

Joana Maria Durães de Matos

ESTUDO DA SECAGEM DA FLOR DE CARDO E  
ANÁLISE DE POLISSACARÍDEOS E COMPOSTOS  
FENÓLICOS

**Dissertação**

Mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar



Julho, 2014

Joana Maria Durães de Matos

## ESTUDO DA SECAGEM DA FLOR DE CARDO E ANÁLISE DE POLISSACARÍDEOS E COMPOSTOS FENÓLICOS

### **Dissertação**

Mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar

Trabalho efectuado sob orientação de  
Professora Doutora Raquel Guiné

Trabalho co-orientado por  
Professor Doutor Fernando Gonçalves

Julho, 2014



o sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objectivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.+

José de Alencar

## **Agradecimentos**

Pela primeira vez as palavras ganham um novo sentido quando não se tornam previsíveis; ganham nova vida quando despertam perplexidades e inquietam o pensamento. E tornam-se sempre insuficientes quando com elas queremos dizer o que nos vai para lá da alma. Como agora.

As minhas primeiras palavras de agradecimento têm de ir, forçosamente, para a minha família. Sem o amor, carinho e todo o apoio que sempre me deram ao longo dos anos possivelmente não estaria aqui. Além, de todo o seu apoio, eles sempre me disponibilizaram o necessário para que o meu aproveitamento escolar dependesse apenas de mim inculcando-me, ao mesmo tempo, um grande sentido de responsabilidade desde a mais tenra idade, por estas razões tenho orgulho deles.

Um agradecimento especial à Doutora Raquel Guiné que me orientou no decorrer do trabalho e que desde logo aceitou a orientação deste, pelo estímulo e entusiasmo revelado por este projecto, pelas críticas e sugestões relevantes feitas durante a orientação e pela disponibilidade sempre revelada.

Ao professor Fernando Gonçalves pela ajuda e intercâmbio de ideias e informação para a elaboração deste trabalho;

Por fim gostaria de estender os meus agradecimentos aos meus amigos, por me suportarem a cada dia, por cada palavra que me deram, por cada minuto de atenção que me doaram, por cada puxão de orelha, por cada abraço, por cada beijo, por cada luta que lutaram comigo, por cada loucura que cometeram comigo e por todo o amor que me deram sem eu pedir.

A todos aqueles que anonimamente me foram ajudando, fornecendo informações, ideias e críticas, algumas das quais essenciais para a prossecução deste trabalho, aqui pretendo deixar um profundo, sentido e público reconhecimento.

A todos o meu muito sincero, Obrigada

## RESUMO

A qualidade dos produtos alimentares e a sua influência sobre a nutrição e a saúde humana tem vindo a merecer um lugar de destaque na comunidade científica. O conceito de alimento funcional tem adquirido grande importância hoje em dia, em particular os alimentos com compostos bioactivos.

O Cardo (*Cynara cardunculus* L.) é uma planta herbácea originária da região mediterrânea usada essencialmente na coagulação do leite, e por muitos considerada um medicamento popular, devido aos seus efeitos terapêuticos.

Este trabalho teve como objectivo estudar o efeito de diferentes condições de secagem da flor de cardo, na composição em ácidos fenólicos, bem como em polissacarídeos. Era ainda objectivo tentar identificar possíveis compostos que pudessem ser utilizados como marcadores de autenticidade do queijo da serra.

Neste trabalho foi usada uma amostra de flor de cardo liofilizado e três amostras secadas, a diferentes temperaturas (40, 50 e 60°C).

A análise do resíduo sólido da flor do cardo, por cromatografia gasosa, permitiu identificar a presença de açúcares constituintes de polissacarídeos pécicos. A análise por HPLC, dos extratos metanólicos e cetónicos, revelaram a presença de ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos na flor do cardo. A amostra mais rica nestes compostos foi a amostra secada a 50°C. O aumento da temperatura de secagem originou uma diminuição de ácidos fenólicos.

