

# Avaliação do teor em compostos fenólicos e atividade antioxidante de folhas de videira com vista ao seu aproveitamento para uso alimentar

## Evaluation of the phenolic content and antioxidant activity of grapevine leaves in order to use them as food

Adriano Freitas Lima<sup>1,2</sup>, Albino Bento<sup>1</sup>, José Alberto Pereira<sup>1</sup>, Ilton José Baraldi<sup>2</sup> e Ricardo Malheiro<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal

<sup>2</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Medianeira, Avenida Brasil, 4232 – Bairro Independência – CEP 85884-000, Medianeira, Paraná, Brasil

(\*E-mail: rmalheiro@ipb.pt)

<http://dx.doi.org/10.19084/RCA16223>

Recebido/received: 2016.12.22

Recebido em versão revista/received in revised form: 2017.03.24

Aceite/accepted: 2017.03.27

### RESUMO

A videira (*Vitis vinifera* L.) é uma das plantas mais cultivadas em Portugal, sendo que as suas folhas não têm praticamente utilização. Trabalhos recentes demonstraram que são constituídas por uma série de componentes que lhe conferem propriedades e funções de elevada importância. No presente trabalho, pretendeu-se avaliar as folhas de diferentes castas de videira no que respeita ao seu teor em antioxidantes e bioatividade com vista à sua inclusão na dieta humana.

A partir de 10 castas de videira, quatro tintas (Tinta Amarela, Tinta Roriz, Touriga Franca e Touriga Nacional) e seis brancas (Côdega do Larinho, Fernão Pires, Gouveio, Malvasia Fina, Rabigato e Viosinho) cultivadas no Planalto Mirandês, e colhidas amostras de folhas sãs, foram obtidos resultados que indicaram que as castas brancas têm maior teor em componentes bioativos e potencial antioxidante, sendo as folhas da casta Malvasia Fina as que apresentaram maior interesse para serem processadas e incluídas como ingrediente na dieta humana.

**Palavras-chave:** *Vitis vinifera* L., folhas de videira, composição fitoquímica, atividade antioxidante.

### ABSTRACT

Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is one of the most cultivated plants in Portugal, and its leaves have practically no use. Recent studies have shown that the leaves consist of a range of components that confer properties and functions of huge importance. The present study aimed to assess the leaves from different grape varieties regarding their antioxidants content and bioactivity in order to include in the human dietary.

From the 10 grape varieties, four red (Tinta Amarela, Tinta Roriz, Touriga Franca e Touriga Nacional) and six white (Côdega do Larinho, Fernão Pires, Gouveio, Malvasia Fina, Rabigato and Viosinho) grown in the Planalto Mirandês, samples were harvested from healthy leaves and the results obtained indicated that the white varieties have the most interesting antioxidant potential and bioactive components, being the leaves of Malvasia Fina those with the greatest potential to be processed and included as an ingredient in the human diet.

**Keywords:** *Vitis vinifera* L., grape leaves, phytochemical composition, antioxidant activity.

## INTRODUÇÃO

Pertencente à família *Vitaceae*, a videira, do Latim *Vitis*, é composta por muitas espécies distribuídas mundialmente, sendo essencialmente reconhecida devido à produção de uva, que é utilizada em grande escala para consumo “*in natura*” ou até mesmo para elaboração de diferentes matérias-primas (Teixeira *et al.*, 2002).

