 mL)				
	T0	T45	T90	T135	T180	T0	T45	T90	T135	T180	T0	T45	T90	T135	T180
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F7I3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F3I7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Dados expressos em média dos resultados obtidos em unidades formadoras de colônias, realizados em triplicata (n=3).

5.2.2.4. Potencial antioxidante pela captura do radical DPPH

Em vista de determinar o prazo de validade de um produto, ou o tempo de armazenamento, é necessário avaliar se o produto cumpre seu propósito durante a estabilidade (BRASIL, 2024). Em vista disso, foi avaliada a atividade antioxidante pelo método de captura do radical DPPH ao longo dos tempos de estabilidade propostos (Tabela 15).

Nota-se que houve variações na atividade antioxidante em função do tempo. Ao comparar o tempo 0, antes da incubação, com o último tempo analisado, 6 meses após a incubação, tem-se um aumento da atividade antioxidante, isto é, redução do IC₅₀ em 6,83, 2,32, 4,74, 4,65 e 6,26mg/mL para as infusões F, I, FI, F7I3 e F3I7, respectivamente. Inferindo que o propósito antioxidante dos frutos de amora e framboesa não sofreu deterioração, pelo contrário, foi potencializado pelas condições adversas e aumento de compostos fenólicos (Tabela 12).

Também foi observado aumento da capacidade antioxidante com o aumento da temperatura em estudo com frutos de damasco (MADRAU et al., 2009), corroborando para as evidências encontradas no presente estudo.

Em relação as combinações, nota-se que ao final do estudo, as infusões de amora e as combinações F3I7 e FI (5,32, 5,64 e 6,41 mg/mL de IC₅₀, respectivamente) foram as que demonstraram maiores atividade antioxidante, sendo iguais estatisticamente, seguidas das infusões FI (6,41 mg/mL de IC₅₀) e I (8,35 mg/mL de IC₅₀). Isso demonstra a possibilidade de combinar as drogas vegetais sem perda de atividade antioxidante.

Tabela 15. Atividade antioxidante por DPPH dos infusos de *R. idaeus* e *R. fruticosus* como monodroga e combinados preparados a partir da droga vegetal incubada a a 40°C e 75%UR ao longo de 180 dias.

	DPPH				
	IC ₅₀ (mg/mL)				
	T0	T45	T90	T135	T180
F	12,15±1,15 ^{bcd}	10,30±0,64 ^{Dd}	23,53±0,20 ^{Aa}	11,25±0,25 ^{Ecd}	5,32±0,38 ^{De}
I	10,67±0,40 ^{cd}	14,60±0,24 ^{Ab}	10,14±0,25 ^{Dde}	20,58±0,26 ^{Aa}	8,35±0,24 ^{Ae}
FI	11,15±1,17 ^d	12,55±0,27 ^{BCcd}	16,38±0,38 ^{Ba}	13,76±0,18 ^{CDbc}	6,41±0,26 ^{BCDe}
F7I3	12,21±1,05 ^d	14,3±0,52 ^{ABc}	23,16±0,35 ^{Aa}	17,10±0,16 ^{Bb}	7,56±0,25 ^{ABCe}
F3I7	11,90±1,70 ^{ab}	11,48±0,36 ^{CDb}	13,69±0,38 ^{Ca}	12,62±0,33 ^{DEab}	5,64±0,43 ^{CDc}

Dados expressos em média ± desvio padrão. Análise de comparação de média realizada por ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey para cada coluna representado por letras maiúsculas e para cada linha em letras minúsculas. Estatísticas rodadas no programa Prisma considerando p<0,05.

5.2.2.5. Determinação de umidade

A determinação de umidade das drogas vegetais foi avaliada em todos os tempos da estabilidade acelerada (**Tabela 16**) em vista de avaliar a relação entre a atividade de água e possível deterioração dos compostos.