**Palavras-Chave:** Cardo, Polissacarídeos, Compostos Fenólicos, Secagem, Cromatografia gasosa, HPLC.

## ABSTRACT

The quality of food and its influence on nutrition and human health has earned a prominent place in the scientific community. The concept of functional foods has acquired great importance today, particularly foods with bioactive compounds.

The thistle (*Cynara cardunculus L.*) is a herbaceous plant native to the Mediterranean region mainly used in coagulation milk, and considered by many a popular product due to its therapeutic effects.

This work aimed to study the effect of different drying conditions of the thistle flower in the composition of phenolic acids and polysaccharides. It is still another object trying to identify possible compounds that could be used as markers of authenticity of mountain cheese.

In this work a sample of lyophilized thistle flower and three samples dried at different temperatures (40, 50 and 60 ° C) were used.

The analysis of the solid residue from the thistle flower, by gas chromatography, allowed to identify the presence of constituent sugars of pectic polysaccharides.

The HPLC analysis of the methanol and ketone extracts revealed the presence of hydroxybenzoic acids and hydroxycinnamic on thistle flower.

. The richer sample in these compounds was the sample dried at 50 ° C. An increase in the drying temperature induced a decrease of phenolic acids.

**Keywords:** Cardo, Polysaccharides, Phenolic Compounds, Drying, Gas Chromatography, HPLC.

# ÍNDICE

LISTA DE TABELAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SÍMBOLOS .....	x
CAPITULO I .....	1
1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS .....	2
CAPÍTULO II .....	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	6
2.1. ENQUADRAMENTO DO TRABALHO: CARDO .....	6
2.1.1. Parede celular vegetal .....	8
2.1.1.1. Celulose .....	10
2.1.1.2. Hemicelulose .....	11
2.1.1.3. Substâncias pécnicas .....	11
2.1.2. Composição: compostos fenólicos .....	15
2.2. METODOLOGIAS ANALITICAS .....	20
2.2.1. Secagem .....	20
2.2.1.1. Liofilização .....	23
2.2.1.2. Secagem Convectiva .....	23
2.2.2. Processo de Secagem .....	25
2.2.3. Cromatografia .....	27
2.2.3.1. HPLC .....	28
2.2.3.2. Cromatografia gasosa .....	30
CAPITULO III .....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	34
3.1. AMOSTRAS .....	34
3.1.1. Cardo .....	34
3.2. METODOLOGIA .....	34
3.2.1. Secagem .....	34
3.2.2. Extracção sólida - líquida .....	35