O continente Europeu tem uma grande produção de uva com uma produção de cerca de 26,5 milhões de toneladas comparativamente às 77 milhões de toneladas produzidas mundialmente. Portugal produz 828 mil toneladas de uva em 179,5 mil hectares, ou seja 4,94% da área agrícola nacional (FAO, 2013). Embora a videira seja uma cultura muito importante em Portugal, os seus subprodutos, como é o caso da folha, são desvalorizados. Tendo a videira uma grande representatividade de produção foliar, seria importante fomentar novas maneiras de valorizar este subproduto. A folha de videira é utilizada para consumo humano em várias regiões do mundo, principalmente em países do Norte de África e no Médio-Oriente (Harb *et al.*, 2015), bem como na América do Sul, nomeadamente no Brasil. Nesta perspetiva, o presente trabalho visa realizar um estudo preliminar para prospektar possíveis castas, brancas e

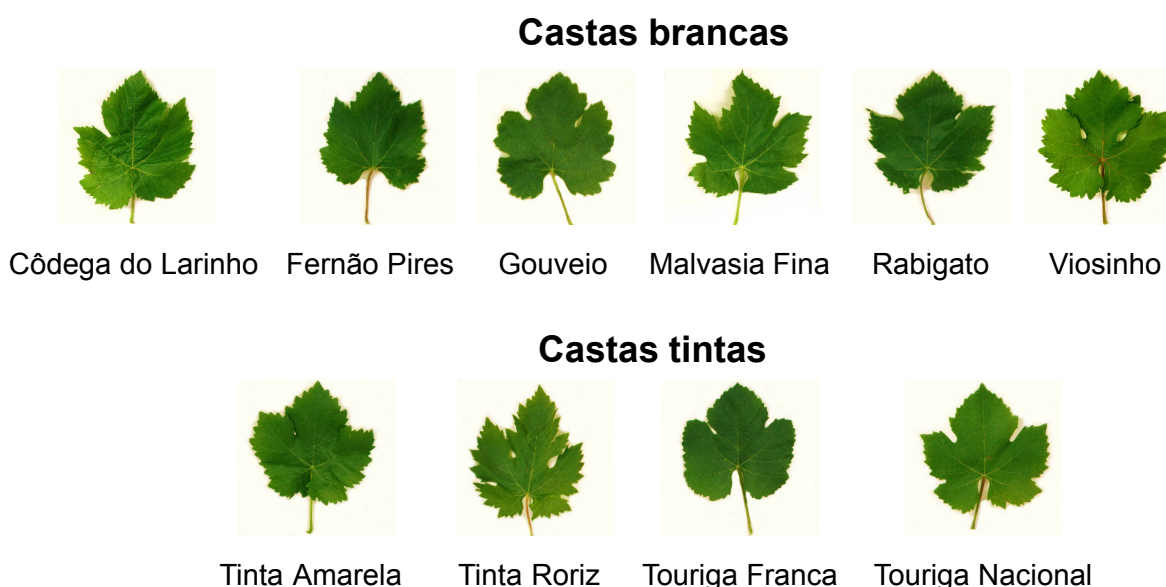
tintas, que possam ter valor fitoquímico, para o seu posterior processamento tecnológico e inclusão na dieta humana. Desta forma as folhas de videira ricas em antioxidantes seriam incluídas na dieta humana, reduzindo a quantidade de resíduos da vinha e criando-se assim uma estratégia de valorização deste subprodutos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Amostras e preparação dos extratos*

Foram selecionadas 10 castas, seis brancas (Côdega do Larinho, Fernão Pires, Gouveio, Malvasia Fina, Rabigato and Viosinho) e quatro tintas (Tinta Amarela, Tinta Roriz, Touriga Franca e Touriga Nacional), apresentadas na Figura 1, tendo sido colhidas três amostras independentes por casta, totalizando 30 amostras, de folhas sãs.

As amostras foram congeladas e liofilizadas sendo os extratos aquosos realizados da seguinte forma: 5 g de folhas liofilizadas e trituradas foram adicionadas a 250 mL de água destilada em ebulição durante 45 minutos, seguido de filtração com papel de filtro Whatman n.º 4. O filtrado foi posteriormente liofilizado para obter o extrato seco. O extrato foi redissolvido em água destilada a



**Figura 1** - Folhas de castas de videira em estudo provenientes do Planalto Mirandês.

50 mg mL<sup>-1</sup>, sendo preparadas concentrações que variaram entre 0,01 e 2 mg mL<sup>-1</sup> e foram aplicadas em todos os métodos em estudo, salvo exposto o contrário.

