

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE TABELAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	9
ABSTRACT	12
OBJECTIVOS GERAIS	13

I - INTRODUÇÃO

1. ANTIOXIDANTES	15
1.1. INTRODUÇÃO GERAL	15
1.2. COMPOSTOS FENÓLICOS NOS VEGETAIS.....	16
1.2.1. FLAVONÓIDES	17
1.2.2. ÁCIDOS FENÓLICOS.....	19
1.3. PROPRIEDADES BIOACTIVAS	21
2. CANÓNIGOS.....	22
2.1. INTRODUÇÃO.....	22
2.2. COMPOSIÇÃO FENÓLICA	23
2.3. PROPRIEDADES BIOACTIVAS	23
3. BRÓCOLOS.....	24
3.1. INTRODUÇÃO.....	24
3.2. COMPOSIÇÃO FENÓLICA	25
3.3. PROPRIEDADES BIOACTIVAS	25
4. NOÇÕES BÁSICAS SOBRE A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA NO ESTUDO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS.....	26

II - MATERIAL E MÉTODOS

A. AMOSTRAS	30
B. PREPARAÇÃO DOS EXTRACTOS	30
1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS	31
1.1. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES	32
2. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	34
2.1. DETERMINAÇÃO DO PODER REDUTOR PELO MÉTODO HEXACIANOFERRATO DE POTÁSSIO .	34

2.1.1.	PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES	35
2.2.	MÉTODO DO FRAP.....	37
2.2.1.	PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES	38
2.3.	MÉTODO DO ABTS.....	40
2.3.1.	PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES	40
2.4.	MÉTODO DO DPPH	42
2.4.1.	PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES	43
3.	ESTUDO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA DOS CANÓNICOS POR HPLC-DAD-ESI/MS/MS.....	45
4.	QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO CLOROGÉNICO NOS CANÓNICOS.....	47
4.1.	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA	48
5.	ANÁLISE DE DADOS	49

III - RESULTADOS

1.	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS NOS BRÓCOLOS E CANÓNICOS.....	51
2.	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	52
2.1.	DETERMINAÇÃO DO PODER REDUTOR PELO MÉTODO HEXACIANOFERRATO DE POTÁSSIO .	52
2.2.	MÉTODO DO FRAP.....	53
2.3.	MÉTODO DO ABTS.....	54
2.4.	ENSAIO DO DPPH	55
3.	ESTUDO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA DOS CANÓNICOS ATRAVÉS DA HPLC-DAD-ESI/MS/MS.....	56
3.1.	OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRACÇÃO.....	56
3.2.	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA DOS CANÓNICOS	58
3.2.1.	IDENTIFICAÇÃO ATRAVÉS DE HPLC-DAD	58
3.2.2.	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRACTO METANÓLICO ATRAVÉS DE HPLC-ESI/MS/MS	58
4.	QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO CLOROGÉNICO NOS CANÓNICOS.....	62
4.1.	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA	62

IV - DICUSSÃO DE RESULTADOS

1.	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS.....	64
2.	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	65
3.	ESTUDO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA DOS CANÓNICOS POR HPLC-DAD-ESI/MS/MS ...	67

V - PRINCIPAIS CONCLUSÕES

CONCLUSÕES..... 69

BIBLIOGRAFIA 72

ANEXO A

INSTRUMENTAÇÃO 77

REAGENTES E AMOSTRAS 78

AGRADECIMENTOS

Um novo capítulo está prestes a começar, no entanto não quero virar a página sem antes agradecer a todas as pessoas que me apoiaram e me ajudaram neste árduo percurso.

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha mãe por tudo o que fez por mim, por todos os sacrifícios feitos, pela compreensão, pelo apoio e pela paciência durante toda a minha vida académica.

Em especial quero agradecer às minhas orientadoras Dra. Maria João Lima e Dra. Edite Teixeira-Lemos por todo o apoio, pelo incentivo e por toda a ajuda; pela preocupação que sempre tiveram comigo durante o meu trabalho e acima de tudo, por terem sido incansáveis neste meu último ano de Mestrado.

Não menos importante, quero ainda agradecer ao meu orientador Dr. Luís Ferreira Guido, pela disponibilidade que teve comigo, por todo o apoio e pela ajuda prestada ao longo deste trabalho.

A todo o grupo QuaQua da FCUP e em especial ao Professor Dr. Aquiles Araújo Barros, quero agradecer por todos os apoios financeiros e pelas oportunidades em poder participar em congressos.

Aos meus colegas de laboratório: Joana Vieira, Ana Silva, Ana Margarida, Manuela Moreira, Inês Valente, Luís Gonçalves, Luisa Santos, Susana Gomes e Fábio Oliveira, quero agradecer por todos os momentos excelentes que passei na vossa companhia, pela preocupação que sempre tiveram comigo, pela ajuda e por me fazerem sentir em casa e especialmente por toda a alegria que me deram durante a minha estadia pelo Porto.

E sem esquecer, quero agradecer à minha família, a todos os meus amigos e alguns colegas de mestrado por todo o apoio que me deram durante todo o meu percurso.

Por último, quero agradecer à Manuela Moreira por toda ajuda que me deu ao longo destes meses, pela preocupação e pelo apoio.

“O vencedor não é aquele que ganha sempre, mas sim aquele que nunca deixa de lutar”

Autor Desconhecido

ÍNDICE DE FIGURAS

I – INTRODUÇÃO

1. ANTIOXIDANTES

FIG. 1. 1 – ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONÓIDES (A) E ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONÓIDES COM GRUPO CARBONILO NO C ₄ . ADAPTADO DE HUBER [19].	18
FIG. 1. 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO BENZÓICO E DOS DIFERENTES COMPOSTOS DO GRUPO HBA OBTIDOS POR SUBSTITUIÇÃO DOS GRUPOS R ₁ , R ₂ , R ₃ E R ₄ . ADAPTADO DE SOARES [24].	20
FIG. 1. 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO CINÂMICO E DOS DIFERENTES COMPOSTOS DO GRUPO HCA OBTIDOS POR SUBSTITUIÇÃO DOS GRUPOS R ₁ , R ₂ , R ₃ E R ₄ . ADAPTADO DE SOARES [24].	20
FIG. 1. 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO CLOROGÉNICO (A) E ROSMARÍNICO (B).	21

2. CANÓNIGOS

FIG. 2. 1 – CANÓNIGOS (A) E COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NOS CANÓNIGOS (B). ADAPTADO DE GRZEGORZEWSKI [32].	23
--	----

II – MATERIAL E MÉTODOS

B. PREPARAÇÃO DOS EXTRACTOS

ILUSTRAÇÃO 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL UTILIZADO PARA A PREPARAÇÃO DOS DIFERENTES EXTRACTOS DE BRÓCOLOS E CANÓNIGOS PARA AS ANÁLISES.	31
--	----

1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS

FIG. 1. 1 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO.	33
FIG. 1. 2 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA QUERCETINA.	37
FIG. 1. 3 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO TROLOX.	39
FIG. 1. 4 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO TROLOX.	42

4. QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO CLOROGÉNICO NOS CANÓNIGOS

FIG. 4. 1 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ACG.	48
---	----

III – RESULTADOS

3. ESTUDO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA DOS CANÓNIGOS ATRAVÉS DA HPLC-DAD-ESI/MS/MS

FIG. 3. 1 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA OS DIFERENTES EXTRACTOS USANDO SOLVENTES DIFERENTES PARA OS CANÓNIGOS ATRAVÉS DE HPLC-DAD A 280 NM.	56
FIG. 3. 2 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA OS EXTRACTOS METANÓLICOS UTILIZANDO DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRACÇÃO PARA OS CANÓNIGOS A 280 NM.	57
FIG. 3. 3 – CROMATOGRAMA OBTIDO PARA O EXTRACTO METANÓLICO DOS CANÓNIGOS ATRAVÉS A 280 NM.	58
FIG. 3. 4 – MECANISMO PROPOSTO PARA A FRAGMENTAÇÃO DA DIOSMETINA 7-O-RUTINÓSIDO PELO PROGRAMA <i>HIGHCHEM MASSFRONTIER 1.0</i> .	61

ÍNDICE DE TABELAS

I – INTRODUÇÃO

1. ANTIOXIDANTES

TABELA 1. 2 – FONTES NATURAIS DE COMPOSTOS FENÓLICOS. ADAPTADO DE NACZK [14].	17
TABELA 1. 3 – PRINCIPAIS SUBCLASSES DOS FLAVONÓIDES. ADAPTADO DE ERDMAN E BRAVO [17, 23].	19

3. BRÓCOLOS

TABELA 3. 1 – COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NOS BRÓCOLOS. ADAPTADO DE PODSEDEK [3].	25
---	----

II – MATERIAL E MÉTODOS

1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS

TABELA 1. 1 – SOLUÇÕES PADRÃO DO ÁCIDO GÁLICO.	32
TABELA 1. 2 – RESULTADOS OBTIDOS REFERENTE À CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O MÉTODO FOLIN-CIOCALTEU.	33

2. Determinação da Capacidade Antioxidante

TABELA 2. 1 – SOLUÇÕES PADRÃO DE QUERCETINA	35
TABELA 2. 2 – RESULTADOS OBTIDOS REFERENTE À CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O MÉTODO HEXACIANO FERRATO DE POTÁSSIO.	36
TABELA 2. 3 – SOLUÇÕES PADRÃO DE TROLOX	38
TABELA 2. 4 – RESULTADOS OBTIDOS REFERENTE À CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O MÉTODO FRAP.	39
TABELA 2. 5 – SOLUÇÕES PADRÃO DO TROLOX	41
TABELA 2. 6 – RESULTADOS OBTIDOS REFERENTE À CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O MÉTODO ABTS.	41
TABELA 2. 7 – TIPO DE DILUIÇÕES REALIZADAS PARA CADA EXTRACTO DOS BRÓCOLOS E CANÓNICOS	43
TABELA 2. 8 – PREPARAÇÃO DE CADA MISTURA REACCIONAL.	44

3. ESTUDO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA DOS CANÓNICOS ATRAVÉS DA HPLC-DAD-ESI/MS/MS

TABELA 3. 1 – CONDIÇÕES UTILIZADAS NA ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA DO EXTRACTO EM METANOL DOS CANÓNICOS POR HPLC-DAD-ESI/MS/MS	46
--	----

4. QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO CLOROGÉNICO NOS CANÓNICOS

TABELA 4. 1 – SOLUÇÕES PADRÃO ÁCIDO CLOROGÉNICO	47
TABELA 4. 2 – VALORES DA ÁREA OBTIDOS PARA CADA PADRÃO DO ÁCIDO CLOROGÉNICO	48

III - RESULTADOS

1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS

TABELA 1. 1 – TPC PARA OS DIFERENTES EXTRACTOS DE BRÓCOLOS E CANÓNICOS, EXPRESSOS EM $MG_{GAE}/100 G PF$.	51
--	----

2. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

TABELA 2. 1 – PR PARA OS DIFERENTES EXTRACTOS DE BRÓCOLOS E CANÓNIGOS, EXPRESSOS EM $MG_{QE}/100$ G PF.	52
TABELA 2. 2 – CA PARA OS DIFERENTES EXTRACTOS DE BRÓCOLOS E CANÓNIGOS, EXPRESSOS EM $MG_{TE}/100$ G PF.....	53
TABELA 2. 3 – CA PARA OS DIFERENTES EXTRACTOS DE BRÓCOLOS E CANÓNIGOS, EXPRESSOS EM $MG_{TE}/100$ G PF.....	54
TABELA 2. 4 – PODER ANTI-RADICALAR OBTIDO PARA CADA EXTRACTO DE BRÓCOLOS E CANÓNIGOS, EXPRESSOS EM % PAR.	55

3. ESTUDO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA DOS CANÓNIGOS ATRAVÉS DA HPLC-DAD-ESI/MS/MS

TABELA 3. 1 – COMPOSIÇÃO FENÓLICA DO EXTRACTO METANÓLICO DOS CANÓNIGOS, ATRAVÉS DA HPLC-ESI/MS/MS. ...	59
--	----

4. QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO CLOROGÉNICO NOS CANÓNIGOS

TABELA 4. 1 – TEOR DE ACG NOS EXTRACTOS METANÓLICOS DOS CANÓNIGOS, EXPRESSOS EM MG ACG/100 G PF.	62
TABELA 4. 2 – FACTORES DA METODOLOGIA PROPOSTA.	62

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABTS – 2,2-azinobis 3-etilbenzotiazolina-ácidosulfônico
- ACG – ácido clorogénico
- ADN – ácido desoxirribonucleico
- ANOVA – análise de variância
- APCI – *atmospheric pressure chemical ionization* (ionização química à pressão atmosférica)
- API – *atmospheric pressure ionization* (ionização à pressão atmosférica)
- CA – capacidade antioxidante
- CGA – chlorogenic acid (ácido clorogénico)
- CV – coeficiente de variação
- DAD – *diode array detector* (detecção por díodos)
- DDR – dose diária recomendável
- DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
- EC₅₀ – *efficient concentration* (concentração eficiente)
- ESI – *electrospray ionization* (ionização por electrospray)
- FC – Folin-Ciocalteu
- Fig – figura
- FRAP – *ferric reducing antioxidant power* (poder férrico antioxidante reduzido)
- FW – *fresh weight* (peso fresco)
- g – grama
- GAE – *gallic acid equivalents* (equivalentes de ácido gálico)
- HBA – *hydroxybenzoic acid* (ácido hidroxibenzóico)
- HCA – *hydroxycinnamic acid* (ácido hidroxicinâmico)
- HPLC – *high-performance liquid chromatography* (cromatografia líquida de alta eficiência)
- HPLC-DAD – *high-performance liquid chromatography/diode array detector* (cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção por díodos)
- HPLC-ESI-MS/MS – *high-performance liquid chromatography/ electrospray ionization/mass spectrometry* (cromatografia líquida de alta eficiência/ionização por electrospray acoplada à espectrometria de massa)
- IMC – índice de massa corporal
- Kcal – quilocalorias
- Kg – quilograma
- LOD – *limit of detection* (limite de detecção)
- LOQ – *limit of quantification* (limite de quantificação)
- LC-MS/MS – *liquid chromatography/mass spectrometry* (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa)
- mL – mililitro
- MS – *mass spectrometry* (espectrometria de massa)
- m/z – razão massa/carga
- ND – não detectado

OMS – organização mundial de saúde
p.a – para análise
p.e – por exemplo
PAR – poder anti-radicalar
PF – peso fresco
PR – poder redutor
QE – *quercetin equivalents* (equivalentes de quercetina)
 R^2 – coeficiente de correlação linear
RCS – *reactive chlorine species* (espécies reactivas de cloro)
RNS – *reactive nitrogen species* (espécies reactivas de azoto)
ROS – *reactive oxygen species* (espécies reactivas de oxigénio)
TCA – ácido tricloroacético
TE – *trolox equivalents* (equivalentes de trolox)
TPC – *total phenolics content* (teor total de polifenóis)
TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazina
 t_R – tempo de retenção
Trolox - ácido 6-hidroxi-2,3,7,8-tetrametilcrómio-2-carboxílico
UV/Vis – radiações ultravioleta e visível
WHO – *world health organization* (organização mundial de saúde)
 λ – comprimento de onda
 μg – micrograma

RESUMO

Nos últimos anos, o consumo de frutas e vegetais tem sido recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), numa perspectiva de prevenção de diversas patologias, tais como o cancro, a osteoporose e doenças cardiometabólicas e degenerativas. Os benefícios destes alimentos para a saúde humana estão associados à presença de compostos com actividade antioxidante capazes de minimizar alterações celulares induzidas por espécies reactivas de oxigénio e azoto. O presente trabalho tem como principais objectivos determinar o teor total de polifenóis e consequentemente a capacidade antioxidante dos brócolos e canónigos, avaliando paralelamente a influência das condições de extracção através de variadas técnicas espectrofotométricas; e ainda caracterizar a composição fenólica dos canónigos após separação por cromatografia líquida (HPLC-DAD-ESI/MS/MS). Os resultados mostram que os canónigos possuem um teor de polifenóis totais cerca de 3 vezes superior em relação aos brócolos, bem como 4 a 22 vezes maior capacidade antioxidante. O solvente mais eficaz na extracção dos polifenóis em ambos os vegetais foi o metanol. Foram identificados cinco compostos fenólicos, onde se destaca o ácido clorogénico como principal constituinte da matriz de canónigos, com 168 ± 9 mg ACG/100 g peso fresco (PF).

ABSTRACT

In last years the consumption of fruits and vegetables has been recommended by the world health organization (WHO) trying to prevent several diseases such as, cancer, osteoporosis, cardiometabolic and degenerative diseases. The benefits of these foods for human health are associated with the presence of compounds with antioxidant activity capable of minimizing cellular changes induced by reactive oxygen species and nitrogen. The present work's main objectives were the total content of polyphenols determination and consequently the antioxidant capacity of broccoli and lamb's lettuce, evaluating the influence of the extraction conditions by spectrophotometric techniques; and characterize the phenolic composition of lamb' lettuce after separation by liquid chromatography (HPLC-DAD-ESI/MS/MS). The results indicate that lamb's lettuce contains about 3-fold higher amount of total polyphenols compared to broccoli, as well as higher antioxidant activity, up to 22-fold. The most efficient solvent extraction of polyphenols in both plants was methanol. A total of five compounds were identified and the main phenolic compound found was chlorogenic acid with a content of 168 ± 9 mg CGA/100 g fresh weight (FW).