Observou-se que para a droga vegetal de amora não houve diferença estatística entre a umidade do T0 para o T180, tendo um aumento apenas numericamente, de 15% para 12,79%. Para a framboesa, foi observado um aumento da umidade de 6,65% quando comparado o último e o primeiro tempo da estabilidade.

Essa diferença de umidade entre as drogas de *R. idaeus* e *R. fruticosus* não foi suficiente para apresentar uma relação sustentável no presente trabalho, visto que o comportamento das infusões das bagas foi similar no que tange a alterações dos compostos ao longo do tempo da estabilidade (**Tabela 12**), bem como não influenciou sua atividade antioxidante final (**Tabela 15**).

Tabela 16. Determinação da umidade dos frutos secos de *R. idaeus* e *R. fruticosus* incubados a 40°C e 75%UR ao longo de 180 dias.

	Umidade (%)				
	T0	T45	T90	T135	T180
F (DV)	15,00±2,86	13,58±0,29	13,12±3,11	13,21±0,52	12,79±3,36
I (DV)	12,57±0,33 ^c	17,55±0,54 ^{ac}	18,23±0,08 ^{ab}	17,20±0,28 ^{ac}	19,22±0,22 ^a

Dados expressos em média ± desvio padrão. Análise de comparação de média realizada por ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey para cada linha. Estatísticas rodadas no programa Prisma considerando p<0,05.

5.2.2.6. Exame sensorial

Além dos demais ensaios, a identidade e qualidade de um material vegetal devem ser estabelecidas mediante detalhado exame visual e macroscópico, onde o material vegetal é comparado com matéria-prima de referência, laudo do fornecedor ou material respaldado de referência. A amostra que não for semelhante em cor, consistência e odor deve ser descartada por não apresentar os requisitos mínimos especificados nas monografias (BRASIL, 2024). Dentre os ensaios de exame sensorial, foram realizados a identificação por cor e odor de todos os infusos e das drogas vegetais (**Tabelas 17 e 18**) e a análise de sabor dos infusos (**Tabela 19**). Estes ensaios foram realizados em todos os tempos da estabilidade afim de observar possíveis alterações macroscópicas.

Com o passar do tempo de incubação a 40°C e 75%UR, foi notável as alterações sensoriais tanto nas drogas vegetais que foram submetidas à câmara climática, quanto nos produtos gerados, as infusões. Foi observado a perda de cor (**Tabela 17 e Figura 10**) e aroma (**Tabela 18 e Figura 10**) para as infusões e drogas vegetais. Quando comparados as drogas vegetais nos tempos iniciais e finais, a cor foi alterada de roxo para preto na amora e avermelhado para marrom escuro na framboesa.

Nas infusões, a cor de todas as foi classificada como tons de rosa no tempo inicial, sofrendo alterações ao longo dos meses até chegar em tons de marrom após os seis meses da estabilidade. Em relação aos seus odores, nos tempos iniciais eram marcantes e característicos das frutas amora e framboesa, sendo possível identificar as espécies vegetais secas pelo aroma, diferente das infusões, que não foi possível diferenciá-las pelo cheiro, mas a característica de fortemente aromático permaneceu para todos os infusos.

Após 90 dias na câmara climática, tanto as drogas vegetais como as infusões perderam consideravelmente seus aromas, sendo as drogas vegetais caracterizadas como aroma distinto e quando realizadas as infusões apresentaram caráter aromático, mas diferente dos tempos iniciais. Nos dois últimos tempos, os aromas em geral foram classificados como fracos, pois foi observado dificuldade em senti-los. Corroborando com o achado, é comum que drogas vegetais percam seu aroma ao longo do tempo em razão da degradação de seus compostos voláteis (EMBRAPA, 2010).

Em relação ao sabor das infusões de *R. ideaus*, *R. fruticosus* e suas misturas, foi observado sabores característicos das frutas, agradáveis e doces ao paladar nos dois primeiros tempos de análise. No terceiro tempo, foi visto uma perda do sabor doce e característico das frutas e após o quarto tempo foi sentido sabores levemente amargos.