3.2.3. Extração em fase sólida.....	35
3.2.4. Análise de açúcares neutros.....	38
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>41</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
4.1. SECAGENS.....	42
4.2. DETERMINAÇÃO DOS POLISSACARIDEOS.....	48
4.3. DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	51
<b>CAPITULO V.....</b>	<b>59</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>II</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>III</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Principais características dos componentes da flor do cardo e teores expectáveis de polissacarídeos (Fonte: Marga <i>et al.</i> , 2003) .....	15
<b>Tabela 2</b> - Compostos fenólicos descritos no Cardo (Fonte: Sevcíková <i>et al.</i> , 2002) .....	19
<b>Tabela 3</b> - Gradiente de eluição utilizado na análise dos ácidos fenólicos dos frutos analisados por HPLC.....	37
<b>Tabela 4</b> - Características do cromatógrafo gasoso usado na realização dos ensaios. ....	39
<b>Tabela 5</b> - Humidade das amostras de flor de cardo (Média ± desvio padrão).....	44
<b>Tabela 6</b> - Actividade da água das amostras de cardo secado (Média ± desvio padrão).....	46
<b>Tabela 7</b> - Massa das amostras antes do processo de secagem e após secagem (Média ± desvio padrão).....	46
<b>Tabela 8</b> - Composição em monossacarídeos das amostras de cardo estudadas. ...	50
<b>Tabela 9</b> - Tempo de retenção e concentrações obtidas expressas em mg/L dos ácidos benzóicos e hidrocínâmicos do extracto secado a 50°C (Média ± desvio padrão).....	55
<b>Tabela 10</b> - Tempo de retenção e concentrações obtidas expressas em mg/L dos ácidos benzóicos e hidroxicinâmicos do extracto secado a 60°C (Média ± desvio padrão).....	56
<b>Tabela 11</b> - Tempo de retenção e concentrações obtidas expressas em mg/L dos ácidos benzóicos e hidroxicinâmicos do extracto liofilizado (Média ± desvio padrão). ....	57
<b>Tabela 12</b> - Percentagem de água existente na flor de cardo por cada 15 minutos de secagem numa estufa à temperatura de 40°C (Média ± desvio padrão).....	IV
<b>Tabela 13</b> - Percentagem de água existente na flor de cardo por cada 15 minutos de secagem numa estufa à temperatura de 50°C (Média ± desvio padrão).....	V
<b>Tabela 14</b> - Percentagem de água existente na flor de cardo por cada 15 minutos de secagem numa estufa à temperatura de 60°C (Média ± desvio padrão).....	V
<b>Tabela 15</b> - Percentagem de água existente na flor de cardo antes e após liofilização (Média ± desvio padrão).....	VI

**Tabela 16** - Valores da actividade da água dos diferentes extractos analisados..... VI

**Tabela 17** - Massas das amostras antes do processo de secagem e após secagem e respectivos duplicados ..... VI

**Tabela 18**- Tempos de retenção e respectivas áreas dos diferentes compostos existentes no extracto analisado, de flor de cardo secado a 40°C (dRib- 2-deoxy-dribose; Rha-ramnose; Fuc- Fucose; Ara-arabinose; Xyl-xilose; St- 2 desoxyglucose Man-manose; Gal-galactose; Glc- Glucose)..... VII

**Tabela 19** - Tempos de retenção e respectivas áreas dos diferentes compostos existentes no extracto analisado, flor de cardo secado a 50°C (dRib- 2-deoxy-dribose; Rha-ramnose; Fuc- Fucose; Ara-arabinose; Xyl-..... VII

**Tabela 20** - Tempos de retenção e respectivas áreas dos diferentes compostos existentes no extracto analisado, na flor de cardo secado a 60°C (dRib- 2-deoxy-dribose; Rha-ramnose; Fuc- Fucose; Ara-arabinose; Xyl-xilose; St- 2 desoxyglucose Man-manose; Gal-galactose; Glc- Glucose)..... VIII

**Tabela 21** - Tempos de retenção e respectivas áreas dos diferentes compostos existentes no extracto analisado, flor de cardo liofilizado (dRib- 2-deoxy-dribose; Rha-ramnose; Fuc- Fucose; Ara-arabinose; Xyl-xilose; St- 2 desoxyglucose Man-manose; Gal-galactose; Glc- Glucose)..... VIII