OBJECTIVOS GERAIS

Nos últimos anos, estudos sobre a extracção de compostos fenólicos a partir de fontes naturais têm tido uma crescente atenção. Os compostos fenólicos estão bem presentes nos vegetais e têm mostrado um papel fundamental na prevenção da progressão de algumas patologias degenerativas. Estes efeitos benéficos na saúde humana são geralmente atribuídos aos polifenóis os quais, em inúmeras citações na literatura, demonstram intensa actividade antioxidante. Os principais antioxidantes presentes nos vegetais são os compostos fenólicos, as vitaminas C e E, os carotenóides e flavonóides [1]. Assim sendo, a extracção de compostos fenólicos a partir de vegetais poderá constituir uma área interessante de estudo e de aplicação com fins comerciais.

Este trabalho de investigação teve como objectivos determinar o teor de polifenóis totais e conseqüentemente a capacidade antioxidante em brócolos e canónigos, através de variadas técnicas espectrofotométricas, e ao mesmo tempo estudar a influência das condições de extracção (solvente e técnica de extracção). Face aos resultados obtidos pelos métodos anteriores, o estudo prosseguiu no intuito de se identificar e caracterizar a composição fenólica dos canónigos, uma matriz praticamente desconhecida, por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por díodos acoplada à espectrometria de massa (HPLC-DAD-ESI-MS/MS). O presente trabalho de dissertação terminou com a quantificação do ácido clorogénico presente nos canónigos, uma vez que foi identificado como principal composto fenólico presente nesta matriz.

De modo a alcançar os objectivos propostos, este trabalho de dissertação está dividido em cinco capítulos. No primeiro capítulo (I – Introdução) é feita uma revisão da literatura com três subcapítulos, onde é dada especial atenção aos compostos fenólicos e à sua importância em aplicações nas indústrias. O segundo capítulo (II – Material e Métodos) ilustra os métodos e os seus fundamentos. No terceiro capítulo (III – Resultados) apresentam-se todos os resultados obtidos ao longo do trabalho experimental, seguindo-se a discussão dos mesmos (IV – Discussão dos Resultados). Por último, no quinto capítulo (V – Conclusões) serão retiradas as principais conclusões face aos resultados obtidos e será discutida a relevância deste trabalho.

I – INTRODUÇÃO

1. ANTIOXIDANTES

1.1. INTRODUÇÃO GERAL

Actualmente os efeitos fisiológicos de alimentos ricos em polifenóis, tais como fruta, vegetais, bebidas (sumos de fruta, vinho, chá, café e chocolate) e azeite, têm recebido uma atenção especial como fontes dietéticas de antioxidantes, uma vez que são valiosos para a saúde humana. Além disso, os antioxidantes aumentam o tempo de vida de prateleira dos alimentos, atrasando ou inibindo a deterioração lípidica responsável pelas alterações de aroma (*off-flavour*) que pode ocorrer durante o processamento e o armazenamento [2].

Nos organismos aeróbios, os radicais livres são constantemente produzidos durante o funcionamento normal da célula, na maior parte sob a forma de espécies reactivas de oxigénio (ROS, *reactive oxygen species*). Uma vez produzidas e em organismos normais, a maior parte dos radicais livres são removidos pelas defesas antioxidantes da célula que incluem enzimas e moléculas não enzimáticas. A manutenção do equilíbrio entre produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo [3]. Em concentrações baixas ou moderadas, as ROS são benéficas para as células, uma vez que estão envolvidas na sinalização celular e são usados pelos fagócitos nas suas acções bactericidas [3-5]. No entanto, a produção excessiva de ROS, provoca o “stress oxidativo” intrinsecamente ligado ao envelhecimento celular e os processos inflamatórios subclínicos responsáveis pelo aparecimento de doenças [4]. Pelo que, os mesmos são neutralizados por enzimas com actividade antioxidante (tais como as glutatona peroxidase, redutase e s-transferase; a superóxido dismutase e a catalase), conhecidas como antioxidantes endógenos. Contudo, estes sistemas de defesa são frequentemente insuficientes para prevenir na totalidade os danos causados pelas ROS [5]. Daí a importância dos antioxidantes uma vez que por um lado evitam o ranço dos alimentos e por outro protegem as células de danos causados por ROS, bem como de espécies reactivas de azoto (RNS, *reactive*

nitrogen species) e espécies reactivas de cloro (RCS, *reactive chlorine species*) [6]. Halliwell, 1995 [7] definiu antioxidante como “qualquer substância que, mesmo presente em baixas concentrações comparativamente com a do substrato oxidável (tais como lípidos, proteínas, ácido desoxirribonucleico [ADN] ou hidratos de carbono) atrasa ou inibe a oxidação desse substrato de maneira eficaz”.

Existe uma grande variedade de moléculas naturais ou sintéticas com propriedades antioxidantes e que podem constituir um sistema exógeno de defesa. Alguns produtos naturais com actividade antioxidante podem ser úteis no auxílio do sistema protector endógeno, podendo ser utilizados como nutracêuticos. Nessa perspectiva, os antioxidantes presentes na nossa dieta assumem uma grande importância como possíveis agentes protectores na redução dos danos oxidativos e na manutenção da integridade das membranas das células [3, 6].

Estudos demonstram que o consumo frequente de vegetais e frutas está associado à diminuição do risco de várias patologias, tais como o cancro, a osteoporose, doenças cardiometabólicas e degenerativas [8-10]. Estes benefícios são atribuídos à presença dos compostos bioactivos, que contribuem na prevenção da oxidação lipídica, mutações no ADN e posteriormente danos nos tecidos [6].

1.2. COMPOSTOS FENÓLICOS NOS VEGETAIS

Os compostos fenólicos são uma classe de compostos de baixo peso molecular e correspondem a metabolitos secundários sintetizados pelas plantas, durante o seu desenvolvimento e em resposta a condições de stress, tais como infecções, polinização, radiação UV e agentes patogénicos [11-13]. Estes compostos não estão apenas associados ao sabor e à cor das plantas, mas também a propriedades bioactivas que exercem sobre a saúde humana [13]. Deste modo depreende-se o interesse em identificar e caracterizar os compostos fenólicos presentes em fontes naturais tal como está referido na Tabela 1.1.

Já foram identificados a partir de fontes naturais mais de 8000 compostos fenólicos com actividade antioxidante [12, 14]. Cada classe é dividida em subclasses, dependendo da base da sua estrutura química [15, 16]. As principais classes dos compostos fenólicos são os ácidos fenólicos e os flavonóides [13]. As propriedades bioactivas dos compostos fenólicos serão abordadas no subcapítulo 1.3.

Tabela 1. 1 – Fontes naturais de compostos fenólicos. Adaptado de Naczk (2006) [12].

Compostos fenólicos	Fontes Alimentares
Ácidos fenólicos	
Ácidos Hidroxicinâmicos	Mirtilo, cereais, pêra, citrinos, oleaginosas, espinafre, tomate, amoras
Ácidos Hidroxibenzóicos	Mirtilo, cereais, oleaginosas, amoras
Flavonóides	
Antocianidinas	Mirtilo, morangos, uvas, cerejas, amoras
Flavanóis	Maçã, uvas, alface, cebola, amoras
Flavanonas	Citrinos
Flavonóis	Maçã, feijão, alface, cebola, azeitona, pimenta, tomate
Flavonas	Citrinos, salsa, espinafre
Isoflavonas	Soja

1.2.1. FLAVONÓIDES

Os flavonóides são um grupo diverso de compostos fenólicos amplamente distribuído no reino vegetal tendo sido identificados em fontes naturais mais de 4000 flavonóides. Estes compostos são principalmente reconhecidos como os responsáveis pelas cores amarelo, laranja e vermelho em flores, frutas e folhas [17, 18]. Os flavonóides, nomeadamente as antocianidinas e os flavonóis, actuam nas plantas atraindo polinizadores e disseminadores de sementes. Além da pigmentação em frutas, flores, sementes e folhas, os flavonóides também têm funções na sinalização entre plantas e microrganismos, na

fertilidade de algumas espécies, na defesa como agentes antimicrobianos e na protecção à radiação UV [19].

Os flavonóides consistem num grande grupo de polifenóis de baixo peso molecular, derivados da benzo- γ -pirona. A estrutura base dos flavonóides é constituída por dois anéis benzénicos (A e B) e um anel (C) que pode ser um pirano heterocíclico (flavanóis e antocianinas, Fig 1.3-a) ou uma pirona (flavonóis, flavonas, isoflavonas e flavanonas, Fig 1.3-b), que possuem na posição C_4 do anel C um grupo carbonilo. Em 90% das flavonas e flavonóis, o anel A encontra-se substituído por dois grupos hidroxilos, em C_5 e C_7 . Estes grupos hidroxilo podem estar livres ou esterificados [14, 20].

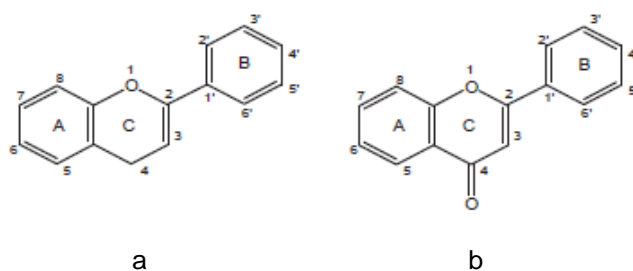








Fig. 1. 1 – Estrutura básica dos flavonóides (a) e estrutura básica dos flavonóides com grupo carbonilo no C_4 . Adaptado de Huber (2008) [19].

Os flavonóides são formados a partir dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina. Quimicamente, os flavonóides são dibenzopirenos e pironas (e seus derivados), isto é, qualquer composto de estrutura cíclica $C_6-C_3-C_6$. [14].

A actividade biológica dos flavonóides e dos seus metabolitos depende da sua estrutura química e dos vários substituintes da molécula, uma vez que a estrutura básica pode sofrer uma série de alterações, tais como, glicosilação, esterificação, amidação, hidroxilação, entre outras, que modulam a polaridade e toxicidade destes compostos [14]. Além disso, os flavonóides dependendo do estado de oxidação do anel C, são divididos em 13 subclasses, das quais se destacam 6 subclasses principais: flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanóis e antocianinas (Tabela 1.2) [15-17, 20].

Tabela 1. 2 – Principais subclasses dos flavonóides. Adaptado de Erdman (2007) e Bravo (1998) [15, 21].

Subclasses	Estrutura química	Características	Exemplos de Flavonóides
Flavonóis		O anel C está insaturado entre C ₂ e C ₃ e hidroxilado no C ₃ .	Isoramnetina, Campferol, miricetina, quercetina
Flavonas		Apresenta uma insaturação entre C ₂ e C ₃ .	Apigenina, luteolina, diosmetina
Flavanonas		O anel C está saturado e possui um grupo carbonilo no C ₄ .	Eriodictiol, hesperetina, naringenina
Isoflavonas		O anel C está insaturado entre C ₂ e C ₃ e o anel B ligado ao C ₃ .	Daidzeína, genisteína, gliciteína
Flavanóis		O anel C está saturado, hidroxilado no C ₃ e não existe o grupo carbonilo no C ₄ .	(+)-Catequina, (+)-galocatequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, (-)-epicatequina 3-galato, (-)-epigallocatequina 3-galato
Antocianinas		O anel C está insaturado entre C ₂ e C ₃ e hidroxilado na C ₃ .	Cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina, petunidina

Os flavonóides (excepto as catequinas) existem nas plantas principalmente na forma glicosilada, ou seja, ligados a açúcares (*O*-glicósidos), sob a forma de monossacáridos ou dissacáridos. O glicósido liga-se ao grupo hidroxilo na posição C₃ (anel B) ou C₇ (anel A). As moléculas desprovidas de açúcares são denominadas de agliconas [14, 16, 19].

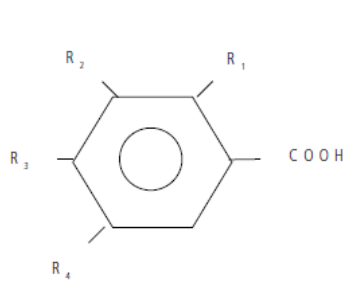
1.2.2. ÁCIDOS FENÓLICOS

Os ácidos fenólicos possuem um único anel aromático e um grupo carboxilo funcional e são bastante comuns quer em plantas inferiores quer em plantas superiores. Estes compostos são encontrados em diferentes formas: agliconas, ésteres, glicosilados e complexados. Os ácidos fenólicos estão directamente implicados na resposta aos diferentes tipos de *stress*: mecânico (cortes), químico (vários tipos de tratamentos) ou microbiológico (infecções por patogénicos). Estes compostos estão também envolvidos na resistência através de duas vias: *i*) contribuem para a cicatrização de cortes por linhificação das paredes das células ao redor da zona e *ii*) induzem propriedades antimicrobianas. [14, 16, 20, 22].

Os ácidos fenólicos subdividem-se em duas subclasses diferentes: os ácidos hidroxibenzoicos (HBA, *hydroxybenzoic acid*) e os ácidos hidroxicinâmicos

(HCA, *hydroxycinnamic acid*). Estes derivam de duas moléculas não fenólicas: o ácido benzóico e o ácido cinâmico, respectivamente. No entanto, na maioria dos casos, os ácidos fenólicos não são encontrados na sua forma livre, mas sim na forma combinada ou ligados a componentes da parede celular [22].

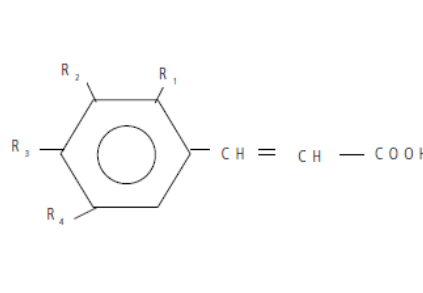
Os HBA incluem os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatéquico, vanílico e sirínico, que têm estrutura comum C₆-C₁. O representante mais importante da subclasse dos HBA é o ácido gálico, Fig. 1.2 [23].



Ácido	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Salicílico	OH	H	H	H
<i>p</i> -Hidroxibenzóico	H	H	OH	H
Protocatéquico	H	OH	OH	H
Vanílico	H	OCH ₃	OH	H
Gálico	H	OH	OH	OH
Sirínico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

Fig. 1. 2 – Estrutura química do ácido benzóico e dos diferentes compostos do grupo HBA obtidos por substituição dos grupos R₁, R₂, R₃ e R₄. Adaptado de Soares (2002) [24].

Os HCA são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C₆-C₃) e são mais comuns do que os HBA [20, 23]. Os ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico (Fig. 1.3) são representantes desta subclasse química em plantas de uso alimentar e medicinal. Em muitas plantas, estes compostos aparecem sob a forma de heterósidos, ésteres e dímeros (C₆-C₂-C₆). Destacam-se os ésteres dos ácidos cafeico e quínico (ácido clorogénico ou 5-cafeoilquínico) e os dépsidos tais como o ácido rosmarínico, Fig. 1.4 [14].



Ácido	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
<i>o</i> -Cumárico	OH	H	H	H
<i>m</i> -Cumárico	H	OH	H	H
<i>p</i> -Cumárico	H	H	OH	H
Cafeico	H	OH	OH	H
Ferúlico	H	OCH ₃	OH	H
Sinápico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

Fig. 1. 3 – Estrutura química do ácido cinâmico e dos diferentes compostos do grupo HCA obtidos por substituição dos grupos R₁, R₂, R₃ e R₄. Adaptado de Soares (2002) [24].

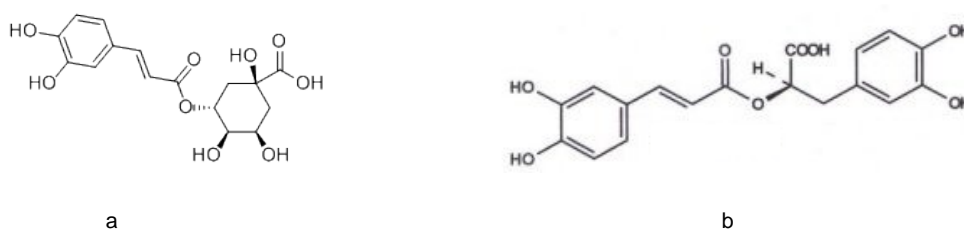


Fig. 1. 4 – Estrutura química do ácido clorogénico (a) e rosmarínico (b).

Os ácidos sinápico, ferúlico e *p*-cumárico apresentam uma maior actividade antioxidante do que os derivados do ácido benzóico, nomeadamente os ácidos protocatéquico, sirínico e vanílico. Este facto deve-se à existência da dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido cinâmico, uma vez que estabiliza o radical por ressonância, enquanto os derivados do ácido benzóico não apresentam essa característica [23].

1.3. PROPRIEDADES BIOACTIVAS

Nos últimos anos, tem crescido o interesse acerca de uma possível adopção de uma dieta rica em compostos bioactivos. Vários estudos indicam que o aumento da ingestão de frutos e vegetais ricos nestes compostos está associado à diminuição do número de casos com doenças crónicas e cancro [1, 10, 25, 26]. Em especial, as vitaminas antioxidantes, incluindo o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E) e o β -caroteno, os flavonóides, os ácidos fenólicos e os carotenóides são os principais compostos bioactivos responsáveis por esses mesmos benefícios [5, 16, 27]. Estudos experimentais em animais e em células humanas demonstraram que os compostos fenólicos poderão ter um papel importante na prevenção do cancro e de doenças cardiovasculares, quando ingeridos diariamente [16, 28].