Apesar das fortes alterações observadas no exame sensorial ao longo da estabilidade, a segurança (**Tabelas 13 e 14**) foi mantida e a atividade antioxidante (**Tabela 15**) foi potencializada, obtendo um resultado positivo no ensaio de estabilidade. É cabível um racional farmacotécnico para viabilizar essas infusões a uma transposição em escala para fins comerciais, dotando-se de aditivos alimentares autorizados para chás, como aromas e corantes (BRASIL, 2023).

Pensando em armazenamento caseiro, também é viável seu armazenamento e consumo durante um ano, sendo presente alterações sensoriais com o passar do

tempo, como descrito acima, no entanto, compreendem mudanças aceitáveis ao paladar adulto.

Tabela 17. Exame sensorial de cor dos frutos secos de *R. idaeus* e *R. fruticosus* incubados a 40°C e 75%UR ao longo de 180 dias e os infusos gerados a partir destas drogas vegetais.

	COR				
	T0	T45	T90	T135	T180
F	Rosa	Rosa claro	Marrom claro	Marrom claro	Marrom escuro
I	Rosa claro	Marrom claro	Marrom claro	Marrom claro	Marrom
FI	Rosa	Marrom claro	Marrom claro	Marrom claro	Marrom
F7I3	Rosa	Marrom claro	Marrom claro	Marrom claro	Marrom
F3I7	Rosa	Marrom claro	Marrom claro	Marrom claro	Marrom
F (DV)	Roxo	Roxo	Marrom escuro	Preto	Preto
I (DV)	Avermelhado	Marrom escuro	Marrom escuro	Marrom escuro	Marrom escuro

