

DM

**Determinação de Compostos Bioativos
em Frutas e Vegetais Consumidos
na Região Autónoma da Madeira**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Joselin Maria Vieira de Aguiar

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA



UNIVERSIDADE da MADEIRA

A Nossa Universidade

www.uma.pt

junho | 2017

**Determinação de Compostos Bioativos
em Frutas e Vegetais Consumidos
na Região Autónoma da Madeira**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Joselin Maria Vieira de Aguiar

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

ORIENTADOR
José de Sousa Câmara

AGRADECIMENTOS

Na realização desta tese de mestrado contei com a confiança e o apoio de inúmeras pessoas. Em primeiro lugar, aos meus pais José e Luz Maria e ao meu irmão José Manuel, um muito obrigado por tudo, pelos seus incentivos, força e amor transmitido nesta etapa.

Ao meu orientador, o Professor Doutor José S. Câmara, que expressei o meu profundo agradecimento pela oportunidade, orientação e o apoio incondicional. Agradeço também a oportunidade que me deu de me integrar no seu grupo de investigação e a confiança que depositou em mim desde o início, como também o sentido de responsabilidade que me deu em todas as fases do meu projeto.

Um agradecimento especial ao meu namorado João Gonçalves pelo carinho, disponibilidade, incentivo, apoio e colaboração em todos os momentos desde o início da tese.

Igualmente, agradeço às minhas colegas e amigas de laboratório, a Vera Alves, e a Mariengie Martinez pela sua amizade e apoio expresso desde o início do mestrado.

Ao Centro de Química da Madeira (CQM) e à Universidade da Madeira (UMa) que me proporcionaram os meios necessários para a realização da minha tese.

E a todas as pessoas que de forma direta ou indireta auxiliaram na execução deste trabalho.

RESUMO

Os compostos bioativos são metabolitos secundários que ocorrem em pequenas quantidades nas plantas. Para além de atuarem como sistema de defesa, estes compostos também contribuem para o bem-estar humano, devido à sua eficiente ação antioxidante, anticancerígena, antimicrobiana, entre outros. Neste trabalho, foram analisadas a composição bioativa e a atividade antioxidante de 11 amostras vegetais, tipicamente, consumidas na RAM, nomeadamente a beterraba, cebola roxa e amarela, cenoura laranja e branca, agrião, brócolos, espinafres, alho, tomate e tomate inglês. Através dos extratos metanólicos obtidos destas matrizes, quantificou-se o teor total dos compostos fenólicos, de flavonoides, de antocianinas, de betalaínas e de carotenoides. A capacidade antioxidante foi, igualmente testada através dos métodos DPPH, ABTS e FRAP, tendo-se verificado maior atividade nas amostras de cebola roxa, tomate inglês e beterraba. Utilizando a metodologia de extração QuEChERS seguida de análise por cromatografia líquida de ultra-eficiência (UHPLC), foi possível identificar e quantificar alguns polifenóis da polpa destas matrizes, onde a catequina e os ácidos gentísico e ferúlico foram os polifenóis mais abundantes. Adicionalmente, efetuou-se o estudo da composição volátil destas amostras, com recurso à microextração em fase sólida (HS-SPME) seguida de análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espetrometria de massa (GC-MS). Foram identificados 320 compostos voláteis pertencentes a diferentes famílias químicas. Com base nos resultados obtidos, verificou-se que os compostos terpénicos são predominantes na beterraba (61%), na cenoura laranja (58%) e na cenoura branca (61%), enquanto que os compostos organossulfurados foram encontrados quase exclusivamente nas amostras de cebola, alho e agrião. Os álcoois e aldeídos são os grupos de compostos voláteis predominantes nos brócolos e nos espinafres, enquanto que os frutos da família *Solanaceae*, são caracterizados por ésteres, no caso do tomate inglês, e aldeídos no caso do tomate.

Palavras-chaves: compostos bioativos; capacidade antioxidante; cromatografia líquida de ultra-eficiência; cromatografia gasosa acoplado a espetrometria de massa

ABSTRACT

Bioactive compounds are secondary metabolites that occur in small amounts in plants. In addition to acting as a defense system, these compounds also contribute to human well-being, due to its efficient antioxidant, anticancer, antimicrobial action, among others. In this work, the bioactive composition and antioxidant capacity of 11 vegetables samples typically consumed in RAM, namely, beetroot, red and yellow onion, orange and white carrots, watercress, broccoli, spinach, garlic, tomato and tamarillo, were determined. The methanolic extracts obtained from these matrices, was used to quantify the total content of the phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins, betalains and carotenoids. The antioxidant capacity was also measured by three different methods: DPPH, ABTS and FRAP. The highest antioxidant capacity was determined for red onion, tamarillo and tomato. Using the QuEChERS extraction methodology combined with liquid chromatography of ultra-efficiency (UHPLC), it was possible to identify and quantify some polyphenols. Catechin and gentisic and ferulic acids were found the most abundant polyphenols. Additionally, the volatile composition of these samples was studied using solid phase microextraction (HS-SPME) followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). 320 volatile compounds were identified and grouped into different chemical families. Based on the results, terpenic compounds were found the most predominant group in beetroot (61%), orange carrot (58%) and white carrot (61%), while organosulfur compounds are dominant in onion, garlic and watercress. Regarding to broccoli and spinach, these vegetables are, essentially, constituted by alcohols and aldehydes, while fruits of *Solanaceae* family are characterized by esters, in tamarillo, and aldehydes in tomato.

Keywords: bioactive compounds; antioxidant capacity; ultra-efficient liquid chromatography, gas chromatography coupled to mass spectrometry

LISTA DE ABREVIATURAS

AAT	Álcool Aciltransferase
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ABTS ⁺⁺	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)
ACSOs	Sulfóxidos de S-alca(en)il-L-Cisteína
ADH	Álcool Desidrogenase
CQM	Centro de Química da Madeira
DI-SPME	Imersão direta - Microextração em Fase Solida
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DVB/CAR/PDMS	Divinilbenzeno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano
EC ₅₀	<i>Maximal Effective Concentration</i>
EI	Impacto eletrónico
EMR	Erro Médio Relativo
FLR	Detetor de Fluorescência
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
FID	Detetor de Ionização de Chama
dSPE	Fase Sólida Dispersiva
13-HPOTE	13- hidroperóxidos
HS-SPME	<i>Headspace</i> - Microextração em Fase Solida
HLB-DVB, H-DVB	<i>Hydrophylic-Lipophilic Balance divinylbenzene</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPL	Hidroperóxido Liase
GAE	Equivalentes de Ácido Gálico
GCB	<i>Graphitised Carbon Black</i>
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massa
GC-qMS	Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada à Espetrometria de Massa com Detecção por Quadrupolo
LLOQ	Limite Inferior de Quantificação
LOX	Dioxigenados por Lipoxigenases
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
QSM	Módulo de Desgaseificação Integrado

QuEChERS/UHPLC-	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i> / Cromatografia
PDA	Líquida de Ultra Eficiência - Detetor de Arranjo de Fotodiodos
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
LLE	Extração Líquido-Líquido
MS	Espetrometria de Massa
M-SPME	Membrana - Microextração em Fase Sólida
MEPS	Micoextração por Sorvente Empacotado
NPD	Detetor de Nitrogénio/Fósforo
TCD	Detetor de Condutividade Térmica
TPTZ	Tripiridiltriazina
RAM	Região Autónoma da Madeira
US	Ultrassons
USAE	Extração Assistida por Ultrassons
PSA	<i>Primary Secondary Amine</i>
PDA	Detetor de Arranjo de Fotodiodos
PTFE	Politetrafluoretileno
R-AX	<i>Retain Anion Exchange</i>
R-CX	<i>Retain cationExchange</i>
SCX	<i>Strong cation exchange</i>
RELACRE	Laboratório Acreditados de Portugal
SM	Amostrador Automático
SPME	Microextração em Fase Sólida
SPE	Extração Fase-Sólida
SWGTOX	<i>Scientific Working Group for Forensic Toxicology</i>
UHPLC-PDA	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência - Detetor de Arranjo de Fotodiodos
UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
UV/Vis	Ultra-violeta /Visível

ÍNDICE GERAL

RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE TABELAS	xv
CAPÍTULO I.....	16
1. INTRODUÇÃO	17
CAPÍTULO II	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1. Metabolismo secundário em vegetais.....	20
2.1.1. Terpenos.....	21
2.1.2. Compostos azotados.....	22
2.1.3. Compostos fenólicos	22
2.2. Antioxidantes	30
2.2.1. Métodos para a determinação da capacidade antioxidante in-vitro.....	32
2.3. Métodos para a quantificação de compostos bioativos	35
2.3.1. Técnicas espectrofotométricas	36
2.3.2. Métodos de Separação Cromatográfica.....	36
2.3.3. Técnicas de extração	42
CAPÍTULO III.....	50
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	51
3.1. Reagentes e Padrões analíticos.....	51
3.2. Material e equipamento.....	51
3.3. Amostras	52
3.4. Obtenção dos extratos por USAE.....	52
3.5. Determinação de compostos bioativos.....	53
3.5.1. Determinação do teor total de compostos fenólicos.....	53
3.5.2. Determinação de flavonoides totais	53
3.5.3. Determinação do teor de antocianinas totais.....	54
3.5.4. Determinação do teor de betalaínas.....	54
3.5.5. Determinação do teor de carotenoides totais.....	55
3.6. Determinação in vitro da Capacidade Antioxidante.....	55
3.6.1. Método DPPH (2,2-difenil-1- picrilhidrazilo).....	55
3.6.2. Método ABTS ⁺ (Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico)	56
3.6.3. Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	57
3.7. Determinação dos Compostos Fenólicos por UHPLC-PDA.....	57

3.7.1. Preparação das Soluções Padrões.....	57
3.7.2. Otimização do Procedimento de Extração QuEChERS	57
3.7.3. Condições Cromatográficas	58
3.7.4. Validação do método analítico.....	60
3.8. Determinação da composição volátil das amostras em estudo.....	64
3.8.1. Extração por HS-SPME	65
3.8.2. Condições do GC-qMS	65
CAPÍTULO IV	67
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1. Determinação da Composição Fitoquímica	68
4.1.1. Determinação do teor total de compostos fenólicos.....	68
4.1.2. Determinação do teor total de flavonoides.....	70
4.1.3. Determinação do teor de antocianinas totais.....	73
4.1.4. Determinação do teor de carotenoides	75
4.2. Determinação da Capacidade Antioxidante in vitro.....	77
4.2.1. Correlação das capacidades antioxidantes	78
4.3. Análise Quantitativa de Compostos Fenólicos por QuEChERS/UHPLC-PDA.....	80
4.3.1. Otimização das condições de extração por QuEChERS	80
4.3.2. Validação do método.....	83
4.3.3. Aplicação do Método a Amostras Vegetais	90
4.4. Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa (GC-MS)	95
4.4.1. Beterraba	99
4.4.2. Cenoura	100
4.4.3. Cebola	101
4.4.4. Alho.....	103
4.4.5. Brócolos	104
4.4.6. Espinafre.....	105
4.4.7. Tomate.....	107
4.4.8. Tomate inglês	108
CAPÍTULO V	110
5. CONCLUSÕES.....	111
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
ANEXOS.....	136

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema das inter-relações entre os metabolismos primários com os metabolitos secundários (adaptado de Lincoln [14]).	21
Figura 2. Estrutura química de um fenol simples.	23
Figura 3. Estrutura básica e sistema de numeração dos flavonoides (adaptado de Balasundram [26]).	25
Figura 4. Estrutura químicas de alguns a) ácidos hidroxibenzoicos, e b) ácidos hidroxicinâmicos [26].	29
Figura 5. Representação esquemática do stress oxidativo (adaptado de Kelly [67]).	31
Figura 6. Reação química do radical DPPH com um antioxidante RH (adaptado de Wang [75]).	33
Figura 7. Redução do radical ABTS ^{•+} por ação de um antioxidante e a sua formação por meio do persulfato de sódio (K ₂ SO ₅) (adaptado de Spínola [80]).	34
Figura 8. Redução do complexo férrico tripiridiltriazina (Fe ⁺³ -TPTZ) para o complexo ferroso tripiridiltriazina (Fe ⁺² -TPTZ).	35
Figura 9. Esquema do sistema HPLC (adaptado de Pinto [98]).	37
Figura 10. Esquema básico de um equipamento de cromatografia gasosa acoplado a um espectrómetro de massa (GC-MS).	41
Figura 11. Representação esquemática das etapas de extração da SPE (adaptado de Alves [113]).	43
Figura 12. a) Representação esquemática da microseringa MEPS com microcoluna empacotada. b) seringa MEPS (adaptado de Queiroz [135]).	44
Figura 13. Representação esquemática das diferentes versões da MEPS (adaptado de Gonçalves [114]).	45
Figura 14. Representação esquemática das etapas do QuEChERS.	46
Figura 15. Dispositivo de SPME (adaptado de Gonçalves [150]).	47
Figura 16. Representação esquemática dos modos de SPME (a) por imersão direta, (b) por headspace (c) por membrana (adaptado de Gonçalves [151]).	48
Figura 17. Representação esquemática de um dispositivo SPME na absorção e dessorção da fibra de SPME (adaptado de Alves [155]).	49
Figura 18. Representação esquemática do procedimento de extração QuEChERS.	58
Figura 19. Sistema UHPLC-PDA da Waters modelo Acquity UPLC H-Class (adaptado de Gonçalves [151]).	59
Figura 20. Gradiente de temperatura de coluna do GC utilizado para a separação dos analitos.	66

Figura 21. Curva de calibração de ácido gálico utilizada para determinar o teor total de compostos fenólicos nos extratos vegetais.....	68
Figura 22. Curva de calibração de quercetina utilizada para determinar o teor total de flavonoides dos extratos vegetais.	71
Figura 23. Correlação entre os métodos FRAP-DPPH, ABTS-DPPH e FRAP-ABTS.	79
Figura 24. Estudo da influência do modo de agitação e otimização do tempo de ultrassons na eficiência de extração dos compostos fenólicos.....	81
Figura 25. Estudo da influência do solvente extrator na eficiência de extração dos compostos fenólicos. Acrónimos: ACN - acetonitrilo; EtOAc - acetato de etilo e MeOH - metanol.....	82
Figura 26. Cromatogramas típicos da fração volátil das 11 amostras de frutas e vegetais obtidos por HS-SPME-GC/qMS. 1 - α -Pinenos; 2 - β -Pinenos; 3 - D-Limoneno; 4 - (Z)-Ocimeno; 5 - 1-Metil-2-(1-metiletil)-benzeno; 6 - Terpinoleno; 7 - Ácido acético; 8 - 5-Metilfurfural; 9 - N-metil-1,3-propanodiamina; 10 - Hexanal; 11 - 2-Metil-2-pental; 12 - 2,5-Dimetil tiofeno; 13 - 1-Hidroxi-2-propanona; 14 - Dimetil-trissulfeto; 15 - Ácido acético; 16 - Furfural; 17 - Ácido Fórmico; 18 - 5-Metilfurfural; 19 - 2-Furanmetanol; 20 - 2,5-Furanodicarboxaldeído; 21 - 5-Acetoximetil-2-furaldeído; 22 - 2,3-Dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona; 23 - 1,3-Ditiano; 24 - Dipropil-dissulfeto; 25 - Nonanal; 26 - (E)-2-Octanal; 27 - β -Mirceno; 28 - γ -Terpineno; 29 - 1-Metil-2- (1-metiletil)-benzeno; 30 - 1,5-Dietenil-3-metil-2-metileno- (1 α , 3 α , 5 α) ciclohexano; 31 - α -Ocimene; 32 - Santolina Trieno; 33 - 10,10-Dimetil-2,6-dimetileno-biciclo[7.2.0]undecano-5- β -ol; 34 - 6-Metil-5-hepteno-2-ona; 35 - (E)-2-Octanal; 36 - (E)-2-Decenal; 37 - (E)-Pinocarveol; 38 - 1-Etil-2,4-dimetil-benzeno; 39 - Ácido undecanóico; 40 - Dialil sulfeto; 41 - Dialil disulfeto; 42 - Metil alitioacetato; 43 - 2-(2-Etoxi)etanol; 44 - 3-Vinil-1,2-ditiociclohex-4-eno; 45 - Dialil trissulfeto; 46 - Metil éster do ácido ciclopropano-carboxílico; 47 - Etil éster do ácido hexanóico; 48 - 1-Hexanol; 49 - (E)-3-Hexen-1-ol; 50 - (Z)-3-Hexen-1-ol; 51 - Etil éster do ácido octanóico; 52 - 1,3-bis(1,1-Dimetiletil)-benzeno; 53 - cis-3-Hexenil valerato; 54 - Benzaldeído; 55 - 3,5-Octadieno-2-ona; 56 - Feniletil álcool; 57 - β -Ionona; 58 - 3-Metil-1-isotiocianato-butano; 59 - 4-Metilpentil Isotiocianato; 60 - Benzenoacetaldéido; 61 - 2-Feniletil cianido; 62 - 1-Isotiocianato-3-(metiltio)-propano; 63 - 2-Feniletil isotiocianato; 64 - 2-Hexanal; 65 - Acetato de (E)-2-hexen-1-ol; 66 - (Z)-3-Hexenil éster do ácido butanoico; 67 - Protanoato de (E)-2-hexen-1-ol; 68 - (E)-2-Hexen-1-ol; 69 - (Z)-3-Metil-1,3,5-hexatrieno; 70 - Metil éster do ácido butanoico; 71 - Etil éster do ácido butanoico; 72 - Metil éster do ácido hexanóico; 73 - Acetato de (Z)-3-hexen-1-ol; 74 - β -ciclocitral; 75 - α -Terpineol; 76 - 5-(Hidroxi)metil)furfural; 77 - Geranil acetona.	99
Figura 27. Distribuição das famílias de compostos químicos identificados na beterraba.....	100
Figura 28. Famílias de compostos químicos identificados na cenoura laranja e na cenoura branca.	101
Figura 29. Famílias de compostos químicos identificados nas cebola roxa e cebola amarela. .	102
Figura 30. Famílias de compostos químicos identificados no alho.....	103
Figura 31. Estruturas químicas dos principais produtos secundários da degradação da alicina presente no alho (adaptado de Schäfer [297]).	104

Figura 32. Famílias de compostos químicos identificados nos brócolos.	105
Figura 33. Famílias de compostos químicos identificados nos espinafres.	106
Figura 34. Esquema representativo da biossíntese de compostos voláteis via lipoxigenase/hidroperóxido liase. IF - (3Z):(2E)-enal isomerase; AAT - álcool aciltransferase; ADH - álcool desidrogenase; LOX - lipoxigenase; HPL - hidroperoxidase liase; 13-HPOTE - 13-hidroperóxidos (adaptado de Scala [332]).	107
Figura 35. Famílias de compostos químicos identificados no tomate.	108
Figura 36. Famílias de compostos químicos identificados no tomate inglês.	109
Figura 37A. Curva de calibração utilizada para determinar a capacidade de neutralização de radicais livres (DPPH) dos extratos vegetais.	139
Figura 38A. Curva de calibração utilizada para determinar a capacidade de neutralização de radicais livres (ABTS ^{•+}) dos extratos vegetais.	140
Figura 39A. Curva de calibração utilizada para determinar o poder antioxidante por redução do íon férrico (FRAP) dos extratos vegetais.	140
Figura 40A. Comparação dos perfis cromatográficos das amostras vegetais com a solução dos padrões analíticos (10 µg/mL). O comprimento de onda 289 nm corresponde ao máximo de absorção do padrão interno e permite uma visualização geral dos analitos estudados. (1 - ácido protocatecuico, 2 - catequina, 3 - ácido gentísico, 4 - ácido vanílico, 5 - seringaldeído, 6 - ácido p-cumárico, 7 - ácido ferúlico, 8 - ácido m-cumárico, 9 - ácido o-cumárico, 10 - ácido cinâmico, 11 - quercetina, 12 - kaempferol, PI - padrão interno).	143
Figura 41A. Espectros de absorção dos padrões individuais dos polifenóis analisados por QuEChERS/UHPLC-PDA.	144
Figura 42A. Curvas de calibração obtidas para cada analito.	145

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classes de compostos fenólicos.	23
Tabela 2. Classificação dos flavonóides de acordo com a estrutura básica [28, 36].....	26
Tabela 3. Gradiente de fase móvel usado na separação dos compostos fenólicos.	59
Tabela 4. Teor total dos compostos fenólicos nas amostras em estudo.	69
Tabela 5. Teor de flavonoides totais nas amostras analisadas.....	71
Tabela 6. Teor de antocianinas totais presentes nos extratos dos frutos e vegetais produzidos na RAM.....	73
Tabela 7. Teores de betacianinas e betaxantinas presentes no extrato da beterraba.	75
Tabela 8. Teor de carotenoides presentes nos diferentes extratos vegetais.....	75
Tabela 9. Capacidade antioxidante dos extratos vegetais através dos métodos DPPH, ABTS e FRAP.....	77
Tabela 10. Coeficientes de determinação (r^2) entre os diferentes métodos estudados.	79
Tabela 11. Resultados obtidos para o estudo da linearidade.....	85
Tabela 12. LOD e LOQ obtidos para os polifenóis em estudo por QuEChERS/UHPLC-PDA. 86	
Tabela 13. Resultados obtidos do estudo da precisão e exatidão do método analítico QuEChERS/UHPLC-PDA.....	87
Tabela 14. Resultados obtidos para a eficiência de extração do método analítico.....	89
Tabela 15. Concentrações dos compostos fenólicos encontradas nas amostras vegetais em estudo.	93
Tabela 16. Efeitos biológicos de alguns compostos terpênicos e organossulfurados encontrados nas frutas e nos vegetais (adaptado de Perestrelo [298]).....	95
Tabela 17A. Lista de padrões analíticos.....	137
Tabela 18A. Lista de reagentes e solventes.....	137
Tabela 19A. Lista de equipamentos.	138
Tabela 20A. Resultados do EC ₅₀	139
Tabela 21A. Composição volátil identificada nas frutas e vegetais através da metodologia HS-SPME/GC-qMS.....	146

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem-se observado um crescente interesse no estudo dos benefícios dos alimentos na saúde humana. A presença de determinados compostos bioativos em certos alimentos, parecem contribuir para as suas propriedades funcionais permitindo prevenção acrescida no desenvolvimento de determinadas doenças.

As frutas e os vegetais são fontes naturais de fibras, vitaminas, sais minerais e um grande número de compostos fitoquímicos responsáveis pelas suas propriedades bioativas e organoléticas [1]. Recentemente, inúmeros estudos científicos têm demonstrado que o consumo regular destes alimentos está diretamente relacionado com a diminuição de riscos associados às doenças crónicas, como as doenças coronárias [2, 3], alguns tipos de cancro [4, 5] e doenças neurológicas [6, 7]. Na verdade, a maioria destes efeitos benéficos estão associados à composição fitoquímica com capacidade antioxidante que interage com os radicais livres prevendo o dano oxidativo celular [8, 9].

Entre a vasta gama de compostos químicos que constituem as frutas e os vegetais, os polifenóis e os carotenoides são as classes predominantes que apresentam atividade antioxidante [10]. O poder antioxidante destes compostos em alimentos de origem vegetal depende, essencialmente, da sua estrutura química e da sua concentração. Além disso, a quantidade destas substâncias em vegetais é, amplamente, influenciada por fatores genéticos e condições ambientais, além do grau de maturação e variedade da planta [11].

Com base nestas evidências científicas surge o presente trabalho, cuja finalidade foi investigar o teor de compostos bioativos assim como o potencial antioxidante das frutas e dos vegetais produzidos na Região Autónoma da Madeira (RAM). Em consequência do terreno fértil e do clima subtropical, a RAM é, tradicionalmente, uma região agrícola, sendo este um dos setores dominantes da economia madeirense [12]. Entre a diversidade de produtos hortícolas produzidos na região o agrião, os brócolos, a cenoura, o alho, o espinafre, a beterraba, o tomate e a cebola constituem a base elementar da dieta do povo madeirense. Neste sentido, e face aos escassos trabalhos a nível regional, pretende-se que este trabalho possa contribuir para uma melhor caracterização química dos frutos e vegetais produzidos na região e valorizar as potencialidades destes alimentos.

Por conseguinte, este trabalho teve como objetivo a determinação de compostos bioativos nomeadamente compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas e carotenoides em frutos e vegetais produzidos na RAM, assim como, a avaliação da sua atividade antioxidante. De modo a complementar o estudo, foi efetuada a validação de um método

analítico para a quantificação de polifenóis, baseado na extração por QuEChERS seguida de análise por cromatografia líquida de ultra eficiência com detetor de fotodiodos (UHPLC-PDA). Paralelamente a este estudo, a análise do perfil volátil das frutas e dos vegetais foi igualmente efetuado através da microextração em fase sólida (SPME) seguida de análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

CAPÍTULO II
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Metabolismo secundário em vegetais

As plantas produzem uma vasta gama de compostos orgânicos que podem ser classificados de acordo com o tipo de metabolismo – primário ou secundário. Os metabolitos primários desempenham funções vitais nas plantas, tais como a fotossíntese, a respiração celular e o transporte de solutos. Os compostos envolvidos neste metabolismo possuem uma distribuição universal nas plantas, ou seja, são encontrados em todo o reino vegetal. Em contrapartida, os metabolitos secundários não possuem uma distribuição universal, sendo os compostos orgânicos produzidos, restritos a uma espécie ou grupo vegetal. Estes metabolitos, por sua vez, têm como função atuar como um sistema de proteção contra potenciais inimigos dos vegetais, tais como herbívoros e microrganismos patogênicos.

Muitos destes metabolitos são pigmentos, os quais proporcionam cor às flores e aos frutos atraindo organismos benéficos como polinizadores e animais dispersores de sementes, como agente alelopático, protetores da exposição da luz ultravioleta e deficiência de minerais [13-15].

Existem três grandes grupos de metabolitos secundários originados pela biossíntese do metabolismo primário: *o grupo dos terpenos* que derivam do ácido malónico ou do piruvato e 3-fosfoglicerato, *o grupo dos compostos azotados* derivados de aminoácidos aromáticos, como o triptofano e a tirosina (os quais, por sua vez, derivam do ácido chiquímico) e de aminoácidos alifáticos como a ornitina e a lisina, e por último *o grupo dos compostos fenólicos* (derivados do ácido chiquímico ou ácido malónico) [14, 16]. Na Figura 1 encontra-se exemplificada a origem biossintética dos metabolitos secundários.

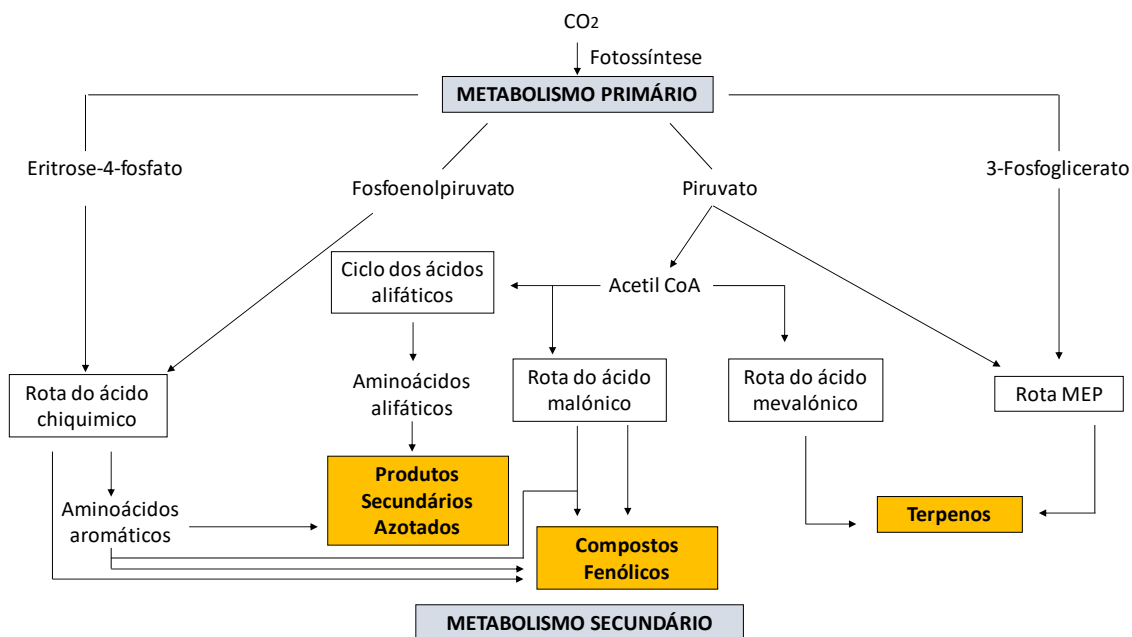


Figura 1. Esquema das inter-relações entre os metabolismos primários com os metabolitos secundários (adaptado de Lincoln [14]).

2.1.1. Terpenos

Os terpenos, ou terpenóides, constituem o maior grupo de metabolitos secundários presentes na natureza encontrando-se largamente difundidos na maioria das espécies vegetais. Estes compostos são biossintetizados a partir de metabolitos primários e desempenham papéis fundamentais na atividade biológica, atuando principalmente como antibacterianos, antivirais, espasmolíticos e/ou anticarcinogênicos [15, 17, 18].

A diversidade estrutural dos terpenos é tão vasta, que incluem compostos acíclicos, monocíclicos e policíclicos [19]. Geralmente, este grupo de compostos é classificado de acordo com as unidades isopreno que constituem a sua estrutura química dividindo-se, assim, em monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos e esteroides (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀) [16, 18].

Alguns terpenos são considerados metabolitos primários por estarem relacionados com o crescimento e desenvolvimento dos vegetais. A giberelina, por exemplo, é um diterpeno que exerce um papel importante no crescimento das plantas, ao passo que os esteróis, que são derivados dos triterpenos, encontram-se essencialmente nas membranas celulares. Os carotenoides, por sua vez, apresentam uma estrutura tetraterpenica e são responsáveis pela pigmentação vermelha, amarela ou alaranjada de muitas espécies vegetais assim como, pela proteção dos tecidos contra a fotoxidação causada pela radiação UV [14, 16]. Os carotenoides, são na verdade uma das classes mais abundantes

nas frutas e nos vegetais [16]. Dos mais de 600 carotenoides conhecidos atualmente, aproximadamente 50 são precursores da vitamina A [20].

De acordo com a sua estrutura química, os carotenoides são divididos em duas grandes famílias, nomeadamente, *os carotenos* que são caracterizados pela sua longa estrutura apolar, formada por átomos de carbono e hidrogénio, como por exemplo, o beta-caroteno encontrado frequentemente nas cenouras, o licopeno encontrado em diversas variedades de tomate e a luteína encontrada sobretudo nos vegetais verdes; e *as xantofilas* que são carotenóies polares formados por diversos grupos oxigenados como os grupos hidroxilo e carbonilo. Dentre a família das xantofilas, a zeaxantina, frequentemente encontrada nos brócolos e na couve de bruxelas, e a criptoxantina, encontrada predominantemente na laranja, na tangerina e na papaia, são provavelmente as xantofilas mais abundantes na natureza [16, 21, 22].

2.1.2. Compostos azotados

Muitos dos metabolitos secundários possuem nitrogénio na sua estrutura, os quais são sintetizados a partir de aminoácidos aromáticos. Nesta categoria, incluem-se os alcaloides e os glicosídeos cianogénicos que atuam na defesa das plantas contra parasitas e herbívoros, apresentando assim, um alto grau de toxicidade para além das suas propriedades medicinais. Os alcaloides sintetizados a partir de aminoácidos como lisina, tirosina e triptofano (*e.g.* morfina) possuem efeitos no sistema nervoso central e no sistema nervoso parassimpático [14, 16, 23]. O grupo glicosídeo cianogénico apresenta funções de proteção nas plantas através da libertação de substâncias voláteis responsáveis por odores característicos, encontrados principalmente em plantas como os brócolos, o repolho e o rabanete [14, 24].

2.1.3. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos, também designados de polifenóis, constituem um dos grupos mais numerosos e amplamente distribuídos no reino vegetal, com mais de 8000 compostos atualmente conhecidos [25, 26]. Estes compostos são produtos do metabolismo secundário das plantas, sendo originados a partir de duas vias de síntese principais: *a via do chiquimato* e *a via dos fenilpropanóides* [25]. Em geral, os compostos fenólicos têm um papel importante na fisiologia e na morfologia das plantas, sendo fundamentais no crescimento e reprodução, além de protegerem contra patógenos e

predadores e contribuirão significativamente para as características organolépticas das frutas e dos vegetais [26].

Estruturalmente, os compostos fenólicos são substâncias que compreendem um anel aromático ligado a um ou mais substituintes hidroxilo (Figura 2), que podem variar desde simples moléculas fenólicas, como os ácidos fenólicos, até compostos altamente polimerizados como os taninos [25].

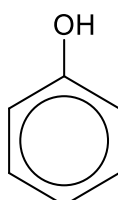
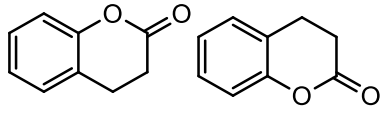
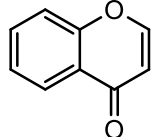
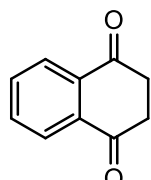
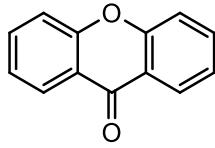
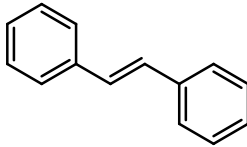
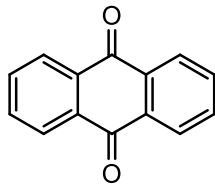
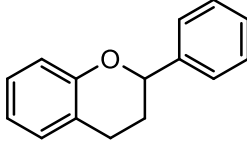
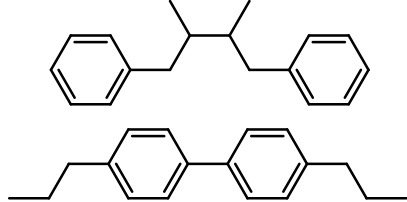


Figura 2. Estrutura química de um fenol simples.

Na natureza os compostos fenólicos encontram-se majoritariamente associados a mono- ou polissacarídeos, que podem estar ligados a um ou mais grupos fenólicos. A associação destes compostos com ácidos orgânicos, aminas e lípidos também têm sido encontrados na natureza [26]. Apesar desta diversidade estrutural, Harborne [27], categorizou estes compostos em vários grupos, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Classes de compostos fenólicos.

Classe	Estrutura básica	Estrutura química
Fenóis simples	C ₆	
Benzoquinonas	C ₆	
Ácidos hidroxibenzoicos	C ₆ -C ₁	
Acetofenonas	C ₆ -C ₂	
Ácidos fenilacéticos	C ₆ -C ₂	
Ácidos hidroxicinâmicos	C ₆ -C ₃	
Fenilpropenos	C ₆ -C ₃	

Cumarinas e Isocumarinas	C_6-C_3	
Cromonas	C_6-C_3	
Naftoquinonas	C_6-C_4	
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$	
Estilbenos	$C_6-C_2-C_6$	
Antraquinonas	$C_6-C_2-C_6$	
Flavonoides	$C_6-C_3-C_6$	
Lignanós e Neolignanós	$(C_6-C_3)_2$	
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$	
Taninos condensados, proantocianidinas e flavolanos	$(C_6-C_3-C_6)_n$	

Atualmente, vários autores dividem os compostos fenólicos em dois grandes grupos, nomeadamente os flavonoides e os não flavonoides [28]. Dentre o grupo dos não flavonoides temos os ácidos fenólicos, estilbenos e ligninas, enquanto que o grupo dos

flavonoides é caracterizado por todos aqueles compostos que possuem uma estrutura básica C₆-C₃-C₆ [26, 28-31].

2.1.3.1. Flavonoides

Os flavonoides constituem o maior grupo de compostos fenólicos presentes na natureza, representando mais de metade do total de polifenóis que ocorrem naturalmente [26]. Nas plantas, os flavonoides desempenham um papel fundamental na defesa contra os agentes patogênicos e herbívoros, assim como, na proteção contra radiação ultravioleta [32].

Relativamente à sua estrutura, os flavonoides são compostos de baixo peso molecular, constituídos por dois anéis aromáticos (A e B) unidos por uma ponte de três carbonos, normalmente na forma de um anel heterocíclico (C) [25]. Biogeneticamente, o anel aromático A é derivado da via acetato/malonato, enquanto que o anel B é derivado da fenilalanina a partir da via chiquimato [33, 34]. A Figura 3 ilustra a estrutura básica dos flavonoides, bem como, o sistema de numeração dos carbonos do núcleo flavano.

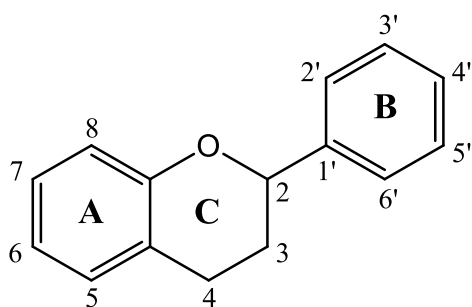
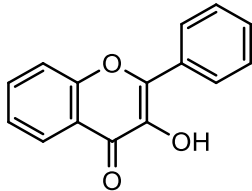
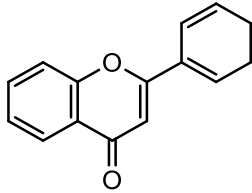
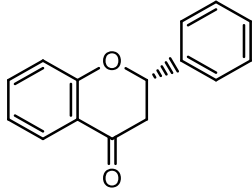
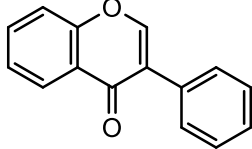
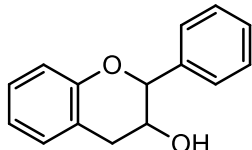
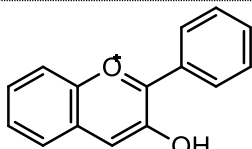


Figura 3. Estrutura básica e sistema de numeração dos flavonoides (adaptado de Balasundram [26]).

A estrutura básica dos flavonoides pode ter inúmeros substituintes. Frequentemente, os grupos hidroxilo estão presentes nas posições 4'-, 5- e 7-. À medida que o número destes grupos hidroxilo aumenta, assim como os açúcares, a solubilidade do flavonoide em água também aumenta. Por outro lado, a presença de outros substituintes como os grupos metil e isopentil, tornam estes compostos lipofílicos [28].

De acordo com as suas características químicas e biossintéticas, os flavonóides classificam-se, principalmente, em flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanóis e antocianidinas [35]. Na Tabela 2 encontram-se resumidas as diferentes classes de flavonóides, assim como as respetivas estruturas.

Tabela 2. Classificação dos flavonóides de acordo com a estrutura básica [28, 36].

Flavonoides	Estrutura básica	Compostos	Ocorrência em alimentos
Flavonóis		Quercetina, Kaempferol miricetina	Cebolas, brócolos, couves, mirtilos, vinho tinto, maçã, tomate.
Flavonas		Apigenina Luteolina	Aipo, salsas e espécies cítricas
Flavanonas		Hesperetina Naringenina	Limão, laranja, toranja, tomate e hortelã
Isoflavonas		Daidzeína Genisteína Clicetina	Tofu, leite de soja e farinha de soja
Flavanóis (algumas vezes referido como Flavan-3-ols)		Catequina Epicatequina	Maçã, amora cereja, uva, pêssego, damasco e chá verde
Antocianidinas		Cianidina Pelargonidina Peonidina	Vinho tinto, amora, beringela, cereja e ameixa

Os flavonóis são o grupo de flavonóides mais abundante nos alimentos, sendo a quercetina, o kaempferol e a miricetina os principais compostos desta classe. As principais fontes de alimentos com estes compostos são a cebola, a couve, o alho-porro, os brócolos e os mirtilos [37]. As flavonas em comparação com os flavonóis, são menos abundantes nas frutas e nos vegetais. A luteolina e apigenina, são dois exemplos de flavonas presentes no aipo, na salsa e alguns citrinos [37]. Nas espécies cítricas como a laranja, o limão e a toranja são mais comuns as flavanonas como a hesperetina e a

naringenina. Estas encontram-se na pele destes frutos em grandes concentrações e geralmente, são glicosiladas por um dissacárido na posição 7 da sua estrutura o que confere o sabor amargo característico dos citrinos [36-39].

Relativamente às isoflavonas, estes flavonóides apresentam semelhanças estruturais aos estrogénios. Embora não sejam esteróides, estes compostos têm grupos hidroxilo nas posições 7 e 4' numa configuração análoga à dos hidroxilos na molécula de estradiol. Esta semelhança estrutural confere a estas substâncias propriedades pseudohormonais, que incluem a capacidade de se ligar aos recetores de estrogénio, sendo classificadas como fitoestrógenos [40]. As isoflavonas são encontradas quase que exclusivamente nas leguminosas, mas principalmente na soja e em todos os seus produtos processados. A genisteína, daidzeína e a gliciteína são as três principais isoflavonas encontradas na soja, geralmente nas proporções 1:1:0,2 [37].

Os flavanóis, também designados de flavan-3-ols, existem na natureza tanto na forma monomérica (catequinas) como na forma polimérica (proantocianidinas). Contrariamente às outras classes, nos alimentos os flavanóis não se encontram na forma glicosilada [37]. Nos frutos, a catequina e a epicatequina são os principais flavanóis, enquanto que a galocatequina, a epigalocatequina e a epigalocatequina galato são frequentemente encontrados nas uvas, em alguns tipos de sementes de leguminosas, mas sobretudo no chá [41, 42].

As antocianinas pertencem ao grupo de flavonóides e são responsáveis pela coloração rosa, vermelha, azul e púrpura das flores e dos frutos, sendo esta dependente do pH e da conjugação destas substâncias com outros compostos [37, 43]. Estruturalmente, as antocianinas são constituídas por glicosídeos, sendo a D-glicose, a D-ramnose e a D-galactose, os açúcares mais comuns. Em geral, estes grupos glicosídeos encontram-se ligados na posição 3-hidroxilo do anel pirânico. No entanto, e apesar de ser menos frequente, estes grupos também podem ocorrer nas posições 5' e 7' do íão flavílio [43]. Sem a presença dos açúcares na sua estrutura, as antocianinas são conhecidas por antocianidinas. Nos alimentos, as antocininas são encontradas principalmente, nas frutas, no vinho tinto, nalguns tipos de cereais e em certos vegetais como as beringelas, os repolhos, as cebolas e os rabanetes [37, 43]. Nos frutos, estas substâncias são encontradas maioritariamente na pele, exceto em certos tipos de frutos vermelhos, como no caso da cereja e dos morangos, que se encontram na polpa [37, 43].

Relativamente às propriedades antioxidantes dos flavonoides, vários estudos demonstram que o número e a posição dos grupos hidroxilo, as ligações glicosídicas e a

presença de grupos metilo na sua estrutura química interferem na atividade antioxidante dos flavonoides [26, 44, 45]. Deste modo:

- quanto maior for o grau de hidroxilação maior será a atividade antioxidante do flavonóide [26]. A miricetina, a título de exemplo, tem uma maior capacidade antioxidante do que o kaempferol, devido ao maior número de grupos hidroxilo presentes na sua estrutura química [46];
- a presença de grupos hidroxilo nas posições 3' e 4' do anel B, como no caso da luteolina e da quercetina, são os principais responsáveis pela neutralização de espécies reativas de oxigênio e azoto [44, 45].
- a presença de grupos hidroxilo nas posições 5 e 7 do anel A, como no caso do kaempferol, da apigenina e da crisina, parecem também contribuir para uma maior atividade antioxidante [44, 45];
- a presença de uma ligação dupla entre C2 e C3, conjugada com o grupo carbonilo na posição 4 do anel C, aumenta a capacidade antioxidante do composto, devido à facilidade de deslocalização de elétrons e consequente estabilização por ressonância [47];
- a presença de um grupo hidroxilo na posição 3 em combinação com a dupla ligação entre C2 e C3, contribui igualmente para uma maior atividade antioxidante [26, 48];
- a glicosilação e a metilação dos flavonóides diminuí a sua atividade antioxidante, quando comparadas com as respectivas agliconas, devido ao impedimento estereoquímico e à diminuição da coplanaridade entre o anel B e a restante estrutura química [26, 44].

Assim, pode afirmar-se que as ligações glicosídicas e os grupos metilo diminuem a atividade antioxidante dos flavonoides, enquanto que a hidroxilação do anel B, e a presença dos grupos carbonilo na posição 4 e hidroxilo na posição 3 do anel C aumentam a atividade antioxidante [46].

2.1.3.2. Não Flavonóides

Os não flavonóides são um vasto grupo de compostos, que incluem os ácidos fenólicos, os estilbenos e as ligninas. A maioria destes compostos são incolores ou de coloração amarelo claro a acastanhado e raramente contribuem para a cor dos alimentos [49]. Do ponto de vista nutricional, os ácidos fenólicos são os que apresentam maior

interesse, devido às suas propriedades antioxidantes [28, 50]. De uma forma genérica, os ácidos fenólicos são substâncias constituídas por um anel fenólico ligado a um ácido carboxílico funcional. São categorizados em dois grupos, nomeadamente os ácidos hidroxibenzoicos e os ácidos hidroxicinâmicos [51]. Os primeiros são componentes das complexas estruturas dos taninos hidrolisáveis e são menos abundantes nos vegetais consumidos pelos humanos [37, 52]. Neste grupo estão incluídos os ácidos gálico, protocatecuico, siríngico e vanílico, os quais apresentam uma estrutura C₆-C₁ em comum (Figura 4a) [53, 54].