O interesse pelo estudo dos flavonóides cresceu desde a descoberta entre a relação da baixa taxa de mortalidade cardiovascular com o alto consumo de gorduras associado ao consumo de vinho tinto (*French paradox*, Paradoxo francês), na população Mediterrânea. O poder antioxidante que os flavonóides apresentam fomenta a eliminação de radicais livres e consequentemente a

protecção contra a oxidação lipídica, podendo vir a interferir no desenvolvimento da aterosclerose, reduzindo assim trombozes e promovendo uma normal função endotelial [11, 15]. Além disso, estudos epidemiológicos confirmam que os flavonóides são compostos promotores de saúde, já que exercem acções protectoras contra patologias crónicas e neurodegenerativas, diabetes, inflamações, alergias e mutagénese, bem como apresentam propriedades antimicrobianas, antivirais, analgésicas e hepatoprotectoras [11, 18, 29].

Face ao exposto anteriormente, poder-se-á dizer que existe uma relação entre a estrutura química e as propriedades bioactivas dos compostos fenólicos. No caso dos ácidos fenólicos, a actividade antioxidante depende do número e das posições dos grupos hidroxilos, isto é, quanto maior o número de grupos hidroxilos maior será a actividade antioxidante [16, 29, 30].

2. CANÓNIGOS

2.1. INTRODUÇÃO

Os canónigos (*Valerianella locusta* L.), também conhecidos como alface de cordeiro, salada de milho e salada de campo, pertencem à família *Valerianaceae* e recebem este nome porque em tempos remotos eram consumidos pelo clérigo. É uma planta anual, pouco conhecida fora da Europa, no entanto é comumente usada em saladas, principalmente na França (é a maior produtora de canónigos), na Alemanha e Itália. Também tem sido usada na Grã-Bretanha durante séculos, mas só se tornou comercialmente disponível em 1980. A área de produção, em estufas, na Alemanha é de 207 ha, tornando-se a terceira maior produtora de canónigos, depois do tomate e do pepino [31]. Em Portugal ainda são pouco conhecidos, no entanto já começaram a ser introduzidos quer em grandes superfícies comerciais quer na restauração. Os canónigos são pouco calóricos, com apenas 19 Kcal/100 g,

apresentam baixo teor proteico (2 g/100 g), lipídico (0,4 g/100 g) e um teor médio de fibras de 1,7 g/100 g ¹.

2.2. COMPOSIÇÃO FENÓLICA

De acordo com o nosso conhecimento, a literatura é exígua em relação à composição fenólica dos canónigos. Apenas Grzegorzewski, *et al.*, 2010 [32] estudaram esta matriz, mostrando a influência de um plasma de descarga luminescente a baixa pressão de oxigénio na morfologia e composição química dos canónigos. Apesar do objectivo do seu estudo não ser a análise da composição fenólica, estes autores referem que os canónigos são ricos em ácidos fenólicos (ácido clorogénico e ácido cafeico), bem como em flavonas (diosmetina e luteolina), Fig. 2.1.

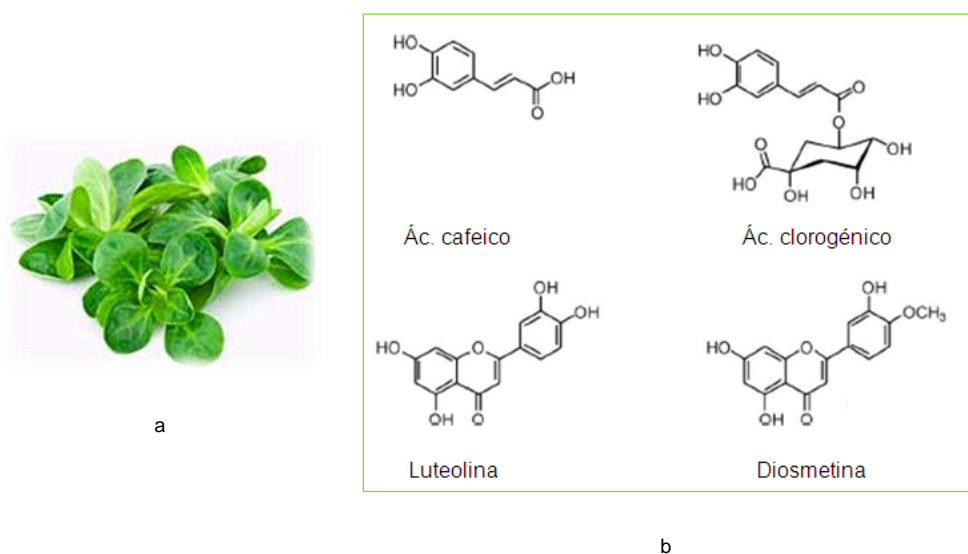


Fig. 2. 1 – Canónigos (a) e compostos fenólicos presentes nos canónigos (b). Adaptado de Grzegorzewski [32].

2.3. PROPRIEDADES BIOACTIVAS

Os canónigos são uma excelente fonte de pró-vitamina A (4250 µg/100 g) e de vitamina B₉ (160 µg/100 g), valores próximos da dose diária recomendada –

¹ <http://www.fondation-louisbonduelle.org/france/en/know-your-vegetables/nutritional-assets-of-vegetables/mache.html>

DDR². Sendo também ricos em vitaminas C, B₆, E, beta-caroteno (um precursor da vitamina A), ácido fólico, iodo, ferro, potássio e fósforo. Devido à grande quantidade de vitaminas e de beta-caroteno, este alimento torna-se um excelente contributo para a visão, para um crescimento adequado das crianças, para o desenvolvimento apropriado dos bebés, entre outros³.

3. BRÓCOLOS

3.1. INTRODUÇÃO

Os brócolos pertencem à família *Brassicaceae* (ou *Cruciferae*), constituída por 350 géneros e 3500 espécies, incluindo *Camelina*, *Crambe*, *Sinapis*, *Thlaspi* e *Brassica*. O género *Brassica* é o mais importante da família *Brassicaceae* que inclui espécies tais como *Brassica oleracea* L., *Brassica napus* L. e *Brassica rapa* L. [25]. Este género inclui um vasto número de vegetais, tais como os brócolos, a couve-flor, a couve-de-bruxelas e a couve-rábano, entre outros, que são cultivados pelas suas inflorescências comestíveis, pelos caules carnudos, pelas raízes (p.e., nabos) e pelos óleos extraídos das sementes [33].

As inflorescências dos brócolos, e mais recentemente, as sementes germinadas são conhecidas como excelentes fontes de vitamina A, C, E, K, ácido fólico, riboflavina (vitamina B₂), ferro, cálcio e potássio [1, 10, 25, 26, 34, 35]. Adicionalmente são também fontes naturais de glucosinolatos [36]. Quanto ao perfil nutritivo, a família *Brassicaceae* apresenta baixo valor calórico (24-34 Kcal/100 g), bem como um baixo teor proteico (1,44 – 2,82 g/100 g), lipídico (0,12 – 0,37 g/100 g) e um teor médio de fibras de 2,5 g/100 g [37].

² Nota: DDR para a pró-vitamina A: 4,800 µg/100 g e para a vitamina B₉: 200 µg/100 g.

³ <http://www.agroportal.pt/x/agronoticias/2006/07/21.htm>.

3.2. COMPOSIÇÃO FENÓLICA

Como já anteriormente referido, a composição fenólica da inflorescência nos brócolos no género *Brassica* tem sido alvo de uma série de estudos. Os brócolos são uma excelente fonte natural de flavonóides e de derivados do ácido hidroxicinâmico. A Tabela 3.1. mostra os principais compostos fenólicos presentes neste vegetal.

Tabela 3. 1 – Compostos fenólicos presentes nos brócolos. Adaptado de Podsedek (2010) [10].

COMPOSIÇÃO FENÓLICA	
PRINCIPAIS COMPOSTOS	1-sinapoil-2-feruloilgentiobiose
	1,2-diferuloilgentiobiose
	1,2,2'-trisinapoilgentiobiose
	Ácido neoclorogénico (ácido 3-cafeoilquinico)
	Quercetina
	Campferol 3-O-soforósido
OUTROS COMPOSTOS PRESENTES NOS BRÓCOLOS	1,2'-disinapoil-2-feruloilgentiobiose
	1,2-disinapoilgentiobiose
	1-sinapoil-2,2-diferuloilgentiobiose
	O isómero do 1,2,2'-trisinapoilgentiobiose
	Ácido clorogénico
	Isoquercetina
	Campferol 3-O-glucósido
Di-glucósidos do campferol	

3.3. PROPRIEDADES BIOACTIVAS

Geralmente, o consumo de vegetais pertencentes à família *Brassicaceae* é associado à prevenção do risco de cancro, uma vez que são ricos em glucosinolatos – precursores de compostos que apresentam propriedades anticancerígenas, p.e., sulforano e indol 3-carbinol [33]. Constituem ainda uma excelente fonte diária de antioxidantes e de vitaminas [33, 35, 38]. A actividade antioxidante do género *Brassica* tem sido atribuída ao seu perfil fenólico, em

especial os flavonóides uma vez que estes têm demonstrado maior actividade antioxidante do que as vitaminas e carotenóides [29]. Além disso, exercem também efeitos protectores em patologias cardiovasculares e infecções pela *Helicobacter pylori* [26, 35]. No entanto as propriedades antioxidantes nos brócolos dependem de vários factores, tais como variedade, maturação, condições de crescimento, clima, fertilidade do solo, agentes patogénicos, cortes e condições de armazenamento [10, 33].

4. NOÇÕES BÁSICAS SOBRE A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA NO ESTUDO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Várias técnicas cromatográficas têm sido usadas para separar, isolar, purificar e identificar compostos fenólicos, bem como para o estudo da interacção dos compostos fenólicos com outros componentes presentes na matriz dos alimentos [39]. A identificação dos compostos fenólicos nos vegetais é influenciada por vários factores: natureza química, método de extracção, tamanho das partículas da amostra, tempo e condições de armazenamento, bem como, pelo método empregue e pela presença de substâncias interferentes ao método, tais como, ceras, gorduras, terpenos e clorofilas. A solubilidade dos polifenóis é dependente do tipo de solvente (polaridade) usado na extracção, do grau de polimerização e da formação de complexos insolúveis. Os solventes mais comuns nas extracções dos compostos fenólicos são o metanol, o etanol, a acetona, a água, o acetato de etilo, o propanol, a dimetilformamida e também as misturas entre eles. Sendo assim, não existe uma metodologia completamente satisfatória para a extracção de todos os compostos fenólicos presentes na matriz dos vegetais, devido à complexidade dos mesmos, bem como às diferenças existentes na reactividade entre os polifenóis e os reagentes usados [39].

A HPLC foi desenvolvida na década de 60 e, actualmente, é a técnica mais utilizada na análise alimentar, e baseando-se na distribuição ou partição dos

analitos de uma amostra entre a fase estacionária e a fase móvel [14, 40]. A HPLC oferece vantagens significativas em termos de simplicidade, de custo, de velocidade (apesar de este factor depender do tipo de método de detecção usado), da sensibilidade, da especificidade, da precisão e da preservação da amostra. É uma técnica versátil e adaptável para estudos específicos, adequando a fase estacionária, a composição da fase móvel com a possibilidade de acoplar um sistema de detecção selectivo. Além disso, a HPLC tem a vantagem de identificar e quantificar compostos fenólicos sem a derivatização preliminar [40]. Os compostos fenólicos presentes nos alimentos, são geralmente detectados por UV/Vis e DAD (*Diode Array Detector*) [39]. A grande diferença entre eles é o facto de que o DAD permite a visualização de cromatogramas em comprimentos de onda variados, facilitando a detecção selectiva de grupos diferentes de compostos fenólicos nos seus comprimentos de onda máximo de absorção, melhorando a sensibilidade [40]. Além disso, o DAD fornece informações quantitativas e qualitativas⁴.

A ligação da cromatografia líquida à espectrometria de massa (LC-MS/MS) tem sido muito útil na caracterização de compostos naturais, nomeadamente os compostos fenólicos [41]. A espectrometria de massa é uma técnica instrumental baseada na separação de iões no vácuo, na fase gasosa de acordo com a sua relação massa/carga (m/z). As moléculas analisadas têm de ser primeiramente ionizadas, originando iões moleculares. Se estes iões moleculares tiverem energia interna suficiente, sofrem uma nova fragmentação formando os chamados “fragmentos”. Geralmente, cada fragmento derivado a partir do ião molecular pode voltar a sofrer nova fragmentação. Todos estes iões são separados no espectrómetro de massa de acordo com os seus respectivos m/z e são detectados. É então gerado um espectro de massa da molécula em estudo que se representa num gráfico, onde o eixo das ordenadas mostra a abundância dos iões e no eixo das abcissas figura os respectivos valores de m/z . Cada pico com uma intensidade elevada é conhecido como pico-base (*base peak*) [42]. Existem vários métodos de ionização que podem ser utilizados nas técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de

⁴ <http://biodiscovery.imb.uq.edu.au/Technologies/Dereplication/HPLCDAD/tabid/3525/Default.aspx>

massa. Uma das técnicas mais usadas é a ionização à pressão atmosférica (API, *atmospheric pressure ionization*) onde temos como exemplos a ESI (*electrospray ionization*) e a APCI (*atmospheric pressure chemical ionization*). Nos últimos anos o uso da ESI é frequente na LC acoplada à MS, uma vez que é uma técnica de ionização suave resultando em moléculas (des)protonadas. Esta permite a medição da massa exacta de moléculas pequenas, tornando-se muito útil para a determinação da fórmula elementar e conseqüentemente na identificação do composto desconhecido [41]. Esta técnica pode ser usada em modo ião negativo $[M - H]^-$ ou ião positivo $[M - H]^+$. A interpretação manual dos espectros de massa é feita baseada na determinação do peso molecular do composto e na análise dos fragmentos gerados no espectro.

II – MATERIAL E MÉTODOS

A presente dissertação engloba dois estudos distintos: numa primeira fase foi efectuada a extracção dos polifenóis totais de brócolos e de canónigos, seguindo-se a avaliação do seu poder antioxidante, através de diferentes técnicas espectrofotométricas (referidas nos Capítulos 1 e 2). Na segunda fase deste trabalho, procedeu-se à caracterização da composição fenólica de canónigos, através da cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por díodos acoplada à espectrometria de massa (HPLC-DAD-ESI/MS/MS), que serão descritas nos Capítulos 3 e 4.

Todas as informações sobre os reagentes e equipamentos utilizados ao longo da realização desta dissertação encontram-se no Anexo A.

A. AMOSTRAS

Os brócolos e os canónigos necessários para a execução do presente trabalho foram adquiridos em supermercados locais. Os brócolos foram adquiridos frescos enquanto os canónigos sob a forma de embalagem. Após a compra dos mesmos, procedeu-se à respectiva preparação dos extractos, descrito no ponto seguinte. 125 g de canónigos e 120 g de inflorescência de brócolos foram retirados das embalagens para posterior análise e caracterização das propriedades antioxidantes e perfil fenólico. Essa alíquota foi homogeneizada e reduzida de modo a que a porção a ser analisada fosse representativa da totalidade de todo o material amostrado.

B. PREPARAÇÃO DOS EXTRACTOS

Todas as extracções foram feitas em dois dias consecutivos de forma a prevenir a degradação das amostras e para assegurar que as condições de extracção seriam as mesmas para todos os ensaios.

Para otimizar a metodologia de extracção dos polifenóis em ambos os vegetais, usaram-se 3 solventes (metanol, acetona e água). Como técnicas de extracção usaram-se o agitador mecânico e o ultra-sons. A Ilustração 1 representa esquematicamente o procedimento experimental aplicado neste

trabalho, para cada amostra utilizada e para o solvente em estudo. Para cada solvente em estudo obtiveram-se 4 extractos, num total de 12 extractos de cada vegetal. Finda a extracção, cada extracto foi guardado a -20°C para posteriores análises. Todas as extracções foram feitas em duplicado.