Figura 10. Drogas vegetais e infusões de *R. ideaus* e *R. fruticosus*

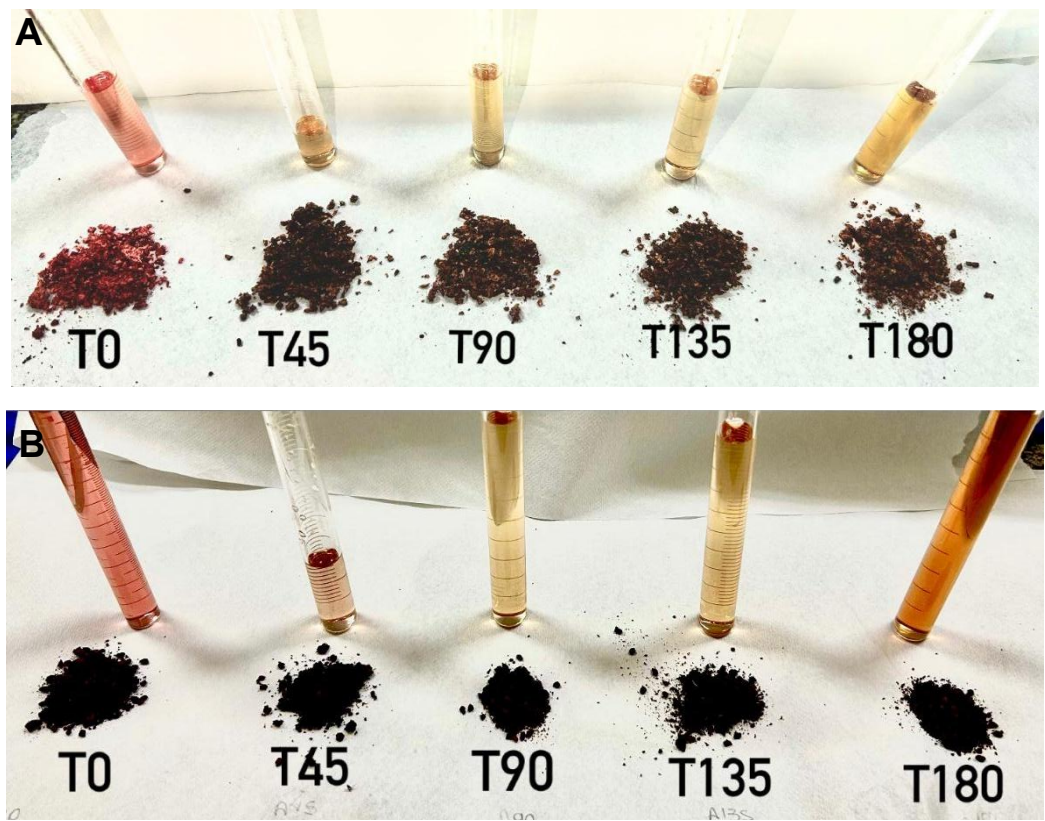


Figura 10. Registro fotográfico das drogas vegetais e infusões de *R. ideaus* (A) e *R. fruticosus* (B) ao longo dos tempos da estabilidade.

Tabela 18. Exame sensorial de odor dos infusos de *R. idaeus* e *R. fruticosus* em monodrogas e combinados após incubação de suas drogas vegetais a 40°C e 75%UR ao longo de 180 dias.

ODOR					
	T0	T45	T90	T135	T180
F	Forte aromático	Forte aromático	Distinto aromático	Fraco	Fraco
I	Forte aromático	Forte aromático	Distinto aromático	Fraco	Fraco
FI	Forte aromático	Forte aromático	Distinto aromático	Fraco	Fraco
F7I3	Forte aromático	Forte aromático	Distinto aromático	Fraco	Fraco
F3I7	Forte aromático	Forte aromático	Distinto aromático	Fraco	Fraco
F (DV)	Forte aromático	Forte aromático	Distinto	Fraco	Fraco
I (DV)	Forte aromático	Forte aromático	Distinto	Fraco	Fraco

Tabela 19. Exame sensorial de sabor dos infusos de *R. idaeus* e *R. fruticosus* em monodrogas e combinados após incubação de suas drogas vegetais a 40°C e 75%UR ao longo de 180 dias.

SABOR					
	T0	T45	T90	T135	T180
F	Doce	Doce	Fracamente doce	Fracamente amargo	Fracamente amargo
I	Doce	Doce	Fracamente doce	Fracamente amargo	Fracamente amargo
FI	Doce	Doce	Fracamente doce	Fracamente amargo	Fracamente amargo
F7I3	Doce	Doce	Fracamente doce	Fracamente amargo	Fracamente amargo
F3I7	Doce	Doce	Fracamente doce	Fracamente amargo	Fracamente amargo

5.2.3. CONCLUSÃO

Este estudo foi pioneiro ao analisar a influência do tempo e temperatura sobre as drogas vegetais e suas influências nas degradações de compostos bioativos e atividades antioxidantes de suas infusões. Foi visto diferentes comportamentos dos compostos bioativos, enquanto o ácido gálico e ácido tânico aumentou com o final da estabilidade, o ácido clorogênico foi degradado, influenciando na atividade antioxidante encontrada, que aumentou para todas as amostras.

As infusões se mostraram seguras a nível microbiológico, sem qualquer contaminação em nenhum tempo analisado. O exame sensorial apresentou diversas alterações ao longo dos tempos da estabilidade, no entanto, não foi considerado como determinante para invalidar o seu consumo após os 6 meses. Sendo, portanto, considerado viável ao consumo, podendo inclusive ser submetido a melhorias farmacotécnicas para fins comerciais.

O estudo de estabilidade acelerado foi conclusivo como satisfatório, demonstrando que as drogas vegetais de *R. ideaus* e *R. fruticosus* mantiveram, até melhoraram, o seu propósito antioxidante com qualidade e segurança durante os seis meses do estudo. Isso indica que essas drogas vegetais podem ser armazenadas em temperatura ambiente por até um ano, desde que vedadas e ao abrigo do sol, para a finalidade de realizar infusões com benefício antioxidante.