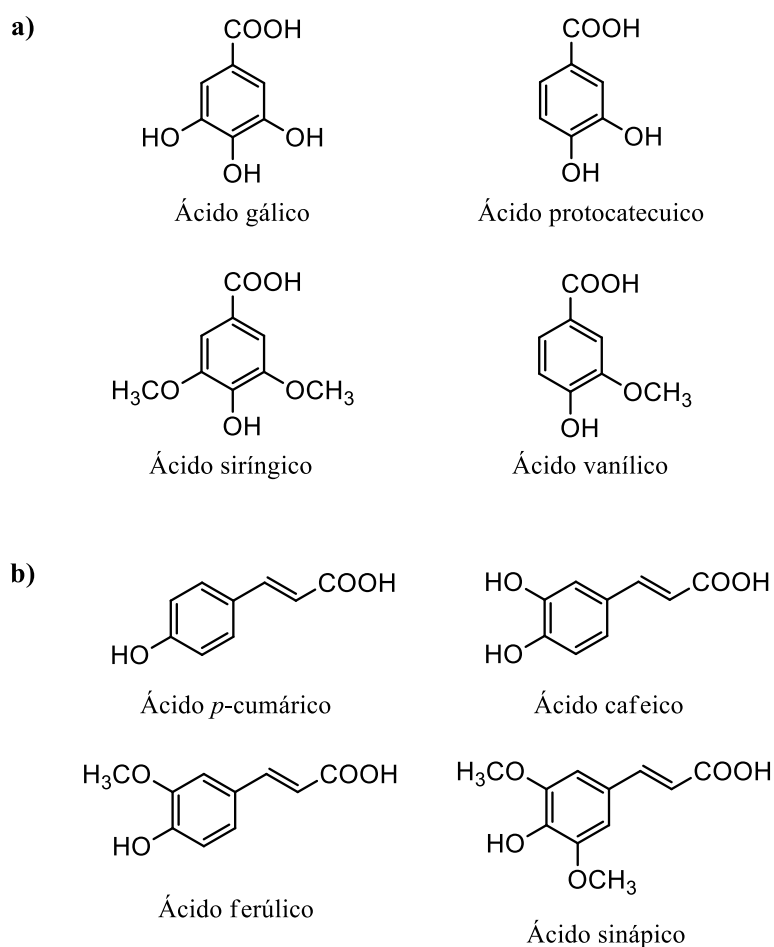


Figura 4. Estrutura químicas de alguns a) ácidos hidroxibenzoicos, e b) ácidos hidroxicinâmicos [26].

Os ácidos hidroxicinâmicos, por outro lado, são compostos aromáticos constituídos por uma cadeia lateral de três carbonos, C₆-C₃, sendo os ácidos cafeico, ferúlico, *p*-cumárico e sinápico os mais comuns (Figura 4b) [25, 26]. Estes compostos estão presentes numa grande variedade de alimentos como as amoras, os kiwis, as ameixas, as cerejas e as maçãs, sendo também encontrados no tomate, nos cereais e no café [37, 52].

A atividade antioxidante de ambos os grupos (ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos) está relacionada com o número e a posição dos grupos hidroxilo na molécula. A eficiência antioxidante dos mono-fenóis é fortemente reforçada com a introdução de um segundo grupo hidroxilo nas posições *orto* ou *para*, e aumenta com uma ou duas substituições metoxi na posição *orto* em relação ao grupo hidroxilo [55, 56]. Em geral, os ácidos sináptico, ferúlico e *p*-cumárico são antioxidantes mais ativos do que os ácidos hidroxibenzoicos, tais como os ácidos protocatecuico, siríngico e vanílico [26]. Este facto deve-se à dupla ligação ($-\text{HC}=\text{CH}-$) presente nos ácidos hidroxicinâmicos, que participa na estabilização do radical arilóxi por ressonância [53, 57].

As ligninas são outro grupo pertencente à classe dos não flavonóides. São formadas por duas unidades fenilpropano, como por exemplo, o secoisolariciresinol que é a principal fonte de compostos fenólicos na linhaça. Alguns tipos de cereais, grãos, frutas e vegetais, como a cenoura os aspargos e o alho também contêm vestígios deste composto [36]. No que concerne à bioatividade das ligninas, além da atividade antioxidante, o número de estudos sobre este assunto é muito escasso [55].

Os estilbenos, por outro lado, são um grupo particular de não flavonóides caracterizados pela estrutura $\text{C}_6\text{-C}_2\text{-C}_6$ [58]. Nas plantas, estas substâncias são sintetizadas em resposta a doenças, lesões e ao stresse, além de inibirem o crescimento de fungos e bactérias [37, 59]. Alguns destes compostos, como o resveratrol e os seus derivados são provavelmente, as substâncias mais conhecidas desta classe, devido às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, antitumorais, cardioprotetoras e neuroprotetoras [58, 60-62]. Em geral, estes compostos são encontrados nos alimentos em pequenas quantidades, sendo o vinho tinto, os mirtilos, as framboesas, as amoras e o amendoim, as principais fontes destes compostos. Pequenas quantidades destas substâncias têm sido encontradas no repolho vermelho e nos espinafres [28].

2.2. Antioxidantes

Um antioxidante é uma substância capaz de inibir ação dos radicais livres e retarda ou impede a oxidação de outras substâncias químicas. No organismo são produzidos radicais livres de carbono, enxofre, nitrogénio e oxigénio, no entanto, os que mais se destacam são os radicais derivados do oxigénio e nitrogénio, devido à sua reatividade e aos danos que podem originar [16, 63, 64].

Os radicais livres podem ser definidos como um átomo ou molécula que contém um ou mais eletrões altamente reativos, que são gerados no citoplasma, mais

precisamente nas mitocôndrias ou na membrana celular. Estes radicais são produzidos por inúmeras reações biológicas podendo ser provenientes de uma fonte endógena como a respiração aeróbica, inflamações, entre outras, ou por uma fonte exógena através de radiações ultravioleta, dieta e tabaco e que levam a um aumento da carga oxidativa. Estas moléculas são altamente reativas porque têm elétrons desemparelhados, como por exemplo, os radicais livres derivados do oxigênio como o óxido (O_2^-), hidroxilo (OH^-), hidropoxi (HOO^-), peroxil (ROO^-) e alcoxilo (RO^-). Estes radicais reagem rapidamente com outros compostos, como os lípidos, as proteínas e os ácidos nucleicos, de modo a capturar elétrons necessários para ganhar estabilidade. Estas moléculas que foram “atacadas” e perderam um elétron tornam-se num radical livre, iniciando assim uma reação em cadeia que dá origem à peroxidação lipídica, levando à desestabilização e desintegração das membranas celulares ou à oxidação de outros componentes celulares como as proteínas e o ADN. Esta alteração a nível celular encontra-se, assim, relacionada com várias patologias crónicas e degenerativas como cancro, doenças cardíacas e doenças renais [63, 65].

A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é uma condição fundamental para o correto funcionamento do organismo. Por vezes, o equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas dos antioxidantes pode ser desestabilizado por uma excessiva produção de radicais livres originando um desequilíbrio chamado de stress oxidativo (Figura 5) [66].

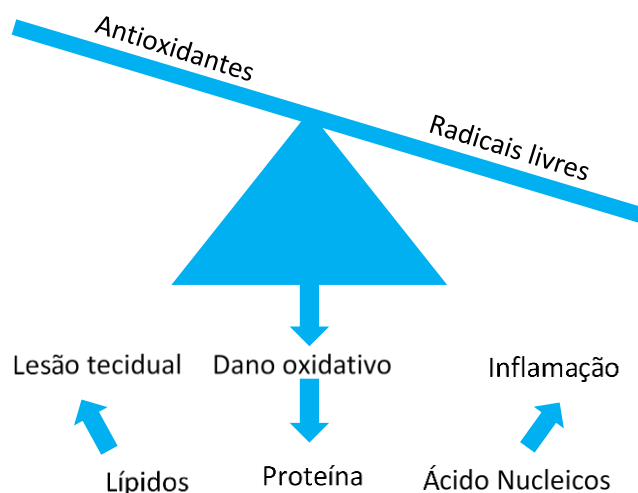


Figura 5. Representação esquemática do stress oxidativo (adaptado de Kelly [67]).

Como consequência, os radicais livres atacam e oxidam outros componentes celulares, como lipídios polinsaturados, proteínas e ácidos nucleicos, levando a lesões nos tecidos e, em alguns casos, o influxo de células inflamatórias aos locais de lesão [67].

No organismo existem diversos agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres, entre os quais, se destacam os antioxidantes enzimáticos, como a superóxido dismutase, a catalase, a glutathione peroxidase e, a glutathione reductase. Estas atuam por meio de mecanismos de prevenção, impedindo ou controlando a formação dos radicais envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culmina com a propagação de um dano oxidativo [66, 68]. Além dos antioxidantes enzimáticos existem os antioxidantes não enzimáticos que são de origem dietética, entre os quais, se destacam os carotenóides, os compostos fenólicos e as vitaminas A, C e E, que contêm propriedades antioxidantes para o organismo, sendo capazes de capturar os radicais livres com grande eficiência. O uso de medicamentos, o tabagismo, a poluição e outros fatores exógenos, contribuem para a diminuição dos níveis de antioxidantes celulares, os quais são reestabelecidos por meio dos compostos bioativos provenientes de vegetais, frutas e cereais.

Em geral, as frutas e os vegetais contêm níveis significativos de componentes biologicamente ativos que conferem grandes benefícios para a saúde. Os compostos fenólicos são os responsáveis pela atividade antioxidante, a qual é conferida pelas propriedades redox que atuam como agentes redutores, doadores de hidrogênio e inativadores de oxigênio [63].

2.2.1. Métodos para a determinação da capacidade antioxidante *in-vitro*

Atualmente, existe uma grande diversidade de métodos que permitem avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* de compostos bioativos, que incluem desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais [69, 70].

Estes ensaios têm-se tornado numa ferramenta extremamente útil na seleção inicial de substâncias que podem ser utilizadas como fármacos, auxiliando deste modo, os investigadores na avaliação da capacidade antioxidante de substâncias isoladas de produtos naturais ou obtidas de fontes sintéticas [70]. Além disso, estes métodos são particularmente úteis para comprovar a presença de substâncias antioxidantes em alimentos como frutas, legumes e bebidas [70].

Devido às diferentes espécies de radicais livres e as suas distintas formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente. Deste modo, a procura por testes mais rápidos e eficientes tem gerado um grande número de métodos para avaliar a atividade de antioxidantes naturais pelo uso de uma grande variedade de sistemas geradores de radicais livres [70, 71]. Dentre os métodos desenvolvidos para determinar a capacidade antioxidante *in vitro*, o ensaio do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), o método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) e o FRAP (“Ferric Reducing Antioxidant Power”) são provavelmente os mais utilizados, devido à sua rapidez, simplicidade e reprodutibilidade [71].

2.2.1.1. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

O método DPPH consiste, essencialmente, na avaliação da capacidade de eliminação de um radical livre numa amostra, sendo um dos métodos mais utilizados para avaliar a capacidade antioxidante de extratos vegetais [72].

O DPPH é um radical livre estável, caracterizado pela sua coloração púrpura, que na presença de um antioxidante (RH) ou de uma espécie radicalar (R[•]), é reduzido formando a difenil-picril-hidrazina de coloração amarela [71]. Essencialmente, o mecanismo baseia-se na aceitação de um átomo de hidrogénio a partir de uma molécula antioxidante ou de um eletrão de uma espécie radicalar, resultando assim, na redução do DPPH, sendo a reação acompanhada espectralmente a 515 nm (Figura 6) [73, 74].

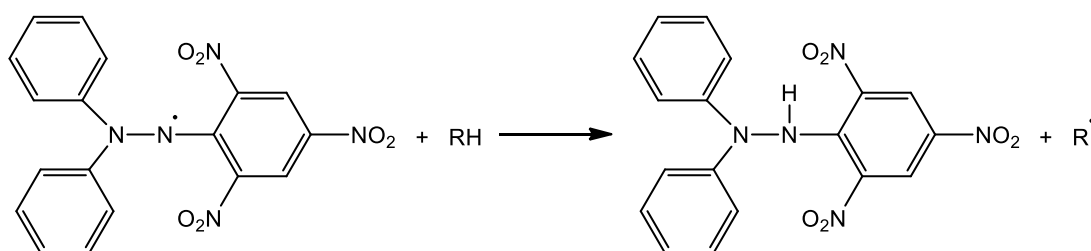


Figura 6. Reação química do radical DPPH com um antioxidante RH (adaptado de Wang [75]).

Os resultados do ensaio DPPH podem ser expressos por meio do IC₅₀, o qual se define como a quantidade de antioxidante necessário para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50%. Este valor é determinado através da representação gráfica da inibição percentual em função da concentração de extrato, sendo o IC₅₀ menor ou maior dependendo da atividade antioxidante [76, 77].

2.2.1.2. Método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico))

Outro método frequentemente utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de matrizes complexas como extratos vegetais, frutas e outros alimentos, é o método ABTS. Em virtude da sua simplicidade, estabilidade e reprodutibilidade, o método ABTS é aplicado no estudo de antioxidantes hidrossolúveis, lipossolúveis e compostos puros, entre os quais se destacam os compostos fenólicos e os carotenoides presentes em alimentos e extratos vegetais [78, 79].

Essencialmente, esta metodologia baseia-se na capacidade dos compostos antioxidantes para captar o radical 2,2-azono-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) ($ABTS^{\bullet+}$), que é gerado através da reação do ABTS com um agente oxidante, normalmente o persulfato de potássio (K_2SO_5). Na presença de um antioxidante o radical $ABTS^{\bullet+}$ é reduzido a ABTS, provocando a descoloração da mistura, que passa de azul esverdeado a incolor (Figura 7). O decréscimo da coloração é monitorizado espectrofotometricamente a 734 nm, sendo que quanto menor for a absorvância maior é a quantidade de radicais $ABTS^{\bullet+}$ reduzidos pelos compostos antioxidantes.

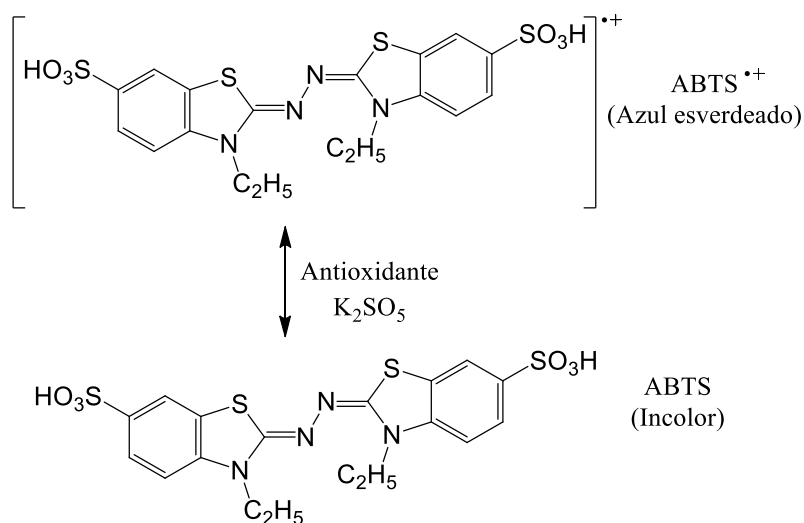


Figura 7. Redução do radical $ABTS^{\bullet+}$ por ação de um antioxidante e a sua formação por meio do persulfato de sódio (K_2SO_5) (adaptado de Spínola [80]).

Em termos quantitativos, a percentagem de inibição do radical $ABTS^{\bullet+}$ é determinado em função do antioxidante sintético Trolox, que é sujeito às mesmas condições de análise [80, 81].

2.2.1.3. Método FRAP (“Ferric Reducing Antioxidant Power”)

O poder antioxidante por redução do íon férrico (FRAP) constitui um método alternativo para avaliar a capacidade antioxidante de extratos vegetais, frutas e outros tipos de matrizes [82-84]. O ensaio FRAP é caracterizado pela redução, em meio ácido, do complexo férrico-tripiridiltriazina [Fe(III)-TPTZ] de cor amarela, ao complexo ferroso [Fe(II)-TPTZ] de coloração azul escura, na presença de um antioxidante (Figura 8).

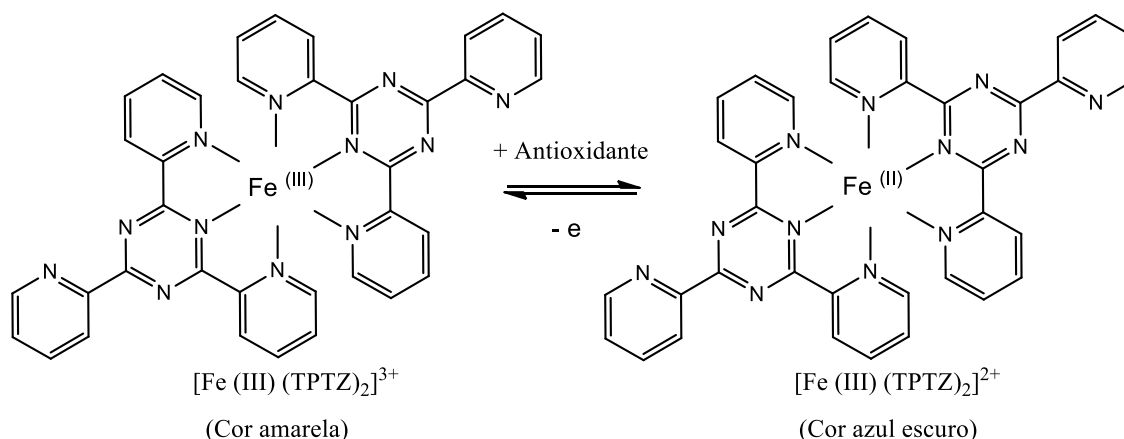


Figura 8. Redução do complexo férrico tripiridiltriazina (Fe⁺³-TPTZ) para o complexo ferroso tripiridiltriazina (Fe⁺²-TPTZ).

A redução do complexo férrico pode ser acompanhada espectrofotometricamente a 593 nm, sendo que quanto maior for a absorvância, ou seja quanto mais azul estiver a solução, maior será o poder redutor do extrato [85, 86].

Em termos quantitativos, o poder redutor é determinado pela comparação da absorvância da solução, com a absorvância de uma solução padrão de íons ferrosos ou com soluções padrão de antioxidantes, como o Trolox [87, 88].

2.3. Métodos para a quantificação de compostos bioativos

A grande diversidade de compostos bioativos dispersos nos tecidos vegetais, assim como as suas diferentes estruturas químicas, tem trazido consigo a necessidade de desenvolver um grande número de técnicas analíticas para a sua identificação e quantificação. As primeiras técnicas desenvolvidas foram as técnicas espectrofotométricas, que têm interesse sobretudo do ponto de vista do controle de qualidade, uma vez que forneçam respostas rápidas, eficazes e de baixo custo. Apesar destas vantagens, estas técnicas têm as suas limitações, pelo que tem sido necessário recorrer a técnicas mais precisas, como as técnicas cromatográficas, que permitem a

identificação individualizada de cada um dos compostos bioativos de interesse nutricional [50].

2.3.1. Técnicas espectrofotométricas

Inúmeros métodos espectrofotométricos têm sido desenvolvidos para a determinação do teor de compostos bioativos em matrizes vegetais. Estes métodos permitem quantificar, não só, o teor total de um grupo específico de substâncias bioativas, como por exemplo o teor total de compostos fenólicos [89], como também permitem determinar a quantidade de uma substância bioativa específica, tal como o *beta*-caroteno [90], o licopeno [91] ou a vitamina C [92], em diversas matrizes alimentares. Alguns métodos permitem, igualmente, quantificar o teor total de uma subclasse específica de compostos bioativos, como por exemplo o teor total de flavonóides [93], de antocianinas [94], de proantocianinas [95], entre outros.

Apesar da diversidade de métodos espectrofotométricos existentes, estes têm as suas limitações. Na presença de amostras complexas, alguns componentes da matriz podem interferir na análise, sobrestimando o conteúdo de compostos determinados. Além disso, uma das principais desvantagens é reduzida especificidade dos métodos [96, 97].

2.3.2. Métodos de Separação Cromatográfica

A cromatografia, de um modo geral, é um método analítico que permite a separação de misturas complexas permitindo assim a identificação dos analitos numa amostra. A separação depende da distribuição das diferentes moléculas entre duas fases: uma fase estacionária (líquida ou sólida) e uma fase móvel (líquida, gasosa ou fluído supercrítico) imiscível com a fase estacionária. De acordo a natureza da fase móvel, as técnicas cromatográficas podem ser classificadas em cromatografia líquida, cromatografia gasosa e cromatografia supercrítica [98, 99].

Atualmente, as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia em fase gasosa acoplada com o detetor de massa (GC-MS) são as mais utilizadas para a separação e quantificação de compostos bioativos em matrizes alimentares [100].

2.3.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A HPLC é uma técnica analítica de separação muito utilizada em laboratórios químicos e farmacêuticos, que utiliza equipamentos altamente sofisticados. As técnicas

de HPLC têm sido, amplamente, utilizadas na separação e caracterização de compostos fenólicos numa grande variedade de extratos vegetais [101-103], frutas [104, 105], sumos [106, 107], azeite de oliva [108], vinhos e outras bebidas [109-112].

Esta técnica analítica fundamenta-se na separação e distribuição dos compostos de uma mistura por meio de duas fases imiscíveis: uma fase móvel líquida e uma fase estacionária contida numa coluna. As amostras são dissolvidas num solvente adequado e analisadas em solução a qual é, posteriormente, introduzida no sistema cromatográfico e arrastada pela fase móvel sob pressão elevada ao longo da fase estacionária. Esta fase é caracterizada pelo uso de colunas em aço inox num diâmetro interno de 2-5 mm, empacotadas com partículas de tamanho pequeno 1,5-10 μm originando pressões elevadas no sistema quando são atravessadas pela fase móvel. O fluxo e a fase móvel podem ser, rigorosamente, alteradas durante o processo de análise cromatográfico [98, 113].

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência é composto, essencialmente, por um reservatório, um sistema de injeção, uma coluna cromatográfica, um detetor e um registrador de dados (Figura 9).

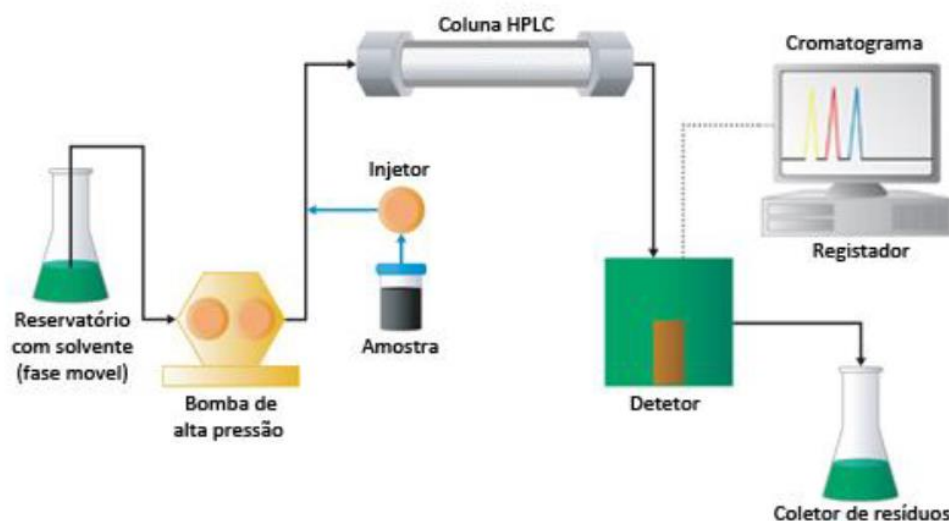


Figura 9. Esquema do sistema HPLC (adaptado de Pinto [98]).

O reservatório é onde se encontram os solventes que constituem a fase móvel. Para o sistema de HPLC é fundamental ter dois reservatórios (sistema binário) conjuntamente com uma bomba ou sistema de bombas que transportam os líquidos contidos nos reservatórios nas proporções estabelecidas pelo operador [98].

Inicialmente, o sistema de injeção era efetuado por microseringas, atualmente o sistema é automatizado devido aos auto-injetores que injetam grandes quantidades de amostras sem a presença de um operador. Uma vez injetada, a amostra é separada na coluna cromatográfica, a qual contém a fase estacionária [114].

Relativamente ao detetor, este tem como função a detenção dos compostos que provêm da coluna cromatográfica. Um bom detetor deve ter uma elevada sensibilidade, seletividade, limite de detenção suficientemente baixo, boa estabilidade e reprodutibilidade do sinal e resposta rápida ao sensor e ser adequado aos componentes que se pretendem analisar e que percorrem pela coluna cromatográfica [115].

Existem diversos tipos de detetores entre eles temos o detetor ultravioleta visível (UV/Vis), o mais utilizado em análises por HPLC, cujo princípio baseia-se na absorção da luz ultravioleta ou visível por parte da amostra, quando passa a radiação eletromagnética sobre ela. Atualmente, encontram-se disponíveis três tipos de equipamento que baseiam-se neste princípio: os fotômetros de comprimento de ondas fixo, os espectrofotômetros e os detetores de arranjo de fotodiodos (PDA) [99, 114].

Um HPLC com detetor de fotómetro de comprimento de onda fixo compreende a aplicação restrita a moléculas que absorvam no comprimento de ondas característico da amostra analisar. Este detetor emite uma luz ultravioleta entre os 190-400 nm por meio de lâmpadas de deutério e 400-800 nm utilizando lâmpadas de tungsténio. Os detetores de arranjo de fotodíodos (PDA) fornecem espectros no UV-Vis do eluente da coluna em delimitados intervalos de tempo. Este detetor é considerado para a realização de desenvolvimentos de novos métodos, por possibilitar o varrimento da região UV-Vis numa única corrida [114].

Há certos compostos que possuem fluorescência ou são derivados fluoresecntes e podem detetar-se por um detetor de fluorescência (FLR). A intensidade da luz emitida é controlada para quantificar a concentração no analito [99].

Outro tipo de detetor que se destaca é o detetor de espectrometria de massas (MS). Este tipo de detetor oferece grande sensibilidade e seletividade e baseia-se na fragmentação de moléculas por campos elétricos, sendo a separação feita com base na relação massa e carga de molécula fragmentada [99]. Os detetores descritos, anteriormente, são comumente utilizados para a determinação de polifenóis em vegetais e frutos.

O detetor é conectado a uma instalação resistente para altas pressões que podem atingir as 300 atm, o sinal determinado pelo detetor é emitido por meio de um registrador que permite a visualização do cromatograma [116].

Dependendo da natureza da fase estacionária e da fase móvel, a separação dos analitos de uma amostra pode ocorrer mediante diferentes processos físico-químicos [98]:

- a) Adsorção: na cromatografia de adsorção a fase estacionária é um adsorvente composto por partículas finamente divididas como por exemplo o gel de sílica ou alumina. A separação baseia-se em processos de adsorção/dessorção repetidos. Há uma competição entre moléculas do soluto e do solvente pelos sítios ativos do adsorvente, estando relacionada com a interação entre os grupos funcionais das partículas do suporte da fase estacionária e os grupos polares das moléculas do soluto [98, 99].
- b) Partilha: é um mecanismo de separação da fase estacionária que é líquida que reveste a partícula de sílica de diâmetro reduzido, a separação vai depender essencialmente da solubilidade dos analitos na fase estacionária e na fase móvel [114]. No caso da fase estacionária ser polar e a fase móvel apolar, a cromatografia diz-se em fase normal. No entanto, se a fase estacionária for apolar (hidrofóbica) e a fase móvel polar, a cromatografia diz-se em fase inversa. Em fase normal, os analitos mais polares são os mais retidos e os últimos a sair da coluna cromatográfica, enquanto que na cromatografia em fase inversa os analitos mais retidos são os de natureza não polar [99].
- c) Troca iónica: neste processo a fase estacionária é um sólido e está caracterizada pela ionização e a sua separação baseia-se na atração de cargas opostas [114].
- d) Exclusão molecular: a fase estacionária é constituída por um material poroso e as substâncias são separadas de acordo com o tamanho molecular dos analitos. As moléculas com maior volume têm menor tempo de retenção sofrem o processo de exclusão e as moléculas de menor dimensão demoram mais tempo em eluir (sofrem permeação) [114].

2.3.2.2. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC)

Ao longo dos últimos anos, várias alterações foram surgindo nos instrumentos de cromatografia líquida, permitindo análises mais rápidas e eficientes. Com surgimento da cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) as análises cromatográficas passaram a ser efetuadas de uma forma mais rápida e eficientes, sem comprometer a resolução cromatográfica [117]. Essencialmente, o UHPLC baseia-se no mesmo princípio de separação que o HPLC com a diferença da introdução de partículas de fase estacionária de diâmetro inferior a 2 μm e a utilização de altas pressões lineares da fase móvel impulsadas pelas bombas atingindo os 15.000 psi, permitindo assim a diminuição do tempo de análise e uma elevada resolução cromatografia [118].

2.3.2.3. Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)

A cromatografia gasosa é uma técnica analítica de separação de substâncias voláteis consoante a afinidade dos analitos da amostra com a fase estacionária. Este tipo de cromatografia em coluna utiliza como fase móvel um gás quimicamente inerte. A amostra é vaporizada e introduzida pelo um fluxo de gás, atravessando a coluna aquecida contendo a fase estacionária onde ocorre a separação. Existem dos tipos de fase estacionária que pode ser sólida ou líquida. As fases estacionárias sólidas são menos versáteis e menos utilizadas que as fases líquidas que são constituídas por partículas sólidas inertes que preenchem a coluna cromatográfica. A separação dos analitos das amostras vai depender de duas características importantes: a solubilidade e a volatilidade do analito. Quanto maior for o peso molecular e a polaridade da sustância, menor será a sua volatilidade e conseqüentemente maior será a dificuldade para analisar [98, 119].

Um equipamento de cromatografia gasosa é constituído por um sistema de fornecimento de gases que abastece o equipamento para a fase móvel, sendo conduzido sob alta pressão e com fluxo controlado até ao injetor, que seguidamente atravessa a coluna e sai pelo detetor. O gás utilizado tem de ser quimicamente inerte e os mais, frequentemente, usados são o hélio e o nitrogénio.

A introdução da amostra é realizada por meio de uma seringa que atravessa um septo de borracha, existente no injetor. Em geral, o sistema de injeção é composto por um cilindro metálico aquecido a uma determinada temperatura de modo que, os componentes da amostra se vaporizem para serem arrastados pelo gás para dentro da coluna cromatográfica [98, 99].

A coluna cromatográfica encontra-se dentro de um forno, com temperaturas programáveis, geralmente aumentadas de modo linear. A amostra é arrastada ao longo da coluna interagindo com a fase estacionária em diferentes velocidades que vai depender da volatilidade do analito levando à separação cromatográfica. A fase estacionária conjuntamente com a temperatura da coluna podem afetar a migração dos analitos [98, 119]. Essencialmente, são utilizadas dois tipos de colunas – enchimento e capilares, estas últimas as mais utilizadas. São constituídas por sílica fundida e revestida exteriormente por poliamidas que conferem a propriedade de grande flexibilidade da coluna. As colunas de enchimento são constituídas por vidro sinalizado e encontram-se empacotadas por partículas sólidas revestidas com o líquido que compõe a fase móvel [98].

Após a passagem dos analitos pela coluna, estes encontram os detetores que determinam uma propriedade física ou química originando um sinal elétrico de intensidade proporcional à quantidade detetada. O sinal elétrico produzido pelo detetor é transmitido e registado através de cromatogramas num sistema computadorizado para o tratamento de dados.

Na Figura 10 encontra-se exemplificado um esquema do sistema de cromatografia gasosa.

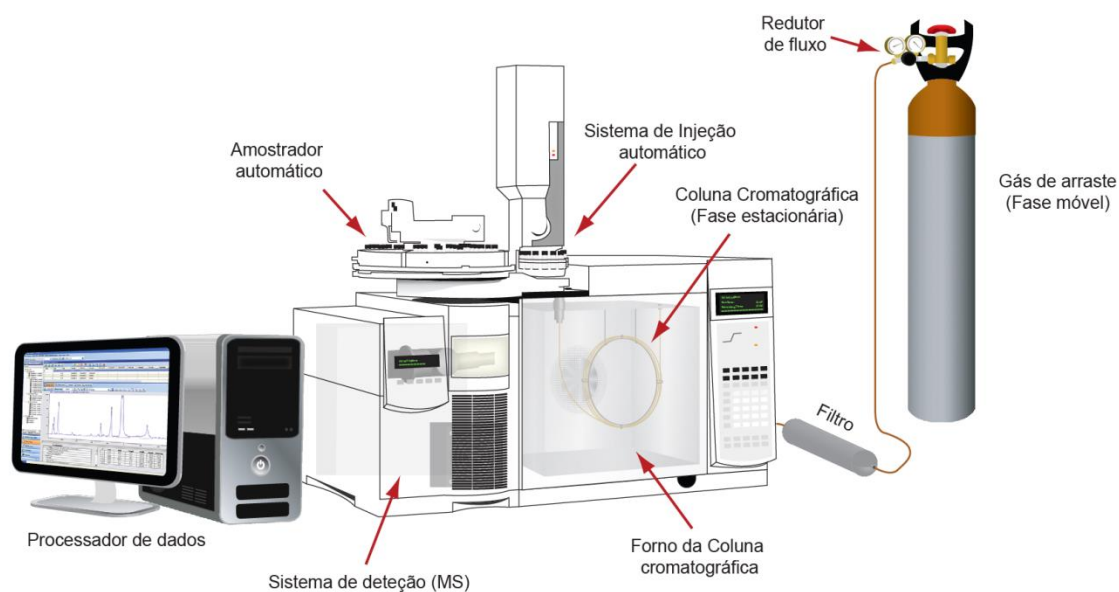


Figura 10. Esquema básico de um equipamento de cromatografia gasosa acoplado a um espectrômetro de massa (GC-MS).

Atualmente, estão disponíveis vários tipos de detetores, entre os quais se destacam o detetor de ionização de chama (FID) utilizado em estudos de substâncias orgânicas, o detetor de condutividade térmica (TCD) que é menos sensível e não é utilizado nas colunas capilares, o detetor de nitrogénio/fósforo (NPD) que só é utilizado para amostras que

contenham nitrogénio ou fósforo na sua composição e o detetor de espectrometria de massa (MS) que permite a identificação de moléculas através do seu peso, possibilitando determinar a fórmula molecular pelo estudo da fragmentação do analito. Este estudo baseia-se na ionização de um composto em estado gasoso por meio de um feixe de elétrons de alta energia que passa pela amostra originando os fragmentos iónicos que são separados de acordo a massa/carga (m/z) permitindo detetar quantidades inferiores a 10^{-12} g. O detetor de espectrometria de massa é comumente utilizado na determinação de voláteis em vegetais [98, 120].

2.3.3. Técnicas de extração

Frequentemente, as análises cromatográficas de amostras alimentares requerem um tratamento prévio da amostra, devido à complexidade da matriz e a sua incompatibilidade com os sistemas cromatográficos e o facto de muitos dos compostos a analisar se encontrarem em concentrações vestigiais.

Atualmente, existe uma grande diversidade de técnicas de pré-tratamento da amostra que permitem extrair os compostos bioativos de matrizes alimentares. Entre estas técnicas destacam-se a extração líquido-líquido (LLE), a extração em fase sólida (SPE), a microextração por sorvente empacotado (MEPS), e mais recentemente o QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effetive, Rugged and Safe*) que têm sido frequentemente utilizadas para a extração de compostos fenólicos em diversas matrizes alimentares [121-124]. Outra técnica comumente utilizada na determinação de compostos bioativos, como os compostos tepénicos a partir de matrizes vegetais [125], é a microextração em fase sólida (SPME).

2.3.3.1. Extração líquido-líquido (LLE)

A LLE é uma técnica de separação que envolve a distribuição de uma ou mais substâncias entre duas fases líquidas imiscíveis, onde numa das fases o analito se encontra dissolvido (fase aquosa) e a outra é um solvente orgânico (solvente extrator). A escolha do solvente extrator é o passo determinante desta técnica, uma vez que a eficiência de extração irá depender da afinidade do soluto pelo solvente extrator [98].

Para a extração de polifenóis os solventes orgânicos mais utilizados são o metanol, o propanol, a acetona, o acetato de etilo e as suas combinações em diferentes proporções [126, 127]. Para a determinação de certos polifenóis o solvente requer ser acidificado como é o caso das antocianinas, para que o meio acidificado possa destruir as membranas

celulares e as dissolvam e estabilizem [128]. A temperatura utilizada para a extração LLC, em geral, é a temperatura ambiente. No entanto, estudos recentes indicam que uma temperatura entre os 20 e os 40 °C não causa a degradação dos compostos, o tempo de extração é menor e evita o processo de oxidação por intervalos de tempos longos [126, 129].

2.3.3.2. Extração fase-sólida (SPE)

A SPE, atualmente, é uma das técnicas mais utilizadas para a extração e/ou concentração de amostras complexas, permitindo que analitos em concentrações diminutas sejam detetados por cromatografia [130]. Inicialmente desenvolvida para suprimir as desvantagens da LLE, esta técnica rapidamente tornou-se popular sendo utilizada em diversas áreas como a área alimentar [131], farmacêutica [132], ambiental [133], toxicológica [134], entre outras.

Em geral, a SPE compreende quatro etapas, nomeadamente o condicionamento do sorvente, a passagem da amostra pela fase extratora, o *clean-up* e por fim a eluição do analito (Figura 11).

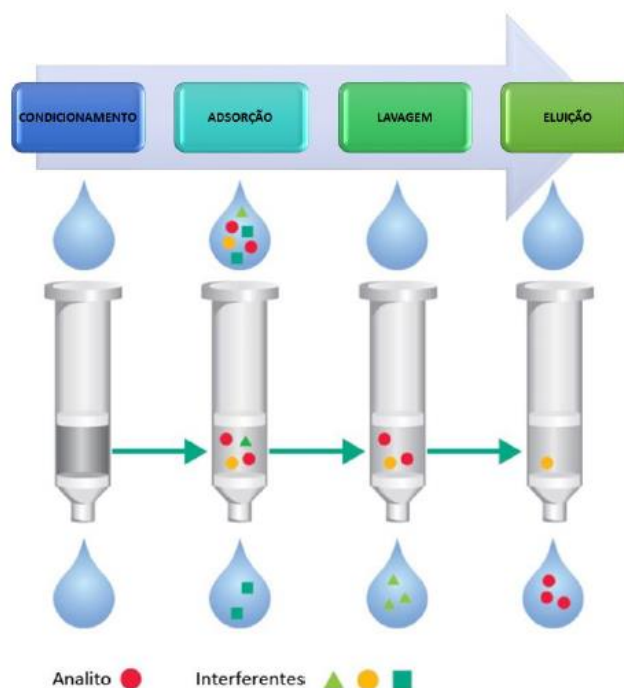


Figura 11. Representação esquemática das etapas de extração da SPE (adaptado de Alves [113]).

A primeira etapa da SPE consiste no condicionamento do sorvente que é realizado com um solvente adequado, geralmente metanol, que tem como finalidade solvatar os grupos funcionais do sorvente, garantindo a sua interceção com a amostra [130].

Na segunda etapa, a amostra líquida é transferida cartucho de SPE. A passagem da amostra pelo sorvente resulta na retenção dos analitos devido às interações químicas estabelecidas com a fase estacionária. Em geral, os interferentes provenientes da amostra são eluídos, mas alguns podem ficar retidos, conjuntamente, com os analitos, razão pela qual existe a etapa seguinte, o *clean-up*. Nesta etapa, ocorre a eliminação dos compostos interferentes por meio da lavagem com solvente, normalmente água, solventes orgânicos diluídos ou mesmo soluções tampão [113, 130].

A última etapa consiste na eluição dos analitos que se realiza com ajuda de um solvente, que deve de ter a capacidade de quebrar as interações entre o analito e o sorvente [113].

2.3.3.3. Micoextração por sorvente empacotado (MEPS)

O método de extração MEPS é uma miniaturização da técnica convencional da SPE, na qual os volumes de amostras e dos solventes foram reduzidos de mililitros a microlitros. Esta técnica utiliza os mesmos sorventes que a SPE, entre as quais se destacam as fases de sílica funcionalizada com os grupos etil (C₂), octil (C₈) e octadecil (C₁₈), as resinas de troca iónica como a SCX, a R-AX e R-CX, e as fases poliméricas de estireno divinil-benzeno (HLB-DVB, H-DVB). Contrariamente aos cartuchos de SPE, a fase sólida (sorvente) da MEPS encontra-se empacotada numa microcoluna, conectada a uma agulha de uma microseringa de capacidade de 100 - 500 µL, como se pode observar na Figura 12 [114, 121, 135].

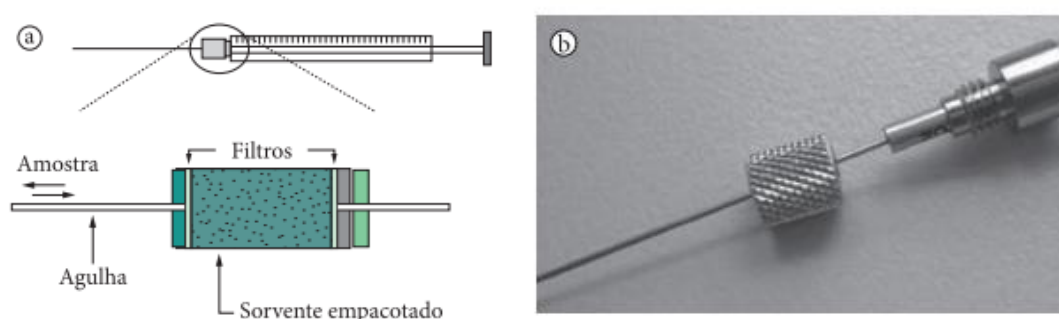


Figura 12. a) Representação esquemática da microseringa MEPS com microcoluna empacotada. b) seringa MEPS (adaptado de Queiroz [135]).

A extração por MEPS utiliza as mesmas etapas da SPE, nomeadamente, o condicionamento do sorvente com o solvente mais apropriado, a introdução da amostra (que é aspirada e dispensada pela agulha da microsseringa), a etapa da lavagem que elimina os interferentes que possam estar retidos com os analitos no sorvente e, finalmente, a eluição dos analitos de interesse [114].

Atualmente, a MEPS encontra-se disponível em três versões: manual, que foi o primeiro formato disponível, o qual utiliza uma seringa analítica com capacidade máxima de 250 μL , a versão semi-automática que contém um dispositivo totalmente digital para realizar a aspiração e dispensa de líquidos, o qual permite programar todas as tarefas do procedimento de extração e por último a versão automática caracterizada por plataformas robóticas (Figura 13). Tanto a versão semi-automática como a automática possibilitam métodos analíticos mais fiáveis e precisos do que a MEPS manual, uma vez que os erros associados ao operador humano são minimizados. [114, 135].



Figura 13. Representação esquemática das diferentes versões da MEPS (adaptado de Gonçalves [114]).

Esta técnica de extração tem sido utilizada para extrair uma ampla gama de analitos em diferentes tipos de matrizes incluindo fármacos em amostras biológicas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e resíduos semi-voláteis em água, análise do teor de flavonoides em sumos de fruta e de compostos fenólicos em cereais [136].

2.3.3.4. QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)

A metodologia de extração QuEChERS foi desenvolvida inicialmente para a análise de resíduos de pesticidas em frutas, legumes e vegetais [137]. É um processo rápido e eficiente na extração de compostos de resíduos em amostras de alimentos e na remoção de interferentes como pigmentos, açúcares e lípidos. Esta técnica apresenta

várias vantagens, fornece resultados de qualidade com uma abordagem rápida, fácil e de baixo custo, permite a análise de amostras de matrizes sólidas e líquidas [138, 139]. Esta técnica devido à sua praticidade e vantagens, nos últimos anos, tem sido utilizada para a determinação de polifenóis em frutas e vegetais [124, 140].

O método QuEChERS compreende três etapas essenciais, nomeadamente, a extração, a partição de amostra e a etapa de *clean up* (Figura 14).

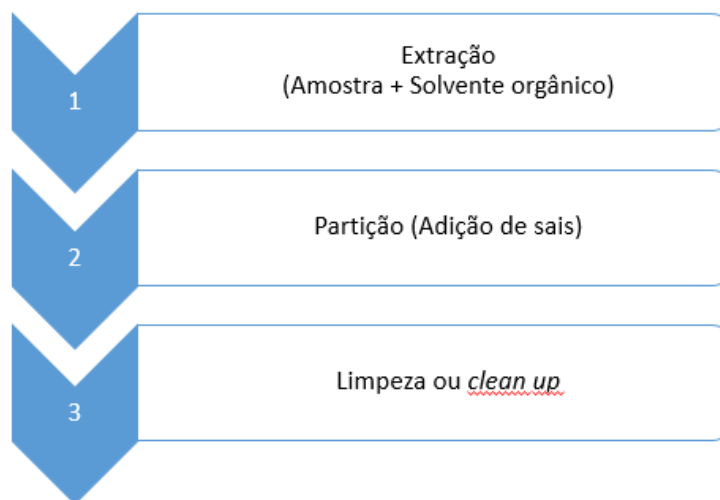


Figura 14. Representação esquemática das etapas do QuEChERS.

A primeira etapa consiste na mistura de um solvente orgânico, geralmente, acetonitrilo com a amostra. Este solvente ajuda a ter uma menor quantidade de interferentes lipofílicos como gorduras provenientes da amostra [141].

Seguidamente, ocorre a etapa da partição onde se adiciona os sais para extrair os analitos alvo, promovendo o efeito de *salting out*. A partição é controlada através da combinação do cloreto de sódio e do sulfato de magnésio (chamado de sal secante), que têm como finalidade melhorar as percentagens de recuperação para analitos polares já que a adição destes diminui a solubilidade dos compostos na fase aquosa. O sal secante possui uma grande capacidade de remoção de água e quando é hidratado sofre uma reação exotérmica, originando um aquecimento entre os 40 a 45 °C, favorecendo, assim a extração de compostos, especialmente apolares [141, 142].

Nestas duas etapas é essencial a interação entre os sais, o solvente orgânico e a amostra. Para facilitar essa interação, a amostra é homogeneizada através de agitação manual ou com o auxílio de um vórtex e posteriormente, a mistura é centrifugada para que ocorra o processo de separação das duas fases. A fase superior (orgânica) é recolhida e transferida para outro tubo de centrifuga para a realização da etapa seguinte, o *clean up*

[113, 142]. Esta etapa consiste numa extração em fase sólida dispersiva (dSPE) e permite que o *clean up* e a redução de água sejam efetuados de forma rápida e simultânea, originando um extrato final de menor polaridade pela precipitação dos interferentes polares.