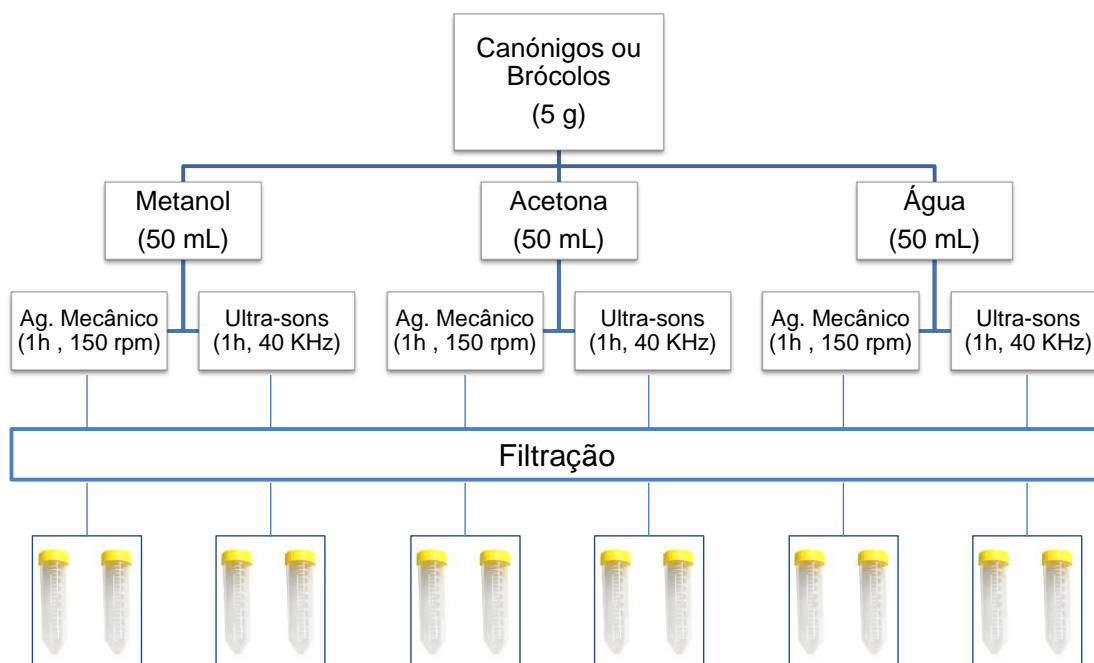


Ilustração 1 – Representação esquemática do procedimento experimental utilizado para a preparação dos diferentes extractos de brócolos e canónigos para as análises.

No fim, obtiveram-se um total de 12 extractos de brócolos e de 12 extractos de canónigos. Os extractos obtidos foram filtrados por vácuo e foram utilizados ao longo de todo o processo experimental.

1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS

Para a determinação dos polifenóis totais recorreu-se ao método de Folin-Ciocalteu (FC). O método baseia-se numa reacção redox, que ocorre em meio alcalino, sendo o ião fenolato oxidado e o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdídico presente no reagente reduzido a uma mistura de óxidos de tungsténio e molibdénio, que produzem uma cor azul com um máximo de absorção nos 765 nm. A coloração desenvolvida é proporcional ao teor de polifenóis totais presentes na amostra [43]. O reagente FC detecta todos os

grupos encontrados nos extractos, incluindo aqueles que se encontram ligados a proteínas. Como desvantagem, este método está sujeito a interferências de substâncias redutoras, tais como o ácido ascórbico [39].

1.1. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

Para a quantificação do TPT (teor de polifenóis totais) nos extractos de brócolos e de canónigos, recorreu-se ao método da curva de calibração, usando o ácido gálico como padrão.

❖ Preparação dos Padrões

Cada padrão foi preparado através da diluição de uma solução stock de 1000 mg/L de ácido gálico com água num balão volumétrico, de acordo com a tabela seguinte (Tabela 1.1):

Tabela 1. 1 – Soluções padrão do ácido gálico.

[Ác. Gálico] (mg/L)	Vol. Solução stock (mL)
5	0,050
10	0,100
25	0,250
50	0,500
100	1,000
150	1,500

❖ Preparação das Amostras

Os extractos de canónigos utilizados em todos os métodos espectrofotométricos realizados nesta dissertação, em metanol e em acetona (referenciados na Ilustração 2 deste mesmo capítulo) foram diluídos 10 vezes. Os extractos aquosos não sofreram diluição.

❖ Análise Espectrofotométrica

Após a preparação dos padrões (n=6) e das amostras (n=24) procedeu-se à análise espectrofotométrica. Para diferentes tubos de ensaio, pipetou-se uma

alíquota de 1 mL de padrão ou de amostra (ou água no caso do branco) e procedeu-se à adição de:

- 5 mL de reagente Folin-Ciocalteu 10 % (v/v)
- 5 minutos em repouso
- 4 mL da solução carbonato de sódio 7,5 % (m/v)

Seguidamente homogeneizou-se a mistura reaccional no *vortex* e guardaram-se os tubos de ensaio ao abrigo da luz durante 120 minutos. Decorrido o tempo de reacção, procedeu-se à leitura espectrofotométrica a um comprimento de onda (λ) de 740 nm contra o branco (água).

Os valores de absorvância correspondentes a cada padrão encontram-se na Tabela 1.2. A curva de calibração do ácido gálico está representada na Fig. 1.1.

Tabela 1. 2 – Resultados obtidos referente à curva de calibração para o método Folin-Ciocalteu.

[Ác. Gálico] (mg/L)	Absorvância (740 nm)
3,8	0,045
9,9	0,107
24,8	0,259
52,7	0,542
98,8	1,011
132,0	1,349

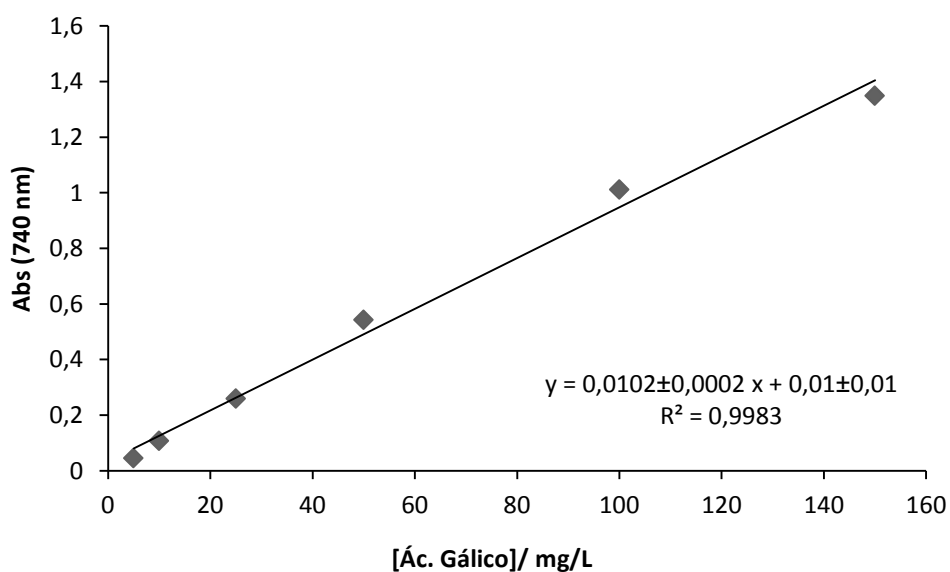


Fig. 1. 1 – Curva de calibração do ácido gálico.

Para cada extracto, o teor de polifenóis totais foi estimado com base na curva de calibração do ácido gálico através da expressão seguinte:

$$\text{TPT (mg}_{\text{GAE}}/100 \text{ g)} = \frac{(\text{Abs}_{(740 \text{ nm})} - b)}{m} * f$$

onde,

Abs (740 nm) = absorvância lida ao fim dos 120 minutos;

b = declive da recta;

m = ordenada na origem;

f = factor de diluição.

Os resultados são expressos em mg de ácido gálico equivalentes por 100 g de peso fresco.

2. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Existem vários métodos para avaliar a capacidade antioxidante dos vegetais. No presente estudo utilizaram-se quatro métodos: poder redutor (PR), FRAP, ABTS e DPPH. Os métodos PR e FRAP baseiam-se na habilidade que os antioxidantes apresentam para reduzirem $\text{Fe}^{3+} - \text{Fe}^{2+}$ onde medem directamente a capacidade redutora dos compostos presentes nas matrizes [44, 45]. Os métodos ABTS e DPPH medem a habilidade que os antioxidantes apresentam para sequestrar os radicais livres, no entanto estes radicais livres são produzidos de diferentes vias. O DPPH^{*} é um radical livre relativamente estável e pronto a ser utilizado; o ABTS^{*} é produzido pela reacção entre o ABTS e o persulfato de potássio [46]. As respectivas metodologias de cada método são descritas seguidamente (subcapítulos 2.1; 2.2; 2.3 e 2.4).

2.1. DETERMINAÇÃO DO PODER REDUTOR PELO MÉTODO HEXACIANOFERRATO DE POTÁSSIO

Este método fundamenta-se no facto de o poder redutor (PR) de um composto fenólico poder servir como potencial indicador da sua actividade antioxidante. O

método do hexacianoferrato de potássio usa o cloreto de ferro (FeCl_3) como oxidante, que na presença de agentes redutores na matriz em estudo (brócolos e canónigos) causa a redução do complexo Fe^{3+} /cianoferrato na forma férrica, detectado a um máximo de absorção de 700 nm. A cor amarela da mistura de reacção muda em diferentes tons de verde e azul dependendo do PR da amostra. Neste método, o aumento da absorvância da mistura é directamente proporcional ao PR [44]. A quantificação do PR é baseada numa curva de calibração, usando a quercetina como padrão.

2.1.1. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

Para a quantificação do poder redutor nos extractos de brócolos e canónigos, recorreu-se ao método da curva de calibração usando a quercetina como padrão.

❖ Preparação dos Padrões

Cada padrão foi preparado através da diluição de uma solução stock de 1000 mg/L de quercetina com metanol num balão volumétrico, de acordo com a tabela seguinte (Tabela 2.1):

Tabela 2. 1 – Soluções padrão de quercetina

[Quercetina] (mg/L)	Vol. Solução stock (mL)
5	0,050
10	0,100
25	0,250
50	0,500
100	1,000
150	1,500

❖ Análise Espectrofotométrica

Depois de preparar os padrões (n=6) e as amostras (n=24) procedeu-se à respectiva análise espectrofotométrica. Pipetou-se 1 mL de cada padrão ou de cada amostra (ou de metanol no caso do branco) em diferentes tubos de ensaio e adicionou-se por ordem:

- 2,50 mL de tampão fosfato (0,2 M, pH 6,6) e
- 2,50 mL de $K_3Fe(CN)_6$ 1% (m/v)

Agitou-se cada mistura de reação usando o *vortex* e colocaram-se os tubos de ensaio num banho termostatizado a 50°C durante 30 minutos. Após este tempo deixaram-se arrefecer os tubos e adicionou-se a cada um 2,50 mL de TCA 10%.

Desta mistura de reação, retiram-se 2,50 mL de cada tubo de ensaio e pipetaram-se para novos tubos de ensaio. A este volume adicionaram-se 2,50 mL de água e 0,50 mL de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,1% e homogeneizou-se. Procedeu-se de seguida à leitura da absorvância a 700 nm contra o branco (água).

Para a quantificação dos resultados foi então traçada a curva padrão que relaciona as diferentes concentrações de quercetina com os respectivos valores de absorvância obtidos (Tabela 2.2). A curva de calibração da quercetina está representada na Fig. 2.2.

Tabela 2. 2 – Resultados obtidos referente à curva de calibração para o método hexacianoferrato de potássio.

[Quercetina] (mg/L)	Absorvância (700 nm)
1,0	0,056
7,5	0,116
28,8	0,314
55,6	0,563
98,1	0,958
149,1	1,432

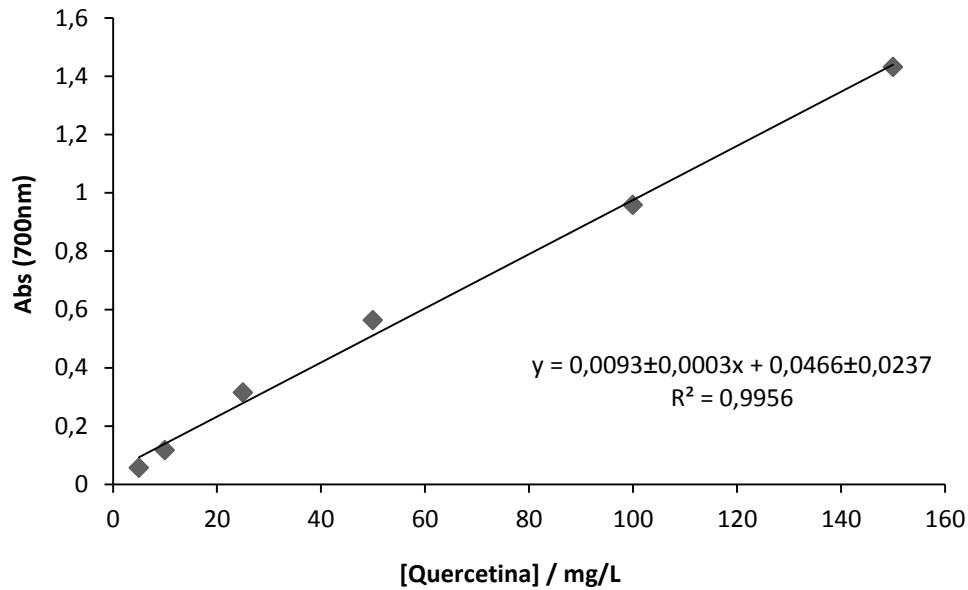


Fig. 2. 1 – Curva de calibração da quercetina.

Para cada extracto obtido o poder redutor foi determinado usando a expressão seguinte:

$$PR \text{ (mg}_{QE}/100 \text{ g)} = \frac{\left(\frac{Abs (700 \text{ nm}) - b}{m} \right)}{PF} * f * 0,005$$

onde,

$Abs (700 \text{ nm})$ = absorvância lida;

b = declive da recta;

m = ordenada na origem;

f = factor de diluição;

PF = peso fresco.

Os resultados são expressos em mg de quercetina equivalentes por 100 g de peso fresco.

2.2. MÉTODO DO FRAP (*FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER*)

Este método baseia-se na capacidade que os antioxidantes (dadores de electrões) apresentam para reduzirem, a pH ácido (3,6), o complexo incolor

[Fe³⁺-TPTZ] ao complexo de cor azul intenso [Fe²⁺-TPTZ] com uma absorção máxima de 593 nm. A quantificação é feita através da construção de uma curva de calibração, usando o trolox como padrão. O aumento da absorvância da mistura de reacção representa um forte poder redutor/antioxidante.

2.2.1. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

Para a quantificação da capacidade antioxidante nos extractos de brócolos e de canónigos, recorreu-se ao método da curva de calibração usando o trolox como padrão.

❖ Preparação dos Padrões

Cada padrão foi preparado através da diluição da solução stock de 1000 mg/L de trolox com metanol num balão volumétrico, de acordo com a tabela seguinte (Tabela 2.3):

Tabela 2.3 – Soluções padrão de trolox

[Trolox] (mg/L)	Vol. Solução stock (mL)
5	0,050
10	0,100
25	0,250
50	0,500
100	1,000
150	1,500

❖ Análise Espectrofotométrica

Após a preparação de todos os padrões (n=6) e de todas as amostras (n=24) procedeu-se à respectiva análise espectrofotométrica. Em cada tubo de ensaio, pipetou-se 0,150 mL de padrão ou amostra (ou metanol no caso do branco) e 2,850 mL da solução FRAP. Com a ajuda do *vortex*, homogeneizaram-se todas as misturas de reacção. Taparam-se todos os tubos de ensaio com parafilme e deixaram-se a repousar durante 30 minutos à temperatura ambiente. Findo o tempo de reacção leram-se as absorvâncias a um λ de 593 nm.

Os valores de absorvância correspondentes a cada padrão encontram-se na Tabela 2.4, bem como a curva de calibração do trolox está representada na Fig. 2.3.

Tabela 2. 4 – Resultados obtidos referente à curva de calibração para o método FRAP.

[Trolox] (mg/L)	Absorvância (593 nm)
5,9	0,100
11,7	0,151
26,3	0,279
44,4	0,438
100,4	0,930
151,2	1,376

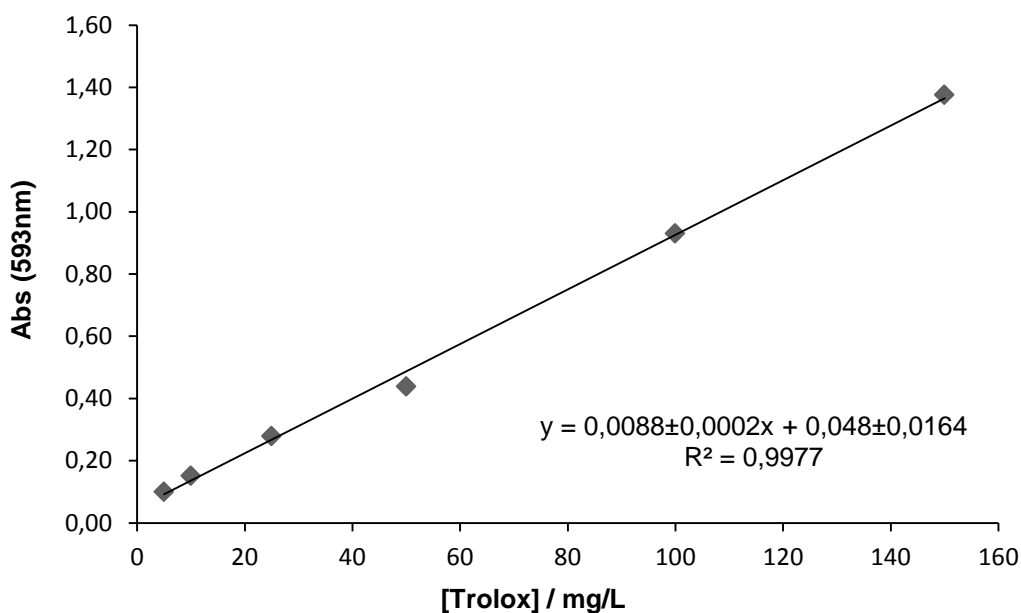


Fig. 1. 2 – Curva de calibração do trolox.