### *Atividade antioxidante*

#### Atividade sequestradora do radical DPPH

A análise de avaliação da atividade sequestradora realizada pelo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) foi verificada de acordo com o procedimento descrito por Lima *et al.* (2016). A 0,3 mL de cada concentração foram adicionados 2,7 mL de uma solução metanólica de DPPH (6 × 10<sup>5</sup> mol L<sup>-1</sup>). A mistura foi colocada no escuro durante 1 hora e o comprimento de onda foi lido a 517 nm.

A percentagem de inibição foi calculada pela descoloração da solução com DPPH, a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição} = \left( \frac{\text{Abs}_{\text{branco}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{branco}}} \right) \times 100$$

Onde: Abs<sub>branco</sub> corresponde à absorvância da solução de DPPH; Abs<sub>amostra</sub> à absorvância da solução com o extrato da amostra. A concentração de extrato que promove 50% de inibição (EC<sub>50</sub>) foi calculada por percentagem do efeito bloqueador em função da concentração de extrato da análise, analisada por representação gráfica.

#### Atividade sequestradora do radical ABTS (ABTS•+)

De acordo com o método descrito por Samaniego Sánchez *et al.* (2007), a 25 mL de ABTS (7 mmol L<sup>-1</sup>) foram adicionados 440 µL de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (140 mmol L<sup>-1</sup>), permanecendo a solução no escuro entre 12 a 16 horas. Após esse período obteve-se uma solução ajustada com absorvância 0,70±0,02 a 734 nm através da solução dissolvida em etanol. A cada 2 mL da solução ajustada de ABTS adicionaram-se 100 µL de extrato das várias concentrações testadas.

A percentagem de inibição dos radicais de ABTS foi calculada pela descoloração da solução a partir

da seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição} = \left( \frac{\text{Abs}_{\text{solução ajustada}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{solução ajustada}}} \right) \times 100$$

Onde: Abs<sub>solução ajustada</sub> corresponde ao valor de absorvância 0,70±0,02; Abs<sub>amostra</sub> ao valor da amostra em solução ABTS. O EC<sub>50</sub> foi calculado de mesmo modo à análise de DPPH.

#### Capacidade redutora total pelo método Folin-Ciocalteu

A capacidade redutora total (CRT) foi avaliada com base no procedimento descrito por Lima *et al.* (2016). Fez-se a mistura de 1 mL de amostra (0,5 e 1 mg mL<sup>-1</sup>), 1 mL de Folin-Ciocalteu, 1 mL de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e 7 mL de água destilada. Toda a mistura permaneceu 90 minutos ao abrigo de luz, logo procedeu-se com a leitura da absorvância a 725 nm. O ácido gálico foi usado para a construção de uma reta de calibração (concentrações que variaram entre 0,001 e 1 mM), sendo os resultados expressos em mg miliequivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg AG g<sup>-1</sup>).

#### Determinação do poder redutor

A determinação da capacidade do agente redutor (antioxidante) foi baseada na metodologia descrita por Berker *et al.* (2007). Foram misturados 1 mL de cada concentração do extrato em 2,5 mL de solução tampão (fosfato de sódio a 200 mmol L<sup>-1</sup>) com pH=6,6 e 2,5 mL de ferricianeto de potássio (1%). Toda essa mistura foi agitada vigorosamente e incubada a 50°C durante 20 minutos. Após arrefecimento, foram adicionados 2,5 mL de ácido tricloroacético (10%). Em seguida retirou-se 2,5 mL de sobrenadante e misturou-se com 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico (0,1%). A absorvância foi lida a 700 nm após 2 minutos de repouso da última agitação.

A concentração de extrato a que corresponde uma absorvância de 0,5 é definida como EC<sub>50</sub> e foi calculada em função da concentração de extrato testada.