Na dSPE utilizam-se cartuchos ou colunas com determinados sorventes, que são selecionados com base na capacidade de reter os compostos da matriz. Um dos sorventes utilizados é o PSA (*primary secondary amine*), que têm como objetivo a retenção dos interferentes da matriz como ácidos orgânicos, açúcares e outros compostos polares que estejam presentes na amostra. Outros sorventes também utilizados na dSPE são: C₁₈, GCB (*graphitised carbon black*) e o MgSO₄. Estes são selecionados dependendo da complexidade da matriz; por vezes se requer a mistura de vários sorventes para o processo de limpeza, havendo atualmente kits com várias misturas de sorventes disponíveis. Nesta etapa é também realizada a homogeneização por agitação e posterior centrifugação para obtenção do extrato final. Uma vez obtido o extrato este é colocado num vial para análise cromatográfica ou pode ser evaporado e posteriormente analisado (dependendo da complexidade da amostra e do objetivo da análise) [113].

2.3.3.5. Microextração em fase sólida (SPME)

A SPME é uma técnica de extração e pré-concentração de amostras muito simples, que tem por base a extração sortiva [98]. Atualmente, esta técnica é muito utilizada para analisar o perfil volátil de alimentos e bebidas, como o vinho [143, 144], as frutas [145, 146], os vegetais [147, 148], entre outros.

Normalmente, a extração dos analitos presentes numa matriz aquosa são absorvidos/adsorvidos para uma fina fibra de sílica fundida revestida por uma camada polimérica [149], que se encontra colocada num dispositivo com a forma de uma seringa como ilustra a Figura 15.

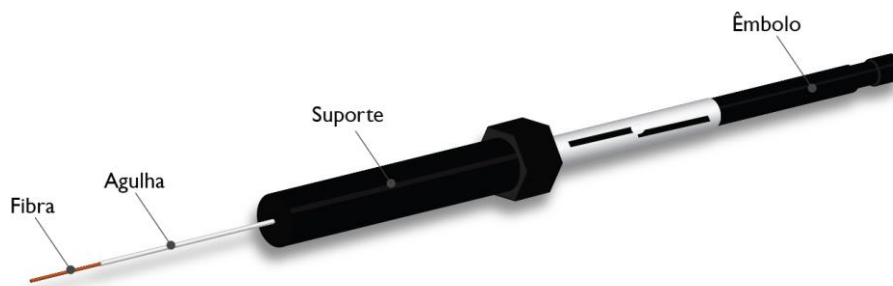


Figura 15. Dispositivo de SPME (adaptado de Gonçalves [150]).

Conforme o tipo de analitos em estudo e a complexidade da amostra, a SPME pode ser efetuada por imersão direta (DI-SPME), por *headspace* (HS-SPME) ou com o auxílio de uma membrana (M-SPME). Na DI-SPME a fibra é posta em contacto diretamente com amostra, enquanto que na HS-SPME a fibra exposta na fase de vapor acima da amostra (*headspace*). Similarmente à DI-SPME encontra-se a extração por membrana, diferindo apenas no facto da fibra se encontrar protegida por uma membrana semipermeável. A Figura 16 ilustra os diferentes modos de SPME.

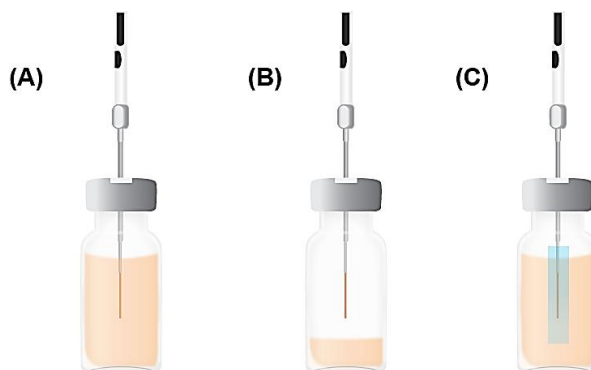


Figura 16. Representação esquemática dos modos de SPME (a) por imersão direta, (b) por headspace (c) por membrana (adaptado de Gonçalves [151]).

A HS-SPME é provavelmente o modo de extração mais utilizado para a análise de compostos voláteis, visto que é mais seletivo que a imersão direta, evitando outras interferências como substâncias de elevado peso molecular, eventualmente presentes na matriz.

O procedimento típico de HS-SPME é muito simples. Regra geral, com a fibra retraída a agulha perfura o septo do frasco de amostragem, e em seguida o êmbolo do dispositivo é pressionado e a fibra é exposta no *headspace* da amostra. Aí os analitos da matriz através de um processo de adsorção/absorção aderem à fibra, dando-se a extração. Uma vez atingido o equilíbrio entre a concentração de analitos no *headspace* e no revestimento da fibra, o processo considera-se terminado e a fibra é retraída para o interior da seringa e a agulha é removida do frasco de amostragem. Posteriormente a agulha entra no injetor do sistema cromatográfico onde a fibra é exposta e, por ação da temperatura, ocorre a dessorção dos analitos [152-154]. A Figura 17 ilustra as etapas da SPME.

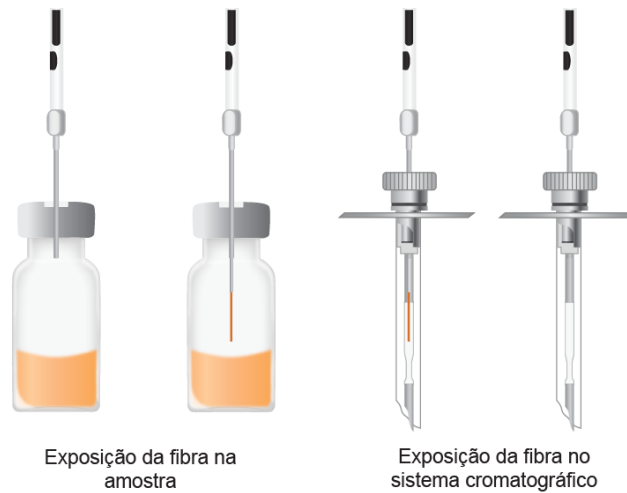


Figura 17. Representação esquemática de um dispositivo SPME na absorção e dessorção da fibra de SPME (adaptado de Alves [155]).

De salientar que são diversos os fatores que influenciam o processo de extração destacando-se o tipo de fibra, a temperatura e o tempo de extração, a agitação e o volume da amostra, a força iônica do meio e o pH da amostra [156]. Normalmente, cada um destes parâmetros deve ser otimizado, para uma determinada matriz, de modo a obter a melhor eficiência de extração.

CAPÍTULO III
PARTE EXPERIMENTAL

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e Padrões analíticos

Os padrões e reagentes usados no desenvolvimento deste trabalho foram de grau analítico adequado às análises realizadas. As Tabela 17A e Tabela 18A apresentadas em anexo descrevem a lista de padrões e reagentes utilizados.

De salientar que a água ultrapura, com resistividade mínima 18,2 MΩ/cm à temperatura ambiente, foi obtido por num sistema de purificação de água Milli-Q® da Millipore (Bedford, EUA).

3.2. Material e equipamento

Tratando-se de um trabalho de cariz experimental, todos os materiais de laboratório utilizados foram adequados às atividades desenvolvidas. Os materiais de vidro usados para medições volumétricas, como balões e pipetas volumétricas, eram de classe A, provenientes da Labbox, enquanto que as micropipetas usadas para a medição de volumes exatos foram provenientes da Orange Scientific. De salientar que estas micropipetas utilizavam pontas descartáveis (modelo Gilson® da Frilabo), que foram trocadas após cada utilização.

Para a metodologia de extração SPME foram utilizados uma fibra Divinilbenzeno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS, 50/30 μm), um suporte manual de SPME e um frasco de vidro âmbar de capacidade máxima 25 mL hermeticamente vedado com septo de teflon (Supelco, USA). Quanto à metodologia de extração QuEChERS, foram utilizados tubos falcon de 50 mL (VWR®, Carnaxide, Portugal) e tubos de *clean up* DisQue de capacidade máxima 2 mL, contendo 150 mg MgSO₄, 25 mg de PSA e 25 mg de C₁₈ (Waters, Mildford, MA, EUA). Os extratos obtidos nesta metodologia foram filtrados com filtros de seringa de 0,22 μm de politetrafluoretileno (PTFE) hidrofílicos da BGB® Analytik (Alexandria, VA, EUA) e colocados em vials âmbar de capacidade 1,5 mL da Waters (Mildford, MA, EUA) com os respetivos insertos cónicos de vidro de 250 μL.

Os solventes utilizados nas fases móveis da cromatografia líquida foram devidamente filtrados a vácuo pelo sistema de filtração All-Glass da Millipore e armazenados em frascos de vidro de borosilicato da VWR® (Carnaxide, Portugal).

Quanto às análises espectrofotométricas para a determinação do teor de compostos bioativos tais como os fenóis, os flavonoides, as antocianinas, as betalainas e os carotenoides, assim como a capacidade antioxidante foram utilizadas células de quartzo de comprimento ótico 10 mm da Hellma® Analytics.

No decorrer deste trabalho foram utilizados uma série de equipamentos disponibilizados pelo Centro de Química da Madeira (CQM), que garantiram a execução deste estudo. A Tabela 19A que se encontra em anexo descreve os principais equipamentos utilizados.

3.3. Amostras

Foram analisados 11 vegetais distintos, nomeadamente o tomate (*Solanum lycopersicum*), tomate inglês (*Solanum betaceum*), agrião (*Rorippa nasturtium-aquaticum*), brócolos (*Brassica oleracea*), espinafre (*Spinacia oleracea*), cenoura branca e cenoura laranja (*Daucus carota*), beterraba (*Beta vulgaris*), cebola branca e cebola roxa (*Allium cepa*) e alho (*Allium sativum*). As amostras de vegetais foram adquiridas numa superfície comercial do Funchal (Mercado dos Lavradores), Ilha da Madeira no mês de Setembro de 2015. Para cada amostra vegetal foram adquiridos 1 kg de forma aleatória das prateleiras do mercado, descartando os vegetais com aparência desagradável.

Cada amostra foi lavada em água corrente e todas as partes não comestíveis foram removidas manualmente ou com o auxílio de uma faca. Seguidamente, cada amostra foi colocada num triturador para a obtenção das polpas e posteriormente armazenadas a – 20 °C ao abrigo da luz até à realização das análises.

3.4. Obtenção dos extratos por USAE

A extração dos compostos bioativos presentes em cada matriz vegetal foi efetuada de acordo com o procedimento descrito por Annegowda [157] com algumas modificações. Essencialmente, 10 g de amostra foram colocada num frasco de vidro âmbar contendo metanol na proporção de 1:10 (*m/v*). Após homogeneização, a mistura foi colocada num banho ultrassónico (42 kHz) a 30 °C durante 30 minutos. Este método é frequentemente utilizado para facilitar a extração de metabolitos a partir de material vegetal, uma vez que a aplicação de ultrassons com elevada intensidade gera tensões mecânicas na suspensão celular, suficientes para causar a rutura das células, aumentando

deste modo a solubilização dos metabolitos no solvente e consequentemente a eficiência de extração [158].

O extrato obtido foi decantado e filtrado através de filtros de papel Whatman™ No. 1 da GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra) e o filtrado resultante dividido em alíquotas de 8 mL e armazenado a – 20 °C até à realização das análises.

3.5. Determinação de compostos bioativos

3.5.1. Determinação do teor total de compostos fenólicos

A determinação do teor total de compostos fenólicos dos extratos vegetais foi realizada com base na metodologia descrita por Tharasena [159] com ligeiras modificações. Resumidamente, 50 µL do extrato foram adicionados a 3 mL de água destilada e 250 µL de reagente de Folin Ciocalteu. Após agitação adicionou-se 750 µL de Na₂CO₃ a 20 % e deixou-se a mistura reagir por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Ao fim deste período a absorvância da solução foi registada a 750 nm utilizando o metanol como branco. O teor total de compostos fenólicos, expresso em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de massa fresca (mg GAE/g vegetal), foi determinado por interpolação da absorvância na equação da reta obtida através da construção de uma curva de calibração com ácido gálico num intervalo de concentrações de 25 até 400 µg/ml. De salientar que as análises foram realizadas em triplicado e os resultados apresentados correspondem aos valores médios.

3.5.2. Determinação de flavonoides totais

A determinação do teor de flavonoides totais foi efetuada através do ensaio colorimétrico com cloreto de alumínio (AlCl₃) usando o procedimento descrito por Marinova [160]. Neste ensaio, 1 mL de extrato vegetal foi pipetado para um balão volumétrico de 10 mL contendo uma mistura de 4 mL de água destilada e 300 µL de NaNO₂ (5%). Após 5 minutos de reação adicionou-se 300 µL de AlCl₃ (10%) e deixou-se a mistura em repouso durante 6 minutos. Em seguida 2 mL de NaOH (1M) foram adicionados à mistura e o balão aferido com água destilada. Após homogeneização, a absorvância da solução foi medida aos 415 nm. Os resultados foram obtidos por meio da equação da reta resultante da curva de calibração em quercetina num intervalo de concentrações de 10 até 400 µg/mL. Todas as amostras foram analisadas em triplicado e

os resultados expressos em mg equivalentes de quercetina por grama de massa fresca (mg QE/g vegetal).

3.5.3. Determinação do teor de antocianinas totais

A análise do teor de antocianinas totais foi realizado pelo método do pH diferencial proposto por Giusti [161]. Numa primeira fase do processo foram preparadas as soluções tampão cloreto de potássio (KCl, pH=1) 0,025 M e acetato de sódio (CH₃CO₂Na, pH= 4,5) 0,4 M. Em seguida os extratos vegetais (250 µL) foram diluídos em cada uma destas soluções tampão (2250 µL) e a absorvância registrada a 520 nm e 700 nm. A concentração de antocianinas totais nas amostras foi calculada com base nas seguintes equações:

$$TA (mg/L) = \frac{A \times MM \times DF \times 1000}{\epsilon \times l} \quad (\text{Equação 1})$$

$$A = (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700})_{pH1,0} - (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700})_{pH4,5} \quad (\text{Equação 2})$$

onde *TA* corresponde ao teor de antocianinas, *A* é a diferença entre as absorvâncias nos diferentes pH's de acordo com a equação 2, *MM* é a massa molar da cianidina-3-glucosídeo (449,2 g/mol), *FD* é o fator de diluição e ϵ é o coeficiente de extinção molar da cianidina-3-glucosídeo (26900 L/mol.cm).

3.5.4. Determinação do teor de betalaínas

Para as amostras de beterraba determinou-se o teor de betaxantinas e betacianinas de acordo com o procedimento descrito por Ravichandran [162]. Segundo este autor, a absorvância dos extratos é medida nos comprimentos de onda 480 nm e 538 nm e o teor de betalaínas é obtido através da seguinte equação:

$$TB (mg/L) = \frac{A \times MM \times DF \times 100}{\epsilon \times l} \quad (\text{Equação 3})$$

onde *TB* corresponde ao teor de betalaínas, *A* é absorvância do extrato, *FD* é o fator de diluição e *l* é o comprimento do percurso ótico (1 cm). Para a quantificação das betacianinas e das betaxantinas as massas molares (*MM*) e os coeficientes de extinção

molar (ϵ) são 550 g/mol e 60000 L/mol.cm para as betacianinas e 308 g/mol e 48000 L/mol.cm para a betaxantinas respetivamente.

3.5.5. Determinação do teor de carotenoides totais

A quantificação de carotenoides totais nos extratos vegetais foi determinada com base no procedimento descrito por Lichtenthaler [163]. Segundo os autores a leitura das absorvâncias dos extratos deverá ser efetuada em diferentes comprimentos de onda, tendo em conta o solvente extrator. O teor de clorofilas a e b também deve ser tido em conta, uma vez que os espetros de absorção destes pigmentos se sobrepõem parcialmente ao dos carotenoides. Assim, a quantificação dos carotenoides pode ser facilmente determinada pelas seguintes equações:

$$C_a(\mu g/ml) = 16,72 A_{665,2} - 9,16 A_{652,4} \quad (\text{Equação 4})$$

$$C_b(\mu g/ml) = 34,09 A_{652,4} - 15,28 A_{665,2} \quad (\text{Equação 5})$$

$$C_{(x+c)}(\mu g/ml) = (1000 A_{470} - 1,63 C_a - 104,96 C_b)/221 \quad (\text{Equação 6})$$

Onde C_a corresponde à concentração de clorofila a, C_b é a concentração de clorofila b, $C_{(x+c)}$ é a concentração de carotenoides totais (xantofilas e carotenos), $A_{665,2}$ é a absorvância a 665,2 nm, $A_{652,4}$ é a absorvância a 652,4 nm e A_{470} é a absorvância a 470 nm.

3.6. Determinação *in vitro* da Capacidade Antioxidante

A determinação da capacidade antioxidante dos extratos vegetais foi efetuada através dos ensaios colorimétricos DPPH, ABTS e FRAP de acordo com as metodologias descritas por Thaipong [88], com algumas modificações. De salientar que todas as determinações foram efetuadas em triplicado e os resultados apresentados correspondem a valores médios.

3.6.1. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

A avaliação da capacidade antioxidante pelo método DPPH consiste essencialmente, na redução do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), na

presença de um antioxidante, que pode ser acompanhada espectrofotometricamente através da alteração da cor [64]. Em termos práticos, este ensaio baseou-se na adição de 150 µL de amostra a 2850 µl de solução metanólica do radical DPPH[•] (60 mM) de cor violeta. Após homogeneização, a reação foi acompanhada espectrofotometricamente durante intervalos de tempo regulares (30 s) até 30 minutos a 515 nm. A percentagem de inibição do DPPH[•] foi posteriormente calculada de acordo com a equação 7.

$$\% \text{ inibição DPPH} = \frac{\text{Abs inicial} - \text{Abs final}}{\text{Abs inicial}} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

Abs inicial representa a absorvância da solução no tempo 0 e *Abs final* corresponde à absorvância da solução no final dos 30 minutos.

A atividade antioxidante, expressa em µM de equivalentes de trolox por grama de massa fresca (µM TE/g vegetal), foi determinada pela equação da reta resultante da curva de calibração em trolox num intervalo de concentrações de 10 até 1200 µM. A concentração de amostra necessária para inibir 50 % do radical DPPH[•] (EC₅₀) foi igualmente avaliada neste estudo. Para tal, o valor de EC₅₀ foi obtido por interpolação gráfica da % de inibição do DPPH[•] em função da concentração do extrato vegetal.

3.6.2. Método ABTS^{•+} (Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico))

O método ABTS^{•+} é uma das metodologias mais populares na determinação da capacidade antioxidante de alimentos e produtos naturais devido à sua simplicidade e reprodutibilidade dos resultados [164]. Experimentalmente este método consiste na formação do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS^{•+}) através da reação de uma solução ABTS (7,4 mM) com uma solução de persulfato de potássio (K₂S₂O₈) 2,6 mM na proporção 1:1 (v/v). A mistura reacional foi conservada ao abrigo da luz e à temperatura ambiente durante 12 horas. Segundo Re [81] a solução resultante é estável durante 48 horas. Uma vez formado, o radical foi diluído com metanol até à obtenção do valor de absorvância 0,700 ± 0,020 a 734 nm. Para a análise da atividade antioxidante, os extratos vegetais (150 µL) foram deixados reagir com 2850 µL da solução ABTS^{•+} durante 30 min e a absorvância foi registada no final deste período a 734 nm. A curva de calibração foi construída com trolox nas concentrações 10, 20, 50, 100, 200 e 400 µM e os resultados da atividade antioxidante expressos em µM equivalentes de trolox por grama de massa fresca (µM TE/g vegetal).

3.6.3. Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

O poder antioxidante por redução do íon férrico (FRAP) constitui um método complementar na avaliação da capacidade antioxidante de frutos e vegetais [82-84], onde o complexo férrico-tripiridiltriazina [Fe(III)-TPTZ] (cor amarela) é reduzido ao complexo ferroso [Fe(II)-TPTZ] (cor azul) em condições ácidas.

Em termos práticos, este ensaio baseou-se na adição de 150 µL de amostra a 2850 µL de solução FRAP preparada através da mistura de 25 mL de tampão acetato 300 mM (pH 3,6), 2,5 mL de solução TPTZ 10 mM em HCl (40 mM) e uma solução de FeCl₃.6H₂O (20 mM). A mistura resultante foi deixada reagir durante 30 minutos a 37 °C ao abrigo da luz. A leitura das absorvâncias foi registada a 593 nm e os resultados determinados por interpolação da absorvância na equação da reta obtida através da construção de uma curva de calibração com trolox num intervalo de concentrações de 10 até 400 µM.

3.7. Determinação dos Compostos Fenólicos por UHPLC-PDA

A análise química de compostos fenólicos presentes em matrizes complexas, como frutas e vegetais, por técnicas cromatográficas requer, geralmente, um tratamento prévio da amostra. Neste sentido, a metodologia de extração QuEChERS assistida por ultrassons foi avaliada neste estudo tendo por base o método desenvolvido por Silva [124], com algumas modificações.

3.7.1. Preparação das Soluções Padrões

Para a otimização do método de extração e análise do teor de compostos fenólicos por UHPLC-PDA foram preparadas soluções padrão individuais do ácido protocatecúico, catequina, ácido gentísico, seringaldeído, ácidos *o*-, *p*- e *m*-coumárico, ácido ferúlico, ácido vanílico, quercetina, ácido cinâmico e kaempferol em metanol para uma concentração de 1 g/L. Após filtração (filtros de seringa PTFE 0,22 µm) as soluções padrão foram distribuídas em alíquotas de 2 mL e armazenadas a - 20 °C.

3.7.2. Otimização do Procedimento de Extração QuEChERS

A otimização do procedimento de extração QuEChERS constituiu uma das etapas fundamentais deste trabalho. Neste estudo foram efetuadas modificações na metodologia QuEChERS desenvolvida anteriormente no laboratório, para extrair compostos fenólicos

em matrizes vegetais [124]. A otimização do procedimento levou à adição de um novo passo, a extração assistida por ultrassons, onde foram avaliados diferentes tempos de extração (1 min, 5 min e 10 min) de forma a melhorar a homogeneização da amostra e aumentar a eficiência de extração. Neste estudo também foram avaliados diferentes solventes de extração, nomeadamente metanol (MeOH), acetonitrilo (ACN), acetato de etilo (EtOAc), MeOH:ACN (50:50, v/v), MeOH:EtOAc (50:50, v/v), ACN:EtOAc (50:50 v/v) e MeOH:H₂O (80:20, v/v). O procedimento experimental QuEChERS está esquematizado na Figura 18.

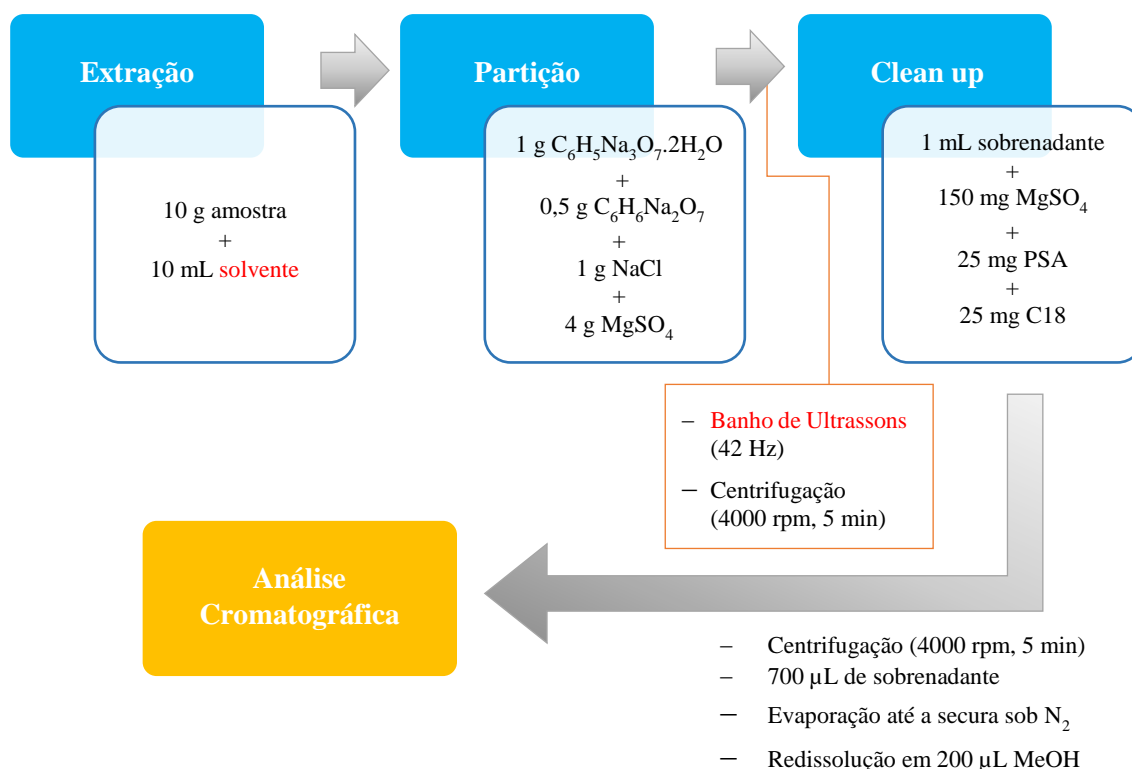


Figura 18. Representação esquemática do procedimento de extração QuEChERS.

De salientar que a otimização foi efetuada numa amostra vegetal (cenoura) enriquecida com a solução padrão das substâncias em estudo (15 µg/mL). Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

3.7.3. Condições Cromatográficas

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos foi efetuada num equipamento de cromatografia líquida de ultra eficiência Acquity UPLC H-Class da Waters (Figura 19), equipado com um sistema de bombas quaternário com módulo de degaseificação integrado (QSM), um amostrador automático (SM), um forno de colunas

e um detetor de fotodiodos (PDA) modelo 2996. Toda a configuração do equipamento foi controlada pelo software Empower[®] v2.0 (Waters Corporation).

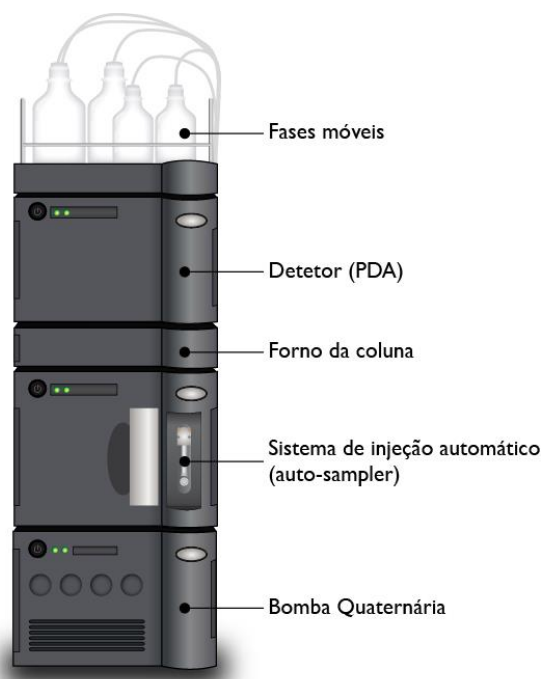


Figura 19. Sistema UHPLC-PDA da Waters modelo Acquity UPLC H-Class (adaptado de Gonçalves [151]).

A coluna analítica utilizada para separar os compostos fenólicos foi uma ACQUITY UPLC[®] HSS T3 (100 × 2,1 mm, 1,8 μm de diâmetro de partícula) da Waters (Milford, MA, EUA). Durante as análises a temperatura da coluna foi mantida a 40 °C e o amostrador automático programado para uma temperatura de 20 °C, de modo a evitar a degradação dos analitos. O volume de injeção, tanto dos padrões como das amostras, foi de 2 μL e a separação cromatográfica ocorreu em modo de gradiente usando como fase móvel uma solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (eluente A) e metanol (eluente B). A Tabela 3 descreve o gradiente utilizado na separação dos analitos em estudo.

Tabela 3. Gradiente de fase móvel usado na separação dos compostos fenólicos.

Tempo (min)	% A	% B
0	80	20
3	60	40
6	55	45
8	30	70
10	30	70
12	80	20
14	80	20

O fluxo durante as análises foi constante (250 $\mu\text{L}/\text{min}$) atingindo uma pressão máxima de 6000 psi. De salientar que todos os solventes do sistema de eluentes (fase móvel) foram previamente filtrados através de um sistema de filtração com filtro de membrana PTFE 0,22 μm .

3.7.4. Validação do método analítico

A validação de um método analítico é um estudo experimental que tem como objetivo demonstrar que o procedimento analítico avaliado é adequado ao fim a que se destina, de modo a assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos [165]. Neste sentido, o processo de validação deve incluir todos os parâmetros necessários para assegurar a fiabilidade do método, como a seletividade, a linearidade, a precisão, a exatidão, os limites de detenção e quantificação e a eficiência de extração. No presente trabalho a validação da metodologia QuEChERS/UHPLC-PDA foi efetuada através da avaliação destes parâmetros analíticos. Importa referir que a análise quantitativa dos compostos fenólicos foi realizada pelo método de padronização interna, que consiste na adição de uma substância conhecida (padrão interno) numa quantidade constante às amostras. Este método é, particularmente, útil quando o método analítico utilizado envolve diversas etapas de tratamento com significativa manipulação da amostra (por exemplo, extração, diluição, centrifugação, concentração, entre outros).

3.7.4.1. Seletividade

A seletividade de um método analítico corresponde à capacidade de detetar os analitos de interesse numa matriz, sem a interferência de outros elementos que possam estar presentes na amostra [166]. Para demonstrar a seletividade do método, as amostras de frutas e vegetais foram analisadas pelo método otimizado QuEChERS/UHPLC-PDA e comparadas com uma solução de padrões de concentração 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A ausência de sinais interferentes nos mesmos tempos de retenção e comprimentos de onda dos analitos provam que o método é seletivo.

3.7.4.2. Linearidade

A linearidade de um método analítico corresponde à capacidade deste produzir resultados diretamente proporcionais à concentração de analito, numa determinada gama de concentrações [167, 168]. Para a maioria das técnicas analíticas, a linearidade do método pode ser determinada a partir da relação matemática entre o sinal do equipamento (*e.g.* área ou altura do pico cromatográfico) e a concentração ou massa da espécie de interesse [169], geralmente obtida pela equação de regressão linear:

$$y = ax + b \quad (\text{Equação 8})$$

onde y corresponde à resposta do equipamento, a é o declive da reta, x é a concentração da espécie de interesse e b a ordenada da origem.

Além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, os coeficientes de correlação linear (r) e de determinação (r^2) que são parâmetros que permitem uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximos de 1,0, menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados [169]. No entanto, a magnitude de tais coeficientes indica apenas o grau de ajuste dos dados à reta de calibração, que só por si, não são suficientes para estabelecer a linearidade [170]. Frequentemente a verificação da linearidade é efetuada através da comparação das variâncias obtidas a partir dos desvios padrão residuais da função de calibração linear e de uma função de calibração não linear [171]. Este teste estatístico, designado de teste de Mandel ou teste de Fisher/Snedecor, permite avaliar qual dos modelos, linear ou não-linear (polinomial), proporciona um melhor ajustamento aos pontos da reta de calibração [113, 151]. A diferença das variâncias DS^2 é calculada através da equação 9:

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y/x}^2 - (N - 3) \times S_{y^2}^2 \quad (\text{Equação 9})$$

onde N representa o número de padrões de calibração, $S_{y/x}^2$ a variância da correlação linear e $S_{y^2}^2$ a variância da correlação não linear (polinomial).

O valor teste (VT) é determinado posteriormente pela equação 10 e o resultado comparado com o valor correspondente da distribuição F de Snedecor/Fisher para um grau de confiança de 95%.

$$VT = \frac{DS^2}{S_{y^2}^2} \quad (\text{Equação 10})$$

Se $VT \leq F_{(0,95; 1; N-3)}$ o ajuste linear é o mais adequado. No entanto, se $VT \geq F_{(0,95; 1; N-3)}$ então o ajuste não linear (polinomial) é o mais apropriado [168].

A avaliação da linearidade foi efetuada através da construção de uma curva de calibração, para cada analito, com cinco pontos de calibração ($N = 5$) numa gama de concentrações que variaram entre 5 e 25 $\mu\text{g/mL}$. Esta gama de trabalho foi selecionada tendo em conta a sensibilidade do detetor do UHPLC e a gama de concentrações de polifenóis habitualmente encontradas em frutos e vegetais. Para cada solução de calibração foi adicionado o padrão interno trolox (10 $\mu\text{g/mL}$).

3.7.4.3. Limites de Detecção e Quantificação

A estimativa dos limites analíticos é um parâmetro fundamental em qualquer validação, pois este critério irá demonstrar a capacidade do método detetar/quantificar baixas concentrações do analito. Enquanto que o limite de deteção (LOD) é definido como a menor concentração de analito que pode ser detetada, mas não necessariamente quantificada, o limite de quantificação (LOQ) corresponde à quantidade mais baixa de analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis [168]. Embora existam diversas formas de determinar os limites analíticos [172], quando o método analítico envolve a utilização da calibração linear o LOD e o LOQ podem ser determinados através do desvio padrão residual da reta de calibração, de acordo com as seguintes expressões:

$$LOD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{a} \quad (\text{Equação 11})$$

$$LOQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{a} \quad (\text{Equação 12})$$

onde $S_{y/x}$ corresponde ao desvio padrão residual e a o declive da reta de calibração. Ambos os limites são expressos em unidades de concentração.

3.7.4.4. Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão de um método analítico são considerados os parâmetros mais relevantes da validação, pois são estes os principais indicadores usados para determinar a confiabilidade dos resultados [173]. Enquanto que, a precisão exprime a

proximidade dos valores analíticos em torno da sua média, a exatidão descreve o grau de concordância desses valores em relação ao valor de referência estabelecido como verdadeiro [174]. Sob o ponto de vista prático, a precisão pode ser avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermédia, ao passo que a exatidão pode ser determinada pelo cálculo do erro médio relativo.

A repetibilidade ou precisão intra-dia avalia o grau de concordância entre os valores de uma série repetida de ensaios analíticos, efetuados num curto intervalo de tempo sob as mesmas condições, ou seja, pelo mesmo analista, mesmo equipamento, mesmas condições experimentais e no mesmo laboratório. Relativamente à precisão intermédia, também designada de precisão inter-dia, os resultados são avaliados em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes, sendo este parâmetro reconhecido como o mais representativo da variabilidade dos resultados num laboratório [167, 174]. Normalmente, a precisão é expressa em termos de desvio-padrão (s) ou desvio padrão relativo (RSD %), também conhecido como coeficiente de variação (CV %), de uma série de repetições da mesma amostra.

$$s = \frac{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}}{(n - 1)} \quad (\text{Equação 13})$$

$$CV \text{ ou } RSD (\%) = \left(\frac{s}{\bar{x}}\right) \times 100 \quad (\text{Equação 14})$$

Onde \bar{x} corresponde à média aritmética dos resultados obtidos, x_i valor individual de uma medição e n o número de medições.

Assim como a precisão, a exatidão também é um parâmetro que permite avaliar a fiabilidade do método analítico e deve ser investigada após a determinação da seletividade, linearidade e precisão do método analítico [175]. Em termos práticos a exatidão pode ser determinada de diversas formas, destacando-se o uso de materiais de referência certificados, a comparação dos resultados com métodos de referência ou através de ensaios inter-laboratoriais [174]. No entanto, face à indisponibilidade destes recursos, a exatidão pode ser determinada através do cálculo do erro médio relativo (EMR ou *Bias*) para expressar a variação do valor medido em relação a um valor de referência [168].

$$EMR \text{ ou Bias } (\%) = \left(\frac{C_{exp} - C_{teor}}{C_{teor}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 15})$$

C_{exp} corresponde à concentração experimental e C_{teor} a concentração teórica.

Neste trabalho, a precisão e a exatidão foram avaliadas conjuntamente através da análise de uma amostra (cenoura) fortificada a três níveis de concentração, incluindo um nível baixo (5 µg/mL), um nível médio (15 µg/mL) e um nível alto (25 µg/mL) da curva de calibração. Para cada uma destas concentrações, foram efetuadas 6 réplicas, para avaliar a repetibilidade, ao passo que para a precisão inter-dia e a exatidão foram analisadas três réplicas, de cada nível, durante três dias não consecutivos.

3.7.4.5. Eficiência de Extração

A eficiência de extração, frequentemente denominada de recuperação ou rendimento de extração, corresponde à capacidade do método analítico para recuperar o analito adicionado à amostra [113, 151]. Este parâmetro é determinado com base na resposta obtida para o analito adicionado na matriz e extraído em relação à resposta obtida para a quantidade de analito teoricamente presente (sem extração), sendo o processo tanto mais eficiente quanto mais próximo de 100 % [175, 176].

Experimentalmente a avaliação da recuperação, foi efetuada a três níveis de concentração, incluindo um nível baixo (5 µg/mL), um nível médio (15 µg/mL) e um nível alto (25 µg/mL) da curva de calibração. Os valores da recuperação de cada analito foram calculados utilizando a seguinte equação:

$$\text{Eficiência de Extração } (\%) = \frac{C_{exp}}{C_{teor}} \times 100 \quad (\text{Equação 16})$$

C_{exp} corresponde à concentração experimental e C_{teor} a concentração teórica.

3.8. Determinação da composição volátil das amostras em estudo

A caracterização qualitativa da composição volátil dos frutos e vegetais selecionados neste estudo foi efetuada com recurso à microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME) combinada com a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa com deteção por quadrupolo (GC-qMS).

3.8.1. Extração por HS-SPME

A aplicação de uma metodologia HS-SPME eficaz requer, geralmente, a otimização dos principais fatores experimentais que influenciam o processo de extração e a resposta experimental [177]. À HS-SPME foi efetuada com base nas metodologias descritas por Figueira [178] e Perestrelo [144], com algumas modificações. Numa primeira fase do processo foram pesados 4 g de polpa de fruta ou vegetal num frasco de vidro âmbar de 25 mL e adicionados 5 mL de água ultrapura e 0,5 g de cloreto de sódio (NaCl). O vial foi posteriormente selado com um septo de teflon e colocado num banho termostaticado a 40 ± 1 °C sob agitação (800 rpm). Uma vez atingido o equilíbrio térmico (5 minutos) a fibra de SPME cujo revestimento era composto por divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS, 50/30 μ m) foi exposta na fase de vapor da amostra durante 45 minutos. Após o término da extração, a fibra foi recolhida, a agulha retirada do septo e levada para o sistema cromatográfico.

De salientar que antes da primeira utilização a fibra de SPME foi condicionada segundo as instruções do fabricante, tendo sido colocada no injetor do cromatógrafo a uma temperatura de 270 °C durante 60 minutos. No início de cada dia, antes da primeira extração, a fibra foi condicionada durante 10 minutos a 250 °C, de modo a limpar a fibra de espécies contaminantes.

3.8.2. Condições do GC-qMS

A análise dos compostos orgânicos voláteis e semivoláteis dos frutos e vegetais foi realizada num cromatógrafo de fase gasosa 6890N Network GC System (Agilent Technologies), acoplado a um espectrómetro de massa do tipo quadrupolo 5973N da Agilent Technologies.

A desorção térmica dos analitos ocorreu no injetor do cromatógrafo (modo *splitless*) que se encontrava a 250 °C onde a fibra foi exposta durante 10 minutos. Os compostos desorvidos foram arrastados pelo gás de arraste hélio (ALPHAGAZ™ 2, Air Liquide, Portugal) a um fluxo constante de 1,0 mL/min e separados numa coluna capilar de sílica fundida BP20 (SGE, Dortmund, Alemanha) com 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura do filme. A temperatura da coluna foi mantida inicialmente a 40 °C durante 1 minuto, seguindo-se um aumento de 1,20 °C/min até os 80 °C permanecendo a esta temperatura durante 2 minutos. Após este período a temperatura aumentou 3 °C/min até os 150 °C e manteve-se por 2 minutos, seguindo-se

um novo aumento de 40 °C/min até atingir a temperatura final de 220 °C, a qual permaneceu durante 10 minutos. O tempo total de análise foi de 73,42 minutos. A Figura 20 ilustra o programa de temperatura utilizado no forno do GC.

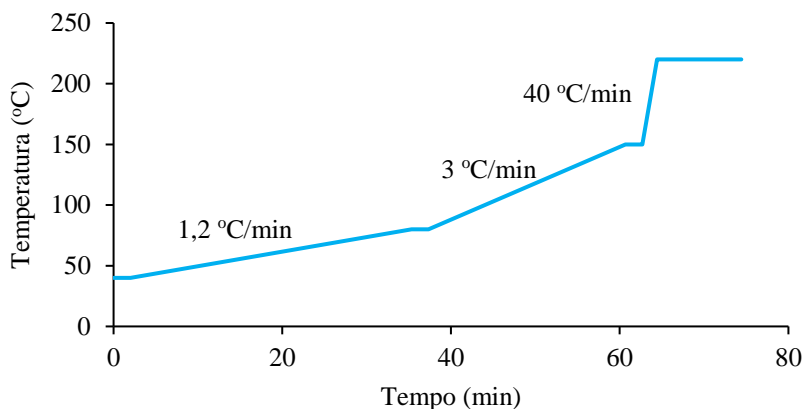


Figura 20. Gradiente de temperatura de coluna do GC utilizado para a separação dos analitos.

As temperaturas da linha de transferência, do quadrupolo e da fonte de ionização permaneceram a 250 °C, 150 °C e 230 °C, respectivamente. Os espectros de massa foram obtidos através de ionização por impacto eletrônico (EI) utilizando uma energia de ionização de 70 eV. As aquisições dos espectros de massa foram realizadas em modo *full scan* (30-300 m/z) e os dados obtidos foram analisados no software MSD ChemStation Enhanced Data Analysis (Agilent Technologies). A identificação dos compostos foi realizada por comparação do espectro de massa com a biblioteca NIST05 (NIST, 2005 software, Mass Spectral Search Program V.2.0d; NIST, Washington, DC), considerando unicamente aqueles compostos com $\geq 75\%$ de similaridade com os disponíveis na biblioteca.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação da Composição Fitoquímica

Entre a vasta gama de compostos fitoquímicos que constituem as frutas e os vegetais, os compostos fenólicos, os flavonoides, as antocianinas e os carotenoides assumem um papel de destaque, devido às suas propriedades antioxidantes e de sequestração de radicais livres, os quais são prejudiciais à saúde humana [179]. Neste trabalho, a composição fitoquímica de 9 tipos de vegetais e duas variedades de frutos produzidos na RAM, foi avaliada em termos de compostos fenólicos totais, de flavonoides, de antocianinas e de carotenoides.

4.1.1. Determinação do teor total de compostos fenólicos

Para a determinação quantitativa dos compostos fenólicos nos extratos vegetais foi utilizado o método do reagente de Folin-Ciocalteu, que consiste essencialmente na redução, em meio alcalino, dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico, existentes no reagente, pelos grupos hidroxilo dos compostos fenólicos, originando complexos molibdénio-tungsténio de cor azul, que podem ser facilmente monitorizados espectrofotometricamente a 750-765 nm [180, 181]. A curva de calibração usada para quantificar o teor de fenóis totais é, frequentemente, preparada com ácido gálico numa gama de concentrações adequada às quantidades habitualmente encontradas destes compostos nas matrizes a analisar. No presente trabalho, a gama de concentrações selecionada para a construção da curva de calibração variou entre 25 e 400 µg/mL e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de massa fresca (mg GAE/g vegetal). Na Figura 21 encontra-se representado a curva de calibração de ácido gálico utilizada para determinar o teor total de compostos fenólicos dos extratos vegetais.

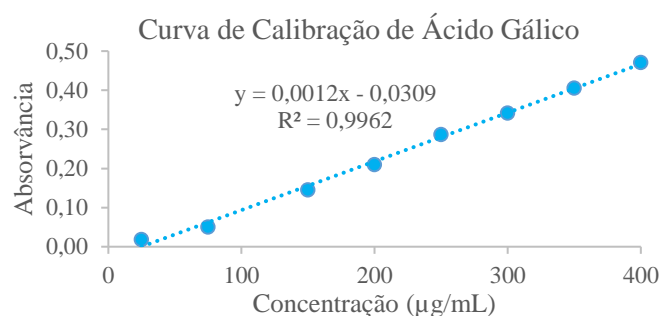


Figura 21. Curva de calibração de ácido gálico utilizada para determinar o teor total de compostos fenólicos nos extratos vegetais.

Na Tabela 4 encontram-se registados os valores do teor em compostos fenólicos totais nas amostras em estudo, calculados por interpolação da absorvância na equação da reta (Figura 21).

Tabela 4. Teor total dos compostos fenólicos nas amostras em estudo.

Amostras	Teor de Fenóis totais (mg GAE/g vegetal)
Beterraba	1,02 ± 0,01
Cebola roxa	1,33 ± 0,09
Cebola amarela	0,94 ± 0,02
Alho	0,96 ± 0,01
Cenoura laranja	0,39 ± 0,02
Cenoura branca	0,53 ± 0,01
Agrião	1,10 ± 0,03
Espinafre	1,00 ± 0,02
Brócolos	0,96 ± 0,02
Tomate inglês	1,10 ± 0,02
Tomate	0,52 ± 0,02

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que os extratos metanólicos da cebola roxa, agrião, tomate inglês e beterraba apresentaram os teores mais elevados de compostos fenólicos totais, enquanto que a cenoura laranja e o tomate foram as que apresentaram os menores teores em polifenóis totais.

Quando comparadas ambas as variedades de cebola, constatou-se que a variedade roxa apresenta um teor mais elevado de compostos fenólicos face à variedade amarela. Nile [182], obtiveram resultados semelhantes ao estudarem o teor de compostos fenólicos em diferentes variedades de cebola. Os resultados deste estudo mostraram, claramente, que o extrato metanólico da cebola roxa apresentou o maior teor de compostos fenólicos, seguindo-se o extrato da cebola amarela e por fim o da variedade branca. De acordo com Shahidi [183] esta diferença poderá estar associada com o elevado conteúdo de antocianinas presentes na cebola roxa, contribuindo desta forma para o teor mais elevado nesta variedade. Contrariamente aos estudos anteriores, Cheng. [184] verificaram que as cebolas amarelas continham um teor ligeiramente superior às cebolas roxas. Esta diferença no teor de compostos fenólicos poderá estar associada à variedade da cebola, assim como a fatores genéticos, as condições ambientais, grau de maturação, condições de cultivo, entre outros [183, 185].