Para cada um dos extractos obtidos, a capacidade antioxidante foi determinada utilizando a expressão seguinte:

$$\text{FRAP (mg}_{\text{TE}}/100 \text{ g)} = \frac{\left(\frac{\text{Abs (593 nm)} - b}{m} \right)}{\text{PF}} * f$$

onde,

Abs (593 nm) = absorvância lida ao fim de 30 minutos;

b = declive da recta;

m = ordenada na origem;

f = factor de diluição;

PF = peso fresco.

Os resultados são expressos em mg de trolox equivalentes por 100 g de peso fresco.

2.3. MÉTODO DO ABTS

Este método (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-acidosulfónico)) baseia-se na capacidade que os antioxidantes presentes na matriz têm em sequestrar o radical $ABTS^{*+}$, comparado com o antioxidante padrão (trolox). Neste ensaio, o ABTS é convertido no seu catião radical ($ABTS^{*+}$) após a adição do persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) [47]. Durante a reacção, a cor azul-roxo intensa vai atenuando até ficar incolor consoante os antioxidantes presentes na matriz. Este facto deve-se ao desaparecimento do radical $ABTS^{*+}$ que é medido a 734 nm. O decréscimo da absorvância é um factor indicativo da presença de compostos com capacidade antioxidante elevada.

2.3.1. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES

Tal como aconteceu no método do FRAP, para a quantificação da capacidade antioxidante nos extractos dos brócolos e dos canónigos, recorreu-se ao método da curva de calibração usando o trolox como padrão.

❖ Preparação dos Padrões

Cada padrão foi preparado através da diluição da solução stock de 1000 mg/L de trolox com metanol num balão volumétrico, de acordo com a tabela seguinte (Tabela 2.5):

Tabela 2. 5 – Soluções padrão do trolox

[Trolox] (mg/L)	Vol. Solução stock (mL)
5	0,050
10	0,100
25	0,250
50	0,500
100	1,000
150	1,500

❖ Análise Espectrofotométrica

Após a preparação de todos os padrões (n=6) e de todas as amostras (n=24) procedeu-se à respectiva análise espectrofotométrica. Em cada tubo de ensaio pipetou-se 0,150 mL de extracto (ou metanol no caso do branco) e 2,850 mL da solução ABTS^{•+}. Com a ajuda do *vortex*, homogeneizaram-se todas as misturas de reacção. Taparam-se os tubos de ensaio com parafilme e deixaram-se a repousar durante 2 horas no escuro à temperatura ambiente. Terminado o tempo de reacção, leram-se as absorvâncias a 734 nm.

Os valores de absorvância correspondente a cada padrão encontram-se na Tabela 2.6, bem como a curva de calibração do trolox está representada na Fig. 2.4. Os valores referentes aos padrões 5 e 150 ppm foram rejeitados, uma vez que extrapolavam a recta.

Tabela 2. 6 – Resultados obtidos referente à curva de calibração para o método ABTS.

[Trolox] (mg/L)	Absorvância (734 nm)
11,2	0,615
24,2	0,551
49,1	0,428
100,5	0,174

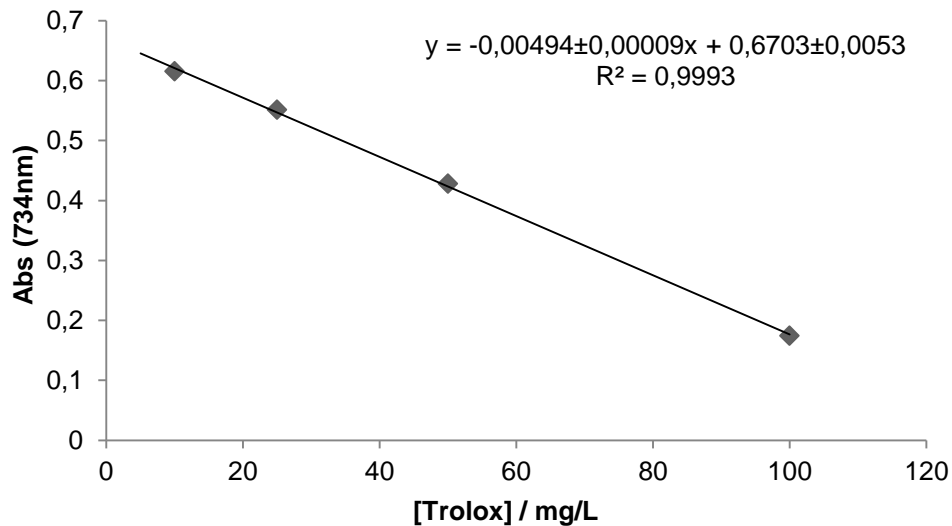


Fig. 1. 3 – Curva de calibração do trolox.

Para os extractos de brócolos e canónigos a capacidade antioxidante foi determinada utilizando a expressão seguinte:

$$\text{ABTS (mg}_{\text{TE}}/100 \text{ g)} = \frac{\left(\frac{\text{Abs (734 nm)} - b}{m} \right)}{\text{PF}} * f$$

onde,

Abs (734 nm) = absorvância lida ao fim de 2 horas;

b = declive da recta;

m = ordenada na origem;

f = factor de diluição;

PF = peso fresco.

Os resultados são expressos em mg de trolox equivalentes por 100 g de peso fresco.

2.4. MÉTODO DO DPPH

Neste método (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), o radical DPPH[•] na presença de um electrão ou de um dador de hidrogénio reduz-se, tornando-se numa molécula estável. Os antioxidantes presentes na matriz em estudo reagem com o radical

DPPH[•] originando a α,α -difeníl- β -picrilhidrazina, que pode ser observado pela mudança da cor violeta escuro, que lhe é característica, em amarelo [48]. Esta descoloração pode ser quantificada através da medição da absorvância a 515 nm. A actividade anti-radicalar é definida como a quantidade de antioxidantes necessários para reduzirem em 50% a concentração inicial do radical DPPH[•] (EC₅₀). O poder anti-radicalar (PAR) é calculado como 1/EC₅₀ [2, 49]. Por dedução, quanto menor for EC₅₀, maior será o PAR [50].

2.4.1. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES

Para a execução deste método, foram necessárias fazer diluições de cada um dos extractos (que se encontram referenciados na Ilustração 2 deste mesmo capítulo) nas diferentes condições em ambos os vegetais (Tabela 2.7). O metanol e a acetona foram usados para as diluições dos extractos em metanol e acetona, respectivamente. No caso dos extractos em água, as diluições foram feitas com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,3.

Tabela 2. 7 – Tipo de diluições realizadas para cada extracto dos brócolos e canónigos.

Brócolos	Canónigos
	1:2
Sem diluir	1:3
1:3	1:4
1:4	1:8

❖ Análise Espectrofotométrica

Após a preparação de todas as amostras (n=18 para os brócolos e n=24 para os canónigos), procedeu-se à respectiva análise espectrofotométrica de cada diluição. Para cada tubo de ensaio foram adicionados os componentes indicados na Tabela 2.8.

Tabela 2. 8 – Preparação de cada mistura reaccional.

	Amostras	Branco	Controlo
DPPH [•] (mL)	2,850	0	2,850
Extracto diulido (mL)	0,150	0	0
Metanol ou Tampão acetato (mL)	0	3,000	0,150

Com a ajuda do *vortex*, homogeneizaram-se todas as misturas de reacção. Taparam-se os tubos de ensaio com parafilme e deixaram-se a repousar durante 120 minutos no escuro à temperatura ambiente. Terminado o tempo de reacção, leram-se as absorvâncias a 515 nm.

Para calcular a % de DPPH que não reagiu em cada mistura reaccional, usou-se a expressão seguinte:

$$\% \text{ DPPH (que não reagiu)} = \frac{\text{Abs (amostra)}}{\text{Abs (controlo)}} * 100$$

onde,

Abs = absorvância lida ao fim de 120 minutos.

A concentração de compostos fenólicos presentes em cada célula de leitura foi determinada através da seguinte expressão:

$$[\text{Compostos fenólicos}] = \frac{0,150 * 1000}{20 * f}$$

onde,

0,150 = volume de extracto na célula;

1000 = factor de conversão;

20 = factor de diluição na célula;

f = factor de diluição nos extractos (varia entre 4 a 20).

Com os valores de DPPH que não reagiu e da concentração para cada diluição, construiu-se um gráfico do tipo % DPPH (que não reagiu) = f (concentração). A partir de cada equação da recta, calculou-se o valor de EC₅₀ para cada extracto, segundo a expressão que se segue:

$$EC_{50} = \frac{(50-b)}{m}$$

onde,

m = declive da recta;

b = ordenada na origem.

Por fim, o poder anti-radicalar (PAR) é calculado da seguinte maneira:

$$PAR (\%) = \frac{1}{EC_{50}} * 100$$

Os resultados são expressos em % de poder-antiradicalar.

3. ESTUDO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA DOS CANÓNICOS POR HPLC-DAD-ESI/MS/MS

Para a determinação da composição fenólica dos canónigos foi utilizada a técnica HPLC-DAD-ESI/MS/MS. Geralmente, para a separação de compostos fenólicos em vegetais, as condições mais usuais incluem o uso de uma coluna de fase reversa RP- C₁₈ e um sistema binário de solventes que contém água acidificada (com ácido fosfórico, sulfúrico, acético ou fórmico) e um solvente menos polar (metanol ou acetonitrilo) [14]. Para a separação e identificação dos compostos fenólicos presentes nos extractos de canónigos foi usada uma coluna RP- C₁₈.

Como já anteriormente referido, a descrição dos equipamentos encontra-se no Anexo A. As condições cromatográficas optimizadas utilizadas na HPLC-DAD com o objectivo de separar os compostos fenólicos são as seguintes:

- FASE ESTACIONÁRIA: conjunto pré-coluna (4.0 mm x 3.0 mm, 4 µm) e coluna Synergi Hydro-RP C₁₈ (150 mm x 4.6 mm, 4 µm) de *Phenomenex*;

- **FASE MÓVEL:** solução aquosa de 0,1 % de ácido acético (A) e metanol para HPLC (B). O fluxo usado foi de 0,500 mL.min⁻¹ nas seguintes condições de gradiente:
 - Início da injeção (0 minutos): 5 % de A e 95 % de B;
 - Dos 0 aos 70 minutos: de 5 % a 58 % de A;
 - Dos 70 aos 100 minutos: de 58 % a 100 % de A;
 - Dos 100 aos 130 minutos: 100 % de A volta aos 5 %.
- **COMPRIMENTO DE ONDA DE DETECÇÃO:** 280 nm (DAD).

Para a identificação dos picos obtidos por HPLC-DAD recorreu-se à utilização do espectrómetro de massa (HPLC-ESI/MS/MS) As condições cromatográficas encontram-se descritas na Tabela 3.1:

Tabela 3. 1 – Condições utilizadas na análise da composição fenólica do extracto em metanol dos canónigos por HPLC-DAD-ESI/MS/MS

Fase Estacionária: pré-coluna (4.0 mm x 3.0 mm, 4 µm) e coluna Synergi Hydro-RP C ₁₈ (150 mm x 4.6 mm, 4 µm) ambos da <i>Phenomenex</i> ;	
Fase Móvel: solução aquosa de 0,1 % de ácido acético (A) e metanol para HPLC (B). O fluxo usado foi de 0,5 mL.min ⁻¹ nas seguintes condições de gradiente: <ul style="list-style-type: none"> - Início da injeção (0 minutos): 5 % de B e 95 % de A; - Dos 0 aos 70 minutos: de 5 % a 58 % de B; - Dos 70 aos 100 minutos: de 58 % a 100 % de B; - Dos 100 aos 130 minutos: 100 % de B volta aos 5 %. 	
Espectrómetro de Massa:	
Fonte de Ionização: <i>Electrospray</i> em modo positivo, [M + H] ⁺ ;	
Analisador de massa: Quadrupolo/Ion Trap (equipamento do tipo híbrido)	
Parâmetros de detecção:	
- Intensidade da descarga na fonte: 80,0 µA	- Energia de colisão: 35,0 V
- Voltagem da fonte de ionização: 5,0 kV	- Temperatura do capilar: 325 °C
- Voltagem do capilar: 4,0 V	- Intervalo de massa: 120-2000 m/z

4. QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO CLOROGÉNICO NOS CANÓNIGOS

Uma vez que é o ácido clorogénico o principal composto fenólico presente na matriz dos canónigos, procedeu-se à respectiva quantificação utilizando uma curva padrão estabelecida para as concentrações que se apresentam na tabela 4.1..

❖ Preparação dos Padrões

Solução stock do ACG (5 g/L): Pesaram-se 0,125 g de ácido clorogénico e dissolveram-se em metanol. Transferiu-se o volume para um balão volumétrico de 25 mL e fez-se o volume total com metanol.

Todos os padrões foram preparados através da diluição da solução mãe de 5000 mg/L com água num balão volumétrico, de acordo com a Tabela 4.1:

Tabela 4. 1 – Soluções padrão ácido clorogénico.

[ACG] (mg/L)	Vol. Solução stock (mL)
5	0,050
10	0,100
25	0,250
50	0,500
100	1,000
150	1,500
200	2,000

A curva de calibração foi então construída onde no eixo das abcissas aparece a [ACG] expressa em mg/L e no eixo das ordenadas a área de cada pico correspondente a cada padrão, expressa em mAU.min, Fig. 4.1. Os valores da área obtidos para cada um dos padrões encontram-se descritos na Tabela 4.2.

Tabela 4. 2 – Valores da área obtidos para cada padrão do ácido clorogénico.

Padrões de ACG (mg/L)	Área (mAU.min)
5	8,9
10	19,5
25	52,7
50	101,9
100	219,1
150	334,9
200	449,3

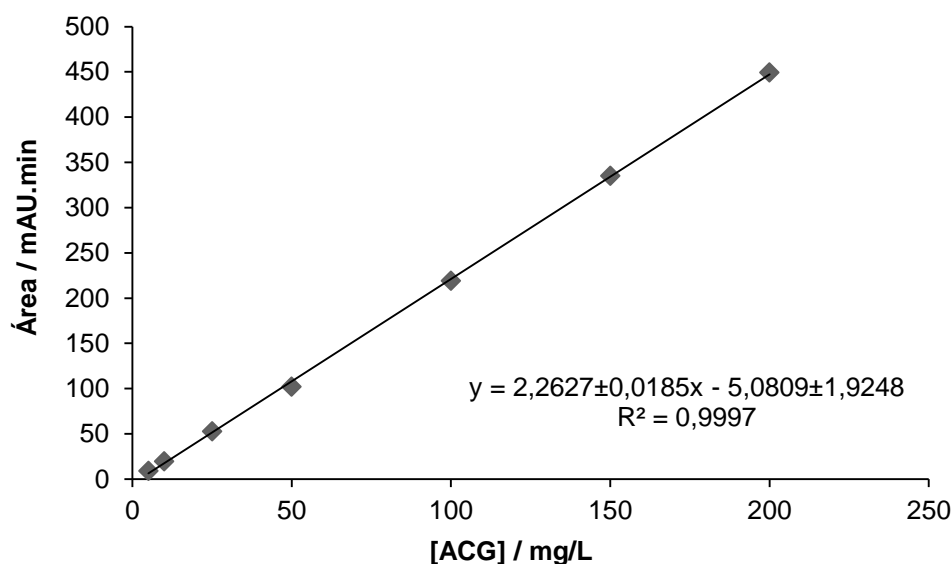


Fig. 4. 1 – Curva de calibração do ACG.

4.1. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

O método utilizado na quantificação do teor de ACG nos canónigos, foi validado em termos de linearidade e limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). A linearidade foi avaliada pela análise dos padrões do ácido clorogénico num intervalo de 5 a 200 mg/L (n=7). A recta foi construída pela razão entre as áreas (mAU.min) dos picos em função da concentração (mg/L) do ácido clorogénico.

A precisão do método de extracção foi avaliada pela determinação da repetibilidade (variabilidade *intra-day*) e pela precisão intermédia (variabilidade

inter-day) nos extractos metanólicos de canónigos. Assim, a repetibilidade foi estimada pelo coeficiente de variação (CV) de cinco extracções repetidas da mesma amostra no mesmo dia (precisão *intra-day*) e os ensaios *inter-day* foram realizados em três dias consecutivos, repetindo cinco extracções em cada dia.

5. ANÁLISE DE DADOS

O tratamento de dados e a elaboração de gráficos necessários para o presente estudo foram realizados utilizando os softwares SigmaPlot 10.0, *HighChem MassFrontier* 1.0 e o Microsoft® Office Excel® 2007. O software Chrompass foi utilizado na medição das áreas dos picos dos cromatogramas resultantes da análise dos extractos dos canónigos por HPLC-DAD.

No sentido de validar as técnicas espectrofotométricas na determinação do teor de polifenóis totais (TP) e da capacidade antioxidante (CA) nos brócolos e nos canónigos, empregou-se o teste-*t* de *student* (duas variáveis) e o factor único ANOVA (três variáveis).

O nível de significância considerado para a diferença entre as médias foi de 5% ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas em duplicado e os resultados apresentados como média \pm desvio padrão.

III – RESULTADOS EXPERIMENTAIS

1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS NOS BRÓCOLOS E CANÓNICOS

Os resultados obtidos para o TP encontram-se na Tabela 1.1 para cada um dos extractos obtidos, expressos em equivalentes de ácido gálico – GAE por 100 g de peso fresco (PF).