### Avaliação de diferentes grupos fenólicos

A partir da metodologia descrita por Boulanouar *et al.* (2013), foram adicionados 1 mL de uma solução de etanol a 96% contendo 0,1% de ácido clorídrico a 2% em 1 mL das concentrações do extrato (0,5 e 1 mg mL<sup>-1</sup>). Ácido clorídrico a 2% foi adicionado às amostras até se obter um volume total de 10 mL, sendo, em seguida, agitado vigorosamente. Os valores da absorvância foram lidos a 280 nm para a determinação dos fenóis totais, usando ácido gálico (AG) como padrão (0,001 e 1 mM), a 320 nm para determinar os derivados do ácido hidroxicinâmico (DAH), usando do ácido cafeico (AC) como padrão (0,001 e 1 mM), e a 360 nm para definir os flavonóis, usando a quercetina (Q) como padrão (0,001 e 0,5 mM). Os resultados foram expressos em mg equivalentes do respectivo padrão usado por grama de extrato: mg AG g<sup>-1</sup>; mg AC g<sup>-1</sup>; e mg Q g<sup>-1</sup>.

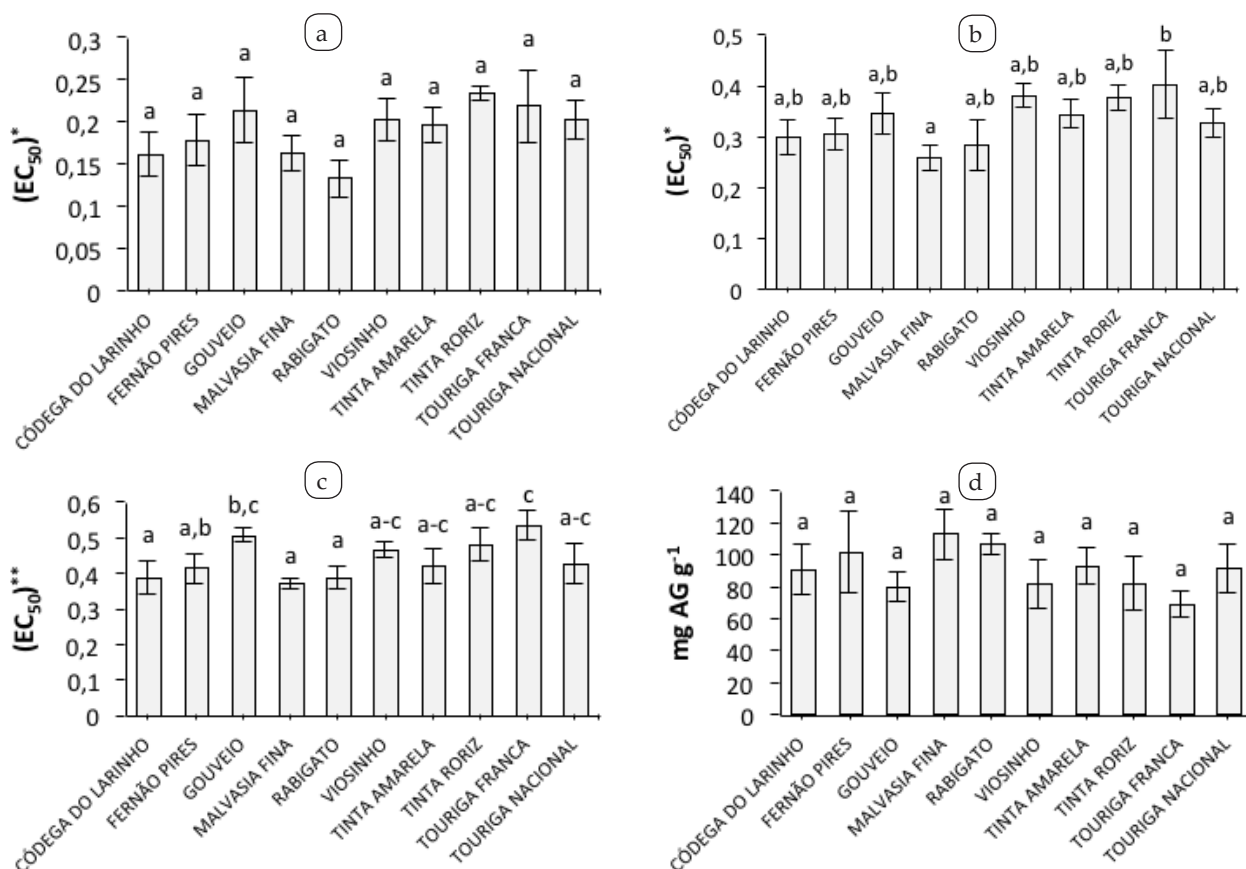
### Análise estatística

Os dados obtidos nas 10 castas de videira foram avaliados através de análise de variância usando o teste de Tukey de comparações múltiplas ou o teste de Dunnett T3 também dependendo se a igualdade de variâncias foi assumida ou não. Todos os testes foram realizados com um nível de significância de 5%. Foi também realizada uma análise de componentes principais (ACP). Todos os tratamentos estatísticos foram realizados com o software SPSS, versão 22.0 (IBM Corporation, Nova Iorque, E.U.A.).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Atividade antioxidante

Todas as amostras em estudo foram avaliadas através de dois tipos de testes antioxidantes *in vitro*:



**Figura 2** - Atividade antirradicalar para os métodos DPPH (A), ABTS (B), poder redutor (C), e capacidade redutora (D) dos extratos aquosos obtidos das folhas de 10 castas de videira. Dentro de cada componente estudado, valores médios com letras diferentes, diferem significativamente ( $P < 0,05$ ). \* $EC_{50}$  (mg mL<sup>-1</sup>): Concentração efetiva capaz de inibir 50% dos radicais livres; \*\* $EC_{50}$  (mg mL<sup>-1</sup>): Concentração efetiva cuja absorvância a 700 nm é 0,5.

métodos de atividade antirradicalar (DPPH e ABTS) e métodos de capacidade redutora (poder redutor e CRT), sendo os resultados apresentados na Figura 2.

Na análise de DPPH, verificaram-se diferenças significativas entre as amostras ( $P < 0,001$ ). Os valores de  $EC_{50}$  variaram entre 0,133 e 0,234  $mg mL^{-1}$ , respetivamente nas castas Còdega do Larinho e Tinta Roriz.

Na análise de ABTS houve diferenças estatísticas ( $P < 0,001$ ), tendo apresentado a Malvasia Fina e a Touriga Franca os menores (0,258  $mg mL^{-1}$ ) e maiores (0,402  $mg mL^{-1}$ ) valores de  $EC_{50}$ , respetivamente. Quando avaliado o poder redutor de cada casta, verificaram-se diferenças significativas entre as amostras ( $P < 0,001$ ), onde a casta Touriga Franca apresentou elevado valor de  $EC_{50}$  (0,534  $mg mL^{-1}$ ), enquanto mais uma vez a casta Malvasia Fina apresentou menor valor (0,371  $mg mL^{-1}$ ).

Na CRT também se verificaram diferenças significativas ( $P < 0,001$ ) porém a casta Malvasia Fina apresentou maior CRT, com 115,0  $mg AG g^{-1}$ , enquanto a casta Touriga Franca apresentou menor CRT com 72,5  $mg AG g^{-1}$ .