Outro estudo curioso, foi o trabalho desenvolvido por Benkeblia [186], acerca da avaliação da capacidade antioxidante dos extratos de vegetais pertencentes à família *Allium*, como a cebola e o alho. Numa primeira fase deste estudo, o autor determinou o teor de compostos fenólicos totais de 4 variedades de cebola e comparou-os com o alho. Os resultados mostraram que a cebola roxa foi a variedade que apresentou o maior teor de compostos fenólicos, apesar deste valor ser ligeiramente inferior ao do alho. No presente trabalho os resultados foram um pouco diferentes. A cebola amarela apresentou o menor teor de fenóis totais (0,94 mg GAE/g vegetal), seguindo-se o alho (0,96 mg GAE/g vegetal) e por fim a cebola roxa (1,33 mg GAE/g vegetal).

Relativamente aos extratos do agrião e do tomate inglês, apesar destas duas espécies pertencerem a famílias distintas, o teor de compostos fenólicos totais encontrado foi semelhante (1,10 mg GAE/g vegetal). Quando comparados estes valores com os reportados na literatura, verificou-se que os resultados obtidos são ligeiramente inferiores ao esperado. Zeb [187], ao estudarem a composição fitoquímica dos extratos metanólicos das diferentes partes do agrião obtiveram teores na ordem dos 2,06 mg GAE/g para as raízes, 2,64 mg GAE/g nos caules e 3,21 mg GAE/g nas folhas.

Em relação ao tomate inglês, Mandal [188] ao avaliarem a composição fitoquímica das diferentes partes do fruto, verificaram que a concentração de fenóis totais era maior na placenta, seguindo-se o endocarpo, as sementes, o epicarpo e finalmente o mesocarpo, com valores que variaram entre 1,5 e 4,11 mg GAE/g fruto. Mais tarde, em 2014, Atiqah Noor [189] ao estudarem a composição bioativa de quatro espécies de tomate verificaram que o extrato etanólico do tomate inglês apresentava o teor de compostos fenólicos mais elevado (7,63 mg GAE/g fruto), seguindo-se o tomate cereja amarelo (5,07 mg GAE/g fruto), o tomate cereja vermelho (4,28 mg GAE/g fruto) e o tomate (4,25 mg GAE/g fruto).

No que diz respeito aos restantes vegetais analisadas, a beterraba foi o vegetal que mais se destacou com um teor de compostos fenólicos na ordem dos 1,02 mg GAE/g amostra, apesar de ser ligeiramente inferior aos valores reportados por Oksuz [190] (1,86 mg/g vegetal) e por Kamath [191] (2,21 mg GAE/g vegetal).

4.1.2. Determinação do teor total de flavonoides

A determinação do teor de flavonoides totais foi realizada através do ensaio colorimétrico do cloreto de alumínio (AlCl_3). Neste método, o catião alumínio (Al^{+3}) forma complexos estáveis com os flavonoides em metanol, ocorrendo na análise

espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção, [192, 193]. Assim, é possível determinar a quantidade de flavonoides, evitando-se as interferências de outras substâncias fenólicas, como os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonoides nos tecidos vegetais [194].

Em termos quantitativos, o teor de flavonoides totais foi determinado através da construção de uma curva de calibração com o padrão analítico de quercetina, numa gama de concentrações que variou entre 10 e 400 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 22).

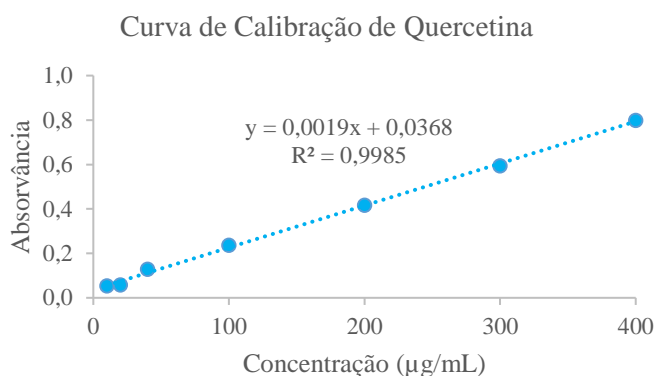


Figura 22. Curva de calibração de quercetina utilizada para determinar o teor total de flavonoides dos extratos vegetais.

Na Tabela 5 encontram-se registados os valores dos conteúdos de flavonoides totais dos extratos em estudo, calculados por interpolação da absorvância na equação da reta.

Tabela 5. Teor de flavonoides totais nas amostras analisadas.

Amostras	Teor de Flavonoides totais (mg QE/g vegetal)
Beterraba	$0,97 \pm 0,01$
Cebola roxa	$0,47 \pm 0,02$
Cebola amarela	$0,20 \pm 0,02$
Alho	$0,33 \pm 0,01$
Cenoura laranja	$0,26 \pm 0,05$
Cenoura branca	$0,76 \pm 0,17$
Agrião	$2,55 \pm 0,04$
Espinafre	$2,52 \pm 0,12$
Brócolos	$1,30 \pm 0,03$
Tomate inglês	$0,69 \pm 0,01$
Tomate	$0,24 \pm 0,02$

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que os extratos metanólicos do agrião, espinafres e brócolos apresentaram os teores mais elevados de flavonoides. Em geral, os vegetais folhosos de coloração verde-escuro, como os brócolos, o agrião e os espinafres, assim como as frutas e os vegetais de coloração amarela ou vermelha são ricas em flavonoides [195-198].

Quando comparados os valores obtidos com os reportados na literatura, observou-se que os vegetais do género brássica, como os brócolos e o agrião apresentaram valores muito inferiores aos obtidos por Agarwal [199] (brócolos: 13,98 mg QE/g vegetal) e Aires [200] (agrião: 5,6 mg CatE/g vegetal). Uma possível justificação para esta discrepância de valores, para além dos fatores ambientais, genéticos, entre outros, poderá residir na metodologia de extração utilizada pelos autores. Enquanto que, Aires [200] extraíram os flavonoides através de uma solução hidrometanólica a 70 °C durante 30 min., Agarwal [199] após secarem o vegetal a 50 °C durante 18 horas, os compostos bioativos foram extraídos por maceração à temperatura ambiente, utilizando a água como solvente extrator. Após 48 horas, o extrato foi filtrado e evaporado até à secura para posterior análise.

Relativamente aos espinafres, os resultados obtidos também foram inferiores aos valores reportados por Agarwal [199], onde o teor de flavonoides rondou os 20,4 mg QE/g vegetal. Maximas [201] obtiveram também um valor muito próximo ao estudo anterior (18,3 mg QE/g vegetal) quando avaliaram a composição fitoquímica do extrato metanólico dos espinafres.

Em relação aos vegetais de coloração púrpura, nomeadamente a cebola roxa e a beterraba, o teor de flavonoides encontrado está de acordo com os reportados por Lin [195] (cebola roxa: 0,56 mg QE/g vegetal; beterraba: 0,63 mg QE/g vegetal). No caso do tomate e da cenoura laranja os valores obtidos foram ligeiramente inferiores aos observados por Bahorun [202] (cenoura: 0,45 mg QE/g vegetal), (tomate: 0,79 mg QE/g vegetal).

Apesar dos resultados, em geral, serem satisfatórios, constatou-se que para algumas matrizes, nomeadamente o agrião, os espinafres, os brócolos e a cenoura branca, o conteúdo de flavonoides encontrado é superior ao teor de compostos fenólicos totais determinado pelo método de Folin-Ciocalteu. Uma breve revisão bibliográfica revela-nos que alguns estudos também encontraram um teor de flavonoides totais superiores ao teor de fenóis totais em diversas matrizes, como vegetais [203], plantas medicinais [204] e algas comestíveis [205], usando o ensaio colorimétrico do cloreto de alumínio.

Uma possível explicação para este facto poderá residir no método utilizado para a determinação destes compostos. A utilização do AlCl_3 na determinação do teor de flavonoides totais não é um procedimento isento de limitações. Apesar deste método ser preciso, ou seja, ser reprodutível entre ensaios, pode ser pouco exato, e neste sentido o valor medido e a quantidade de flavonoides totais realmente presentes na amostra analisada pode ser diferente [194]. De acordo com Luís [194], o valor medido e o valor real são tanto mais próximos entre si quanto maior for a proporção de flavonóis na amostra, e tanto mais distantes quanto maior a proporção de flavonas, isto porque o comprimento de onda selecionado (415-425nm) corresponde à banda de absorção do complexo quercetina-alumínio. Os complexos de outros flavonóis com alumínio absorvem bem próximo da banda 415-425 nm, mas os complexos derivados de flavonas absorvem em comprimentos de onda inferiores, afetando deste modo o resultado final [194, 206].

4.1.3. Determinação do teor de antocianinas totais

Para a determinação do teor de antocianinas totais dos frutos e dos vegetais foi utilizado o método do pH diferencial, que consiste na transformação estrutural reversível das antocianinas em função do pH, que leva à obtenção de diferentes espectros de absorção. Assim, a pH 1, a forma predominante é a de oxónio colorido ($\lambda_{\text{max-vis}}$ 520 nm), enquanto que a pH 4,5 a forma predominante é a de hemiacetal sem coloração (pouca ou nenhuma absorção a 520 nm) [207]. A diferença das absorvâncias, observadas espectrofotometricamente, possibilita estimar o teor real de antocianinas presentes na amostra [208]. A Tabela 6 mostra os resultados obtidos neste estudo.

Tabela 6. Teor de antocianinas totais presentes nos extratos dos frutos e vegetais produzidos na RAM.

Amostras	Teor de Antocianinas totais ($\mu\text{g Ant./g vegetal}$)
Beterraba	–
Cebola roxa	$5,13 \pm 0,36$
Cebola amarela	$0,67 \pm 0,24$
Alho	$0,75 \pm 0,12$
Cenoura laranja	$1,84 \pm 0,24$
Cenoura branca	$4,15 \pm 0,24$
Agrião	$13,2 \pm 3,65$

Espinafre	0,99 ± 0,23
Brócolos	4,10 ± 0,12
Tomate inglês	17,3 ± 0,23
Tomate	1,21 ± 0,34

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que os extratos metanólicos do tomate inglês, do agrião e da cebola roxa apresentaram os teores mais elevados de antocianinas. O tomate inglês é um fruto tropical caracterizado pela sua forma oval de coloração vermelha, por vezes amarelada. Este fruto é considerado uma fonte rica de pigmentos naturais, como as antocianinas e os carotenoides, os quais contribuem para o potencial antioxidante deste fruto [209-211]. Neste trabalho, o tomate inglês apresentou o teor de antocianinas mais elevado (17,3 µg ant./g vegetal) quando comparado com as restantes amostras. Através de uma breve revisão da literatura, constatou-se que este valor é inferior ao teor obtido por Vasco [212] (380 µg ant./g vegetal). Uma das possíveis causas para esta diferença de valores pode estar relacionada com a origem dos frutos. Enquanto que, no presente trabalho os frutos foram produzidos na RAM, no trabalho de Vasco [212] os frutos eram provenientes do Equador. Além disso, o procedimento de extração dos compostos bioativos utilizado por estes autores foi muito diferente do utilizado neste trabalho.

Em relação à cebola roxa, inúmeros estudos revelam que os flavonóis e as antocianinas são as principais subclasses de flavonoides neste vegetal [213]. Tendo em conta a quantidade encontrada de antocianinas (5,13 µg ant./g vegetal) e comparando-a com o valor obtido por Rodrigues [213], onde o teor destes compostos variou entre 5,6 e 5,9 µg/g vegetal, pode-se afirmar que os resultados são concordantes.

Para a beterraba, não foram encontradas antocianinas. Na verdade, a pigmentação vermelho-arroxeadada deste vegetal deve-se a uma família de compostos muito particular as betalaínas [214]. As betalaínas são compostos N-heterocíclicos solúveis em água, que se encontram localizados nos vacúolos das plantas [215]. Na natureza estes pigmentos são encontrados nas flores, nos frutos, mas sobretudo na beterraba, sendo esta a principal fonte destes compostos [215]. Existem duas classes de betalaínas, ambas biossintetizadas a partir do ácido betalâmico: as betacianinas de coloração vermelha ou vermelho-arroxeadado, e as betaxantinas de coloração amarela [216]. De acordo com alguns estudos, estas substâncias têm propriedades antimicrobianas e antivirais [217], assim como a capacidade de inibir a proliferação de células tumorais humanas [218].

Posto isto, o teor de ambas as classes de betalaínas foi determinado para o extrato metanólico da beterraba com base no procedimento descrito por Ravichandran [162]. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Teores de betacianinas e betaxantinas presentes no extrato da beterraba.

Betalaínas	Teor de betalaínas (μg Betal./g vegetal)
Betacianinas	$612,8 \pm 86,7$
Betaxantinas	$286,3 \pm 11,2$

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que as betacianinas encontradas na beterraba foram responsáveis por 68,2% do teor total de betalaínas, enquanto que as betaxantinas contribuíram apenas com 31,8%. Segundo Lim [219], a betanina e a vulgaxantina I são os compostos maioritários encontrados nos extratos da beterraba, e juntas compreendem mais de 90% do teor total de betalaínas. Segundo a mesma fonte o teor total de betalaínas encontradas nas amostras de beterraba analisadas variaram entre 650 e 800 μg betal./g vegetal. Neste sentido, pode-se afirmar que o teor total destes pigmentos encontrados no presente trabalho (899,1 μg betal./g vegetal) foi superior ao estudo anterior.

4.1.4. Determinação do teor de carotenoides

A determinação do teor de carotenoides dos extratos vegetais foi efetuada espectrofotometricamente com base no procedimento descrito por Lichtenthaler [163]. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 8.

Tabela 8. Teor de carotenoides presentes nos diferentes extratos vegetais.

Amostras	Teor de Carotenoides (μg Carot./g vegetal)
Beterraba	$30,1 \pm 0,28$
Cebola roxa	$2,41 \pm 0,03$
Cebola amarela	$0,18 \pm 0,03$
Alho	$0,34 \pm 0,15$
Cenoura laranja	$22,6 \pm 1,06$
Cenoura branca	$0,29 \pm 0,03$
Agrião	$5,38 \pm 0,06$
Espinafre	$14,5 \pm 1,96$

Brócolos	21,5 ± 1,84
Tomate inglês	19,7 ± 2,84
Tomate	8,27 ± 0,40

Os resultados indicam que, dentre as amostras analisadas a beterraba, a cenoura laranja e os brócolos são as que apresentam teores de carotenoides mais elevados.

A cenoura laranja, como era de esperar, apresentou uns dos maiores teores de carotenoides (22,6 µg cart./g vegetal). De acordo com Pinheiro-Santana [220], o α - e β -caroteno são os compostos maioritários encontrados nesta espécie e juntos totalizam 80 a 90% do teor total de carotenoides, sendo este vegetal uma das fontes mais abundantes destes compostos. Nicolle [221], ao estudarem a composição fitoquímica de cinco variedades de cenoura, verificaram que a variedade laranja-escura apresentou o teor mais elevado em carotenoides (26,5 µg cart./g vegetal), seguindo-se a variedade laranja (12,5 µg cart./g vegetal), roxa (6,05 µg cart./g vegetal) e amarela (5,63 µg cart./g vegetal). Na cenoura branca não foram detetados carotenóides.

No que diz respeito à beterraba, o teor de carotenóides encontrados no extrato deste vegetal foi superior aos restantes vegetais (30,1 µg cart./g vegetal). Em geral, o teor destes compostos é maior nas folhas do que na raiz, sendo a luteína e o β -caroteno os principais carotenoides encontrados [222]. Normalmente, o teor de luteína encontrado na beterraba ronda os 44 µg/g de vegetal, enquanto que o β -caroteno ronda os 25 µg/g de vegetal [223].

Relativamente aos vegetais verdes escuros, verificou-se que os brócolos apresentaram o teor de carotenóides mais elevado (21,5 µg cart./g vegetal), seguindo-se os espinafres (14,5 µg cart./g vegetal) e o agrião (5,38 µg cart./g vegetal). Vinha [224], obtiveram valores ligeiramente diferentes ao analisarem a composição fitoquímica destes vegetais. Neste estudo, os autores verificaram que os espinafres apresentaram o teor de carotenoides mais elevado (32,9 µg cart./g vegetal) quando comparados com o agrião (19,8 µg cart./g vegetal) e os brócolos (11,1 µg cart./g vegetal). Uma análise mais aprofundada da literatura revela-nos que a luteína e a zeaxantina são os principais carotenóides encontrados nestes vegetais [225, 226].

Em relação ao tomate, seria de esperar um teor de carotenóides superior ao encontrado, visto que a cor avermelhada deste fruto é característica do licopeno [227, 228]. Em geral, o teor desta substância no tomate varia entre 78 e 181 µg/g vegetal fresco, que corresponde a aproximadamente 80% do teor total de carotenoides neste fruto [228-230].

Uma possível explicação para os resultados obtidos, reside no estado de maturação do tomate, uma vez que a partir do momento em que o amadurecimento se inicia o teor de licopeno e β -caroteno aumenta, atingindo o seu máximo no estágio maduro [227]. Segundo Figueira [227], a variação do licopeno é mais pronunciada do que o β -caroteno, estando ausente no estágio imaturo (verde) e aumenta até aproximadamente 700 $\mu\text{g/g}$ vegetal no seu estado máximo de maturação.

4.2. Determinação da Capacidade Antioxidante *in vitro*

Dada a complexidade dos compostos bioativos nas matrizes vegetais, é sempre aconselhado utilizar mais de um método para avaliar a capacidade antioxidante destas matrizes [231]. Neste sentido, a capacidade antioxidante dos extratos metanólicos das frutas e dos vegetais foi avaliada através dos ensaios colorimétricos DPPH, ABTS e FRAP. A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos para estes ensaios. De salientar que todas as determinações foram efetuadas em triplicado e os resultados apresentados correspondem a valores médios.

Tabela 9. Capacidade antioxidante dos extratos vegetais através dos métodos DPPH, ABTS e FRAP.

Amostras	DPPH ($\mu\text{M TE/g vegetal}$)	ABTS ($\mu\text{M TE/g vegetal}$)	FRAP ($\mu\text{M TE/g vegetal}$)
Beterraba	3,05 \pm 0,12	6,34 \pm 0,63	7,87 \pm 0,32
Cebola roxa	1,98 \pm 0,09	3,71 \pm 0,03	5,48 \pm 0,42
Cebola amarela	0,41 \pm 0,04	2,54 \pm 0,29	1,57 \pm 0,02
Alho	0,45 \pm 0,04	2,63 \pm 0,12	0,85 \pm 0,01
Cenoura laranja	–	1,24 \pm 0,04	0,28 \pm 0,09
Cenoura branca	–	2,23 \pm 0,01	2,02 \pm 0,13
Agrião	1,52 \pm 0,05	3,86 \pm 0,03	3,62 \pm 0,08
Espinafre	1,67 \pm 0,11	3,83 \pm 0,03	4,27 \pm 0,07
Brócolos	0,13 \pm 0,05	2,61 \pm 0,01	3,06 \pm 0,23
Tomate inglês	3,54 \pm 0,01	6,56 \pm 0,36	7,76 \pm 0,45
Tomate	0,90 \pm 0,03	1,03 \pm 0,04	1,65 \pm 0,05

De acordo com os resultados, verificou-se que todos os extratos exibiram ação antioxidante, com destaque para os extratos do tomate inglês, da beterraba e da cebola

roxa, os quais se mostraram mais eficientes em neutralizar os radicais DPPH[•], ABTS^{•+} e em reduzir os íons férricos. Este resultado, na verdade, seria espetável devido às concentrações de compostos bioativos encontradas nestas matrizes.

O tomate inglês, tal como a cebola roxa, são espécies vegetais ricas em compostos fenólicos, entre os quais se destacam as antocianinas, que têm sido fortemente relacionadas com a atividade antioxidante destas espécies [232, 233]. A beterraba, por sua vez, é um vegetal caracterizado pela sua intensa coloração vermelha-arroxeadada, característica das betalainas. Segundo diversos estudos, estes pigmentos são os principais responsáveis pelas propriedades antioxidantes deste vegetal [234, 235].

Os carotenoides também são compostos que apresentam propriedades antioxidantes. Neste estudo, eles foram encontrados em concentrações relativamente elevadas no tomate inglês e na beterraba, e deste modo podem estar relacionados com os valores da capacidade antioxidante obtidos. Em geral, a eficácia dos carotenoides como antioxidantes depende do número de duplas ligações da sua estrutura [236]. Nesse sentido, o licopeno é tido como o carotenoide mais eficiente, em termos de capacidade antioxidante, devido à sua estrutura composta por onze ligações conjugadas e duas ligações duplas não conjugadas [237]. Alguns estudos afirmam que a capacidade anti-radicalar deste composto deve-se à presença das duas ligações duplas não conjugadas que lhe oferece maior reatividade [237, 238]. Outros carotenoides como os α - e β -carotenos, a luteína, a zeaxantina e a criptoxantina também apresentam pronunciada capacidade antioxidante [236].

Neste trabalho, seria de esperar uma maior capacidade antioxidante dos extratos do tomate e da cenoura laranja, visto que ambas as matrizes são constituídas maioritariamente por licopeno, no caso do tomate, e β -caroteno no caso da cenoura laranja. Embora os compostos bioativos, individualmente, possam proporcionar ação antioxidante, quando em conjunto, o efeito da interação entre compostos bioativos pode ser potenciado (efeito aditivo e/ou sinérgico) [239]. Neste sentido, as propriedades antioxidantes dos extratos vegetais derivam, essencialmente, da combinação dos compostos bioativos [239, 240].

4.2.1. Correlação das capacidades antioxidantes

Quando comparados os métodos de avaliação da capacidade antioxidante, verificou-se que existe uma elevada correlação linear entre estas metodologias ($r^2 > 0,8313$), o que permite concluir que existe proporcionalidade direta entre os métodos.

A Figura 23 apresenta a correlação entre a atividade das amostras nas diferentes metodologias utilizadas.

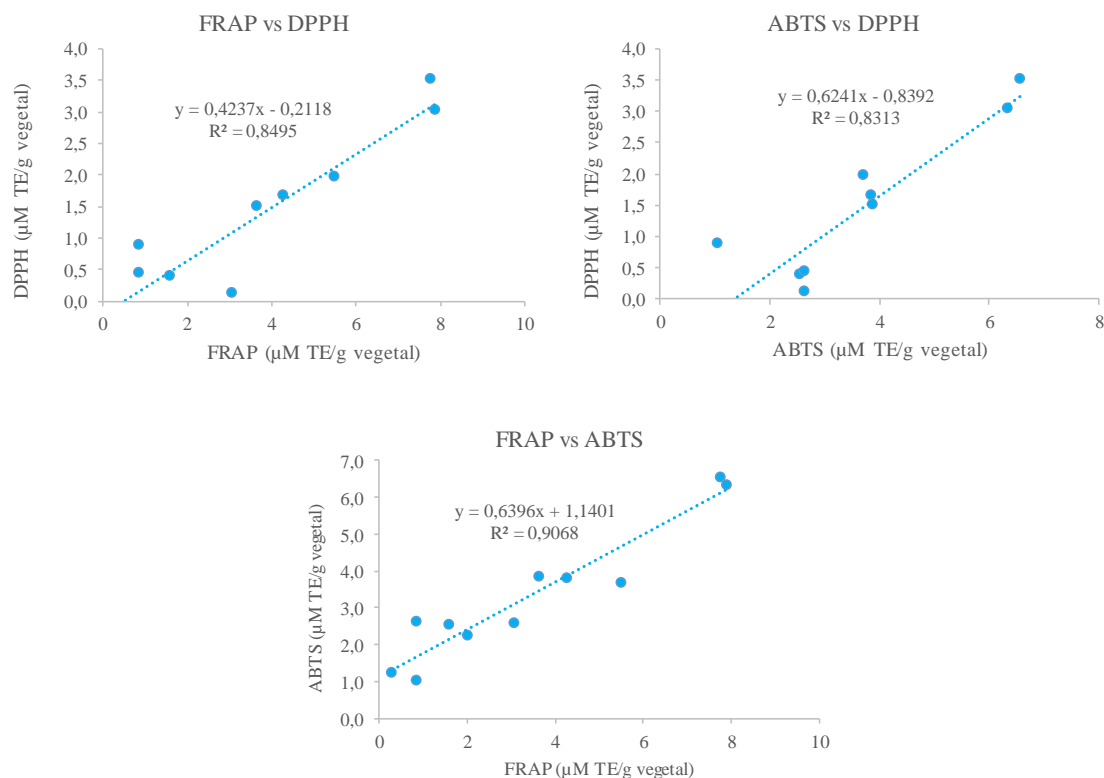


Figura 23. Correlação entre os métodos FRAP-DPPH, ABTS-DPPH e FRAP-ABTS.

No que diz respeito à correlação entre o teor de compostos bioativos e a capacidade antioxidante, a Tabela 10 mostra os coeficientes de determinação obtidos neste estudo.

Tabela 10. Coeficientes de determinação (r^2) entre os diferentes métodos estudados.

	DPPH	ABTS	FRAP
Fenólicos totais	0,3738	0,4576	0,4534
Flavonoides	0,0463	0,0916	0,0837
Antocianinas	0,0011	0,0274	0,0164
Carotenoides	0,1611	0,1831	0,2212

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que não há boa correlação linear entre o teor de compostos bioativos e a atividade antioxidante. Na verdade, a correlação entre o teor destes compostos e a atividade antioxidante ainda é bastante controversa [241]. Em várias frutas e vegetais é possível estabelecer boa correlação entre estas duas variáveis; no entanto, em alguns casos, essa correlação apresenta-se baixa.

Ismail [242], ao estudarem a atividade antioxidante de cinco espécies de vegetais, não obtiveram correlação linear com os compostos fenólicos totais. Seguindo o mesmo padrão, Hassimotto [243] também não observaram correlação linear entre o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante de frutas, vegetais e de polpas de frutas comerciais congeladas.

De acordo com Babbar [244], isto pode dever-se à presença de outros compostos fitoquímicos, como os ascorbátos, os tocoferóis, os terpenos, entre outros, que podem influenciar a atividade antioxidante. Além disso, a existência de efeitos sinérgicos ou antagônicos entre antioxidantes podem também, influenciar significativamente a atividade antioxidante [244].

Neste sentido são necessários mais estudos para avaliar quais os compostos bioativos que produzem maior atividade antioxidante e perceber que tipo de interações existe com os diversos constituintes fitoquímicos.

4.3. Análise Quantitativa de Compostos Fenólicos por QuEChERS/UHPLC-PDA

4.3.1. Otimização das condições de extração por QuEChERS

Apesar do QuEChERS ser uma metodologia relativamente recente, esta técnica tem tido um uso crescente nos últimos anos face às convencionais técnicas de extração, devido à sua versatilidade e simplicidade. Genericamente, o processo de extração é constituído por duas etapas: a extração líquido-líquido assistida por *salting out* e o *clean up* do extrato orgânico, utilizando a extração em fase sólida dispersiva [113, 151]. A combinação das ondas ultrassónicas de elevada intensidade com a extração líquido-líquido assistida por *salting out* (primeira etapa do QuEChERS) tem revelado boa eficiência na extração de compostos antioxidantes em frutos [227, 245], micotoxinas em cereais [246], pesticidas em alimentos [247], entre outros.

Tal como as demais técnicas de preparação de amostra, a eficiência do processo de extração é influenciada por diversos fatores entre os quais se destacam a quantidade de amostra, os sais utilizados na etapa de *salting out*, o uso de fase extratora tamponada, a natureza do solvente de extração e o adsorvente usado no *clean up* [124, 227].

No presente trabalho, a otimização da metodologia QuEChERS foi efetuada com base no procedimento previamente desenvolvido no laboratório [124] com algumas modificações. A inclusão de uma nova etapa, a extração assistida por ultrassons (USAE), foi a principal alteração no procedimento, onde foram avaliados diferentes tempos de

agitação por ultrassons (1 min, 5 min e 10 min) de forma a melhorar a eficácia da extração. Foram também avaliados diferentes solventes extrativos, nomeadamente MeOH, ACN, EtOAc e a combinação entre eles nas proporções 1:1 (v/v).

De salientar que a otimização foi efetuada numa amostra vegetal (cenoura) enriquecida com a solução padrão das substâncias em estudo (15 µg/mL) e todos os ensaios foram realizados em triplicado.

4.3.1.1. Otimização do tempo de extração assistida por ultrassons

O tempo de ultrassons, normalmente, é uma etapa relevante na extração dos analitos presentes na amostra e deve ser avaliado com o objetivo de obter uma maior eficiência de extração no mais curto período de tempo. Neste sentido, foram avaliados diferentes tempos de extração por ultrassons nomeadamente 1, 5 e 10 minutos e os resultados obtidos foram comparados com o procedimento original (extração efetuada com agitação manual e com o auxílio do vortéx durante aproximadamente 2 minutos). A Figura 24 mostra os resultados obtidos.

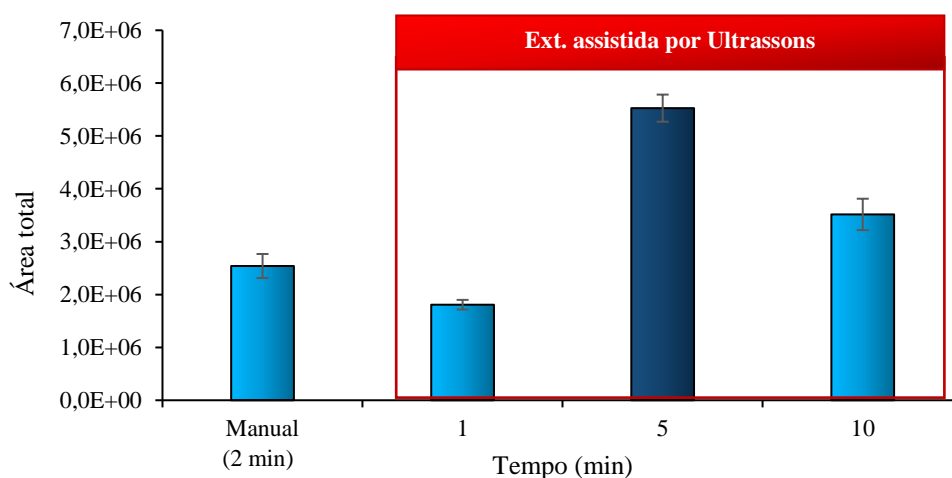


Figura 24. Estudo da influência do modo de agitação e otimização do tempo de ultrassons na eficiência de extração dos compostos fenólicos.

De acordo com os resultados obtidos, a USAE apresentou uma melhor eficiência extrativa quando comparada com a extração efetuada com agitação manual. Na verdade este resultado seria expectável uma vez que a aplicação das ondas ultrassónicas, produzidas durante o processo, gera cavitação e conseqüente rutura das paredes celulares, levando à extração dos compostos fenólicos da amostra para o meio solvente [157, 248].

Relativamente ao efeito dos diferentes tempos de ultrassonicação, os resultados revelaram que entre 1 e 5 minutos houve um aumento da área total em torno dos 67 %, enquanto que entre 5 e 10 minutos houve uma diminuição de aproximadamente 36 % da área total. Estes resultados indicam que a elevada frequência US facilita a difusão dos compostos fenólicos do material vegetal para o solvente aumenta num curto período de tempo (5 min). No entanto, se a exposição às ondas ultrassónicas for prolongada por um período de tempo pode ocorrer “desintegração” dos compostos antioxidantes [249, 250].

Assim, de acordo com os resultados obtidos, para a extração dos analitos de interesse será usado 5 minutos de extração por irradiação ultrassónica.

4.3.1.2. Seleção do solvente extrator

A escolha do solvente de extração é uma tarefa difícil, contudo imprescindível para um bom desempenho analítico. O solvente de extração ideal é aquele que apresenta uma grande afinidade para o soluto, sendo este o mais seletivo possível para os analitos de interesse. Frequentemente, solventes como o metanol, etanol, acetato de etilo e a acetona ou a combinação entre eles, têm vindo a ser utilizados na extração de polifenóis a partir de material vegetal, por vezes com diferentes proporções de água [251-253]. No presente trabalho, foram avaliados diferentes solventes de extração, nomeadamente o metanol (MeOH), acetonitrilo (ACN), acetato de etilo (EtOAc), MeOH:ACN (50:50, v/v), MeOH:EtOAc (50:50, v/v), ACN:EtOAc (50:50 v/v) e MeOH:H₂O (80:20, v/v). Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 25.

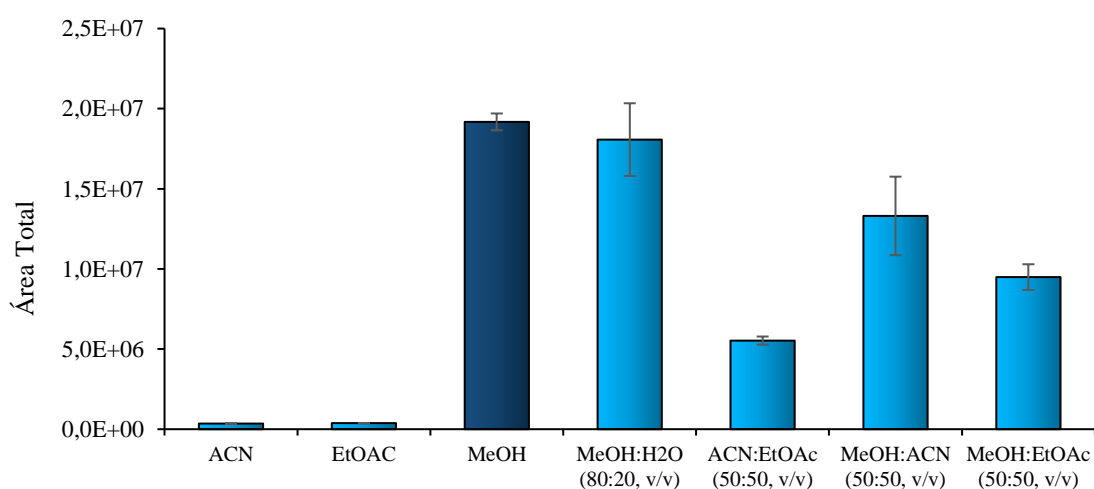


Figura 25. Estudo da influência do solvente extrator na eficiência de extração dos compostos fenólicos. Acrónimos: ACN - acetonitrilo; EtOAc - acetato de etilo e MeOH - metanol.

Entre os solventes analisados, verificou-se que o MeOH proporcionou os melhores resultados em termos de repetibilidade e de resposta cromatográfica (área total dos picos cromatográficos), ao passo que o ACN e o EtOAc apresentaram os menores valores. Como solvente polar, miscível com água, o MeOH é um solvente adequado para extrair uma vasta gama de compostos polares incluindo flavonoides, ácidos fenólicos, entre outros [254]. Uma breve revisão bibliográfica revela-nos que o MeOH é um dos solventes mais utilizado na extração de compostos fenólicos a partir de material vegetal, devido à sua elevada eficiência de extração [254-257]. As soluções metanólicas com percentagens de fase orgânica que variam entre 50% e 80% (v/v) são, muitas vezes, utilizadas para extrair flavonoides e derivados hidroxicinâmicos de frutos e vegetais [248, 254, 258]. De acordo com Tsao [254], a elevada percentagem de água no solvente pode facilitar a extração destes compostos a partir de amostras secas, enquanto que baixas percentagens de água são utilizadas em amostras frescas. No presente estudo, a solução hidrometanólica de 80 % (v/v) apresentou uma ligeira diferença das áreas totais em relação ao MeOH puro. Contudo, o desvio padrão da solução hidrometanólica é mais elevado o que indica uma menor reprodutibilidade entre as extrações. Neste sentido, o MeOH foi o solvente selecionado para extrair os polifenóis dos frutos e dos vegetais devido à sua eficácia de extração.

4.3.2. Validação do método

A validação do método analítico é um estudo essencial em qualquer laboratório analítico e tem como objetivo assegurar a qualidade e a confiabilidade dos resultados. No presente trabalho a validação da metodologia QuEChERS/UHPLC-PDA foi efetuada através da avaliação de diversos parâmetros analíticos, tais como a seletividade, a linearidade, a precisão, a exatidão, os limites de deteção e quantificação e a eficiência de extração. De salientar que a análise quantitativa dos compostos fenólicos foi realizada pelo método de padronização interna, usando o trolox como padrão interno. Idealmente o método de adição de padrão deveria ser utilizado neste trabalho, visto que não é possível obter uma matriz isenta dos analitos em estudo. No entanto, o método de adição de padrão requer maior quantidade de amostra e conseqüentemente de padrões analíticos, uma vez que a calibração deve ser efetuada para cada tipo de fruto ou vegetal analisado. Para contornar este problema foi selecionado o método de padronização interna, para efetuar

a validação, sendo este particularmente útil quando o procedimento utilizado envolve diversas etapas de tratamento com significativa manipulação da amostra.

4.3.2.1. Seletividade

A seletividade é um parâmetro relacionado com a capacidade de um método identificar e distinguir um analito em particular numa mistura complexa sem interferência de outros componentes [167, 174]. Neste trabalho a seletividade do método foi avaliada através da comparação dos cromatogramas obtidos para cada amostra vegetal, seguindo o procedimento QuEChERS otimizado, com uma solução dos padrões analíticos. A Figura 40A, no Anexo 3 ilustra os cromatogramas obtidos durante este estudo.

Foi possível identificar alguns analitos de interesse nas diversas matrizes vegetais. Além disso, verificou-se que não há interferências significativas de constituintes da matriz ao tempo de retenção e comprimentos de onda máximo de cada analito em estudo, evidenciando deste modo a seletividade do método.

4.3.2.2. Linearidade

A capacidade de um método analítico fornecer resultados instrumentais diretamente proporcionais à quantidade de analito, numa determinada gama de concentrações, corresponde à linearidade do método [167]. Para a determinação deste parâmetro de validação foram efetuadas curvas de calibração para os analitos em estudo, com 5 pontos de calibração. A gama de concentrações utilizada variou entre 5 e 25 µg/mL. Para cada uma das soluções de calibração foi adicionado a mesma quantidade de trolox (10 µg/mL; padrão interno) e os resultados foram expressos graficamente através da relação entre as áreas relativas (área analito/área do padrão interno) e a concentração de analito (Figura 42A- ver anexo 3). De salientar que, as quantidades de padrão adicionadas foram subtraídas às quantidades de analito já existente na amostra vegetal (cenoura) de modo a evitar que o sinal do analito proveniente da amostra fosse sobreposto ao sinal do padrão. Os resultados obtidos para os ensaios da linearidade encontram-se resumidos na Tabela 11.

Tabela 11. Resultados obtidos para o estudo da linearidade.

Analitos	Tr (min) ^a	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Intervalo de concentração (µg/mL)	Equação da reta	r	r ²	Teste de Mandel	
							VT ^b	F (0,95; 1; N-3) ^c
Ácido Protocatecuico	2,825	259	5 - 25	7,6389x - 29,253	0,9986	0,9972	1,98	18,5
Catequina	3,222	278	5 - 25	0,9936x - 5,1953	0,9946	0,9892	1,79	18,5
Ácido Gentísico	3,856	327	5 - 25	0,9141x + 0,2776	0,9998	0,9996	1,93	18,5
Ácido Vanílico	4,522	261	5 - 25	2,2658x - 1,562	0,9952	0,9904	1,75	18,5
Seringaldeído	5,322	308	5 - 25	2,2374x - 2,1762	0,9990	0,9981	1,94	18,5
Ácido <i>p</i> -cumárico	5,688	309	5 - 25	4,75x - 2,2961	0,9945	0,9891	1,23	18,5
Ácido Ferúlico	6,038	323	5 - 25	2,9341x - 0,991	0,9963	0,9925	0,91	18,5
Ácido <i>m</i> -cumárico	6,503	278	5 - 25	4,4605x + 5,4055	0,9965	0,9930	1,87	18,5
Ácido <i>o</i> -cumárico	7,473	276	5 - 25	4,0666x + 0,831	0,9981	0,9963	0,49	18,5
Ácido Cinâmico	9,529	277	5 - 25	4,4086 + 0,0199	0,9992	0,9984	1,71	18,5
Quercitina	9,729	372	5 - 25	1,75x + 0,6423	0,9991	0,9982	1,06	18,5
Kaempferol	10,484	366	5 - 25	2,1524x + 1,2044	0,9986	0,9972	0,99	18,5

^a Tr - tempo de retenção

^b VT - valor teste

^c F (0,95; 1; N-3) - valores tabelados da distribuição F de Fisher/Snedecor, para um grau de confiança de 95%.

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que o método é linear no intervalo de concentrações entre 5 e 25 µg/mL, para cada um dos compostos analisados. Os valores dos coeficientes de correlação linear e de determinação foram superiores a 0,9890, garantindo deste modo um ajuste adequado dos valores à reta de calibração. Além disso, foi possível demonstrar através do teste de Mandel que o modelo linear proporcionou o melhor ajustamento aos pontos da reta de calibração ($VT \leq F_{(0,95; 1; N-3)}$), comprovando deste modo a linearidade do método analítico.

Paralelamente ao estudo da linearidade, verificou-se de forma indireta que o método é mais sensível para a determinação do ácido protocatecuico, seguindo-se o ácido *p*-cumárico, ácido *m*-cumárico, ácido cinâmico e ácido *o*-cumárico. A sensibilidade do método traduz a capacidade deste distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas [259, 260]. Neste sentido, um método será tanto mais sensível se uma pequena diferença na concentração do analito causar uma grande variação no valor do sinal analítico medido [260]. Do ponto de vista prático, a sensibilidade do método é definida pelo declive da reta de calibração e depende basicamente, da natureza dos

analitos e da técnica de detecção utilizada [151]. Desta forma, quanto maior for o declive da reta maior será a sensibilidade do método analítico [151, 261].

4.3.2.3. Limites de Detecção e de Quantificação

Os limiares analíticos de um método de ensaio (LOD e LOQ) são parâmetros essenciais pois indicam a concentração a partir da qual é possível detetar ou quantificar os analitos de interesse [174]. Neste trabalho, o cálculo do LOD e do LOQ foi efetuado com base nos parâmetros da calibração linear. Ambos os limites são expressos em unidades de concentração e podem ser, facilmente, determinados de acordo com as equações 11 e 12. A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos para cada substância analisada.

Tabela 12. LOD e LOQ obtidos para os polifenóis em estudo por QuEChERS/UHPLC-PDA.

Analitos	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Ácido Protocatecuico	0,10	0,30
Catequina	0,20	0,60
Ácido Gentísico	0,04	0,12
Ácido Vanílico	0,19	0,57
Seringaldeído	0,08	0,25
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,20	0,61
Ácido Ferúlico	0,17	0,50
Ácido <i>m</i> -cumárico	0,16	0,48
Ácido <i>o</i> -cumárico	0,12	0,35
Ácido Cinâmico	0,08	0,23
Quercitina	0,08	0,25
Kaempferol	0,10	0,31

De acordo com os resultados obtidos, o método demonstrou uma boa capacidade para detetar e quantificar concentrações baixas dos analitos, sendo estes limites muito próximos dos reportados na literatura [124, 262-264].

4.3.2.4. Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão permitem estimar os erros e variações associados aos resultados analíticos [260]. Enquanto que a precisão pode ser estimada pelas medidas de

dispersão (desvio padrão, variância ou coeficiente de variação), a exatidão pode ser facilmente determinada pelo cálculo do erro médio relativo. Ambos os parâmetros devem ser avaliados em 3 níveis de concentração nível baixo, nível médio e nível alto, no intervalo linear da curva analítica. Para o estudo da precisão os coeficientes de variação são considerados adequados quando iguais ou inferiores a 20% [265], ao passo que na exatidão o desvio da média em relação ao valor aceite como referência (EMR) não deverá exceder os 15%, com exceção do limite inferior de quantificação (LLOQ) que não deverá ser superior a 20% [266]. Os resultados do estudo da precisão e exatidão encontram-se descritos na Tabela 13.

Tabela 13. Resultados obtidos do estudo da precisão e exatidão do método analítico QuEChERS/UHPLC-PDA.

Analitos	Nível de fortificação (µg/mL)	Precisão (CV %)		Exatidão (EMR %)
		Intra-dia (n=6)	Inter-dia (n=12)	
Ácido Protocatecuico	5	19	20	- 2
	15	2	14	- 19
	25	14	10	- 11
Catequina	5	20	20	20
	15	18	17	20
	25	16	15	2
Ácido Gentísico	5	20	18	7
	15	12	20	1
	25	11	6	7
Ácido Vanílico	5	7	8	- 14
	15	10	15	- 14
	25	13	7	- 11
Seringaldeído	5	16	14	- 10
	15	15	17	- 18
	25	14	8	10
Ácido <i>p</i> -cumárico	5	10	14	- 3
	15	9	17	- 20
	25	13	8	0,5
Ácido Ferúlico	5	4	8	2
	15	14	17	- 4
	25	9	9	- 6
Ácido <i>m</i> -cumárico	5	11	18	- 1
	15	11	16	- 2
	25	14	7	0,3
Ácido <i>o</i> -cumárico	5	18	20	- 9
	15	8	9	- 6
	25	13	11	- 4

Ácido Cinâmico	5	20	20	- 0,2
	15	11	16	- 20
	25	13	9	6
Quercitina	5	14	19	- 9
	15	13	16	- 4
	25	14	12	10
Kaempferol	5	19	20	- 5
	15	10	18	- 2
	25	14	13	- 8

Os coeficientes de variação determinados no estudo da precisão revelaram uma baixa dispersão dos dados ($CV \leq 20\%$) em torno do valor médio. Relativamente à exatidão, os resultados foram igualmente satisfatórios apesar de alguns valores excederem ligeiramente os $\pm 15\%$ do valor médio. De acordo com a Associação de Laboratório Acreditados de Portugal (RELACRE) [174], o erro médio relativo exprime a componente de erros sistemáticos, ou seja, os erros que se manifestam sempre da mesma forma (*e.g.* erros instrumentais, erros operativos, entre outros), e cabe ao Laboratório definir qual o seu grau de exigência em termos de exatidão do método em estudo. No presente trabalho definiu-se como critério de aceitação o valor de EMR ou Bias $\pm 20\%$ como máximo aceitável. Este valor é, na verdade, aceite pelo *Scientific Working Group for Forensic Toxicology* (SWGTOX) [267] como o valor máximo Bias aceitável para cada concentração.