Tabela 1. 3 – TPC para os diferentes extractos de brócolos e canónigos, expressos em $\text{mg}_{\text{GAE}}/100 \text{ g PF}$.

	Brócolos		Canónigos	
	Ultra-sons	Agitador mecânico	Ultra-sons	Agitador mecânico
Metanol	108± 6 ^a	102,5±0,1 ^a	255±8	278±27
Acetona	85±3 ^a	89±1 ^a	274,3±0,5	280±13
Água	2,5±0,1 ^a	2,8±0,7 ^a	7±2 ^a	6±1 ^a

a - Diferença estatisticamente significativa entre os solventes testados, $p < 0,05$.

Os resultados mostram um TP máximo de $280\pm 13 \text{ mg}_{\text{GAE}}/100 \text{ g PF}$ para os canónigos e $108\pm 6 \text{ mg}_{\text{GAE}}/100 \text{ g PF}$ para os brócolos. Assim, poder-se-á dizer que os canónigos apresentam um teor de polifenóis totais cerca de 2 a 3 vezes superior ao dos brócolos. Em relação aos três solventes testados (em ambas as técnicas de extracção), a água revelou menor eficiência na extracção dos polifenóis, tanto nos brócolos como nos canónigos ($p < 0,05$).

No caso dos canónigos não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre a acetona e o metanol. Para os brócolos existe diferença significativa entre estes dois solventes ($p < 0,05$) onde o metanol foi o solvente mais eficiente na extracção dos polifenóis, obtendo um TPC de $108\pm 6 \text{ mg}_{\text{GAE}}/100 \text{ g PF}$ (ultra-sons).

Relativamente ao tipo de extracção estudada, não existe diferença estatisticamente significativa entre o agitador mecânico e o ultra-sons ($p > 0,05$) para ambos os vegetais, mostrando que a técnica de extracção usada não influenciou a extracção dos polifenóis. Esta observação verifica-se para todos os métodos espectrofotométricos utilizados ao longo do trabalho experimental.

2. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

2.1. DETERMINAÇÃO DO PODER REDUTOR PELO MÉTODO HEXACIANOFERRATO DE POTÁSSIO

A Tabela 2.1 mostra o PR obtido para cada extracto dos brócolos e dos canónigos, expressos em equivalentes de quercetina – QE por 100 g de peso fresco.

Tabela 2.1 – PR para os diferentes extractos de brócolos e canónigos, expressos em $\text{mg}_{\text{QE}}/100 \text{ g PF}$.

	Brócolos		Canónigos	
	Ultra-sons	Agitador mecânico	Ultra-sons	Agitador mecânico
Metanol	99±5 ^a	105,1±0,7 ^a	217±13	238±7
Acetona	71±4 ^a	74±1 ^a	207±9	216±10
Água	ND	ND	ND	ND

ND – não detectado

a - Diferença estatisticamente significativa entre os solventes testados, $p < 0,05$.

A Tabela 2.1 mostra que os extractos de canónigos apresentam um PR superior ao dos brócolos, cerca de 2 vezes superior para os extractos em metanol e 3 vezes para os extractos em acetona. Neste método, não foi detectado poder redutor nos extractos onde foi usado água como solvente extractor.

Quando se avalia a influencia do solvente de extracção na capacidade redutora, constata-se que enquanto para os brócolos o extracto metanólico apresenta actividade significativamente superior ao extracto da acetona ($p < 0,05$), no caso dos canónigos não se observam diferenças estatisticamente significativas entre os dois solventes.

2.2. MÉTODO DO FRAP (*FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER*)

A Tabela 2.2 mostra a capacidade antioxidante obtida para cada extracto dos brócolos e dos canónigos, expressos em equivalentes de trolox – TE por 100 g de peso fresco.

Tabela 2.2 – CA para os diferentes extractos de brócolos e canónigos, expressos em mg_{TE}/100 g PF.

	Brócolos		Canónigos	
	Ultra-sons	Agitador mecânico	Ultra-sons	Agitador mecânico
Metanol	117±7 ^a	104±6 ^a	316±7	341±41
Acetona	62±2 ^a	54±4 ^a	321±15	327,2±0.7
Água	1,76±0,08 ^a	2,9±0,2 ^a	7±2 ^a	4±1 ^a

a - Diferença estatisticamente significativa entre os solventes testados, $p < 0,05$.

Através da análise da Tabela 2.2, torna-se perceptível a diferença da capacidade antioxidante entre os brócolos e os canónigos, cerca de três vezes superior para os canónigos. Além disso, tal como nos métodos anteriores a água foi o solvente menos eficaz comparativamente com o metanol e a acetona ($p < 0,05$) na extracção dos compostos fenólicos para ambos os vegetais, e por consequente, estes foram os extractos que apresentaram menores valores de capacidade antioxidante.

Relativamente aos outros dois solventes testados (metanol e acetona), para os brócolos volta a existir diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), tendo sido os extractos em metanol que apresentaram valores superiores de capacidade antioxidante. No caso dos canónigos não houve influência por parte destes dois solventes ($p > 0,05$).

2.3. MÉTODO DO ABTS

A Tabela 2.3 mostra a capacidade antioxidante obtida para cada extracto dos brócolos e dos canónigos, expressos em mg de TE por 100 g de peso fresco.

Tabela 2.3 – CA para os diferentes extractos de brócolos e canónigos, expressos em mg_{TE}/100 g PF.

	Brócolos		Canónigos	
	Ultra-sons	Agitador mecânico	Ultra-sons	Agitador mecânico
Metanol	201±4 ^a	193±9 ^a	571±10	617±82
Acetona	104±1 ^a	113±13 ^a	546±19	540±50
Água	26,3±0,3 ^a	23±1 ^a	28±2 ^a	39±22 ^a

a - Diferença estatisticamente significativa entre os solventes, $p < 0,05$.

Mais uma vez a diferença é notável entre os brócolos e os canónigos: de 23±1 a 201±4 mg_{TE}/100 g PF e de 28±2 a 617±82 mg_{TE}/100 g PF, respectivamente. Tal como os resultados anteriores, a água voltou a ser o solvente menos eficaz relativamente ao metanol e a acetona (ANOVA $p < 0,05$).

Analisando os resultados dos brócolos, o tipo de solvente (metanol e acetona) voltou a mostrar influência na extracção ($p < 0,05$), uma vez que os extractos em metanol apresentaram maior capacidade antioxidante do que os extractos em acetona (aproximadamente 2 vezes). No caso dos canónigos esta diferença não foi significativa ($p > 0,05$). No entanto, apesar dos extractos em metanol (agitador mecânico) terem apresentado uma capacidade antioxidante de 617±82 mg_{TE}/100 g de PF, é de salientar o valor elevado do desvio padrão (±82) que poderá ser resultado de erros cometidos por parte do operador durante a execução do ensaio.

2.4. ENSAIO DO DPPH

A tabela seguinte mostra o poder anti-radicalar (PAR) para cada extracto dos brócolos e dos canónigos, expressos em % de PAR.

Tabela 2. 4 – Poder anti-radicalar obtido para cada extracto de brócolos e canónigos, expressos em % PAR.

	Brócolos		Canónigos	
	Ultra-sons	Agitador mecânico	Ultra-sons	Agitador mecânico
Metanol	11,3±0,1 ^a	9,4±0,7 ^a	48,53±0,03 ^a	56±8
Acetona	4,44±0,07 ^a	4,0±0,5 ^a	86±12 ^a	58±5
Água	ND	ND	ND	ND

ND – não detectado

a - Diferença estatisticamente significativa entre os solventes, $p < 0,05$.

Pela análise da Tabela 2.4, verifica-se novamente que os canónigos apresentam um poder anti-radicalar superior (86 ± 12 % PAR) aos dos brócolos ($11,3\pm 0,1$ % PAR). Tal como aconteceu no método do PR, os extractos em água para ambos os vegetais não evidenciaram PAR.

No caso dos brócolos existe novamente diferença estatisticamente significativa entre a acetona e o metanol ($p < 0,05$), aproximadamente 2 a 3 vezes superior para o metanol.

Para os canónigos houve uma ligeira diferença de resultados em relação aos métodos anteriores. Para o ultra-sons os extractos que apresentaram maior poder anti-radicalar foram os extractos em acetona com 86 ± 12 % PAR e os extractos em metanol mostraram apenas $48,53\pm 0,03$ % PAR. No caso do agitador mecânico não houve diferença significativa entre os dois solventes ($p > 0,05$).

3. ESTUDO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA DOS CANÓNICOS ATRAVÉS DA HPLC-DAD-ESI/MS/MS

3.1. OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRACÇÃO

Para se proceder ao estudo da composição fenólica nos extractos de canónigos, verificou-se inicialmente a influência do solvente e da técnica de extracção por HPLC-DAD uma vez que esta técnica é mais específica que os métodos espectrofotométricos anteriormente utilizados.

As figuras que se seguem ilustram os cromatogramas obtidos para a influência do solvente usado (Fig. 3.1) e da técnica de extracção (Fig. 3.2). A identificação correspondente de cada pico será feita no Subcapítulo 3.2.

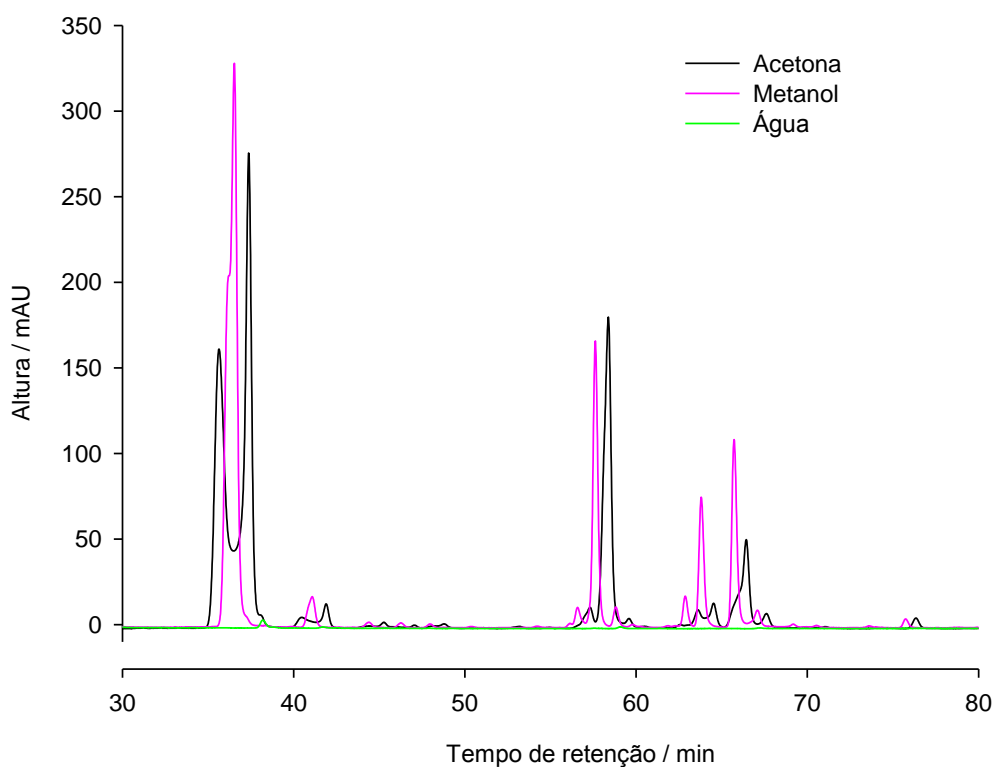


Fig. 3.1 – Cromatogramas obtidos para os diferentes extractos usando solventes diferentes para os canónigos através de HPLC-DAD a 280 nm.

Através da análise da Fig. 3.1 poder-se-á confirmar que o solvente mais eficaz na extracção dos polifenóis dos canónigos é o metanol. Isto porque foi com o metanol que se obteve um cromatograma com picos mais simétricos e

consequentemente mais estreitos, com áreas mais elevadas em comparação com os picos obtidos para a acetona como solvente extractor. Já o cromatograma obtido com a água como solvente não evidenciou nenhum pico. A figura seguinte (Fig. 3.2) mostra de uma forma clara que a técnica de extracção mais eficaz para a extracção dos polifenóis no caso dos canónigos é o agitador mecânico.

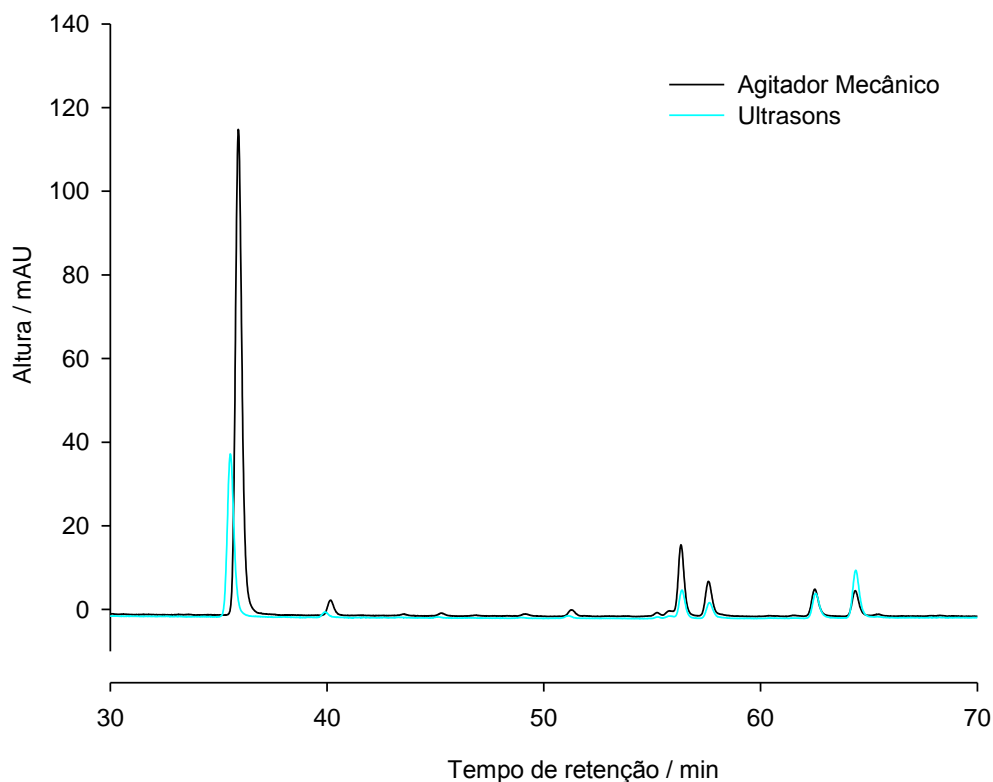


Fig. 3. 2 – Cromatogramas obtidos para os extractos metanólicos utilizando diferentes técnicas de extracção para os canónigos a 280 nm.

Assim, as condições de extracção utilizadas em estudos posteriores foram o metanol como solvente extractor e o agitador mecânico como técnica de extracção.

3.2. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA DOS CANÓNICOS

3.2.1. IDENTIFICAÇÃO ATRAVÉS DE HPLC-DAD

A Fig. 3.3 mostra o cromatograma obtido para o extracto metanólico dos canónigos a um λ de 280 nm. Seguidamente será efectuada a caracterização deste mesmo extracto por espectrometria de massa, assim como uma análise pormenorizada para cada pico.

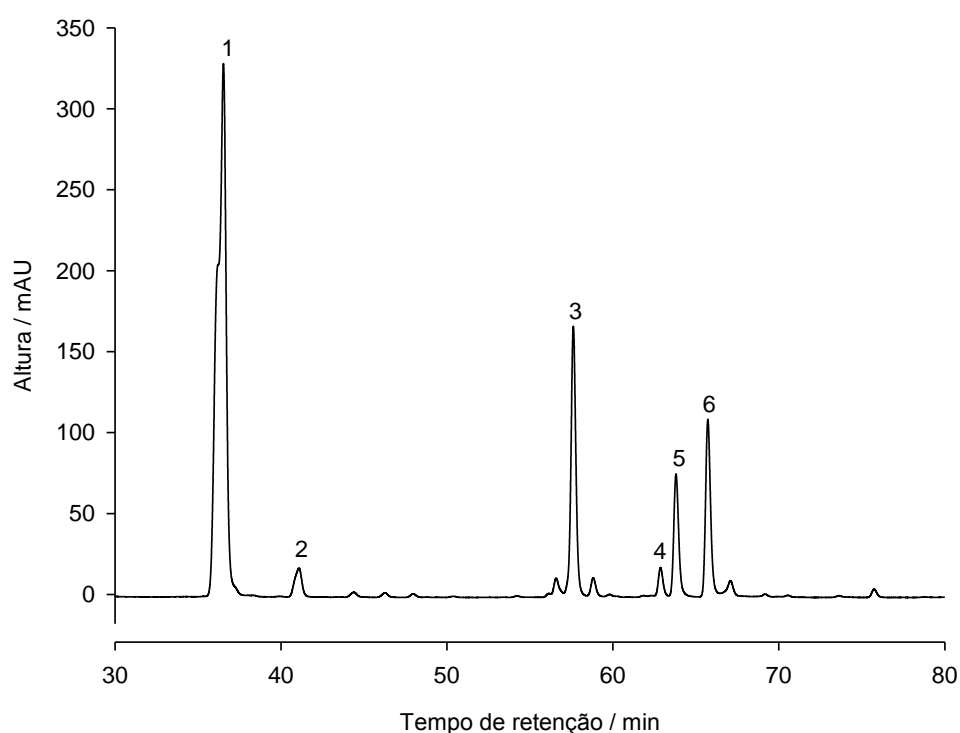


Fig. 3.3 – Cromatograma obtido para o extracto metanólico dos canónigos através a 280 nm.