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Flor do cardo (Fonte: Comunidade, 2014) .....	6
<b>Figura 2</b> - Estrutura da parede celular vegetal (Fonte: Aquino, 2008) .....	9
<b>Figura 3</b> - Estrutura química da celulose, (Fonte: Scientificpsychic, 2012).....	11
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática da estrutura convencional da pectina (A) e da recentemente proposta (B) (Fonte: Willats <i>et al.</i> , 2006).....	13
<b>Figura 5</b> - Principais componentes da flor do cardo: 1 . corola; 2 . Estilete apical; 3 . Estilete basal; 4- Filamento (Fonte: Marga <i>et al.</i> , 2003).....	15
<b>Figura 6</b> - Estrutura química dos seguintes ácidos: ( 1- Ácido p- hidroxibenzóico; 2- Ácido gálico; 3- Ácido protocatecuico; 4- Ácido vanílico; 5- Ácido siringico), (Fonte: Lianda, 2009). .....	17
<b>Figura 7</b> - Estruturas químicas dos seguintes ácidos: ( 1- ácido cafeico; 2- ácido ferúlico; 3- ácido sinápico; 4- ácido p-cumárico), (Fonte: Lianda, 2009). .....	18
<b>Figura 8</b> - Estruturas químicas dos seguintes flavonóides: (1- Esqueleto básico da flavona; 2- Esqueleto básico do flavonol.), (Fonte: Lianda, 2009).....	19
<b>Figura 9</b> - Representação esquemática do movimento de água durante a secagem (Fonte: Fellows, 2000).....	24
<b>Figura 10</b> - Curvas típicas de secagem (Fonte: Park <i>et al.</i> 2001).....	26
<b>Figura 11</b> - Esquema base de uma cromatografia, (Fonte: Naoum, 2006).....	28
<b>Figura 12</b> - Equipamento de HPLC utilizado.....	29
<b>Figura 13</b> - Esquema de um cromatografo gasoso: 1- Reservatório do gás de arraste, 2 - Local onde a amostra será injectada, 3 - Coluna Cromatográfica, 4 . Detector, 5 - Amplificador de sinal, 6 - Formação do Cromatograma, (Fonte: Naoum, 2006). .....	31
<b>Figura 14</b> - Etapas da extracção em fase sólida.....	36
<b>Figura 15</b> - Esquema representativo da concentração da amostra .....	36
<b>Figura 16</b> - Injecção da amostra no cromatografo .....	40
<b>Figura 17</b> - Percentagem de água existente na flor de cardo por cada 15 minutos de secagem numa estufa à temperatura de 60°C, ao longo de dois ensaios de secagem .....	42

<b>Figura 18</b> - Percentagem de água existente na flor de cardo por cada 15 minutos de secagem numa estufa à temperatura de 50°C, ao longo de dois ensaios de secagem.....	43
<b>Figura 19</b> - Percentagem de água existente na flor de cardo por cada 15 minutos de secagem numa estufa à temperatura de 40°C, ao longo de dois ensaios de secagem.....	43
<b>Figura 20</b> - Curvas médias de secagem do cardo para as temperaturas de 40, 50 e 60°C. ....	45
<b>Figura 21</b> - Aspecto da flor de cardo : (1- Congelado; 2- Secado; 3- Liofilizado.). ...	47
<b>Figura 22</b> - Cromatograma obtido para a amostra secada a 40°C. ....	48
<b>Figura 23</b> - Cromatograma obtido para a amostra secada a 50°C. ....	48
<b>Figura 24</b> - Cromatograma obtido para a amostra secada a 60°C. ....	49
<b>Figura 25</b> - Cromatograma obtido para a amostra liofilizada. ....	49
<b>Figura 26</b> - Perfis cromatográficos (A-280 e B-325 nm) relativos aos compostos fenólicos quantificados nos extractos de flor de cardo em estudo. ....	52
<b>Figura 27</b> - Perfis cromatográficos (A-280 e B-325 nm) relativos aos compostos fenólicos quantificados nos extractos de flor de cardo em estudo. ....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SÍMBOLOS