4.3.2.5. Eficiência de Extração

A eficiência de extração ou recuperação do método analítico é uma etapa imprescindível durante a validação do método, uma vez que a maioria dos processos de extração levam à perda de analito [261]. Neste sentido, a eficiência de extração foi avaliada em termos de percentagem de recuperação, de acordo com o procedimento descrito na secção 3.7.4.5. Os resultados obtidos para a eficiência de extração dos polifenóis por QuEChERS/UHPLC-PDA encontram-se descritos na Tabela 14.

Tabela 14. Resultados obtidos para a eficiência de extração do método analítico.

Analitos	Nível de fortificação (µg/mL)	Eficiência de Extração (%) ± σ
Ácido Protocatecuico	5	65 ± 4
	15	77 ± 7
	25	86 ± 2
Catequina	5	77 ± 1
	15	68 ± 4
	25	97 ± 3
Ácido Gentísico	5	86 ± 11
	15	102 ± 7
	25	109 ± 2
Ácido Vanílico	5	78 ± 7
	15	79 ± 7
	25	106 ± 2
Seringaldeído	5	72 ± 13
	15	88 ± 4
	25	104 ± 5
Ácido <i>p</i> -cumárico	5	97 ± 4
	15	87 ± 2
	25	112 ± 4
Ácido Ferúlico	5	92 ± 9
	15	75 ± 21
	25	103 ± 7
Ácido <i>m</i> -cumárico	5	69 ± 8
	15	86 ± 11
	25	102 ± 5
Ácido <i>o</i> -cumárico	5	59 ± 1
	15	80 ± 10
	25	107 ± 4
Ácido Cinâmico	5	92 ± 8
	15	89 ± 5
	25	102 ± 8
Quercitina	5	78 ± 14
	15	79 ± 7
	25	106 ± 8
Kaempferol	5	80 ± 3
	15	80 ± 3
	25	105 ± 8

Os resultados revelaram que para o nível de concentração mais baixo as taxas de recuperação dos analitos variaram entre 59 e 97 %, enquanto que para as gamas de

concentração média e alta os valores variaram entre 68-102 % e 86-112 %, respetivamente.

Frequentemente, taxas de recuperação acima de 70 % são desejáveis. No entanto, segundo Kocourek [268], quando a taxa de recuperação é baixa mas o valor é consistente (demonstrando boa precisão), a média de recuperação abaixo dos 70 % pode ser aceitável. Dadgar [269] afirmam que, por vezes, é preferível sacrificar a taxa de recuperação do método em prol de uma maior seletividade, desde que o método demonstre ter sensibilidade, precisão e exatidão adequadas. Neste contexto, pode-se concluir que os resultados da recuperação são satisfatórios e que a técnica de extração QuEChERS é adequada para a extração de compostos fenólicos de matrizes vegetais.

4.3.3. Aplicação do Método a Amostras Vegetais

Após a validação analítica, o método otimizado foi aplicado a 11 amostras de vegetais e frutos que incluíram a beterraba, o agrião, os espinafres, os brócolos, o alho, o tomate, o tomate inglês, a cenoura branca e a cenoura laranja, e duas variedades de cebola (cebola amarela e a cebola roxa). A Figura 26 no Anexo 3 ilustra os cromatogramas obtidos para cada uma das amostras analisadas. As concentrações dos compostos fenólicos determinadas nas amostras em estudo por QuEChERS/UHPLC-PDA, encontram-se descritas na Tabela 15.

Em termos gerais, os resultados obtidos são satisfatórios para quase todos os vegetais analisados, com exceção da cenoura branca, uma vez que não se conseguiu detetar os polifenóis em estudo. A ausência destes compostos na matriz pode estar associada a diversos fatores, como por exemplo a variedade do vegetal não conter os polifenóis estudados ou o método não ser suficientemente sensível para detetar as quantidades diminutas destes compostos nesta matrix. Ao comparar estes resultados com outros trabalhos [270], verificou-se que nenhum dos polifenóis em estudo foi reportado na literatura para a cenoura branca.

A catequina foi o polifenol mais abundante determinado nas matrizes analisadas, seguindo-se os ácidos gentísico e ferúlico. A catequina, um flavan-3-ol pertencente ao grupo dos flavonoides, encontra-se amplamente distribuída numa grande variedade de alimentos que incluem as frutas e os vegetais [37, 271]. No presente trabalho este flavonoide foi identificado e quantificado nas amostras de alho, cenoura laranja, espinafres, brócolos e de forma mais expressiva nas amostras de tomate e de tomate

inglês. Uma breve revisão bibliográfica revela-nos que Silva [124] obtiveram resultados semelhantes na determinação da catequina em amostras de tomate, cenoura, alho e brócolos. Contrariamente aos resultados aqui apresentados, estes autores também detetaram a presença deste flavonoide em amostras de cebola, beterraba e em duas variedades de pimentão, o pimentão verde e o pimentão vermelho. Similarmente, Akomolafe [272] ao estudarem a composição fenólica do tomate e do pimentão vermelho também detetaram a presença de catequina em ambos os frutos.

Relativamente à composição de ácidos fenólicos presentes nas matrizes analisadas, o ácido gentísico, o ácido ferúlico e o ácido protocatecuico foram sem dúvida os que mais se destacaram. O ácido gentísico, tal como o ácido protocatecuico, são derivados dos ácidos hidroxibenzóicos que podem ser encontrados em certos tipos de alimentos [273]. Geralmente, o teor destes compostos em plantas comestíveis é muito baixo, com exceção de alguns tipos de frutos e nalgumas variedades de vegetais, que podem ter concentrações de várias dezenas de miligramas por quilograma de peso fresco [37, 273]. No que diz respeito aos ácidos hidroxicinâmicos, principalmente os ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico, são mais abundantes do que os ácidos hidroxibenzóicos. De acordo com Manach [37], estes ácidos raramente são encontrados na sua forma livre, exceto em alimentos processados que sofreram congelação, esterilização ou fermentação. No presente trabalho foram identificados ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos, em quase todas as amostras em estudo com exceção dos brócolos, da cenoura branca e de ambas as variedades de cebola. Relativamente à diversidade destes compostos nas matrizes analisadas, a cenoura laranja foi o vegetal que apresentou o maior número de ácidos fenólicos identificados, enquanto que, o agrião apresentou o maior teor total destes compostos, seguindo-se o tomate inglês.

Quanto ao grupo dos flavonóis estudados, a quercetina e o kaempferol foram encontrados principalmente nas amostras de cebola. Este resultado, na verdade, seria espectável, visto que ambos os flavonóis, assim como, os seus derivados glicosídicos são frequentemente encontrados nestes vegetais [274-276], sendo a quercetina, o flavonol predominante, representando mais 95% do teor de flavonoides totais [275]. Alguns estudos sugerem que a cor do bolbo pode estar diretamente associada à presença de quercetina [277-279]. Este facto foi constatado no estudo desenvolvido por Patil [280], acerca da variação do conteúdo de quercetina total em diferentes variedades de cebola. Os resultados deste estudo mostraram, claramente, que a variedade amarela apresenta teores de quercetina superiores aos determinados na variedade roxa. Já a variedade branca

continha apenas traços vestigiais deste flavonóide. Marotti e Piccaglia [281] constataram o elevado teor de quercetina nas variedades que apresentam cor contrariamente à variedade branca que apresentava quantidades diminutas deste flavonol.

Quando comparados os teores de quercetina e kaempferol em ambas as variedades de cebola, verificou-se que o teor na cebola roxa é aproximadamente três vezes superior ao da cebola amarela. Inicialmente, este facto surpreendeu-nos, uma vez que, esperávamos que o teor de flavonóis fosse superior na cebola amarela, visto que estes compostos são característicos da coloração amarela/acastanhada de muitas variedades, ao passo que as antocianinas, como a cianidina e peonidina glucosídeos, são as principais responsáveis pela coloração vermelha/arroxeadada de algumas variedades [276, 282]. No entanto, uma revisão mais abrangente da literatura revela-nos a existência de diversos estudos que reportam um elevado conteúdo de flavonóis na cebola roxa quando comparados com as variedades amarela e branca [274, 283-285], o que nos permitiu concluir, da mesma forma que Marotti [281] que não existe uma relação direta entre a tonalidade do vegetal e o teor total de flavonóis. De acordo com alguns estudos [275, 281, 284, 286, 287], estas variações no teor de flavonóis pode dever-se a fatores genéticos, às condições ambientais e agronómicas, ao estado de maturação, as condições de armazenamento, o tempo de exposição à radiação UV, entre outros.

Tabela 15. Concentrações dos compostos fenólicos encontradas nas amostras vegetais em estudo.

Polifenóis	Concentração $\pm \sigma$ ($\mu\text{g/g}$ de vegetal fresco)										
	Beterraba	Cebola roxa	Cebola amarela	Alho	Cenoura laranja	Cenoura branca	Agrião	Espinafre	Brócolos	Tomate inglês	Tomate
Ácido Protocatecuico					4,6 \pm 0,2		7,8 \pm 0,2				
(+)-Catequina				5,3 \pm 0,01	5,3 \pm 0,01			5,8 \pm 0,03	5,6 \pm 0,03	14,8 \pm 0,3	7,1 \pm 0,02
Ácido Gentísico	2,5 \pm 0,2						6,9 \pm 0,2	2,7 \pm 0,3		14,8 \pm 0,5	3,0 \pm 0,1
Ácido Vanílico					1,1 \pm 0,04					5,8 \pm 0,1	
Seringaldeído	1,1 \pm 0,01			1,0 \pm 0,03	1,0 \pm 0,03						
Ácido <i>p</i> -cumárico					0,7 \pm 0,01		0,7 \pm 0,02				0,7 \pm 0,01
Ácido Ferúlico	0,5 \pm 0,01			0,5 \pm 0,04	0,6 \pm 0,1		18,0 \pm 0,5	< LOQ			
Ácido <i>m</i> -cumárico					< LOD						< LOD
Ácido <i>o</i> -cumárico					< LOD			< LOQ			
Ácido Cinâmico					0,4 \pm 0,2						
Quercitina		17,1 \pm 0,5	5,3 \pm 0,4				0,4 \pm 0,03				
Kaempferol		9,2 \pm 0,4	2,4 \pm 0,4								1,1 \pm 0,03

4. 4. Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa (GC-MS)

Os alimentos de origem vegetal possuem na sua composição química compostos orgânicos voláteis, que permitem dar inúmeras informações para além do aroma. Normalmente, estes compostos são encontrados nas frutas e nos vegetais em pequenas quantidades (de ng a mg/kg), cuja natureza varia de espécie para espécie, e algumas vezes entre variedades [288].

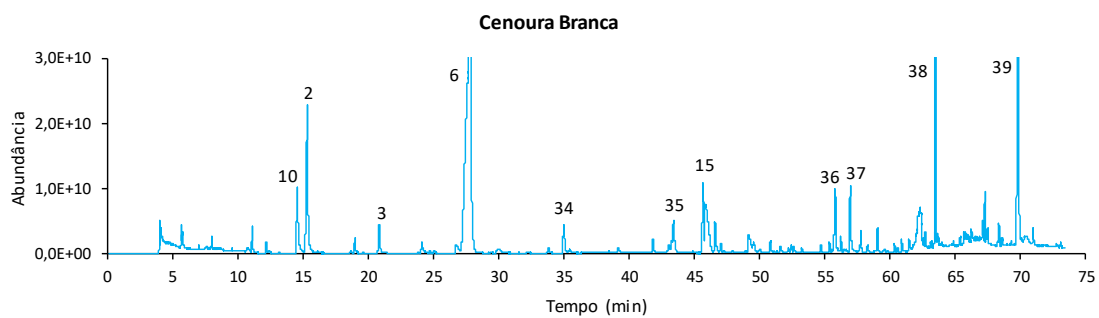
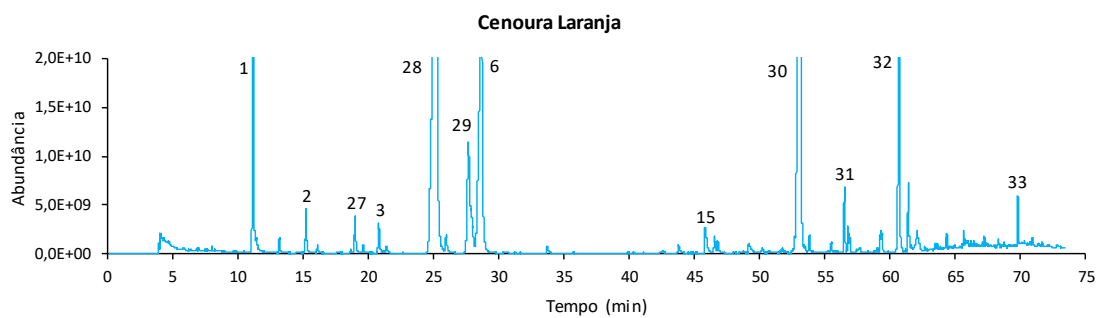
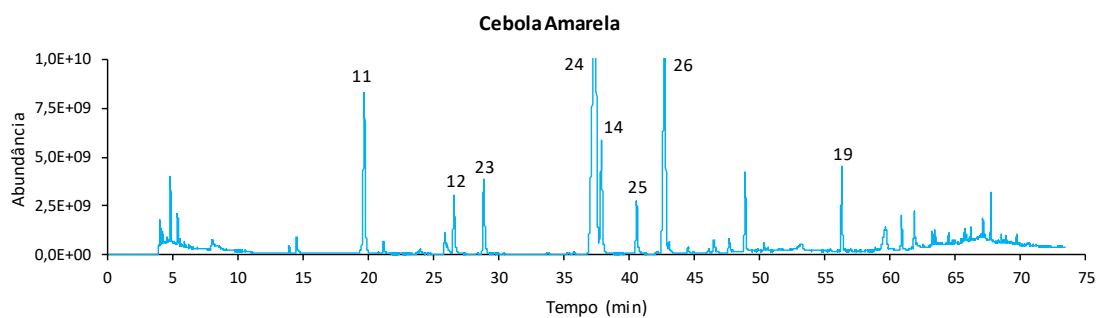
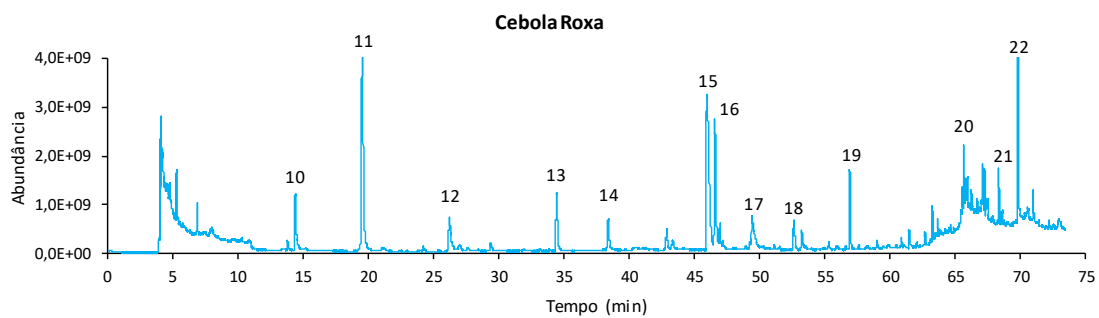
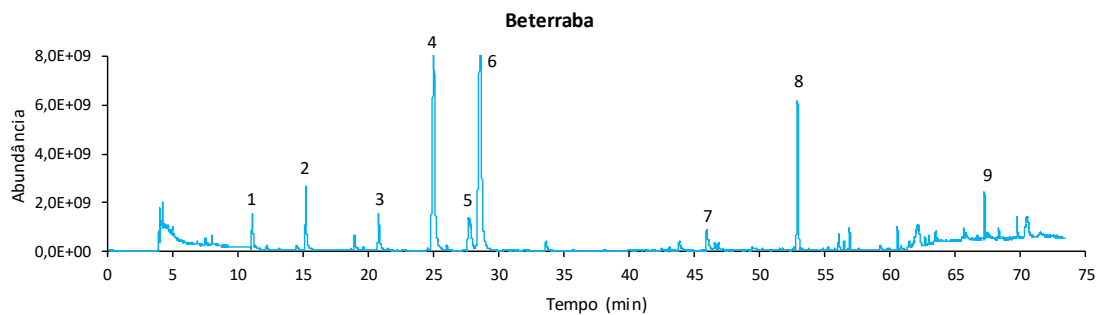
Em geral, estes compostos pertencem a diversas famílias químicas, como os aldeídos, ésteres, cetonas, álcoois, éteres de cadeia alquílica curta, ácidos carboxílicos, terpenos (principalmente mono e sesquiterpenos), além de compostos azotados e sulfurados [288, 289]. Recentemente, muitos destes compostos tornaram-se altamente reconhecidos devido às suas propriedades biológicas. Entre eles destacam-se os compostos terpénicos e os compostos organossulfurados que são responsáveis pelas propriedades medicinais de inúmeras plantas, tais como a sua ação, anti-hipertensiva [290], anti-inflamatória [291, 292], anti-HIV [293], antibacteriana [294], atividade anticancerígena [295-297], entre outros. A Tabela 16 apresenta de forma sucinta as propriedades de alguns destes compostos.

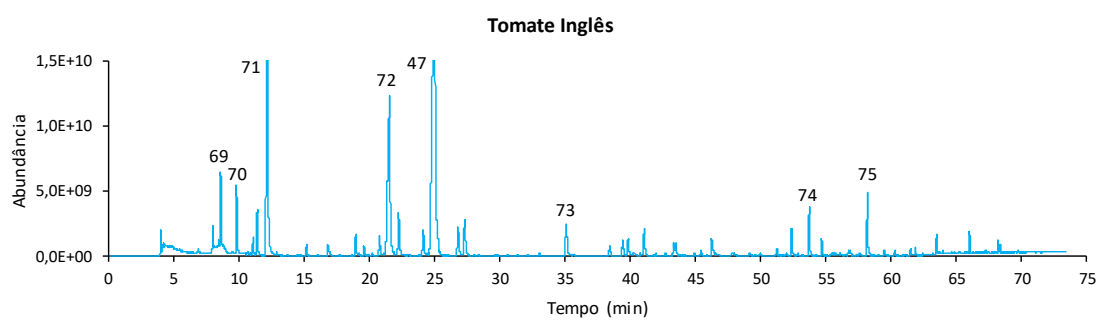
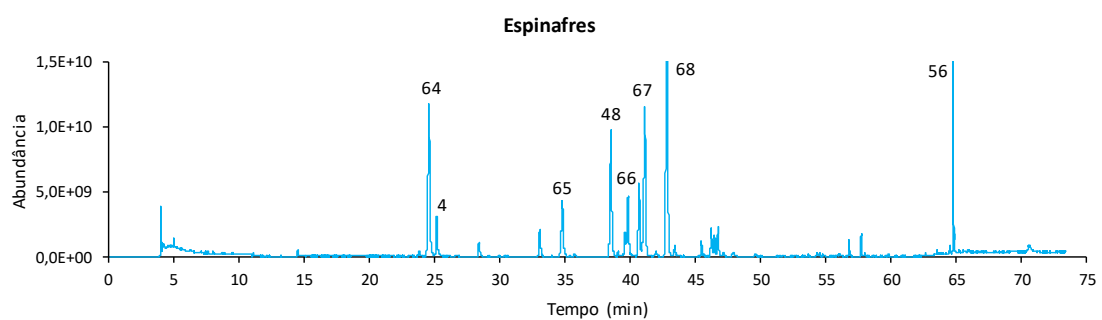
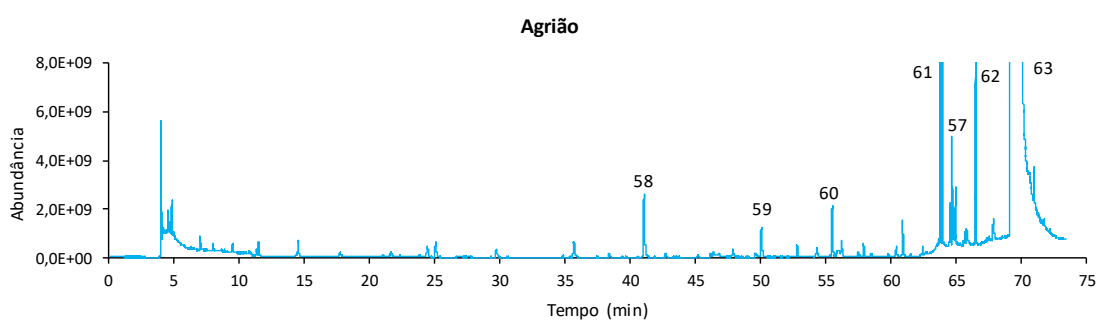
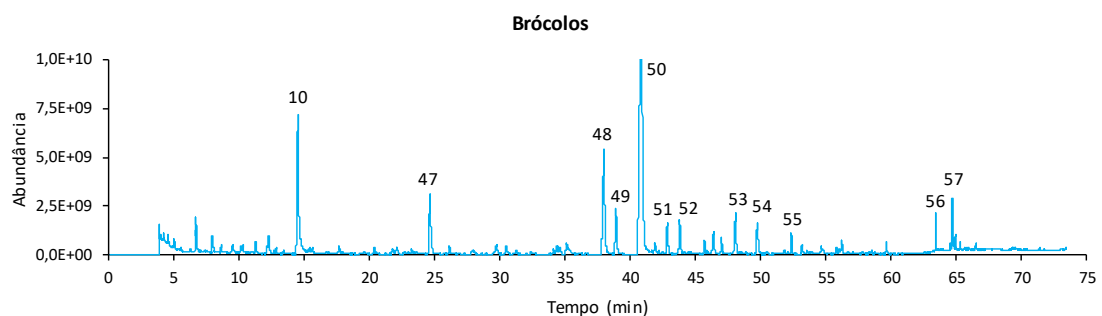
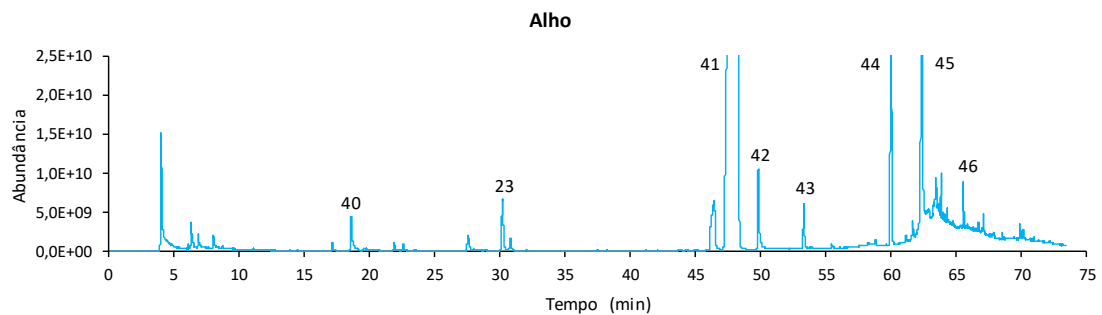
Tabela 16. Efeitos biológicos de alguns compostos terpénicos e organossulfurados encontrados nas frutas e nos vegetais (adaptado de Perestrelo [298]).

Compostos Voláteis	Efeitos biológicos	Referências
Compostos terpénicos		
β -Mirceno	Analgésico, anti-inflamatório, antibiótico, antitumoral	[299]
ρ -Cimeno	Antibiótico, inibidor da AChE, antiproliferativo	[300, 301]
Camfeno	Antimicrobiano, antioxidante	[302]
Terpineno	Anti-inflamatório, antioxidante, atividade quimiopreventiva	[303-305]
Terpinoleno	Antioxidante	[304]
β -Felandreno	Antibacteriano, antitumoral, apoptótico, citotóxico	[306]
β -Pineno	Anti-inflamatório, antimicrobiano, antioxidante, antineoplásico, quimioprotetor	[300, 303]
Acetato de terpenilo	Antiprolifetrativo	[307]
D-Limoneno	Antimutagénico, antitumoral, antioxidante, antimicrobiano, antiproliferativo, quimioprotetor	[303, 308]

Eucaliptol	Antioxidante, antibacteriano, antibiótico, antiviral, anti-inflamatório, citotóxico, antineoplásico	[300, 309]
Canfora	Antibacteriano, larvicida, antioxidante	[310]
Linalool	Citotóxico, antiproliferativo, antioxidante, antimicrobiano, analgésico, anti-inflamatório, antidepressivo, ansiolítico	[300, 303]
Geraniol	Atividade quimiopreventiva, antimutagénico	[311]
Eugenol	Anticancerígeno, antidepressivo, antimicrobiano, antioxidante, larvicida	[300]
Terpineol	Antimicrobiano, antioxidante, antibiótico, inibidor da AChE, citotóxico, antimalárico	[300]
β -Ionenol	Atividade quimiopreventiva, antiproliferativo, citotóxico	[311, 312]
Compostos organossulfurados		
Alicina	Anti-aterosclerótico, antimicrobiano, antifúngica, antivirais, anti-inflamatório	[290, 297]
S-alilcisteína	Anti-hipertensivo	[290]
Dialil difulfeto	Anti-aterosclerótico, anticancerígeno	[290, 313]
Dimetil trisulfeto	Anticancerígeno	[297]
Alil sulfeto	Anticancerígeno	[314]
Dialil trissulfeto	Anticancerígena, antifúngico, antivirais	[315]
Dialil sulfeto	Anticancerígeno, anti-inflamatório	[316, 317]

Em virtude dessa diversidade de funções biológicas e ao potencial destes compostos como agentes terapêuticos, pretendeu-se analisar a fração volátil das frutas e dos vegetais consumidos na RAM. Neste sentido, a caracterização qualitativa da composição volátil foi efetuada com recurso à metodologia HS-SPME_{DVB/CAR/PDMS}/GC-qMS. Os perfis cromatográficos dos metabolitos voláteis dos diversos frutos e vegetais analisados encontram-se apresentados na Figura 26.





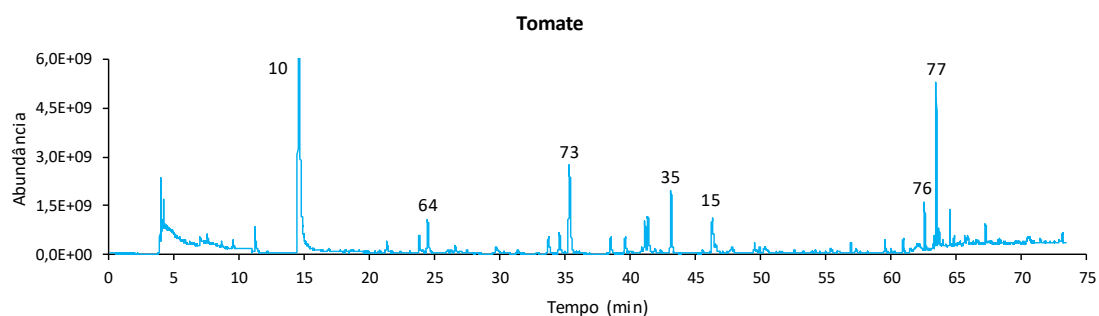


Figura 26. Cromatogramas típicos da fração volátil das 11 amostras de frutas e vegetais obtidos por HS-SPME-GC/qMS. **1** - α -Pineno; **2** - β -Pineno; **3** - D-Limoneno; **4** - (Z)-Ocimeno; **5** - 1-Metil-2-(1-metiletil)-benzeno; **6** - Terpinoleno; **7** - Ácido acético; **8** - 5-Metilfurfural; **9** - N-metil-1,3-propanodiamina; **10** - Hexanal; **11** - 2-Metil-2-pentenal; **12** - 2,5-Dimetil tiofeno; **13** - 1-Hidroxi-2-propanona; **14** - Dimetil-trissulfeto; **15** - Ácido acético; **16** - Furfural; **17** - Ácido Fórmico; **18** - 5-Metilfurfural; **19** - 2-Furanmetanol; **20** - 2,5-Furanodicarboxaldeído; **21** - 5-Acetoximetil-2-furaldeído; **22** - 2,3-Dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona; **23** - 1,3-Ditiano; **24** - Dipropil-dissulfeto; **25** - Nonanal; **26** - (E)-2-Octanal; **27** - β -Mirceno; **28** - γ -Terpineno; **29** - 1-Metil-2-(1-metiletil)-benzeno; **30** - 1,5-Dietenil-3-metil-2-metilen- (1 α , 3 α , 5 α) ciclohexano; **31** - α -Ocimene; **32** - Santolina Trieno; **33** - 10,10-Dimetil-2,6-dimetileno-biciclo[7.2.0]undecano-5- β -ol; **34** - 6-Metil-5-hepteno-2-ona; **35** - (E)-2-Octanal; **36** - (E)-2-Decenal; **37** - (E)-Pinocarveol; **38** - 1-Etil-2,4-dimetil-benzeno; **39** - Ácido undecanóico; **40** - Dialil sulfeto; **41** - Dialil disulfeto; **42** - Metil aliltioacetato; **43** - 2-(2-Etoxietoxi)-etanol; **44** - 3-Vinil-1,2-ditiociclohex-4-eno; **45** - Dialil trissulfeto; **46** - Metil éster do ácido ciclopropano-carboxílico; **47** - Etil éster do ácido hexanóico; **48** - 1-Hexanol; **49** - (E)-3-Hexen-1-ol; **50** - (Z)-3-Hexen-1-ol; **51** - Etil éster do ácido octanóico; **52** - 1,3-bis(1,1-Dimetiletil)-benzeno; **53** - cis-3-Hexenil valerato; **54** - Benzaldeído; **55** - 3,5-Octadieno-2-ona; **56** - Feniletil álcool; **57** - β -Ionona; **58** - 3-Metil-1-isotiocianato-butano; **59** - 4-Metilpentil Isotiocianato; **60** - Benzenoacetaldeído; **61** - 2-Feniletil cianido; **62** - 1-Isotiocianato-3-(metiltio)-propano; **63** - 2-Feniletil isotiocianato; **64** - 2-Hexanal; **65** - Acetato de (E)-2-hexen-1-ol; **66** - (Z)-3-Hexenil éster do ácido butanoico; **67** - Protanoato de (E)-2-hexen-1-ol; **68** - (E)-2-Hexen-1-ol; **69** - (Z)-3-Metil-1,3,5-hexatrieno; **70** - Metil éster do ácido butanoico; **71** - Etil éster do ácido butanoico; **72** - Metil éster do ácido hexanóico; **73** - Acetato de (Z)-3-hexen-1-ol; **74** - β -ciclocitral; **75** - α -Terpineol; **76** - 5-(Hidroximetil)furfural; **77** - Geranil acetona.

Foram identificados um total de 320 compostos voláteis nas diferentes amostras analisadas, dos quais 51 compostos terpênicos, 45 compostos organossulfurados, 31 aldeídos, 37 ésteres, 29 cetonas, 28 álcoois, 23 compostos furânicos, 22 hidrocarbonetos, 19 compostos benzênicos, 13 compostos azotados, 9 ácidos carboxílicos, 7 éteres, 4 compostos halogenados e 3 derivados do naftaleno. A Tabela 21A (Anexo 4) apresenta detalhadamente a composição volátil de cada uma das amostras analisadas, incluindo os tempos de retenção, os índices de Kovats, as famílias químicas, as fórmulas moleculares e as áreas médias obtidas para cada composto.

4.4.1. Beterraba

Para a amostra de beterraba foram identificados 61 compostos voláteis, sendo o perfil caracterizado maioritariamente por compostos terpênicos (61,0 %), seguindo-se os

compostos furânicos (20,6 %), os ácidos carboxílicos (5,6 %) e os compostos benzénicos (5,2%) (Figura 27).

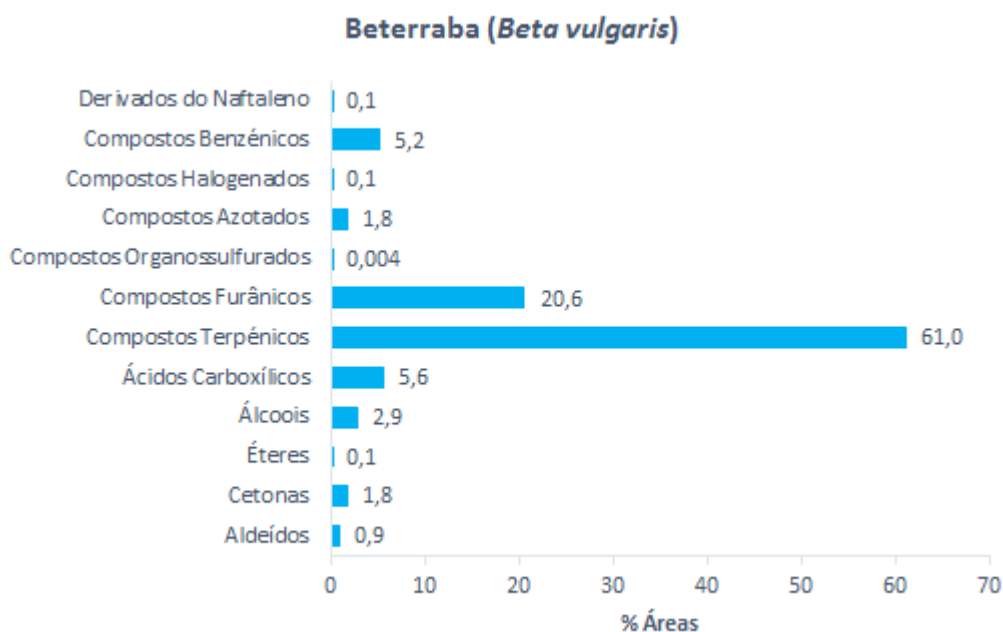


Figura 27. Distribuição das famílias de compostos químicos identificados na beterraba.

Relativamente, aos metabolitos individuais, o terpinoleno, o γ -terpineno e o 5-(hidroximetil)furfural foram os compostos maioritários na beterraba perfazendo 65,6% do perfil volátil total. De forma menos expressiva, foram encontrados o 1-metil-2-(1-metiletil)-benzeno (3,9%), o 5-metilfurfural (3,4%), o β -pineno (2,9%) e o α -pineno (1,7%). É de salientar que de entre os compostos voláteis encontrados, foi possível identificar a geosmina um dos principais compostos característicos do aroma da beterraba. Este *cis*-terpeno é muitas vezes considerado como um *off flavor* deste alimento por introduzir um odor e sabor a terra [318].

4.4.2. Cenoura

Da mesma forma que a beterraba, verificou-se que o perfil volátil de ambas as variedades de cenoura é constituído maioritariamente por compostos terpénicos. Do total dos 71 compostos voláteis identificados na cenoura branca, 22 são compostos terpénicos que contribuem com 61,3% da fração volátil total. Para a cenoura laranja foi possível identificar 31 compostos terpénicos de um total de 59 compostos voláteis, o qual representam 58,1% da fração volátil total (Figura 28).

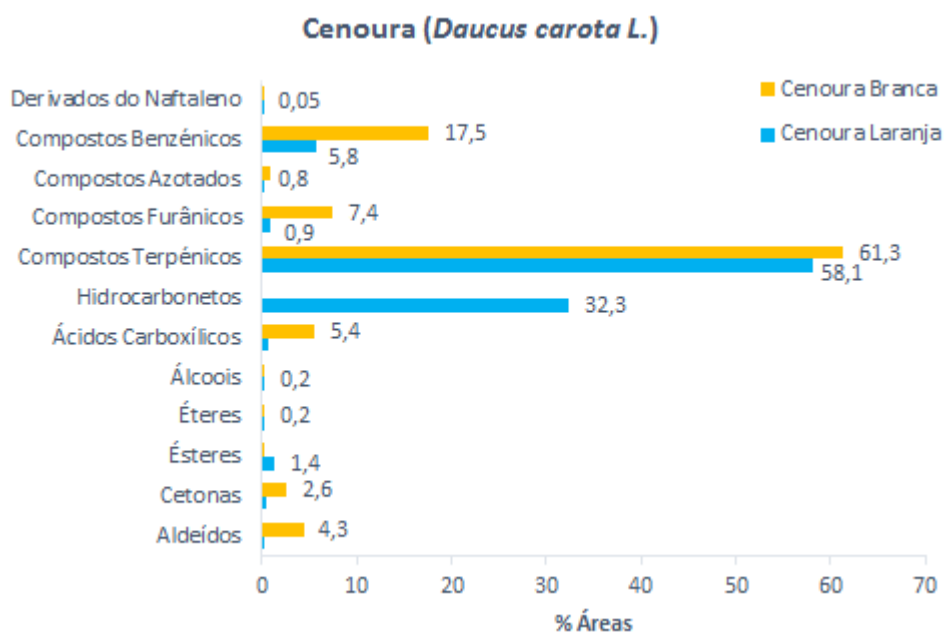


Figura 28. Famílias de compostos químicos identificados na cenoura laranja e na cenoura branca.

Em geral, o sabor característico da cenoura fresca tem sido atribuído essencialmente, aos compostos voláteis mono- e sesquiterpenos [319]. Dentre estes compostos, os monoterpenos foram sem dúvida os mais abundantes em ambas as variedades, sendo o terpinoleno o composto maioritário da cenoura branca (32,0%) e o γ -terpineno da cenoura laranja (27,2%). O α -pineno também foi identificado em ambas as variedades com percentagens que rondaram os 4,3% na variedade laranja e 1,6% na variedade branca. De acordo com Güller [320], estes compostos são os principais responsáveis pelas propriedades antimicrobianas e antifúngicas das cenouras. Além destes compostos bioativos, também foram identificados em menor quantidade o D-limoneno, o β -mirceno, o β -pineno e o α -felandreno, que também apresentam bioatividade.

4.4.3. Cebola

No que diz respeito às amostras de cebola, foram identificados 49 compostos voláteis para a variedade de cebola roxa e 29 compostos para a variedade da cebola amarela. Em termos de famílias químicas identificadas, verificou-se que o perfil de ambas as variedades é muito distinto, sendo que a cebola roxa é caracterizada maioritariamente por aldeídos (26,7%), ao passo que a cebola amarela é caracterizada essencialmente por compostos organossulfurados (73,8%) (Figura 29).

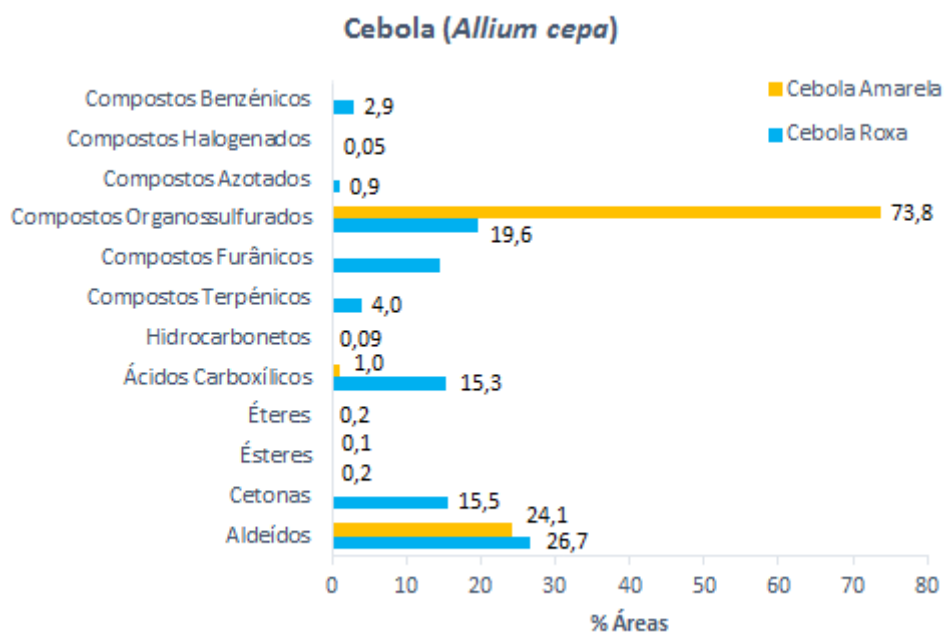


Figura 29. Famílias de compostos químicos identificados nas cebola roxa e cebola amarela.

Juntamente com os flavanóis os compostos organossulfurados, a maioria deles na forma de derivados de cisteína [321], são os principais constituintes bioativos das cebolas, estes são sintetizados pela enzima aliinase que catalisa a hidrólise de sulfóxidos de S-alca(en)il-L-cisteína (ACSOs) para produzir piruvato, amônia e ácidos sulfínicos. Após a ruptura do tecido produzido pela mastigação, cozimento, extração, etc., ocorre a hidrólise enzimática dos ACSOs e os compostos organossulfurados característicos destas espécies são formados pelas reações espontâneas sofridas pelos ácidos sulfínicos entre si e com outros compostos. O resultado final é uma mistura de compostos contendo enxofre, incluindo os tiosulfonatos, os tiosulfonatos, os mono-, di-, e tri-sulfetos, bem como o S-óxido tiopropanal [147, 321]. Muitos destes compostos demonstraram ter atividade antidiabética e insulinoatrópica em estudos *in vivo* com animais [322].

Dentre os principais compostos organossulfurados identificados nas duas variedades de cebola, o dipropil-dissulfeto (47,2 % na cebola amarela), o dimetil-trissulfeto (cebola roxa: 8,8 % e cebola amarela: 9,4%) e o dipropil-trissulfeto (cebola amarela 4,3%) são os dominantes.

Tal como os compostos organossulfurados, os aldeídos são também característicos destes vegetais, sendo o 2-metil-2-pentenal, produzido pela transformação sequencial do ácido 1-propenilsulfenico para o S-óxido de tiopropanal que posteriormente se transforma em 2-metil-2-pentenal [323], o composto maioritário desta família (cebola roxa 22,3% e cebola amarela 9,8%).

4.4.4. Alho

Tal como as cebolas, o alho (*Allium cepa*) também é rico em compostos organossulfurados que são responsáveis pelo odor e pelo sabor característicos deste vegetal, assim como pelas suas propriedades bioativas. Dos 21 compostos identificados nas amostras de alho em estudo 99,7% do perfil volátil são compostos organossulfurados, sendo que os restantes 0,3% pertencem às famílias dos ésteres, éteres, aldeídos e compostos benzénicos (Figura 30).

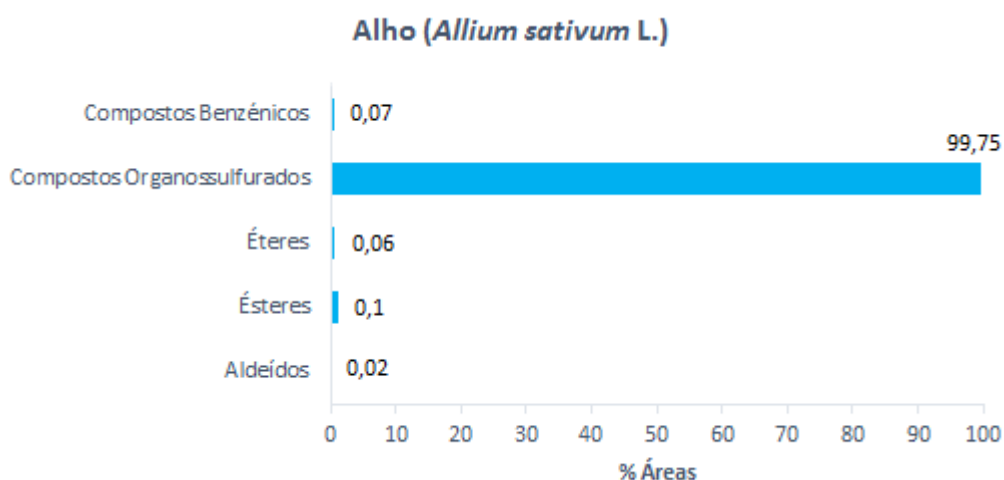


Figura 30. Famílias de compostos químicos identificados no alho.

Relativamente aos compostos individuais, o dialil disulfeto foi o composto maioritário identificado no alho contribuindo com 70,4 % da composição volátil total. Este é um dos compostos organossulfurados mais importantes do alho, e é formado pela decomposição da alicina. Quimicamente, a alicina é uma molécula instável e altamente reativa. É o composto bioativo mais comum e representa cerca de 70% dos compostos sulfurados presentes no alho [324]. Quando os bulbos do alho são cortados ou esmagados, a alicina é produzida enzimaticamente pela interação do aminoácido não proteico aliina, com a enzima aliinase, comum em todas as espécies *Allium*. Durante a reação enzimática, também se formam a amónia e o piruvato [325]. Devido à sua instabilidade, a alicina degrada-se facilmente ao longo do tempo, formando uma coleção de sulfatos de alilo e polissulfetos de segunda geração (comumente denominados organosulfetos do alho) [297]. As estruturas químicas dos principais organosulfetos de segunda geração encontram-se representadas na Figura 31.