Esses achados abrem perspectivas para futuras investigações sobre a aplicação da *R. fruticosus* e *R. ideaus* como chás medicinais e possível inclusão na Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, bem como na aprovação dessas espécies vegetais pela ANVISA para uso como Suplementos alimentares pelos seus notáveis conteúdos de compostos fenólicos. Ademais, é interessante o estudo de estabilidade dessas substâncias a longo prazo e durante o processamento industrial, dando continuidade aos resultados do presente estudo.

5.2.4. REFERÊNCIAS III

AL-TAIE GRI et al. A comparative study of the phenolic compounds of some Brassicaceae taxa by High-performance liquid chromatography (HPLC) technique. **Tikrit journal of pure science**. v. 23, n. 2. 2018.

ARAGÃO, N. M; VELOSO, M. C. C; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9. 2009.

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INIMETRO). **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. 6.ed. 874p. Brasília. 2019. p. 436.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 161, de 1º de julho de 2022. **Estabelece os padrões microbiológicos para alimentos**. Brasília, 2022.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 211, de 1º de março de 2023. **Estabelece as funções tecnológicas, os limites máximos e as condições de uso para os aditivos alimentares e os coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em alimentos**. Brasília, 2023.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Guia nº 16/2018. **Guia para determinação de prazos de validade de alimentos**. ed. 2. 2024.

BRASIL^B. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. 6.ed. 874p. Brasília. 2019. p. 314.

CORNELL JA. Experiments with mixtures: designs, models, and the analysis of mixture data. [s.l.] Wiley, 2002. v. 3.

EGEA MB, LOBATO LP. A desidratação osmótica como pré-tratamento para frutas e hortaliças. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 2014, 73(4):316-24.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro de Pesquisa Agropecuária dos Tabuleiros Costeiros Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Qualidade em plantas medicinais**. ed. 1. Aracaju:Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2010.

GIUSTI, M, WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. **Food Analytical Chemistry**. 2001.

HUARANCCA-HUARCAYA E. et al. Kinetic of thermal degradation of alaybilli (*Vaccinium floribundum* Kunth) and macha-macha (*Gaultheria glomerata* (Cav.) Sleumer) anthocyanins. **Brazilian Journal of Food and Technology**, v. 25. 2022.

KASPOCHAK, E. Efeito do ácido fítico, ácido tânico e saponina na reação de Maillard asparagina-glicose. *Química dos alimentos*, v. 394. 2022.

MADRAU MA et al. Effect of drying temperature on polyphenolic content and antioxidant activity of apricots. *European Food Research and Technology* (2009) 228:441-448.

PERRONE, D.; FARAH, A.; DONANGELO, C. M.; PAULIS, T.; MARTIN, P. R. Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars. *Food Chemistry*, v. 106, n. 2, p. 859-867, 2008.

SANTOS RA. Analysis of sugars and chlorogenic acid in coffee harvested at different ripening stages and after processing. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v. 21. 2018.

SCHERER R; GODOY H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112(1): 654-658.

SILVA, A. B. S. et al. Técnicas de secagem de frutas: uma revisão. **Scientific Electronic Archives**, v. 14, n. 10. 2021.

TELES ASC et al. Effect of temperature on the degradation of bioactive compounds of Pinot Noir grape pomace during drying. *Brazilian Journal of Food Technology* (2018) 21:1.

VIMERCATI, W. C. et al. Efeito da temperatura na cinética de secagem em leito de espuma e na degradação de antocianina em morango. **Brazilian Journal of food technology**, v. 22, p. 2018221, 2019.

VIGNOLI, J.; BASSOLI, D.; BENASSI, M. Antioxidant, activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry* , v. 124, n. 3, p. 863-868, 2011.

YANG B, LIU P. Composition and Biological Activities of Hydrolyzable Tannins of Fruits of *Phyllanthus emblica*. *Journal of agricultural and food chemistry* (2014) 62:3. 529-541.