**a<sub>w</sub>** . Actividade da água

**HM** . Pectinas de alta metoxilação

**LM** . Pectinas de baixa metoxilação

**GalA** . Ácido galacturónico

**HG** . Homogalacturonana

**RG** . Ramnogalacturonana

**RGI I** - Ramnogalacturonana I

**RGI II** - Ramnogalacturonana II

**DRib** - 2-deoxy-dribose;

**Rha** - Ramnose;

**Fuc** - Fucose;

**Ara** - Arabinose;

**Xyl** - Xilose;

**Man** - Manose;

**Gal** - Galactose;

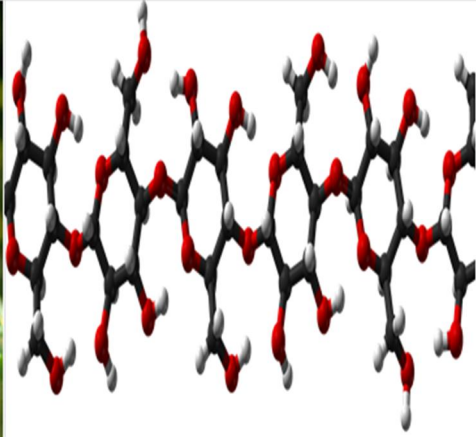
**Glc**- Glucose

**min** . Minutos

**mL** . Mililitros

**mg** . Miligramas

**µL** . Microlitros



# CAPITULO I

## 1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

Desde a antiguidade, a humanidade tem-se preocupado em racionalizar as fontes de alimentos. Para isso, desenvolveu empiricamente métodos artesanais de conservação e de transformação de alimentos (Park, 2006). A remoção de água de alimentos sólidos, surgiu como uma forma de reduzir a actividade da água (aw), inibindo o crescimento microbiano, evitando assim, a deterioração do mesmo. Esta remoção tem, para além da conservação, outra dimensão de grande importância, já que reduz os custos energéticos, de transporte, embalagem e armazenamento desses alimentos (Park, 2006).

A secagem de material vegetal é necessária para evitar a degradação e as alterações químicas dos tecidos. Essencialmente são usados dois métodos para a secagem de tecidos vegetais: secagem convectiva com ar quente (em estufa) e liofilização. A liofilização mantém a maioria das propriedades bioquímicas do tecido vegetal, mas tem a desvantagem de ser um procedimento que requer equipamento dispendioso. A secagem em estufa tem a desvantagem de que podem ocorrer mudanças bioquímicas no material e alterar a sua composição comparativamente ao material fresco (Marur e Sodek, 1995).

Muitas das espécies do género *Cynara* têm sido utilizadas, desde há muitos anos, como medicamentos populares. *Cynara cardunculus* L., vulgarmente conhecida como cardo, é uma erva perene nativa da região mediterrânica. Esta planta apresenta as típicas características botânicas da família *Asteraceae*, produzindo um tipo especial de fruto, a cipsela (aquénios) e um arranjo das flores em capítulos. O *C. cardunculus* foi cultivado como um vegetal desde os tempos antigos, mas a área de terra dedicada a esta cultura nunca foi grande (Wiklund, 1992). Os extractos obtidos a partir das flores de *C. cardunculus* são usados, desde há vários séculos, como coagulante do leite de ovelha no fabrico artesanal do queijo da Serra da Estrela, de Serpa e de Azeitão (Salguero e Sanjuán, 1999).

As paredes celulares são compostas por polissacarídeos e pequenas quantidades de proteínas e compostos fenólicos que vão sofrendo alterações ao longo da vida das células. São estruturas muito complexas que possuem uma grande diversidade de funções durante a vida da planta: proporcionam às células robustez mecânica, mantêm a sua morfologia, controlam a expansão celular e o

transporte intercelular, protegem a célula contra a maioria dos organismos potencialmente patogénicos e predadores, participam na comunicação intercelular e contribuem em alguns casos como reserva alimentar (Silva, 1993).

Segundo o modelo clássico, a parede celular primária é constituída por duas fases, uma microfibrilar e outra matricial. A fase microfibrilar é composta por estruturas longas e finas designadas microfibrilas, constituídas por moléculas de celulose associadas entre si por pontes de hidrogénio e alinhadas paralelamente ao longo das microfibrilas. Coexistindo com as zonas cristalinas encontram-se nas microfibrilas zonas amorfas em que as fibras de celulose não têm orientação regular. A fase matricial consiste numa variedade de polissacarídeos, glicoproteínas e compostos fenólicos, variando a sua composição com as diferentes camadas da parede, tipos de células e diferentes fases do ciclo celular (Silva, 1993).