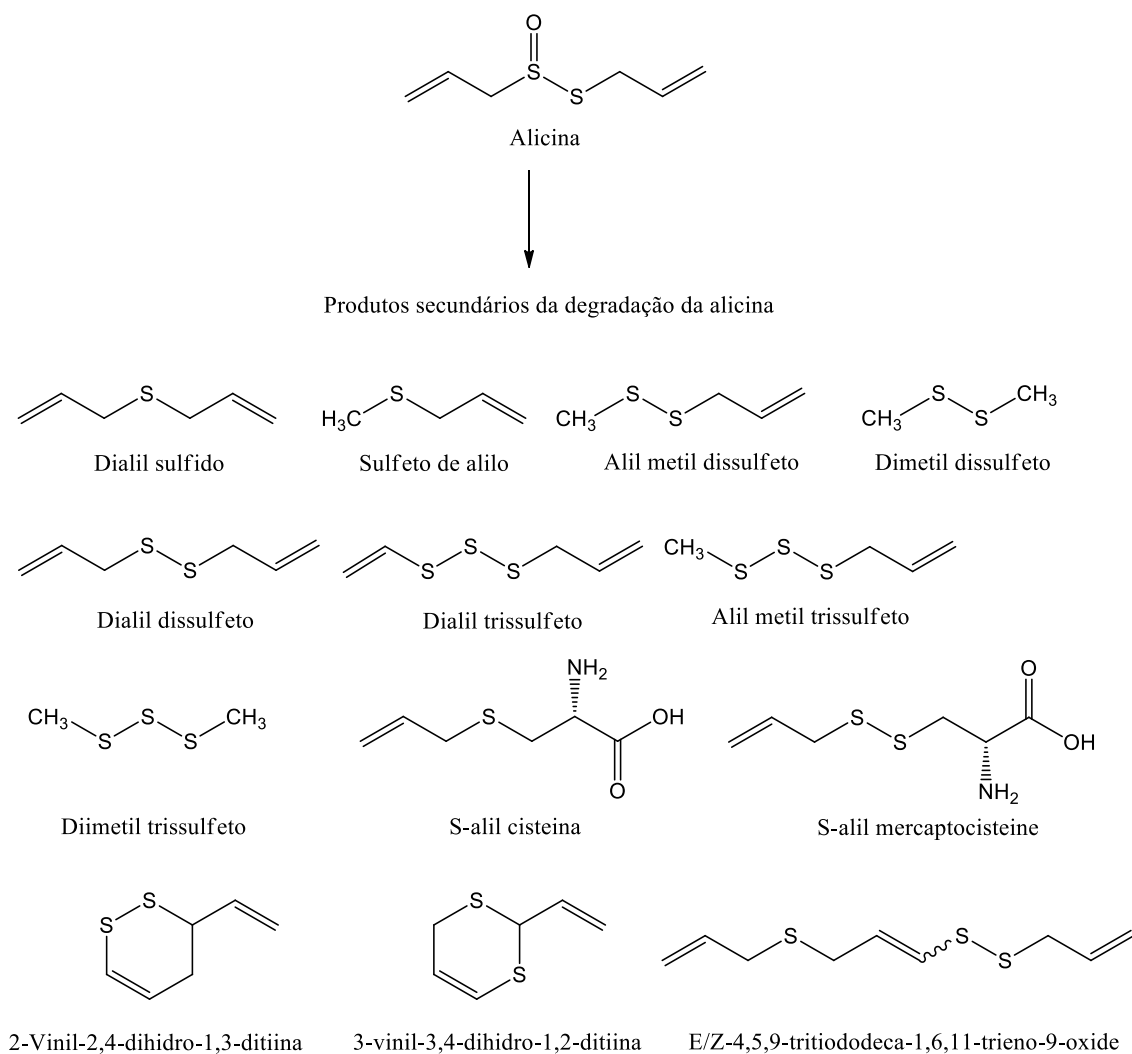


Figura 31. Estruturas químicas dos principais produtos secundários da degradação da alicina presente no alho (adaptado de Schäfer [297]).

Neste trabalho, o dialil trissulfeto foi identificado numa percentagem considerável (12,4%) sendo este o segundo composto maioritário. Tanto o dialil dissulfeto como o dialil trissulfeto são responsáveis, em parte, pelos efeitos bioativos do alho, estando estes associados a propriedades anticancerígenas [290, 313, 326].

4.4.5. Brócolos

Relativamente ao perfil volátil dos brócolos, foram identificados 88 compostos voláteis sendo os álcoois e os aldeídos as famílias mais representativas desta matriz (Figura 32).

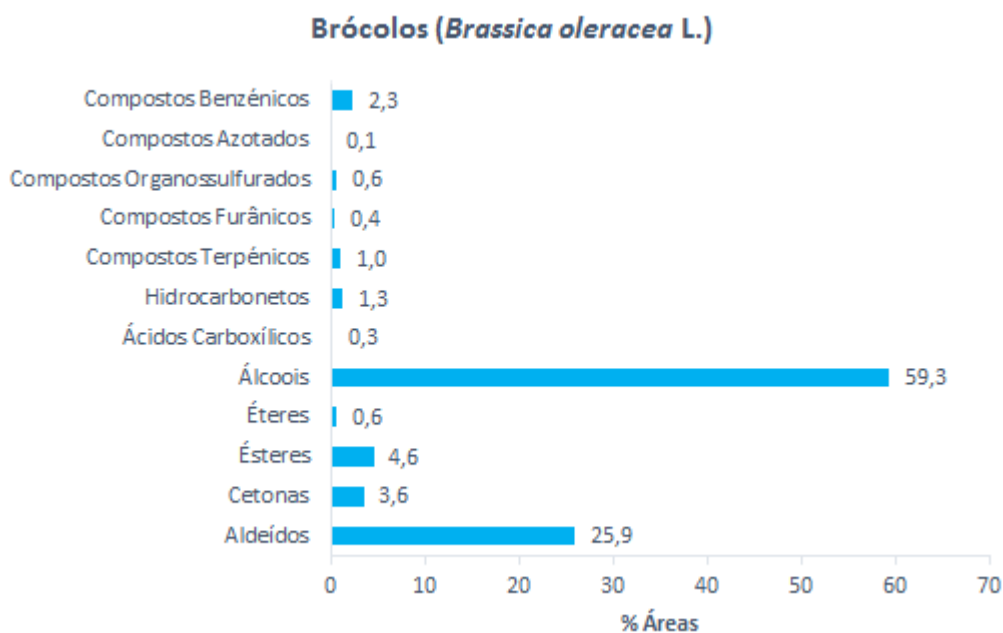


Figura 32. Famílias de compostos químicos identificados nos brócolos.

Os compostos com maior influência no aroma dos brócolos são o (Z)-3-hexen-1-ol, heptanal, o nonanal, o hexanal e o pentanal. Esta amostra também é caracterizada pelos compostos organossulfurados presentes em baixas quantidades, como o dimetil sulfeto, o dimetil dissulfeto e o metil éster do ácido tiociânico que são formados a partir dos glucosinolatos e dos precursores dos aminoácidos [327].

Os glucosinalatos são compostos característicos da família *Brassicaceae* como os brócolos e o agrião. Apesar destes compostos não serem biologicamente ativos, os seus derivados enzimáticos como os isotiocianatos são os que lhe conferem as propriedades medicinais [328, 329]. Dentre estes compostos, o 2-feniletil isotiocianato foi encontrado maioritariamente no agrião contribuindo com uma percentagem de 96,5% do perfil total. Esta substância tem sido objeto de vários estudos devido às suas propriedades anticancerígenas, antioxidantes e antimicrobianas [329].

De acordo com Rybarczyk-Plonska [330] e Jeffery . [331] a variação do teor de compostos glucosinolatos e consequentemente de compostos sulfurados pode ser afetado por diversos fatores entre os quais se destacam os fatores genéticos, as condições de cultivo, o processamento e/ou armazenamento, entre outros.

4.4.6. Espinafre

No que diz respeito à caracterização do perfil volátil do espinafre, dos 57 compostos identificados, 14 são ésteres, 13 são compostos terpênicos, 8 álcoois, 7

aldeídos e os restantes compostos miscelâneos. Apesar do número de álcoois identificados, esta família química foi a que contribuiu de forma mais expressiva para o perfil volátil total, seguindo-se os ésteres, os aldeídos e os compostos terpénicos (Figura 33).

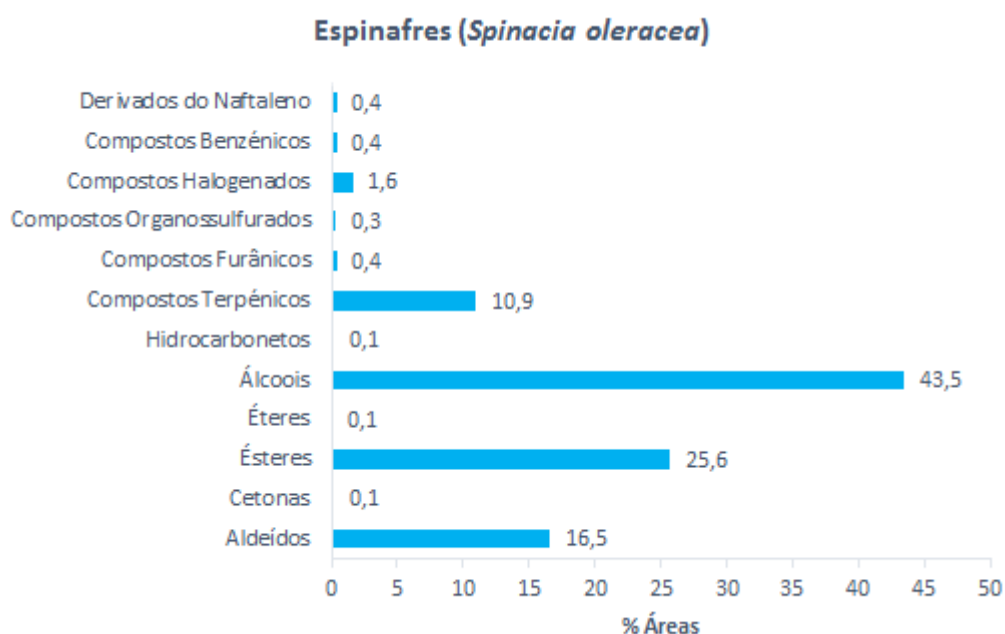


Figura 33. Famílias de compostos químicos identificados nos espinafres.

Em geral, os compostos voláteis produzidos pelos vegetais de folhas verdes, como os espinafres, consistem numa família de compostos C_6 , que incluem aldeídos, álcoois e ésteres que são responsáveis pelo aroma semelhante a relva cortada [332]. Nos espinafres, as principais reações que levam à formação dos voláteis característicos desta espécie podem ser categorizadas como: (i) hidrólises enzimáticas de aminoácidos contendo enxofre decorrentes da perda de integridade celular; (ii) degradação por indução térmica de aminoácido contendo o enxofre; (iii) degradação de ácidos gordos insaturados; e finalmente (iv) reação de Maillard juntamente com as suas reações laterais consecutivas [333].

Neste trabalho, os compostos maioritários identificados neste vegetal foram o (E)-2-hexen-1-ol, o 2-hexenal e o 1-hexanol que totalizam 56,8% da fração volátil total. Estes compostos voláteis são derivados de ácidos gordos insaturados C_{18} , como o ácido linoleico e/ou o α -linolénico através das vias lipoxigenase/ hidroperóxido liase. Uma vez desoxigenados por lipoxigenases (LOX), os ácidos gordos hidroperóxidos resultantes são metabolizados por diversas enzimas, incluindo a hidroperóxido liase (HPL) para produzir os compostos voláteis (Figura 34).

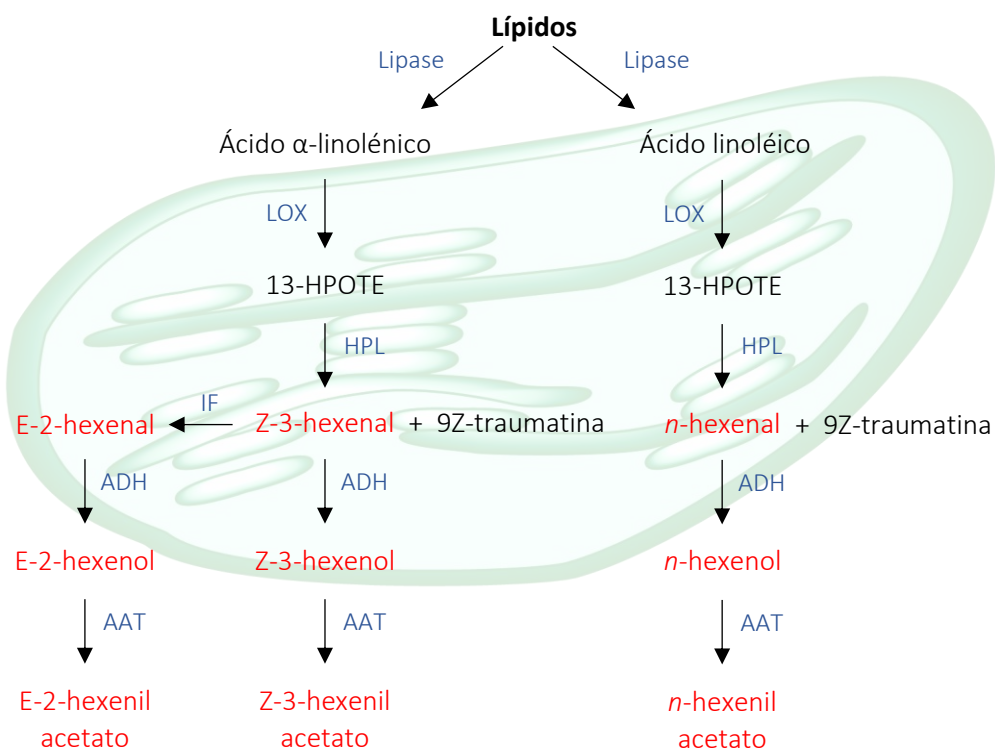


Figura 34. Esquema representativo da biossíntese de compostos voláteis via lipoxigenase/hidroperóxido liase. IF - (3Z):(2E)-enal isomerase; AAT - álcool aciltransferase; ADH - álcool desidrogenase; LOX - lipoxigenase; HPL - hidroperoxidase liase; 13-HPOTE - 13-hidroperóxidos (adaptado de Scala [332]).

Os aldeídos C₆ responsáveis pelo aroma «herbáceo» são formados a partir de 13-hidroperóxidos e incluem o hexenal e o (Z)-3-hexenal. Este último é um composto instável e rapidamente é isomerizado a (E)-2-hexenal pela (3Z):(2E)-enal isomerase [332]. Estes aldeídos, por sua vez, podem ser transformados nos álcoois e ésteres correspondentes através da atividade das enzimas álcool desidrogenase (ADH) e álcool aciltransferase (AAT) [332, 334]. De acordo com Deng [334], estes compostos voláteis apresentam atividade antiproliferativa de bactérias, sendo que os voláteis insaturados (E)-2-hexenal e (E)-2-hexen-1-ol apresentam maior atividade do que os voláteis saturados hexenal e 1-hexanol [334].

4.4.7. Tomate

No que diz respeito ao tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), este fruto rico em nutrientes é também constituído por uma grande variedade de compostos voláteis. Neste trabalho, foram identificados 77 compostos voláteis pertencentes a diferentes famílias químicas. Do total de compostos identificados, os aldeídos e os compostos furânicos

foram as classes predominantes representando cerca de 71% do perfil volátil total (Figura 35). Os restantes grupos identificados que contribuem para o aroma e sabor desta amostra foram os álcoois (6,6%), os ésteres (5,9%), os compostos terpênicos (5,5%), os ácidos carboxílicos (4,7%), os compostos organossulfurados (2,9%) e as cetonas (1,6%). As restantes famílias químicas identificadas contribuem com menos de 1 % para o perfil volátil total do tomate.

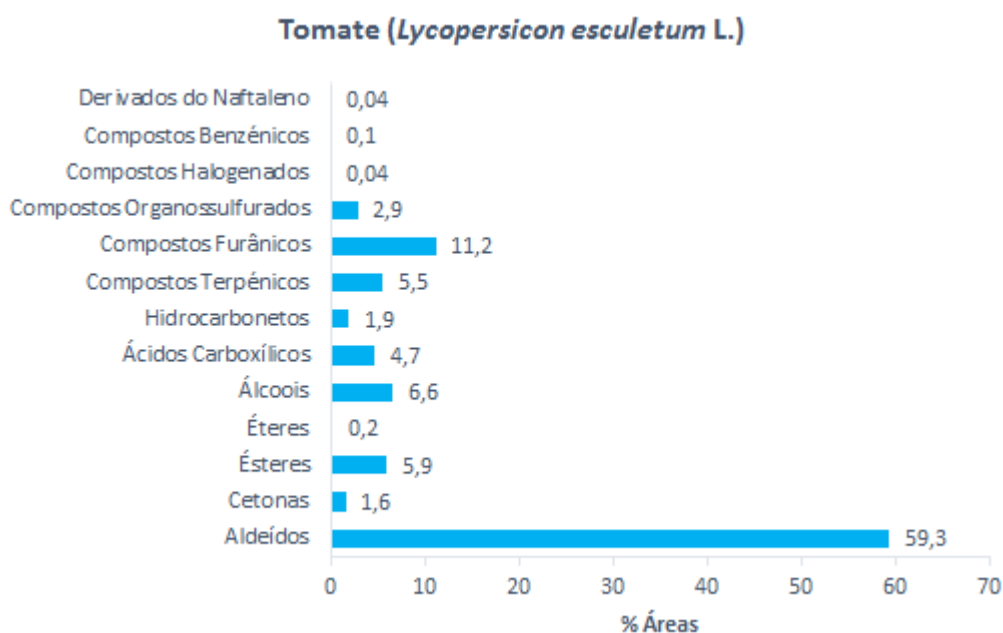


Figura 35. Famílias de compostos químicos identificados no tomate.

Entre os compostos identificados, o hexanal, o (Z)-3-hexenal, o 3-metil-butanal, o (E)-3-hexen-1-ol, a β -ionona e o 2-isobiltiazole são considerados os componentes voláteis mais importantes para a definição do aroma do tomate, conferindo o caráter fresco a esta matriz. Os principais percussores desses compostos voláteis no tomate são os aminoácidos livres, os ácidos gordos e os carotenoides [178, 335].

4.4.8. Tomate inglês

Em relação à composição volátil do tomate inglês (*Solanum betaceum*), foram identificados 65 compostos, dos quais 20 são compostos terpênicos, 17 ésteres, 7 álcoois, 5 compostos benzênicos, 4 aldeídos, 4 compostos furânicos e os restantes 7 compostos miscelâneos. Em termos de percentagem contributiva de cada família para o perfil volátil total, os ésteres foram sem dúvida a família mais importante (65,4%), seguindo-se os compostos terpênicos (15,8%) (Figura 36).

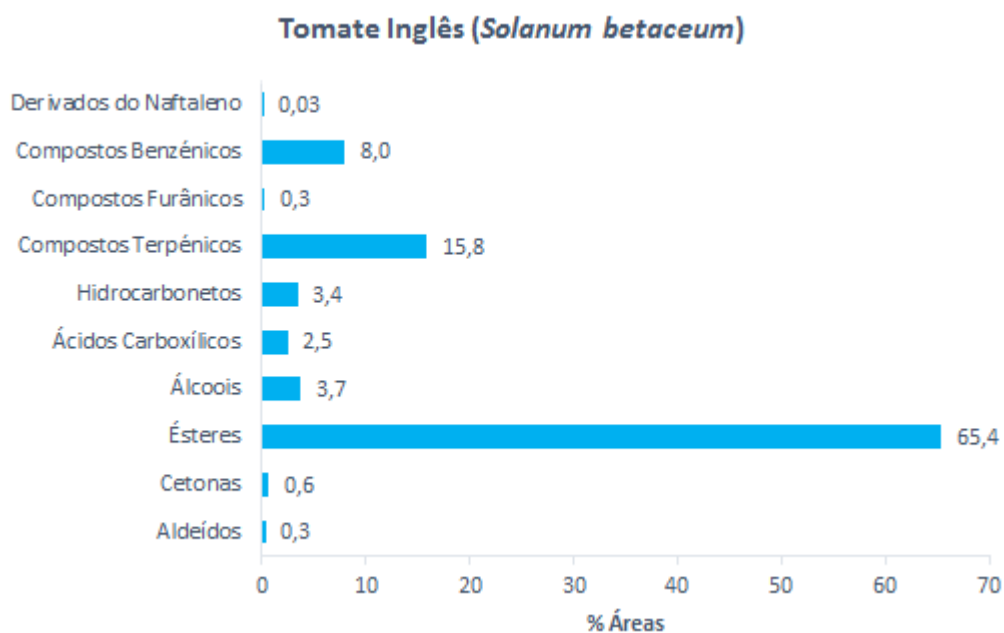


Figura 36. Famílias de compostos químicos identificados no tomate inglês.

Relativamente, aos metabolitos individuais, o etil éster do ácido butanoico, o metil éster do ácido hexanoico e o etil éster do ácido hexanoico foram os compostos maioritários identificados totalizando 58,6% do perfil volátil total. De forma menos expressiva foram encontrados o eucaliptol (2,9%), o D-limoneno (1,3%), o α -felandreno (0,03%), o α - e o β -pineno ($\leq 0,6\%$) que são compostos terpênicos conhecidos pelas suas propriedades bioativas, tais como as propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas e anticancerígenas. Por outro lado, os compostos voláteis de cadeia-curta como o acetato de etilo, o álcool etílico e o ácido acético, que são comumente encontrados em muitas frutas, desempenham um papel importante na inibição de fungos e bactérias [289].

CAPÍTULO V
CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Diversos estudos têm demonstrado que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta diária, pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo. Neste sentido, pretendeu-se com este trabalho avaliar a composição bioativa e a capacidade antioxidante de nove vegetais e duas variedades de frutos produzidos na RAM.

Através dos extratos metanólicos obtidos destas amostras, quantificou-se o teor total de compostos fenólicos, de flavonoides, de antocianinas, de betalaínas e de carotenoides. Os resultados deste estudo revelaram que a cebola roxa e o tomate inglês apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos e de antocianinas, ao passo que a beterraba e a cenoura laranja apresentaram os teores mais elevados de carotenoides.

Em termos de atividade antioxidante constatou-se que a beterraba, a cebola roxa e o tomate inglês apresentaram a maior atividade inibidora dos radicais DPPH e ABTS, assim como, o maior poder redutor demonstrado pelo método FRAP. Apesar da elevada correlação linear entre as metodologias utilizadas para avaliar a capacidade antioxidante, não foi possível estabelecer uma boa correlação entre a concentração de compostos bioativos e a capacidade antioxidante. Na verdade, a relação entre a concentração de compostos com atividade antioxidante em alimentos e a capacidade antioxidante de cada um dos compostos presentes num determinado alimento ainda não está completamente esclarecida.

No decorrer deste trabalho, foi desenvolvida uma metodologia analítica baseada na técnica de extração QuEChERS seguida de análise por UHPLC-PDA, para a identificação e quantificação de polifenóis em frutas e vegetais. Uma vez otimizado, o método demonstrou resultados satisfatórios em termos de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e eficiência de extração. As concentrações dos compostos fenólicos determinadas nestas amostras permitiu evidenciar a capacidade do método em identificar e quantificar este tipo de substâncias em matrizes alimentares. Relativamente aos compostos fenólicos analisados, a catequina foi o polifenol mais abundante, seguindo-se os ácidos gentísico e ferúlico, sendo estes últimos encontrados de forma expressiva no agrião. Quanto aos flavanóis analisados, a quercetina e o kaempferol foram encontrados majoritariamente nas amostras de cebola, e em pequenas quantidades no tomate e no agrião.

Numa terceira parte deste trabalho, efetuou-se a caracterização da composição volátil das frutas e dos vegetais, com recurso à metodologia HS-SPME/GC-qMS. Neste estudo, foram identificados um total de 320 compostos voláteis que foram agrupados em diferentes famílias químicas. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que os compostos terpénicos foram predominantes na beterraba e nas duas variedades cenoura (laranja e branca), ao passo que os compostos organossulfurados foram encontrados quase exclusivamente nas amostras de alho, agrião e nas duas variedades cebola (roxa e amarela). Segundo a bibliografia consultada, estas famílias são responsáveis pelas propriedades medicinais de inúmeras plantas, tais como as propriedades anti-hipertensivas, anti-inflamatórias, anti-HIV, antibacterianas, anticancerígenas, entre outros.

Apesar destes resultados promissores, o estudo da presença e concentração de compostos bioativos nos alimentos de origem vegetal deverá ser ampliado, de modo a permitir uma melhor avaliação dos seus efeitos. Durante este estudo deveram ser tidos em conta os diferentes estágios de maturação das frutas e dos vegetais, assim como outros fatores que afetam o teor de compostos bioativos nestes alimentos. Adicionalmente, este estudo deverá ser complementado com a avaliação das capacidades anti-inflamatória, antimicrobiana e antiproliferativa em células tumorais, dos extratos vegetais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Slavin JL, Lloyd B. Health Benefits of Fruits and Vegetables. *Advances in Nutrition: An International Review Journal* 2012;3:506-516.
2. Dauchet L, Amouyel P, Hercberg S, Dallongeville J. Fruit and Vegetable Consumption and Risk of Coronary Heart Disease: A Meta-Analysis of Cohort Studies. *The Journal of Nutrition* 2006;136:2588-2593.
3. Boeing H, Bechthold A, Bub A, Ellinger S, Haller D, Kroke A, et al. Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *European Journal of Nutrition* 2012;51:637-663.
4. Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* 1992;18:1-29.
5. Terry P, Giovannucci E, Michels KB, Bergkvist L, Hansen H, Holmberg L, et al. Fruit, Vegetables, Dietary Fiber, and Risk of Colorectal Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2001;93:525-533.
6. Dai Q, Borenstein AR, Wu Y, Jackson JC, Larson EB. Fruit and Vegetable Juices and Alzheimer's Disease: The Kame Project. *The American Journal of Medicine* 2006;119:751-759.
7. Hu N, Yu J-T, Tan L, Wang Y-L, Sun L, Tan L. Nutrition and the Risk of Alzheimer's Disease. *BioMed Research International* 2013;2013:524820.
8. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 2010;4:118-126.
9. Oroian M, Escriche I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International* 2015;74:10-36.
10. Kaulmann A, Jonville M-C, Schneider Y-J, Hoffmann L, Bohn T. Carotenoids, polyphenols and micronutrient profiles of Brassica oleraceae and plum varieties and their contribution to measures of total antioxidant capacity. *Food Chem* 2014;155:240-250.
11. Oliveira ACd, Valentim IB, Goulart MOF, Silva CA, Bechara EJH, Trevisan MTS. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova* 2009;32:689-702.
12. Programa de Desenvolvimento Rural da Região Autónoma da Madeira 2007-2013: "A Madeira Rumo à Sustentabilidade e Qualidade". Secretaria Regional do Ambiente e Recursos Naturais, 2012.
13. Starker SD, Latif Z, Gray AI. *Natural Products Isolation*. 2nd ed. New Jersey: Humana Press, 2006.
14. Lincoln T, Eduardo Z. *Fisiologia Vegetal*. 3^{ra} ed. São Paulo, Brasil: Artmed, 2006. p. 719.
15. Crozier A, Clifford MN, Ashihara H. *Plant Secondary Metabolites - Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Oxford, United Kingdom: Blackwell Publishing, 2006. p. 372.
16. Bergamaschi KB. Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento: Dissertação apresentada na Universidade de São Paulo e Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz para obtenção do grau de Mestre; 2010.

17. Kupska M, Chmiel T, Jędrkiewicz R, Wardencki W, Namieśnik J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography for determination of the terpenes profile of blue honeysuckle berries. *Food Chem* 2014;152:88-93.
18. Pinto JF. *Nutracêuticos e Alimentos Funcionais*. Lisboa, Portugal: Lidel - Edição Técnicas, Lda. , 2010. p. 276.
19. Valente ILP. TERPENÓIDES DE EUPHORBIA MELLIFERA AIT. – Pesquisa de Moduladores do Fenómeno de Multirresistência em Células Tumerais: Dissertação apresentada na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa para obtenção do grau de Mestre; 2007.
20. Ambrósio CLB, Campos FdACeS, Faro ZPd. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. *Revista de Nutrição* 2006;19:233-243.
21. Stahl W, Sies H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2005;1740:101-107.
22. Guedes V. *Phytolacca americana L.*: Potencial das bagas de uma planta invasora: Universidade do Porto; 2015.
23. Kukula-Koch WA, Widelski J. Chapter 9 - Alkaloids A2 - Badal, Simone. In: Delgoda R, editor. *Pharmacognosy*. Boston: Academic Press, 2017. p. 163-198.
24. Bennett RN, Wallsgrove RM. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* 1994;127:617-633.
25. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr Rev* 1998;56:317-333.
26. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem* 2006;99:191-203.
27. Baxter H, Harborne JB, Moss GP. *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*, Second Edition: Taylor & Francis, 1998. p. 976.
28. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* 2009;26:1001-1043.
29. Tsao R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* 2010;2:1231.
30. SOARES SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição* 2002;15:71-81.
31. Cabrita MJ, Ricardo-da-Silva J, Laureano O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos I Seminario Internacional de Vitivinicultura, México; 2003. p. 61-100.
32. Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 2000;55:481-504.
33. Bohm BA. Introduction to flavonoids. In: De la Rosa LA, Alvarez-Parrilla E, González-Aguilar GA, editors. *Fruit and Vegetable Phitochemicals: Chemistry Nutricional Value and Stability*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1998. p. 339-364.
34. Merken HM, Beecher GR. Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *J Agric Food Chem* 2000;48:577-599.

35. Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical* 2008;7:1089 -1099.
36. El Gharras H. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. *International Journal of Food Science & Technology* 2009;44:2512-2518.
37. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2004;79:727-747.
38. Le Marchand L. Cancer preventive effects of flavonoids—a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2002;56:296-301.
39. YAO LH, JIANG YM, SHI J, TOMÁS-BARBERÁN FA, DATTA N, SINGANUSONG R, et al. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition* 2004;59:113-122.
40. Pilsakova L, Riečanský I, Jagla F. The physiological actions of isoflavone phytoestrogens. *Physiol Res* 2010;59:651-664.
41. Arts ICW, van de Putte B, Hollman PCH. Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in The Netherlands. 1. Fruits, Vegetables, Staple Foods, and Processed Foods. *J Agric Food Chem* 2000;48:1746-1751.
42. Arts ICW, van de Putte B, Hollman PCH. Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in The Netherlands. 2. Tea, Wine, Fruit Juices, and Chocolate Milk. *J Agric Food Chem* 2000;48:1752-1757.
43. Sass-Kiss A, Kiss J, Milotay P, Kerek MM, Toth-Markus M. Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. *Food Research International* 2005;38:1023-1029.
44. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2002;13:572-584.
45. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 1997;2:152-159.
46. Santos SM. Extração, purificação e determinação da actividade antioxidante de compostos fenólicos da espécie *Prunus avium*: Dissertação apresentada na Universidade da Beira Interior para obtenção do grau de Mestre; 2011.
47. Pietta P-G. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* 2000;63:1035-1042.
48. Van Acker SABE, Van Den Berg D-j, Tromp MNJL, Griffioen DH, Van Bennekom WP, Van Der Vijgh WJF, et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 1996;20:331-342.
49. Dabas D. Polyphenols as Colorants. *Advances in Food Technology and Nutritional Sciences* 2016;SE:S1-S6.
50. Martínez-Valverde I, Periago MJ, Ros G. [Nutritional importance of phenolic compounds in the diet]. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion* 2000;50:5-18.
51. Robbins RJ. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J Agric Food Chem* 2003;51:2866-2887.

52. Oliveira DMd, Bastos DHM. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Química Nova* 2011;34:1051-1056.
53. Angelo PM, Jorge N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)* 2007;66:01-09.
54. Lorrain B, Ky I, Pechamat L, Teissedre PL. Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines, and extracts. *Molecules* 2013;18:1076-1100.
55. Pereira D, Valentão P, Pereira J, Andrade P. Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules* 2009;14:2202.
56. Fukumoto LR, Mazza G. Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *J Agric Food Chem* 2000;48:3597-3604.
57. Wanasundara U, Amarowicz R, Shahidi F. Isolation and identification of an antioxidative component in canola meal. *J Agric Food Chem* 1994;42:1285-1290.
58. Jeandet P, Delaunois B, Conreux A, Donnez D, Nuzzo V, Cordelier S, et al. Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants. *BioFactors* 2010;36:331-341.
59. Gorham J. *Biochemistry of the Stilbenoids*. Netherlands: Springer, 1995. p. 276.
60. Anekonda TS. Resveratrol—A boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Research Reviews* 2006;52:316-326.
61. Athar M, Back JH, Tang X, Kim KH, Kopelovich L, Bickers DR, et al. Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2007;224:274-283.
62. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:493-506.
63. Kaur C, Kapoor HC. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. *International Journal of Food Science & Technology* 2001;36:703-725.
64. Moon J-K, Shibamoto T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *J Agric Food Chem* 2009;57:1655-1666.
65. Fernandez-Panchon MS, Villano D, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC. Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2008;48:649-671.
66. Ferreira ICFR, Abreu RMV. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise* 2007;2:32-39.
67. Kelly FJ. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occupational and Environmental Medicine* 2003;60:612-616.
68. Barbosa K, Costa N, Alfenas R, De Paula S, Minim V, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição* 2010;23:629-643.
69. Sánchez-Moreno C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Revista de Agaroquímica y Tecnología de Alimentos* 2002;8:121-137.

70. Alves CQ, David JM, David JP, Bahia MV, Aguiar RM. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova* 2010;33:2202-2210.
71. Pisoschi AM, Negulescu GP. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry* 2011;1:1-10.
72. Medronho JCP. Avaliação da atividade biológica e teor em fenóis de diferentes extratos de palmeira anã (*Chamaerops humilis* L.): Dissertação apresentada na Universidade do Algarve para obtenção do grau de mestre; 2015.
73. Chen Z, Bertin R, Frolidi G. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chem* 2013;138:414-420.
74. Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chem* 2012;130:1036-1043.
75. Wang G, Huang X, Pei D, Duan W, Quan K, Li X, et al. DPPH-HPLC-DAD analysis combined HSCCC for screening and identification of radical scavengers in *Cynomorium songaricum* Rupr. *New Journal of Chemistry* 2016;40:3885-3891.
76. Deng J, Cheng W, Yang G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chem* 2011;125:1430-1435.
77. Negri MLS, Possamai JC, Nakashima T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2009;19:553-556.
78. Huang D, Ou B, Prior RL. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J Agric Food Chem* 2005;53:1841-1856.
79. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J Agric Food Chem* 2005;53:4290-4302.
80. Spínola VAR. Novas metodologias para a Determinação do Conteúdo de Ácido Ascórbico em Alimentos Frescos: Dissertação apresentada na Universidade da Madeira para a obtenção do grau de Mestre; 2011.
81. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 1999;26:1231-1237.
82. Morales-Soto A, García-Salas P, Rodríguez-Pérez C, Jiménez-Sánchez C, Cádiz-Gurrea MdL, Segura-Carretero A, et al. Antioxidant capacity of 44 cultivars of fruits and vegetables grown in Andalusia (Spain). *Food Research International* 2014;58:35-46.
83. Stangeland T, Remberg SF, Lye KA. Total antioxidant activity in 35 Ugandan fruits and vegetables. *Food Chem* 2009;113:85-91.
84. Zou Z, Xi W, Hu Y, Nie C, Zhou Z. Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food Chem* 2016;196:885-896.
85. Griffin SP, Bhagooli R. Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 2004;302:201-211.
86. Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance

Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *J Agric Food Chem* 2002;50:3122-3128.

87. Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal* 2013;21:143-152.

88. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal* 2006;19:669-675.

89. Paixão N, Perestrelo R, Marques JC, Câmara JS. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chem* 2007;105:204-214.

90. Biswas AK, Sahoo J, Chatli MK. A simple UV-Vis spectrophotometric method for determination of β -carotene content in raw carrot, sweet potato and supplemented chicken meat nuggets. *LWT - Food Science and Technology* 2011;44:1809-1813.

91. Davis AR, Fish WW, Perkins-Veazie P. A rapid spectrophotometric method for analyzing lycopene content in tomato and tomato products. *Postharvest Biology and Technology* 2003;28:425-430.

92. Khan MR, Rahman M, Islam M, Begum S. A simple UV-spectrophotometric method for the determination of vitamin C content in various fruits and vegetables at Sylhet area in Bangladesh. *Journal of Biological Sciences* 2006;6:388-392.

93. da Silva LAL, Pezzini BR, Soares L. Spectrophotometric determination of the total flavonoid content in *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) leaves. *Pharmacognosy Magazine* 2015;11:96-101.

94. Hariram Nile S, Hwan Kim D, Keum Y-S. Determination of Anthocyanin Content and Antioxidant Capacity of Different Grape Varieties. *Ciência Téc. Vitiv.* 2015;30:60-68.

95. Li Y-G, Tanner G, Larkin P. The DMACA-HCl Protocol and the Threshold Proanthocyanidin Content for Bloat Safety in Forage Legumes. *J. Sci. Food Agric.* 1996;70:89-101.

96. Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem* 2011;126:1821-1835.

97. Khoddami A, Wilkes M, Roberts T. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* 2013;18:2328.

98. Pinto MMM. *Manual de Trabalhos Laboratoriais de Química Orgânica e Farmacêutica*. Lisboa, Portugal: Lidel- edições técnicas, Lda, 2011. p. 462.

99. Skoog DA, J. Holler, T. Nieman. *Princípios de Análise Instrumental*. 5ª ed. ed: Porto Alegre: Bookman, 2002.

100. Gilbert J, Şenyuva H. *Bioactive Compounds in Foods*. Oxford: John Wiley & Sons, 2009. p. 432.

101. Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S, Ashida H, Kanazawa K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J Agric Food Chem* 2003;51:571-581.

102. Vallverdú-Queralt A, Jáuregui O, Di Lecce G, Andrés-Lacueva C, Lamuela-Raventós RM. Screening of the polyphenol content of tomato-based products through accurate-mass spectrometry (HPLC–ESI-QTOF). *Food Chem* 2011;129:877-883.
103. Perlatti B, Fernandes JB, Silva MFGF, Ardila JA, Carneiro RL, Souza BHS, et al. Application of a Quantitative HPLC-ESI-MS/MS Method for Flavonoids in Different Vegetables Matrices. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2016;27:475-483.
104. Puigventos L, Navarro M, Alechaga E, Nunez O, Saurina J, Hernandez-Cassou S, et al. Determination of polyphenolic profiles by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry for the authentication of fruit extracts. *Anal Bioanal Chem* 2015;407:597-608.
105. de Lourdes Mata Bilbao M, Andrés-Lacueva C, Jáuregui O, Lamuela-Raventós RM. Determination of flavonoids in a Citrus fruit extract by LC–DAD and LC–MS. *Food Chem* 2007;101:1742-1747.
106. Le Deun E, Van der Werf R, Le Bail G, Le Quere JM, Guyot S. HPLC-DAD-MS Profiling of Polyphenols Responsible for the Yellow-Orange Color in Apple Juices of Different French Cider Apple Varieties. *J Agric Food Chem* 2015;63:7675-7684.
107. Mullen W, Marks SC, Crozier A. Evaluation of phenolic compounds in commercial fruit juices and fruit drinks. *J Agric Food Chem* 2007;55:3148-3157.
108. Bayram B, Esatbeyoglu T, Schulze N, Ozcelik B, Frank J, Rimbach G. Comprehensive analysis of polyphenols in 55 extra virgin olive oils by HPLC-ECD and their correlation with antioxidant activities. *Plant Foods Hum Nutr* 2012;67:326-336.
109. Paixao N, Pereira V, Marques JC, Camara JS. Quantification of polyphenols with potential antioxidant properties in wines using reverse phase HPLC. *J Sep Sci* 2008;31:2189-2198.
110. Zhang X, Zheng Y, Zeng Y, Liu W. [Direct analysis of 38 polyphenols in wine by ultra high performance liquid chromatography-linear ion trap/orbitrap high resolution mass spectrometry]. *Se Pu* 2015;33:583-589.
111. Lee MJ, Prabhu S, Meng X, Li C, Yang CS. An improved method for the determination of green and black tea polyphenols in biomatrices by high-performance liquid chromatography with coulometric array detection. *Anal Biochem* 2000;279:164-169.
112. Quifer-Rada P, Vallverdu-Queralt A, Martinez-Huelamo M, Chiva-Blanch G, Jáuregui O, Estruch R, et al. A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Food Chem* 2015;169:336-343.
113. Alves VLG. Desenvolvimento e Validação de Novas Metodologias Analíticas Baseadas na MEPS/UHPLC-PDA e QuEChERS/UHPLC-PDA para a Determinação de Antidepressivos em Amostras de Urina: Dissertação apresentada na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Mestre; 2015.
114. Gonçalves JIJ. Quantificação de Antipsicóticos em Urina, recorrendo à Microextração por Sorvente Empacotado combinada com a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência: Dissertação apresentada na Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Mestre; 2015.

115. Porto HSM. HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos: Dissertação apresentada na Faculdade de Farmacia da Universidade de Coimbra para obtenção do grau Mestre; 2014.
116. Gomes SMdC. Determinação de Antioxidantes por Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detecção Electroquímica: Dissertação apresentada na Universidade de Coimbra para obtenção do grau Mestre; 2010.
117. Maldaner L, Jardim ICSF. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Química Nova* 2009;32:214-222.
118. Maldaner L, Jardim ICSF. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. *Scientia Chromatographica* 2012;4:197-207.
119. Niessen WMA. *Current Practice of Gas Chromatography-Mass Spectrometry*: CRC Press, 2001.
120. Poole C. *Gas Chromatography*: Elsevier Science, 2012.
121. Gonçalves J, Mendes B, Silva CL, Câmara JS. Development of a novel microextraction by packed sorbent-based approach followed by ultrahigh pressure liquid chromatography as a powerful technique for quantification phenolic constituents of biological interest in wines. *Journal of Chromatography A* 2012;1229:13-23.
122. Capriotti AL, Cavaliere C, Crescenzi C, Foglia P, Nescatelli R, Samperi R, et al. Comparison of extraction methods for the identification and quantification of polyphenols in virgin olive oil by ultra-HPLC-QToF mass spectrometry. *Food Chem* 2014;158:392-400.
123. Hashim SN, Schwarz LJ, Boysen RI, Yang Y, Danylec B, Hearn MT. Rapid solid-phase extraction and analysis of resveratrol and other polyphenols in red wine. *J Chromatogr A* 2013;1313:284-290.
124. Silva CL, Haesen N, Câmara JS. A new and improved strategy combining a dispersive-solid phase extraction-based multiclass method with ultra high pressure liquid chromatography for analysis of low molecular weight polyphenols in vegetables. *Journal of Chromatography A* 2012;1260:154-163.
125. Kupska M, Wasilewski T, Jędrkiewicz R, Gromadzka J, Namieśnik J. Determination of Terpene Profiles in Potential Superfruits. *International Journal of Food Properties* 2016;19:2726-2738.
126. Garcia-Salas P, Morales-Soto A, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules* 2010;15:8813.
127. Ross KA, Beta T, Arntfield SD. A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food Chem* 2009;113:336-344.
128. Welch CR, Wu Q, Simon JE. Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization. *Current analytical chemistry* 2008;4:75-101.
129. Naczki M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006;41:1523-1542.
130. Jardim ICSF. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. *Scientia Chromatographica* 2010;2:13-25.

131. Otles S, Kartal C. Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and Applications in Food Samples. *Acta Sci Pol Technol Aliment* 2016;15:5-15.
132. Kerns EH, Kleintop T, Little D, Tobien T, Mallis L, Di L, et al. Integrated high capacity solid phase extraction-MS/MS system for pharmaceutical profiling in drug discovery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2004;34:1-9.
133. Robles-Molina J, Lara-Ortega FJ, Gilbert-López B, García-Reyes JF, Molina-Díaz A. Multi-residue method for the determination of over 400 priority and emerging pollutants in water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2014;1350:30-43.
134. Pedersen AJ, Dalsgaard PW, Rode AJ, Rasmussen BS, Müller IB, Johansen SS, et al. Screening for illicit and medicinal drugs in whole blood using fully automated SPE and ultra-high-performance liquid chromatography with TOF-MS with data-independent acquisition. *J Sep Sci* 2013;36:2081-2089.
135. Queiroz MEC. Microextração em Sorventes Empacotados (MEPS) para a Determinação de Fármacos em Fluidos Biológicos. *Scientia Chromatographica* 2011;3:223-229.
136. Gonçalves J, Câmara JS. New method for determination of (E)-resveratrol in wine based on microextraction using packed sorbent and ultra-performance liquid chromatography. *J Sep Sci* 2011;34:2376-2384.
137. Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int* 2003;86:412-431.
138. Lehotay SJ. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe Approach for Determining Pesticide Residues. In: Martínez Vidal JL, Frenich AG, editors. *Pesticide Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. p. 239-261.
139. González-Curbelo MÁ, Socas-Rodríguez B, Herrera-Herrera AV, González-Sálamo J, Hernández-Borges J, Rodríguez-Delgado MÁ. Evolution and applications of the QuEChERS method. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2015;71:169-185.
140. Jiang Z, Li H, Cao X, Du P, Shao H, Jin F, et al. Determination of hymexazol in 26 foods of plant origin by modified QuEChERS method and liquid chromatography tandem-mass spectrometry. *Food Chem* 2017;228:411-419.
141. Prestes OD, Adaime MB, Zanella R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostras para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. *Scientia Chromatographica* 2011;3:51-64.
142. Prestes OD, Friggi CA, Adaime MB, Zanella R. QuEChERS: Um método moderno de preparo de amostra para deerminação multiresíduos de pesicidas em alimentos por métodos cromatograficos acoplados à espectrometria de massas *Química Nova* 2009;32:1620-1634.
143. Mendes B, Gonçalves J, Câmara JS. Effectiveness of high-throughput miniaturized sorbent- and solid phase microextraction techniques combined with gas chromatography–mass spectrometry analysis for a rapid screening of volatile and semi-volatile composition of wines—A comparative study. *Talanta* 2012;88:79-94.
144. Perestrelo R, Barros AS, Rocha SM, Câmara JS. Optimisation of solid-phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry based

methodology to establish the global volatile signature in pulp and skin of *Vitis vinifera* L. grape varieties. *Talanta* 2011;85:1483-1493.

145. Pereira J, Pereira J, Câmara JS. Effectiveness of different solid-phase microextraction fibres for differentiation of selected Madeira island fruits based on their volatile metabolite profile—Identification of novel compounds. *Talanta* 2011;83:899-906.

146. Pontes M, Marques JC, Câmara JS. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-quadrupole mass spectrometric methodology for the establishment of the volatile composition of *Passiflora* fruit species. *Microchemical Journal* 2009;93:1-11.

147. Järvenpää EP, Zhang Z, Huopalahti R, King JW. Determination of fresh onion (*Allium cepa* L.) volatiles by solid phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* 1998;207:39-43.