3.2.2. CARACTERIZAÇÃO DO EXTRACTO METANÓLICO ATRAVÉS DE HPLC-ESI/MS/MS

Devido à possível formação de aductos e a interferências de pureza com a linha de base, houve a necessidade de analisar os picos 3, 4 e 5 em modo negativo, $[M - H]^-$. As condições de análise foram as mesmas que as descritas no Quadro 3.1 (Capítulo 3 do Material e Métodos), com a excepção do solvente A onde foi usado 0,1% de ácido fórmico em vez de ácido acético.

A Tabela 3.1 descreve resumidamente a composição fenólica para o extracto metanólico.

Tabela 3. 1 – Composição fenólica do extracto metanólico dos canónigos, através da HPLC-ESI/MS/MS.

Pico	t _R (min)	λ _{max} (nm)	[M + H] ⁺ / [M - H] ⁻	MS ²	MS ³	Identificação	Referências
1	36.6	324	355 / -	163 (100)	145 (100) 117 (35)	Ácido clorogénico	Clifford <i>et al.</i> , 2007 Clifford <i>et al.</i> , 2008
2	40.7	316	372 / -	355 (100) 163 (30) 193 (25)	163 (100)	Composto desconhecido	Gouveia <i>et al.</i> , 2009 Clifford <i>et al.</i> , 2007
3	57.7	329	- / 515	353 (100)	191 (100) 179 (85)	Ácido 1,3-dicafeoilquínico	Schütz <i>et al.</i> , 2005 Gouveia <i>et al.</i> , 2009
4	62.5	329	- / 515	353 (100)	179 (100) 173 (80) 191 (40) 135 (30)	Ácido 4,5-dicafeoilquínico	Schütz <i>et al.</i> , 2005 Gouveia <i>et al.</i> , 2009 Clifford <i>et al.</i> , 2005
5	63.8	344	- / 593	299 (100) 284 (20)	284 (100)	Luteolina 7-O-rutinósido	Schütz <i>et al.</i> , 2005
6	66.0	344	609 / -	463 (100) 301 (40)	301 (100)	Diosmetina 7-O-rutinósido	Lin <i>et al.</i> , 2007

✓ PICO 1 – ÁCIDO CLOROGÉNICO

O pico 1 (t_R = 36,6 minutos) exibiu um ião [M + H]⁺ de m/z 355, que é indicativo de um peso molar de 354, o que corresponde à massa molar do ácido clorogénico [51]. A sua fragmentação MS² produziu um ião [cafeoil + H]⁺ de m/z 163. Este por sua vez originou um ião de m/z 145 (18 Da, expulsão de uma molécula de H₂O).

✓ PICO 2 – COMPOSTO DESCONHECIDO

O 2º pico, com um tempo de retenção de 40,7 minutos, apresentou um ião [M + H]⁺ de m/z 372. A sua fragmentação produziu um ião [ác. clorogénico + M]⁺ de m/z 355, um segundo ião [cafeoil + H]⁺ de m/z 163 e ainda outro ião [ác. quínico + H]⁺ de m/z 193. O fragmento de m/z 355 originou no MS³ o ião [cafeoil + H]⁺ de m/z 163. Uma vez que o padrão de fragmentação é o mesmo do ácido clorogénico, poderá sugerir de que se trate do ácido clorogénico

ligado a uma molécula de água, já que a diferença entre m/z 372 e 355 é de 18 Da (molécula de água).

✓ PICO 3 – ÁCIDO 1,3-DICAFEOLQUÍNICO

Aos 57,7 minutos identificou-se um ião $[M - H]^-$ de m/z 515, típico dos ácidos dicafeoilquínicos que apresentam um peso molar de 516. A fragmentação deste composto originou um ião [ác. clorogénico - H]⁻ de m/z 353. Este por sua vez produziu um ião [ác. quínico - H]⁻ de m/z 191, que é resultante da substituição de um grupo OH na posição 3 do ácido quínico para se ligar o 2º grupo cafeoil [13] e um segundo ião [ác. cafeico - H]⁻ de m/z 179 com 85% de intensidade.

✓ PICO 4 – ÁCIDO 4,5-DICAFEOLQUÍNICO

O 4º composto saiu aos 62,5 minutos e exibiu um ião $[M - H]^-$ de m/z 515 (peso molar = 516), sugerindo que também se trata de um ácido dicafeoilquínico. A sua fragmentação produziu um ião [ác. clorogénico - H]⁻ de m/z 353 que por sua vez originou um ião [ác. cafeico - H]⁻ de m/z 179 e um outro ião [ác. quínico - H⁺ - H₂O] de m/z 173.

Em alguns casos este composto pode ser confundido com um isómero, o 3,4-diCQA. De acordo com estudos efectuados [13, 52] é possível distingui-los uma vez que diferem na intensidade do ião de m/z 335 no MS². No caso do isómero 3,4-diCQA este ião aparece com maior intensidade (\pm 15%), enquanto no isómero 4,5-diCQA o ião aparece com uma intensidade menor que 5% ou em alguns casos é inexistente (como acontece na matriz em estudo). Assim, o pico 4 foi identificado como o ácido 4,5-dicafeoilquínico.

✓ PICO 5 – LUTEOLINA 7-O-RUTINÓSIDO

O pico 5 (63,8 minutos) produziu um ião $[M - H]^-$ de m/z 593, sendo identificado como luteolina 7-O-rutinósido. A fragmentação mostrou um ião $[M - H - 294]^-$

de m/z 299 e por sua vez a sua fragmentação exibiu um ião [luteolina – H]⁻ de m/z 284.

✓ PICO 6 – DIOSMETINA 7-O-RUTINÓSIDO

Aos 66,0 minutos saiu o último pico com um ião [M + H]⁺ de m/z 609. O MS² originou um ião de m/z 463 (perda da ligação ramnose, 146 Da), que por sua vez foi fragmentado e produziu um ião de m/z 301 (representa a aglicona), sendo assim identificado como diosmetina 7-O-rutinósido. A Fig. 3.4 ilustra um mecanismo possível para a fragmentação deste composto obtido pelo programa *HighChem MassFrontier* 1.0.

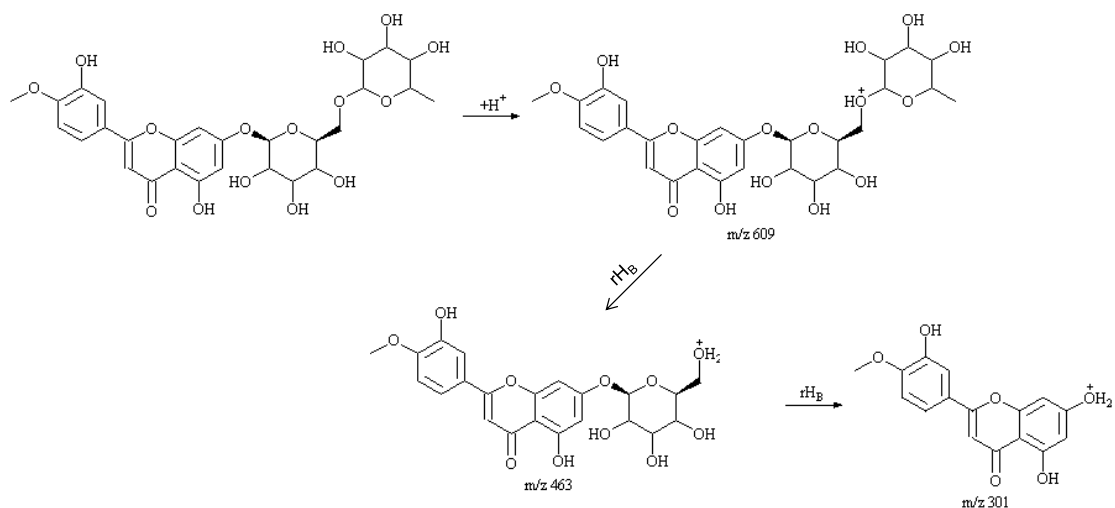


Fig. 3. 4 – Mecanismo proposto para a fragmentação da diosmetina 7-O-rutinósido pelo programa *HighChem MassFrontier* 1.0.

4. QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO CLOROGÉNICO NOS CANÓNIGOS

Os resultados obtidos para os extractos em metanol analisados estão representados na Tabela 4.1:

Tabela 4. 1 – Teor de ACG nos extractos metanólicos dos canónigos, expressos em mg ACG/100 g PF.

Amostra	Área (mAU.min)	mg ACG/100 g PF	Valores médios (mg ACG/100 g PF)	Desvio Padrão	CV (%)
A	#1	73,8	174	9	5
	#2	68,1	162		

Através da recta do ácido clorogénico (Fig. 4.2) obtida no Capítulo 4 (Material e Métodos), calculou-se o teor de ACG na matriz dos canónigos tendo-se obtido um valor médio de 168 ± 9 mg ACG/100 g de peso fresco.

4.1. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

A metodologia utilizada foi validada através do intra-day CV (5,7%) e do *inter-day* CV (4,4%). Estes valores são menores do que 6 %, demonstrando que o método é preciso e confirmando a estabilidade dos extractos de canónigos durante o período de avaliação. Além disso o coeficiente de correlação linear (R^2) obtido foi de 0,9997 traduzindo uma boa linearidade do método, Tabela 4.2.

Tabela 4. 2 – Factores da metodologia proposta.

Equação da recta ($y = ax - b$)		R^2	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Precisão <i>Intra-day</i> (CV%; n=5)	Precisão <i>Inter-day</i> (CV%; n=3)
a	b					
$2,26 \pm 0,02$	-5 ± 2	0,9997	4,5	15,1	5,7	4,4

IV – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo serão discutidos todos os resultados obtidos ao longo do presente trabalho. Em primeiro lugar irão ser abordados os resultados referentes à determinação do teor de polifenóis totais e da respectiva capacidade antioxidante nos brócolos e canónigos através das técnicas espectrofotométricas (Capítulos 1 e 2). Seguidamente serão discutidos os resultados referentes aos estudos realizados através das técnicas cromatográficas para os canónigos (Capítulo 3).

1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS

Existem vários factores que influenciam a extracção dos polifenóis e consequentemente a sua capacidade antioxidante, tais como as propriedades coloidais dos substratos, o tipo de solvente usado, as condições e os estágios da oxidação, a formação e estabilidade dos radicais livres, bem como a possível localização dos antioxidantes [53]. Além disso a natureza química dos polifenóis também é variável, bem como as possíveis interacções dos polifenóis com hidratos de carbono, proteínas, ácido ascórbico, clorofila, entre outros componentes presentes nos vegetais [39]. As misturas entre os solventes (metanol-água; acetona-água; acetona-água-ácido acético, entre outros) poderão contribuir para o aumento da eficiência da extracção de polifenóis nos vegetais, no entanto é difícil desenvolver um procedimento de extracção de polifenóis que seja completamente satisfatório e aplicável para todos(as) os(as) vegetais/plantas [16, 39, 40]. Devido a todos estes factores interferentes é aconselhável realizar mais do que um método para avaliar a actividade antioxidante atendendo às diferenças existentes em cada método [46, 54] e igualmente pelo facto de não existir um método oficial aceite universalmente.

Os resultados obtidos na avaliação das amostras de brócolos e canónigos mostram uma diferença substancial entre estes dois vegetais, tendo sido sendo superiores para os canónigos: nos brócolos o TPC varia entre 85 ± 3 e 108 ± 6 $\text{mg}_{\text{GAE}}/100$ g PF e no caso dos canónigos o TPC varia entre 255 ± 8 e 280 ± 13

mg_{GAE}/100 g PF (valores para extractos em metanol e acetona). A justificação para esta diferença significativa poderá dever-se ao facto da localização dos antioxidantes estar muitas vezes na região exterior da planta/vegetal, uma vez que os mesmos exercem um efeito protector sobre os vegetais [28]. Os resultados obtidos estão de acordo com os mencionados por Podsedek, 2007 [10], onde relata que o teor de polifenóis totais nos brócolos varia entre 34,5 e 337,0 mg/100 g PF. A água foi o solvente que mostrou menor eficiência na extracção dos polifenóis, o que vem de acordo com o descrito por Sun *et al.*, 2007 [46], onde é referido que a água sozinha não é um bom solvente extractor de compostos fenólicos. No caso dos brócolos houve diferença estatisticamente significativa entre o metanol e a acetona, vindo a confirmar que o tipo de solvente usado tem impacto na extracção de polifenóis, tal como Zhao *et al.*, 2006 [55] descreveram.

2. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Existem vários métodos para avaliar a capacidade antioxidante dos vegetais. No presente estudo utilizaram-se quatro métodos: PR, FRAP, ABTS e DPPH.

Com o objectivo de analisar o PR dos compostos fenólicos presentes nos brócolos e nos canónigos, empregou-se o método do hexacianoferrato de potássio, usando a quercetina como antioxidante padrão. Os resultados mostram uma capacidade redutora duas (extractos em metanol) a três (extractos em acetona) vezes superior para os canónigos em relação aos brócolos. Neste método, não foi detectado poder redutor nos extractos onde foi usado água como solvente extractor. Isto poderá dever-se ao facto dos flavonóides, que são os principais compostos fenólicos presentes nos vegetais, serem mais solúveis em metanol e acetona do que em água [46]. Relativamente ao método FRAP o antioxidante padrão usado foi o trolox. Neste método os resultados mostram novamente uma diferença notória existente entre os brócolos e os canónigos. Entre os extractos em metanol, os canónigos apresentaram uma capacidade antioxidante 3 vezes superior, enquanto nos extractos em acetona a diferença entre os dois vegetais é cerca de 6 vezes mais para os canónigos. Em relação à água como solvente extractor, os

resultados mostraram baixa capacidade antioxidante por parte dos compostos presentes nos extractos, quer dos brócolos quer dos canónigos. Segundo Pandino *et. al.*, 2011 [45], a interpretação dos resultados deste método é complexo uma vez que a capacidade antioxidante depende da qualidade e quantidade dos compostos fenólicos presentes nas matrizes.[46].

Os resultados do método ABTS mostram de forma clara que os canónigos possuem uma capacidade antioxidante entre 3 (extractos em metanol) a 5 (extractos em acetona) vezes superior em relação aos brócolos. Este foi o método onde os extractos em água (brócolos e canónigos) mostraram maior capacidade antioxidante: $26,3 \pm 0,3$ e 39 ± 22 mg_{TE}/100 g PF respectivamente, em relação aos dois métodos anteriores, nomeadamente ao método FRAP.

Por fim empregou-se o método do DPPH, e os canónigos mostraram um poder anti-radicalar cerca de 6 (metanol) a 20 (acetona) vezes superior aos brócolos. Tal como aconteceu no método do poder redutor, os extractos em água de ambos os vegetais em estudo não exibiram poder anti-radicalar. Para os canónigos os extractos em acetona (ultra-sons) foram os que mostraram maior poder anti-radicalar, com 86 ± 12 % PAR. Apesar de nos métodos anteriores não existir diferença estatisticamente significativa entre o metanol e a acetona, foi o metanol o solvente extractor ligeiramente mais eficaz na extracção dos polifenóis nos canónigos. Este facto vem reforçar a ideia de que a solubilidade dos compostos fenólicos varia de acordo com a polaridade do solvente usado, do grau de polimerização e das suas interacções com outros constituintes da matriz [23]. Mais uma vez, os nossos resultados estão de acordo com o estudo feito por Sun *et al.*, 2007 [46], que avaliaram a capacidade antioxidante dos flavonóides presentes em espargos e brócolos, onde relatam que os extractos em metanol e acetona apresentaram valores superiores de poder anti-radicalar em relação aos extractos em água. Um outro estudo realizado por Wijngaard *et al.*, 2009 [28] sobre fontes de antioxidantes em frutas e em subprodutos (nomeadamente de brócolos) revelam também que o metanol foi o solvente extractor mais eficaz para as matrizes em estudo. Uma razão que poderá justificar a eficiência do metanol em relação aos restantes solventes é porque o álcool causa instabilidade nas membranas celulares facilitando a extracção dos

polifenóis; além disso inactivam as enzimas contribuindo para a estabilização dos compostos extraídos [40].

Os resultados mostram que as técnicas de extracção (agitador mecânico e ultra-sons) utilizadas no presente estudo não influenciaram a extracção dos polifenóis, quer nos brócolos quer nos canónigos.

3. ESTUDO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA DOS CANÓNIGOS POR HPLC-DAD-ESI/MS/MS

Após a verificação da existência de polifenóis na matriz de canónigos aplicou-se a metodologia do HPLC-DAD-ESI-MS/MS para a separação e caracterização da composição fenólica no extracto dos mesmos. Segundo o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a efectuar a caracterização da composição fenólica nos canónigos. No total, foram identificados três ácidos hidroxicinâmicos (o ácido clorogénico, os ácidos 1,3-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico) e duas flavonas (a luteolina 7-O-rutinósido e a diosmetina 7-O-rutinósido), onde se destacou o ácido clorogénico como composto principal da matriz, evidenciando teores de 168 ± 9 mg ACG/100 g PF.