Devido à importância da determinação desses açúcares, algumas metodologias têm sido estudadas, entre as quais as fundamentadas nas técnicas cromatográficas. Tais técnicas de separação, permitem determinar a composição de misturas complexas de diversas substâncias químicas, com grande eficiência e reprodutibilidade. Podem ser conceituadas como métodos físico-químicos de separação, nos quais os constituintes da amostra são separados por partição em duas fases: uma móvel e outra estacionária (Herter *et al.*, 2001). A identidade de um composto deve ser esclarecida pelo maior número de critérios possível, que incluem os dados obtidos nos processos cromatográficos. As técnicas cromatográficas podem assim ser usadas com fins analíticos ou de isolamento e fornecem informações importantes também para a identificação de compostos fenólicos (Valentão, 2002).

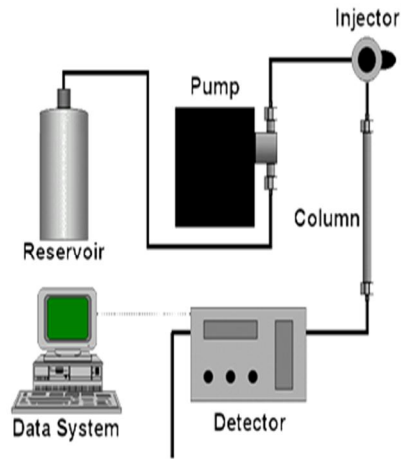
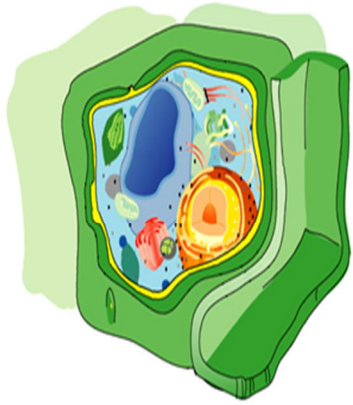
Para que um composto possa ser utilizado como marcador taxonómico deverá obedecer a várias condições: não deve pertencer aos constituintes principais universalmente distribuídos, tais como glúcidos e ácidos orgânicos; não poderá ter uma estrutura demasiado complexa, elaborada por um número restrito de espécies; deverá ser acumulado e intervir no metabolismo, e ser de fácil detecção. Certos compostos fenólicos reúnem estes requisitos e por isso são utilizados como marcadores de autenticidade. De facto, geralmente é possível associar aos produtos de origem vegetal um perfil fenólico qualitativo e quantitativo característico, que permita garantir a sua autenticidade (Ribéreau-Gayon, 1968).

---

O objectivo genérico do presente plano de trabalhos prendeu-se com a secagem da flor do cardo que é utilizada no fabrico do queijo certificado %Serra da Estrela+, e análise dos polissacarídeos que possam ser identificados como garante da autenticidade do queijo quando fabricado com o cardo.

Nesta medida, os objectivos específicos deste estudo foram:

- Fazer a secagem da flor de cardo, utilizando metodologias alternativas;
- Fazer o fraccionamento dos extractos obtidos a partir da flor de cardo secada;
- Fazer a análise de polissacarídeos;
- Fazer a análise de compostos fenólicos.



# CAPÍTULO II

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. ENQUADRAMENTO DO TRABALHO: CARDO

A qualidade dos produtos alimentícios e a sua influência sobre a nutrição e a saúde humana vêm merecendo lugar de destaque nos meios científicos. Essa preocupação deve-se ao grande número de produtos alimentícios existentes e a tendência actual de se ingerirem produtos naturais. Desses produtos destacam-se os leites fermentados (Bastos, 1995).