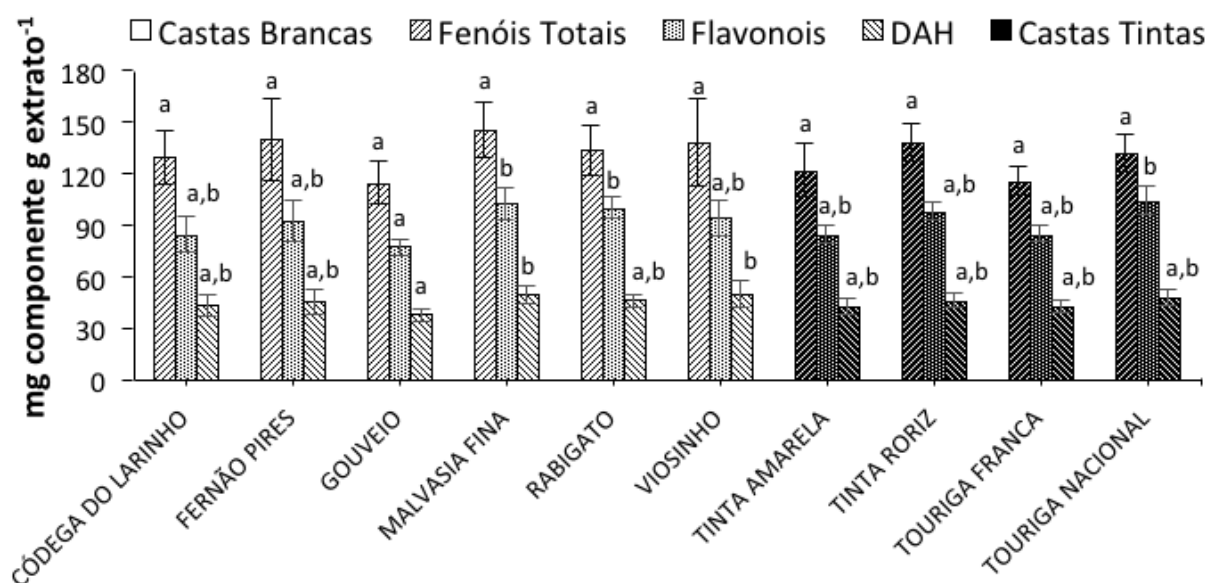
Os resultados obtidos na atividade antioxidante, nomeadamente nos valores de  $EC_{50}$  do DPPH e poder

reductor, estão em consonância com os resultados obtidos em outras castas Portuguesas avaliadas através do mesmo tipo de extração, atribuindo às castas brancas estudadas, na generalidade, uma maior atividade antioxidante (Fernandes *et al.*, 2013). No entanto os resultados obtidos na CRT foram abaixo do obtido por Fernandes *et al.* (2013). Vários fatores poderão explicar esta diferença, como fatores edafoclimáticos, práticas culturais, época de colheita, entre outros (Katalinic *et al.*, 2013).

Com vista a estimar as castas com maior potencial bioativo para processamento alimentar, tomou-se em consideração, além da atividade antioxidante, a composição em componentes bioativos, como os compostos fenólicos.

#### Diferentes grupos fenólicos

Realizou-se também o estudo da composição fitoquímica das castas em estudo, nomeadamente o teor em compostos fenólicos, derivados do ácido hidroxicinâmico e flavonóis, sendo os dados obtidos apresentados na Figura 3. Verificaram-se diferenças significativas para os teores de fenóis totais ( $P < 0,001$ ), variando entre 112  $mg AG g^{-1}$  nas castas Gouveio e Touriga Franca, e 150  $mg AG g^{-1}$  na casta Malvasia Fina (Figura 3). Em relação



**Figura 3** - Composição em fenóis totais ( $mg AG g extrato^{-1}$ ), flavonóis ( $mg Q g extrato^{-1}$ ) e derivados do ácido hidroxicinâmico (DAH) ( $mg AC g extrato^{-1}$ ) nos extratos aquosos das folhas das 10 castas de videira. Dentro de cada componente estudado, valores médios com letras diferentes, diferem significativamente ( $P < 0,05$ ).

ao teor em flavonóis, as castas Malvasia Fina, Rabigato e Touriga Nacional apresentaram teores superiores. A variação dos derivados do ácido hidroxicinâmico mostrou ser também significativa nas diferentes castas ( $P=0,027$ ), apresentando a casta Gouveio um teor reduzido, enquanto a Malvasia Fina e Viosinho apresentaram valores mais elevados.