6. CONCLUSÃO FINAL

O presente estudo, de caráter pioneiro, elucidou que a combinação das infusões de duas espécies de frutas vermelhas, amora e framboesa, não potencializa suas atividades antioxidantes, sendo mais ativas em suas infusões em monodroga, contrapondo as alegações publicitárias sobre “chás de frutas vermelhas”. Em relação ao estudo de estabilidade, trata-se do primeiro estudo a analisar a influência do tempo e temperatura sobre as drogas vegetais e suas influências nas degradações de compostos bioativos e atividades antioxidantes de suas infusões, tendo a estabilidade resultante como satisfatória.

A avaliação da atividade antioxidante confirmou que apenas a infusão de amora, *R. fruticosus*, apresentou efeito protetor contra os danos oxidativos causados pelo peróxido de hidrogênio, enquanto todas as infusões demonstraram atividade antioxidante pela redução na produção do ânion superóxido, sendo que a framboesa, *R. ideaus*, se destacou. As combinações, apesar de antioxidantes, não demonstraram efeito em potencializar a atividade antioxidante, sendo menos ativas que as infusões em monodrogas.

Todas as infusões apresentaram atividade anti-inflamatória, sendo capazes de reduzir a produção de óxido nítrico, sendo que framboesa apresentou maior atividade em todas as concentrações testadas. As infusões em monodrogas, amora e framboesa, também tiveram maior impacto sobre a redução da expressão da citocina IL-1, sendo que neste método a amora apresentou melhor efeito anti-inflamatório.

O estudo de estabilidade acelerado foi conclusivo como satisfatório, demonstrando que as drogas vegetais de *R. ideaus* e *R. fruticosus* apresentaram expressiva atividade antioxidante, cumprindo seu propósito, com qualidade e segurança durante os seis meses do estudo. Isso indica que essas drogas vegetais podem ser armazenadas em temperatura ambiente por até um ano, desde que vedadas e ao abrigo do sol, para a finalidade de realizar infusões com benefício antioxidante.

Esses achados abrem perspectivas para futuras investigações sobre a aplicação da *R. fruticosus* e *R. ideaus* como chás medicinais, incluindo investigações em modelos *in vivo* e ensaios clínicos. Ademais, considerando o uso popular dessas infusões e seu potencial funcional, pesquisas futuras poderiam avaliar a inclusão destas espécies na Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, bem como

a aprovação dessas espécies vegetais pela ANVISA para uso como Suplementos alimentares pelos seus notáveis conteúdos de compostos fenólicos.

Além disso, é interessante a realização de estudo de estabilidade dessas substâncias a longo prazo e durante o processamento industrial, dando continuidade aos resultados do presente estudo, bem como avaliação da biodisponibilidade dos compostos bioativos e a possível implementação dessas espécies em estratégias terapêuticas antioxidantes e anti-inflamatórias.

7. MATERIAIS SUPLEMENTARES

7.1. LAUDOS DOS FRUTOS

	FICHA TÉCNICA DE PRODUTO	Código
		DM/FT-F08 01
TÍTULO:	AMORA IQF	

1. DESCRIÇÃO

Amoras inteiras congeladas, obtidas a partir de frutas selecionadas.

- **Ingredientes:** Amora preta (*Rubus fruticosus*)

2. ESPECIFICAÇÕES

- **Sensoriais:**

Parâmetros	Especificações
Cor	Característico.
Odor	Característico, livre de odores estranhos.
Sabor	Característico, sem sabores estranhos.
Aspecto	Congelada inteira IQF.