148. Tsai HY, Chang CM, Shen JL, Chen LJ, Yang TF, Bor Fuh C. Solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography for determination of beta-carotene in food. *J Chromatogr Sci* 2006;44:354-358.

149. Alpendurada MF. Solid-Phase Microextraction: a Promising Technique for Sample Preparation in Environmental Analysis. *J Chromatogr A* 2000;889:3-14.

150. Gonçalves J. Quantificação de Antipsicóticos em Urina, recorrendo à Microextração por Sorvente Empacotado combinada com a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra 2015.

151. Gonçalves J. Quantificação de Antipsicóticos em Urina, recorrendo à Microextração por Sorvente Empacotado combinada com a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência: Dissertação apresentada na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Mestre; 2015.

152. Gros N, Camoes MF, Oliveira C, Silva MC. Ionic Composition of Seawaters and Derived Saline Solutions Determined by Ion Chromatography and its Relation to Other Water Quality Parameters. *J Chromatogr A* 2008;1210:92-98.

153. Aldrich S-S. Solid Phase Microextraction: Theory and optimization of Conditions. *Boletim* 923; 1998.

154. Alves S. Validação de um Método Analítico para a Identificação de Ácidos Gordos Voláteis em Águas Intersticiais de Sedimentos Marinhos por SPME-GC-MS. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa 2014.

155. Alves SIC. VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GORDOS VOLÁTEIS EM ÁGUAS INTERSTICIAIS DE SEDIMENTOS MARINHOS POR SPME-GC-MS: Dissertação apresentada na Universidade de Lisboa para obtenção do grau de Mestre 2014; 2014.

156. Pawliszyn J. Solid Phase Microextraction Theory and Practice: Wiley-VCH, 1997. p. 247.

157. Annegowda HV, Bhat R, Min-Tze L, Karim AA, Mansor SM. Influence of sonication treatments and extraction solvents on the phenolics and antioxidants in star fruits. *J Food Sci Techn* 2012;49:510-514.

158. Startek SD, Latif Z, Gray AI. Natural Products Isolation. New Jersey: Humana Press, 2006.
159. Tharasena B, Lawan S. Phenolics, Flavonoids and Antioxidant Activity of Vegetables as Thai Side Dish. APCBEE Procedia 2014;8:99-104.
160. Marinova D, Ribarova F, Atanassova M. Total phenolics and total flavonoids in Bulgaria fruits and vegetables. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy 2005;40:255-260.
161. Giusti MM, Wrolstad RE. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry: John Wiley & Sons, Inc., 2001. p.
162. Ravichandran K, Saw NMMT, Mohdaly AAA, Gabr AMM, Kastell A, Riedel H, et al. Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. Food Research International 2013;50:670-675.
163. Lichtenthaler HK, Buschmann C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry: John Wiley & Sons, Inc., 2001. p.
164. Spinola V. Novas Metodologias para a Determinação do Conteúdo de Ácido Ascórbico em Alimentos Frescos: Dissertação apresentada na Universidade da Madeira para a obtenção do grau de Mestre; 2011.
165. Manual de Garantia da Qualidade Analítica - Resíduos e Contaminantes em Alimentos. 1ª ed. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011. p. 277.
166. Dorkó Z, Verbić T, Horvai G. Selectivity in analytical chemistry: Two interpretations for univariate methods. Talanta 2015;132:680-684.
167. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova 2004;27:771-780.
168. Ribeiro FAdL, Ferreira MMC, Morano SC, Silva LRd, Schneider RP. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. Química Nova 2008;31:164-171.
169. Aragão NMd, Veloso MCdC, Andrade JBd. 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 2009;32:2476-2481.
170. Thompson M, Ellison Stephen LR, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry 2002. p. 835.
171. ISO 8466-1, Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics - Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland 1999.
172. Paschoal JAR, Rath S, Airoidi FPdS, Reyes FGR. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. Química Nova 2008;31:1190-1198.

173. Brito NM, Junior OPdA, Polese L, Ribeiro ML. Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. *Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente* 2003;13:129-146.
174. Relacre (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal), Validação de métodos internos de ensaio em análise química - Guia Relacre nº 13. Lisboa 2000. p. 51.
175. Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. 2001.
176. Cassiano NM, Barreiro JC, Martins LRR, Oliveira RV, Cass QB. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Química Nova* 2009;32:1021-1030.
177. Rocha SM, Salvador ÂC, Martins C, Barbosa C, Santos M, Petronilho S. Microextração em fase sólida e cromatografia de gás: Uma combinação de elevado potencial. *Scientia Chromatographica* 2013;5:284-300.
178. Figueira J, Câmara H, Pereira J, Câmara JS. Evaluation of volatile metabolites as markers in *Lycopersicon esculentum* L. cultivars discrimination by multivariate analysis of headspace solid phase microextraction and mass spectrometry data. *Food Chem* 2014;145:653-663.
179. de la Rosa LA, Alvarez-Parrilla E, González-Aguilar GA. Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value, and Stability: Wiley-Blackwell, 2009. p. 384.
180. Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JL. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*. 2008;613:1-19.
181. Vermerris W, Nicholson R. Phenolic Compound Biochemistry. Netherlands: Springer Science & Business Media, 2007. p. 276.
182. Nile SH, Park SW. Total phenolics, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activity of three colored onions (*Allium cepa* L.). *Frontiers in Life Science* 2013;7:224-228.
183. Shahidi F, Chandrasekara A, Zhong Y. Bioactive Phytochemicals in Vegetables. In: Sinha N, Hui YH, Evranuz EÖ, Siddiq M, Ahmed J, editors. Handbook of Vegetables and Vegetable Processing: John Wiley & Sons, 2010. p. 125-158.
184. Cheng A, Chen X, Jin Q, Wang W, Shi J, Liu Y. Comparison of Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Red and Yellow Onions. *Czech J. Food Sci.* 2013;31:501-508.
185. Muniz LB. Caracterização química, física e de compostos funcionais em cebolas frescas minimamente processadas: Dissertação apresentada na Universidade de Brasília para obtenção do grau de Mestre; 2007.
186. Benkeblia N. Free-radical scavenging capacity and antioxidant properties of some selected onions (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) extracts. *Braz Arch Biol Technol* 2005;48:753-759.
187. Zeb A. Phenolic profile and antioxidant potential of wild watercress (*Nasturtium officinale* L.). *SpringerPlus* 2015;4:714.
188. Mandal P, Ghosal M. Antioxidant activities of different parts of tree tomato fruit. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2012;13:39-47.

189. Noor Atiqah AAK, Maisarah AM, Asmah R. Comparison of antioxidant properties of tamarillo (*Cyphomandra betacea*), cherry tomato (*Solanumly copersicum* var. *cerasiform*) and tomato (*Lyopersicon esulentum*). International Food Research Journal 2014;21:2355-2362.
190. Oksuz T, Surek E, Tacer-Caba Z, Nilufer-Erdil D. Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Persimmon and Red Beet Jams Produced by Sucrose Impregnation. Food Science and Technology 2015;3:1-8.
191. Kamath SD, Arunkumar D, Avinash NG, Samshuddin S. Determination of total phenolic content and total antioxidant activity in locally consumed food stuffs in Moodbidri, Karnataka, India. Advances in Applied Science Research 2015;6:99-102.
192. Fernandes AJ, Ferreira MR, Randau KP, de Souza TP, Soares LA. Total flavonoids content in the raw material and aqueous extractives from Bauhinia monandra Kurz (Caesalpinaceae). The Scientific World Journal 2012;2012:923462.
193. Figueirêdo CBM, Alves LDS, Silva CCAR, Soares MFdLR, Ferreira PA, Silva RMF, et al. Doseamento de flavonoides totais das partes aéreas de *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae). Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada 2015;36:509-516.
194. Luís ÂFS. Pesquisa e Identificação de Compostos Bioativos em Plantas Florestais 2014.
195. Lin J-Y, Tang C-Y. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. Food Chem 2007;101:140-147.
196. Cieślík E, Gręda A, Adamus W. Contents of polyphenols in fruit and vegetables. Food Chem 2006;94:135-142.
197. Cho MJ, Howard LR, Prior RL, Morelock T. Flavonoid content and antioxidant capacity of spinach genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. Journal of the Science of Food and Agriculture 2008;88:1099-1106.
198. Martínez-Sánchez A, Gil-Izquierdo A, Gil MI, Ferreres F. A Comparative Study of Flavonoid Compounds, Vitamin C, and Antioxidant Properties of Baby Leaf Brassicaceae Species. J Agric Food Chem 2008;56:2330-2340.
199. Agarwal A, Raj N, Chaturvedi N. A Comparative Study on Proximate and Antioxidant Activity of *Brassica oleracea* (Kale) and *Spinacea oleracea* (Spinach) Leaves. Int J Adv Res Bio. Sci 2017;4:22-29.
200. Aires A, Carvalho R, Rosa EAS, Saavedra MJ. Phytochemical characterization and antioxidant properties of baby-leaf watercress produced under organic production system. CyTA - Journal of Food 2013;11:343-351.
201. Maximas H, Rose HR, Sudha PN, Sudhakar K. A study on the hepatoprotective activities of Methanol Extract of *Spinacia oleracea* (Linn.) to the Induced Hepatotoxicity in wistar rat models Int J Pharm Res Health Sci 2014;2:287-301.
202. Bahorun T, Luximon-Ramma A, Crozier A, Aruoma OI. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. Journal of the Science of Food and Agriculture 2004;84:1553-1561.

203. Curcic MG, Stankovic MS, Radojevic ID, Stefanovic OD, Comic LR, Topuzovic MD, et al. Biological Effects, Total Phenolic Content and Flavonoid Concentrations of Fragrant Yellow Onion (*Allium flavum* L.). *Medicinal Chemistry* 2012;8:46-51.
204. Agbo MO, Uzor PF, Akazie-Nneji UN, Eze-Odurukwe CU, Ogbatue UB, Mbaoji EC. Antioxidant, Total Phenolic and Flavonoid Content of Selected Nigerian Medicinal Plants. *Dhaka Univ. J. Pharm. Sci.* 2015;14:1-7.
205. Farasat M, Khavari-Nejad R-A, Nabavi SMB, Namjooyan F. Antioxidant Activity, Total Phenolics and Flavonoid Contents of some Edible Green Seaweeds from Northern Coasts of the Persian Gulf. *Iran J Pharm Res* 2014;13:163-170.
206. Pękal A, Pyrzyńska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Methods* 2014;7:1776-1782.
207. Carreira SMV. Avaliação das propriedades antioxidantes e antimutagênicas de diferentes cultivares *Vaccinium spp.*: Partiot, Bluecrop, Duke, Earlyblue e O'Neal, produzidas na Sub-região do Baixo Vouga 2012.
208. Teixeira LN, Stringheta PC, Oliveira FA. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. *Revista CERES* 2008;55:297-304.
209. Osorio C, Hurtado N, Dawid C, Hofmann T, Heredia-Mira FJ, Morales AL. Chemical characterisation of anthocyanins in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) and Andes berry (*Rubus glaucus* Benth.) fruits. *Food Chem* 2012;132:1915-1921.
210. de Rosso VV, Mercadante AZ. HPLC–PDA–MS/MS of Anthocyanins and Carotenoids from Dovyalis and Tamarillo Fruits. *J Agric Food Chem* 2007;55:9135-9141.
211. Nallakurumban P, Suja N, Vijayakumar A, Geetha PS, Karpagapandi L. Estimation of Phytochemicals and Antioxidant Property of Tamarillo (*Solanum betaceum*) and A Value Added Product Tamarillo Sauce. *Int J Sci Prog Res* 2015;9:61-65.
212. Vasco C, Avila J, Ruales J, Svanberg U, Kamal-Eldin A. Physical and chemical characteristics of golden-yellow and purple-red varieties of tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2009;60:278-288.
213. Rodrigues AS, Pérez-Gregorio MR, García-Falcón MS, Simal-Gándara J, Almeida DPF. Effect of meteorological conditions on antioxidant flavonoids in Portuguese cultivars of white and red onions. *Food Chem* 2011;124:303-308.
214. Wruss J, Waldenberger G, Huemer S, Uygun P, Lanzerstorfer P, Müller U, et al. Compositional characteristics of commercial beetroot products and beetroot juice prepared from seven beetroot varieties grown in Upper Austria. *J Food Compos Anal* 2015;42:46-55.
215. Volp ACP, Renhe IRT, Stringueta PC. Pigmentos Naturais Bioativos. *Alimentos e Nutrição Araraquara* 2009;20:157-166.
216. Herbach KM, Stintzing FC, Carle R. Betalain Stability and Degradation—Structural and Chromatic Aspects. *J Food Sci* 2006;71:R41-R50.
217. Strack D, Vogt T, Schliemann W. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* 2003;62:247-269.

218. Reddy MK, Alexander-Lindo RL, Nair MG. Relative Inhibition of Lipid Peroxidation, Cyclooxygenase Enzymes, and Human Tumor Cell Proliferation by Natural Food Colors. *J Agric Food Chem* 2005;53:9268-9273.
219. Lim TK. *Beta vulgaris*. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 10, Modified Stems, Roots, Bulbs*. Netherlands: Springer, 2016. p. 26-68.
220. Pinheiro-Santana HM, Stringheta PC, Brandão SCC, Páez HH, Queiróz VMVd. Evaluation of total carotenoids, a- and b-carotene in carrots (*Daucus carota* L.) during home processing. *Food Science and Technology (Campinas)* 1998;18:39-44.
221. Nicolle C, Simon G, Rock E, Amouroux P, Rémésy C. Genetic Variability Influences Carotenoid, Vitamin, Phenolic, and Mineral Content in White, Yellow, Purple, Orange, and Dark-orange Carrot Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 2004;129:523-529.
222. Rao AV, Rao LG. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research* 2007;55:207-216.
223. Dias MG, Camões MFGFC, Oliveira L. Carotenoids in traditional Portuguese fruits and vegetables. *Food Chem* 2009;113:808-815.
224. Vinha AF, Alves RC, Barreira SVP, Costa ASG, Oliveira MBPP. Impact of boiling on phytochemicals and antioxidant activity of green vegetables consumed in the Mediterranean diet. *Food Funct* 2015;6:1157-1163.
225. Xu D-P, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, et al. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *Int J Mol Sci* 2017;18:96.
226. Barickman TC, Kopsell DA, Sams CE. Impact of nitrogen and sulfur fertilization on the phytochemical concentration in watercress, *Nasturtium officinale* r. Br. *Acta Hort.* 2009;841:479-482.
227. Figueira JA, Pereira JAM, Porto-Figueira P, Câmara JS. Ultrasound-assisted liquid-liquid extraction followed by ultrahigh pressure liquid chromatography for the quantification of major carotenoids in tomato. *J Food Compost Anal* 2017;57:87-93.
228. Martí R, Roselló S, Cebolla-Cornejo J. Tomato as a Source of Carotenoids and Polyphenols Targeted to Cancer Prevention. *Cancers* 2016;8:58.
229. Clinton SK. Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr Rev* 1998;56:35-51.
230. Gama JJT, Tadiotti AC, Sylos CM. Comparison of carotenoid content in tomato, tomato pulp and ketchup by liquid chromatography. *Alimentos e Nutrição Araraquara* 2009;17:353-358.
231. Chanda S, Dave R. *In vitro* models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *African Journal of Microbiology Research* 2009;3:981-996.
232. Espin S, Gonzalez-Manzano S, Taco V, Poveda C, Ayuda-Durán B, Gonzalez-Paramas AM, et al. Phenolic composition and antioxidant capacity of yellow and purple-red Ecuadorian cultivars of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.). *Food Chem* 2016;194:1073-1080.

233. Geetha M, Ponmozhi P, Saravanakumar M, Suganyadevi P. Extraction of anthocyanin and analyzing its antioxidant properties from different onion (*Allium cepa*) varieties. *Int. J. Res. Pharm. Sci.* 2011;2:497-506.
234. Raikos V, McDonagh A, Ranawana V, Duthie G. Processed beetroot (*Beta vulgaris* L.) as a natural antioxidant in mayonnaise: Effects on physical stability, texture and sensory attributes. *Food Science and Human Wellness* 2016;5:191-198.
235. Georgiev VG, Weber J, Kneschke E-M, Denev PN, Bley T, Pavlov AI. Antioxidant Activity and Phenolic Content of Betalain Extracts from Intact Plants and Hairy Root Cultures of the Red Beetroot *Beta vulgaris* cv. Detroit Dark Red. *Plant Foods for Human Nutrition* 2010;65:105-111.
236. Horst MA, Moreno FS. *Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes: Carotenoides*. São Paulo, Brasil: International Life Sciences Institute, 2009. p. 32.
237. Shami NJIE, Moreira EAM. Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrição* 2004;17:227-236.
238. Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1989;274:532-538.
239. Liu RH. Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *The Journal of Nutrition* 2004;134:3479S-3485S.
240. Liu RH. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2003;78:517S-520S.
241. Vizzotto M, Raseira MdCB, Pereira MC, Fetter MdR. Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante em diferentes genótipos de amoreira-preta (*Rubus* sp.). *Revista Brasileira de Fruticultura* 2012;34:853-858.
242. Ismail A, Marjan ZM, Foong CW. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chem* 2004;87:581-586.
243. Hassimotto NMA, Genovese MI, Lajolo FM. Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulps. *J Agric Food Chem* 2005;53:2928-2935.
244. Babbar N, Oberoi HS, Uppal DS, Patil RT. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Research International* 2011;44:391-396.
245. Sobhi HR, Esrafil A. A Double Extraction Method for Determination of Diphenylamine in Fruits by GC/MS. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology* 2016;6:1-5.
246. Porto-Figueira P, Camacho I, Câmara JS. Exploring the potentialities of an improved ultrasound-assisted quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe-based extraction technique combined with ultrahigh pressure liquid chromatography-fluorescence detection for determination of Zearalenone in cereals. *Journal of Chromatography A* 2015;1408:187-196.
247. You X, Jiang W, Liu F, Liu C. QuEChERS in Combination with Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on Solidification of Floating

Organic Droplet Method for the Simultaneous Analysis of Six Fungicides in Grape. *Food Anal Methods* 2013;6:1515-1521.

248. Safdar MN, Kausar T, Jabbar S, Mumtaz A, Ahad K, Saddozai AA. Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *J Food Drug Anal.*

249. Zhou T, Xu D-P, Lin S-J, Li Y, Zheng J, Zhou Y, et al. Ultrasound-Assisted Extraction and Identification of Natural Antioxidants from the Fruit of *Melastoma sanguineum* Sims. *Molecules* 2017;22:306.

250. Xu D-P, Zhou Y, Zheng J, Li S, Li A-N, Li H-B. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Antioxidants from the Flower of *Jatropha integerrima* by Response Surface Methodology. *Molecules* 2016;21:18.

251. Dai J, Mumper RJ. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* 2010;15:7313-7352.

252. Alothman M, Bhat R, Karim AA. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chem* 2009;115:785-788.

253. Boeing JS, Barizao EO, BC ES, Montanher PF, de Cinque Almeida V, Visentainer JV. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chem Cent J* 2014;8:48.

254. Tsao R, McCallum J. Chemistry of Flavonoids. In: de la Rosa LA, Alvarez-Parrilla E, Gonzalez-Aguilar GA, editors. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability*. Iowa, USA: John Wiley & Sons, 2010. p. 131-154.

255. Marston A, Hostettmann K. Separation and quantification of flavonoids. In: Andersen ØM, Markham KR, editors. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*. Boca Raton, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2006. p. 1-36.

256. Ghasemzadeh A, Jaafar HZE, Rahmat A. Effects of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in two varieties of young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* 2011;5:1147-1154.

257. Fernández AEL, Obledo-Vázquez EN, Vivar-Vera MDLA, Ayerdi SGS, Montalvo-González E. Evaluation Of Emerging Methods On The Polyphenol Content, Antioxidant Capacity And Qualitative Presence Of Acetogenins In Soursop Pulp (*Annona muricata* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura* 2017;39.

258. Macheix JJ, Fleuriet A. *Fruit Phenolics*: Taylor & Francis, 1990.

259. Amarante OP, Caldas EP, Brito NM, Santos TC, Vale ML. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. *Cad. Pesq.* 2001;12:116-131.

260. Brito NM, Junior OPdA, Polese L, Ribeiro ML. Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente* 2003;13:129-146.

261. Francisco AM. Estudo da Lamotrigina em doentes epilépticos submetidos a monitorização video-electroencefalografia: Dissertação apresentada na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Doutor; 2008.

262. Silveira ALC. Validação de métodos para a determinação de compostos fenólicos em melancia: Dissertação apresentada na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para obtenção do grau de Mestre; 2013.
263. Novak I, Janeiro P, Seruga M, Oliveira-Brett AM. Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal Chim Acta* 2008;630:107-115.
264. Tuszyńska M. Validation of the Analytical Method for the Determination of Flavonoids in Broccoli. *Journal of Horticultural Research* 2014;22:131-140.
265. Brito NM, Junior OPdA, Polese L, dos Santos TCR, Ribeiro ML. Avaliação da Exatidão e da Precisão de Métodos de Análise de Resíduos de Pesticidas Mediante Ensaio de Recuperação. *Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente* 2002;12:155-168.
266. Huber L. Validation and Qualification in Analytical Laboratories. 2nd ed. New York, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2007. p. 288.
267. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *Journal of Analytical Toxicology* 2013;37:452-474.
268. Kocourek V. Method validation and quality control procedures. Department of Food Chemistry and Analysis, Institute of Chemical Technology of Prague; 2012.
269. Dadgar D, Burnett PE. Issues in evaluation of bioanalytical method selectivity and drug stability. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1995;14:23-31.
270. Alasalvar C, Grigor JM, Zhang D, Quantick PC, Shahidi F. Comparison of Volatiles, Phenolics, Sugars, Antioxidant Vitamins, and Sensory Quality of Different Colored Carrot Varieties. *J Agric Food Chem* 2001;49:1410-1416.
271. Yilmaz Y. Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Science & Technology* 2006;17:64-71.
272. Akomolafe SF, Oboh G. Characterization of polyphenolic constituents and radical scavenging ability of ripe tomato and red pepper fruits. *Journal of Experimental and Integrative Medicine* 2015;5:61-67.
273. Juurlink BH, Azouz HJ, Aldalati AM, AlTinawi BM, Ganguly P. Hydroxybenzoic acid isomers and the cardiovascular system. *Nutrition Journal* 2014;13:63.
274. Slimestad R, Fossen T, Vågen IM. Onions: A Source of Unique Dietary Flavonoids. *J Agric Food Chem* 2007;55:10067-10080.
275. Rodríguez Galdón B, Rodríguez Rodríguez EM, Díaz Romero C. Flavonoids in Onion Cultivars (*Allium cepa* L.). *J Food Sci* 2008;73:C599-C605.
276. Griffiths G, Trueman L, Crowther T, Thomas B, Smith B. Onions—A global benefit to health. *Phytotherapy Research* 2002;16:603-615.
277. Laul MS, Bhalenao SD, Muhmoley GV, Shah GR, Palal VS. Curing and storage of Nasik red onions (*Allium cepa* L.). *Indian Food Packer* 1984;38:30-39.
278. Bajaj KL, Kaur G, Chadha ML. Varietal variations in some important chemical constituents of onion (*Allium cepa* L.). *Tropical Science* 1990;30:391-395.

279. Shankar GM, Antony J, Anto RJ. Quercetin and Tryptanthrin: Two Broad Spectrum Anticancer Agents for Future Chemotherapeutic Interventions. In: Bathaie SZ, Tamanoi F, editors. *The Enzymes*: Elsevier Science, 2015. p. 43-72.
280. Patil BS, Pike LM, Yoo KS. Variation in the Quercetin Content in Different Colored Onions (*Allium cepa* L.). *J. AMER. SOC. HORT. SCI.* 1995;120:909-913.
281. Marotti M, Piccaglia R. Characterization of Flavonoids in Different Cultivars of Onion (*Allium cepa* L.). *J Food Sci* 2002;67:1229-1232.
282. Lee EJ, Patil BS, Yoo KS. Antioxidants of 15 onions with white, yellow, and red colors and their relationship with pungency, anthocyanin, and quercetin. *LWT - Food Science and Technology* 2015;63:108-114.
283. Tiwari BK, Brunton NP, Brennan C. *Handbook of Plant Food Phytochemicals: Sources, Stability and Extraction*: Wiley, 2013.
284. Pérez-Gregorio RM, García-Falcón MS, Simal-Gándara J, Rodrigues AS, Almeida DPF. Identification and quantification of flavonoids in traditional cultivars of red and white onions at harvest. *J Food Compost Anal* 2010;23:592-598.
285. Lombard KA, Geoffriau E, Peffley E. Flavonoid Quantification in Onion by Spectrophotometric and High Performance Liquid Chromatography Analysis. *HortScience* 2002;37:682-685.
286. Ko EY, Nile SH, Sharma K, Li GH, Park SW. Effect of different exposed lights on quercetin and quercetin glucoside content in onion (*Allium cepa* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences* 2015;22:398-403.
287. Higashio H, Hirokane H, Sato F, Tokuda S, Uragami A, editors. *Effect of UV Irradiation After the Harvest on the Content of Flavonoid in Vegetables 2005*: International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium.
288. Rocha SM. Porque se estudam os compostos voláteis dos alimentos de origem vegetal? *Química* 2009;112:49-55.
289. Silva TMG. Avaliação dos efeitos da actividade enzimática e das condições ambientais no escurecimento em preparados de morango e estratégias para a sua minimização 2015.
290. Bayan L, Koulivand PH, Gorji A. Garlic: a review of potential therapeutic effects. *Avicenna Journal of Phytomedicine* 2014;4:1-14.
291. Wang LY, Unehara T, Kitanaka S. Anti-inflammatory activity of new guaiane type sesquiterpene from *Wikstroemia indica*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2005;53:137-139.
292. de Cassia da Silveira e Sa R, Andrade LN, de Sousa DP. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules* 2013;18:1227-1254.
293. Xu Z, Chang FR, Wang HK, Kashiwada Y, McPhail AT, Bastow KF, et al. Anti-HIV agents 45(1) and antitumor agents 205.(2) two new sesquiterpenes, leitneridanins A and B, and the cytotoxic and anti-HIV principles from *Leitneria floridana*. *J Nat Prod* 2000;63:1712-1715.
294. Tamemoto K, Takaishi Y, Chen B, Kawazoe K, Shibata H, Higuti T, et al. Sesquiterpenoids from the fruits of *Ferula kuhistanica* and antibacterial activity of the constituents of *F. kuhistanica*. *Phytochemistry* 2001;58:763-767.

295. Gould MN. Cancer chemoprevention and therapy by monoterpenes. *Environmental Health Perspectives* 1997;105:977-979.
296. Bayala B, Bassole IHN, Scifo R, Gnoula C, Morel L, Lobaccaro J-MA, et al. Anticancer activity of essential oils and their chemical components - a review. *American Journal of Cancer Research* 2014;4:591-607.
297. Schäfer G, Kaschula CH. The Immunomodulation and Anti-Inflammatory Effects of Garlic Organosulfur Compounds in Cancer Chemoprevention. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 2014;14:233-240.
298. Perestrelo R, Silva CL, Pereira J, Câmara JS. Healthy effects of bioactive metabolites from *Vitis vinifera* L. Grapes: A review. In: Câmara JS, editor. *Grapes: Production, Phenolic Composition and Potential Biomedical Effects*: Nova Science Publishers, 2014. p.
299. Suhail MM, Wu W, Cao A, Mondalek FG, Fung K-M, Shih P-T, et al. *Boswellia sacra* essential oil induces tumor cell-specific apoptosis and suppresses tumor aggressiveness in cultured human breast cancer cells. *BMC complementary and alternative medicine* 2011;11:129.
300. Mander L, Liu H-w. *Comprehensive natural products ii: chemistry and biology*: Access Online via Elsevier, 2010.
301. Razavi SM, Nejad-Ebrahimi S. Chemical composition, allelopathic and cytotoxic effects of essential oils of flowering tops and leaves of *Crambe orientalis* L. from Iran. *Natural product research* 2009;23:1492-1498.
302. Singh BK, Tripathi M, Chaudhari BP, Pandey PK, Kakkar P. Natural terpenes prevent mitochondrial dysfunction, oxidative stress and release of apoptotic proteins during nimesulide-hepatotoxicity in rats. *PLoS ONE* 2012;7:e34200.
303. Rathore S, Saxena S, Singh B. Potential health benefits of major seed spices. *International J. Seed Spices* 2013;3:1-12.
304. Ruberto G, Baratta MT. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem* 2000;69:167-174.
305. Yin Q-h, Yan F-x, Zu X-Y, Wu Y-h, Wu X-p, Liao M-c, et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology* 2012;64:43-51.
306. Hussain AI, Anwar F, Nigam PS, Ashraf M, Gilani AH. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2010;90:1827-1836.
307. Preethy CP, Padmapriya R, Periasamy VS, Riyasdeen A, Srinag S, Krishnamurthy H, et al. Antiproliferative property of *n*-hexane and chloroform extracts of *Anisomeles malabarica* (L). R. Br. in HPV16-positive human cervical cancer cells. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics* 2012;3:26.
308. Miller JA, Lang JE, Ley M, Nagle R, Hsu C-H, Thompson PA, et al. Human breast tissue disposition and bioactivity of limonene in women with early-stage breast cancer. *Cancer Prevention Research* 2013;6:577-584.
309. Mohamad RH, El-Bastawesy AM, Abdel-Monem MG, Noor AM, Al-Mehdar HAR, Sharawy SM, et al. Antioxidant and anticarcinogenic effects of methanolic extract

and volatile oil of fennel seeds (*Foeniculum vulgare*). Journal of medicinal food 2011;14:986-1001.

310. Waliwitiya R, Kennedy CJ, Lowenberger CA. Larvicidal and oviposition-altering activity of monoterpenoids, trans-anethole and rosemary oil to the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Pest management science 2009;65:241-248.

311. Cardozo MT, de Conti A, Ong TP, Scolastici C, Purgatto E, Horst MA, et al. Chemopreventive effects of β -ionone and geraniol during rat hepatocarcinogenesis promotion: distinct actions on cell proliferation, apoptosis, HMGCoA reductase, and RhoA. The Journal of Nutritional Biochemistry 2011;22:130-135.

312. Rigano D, Cardile V, Formisano C, Maldini MT, Piacente S, Bevilacqua J, et al. *Genista sessilifolia* DC. and *Genista tinctoria* L. inhibit UV light and nitric oxide-induced DNA damage and human melanoma cell growth. Chemico-biological interactions 2009;180:211-219.

313. Kim S-H, Lee I-C, Baek H-S, Moon C, Kim S-H, Kim J-C. Protective effect of diallyl disulfide on cyclophosphamide-induced testicular toxicity in rats. Laboratory Animal Research 2013;29:204-211.

314. Wang HC, Pao J, Lin SY, Sheen LY. Molecular mechanisms of garlic-derived allyl sulfides in the inhibition of skin cancer progression. Ann N Y Acad Sci 2012;1271:44-52.

315. Borkowska A, Knap N, Antosiewicz J. Diallyl trisulfide is more cytotoxic to prostate cancer cells PC-3 than to noncancerous epithelial cell line PNT1A: a possible role of p66Shc signaling axis. Nutr Cancer 2013;65:711-717.

316. Wargovich MJ, Woods C, Eng VW, Stephens LC, Gray K. Chemoprevention of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal cancer in rats by the naturally occurring thioether, diallyl sulfide. Cancer Res 1988;48:6872-6875.

317. Rao PSS, Midde NM, Miller DD, Chauhan S, Kumar A, Kumar S. Diallyl Sulfide: Potential Use in Novel Therapeutic Interventions in Alcohol, Drugs, and Disease Mediated Cellular Toxicity by Targeting Cytochrome P450 2E1. Current drug metabolism 2015;16:486-503.

318. Lu G, Fellman JK, Edwards CG, Mattinson DS, Navazio J. Quantitative determination of geosmin in red beets (*Beta vulgaris* L.) using headspace solid-phase microextraction. J Agric Food Chem 2003;51:1021-1025.

319. Arscott SA, Tanumihardjo SA. Carrots of Many Colors Provide Basic Nutrition and Bioavailable Phytochemicals Acting as a Functional Food. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2010;9:223-239.

320. Güler Z, Karaca F, Yetisir H, Yildiz F. Identification of volatile organic compounds (VOCs) in different colour carrot (*Daucus carota* L.) cultivars using static headspace/gas chromatography/mass spectrometry. Cogent Food & Agriculture 2015;1:1117275.

321. Colina-Coca C, González-Peña D, Vega E, de Ancos B, Sánchez-Moreno C. Novel approach for the determination of volatile compounds in processed onion by headspace gas chromatography–mass spectrometry (HS GC–MS). Talanta 2013;103:137-144.

322. Islam MS, Choi H, Loots DT. Effects of Dietary Onion (*Allium cepa* L.) in a High-Fat Diet Streptozotocin-Induced Diabetes Rodent Model. *Annals of Nutrition and Metabolism* 2008;53:6-12.
323. Choi SM, Lee D-J, Kim J-Y, Lim S-T. Volatile composition and sensory characteristics of onion powders prepared by convective drying. *Food Chem* 2017;231:386-392.
324. Miron T, Shin I, Feigenblat G, Weiner L, Mirelman D, Wilchek M, et al. A spectrophotometric assay for allicin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfinates. *Anal Biochem* 2002;307:76-83.
325. Silva EYYd, Moretti CL, Mattos LM. Compostos funcionais presentes em bulbilhos de alhos armazenados sob refrigeração, provenientes de cultivos no Brasil e na China. *Ciência Rural* 2010;40:2580-2587.
326. Seki T, Hosono T, Hosono-Fukao T, Inada K, Tanaka R, Ogihara J, et al. Anticancer effects of diallyl trisulfide derived from garlic. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008;17 Suppl 1:249-252.
327. Berger RG. *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*: Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 648.
328. Conaway CC, Getahun SM, Liebes LL, Pusateri DJ, Topham DK, Botero-Omary M, et al. Disposition of glucosinolates and sulforaphane in humans after ingestion of steamed and fresh broccoli. *Nutr Cancer* 2000;38:168-178.
329. Freitas E, Aires A, Rosa EAdS, Saavedra MJ. Antibacterial activity and synergistic effect between watercress extracts, 2-phenylethyl isothiocyanate and antibiotics against 11 isolates of *Escherichia coli* from clinical and animal source. *Letters in Applied Microbiology* 2013;57:266-273.
330. Rybarczyk-Plonska A, Hagen SF, Borge GIA, Bengtsson GB, Hansen MK, Wold A-B. Glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) as affected by postharvest temperature and radiation treatments. *Postharvest Biology and Technology* 2016;116:16-25.
331. Jeffery EH, Brown AF, Kurilich AC, Keck AS, Matusheski N, Klein BP, et al. Variation in content of bioactive components in broccoli. *J Food Compos Anal* 2003;16:323-330.
332. Scala A, Allmann S, Mirabella R, Haring MA, Schuurink RC. Green Leaf Volatiles: A Plant's Multifunctional Weapon against Herbivores and Pathogens. *Int J Mol Sci* 2013;14:17781-17811.
333. Kebede BT, Grauwet T, Tabilo-Munizaga G, Palmers S, Vervoort L, Hendrickx M, et al. Headspace components that discriminate between thermal and high pressure high temperature treated green vegetables: Identification and linkage to possible process-induced chemical changes. *Food Chem* 2013;141:1603-1613.
334. Deng W, Hamilton-Kemp TR, Nielsen MT, Andersen RA, Collins GB, Hildebrand DF. Effects of six-carbon aldehydes and alcohols on bacterial proliferation. *J Agric Food Chem* 1993;41:506-510.
335. Tandon KS, Baldwin EA, Shewfelt RL. Aroma perception of individual volatile compounds in fresh tomatoes (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) as affected by the medium of evaluation. *Postharvest Biology and Technology* 2000;20:261-268.

ANEXOS

ANEXO 1. Materiais e métodos

Tabela 17A. Lista de padrões analíticos.

Padrão	Grau de Pureza (%)	Marca
3,5-Dimetoxi-4-hidroxibenzaldeído	98,0 %	Acros Organics (Bélgica)
Ácido Gálico	98,0 %	Fluka (Alemanha)
Ácido 2,5-Dihidroxibenzoico	≥ 98,0 %	Fluka (Alemanha)
Ácido <i>m</i> -cumárico	≥ 98,0 %	Fluka (Alemanha)
Ácido <i>o</i> -cumárico	≥ 97,0 %	Fluka (Alemanha)
Ácido Cinâmico	≥ 99,0 %	Fluka (Alemanha)
Ácido Ferúlico	≥ 99,0 %	Fluka (Alemanha)
Apigenina	≥ 99,0 %	Fluka (Alemanha)
Ácido 3,4-Dihidroxibenzoico	≥ 99,0 %	Sigma – Aldrich (Alemanha)
(+) - Catequina	≥ 99,0 %	Sigma – Aldrich (Alemanha)
Kaempferol	≥ 97,0 %	Sigma – Aldrich (Alemanha)
Quercetina Dihidratada	99,0 %	Riedel-de Haën (Dinamarca)
Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox)	≥ 98,0 %	Sigma – Aldrich (Alemanha)

Tabela 18A. Lista de reagentes e solventes.

Reagentes e Solventes	Grau de Pureza (%)	Marca
2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) sal diamónio (ABTS)	≥ 99,0 %	Riedel-de Haën (Dinamarca)
2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	≥ 85,0 %	Sigma – Aldrich (Alemanha)
2,4,6-Tri-(2-piridil)-s-triazina (TPTZ)	≥ 99,0 %	Sigma – Aldrich (Alemanha)
Ácido 2-Tiobarbitúrico	≥ 99,0 %	Sigma – Aldrich (Alemanha)
Ácido Tricloroacético	≥ 99,0 %	Sigma – Aldrich (Alemanha)
Cloreto de Ferro (III)	98,0 %	Sigma – Aldrich (Alemanha)
Cloreto de Sódio	≥ 99,5 %	Sigma – Aldrich (Alemanha)
Cloreto de Alumínio	98,0 %	Riedel-de Haën (Dinamarca)
Citrato Trissódico Dihidratado	≥ 99,0 %	Sigma – Aldrich (Alemanha)
Citrato de Sódio Dibásico Sesquihidratado	≥ 99,0 %	Sigma – Aldrich (Alemanha)

Sulfato de Magnésio	≥ 99,5 %	Sigma – Aldrich (Alemanha)
Carbonato de Sódio Anidro	99,8 %	Panreac Quimica S.A (Espanha)
Acetato de Sódio Trihidratado	99,0 %	Panreac Quimica S.A (Espanha)
Hidróxido de Sódio	98,0 %	Panreac Quimica S.A (Espanha)
Di-hidrogénio Fosfato de Potássio	99,0 %	Panreac Quimica S.A (Espanha)
Fosfato de Sódio Dibásico Dodecahidratado	≥ 99,0 %	Riedel-de Haën (Dinamarca)
Peroxodissulfato de Potássio	≥ 99,0 %	Fluka (Alemanha)
Nitrato de Sódio Extra Puro	≥ 99,0 %	Merck (Alemanha)
Ácido Acético Glacial	≥ 99,0 %	Merck (Alemanha)
Ácido Fórmico	99,0 %	Panreac Quimica S.A (Espanha)
Metanol	99,0 %	Fisher Scientific (Reino Unido)
Acetonitrilo	99,0 %	Fisher Scientific (Reino Unido)
Acetato de Etilo	99,0 %	Fisher Scientific (Reino Unido)

Tabela 19A. Lista de equipamentos.

Equipamento	Marca
Balança Analítica	Ohaus Pioneer PA114
Agitador Vortéx	Thermolyne MaxiMixPlus
Triturador	Varinha BRAUN MQ100
Sistema de purificação de água	Milli-Q® (Millipore, Bedford, EUA) Sistema de purificação Direct 8 Millipore.
Banho de Ultrassons	Branson 2510
Medidor de pH	Metrohm 691
Espectrofotómetro UV-vis	Perkin Elmer lambda 25
Centrifugadora Refrigerada	Sigma 3K30 Bioblock Scientific
Placa de aquecimento com agitação	Ika RCT standard safety control
Equipamento de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC)	Waters Acquity UPLC H-Class (Mildford, MA, EUA)
Detetor de fotodiodos (PDA)	Waters modelo 2996 (Mildford, MA, EUA)
Cromatógrafo de fase gasosa com detetor de espectrometria de massas (GC-MS)	Agilent Technologies 6890N (GC), Agilent Technologies 5973N (MS)

ANEXO 2. Capacidade antioxidante

A2.1. DPPH

Para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método DPPH foi construída uma curva de calibração com trolox num intervalo de concentrações de 10 até 1200 μM (Figura 37A). Os resultados da capacidade antioxidante foram expressos em μM equivalentes de trolox por grama de massa fresca ($\mu\text{M TE/g}$ vegetal).

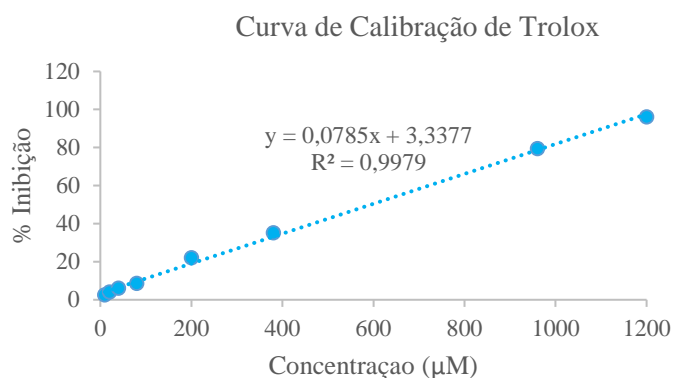


Figura 37A. Curva de calibração utilizada para determinar a capacidade de neutralização de radicais livres (DPPH) dos extratos vegetais.

Outra forma de expressar os resultados do DPPH foi através do cálculo do EC_{50} . Para tal, o valor de EC_{50} foi obtido por interpolação gráfica da % de inibição do DPPH em função da concentração do extrato vegetal e os resultados encontram-se descritos na Tabela 21.

Tabela 20A. Resultados do EC_{50} .

Amostras	Equação	r^2	EC_{50} (mg/L)
Beterraba	$y=33,503 \ln(x) - 141,86$	0,9839	$214,82 \pm 5,6$
Cebola roxa	$y=28,303 \ln(x) - 110,35$	0,9997	$292,32 \pm 5,09$
Cebola amarela	$y=0,9199 \ln(x)-1,3903$	0,9883	$5543,66 \pm 1124$
Alho	$y=12,496 \ln(x) - 52,117$	0,9879	$3052,46 \pm 689,93$
Cenoura laranja	$y=1,21 \ln(x) - 3,2957$	0,9996	–
Cenoura branca	$y=11,498 \ln(x) - 47,338$	0,9978	–
Agrião	$y=24,563 \ln(x) - 96,174$	0,9419	$369,98 \pm 19,91$
Espinafre	$y=24,933 \ln(x) - 100,21$	0,9924	$403,56 \pm 13,98$
Brócolos	$y=6,0724 \ln(x)-22,213$	0,9909	$109705,70 \pm 51460$
Tomate inglês	$y=37,983 \ln(x)-142,51$	0,9908	$157,62 \pm 1,81$
Tomate	$y=24,126 \ln(x)-10,44$	0,9643	$13,27 \pm 1,45$

A2.2. ABTS

Para a avaliação da capacidade antioxidante dos extratos metanólicos das frutas e dos vegetais pelo método ABTS, foi efetuada construída uma curva de calibração com trolox nas concentrações 10, 20, 50, 100, 200 e 400 μM (Figura 38A). Os resultados deste estudo foram expressos em μM equivalentes de trolox por grama de massa fresca ($\mu\text{M TE/g}$ vegetal).

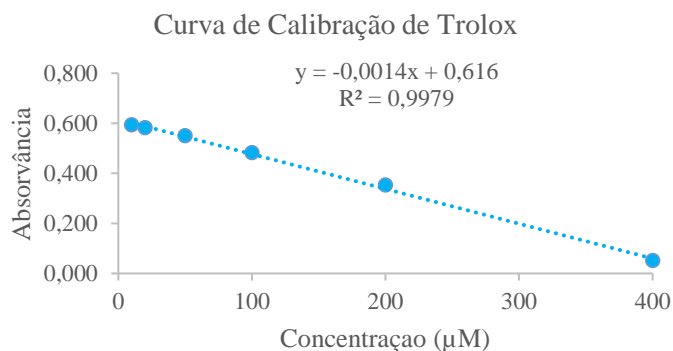


Figura 38A. Curva de calibração utilizada para determinar a capacidade de neutralização de radicais livres ($\text{ABTS}^{+\cdot}$) dos extratos vegetais.

A2.3. FRAP

Para o estudo da capacidade antioxidante dos extratos vegetais a leitura das absorvâncias foi registrada a 593 nm e os resultados foram determinados por meio da equação da reta obtida através da construção de uma curva de calibração com trolox num intervalo de concentrações de 10 até 400 μM (Figura 39A). Os resultados deste estudo foram expressos em μM equivalentes de trolox por grama de massa fresca ($\mu\text{M TE/g}$ vegetal).