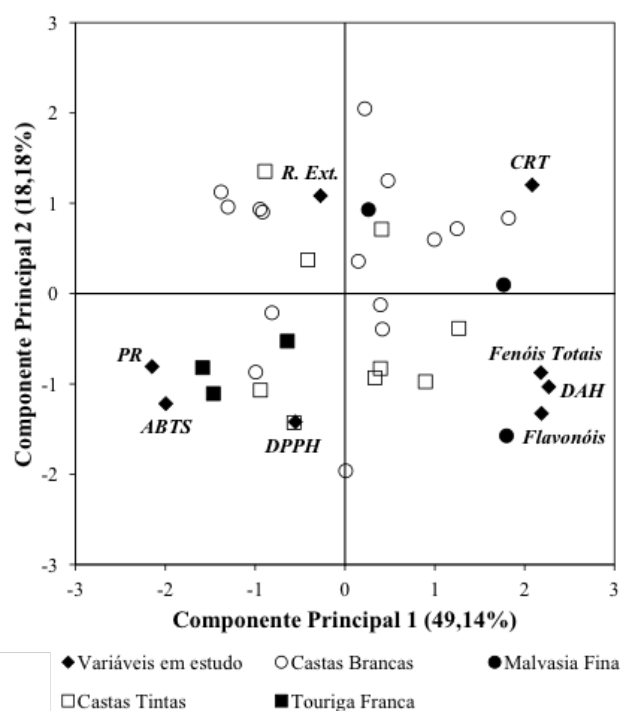
Os valores de fenóis totais apresentados são superiores aos reportados por Fernandes *et al.* (2013), onde se avaliou o perfil fenólico de folhas de videira de castas brancas e tintas por cromatografia líquida.

Através da avaliação destes grupos de compostos bioativos, juntamente com os dados obtidos na atividade antioxidante, verificamos correlações significativas. Para os valores de fenóis totais obtidos e a análise de DPPH não houve correlação significativa ( $R^2=0,023$ ;  $P=0,422$ ;  $y=246,3x+165,5$ ). Tal facto já tinha sido constatado por Fernandes *et al.* (2013). Porém, em relação às análises de ABTS e poder redutor, houve uma correlação muito significativa ( $R^2=0,271$ ;  $P=0,003$ ;  $y=143,7x+178,4$  e  $R^2=0,290$ ;  $P=0,002$ ;  $y=135,6x+190,3$  respetivamente). Assim, com uma redução do teor em fenóis totais, possivelmente maior será a quantidade de extrato necessária para atingir o  $EC_{50}$  nas análises com correlação significativa, o que implica uma menor atividade antioxidante.

Com base nos resultados obtidos na atividade antioxidante e no teor em compostos bioativos, verificou-se de uma maneira geral que as castas brancas possuem um maior potencial bioativo e maior teor em compostos bioativos. À partida, esta constatação além de estar relacionada com o maior teor em fenóis presente nas castas brancas poderá ser devido à composição em outros componentes como flavonóis e estilbenos, em folhas colhidas em agosto e setembro (Katalinic *et al.*, 2013). Balík *et al.* (2008) também mostraram que as folhas das castas brancas são as dominantes em trans-resveratrol, trans-piceid (derivado do resveratrol) e no ácido caftárico, quando comparados às castas tintas.

Esta diferenciação entre castas também foi observada quando os dados obtidos foram usados numa Análise de Componentes Principais (ACP) (Figura 4), onde na generalidade é visível

a separação das castas brancas e castas tintas. Na região positiva da componente principal 1 está representada a casta Malvasia Fina (casta branca) uma vez que apresentou elevados teores de fenóis totais, derivados do ácido hidroxicinâmico e flavonóis. No extremo oposto está representada a casta Touriga Franca, que apresentou na generalidade valores mais elevados de  $EC_{50}$  principalmente no ABTS e poder redutor. Isto implica que esta casta foi a que apresentou menor atividade antioxidante.