V – PRINCIPAIS CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

A extracção de compostos fenólicos a partir de vegetais é um passo importante para a obtenção de polifenóis totais que evidenciem uma actividade antioxidante pretendida que seja útil para as indústrias [50]. Perante o conjunto dos resultados obtidos pelos métodos espectrofotométricos, devem-se ter em conta vários aspectos. Em primeiro lugar, a diferença de resultados entre os canónigos e os brócolos foi significativa, quer em relação ao teor de polifenóis totais quer à capacidade antioxidante de ambos. Os canónigos quando comparados com os brócolos mostraram teores 3 vezes superiores de polifenóis totais, bem como 4 a 22 vezes maior capacidade antioxidante. Outro aspecto observável é em relação aos três solventes usados no estudo. Em geral, o metanol e a acetona foram os solventes mais eficazes na extracção dos compostos fenólicos do que a água, uma vez que foram os extractos em metanol e em acetona que apresentaram maior teor de polifenóis totais e capacidade antioxidante, comparativamente com os extractos em água. Como já anteriormente dito, este facto deve-se à presença maioritária de flavonóides, quer nos brócolos quer nos canónigos, e estes serem muito mais solúveis em metanol e acetona, do que em água [46]. Além disso, Sun *et al.*, 2006 [46] defendem que a água sozinha não é um bom solvente para a extracção de polifenóis. O grau de eficiência dos solventes apresentado ao longo do trabalho poderá ser mostrado da seguinte forma: metanol > acetona > água. Assim sendo, os nossos resultados vão de encontro com outros estudos realizados sobre a influência do solvente na extracção de polifenóis em vegetais.

Em suma, poder-se-á afirmar que se torna importante realizar várias metodologias para avaliar a capacidade antioxidante, dadas as diferenças de resultados obtidos existentes entre os diferentes métodos e as possíveis influências a que cada um está sujeito.

Após a verificação da existência de polifenóis na matriz dos canónigos aplicou-se a metodologia do HPLC-DAD-ESI-MS/MS para a separação e caracterização da composição fenólica no extracto dos mesmos. No total, foram identificados cinco compostos fenólicos, onde se destacou o ácido

clorogénico como composto principal na mesma matriz, com 168 ± 9 mg ACG/100 g PF.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Moreno, M., et al., *Acylated anthocyanins in broccoli sprouts*. Food Chemistry, 2010. **123**(2): p. 358-363.
2. Hayes, J.E., et al., *Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (Olea europaea L.), lutein, sesamol and ellagic acid*. Food Chemistry, 2011. **126**(3): p. 948-955.
3. Ferreira, I., et al., *Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos*. Bioanálise, 2007. **2**: p. 32-39.
4. Danino, O., et al., *Antioxidant activity of 1,3-dicaffeoylquinic acid isolated from Inula viscosa*. Food Research International, 2009. **42**(9): p. 1273-1280.
5. Soares, A., et al., *Antioxidant activity and total phenolic content of Agaricus brasiliensis (Agaricus blazei Murril) in two stages of maturity*. Food Chemistry, 2009. **112**(4): p. 775-781.
6. Naczk, M. et al., *Antioxidant Properties of Food Phenolics*, in *Food Phenolics*. 2003, CRC Press.
7. Halliwell, B., et al., *The characterization of antioxidants*. Food and Chemical Toxicology, 1995. **33**(7): p. 601-617.
8. Sato, Y., et al., *In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid*. International Journal of Pharmaceutics, 2011. **403**(1-2): p. 136-138.
9. Gugliucci, A., et al., *Caffeic and chlorogenic acids in Ilex paraguariensis extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins*. Fitoterapia, 2009. **80**(6): p. 339-344.
10. Podsedek, A., *Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review*. LWT - Food Science and Technology, 2007. **40**(1): p. 1-11.
11. Díaz-Reinoso, B., et al., *Antioxidant Extraction by Supercritical Fluids*, in *Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds*. 2007, CRC Press. p. 275-303.
12. Naczk, M. et al., *Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006. **41**(5): p. 1523-1542.
13. Gouveia, S. et al., *Analysis of phenolic compounds from different morphological parts of Helichrysum devium by liquid chromatography with on-line UV and electrospray ionization mass spectrometric detection*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2009. **23**(24): p. 3939-3953.
14. Pinto, J., *Nutracêuticos e Alimentos Funcionais*. Lisboa. Lidel - Edições Técnicas, Lda. 2010.
15. Erdman, J., et al., *Flavonoids and Heart Health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31st–June 1, 2005, Washington, DC*. The Journal of Nutrition, 2007. **137**(3): p. 718S-737S.
16. Garcia-Salas, P., et al., *Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples*. Molecules, 2010. **15**: p. 8813-8826.
17. Março, P., et al., *Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais*. Química Nova, 2008. **31**: p. 1218-1223.

18. Patel, J., *A Review of Potential Health Benefits of Flavonoids*. Lethbridge Undergraduate Research Journal, 2008. **3**(2).
19. Huber, L. et al., *Flavonóis e Flavonas: Fontes Brasileiras e Fatores que Influenciam a Composição em Alimentos*. 2008. Vol. 19. 2008.
20. Leopoldini, M., et al., *The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants*. Food Chemistry, 2011. **125**(2): p. 288-306.
21. Bravo, L., *Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*. Nutrition Reviews, 1998. **56**(11): p. 317-333.
22. Crecelius, A., et al., *Flavonoids*, in *Natural Food Antimicrobial Systems*. 2000, CRC Press.
23. Angelo, P. et al., *Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão*. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 2007. **66**(1): p. 232-240.
24. Soares, S., *Ácidos fenólicos como antioxidantes*. Revista de Nutrição, 2002. **15**: p. 71-81.
25. Vallejo, F. et al., *Characterisation of flavonols in broccoli (Brassica oleracea L. var. italica) by liquid chromatography-UV diode-array detection-electrospray ionisation mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2004. **1054**(1-2): p. 181-193.
26. Pérez-Balibrea, S., et al., *Genotypic effects on the phytochemical quality of seeds and sprouts from commercial broccoli cultivars*. Food Chemistry, 2011. **125**(2): p. 348-354.
27. Kubola, J., et al., *Phytochemicals, vitamin C and sugar content of Thai wild fruits*. Food Chemistry, 2011. **126**(3): p. 972-981.
28. Wijngaard, H. et al., *A survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants*. Food Chemistry, 2009. **116**(1): p. 202-207.
29. Cartea, M., et al., *Phenolic Compounds in Brassica Vegetables*. Molecules, 2011. **16**(1): p. 251-280.
30. Sroka, Z. et al., *Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids*. Food and Chemical Toxicology, 2003. **41**(6): p. 753-758.
31. Muminovic, J., et al., *Genetic diversity in lambs lettuce (Valeriana locusta L.) and related species determined by AFLP markers*. Plant Breeding 2004. **123**: p. 460-466.
32. Grzegorzewski, F., et al., *Surface morphology and chemical composition of lamb's lettuce (Valerianella locusta) after exposure to a low-pressure oxygen plasma*. Food Chemistry, 2010. **122**(4): p. 1145-1152.
33. Latté, K. et al., *Health benefits and possible risks of broccoli - An overview*. Food and Chemical Toxicology, 2011. **49**(12): p. 3287-3309.
34. Olsen, H., et al., *Characterization and Quantification of Flavonoids and Hydroxycinnamic Acids in Curly Kale (Brassica oleracea L. Convar. acephala Var. sabellica) by HPLC-DAD-ESI-MSn*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(7): p. 2816-2825.
35. Moreno, M., et al., *Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006. **41**(5): p. 1508-1522.
36. Preedy, V. et al., *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention in Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*, Elsevier, Editor. 2011, Academic Press; 1 edition. p. 253-255.

37. Heimler, D., *et al.*, *Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties*. Food Chemistry, 2006. **99**(3): p. 464-469.
38. Jeffery, E., *et al.*, *Variation in content of bioactive components in broccoli*. Journal of Food Composition and Analysis, 2003. **16**(3): p. 323-330.
39. Naczk, M. *et al.*, *Analysis of Polyphenols in Foods*, in *Methods of Analysis of Food Components and Additives*. 2005, CRC Press.
40. Bravo, L. *et al.*, *Analysis of Flavonoids in Functional Foods and Nutraceuticals*, in *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals, Second Edition*. 2008, CRC Press. p. 148-193.
41. Gómez-Romero, M., *et al.*, *Automated identification of phenolics in plant-derived foods by using library search approach*. Food Chemistry, 2011. **124**(1): p. 379-386.
42. Hajslova, J., *et al.*, *Mass Spectrometry and Hyphenated Instruments in Food Analysis*, in *Handbook of Food Analysis Instruments*. 2008, CRC Press. p. 198-201.
43. Neves, J., *et al.*, *Actividade antioxidante e avaliação in vitro da citotoxicidade de extractos aquosos de folhas de mentha x piperita*. Revista da Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, 2009. **6**: p. 344-354.
44. Zeng, L., *et al.*, *Antioxidant activity and chemical constituents of essential oil and extracts of Rhizoma Homalomenae*. Food Chemistry, 2011. **125**(2): p. 456-463.
45. Pandino, G., *et al.*, *Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild Cynara cardunculus L. genotypes*. Food Chemistry, 2011. **126**(2): p. 417-422.
46. Sun, T., *et al.*, *Evaluation of the antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices*. Food Chemistry, 2007. **105**(1): p. 101-106.
47. Salluca, T., *et al.*, *Determination of total phenolic compounds content and the antioxidant capacity of andean tubers and roots (Isaño, Oca, Ulluco and Arracacha)*. Revista Boliviana de Química, 2008. **25**(1): p. 59-62.
48. Liu, J., *et al.*, *The antioxidant and free-radical scavenging activities of extract and fractions from corn silk (Zea mays L.) and related flavone glycosides*. Food Chemistry, 2011. **126**(1): p. 261-269.
49. Böhm, V., *et al.*, *Methods to Measure the Antioxidant Capacity of Meat Products*, in *Handbook of Processed Meats and Poultry Analysis*. 2008, CRC Press. p. 273-289.
50. Zhu, K., *et al.*, *Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ*. Food Chemistry, 2011. **126**(3): p. 1122-1126.
51. Clifford, M., *et al.*, *Profiling the Chlorogenic Acids and Other Caffeic Acid Derivatives of Herbal Chrysanthemum by LC-MSⁿ*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(3): p. 929-936.
52. Schütz, K., *et al.*, *Characterization of phenolic acids and flavonoids in dandelion (Taraxacum officinale WEB. ex WIGG.) root and herb by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005. **19**(2): p. 179-186.
53. Rockenbach, I., *et al.*, *Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço*

- de uva (Vitis vinifera) variedades Tannat e Ancelota*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2008. **28**: p. 238-244.
54. Schlesier, K., *et al.*, *Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods*. Free Radical Research, 2002. **36**(2): p. 177–187.
55. Zhao, H., *et al.*, *Effects of Extraction Solvent Mixtures on Antioxidant Activity Evaluation and Their Extraction Capacity and Selectivity for Free Phenolic Compounds in Barley (Hordeum vulgare L.)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(19): p. 7277-7286.

ANEXO A

INSTRUMENTAÇÃO E REAGENTES USADOS

INSTRUMENTAÇÃO

A instrumentação utilizada ao longo da realização experimental deste trabalho encontra-se seguidamente descrita:

- ✓ Balança analítica *Mettler*, modelo AE50, para pesagem rigorosa dos reagentes;
- ✓ Balança *Mettler*, modelo PE200, para pesagem dos reagentes;
- ✓ Banho de ultra-sons *Cole-Parmer*, 8891, para homogeneização e degaseificação de soluções;
- ✓ Espectrofotómetro *Schimidzu* UV-3101, para estudos espectrofotométricos;
- ✓ Células espectrofotométricas de poliestireno, *Biochrom Ltd*;
- ✓ Medidor de pH *Metrohm*, modelo 605, equipado com um eléctrodo de vidro combinado *Metrohm*. Antes de cada utilização, o medidor de pH foi calibrado com soluções de referência de pH 7 e pH 4;
- ✓ Micropipetas *Gilson Pipetman* (P200 – capacidade máxima de 200 µL; P1000 – capacidade máxima de 1000 µL e P5000 – capacidade máxima de 5000 µL, para medições de pequenos volumes. A medição de volumes superiores a 5000 µL foi efectuada com material de vidro aferido;
- ✓ Sistema Millipore Simplicity™ 185, para filtração e purificação da água utilizada na preparação das soluções e eluentes para cromatografia;
- ✓ Agitador mecânico modelo *yellow line* TTS2-IKA para agitação dos extractos obtidos (canónigos e brócolos).
- ✓ *Vortex Yellow Line*, TTS 2, para agitação e homogeneização de soluções.
- ✓ Filtros *Whatman*™, 55 mm, usados na filtração dos extractos;
- ✓ Bomba de vácuo VWR, PM20405-86.
- ✓ Filtros de nylon 0.45 µm (*Whatman*™), usados na filtração dos solventes para uso de HPLC.

As análises por HPLC com detecção por díodos (HPLC-DAD) foram efectuadas num cromatógrafo com as seguintes características:

- ✓ Unidade de gradiente quaternário *Jasco*, modelo PU-2089 *Plus*;
- ✓ Unidade de desgaseificação *Jasco*, modelo DG-1580-54;
- ✓ Bomba *Jasco*, modelo PU-1580;
- ✓ Amostrador automático *Jasco*, modelo AS-950;
- ✓ Detector de múltiplos comprimentos de onda *Jasco*, modelo MD-1510;
- ✓ Caixa de interface *Jasco*, modelo LC-Net II / ADC.

O sistema acima descrito foi controlado pelo programa HSS-1500, versão 3.4.7 *Jasco*, que operou em conjunto com o programa Borwin-PDA, versão 1.50 JMBS Developments, para o processamento de dados cromatográficos e com o programa Spectra-Manager, versão 1.40 *Jasco*, para o processamento de espectros de absorção.

As análises por HPLC/MS/MS foram realizadas num cromatógrafo *Finnigan LCQ DECA XP MAX* com as seguintes características:

- ✓ Unidade de gradiente quaternário *Finnigan Surveyor Plus*;
- ✓ Bomba *Finnigan Surveyor LC Pump Plus*;
- ✓ Amostrador automático *Finnigan Surveyor Plus*;
- ✓ Detector de espectrometria de massa *Finnigan LCQ DECA XP Plus* (fonte de ionização: electrospray (ESI) e analisador de massa: Quadropolo/Ion Trap)
- ✓ Detector de múltiplos comprimentos de onda *Finnigan Surveyor PDA Plus*;
- ✓ Caixa de interface *Finnigan LCQ-DECA XP MAX*.

REAGENTES E AMOSTRAS

As características do ácido clorogénico e dos reagentes utilizados ao longo da realização experimental deste trabalho encontram-se indicadas nas Tabelas seguintes.

Tabela 1. 1 – Características do composto fenólico usado no trabalho experimental.

Composto fenólico	Pureza	Fabricante
Ácido Clorogénico	99%	Sigma-Aldrich

Tabela 1. 2 – Características gerais dos reagentes utilizados no trabalho experimental.

Reagente	Pureza	Fabricante
Metanol (CH ₃ OH)	Solvente para HPLC	Merck
Acetona (CH ₃ COCH ₃)	99-100%	Merck
Ácido acético (CH ₃ COOH)	100% anidro	Merck
Ácido fórmico (HCOOH)	99-100%	VWR-Prolabo
Ácido clorídrico (HCl)	37%	Pronalab

Tabela 1. 3 – Características dos reagentes utilizados no método do Folin Ciocalteu.

Reagente	Pureza	Fabricante
Ácido gálico	-	Fluka
Carbonato de sódio anidro	-	Merck
Folin Ciocalteu	-	Merck

Tabela 1. 4 – Características dos reagentes utilizados no método do Poder Redutor.

Reagente	Pureza	Fabricante
Hexacianoferrato (III) de potássio	-	Sigma-Aldrich
Fosfato de sódio	p.a	Merck
Metanol	p.a	Merck
Tricloreto de ferro hexahidratado	-	Sigma-Aldrich
Ácido tricloroacético	-	Sigma-Aldrich
Quercetina	98%	Sigma-Aldrich

Tabela 1. 5 – Características dos reagentes utilizados no método do FRAP.

Reagente	Pureza	Fabricante
Acetato de sódio trihidratado	-	Merck
TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina)	-	Fluka
Tricloreto de ferro hexahidratado	-	Sigma-Aldrich
Trolox (ácido 6-hidroxi-2,3,7,8-tetrametilcrômio-2-carboxílico)	-	Sigma-Aldrich
Metanol	p.a	Merck
Ácido clorídrico	37%	Pronalab
Ácido acético glacial	-	Pronalab

Tabela 1. 6 – Características dos reagentes utilizados no método do ABTS.

Reagente	Pureza	Fabricante
ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-acidosulfônico))	-	Fluka
Persulfato de potássio	p.a	Sigma-Aldrich
Metanol	p.a	Merck
Trolox	-	Sigma-Aldrich

Tabela 1. 7 – Características dos reagentes utilizados no método do DPPH.

Reagente	Pureza	Fabricante
DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)	-	Sigma-Aldrich
Acetato de sódio	p.a	Merck
Metanol	p.a	Merck

p.a: para análise