- **Defeitos:**

Parâmetros	Especificações
Cabos, talo	Máx. 15 unidades a cada 12 kg
Deformidades (pontos pretos, podridão, danos causados pelo sol, etc)	Máx. 1%
Folha, grama, flores	Máx. 1 unidade a cada 12 kg
Materiais estranhos tais como: madeira, plástico, nylon, areia, lama, insetos, fragmentos de insetos, cabelo, larvas, pedras, etc	Ausente

- **Físico-Químicos:**

Parâmetros de liberação	Especificações	CA	Métodos
°Brix (20°C)	Min. 7,5	X	DM IO LB 59
pH	2,6 – 3,9	X	DM IO LB 74
Acidez (ml NaOH 0,1N / 10g)	9 – 30	X	DM IO LB 04
Acidez (% ácido cítrico)	0,5 – 2,0	X	DM IO LB 04

- **Microbiológicos:**

Parâmetros de liberação	Especificações	CA	Métodos
<i>E. coli</i>	< 10 UFC/g	X	DM IO LB 53
<i>Salmonella</i> sp	Ausente/25g	X	DM IO LB 86

Fonte: IN 161 de 2022 (Item 1B).

*CA: Certificado de análise – laudo em todo lote.



Responsáveis:	Rubricas:	Data aprovação	31/07/2023	
Elaboração:	Roberta Celestrino	Versão	15	
Aprovação:	Jussara De Marchi Miqueletto	Data versão anterior	21/11/2022	

TÍTULO:	AMORA IQF	Página 2/2	Código DM/FT-F08 01
----------------	------------------	-----------------------------	--------------------------------------

3. EMBALAGEM

Códigos internos	Embalagem
104100121	300 g – Saco de polietileno em caixa de papelão com 6 kg
101122412	450 g – Cumbucas de plástico em caixa de papelão com 4,5 kg
101122242	1,02 kg – Saco de polietileno em caixa de papelão com 10,2 kg
101122371	12 kg – Saco de polietileno em caixa de papelão

4. ROTULAGEM

No rótulo do produto constam as seguintes informações: Nome do produto; dados do fabricante (nome, endereço, CNPJ, Telefone); nº lote; validade; peso líquido; condições de armazenagem.

- Para a embalagem 300g incluir: Produzido e embalado por Fragole Produtos Alimentícios Ltda. Comercializado por De Marchi Ind. e Com. De Frutas Ltda.

5. TRANSPORTE

Deverá ser transportado em caminhão refrigerado, fechado, ao abrigo de chuva e poeira, protegido de forma adequada que garanta a integridade do produto e sem a presença de outros materiais que possam contaminá-lo com substâncias estranhas. Em nenhum momento durante a distribuição a temperatura deve ser maior que -15°C, conforme legislação vigente.

6. ARMAZENAGEM

Deve ser armazenado em embalagem fechada, em câmara fria com temperatura controlada ideal de -18°C (-16°C a -20°C) em local livre de sujidades, protegido da luz e do ataque de insetos e roedores.

7. PRAZO DE VALIDADE

2 anos, mantidas as condições de armazenagem.

8. INFORMAÇÃO NUTRICIONAL

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL		
Porção: 100 g		
	100g	%VD*
Valor energético (kcal)	43	2
Carboidratos totais (g)	9,6	3
Açúcares totais (g)	0,6	
Açúcares adicionados (g)	0	0
Proteínas (g)	1,4	3
Gorduras totais (g)	0,5	1
Gorduras saturadas (g)	0	0
Gorduras trans (g)	0	
Fibra alimentar (g)	5,3	21
Sódio (mg)	1	0
*Percentual de valores diários fornecidos pela porção.		

9. REGISTRO NO MINISTÉRIO DA SAÚDE

Esse produto é isento de registro conforme legislação vigente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.



	FICHA TÉCNICA DE PRODUTO	Código
		DMFT-F36 01
TÍTULO:	FRAMBOESA IQF	

1. DESCRIÇÃO

Framboesas inteiras congeladas, obtidas a partir de frutas selecionadas.

- **Ingredientes:** Framboesa (*Rubus idaeus*)

2. ESPECIFICAÇÕES

- **Sensoriais:**

Parâmetros	Especificações
Cor	Característico.
Odor	Característico, livre de odores estranhos.
Sabor	Característico, sem sabores estranhos.
Aspecto	Congelado.