**Figura 4** - Análise de componentes principais obtida a partir dos dados da atividade antioxidante e composição em compostos bioativos de folhas de videira de 10 castas. As componentes principais explicam 67,32% da variância total dos dados.

## CONCLUSÕES

No presente trabalho, na generalidade as castas brancas estudadas foram aquelas que apresentaram melhores respostas à atividade antioxidante e composição em compostos bioativos. Uma avaliação entre diversas variedades, através da interpretação dos dados obtidos para as análises dentro da atividade antioxidante e da composição

em compostos bioativos, juntamente com a interpretação dos dados obtidos na ACP, permitiu concluir que a casta branca, Malvasia Fina, é potencialmente a melhor, de entre as estudadas, para ser utilizada no processamento alimentar para posteriormente ser incluída na dieta humana.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi financiado pelo PRODER através do projeto “Proteção da videira contra pragas e doenças em modo de produção biológico para obtenção para obtenção de vinho biológico” (n.º 47476).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balík, J.; Kyseláková, M.; Vrchotová, N.; Tříška, J.; Kumšta, M.; Veverka, J.; Híc, P.; Totušek, J. & Lefnerová, D. (2008) – Relations between Polyphenols Content and Antioxidant Activity in Vine Grapes and Leaves. *Czech Journal of Food Sciences*, vol. 26, p. S25-S32.
- Berker, K.I.; Güçlü, K.; Tor, I. & Apak, R. (2007) – Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, vol. 72, n. 3, p. 1157-1165. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2007.01.019>
- Boulanouar, B.; Abdelaziz, G.; Aazza, S.; Gago, C. & Miguel, M.G. (2013) – Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products*, vol. 46, p. 85-96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.01.020>
- FAO (2013) – *FaoStat Database*. [cit. 2016.05.10]. <http://faostat3.fao.org/>
- Fernandes, F.; Ramalhosa, E.; Pires, P.; Verdial, J.; Valentão, P.; Andrade, P.; Bento, A. & Pereira, J.A. (2013) – *Vitis vinifera* leaves towards bioactivity. *Industrial Crops and Products*, vol. 43, p. 434-440. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.031>
- Harb, J.; Alseekh, S.; Tohge, T. & Fernie, A.R. (2015) – Profiling of primary metabolites and flavonols in leaves of two table grape varieties collected from semiarid and temperate regions. *Phytochemistry*, vol. 117, p. 444-455. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.07.013>
- Katalinic, V.; Mozina, S.S.; Generalic, I.; Skroza, D.; Ljubenkovic, I. & Klancnik, A. (2013) – Phenolic profile, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of leaf extracts from six *Vitis vinifera* L. varieties. *International Journal of Food Properties*, vol. 16, n. 1, p. 45-60. <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2010.526274>
- Lima, A.; Bento, A.; Baraldi, I. & Malheiro, R. (2016) – Selection of grapevine leaf varieties for culinary process based on phytochemical composition and antioxidant properties. *Food Chemistry*, vol. 212, p. 291-295. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.177>
- Samaniego Sánchez, C.; Troncoso González, A.M.; García-Parrilla, M.C.; Quesada Granados, J.J.; López García de la Serrana, H. & López Martínez, M.C. (2007) – Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta*, vol. 593, n. 1, p. 103-107. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2007.04.037>
- Teixeira, A.H.D.C.; Souza, R.A. de; Ribeiro, P.H.B.; Reis, V.C. da S. & Santos, M. das G.L. dos (2002) – Aptidão agroclimática da cultura da videira no Estado da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, vol. 6, n. 1, p. 107-111. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662002000100019>