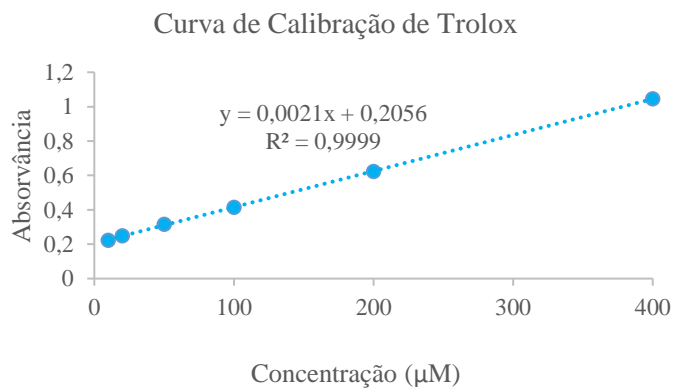
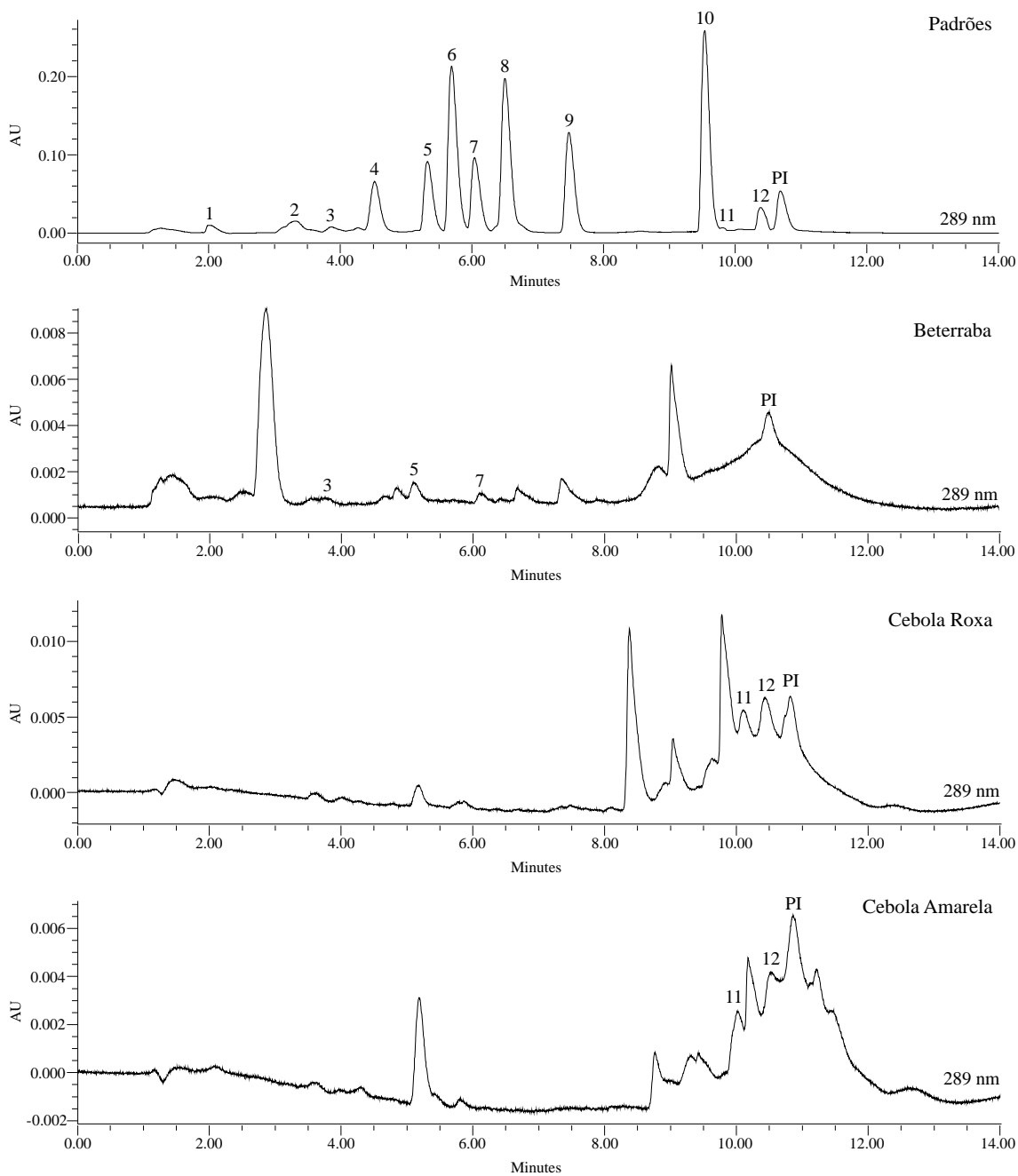


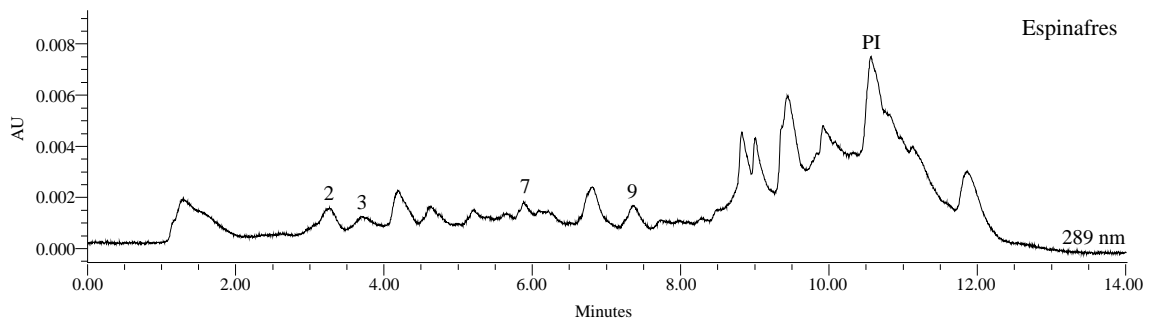
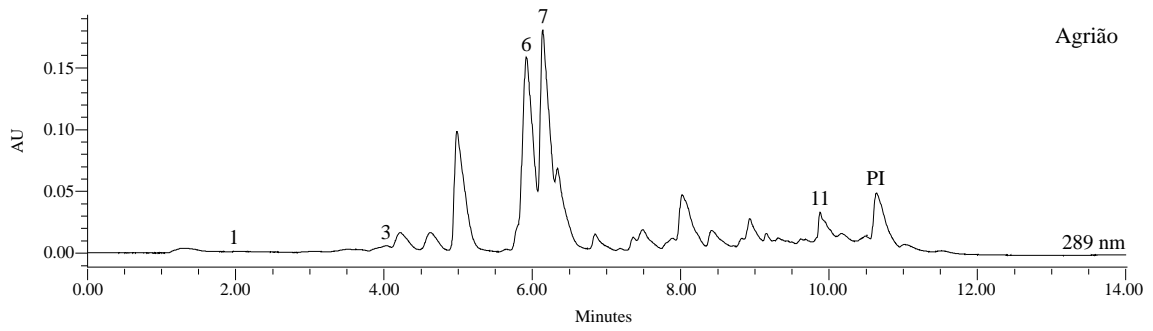
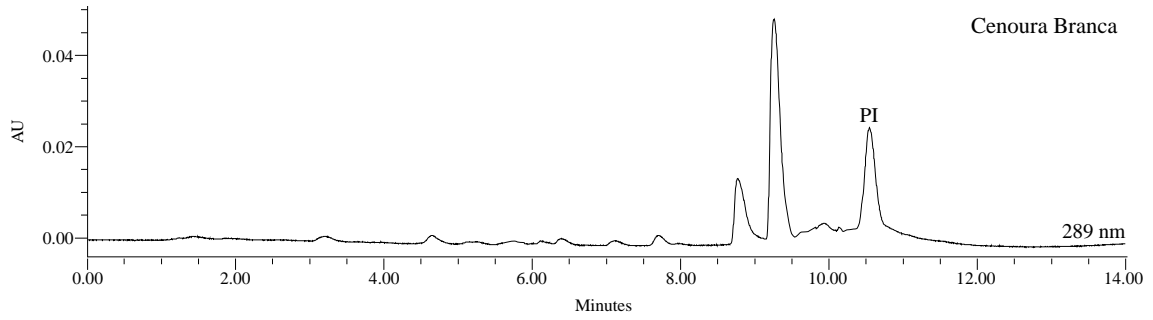
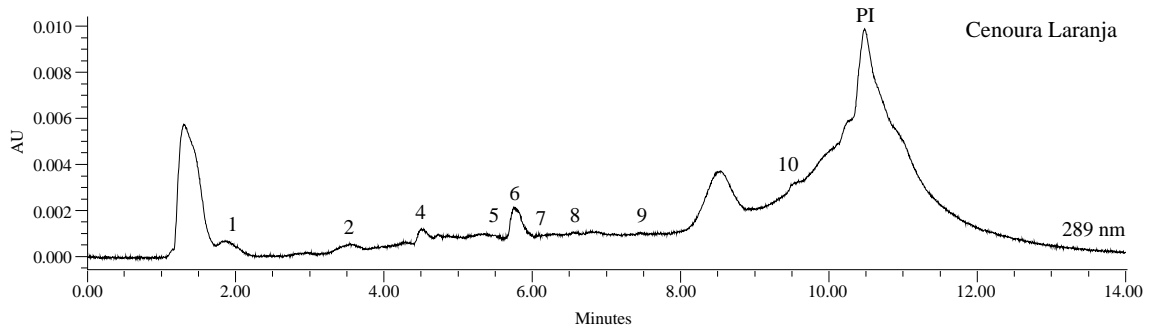
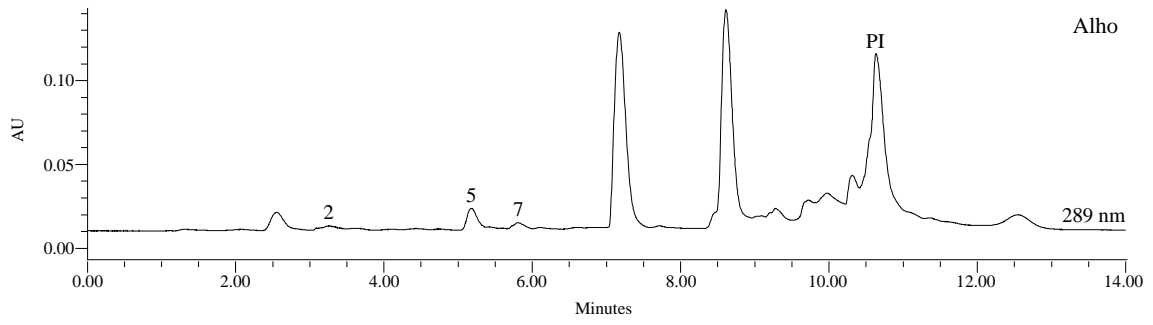
Figura 39A. Curva de calibração utilizada para determinar o poder antioxidante por redução do íon férrico (FRAP) dos extratos vegetais.

ANEXO 3. Análise Quantitativa de Compostos Fenólicos por QuEChERS/UHPLC-PDA

A3.1. Seletividade

No estudo da seletividade do método, as amostras de frutas e vegetais foram analisadas pelo método otimizado QuEChERS/UHPLC-PDA e comparadas com uma solução de padrões de concentração 10 µg/mL.





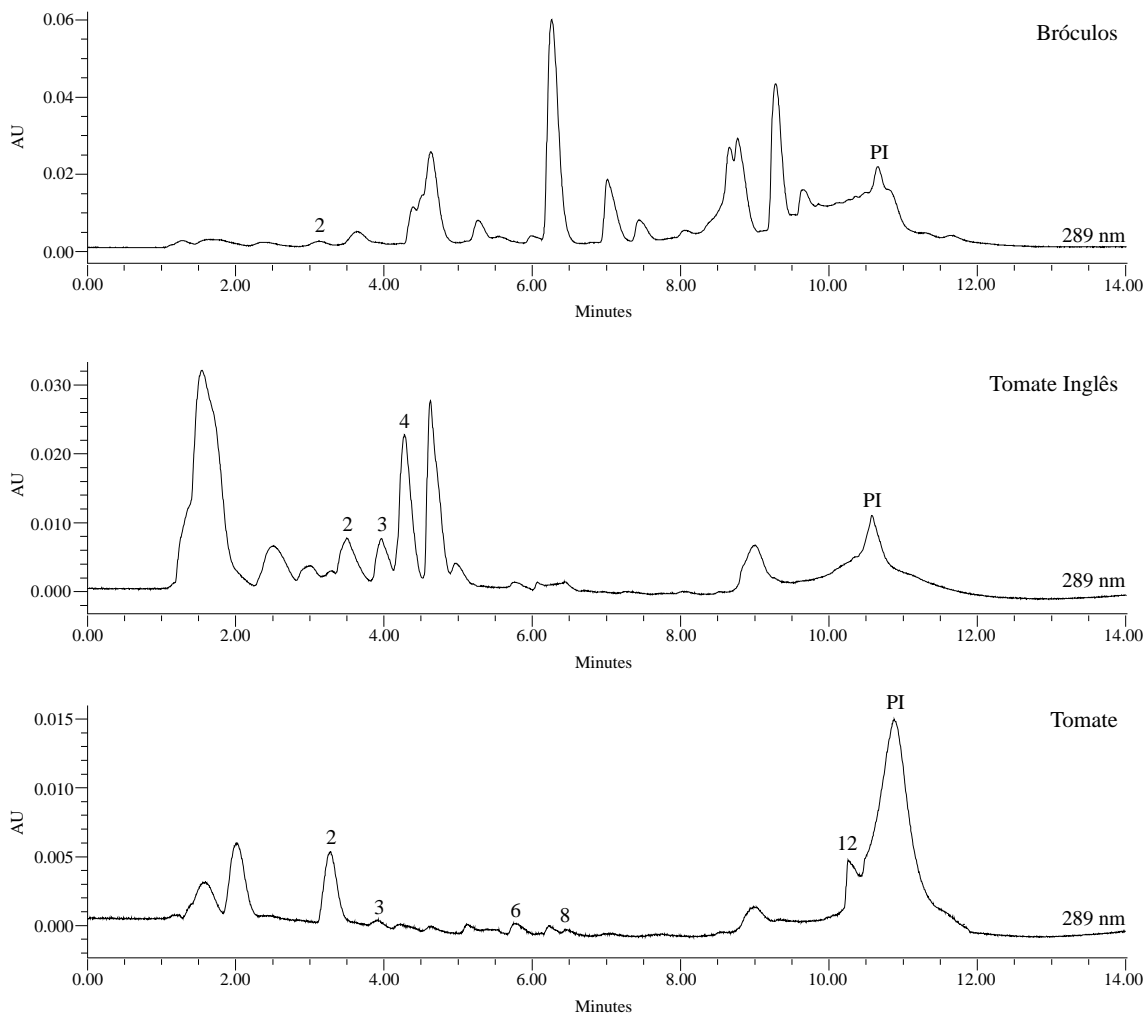
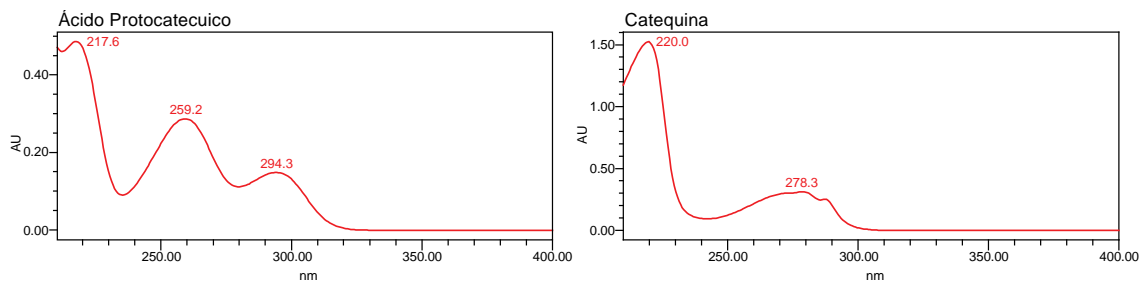


Figura 40A. Comparação dos perfis cromatográficos das amostras vegetais com a solução dos padrões analíticos (10 µg/mL). O comprimento de onda 289 nm corresponde ao máximo de absorção do padrão interno e permite uma visualização geral dos analitos estudados. (1 - ácido protocatecuico, 2 - catequina, 3 - ácido gentísico, 4 - ácido vanílico, 5 - seringaldeído, 6 - ácido p-cumárico, 7 - ácido ferúlico, 8 - ácido m-cumárico, 9 - ácido o-cumárico, 10 - ácido cinâmico, 11 - quercetina, 12 - kaempferol, PI - padrão interno).

Os espectros de absorção dos polifenóis analisados encontram-se na Figura 41A.



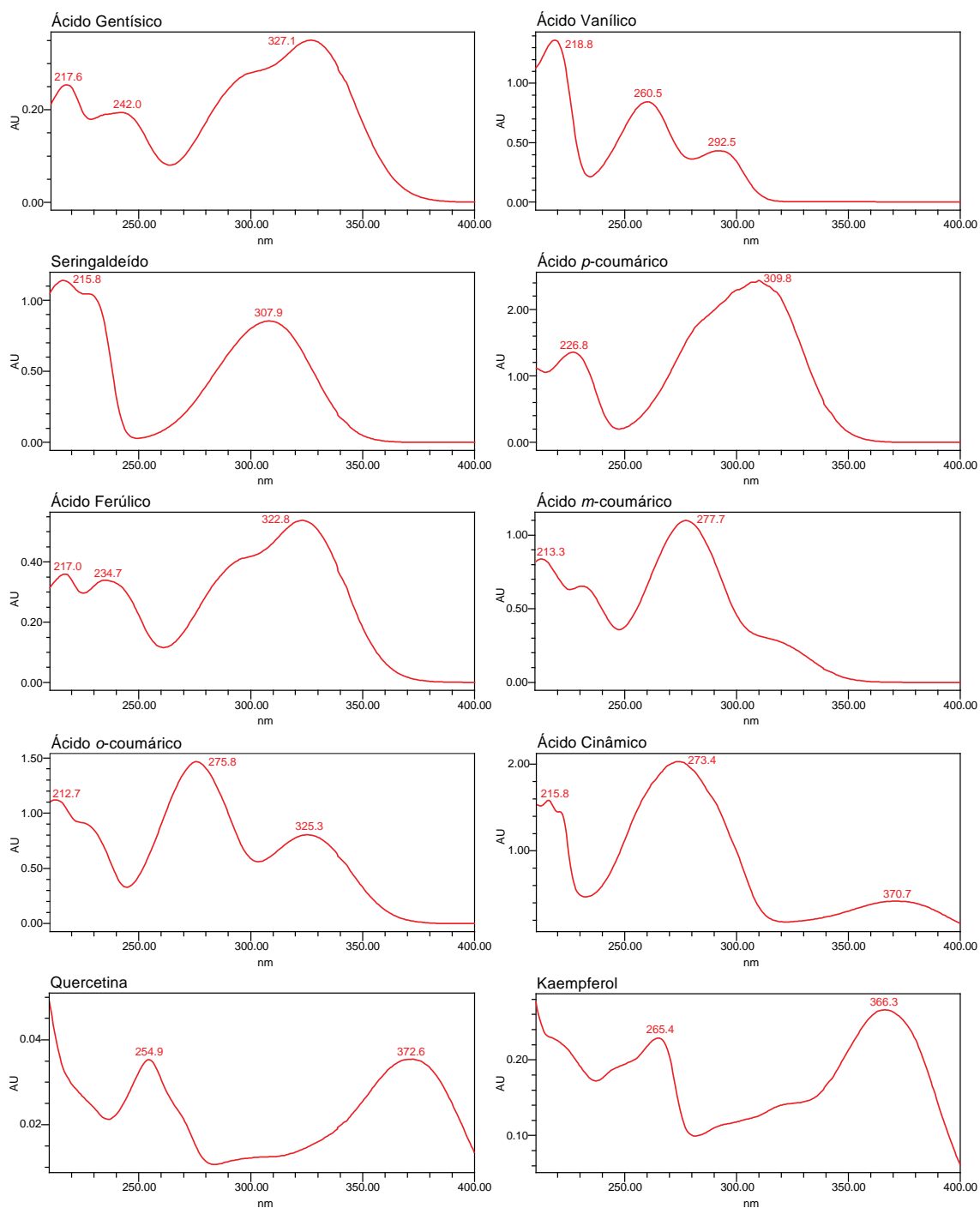


Figura 41A. Espectros de absorção dos padrões individuais dos polifenóis analisados por QuEChERS/UHPLC-PDA.

A3.2. Linearidade

A avaliação da linearidade neste trabalho foi efetuada através da construção de uma curva de calibração, para cada analito, com cinco pontos de calibração numa gama de concentrações que variaram entre 5 e 25 $\mu\text{g/mL}$. A Figura 42 ilustra as curvas de calibração obtidas para cada polifenol.

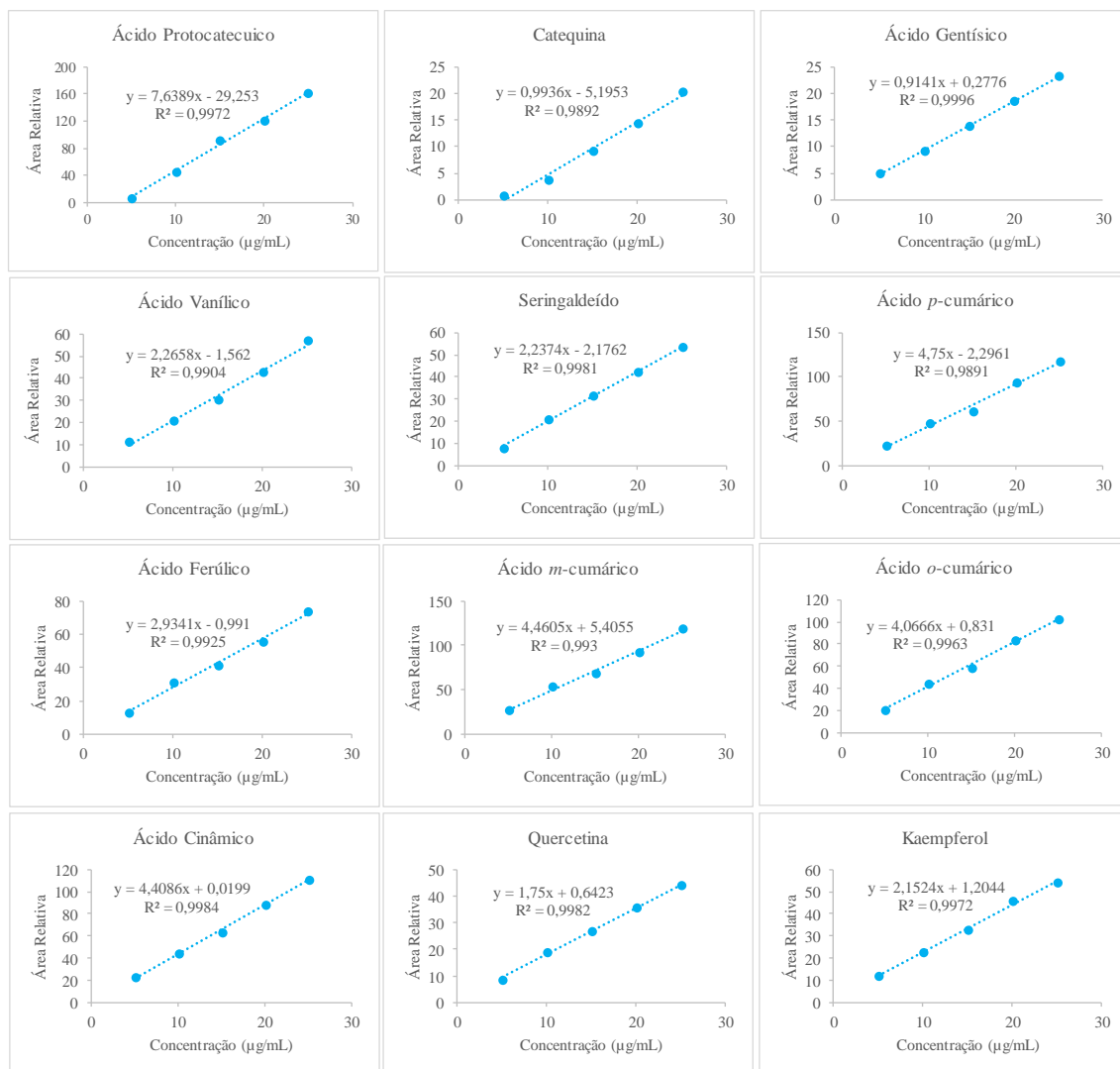


Figura 42A. Curvas de calibração obtidas para cada analito.

ANEXO 4. Resultados da composição volátil das frutas e dos vegetais.

Tabela 21A. Composição volátil identificada nas frutas e vegetais através da metodologia HS-SPME/GC-qMS.

Nº	Tr (min)	Índice Kovat	Compostos	Família Química	Fórmula Molecular	Área do Pico ($\times 10^6$)										
						Beterraba	Cebola Roxa	Cebola Amarela	Cenoura Laranja	Cenoura Branca	Alho	Brócolos	Agrião	Espinafre	Tomate	Tomate Inglês
1	4,628	1065	Acetaldeído	Aldeídos	C2H4O							8,1				
2	4,972	1073	Dimetilsulfeto	Compostos Organossulfurados	C2H6S								8,7			
3	5,033	1074	4-Metil-heptano	Hidrocarbonetos	C8H18							8,4				
4	5,359	1081	Propanal	Aldeídos	C3H6O		36,9					2,6				
5	5,583	1085	Acetona	Cetonas	C3H6O					44,4						
6	6,548	1105	Ácido aminometanosulfônico	Compostos Organossulfurados	CH5NO3S						157,5					
7	6,696	1110	2,4-Dimetil-1-heptano	Hidrocarbonetos	C9H18							32,8				
8	6,803	1113	Acetato de etilo	Ésteres	C4H8O2					4,8		3,0				14,0
9	6,944	1118	Allil Mercaptano	Compostos Organossulfurados	C3H6S						94,0					
10	7,416	1132	2-Metil-butanal	Aldeídos	C5H10O							3,6				
11	7,469	1133	3-Metil-butanal	Aldeídos	C5H10O	8,7						5,9		2,8	7,3	
12	7,971	1147	Etil aminometilformimidato	Compostos Azotados	C4H10N2O		14,7									
13	7,977	1147	Álcool etílico	Álcoois	C2H6O				10,4	54,3		55,8	7,9	7,5		86,5
14	8,008	1148	Etadiamida	Compostos Azotados	C2H4N2O2	11,3										
15	8,081	1150	Metil-tiirano	Compostos Organossulfurados	C3H6S			21,7			87,9					
16	8,611	1163	(Z)-3-Metil-1,3,5-hexatrieno	Hidrocarbonetos	C7H10											290,2
17	8,622	1164	2-Etil-furano	Compostos Furânicos	C6H8O							15,7			6,2	
18	9,827	1192	Metil éster do ácido butanóico	Ésteres	C5H10O2											235,2
19	9,100	1175	2-Propil-ciclopentano	Hidrocarbonetos	C8H14								2,7			
20	9,579	1186	3-Pentanona	Cetonas	C5H10O								16,0			
21	9,498	1184	Pentanal	Aldeídos	C5H10O					13,5		31,3			11,7	

51	18,963	1367	β -Mirceno	Compostos Terpénicos	C10H16	29,6			407,3				3,3			
52	19,097	1369	β -Tujeno	Compostos Terpénicos	C10H16				27,7	8,8					71,1	
53	19,612	1377	α -Terpineno	Compostos Terpénicos	C10H16	6,3			92,7	18,6				6,4	49,0	
54	19,610	1377	4-Metil-hexanal	Aldeídos	C7H14O							5,1				
55	19,661	1378	2-Metil-2-Pental	Aldeídos	C6H10O		728,2	631,3							2,9	
56	20,262	1387	Metil éster do ácido 3-metil-2-butanóico	Ésteres	C6H10O2										10,7	
57	20,285	1388	1-Penten-3-ol	Álcoois	C5H10O							21,8	20,1			
58	20,614	1392	2-Etil-tiofeno	Compostos Organossulfurados	C6H8S							1,2				
59	20,793	1395	D-Limoneno	Compostos Terpénicos	C10H16	73,6		7,1	456,7	333,9			27,1	4,8	7,4	112,8
60	21,019	1398	1,3,4-Tiadiazol-2-amina	Compostos Organossulfurados	C2H3N3S								9,7			
61	21,165	1401	2,4-Dimetil-tiofeno	Compostos Organossulfurados	C6H8S		12,4	40,0					13,2			
62	21,233	1402	Heptanal	Aldeídos	C7H14O					11,9		9,6				
63	21,328	1404	p-Xileno	Compostos Benzénicos	C8H10							3,3				
64	21,346	1404	Metil éster do ácido hexanóico	Ésteres	C7H14O2									62,9	1619,8	
65	21,594	1409	2-Heptanona	Cetonas	C7H14O							1,0				
66	21,473	1407	β -Felandreno	Compostos Terpénicos	C10H16	3,6			54,3	20,8						
67	22,642	1428	Dodecano	Hidrocarbonetos	C12H26							5,9				
68	22,999	1435	Eucaliptol	Compostos Terpénicos	C10H18O							4,2			256,8	
69	23,629	1446	4-Metil-2-heptanone	Cetonas	C8H16O							7,1				
70	23,803	1449	2-Pentil-furano	Compostos Furânicos	C9H14O			3,9				3,9			37,5	
71	23,961	1451	Biciclo[2.2.2]oct-5-en-2-one	Cetonas	C8H10O			1,3								
72	23,966	1451	Metil-propil dissulfeto	Compostos Organossulfurados	C4H10S2		2,1	11,4								
73	24,441	1459	(E)-2-Hexenal	Aldeídos	C6H10O								31,2			
74	24,223	1456	(E)-Ocimeno	Compostos Terpénicos	C10H16	4,6				9,5			40,7	48,1		
75	24,651	1463	γ -Terpineno	Compostos Terpénicos	C10H16	911,8	41,8	1,9	10408,8	3126,5					2,7	247,5
76	24,653	1463	2-Hexenal	Aldeídos	C6H10O							363,2		420,5	202,6	
77	24,683	1463	Etil éster do ácido hexanóico	Ésteres	C8H16O2			7,8		27,4		40,9			1455,8	
78	25,699	1480	(Z)-Ocimeno	Compostos Terpénicos	C10H16	9,5			218,1	88,8				192,9		
79	25,862	1482	2-Metil-1-butanol	Álcoois	C5H12O										6,3	

109	32,161	1586	4-Dietilamino-2-butanona	Compostos Azotados	C8H17NO	6,4											
110	32,364	1589	1-Octen-3-ona	Cetonas	C8H14O					5,8							11,4
111	33,086	1600	2,3-Dimetil-1,3-butadieno	Hidrocarbonetos	C6H10							1,0					
112	33,190	1601	2,3-Dimetil-oxirano	Éteres	C4H8O	2,5											
113	33,815	1613	(E)-2-Penten-1-ol	Álcoois	C5H10O					2,1	7,9						
114	33,879	1614	(Z)-2-Heptenal	Aldeídos	C7H12O		5,3		40,4	22,9							45,9
115	34,002	1617	1-Hidroxi-2-propanona	Cetonas	C3H6O2	48,6	115,4	17,0	32,3	226,9							14,9
116	34,013	1617	Acetato de (Z)-3-hexen-1-ol	Ésteres	C8H14O2						18,6	2,5	125,0			3,6	9,5
117	34,683	1629	(Z)-2-Penten-1-ol	Álcoois	C7H12O						25,2	54,3					
118	35,024	1635	2,3-Octanodiona	Cetonas	C5H10O						26,7						
119	35,103	1637	Acetato de (E)-2-hexen-1-ol	Ésteres	C8H14O2											126,9	
120	35,345	1641	2-Metilhexil éster do ácido propanóico	Ésteres	C10H20O2											24,3	
121	35,561	1645	6-Metil-5-hepteno-2-ona	Cetonas	C8H14O					19,7	10,1						2,1
122	35,956	1652	2,7-Dimetil-1-octeno	Hidrocarbonetos	C10H20												2,8
123	37,581	1680	Alil isotiocianato	Compostos Organossulfurados	C4H5NS							2,5					
124	37,624	1681	Dipropil-dissulfeto	Compostos Organossulfurados	C6H14S2			3174,0									
125	37,952	1686	Dimetil-trissulfeto	Compostos Organossulfurados	C2H6S3	303,8	633,5										
126	38,241	1691	1-Hexanol	Álcoois	C6H14O					9,4	589,8	11,3	340,2			37,5	57,3
127	38,825	1701	Allo-Ocimeno	Compostos Terpénicos	C10H16				4,8								
128	38,950	1703	(E)-3-Hexen-1-ol	Álcoois	C6H12O						161,9						83,4
129	39,882	1721	(Z)-3-Hexenil éster do ácido butanóico	Ésteres	C10H18O2							1,9	152,6				
130	39,756	1719	p-Menta-1,3,8-trieno	Compostos Terpénicos	C10H14	3,6			2,4	47,8							
131	39,885	1721	Metil éster do ácido octanóico	Ésteres	C9H18O2												48,0
132	39,939	1722	Propanoato de (Z)-3-hexen-1-ol	Ésteres	C9H16O2								25,6				191,5
133	40,016	1724	Nonanal	Aldeídos	C9H18O			15,8									7,9
134	40,155	1726	2-Nonanone	Cetonas	C9H18O					5,3							
135	40,539	1734	2,3,5,6-Tetrametil-fenol	Álcoois	C10H14O												10,5
136	41,007	1742	(Z)-3-Hexen-1-ol	Álcoois	C6H12O						2468,5	174,4	4,0				143,5
137	41,299	1748	Protanoato de (E)-2-hexen-1-ol	Ésteres	C9H16O2											44,7	

195	51,732	1942	1-Octanol	Álcoois	C8H18O				5,4	6,1	1,9	2,8	4,1		
196	52,331	1954	3,5-Octadieno-2-ona	Cetonas	C8H12O				28,3	51,2					
197	52,622	1959	5-Metilfurfural	Compostos Furânicos	C6H6O2	157,9	75,0				2,4	9,1	9,4	2,6	
198	52,754	1962	1,7,7-Trimetil-biciclo[2.2.1]hept-2-il éster do ácido acético	Ésteres	C12H20O2							24,3			
199	52,901	1965	1-Isotiocianato-hexano	Compostos Organossulfurados	C7H13NS						20,9				
200	52,955	1966	Metil éster Isotimol	Compostos Terpénicos	C11H16O							7,8			
201	53,164	1969	3,5,5-Trimetil-2-Ciclohexen-1-ona	Cetonas	C9H14O						25,9				
202	53,250	1971	2-Ciclopenteno-1,4-diona	Cetonas	C5H4O2	5,0	51,2		49,2				6,5		
203	53,337	1973	2,4-Hexadieno-1-ol	Álcoois	C6H10O						4,2				
204	53,534	1976	6,6-Dimetilhepta-2,4-dieno	Hidrocarbonetos	C9H16						14,1				
205	53,712	1980	1,5-Dietenil-3-metil-2-metileno- (1 α , 3 α , 5 α) ciclohexano	Hidrocarbonetos	C12H18							12367,6			
206	54,580	1995	(Z)-2-Octeno-1-ol	Álcoois	C8H16O								1,5		
207	54,597	1996	4,5,6,7-Tetrahidroindazole-3-espirociclohexano	Compostos Azotados	C12H18N2							9,3			
208	54,617	1996	β -ciclocitral	Compostos Terpénicos	C10H16O						11,4	19,2	6,7	4,8	8,5
209	54,698	1998	2,2-Dimethyl-3-octanol	Álcoois	C10H22O								9,3		
210	54,766	1999	Mirtenal	Compostos Terpénicos	C10H14O				43,8						
211	54,776	1999	2-(2-Propenil)-furano	Compostos Furânicos	C7H8O						3,6				
212	54,888	2101	2-(2-Etoxietoxi)-etanol	Éteres	C6H14O3	3,3	2,6	3,8	10,4		1,9		2,2		
213	54,941	2102	Etil éster do ácido 2-furancarboxílico	Compostos Furânicos	C7H8O3									3,4	
214	55,284	2110	Butirolactona	Cetonas	C4H6O2	8,8	6,7	11,4	67,0	3,2	3,0	3,4	9,9	27,2	
215	55,552	2115	2-Dodecenal	Aldeídos	C12H22O									3,7	
216	55,656	2118	(E)-2-Decenal	Aldeídos	C10H18O				9,3						
217	55,727	2119	1,7,7-Trimetil-2-vinilbiciclo [2.2.1]hept-2-eno	Compostos Terpénicos	C12H18	1,9									
218	55,819	2121	Ácido 2-propanóico	Ácidos Carboxílicos	C3H4O2	18,7									
219	55,967	2124	Benzenoacetaldeído	Aldeídos	C8H8O						21,4	12,9	9,3		
220	56,213	2129	Acetofenona	Cetonas	C8H8O					35,7					

277	63,495	2282	p-Cimen-8-ol	Compostos Terpénicos	C10H14O	5,2	13,6	1411,9					
278	63,709	2286	2-Metoxi-fenol	Álcoois	C7H8O2							7,4	2,1
279	63,790	2288	2,4-Ditiopentano	Compostos Organossulfurados	C3H8S2				76,2				
280	63,876	2290	2-(1,1-Dimetiletil)-1,4-dimetoxi-benzeno	Compostos Benzénicos	C12H18O2		11,4						
281	63,969	2292	Álcool benzílico	Álcoois	C7H8O				1,2				3,0
282	64,209	2296	4-Metil-5H-furano-2-one	Compostos Furânicos	C7H8O								1,1
283	64,316	2299	Linalil Isovalerate	Compostos Terpénicos	C15H26O2		55,9						
284	64,378	2300	2,4-Dimetil-quinolina	Compostos Azotados	C11H11N		48,1						
285	64,525	2303	2,4-Dimetil-cumeno	Compostos Terpénicos	C11H16		9,0						
286	64,535	2303	Feniletil alcóol	Álcoois	C8H10O				6,8	31,9	13,1		26,0
287	64,701	2306	2-Feniletil cianido	Compostos Azotados	C9H9N					151,9			
288	64,856	2309	Fenilacetoneitrilo	Compostos Azotados	C8H7N				4,8				
289	64,935	2311	β -Ionona	Compostos Terpénicos	C13H20O		7,2		14,4	58,7	7,6	5,8	4,8
290	65,363	2319	2,7-Dimetil-naftaleno	Derivados do Naftaleno	C12H12		2,8						
291	65,563	2323	2-Metoxi-5-metil-tiofeno	Compostos Organossulfurados	C6H8OS	13,3							
292	65,579	2323	Acetato de citronelil	Compostos Terpénicos	C12H22O2						3,6		
293	65,649	2325	3,5-Dihidroxitolueno	Compostos Benzénicos	C7H8O2		48,8						
294	65,649	2325	2,5-Furanodicarboxaldeído	Compostos Furânicos	C6H4O3	13,6	57,6	41,8					8,6
295	65,691	2326	1-Isotiocianato-3-(metiltio)-propano	Compostos Organossulfurados	C5H9NS2					9,4			
296	65,825	2328	Dihidro-4-hidroxi-2(3H)-furanona	Compostos Furânicos	C4H6O3	26,7							
297	65,917	2330	Fenol	Álcoois	C6H6O	2,3				3,6			
298	66,761	2346	Metil éster do ácido ciclopropanocarboxílico	Ésteres	C5H8O2				18,6				
299	67,094	2352	1,3-Dihidroxi-2-propanona	Cetonas	C3H6O3		33,6	74,3					
300	67,261	2356	N-metil-1,3-propanodiamina	Compostos Azotados	C4H12N2	68,1		146,0					
301	67,402	2358	2-Metil-7-exo-fenil-biciclo [4.2.0]-oct-1-eno	Compostos Terpénicos	C15H18					5,1			
302	67,481	2360	(E)-4-metoxi-2-hexeno	Éteres	C7H14O			50,9					
303	67,677	2363	Angelicina	Compostos Furânicos	C11H6O3	6,5							

304	68,029	2370	Carvacrol	Compostos Terpénicos	C10H14O			5,6								
305	68,229	2374	Eugenol	Compostos Terpénicos	C10H12O2						4,6		33,6			
306	68,368	2376	Metilisoegenol	Compostos Terpénicos	C11H14O2								18,5			
307	68,587	2380	5-Acetoximetil-2-furaldeído	Compostos Furânicos	C8H8O4	25,6			28,0							
308	69,481	2397	Heptadecano	Hidrocarbonetos	C17H36			20,2								
309	69,535	2398	2-Feniletil isotiocianato	Compostos Organossulfurados	C9H9NS						27182,8					
310	69,773	2402	Miristicina	Compostos Benzénicos	C11H12O3	38,0			4260,3					11,3		
311	69,837	2403	2,3-Dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona	Cetonas	C6H8O4	299,3		103,1								
312	70,306	2412	10,10-Dimetil-2,6-dimetileno-biciclo[7.2.0]undecano-5-β-ol	Compostos Terpénicos	C15H24O			17,5								
313	70,500	2415	Ácido undecanóico	Ácidos Carboxílicos	C11H22O2	104,4			203,5							
314	70,988	2424	3-Isotiocianatopropil-benzeno	Compostos Organossulfurados	C10H11NS						30,8					
315	70,990	2424	N-Metil-N-nitroso-2-propanamina	Compostos Azotados	C4H10N2O				89,1							
316	71,174	2427	(Z)-isoeugenol	Compostos Terpénicos	C10H12O2									4,1		
317	72,229	2446	(Z)-8-Dodeceno-1-ol	Álcoois	C12H24O	131,4										
318	72,802	2456	Ácido 3-furanocarboxílico	Compostos Furânicos	C5H4O3			18,4								
319	72,929	2458	Ácido benzenocarboxílico	Ácidos Carboxílicos	C7H6O2						16,2					
320	72,944	2459	Ácido 2-furanocarboxílico	Compostos Furânicos	C5H4O3	17,9			59,1							
Número total de compostos						61	49	29	59	71	21	88	51	57	77	65
Área Total (× 10⁸)						46,2	34,2	67,2	383,1	278,4	173,1	57,3	281,6	28,6	28,8	86,8

Publicações

Aguiar J., Gonçalves J., Alves V., Câmara J. S.; Analysis of antioxidant activity and natural pigments in fruits and vegetables; XIII Encontro de Química dos Alimentos. Porto, Portugal; 14-16th September; ID number CPO94; 2016.

Analysis of antioxidant activity and natural pigments in fruits and vegetables

Josefin Aguiar^{1,2}, João Gonçalves¹, Vera Alves¹, José Camara^{1,2,*}
¹CQM - Madeira Research Centre, ²Exact Sciences and Engineering Competence Centre, Madeira University, Campus Universitário da Penteada, 9000-800 Funchal, Portugal; *email: jsc@uma.pt

Introduction

Fruit and vegetables are an excellent source of macronutrients and fibers. The health benefits are mostly assigned to a group of active compounds known as antioxidants that has attracted great attention in the scientific community. The defensive effects against several chronic diseases, such as cancer and cardiovascular diseases, are associated to these major groups: vitamins, polyphenols, and carotenoids. Several assays have been frequently used to estimate antioxidant capacities in fresh fruits and vegetables and their products and foods for clinical studies including 2,2-azobis (3-amidinopropane) dihydrochloride (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP). The aim of this research was to compare the efficiency of the assays ABTS, DPPH and FRAP to estimate antioxidant activities, and their correlation with total phenolics and total carotenoids contents in several fruits and vegetable extracts. In addition, the total anthocyanins and betalains contents were investigated in this study.

Experimental

Samples

• Beet	• Carrot	• Purple Onion	• Tomato	• Watermelon
• Citrus	• White Carrot	• Garlic	• Turnip	• Broccoli
				• Spinach

Methodology

Total phenolic content

40 µL of extract
200 µL of Folin-Ciocalteu
100 µL of sodium carbonate (20%)
Reaction for 80 minutes
Absorbance measured at 760 nm

Total flavonoid content

400 µL of sodium citrate (5%)
400 µL of aluminum chloride (10%)
2 µL of sodium hydroxide (5M)
Absorbance measured at 415 nm

Total carotenoids content

Reading the extracts from the following wavelengths:
a) 470 nm b) 502,4 nm c) 565,8 nm

Total anthocyanins content

gH difference method
250 µL of extract + 2250 µL of CH₃COOH(0,25M)
250 µL of extract + 2250 µL of CH₃COOH(0,4M)

Total Betalains content

Reading the extracts from the following wavelengths: 535 and 558 nm

Antioxidant Capacity assay

ABTS Assay

ABTS + potassium persulfate
Reaction for 12 hours
+
Dilute ABTS solution with NaOH and absorbance 0.700 ± 0.20 in 750 nm
+
200 µL of extract + 2000 µL of fresh ABTS solution
Absorbance measured at 734 nm

FRAP assay

2% w/v ACQDS solution + 2.5 mL 10% TPTZ + 2.5 mL 0.01M FeCl₃·6H₂O
+
Heat for 37 °C for 5 min
+
200 µL of extract + 200 µL of FRAP solution
Reaction for 30 min
Absorbance measured at 595 nm

DPPH[•] assay

Stock solution 40 mg DPPH + 500 mL EtOH
+
50 µL of extract + 2000 µL DPPH solution
Absorbance measured at 518 nm
Reading was carried out at intervals of 3 minutes during 30 minutes

Figure 1. Total phenolic and flavonoid content

Figure 2. Total carotenoid content

Figure 3. Total anthocyanin content

Results

Phytochemical Analysis

Figure 4. Determination of the antioxidant capacity over 30 minutes. A) Total antioxidant capacity

Figure 5. Determination of the antioxidant capacity over 30 minutes. B) Total antioxidant capacity

Figure 6. Statistical analysis PCA - LMS-PC2 performed to replicate of each sample and comparing sample group

Conclusions

- ✓ Phenolic compounds present in plants, is a major contributor to the antioxidant activity. The results demonstrated that the vegetables with high content in phenolic compounds, such as purple onion, turnip, watermelon and beet showed a high correlation with antioxidant capacity, antidiabetic activity and redox power.
- ✓ Just as total phenolic content, we observed that turnip, watermelon and purple onion showed higher carotenoids content, with exception of beet, which had as its characteristic a characteristic pigment of the vegetable – the betalain. Its total betalain content was 808.3 µg betanidin/g fresh vegetable.
- ✓ For the studied vegetables, it was found that beet, carrot, broccoli and turnip showed the higher carotenoid content, while white onion, white carrot and garlic presented the lower values.
- ✓ The data relating to chemical composition and antioxidant activity were subjected to principal component analysis (PCA), in order to assess the correlations between samples. In PCA, was observed the separation of samples into several groups, one of them being formed by garlic and white onion samples. The similar results, in terms of total phenolic, flavonoid, anthocyanins, carotenoids content and antioxidant assays can be explained by the association between samples, once they belong to the same plant group.

Acknowledgments

The authors would like to thank Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT) through National Research Funding (Project: PGC/2013/004970/0001/00)

CPO94 XIII Encontro de Química dos Alimentos, September 14th - 16th, 2016, Porto, Portugal