- **Defeitos:**

Parâmetros	Especificações
Blocados, albinas, crumble / quebradas, frutos passados	Máx. 5%
Deformidades (pontos pretos, podridão, danos causados pelo sol, danos causados por insetos, etc)	Máx. 1%
Folha, caules, etc.	Máx. 3 unidades a cada 12 kg
Grama, flores, sementes	Máx. 1 unidade a cada 12 kg
Materiais estranhos tais como: madeira, plástico, nylon, areia, lama, insetos, fragmentos de insetos, cabelo, larvas, pedras, etc	Ausente

- **Físico-Químicos:**

Parâmetros de liberação	Especificações	CA	Métodos
Brix (20°C)	7 – 13	X	DM IO LB 59
pH	2,7 – 3,4	X	DM IO LB 74
Acidez (ml NaOH 0,1N / 10g)	22 – 34	X	DM IO LB 04
Acidez (% ácido cítrico)	1,4 – 2,2	X	DM IO LB 04

- **Microbiológicos:**

Parâmetros de liberação	Especificações	CA	Métodos
<i>E. coli</i>	< 10 UFC/g	X	DM IO LB 53
<i>Salmonella</i> sp	Ausente/25g	X	DM IO LB 86

Fonte: IN 161 de 2022 (Item 1B).

*CA: Certificado de análise – laudo em todo lote.

DE MARCHI

CÓPIA NÃO
CONTROLADA

Responsáveis:	Rubricas:	Data aprovação	21/11/2022
Elaboração: Roberta Celestrino		Versão	16
Aprovação: Jussara De Marchi Miqueletto		Data versão anterior	10/05/2022

TÍTULO:	FRAMBOESA IQF	Página 2/2	Código DM/FT-F36 01
----------------	----------------------	-----------------------------	--------------------------------------

3. EMBALAGEM

Códigos internos	Embalagem
101128712	450g – Cumbucas de plástico em caixa de papelão com 4,5 kg
101128713	450g – Cumbucas de plástico em caixa de papelão com 5,4 kg
101128792	1,02 kg – Saco de polietileno em caixa de papelão com 10,2 kg
101128723	1,2 kg – Saco de polietileno em caixa de papelão com 10,8 kg

4. ROTULAGEM

No rótulo do produto constam as seguintes informações:

Nome do produto; dados do fabricante (nome, endereço, CNPJ, telefone); informação nutricional; nº lote; validade; peso líquido; ingredientes; condições de armazenagem.

5. TRANSPORTE

Deverá ser transportado em caminhão refrigerado, fechado, ao abrigo de chuva e poeira, protegido de forma adequada que garanta a integridade do produto e sem a presença de outros materiais que possam contaminá-lo com substâncias estranhas. Em nenhum momento durante a distribuição a temperatura deve ser maior que -15°C, conforme legislação vigente.

6. ARMAZENAGEM

Deve ser armazenado em embalagem fechada, em câmara fria com temperatura ideal controlada a -18°C (-16°C a -20°C) em local livre de sujidades, protegido da luz e do ataque de insetos e roedores.

7. PRAZO DE VALIDADE

2 anos, mantidas as condições de armazenagem.

8. INFORMAÇÃO NUTRICIONAL

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL		
Porção: 100 g		
	100g	%VD*
Valor energético (kcal)	52	3
Carboidratos totais (g)	12	4
Açúcares totais (g)	4,2	
Açúcares adicionados (g)	0	0
Proteínas (g)	1,2	2
Gorduras totais (g)	0,6	1
Gorduras saturadas (g)	0	0
Gorduras trans (g)	0	
Fibra alimentar (g)	6	24
Sódio (mg)	1	0

*Percentual de valores diários fornecidos pela porção.

9. REGISTRO NO MINISTÉRIO DA SAÚDE

Esse produto é isento de registro conforme legislação vigente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