Muitas das espécies do género *Cynara* têm sido utilizadas, desde há muitos anos, como medicamentos populares. O Cardo-do-Coalho (*Cynara cardunculus* L.) é uma planta herbácea nativa da bacia do mediterrâneo. Distribui-se pela Europa (França, Grécia, Itália, Portugal, Espanha e Turquia), Norte de África (Líbia, Marrocos, Tunísia), América do Sul (Chipre), Ilhas Canárias (Gominho *et al.*, 2009).

O género *Cynara* L. apresenta uma distribuição geográfica muito semelhante à da oliveira. Pertence à família das *Asteraceae-Cardueae*, contendo oito espécies e quatro subespécies, incluindo o muito conhecido cardo. Este encontra-se agora incluído na espécie *C. cardunculus* (Wiklund, 1992).

Na Figura 1 é possível ver o aspecto da flor do cardo.



**Figura 1** - Flor do cardo (Fonte: Comunidade, 2014)

## Classificação científica

- Reino: Plantae
- Filo: Magnoliophyta
- Classe: Magnoliopsida
- Ordem: Asterales
- Família: Asteraceae
- Género: Cynara
- Espécie: *C. cardunculus*
- Nome Binomial: *Cynara cardunculus* (Almeida *et al.*, 2009).

O cardo é uma planta não domesticada, perene e robusta que é caracterizada por possuir folhas espinhosas, caules com floração ramificada e flores azul-violeta. O cardo selvagem é propagado através das suas sementes. A maioria das sementes é espalhada perto da planta mãe e germina depois das primeiras chuvas do Outono, apesar da germinação poder ocorrer durante todo o ano, desde que em condições controladas. O período de crescimento estendesse até Junho, altura esta em que o cardo fica em flor (Foti *et al.*, 1999). Este é cultivado como legume, sobretudo na zona sudoeste da Europa, sendo consumidos os pecíolos e as nervuras esbranquiçadas e carnudas das folhas (Paris e Moyse, 1971).

Para fins terapêuticos utilizam-se as folhas, colhidas na época de floração, que ocorre entre Junho e Agosto. As folhas contêm uma seiva amarga (cianopicrina), mucilagens, taninos, ácidos orgânicos e vitamina A e são o órgão mais rico em compostos fenólicos, sobretudo ésteres do ácido cafeico. As folhas são usadas também no fabrico de bebidas amargas e licores (Paris e Moyse, 1971).

Estudos anteriores demonstraram que as sementes do cardo são também uma importante fonte de óleo, tanto a nível de quantidade como de qualidade e que o resíduo resultante da extração é utilizável como componente de ração animal (Foti *et al.*, 1999).

A infusão de Cardo é tradicionalmente usada como colerético, colagogo, hepatoprotector e diurético. Apresenta um efeito de prevenção da arteriosclerose, por diminuição da colesterolemia, e capacidade para reduzir a glicemia, sendo utilizado como adjuvante no tratamento da diabetes (Amico e Sorce, 1997). Os extractos obtidos a partir das flores de *C. cardunculus* são usados, desde há vários

séculos, como coagulante do leite de ovelha no fabrico artesanal do queijo da Serra da Estrela, de Serpa e de Azeitão. A espécie *Cynara humilis* é também utilizada no fabrico de queijo de ovelha como substituto ou misturado com *Cynara cardunculus* quando este é insuficiente. A actividade coagulante dos extractos das flores é devida à presença de proteinases aspárticas (ciprozinas 1, 2 e 3) (Salguero e Sanjuán, 1999).

No passado, muitos mais queijos foram confeccionados com coagulante vegetal, mas actualmente muitos deles estão a ser produzidos com coagulantes de origem animal ou microbiana. Este tipo de coagulantes oferecem mais consistência aos produtos e são também mais baratos e fáceis de usar, evitando assim o trabalho intensivo e dispendioso que resulta da colheita das plantas (Cerretani, 2001).

Estudos revelaram que coagulantes vegetais têm algumas desvantagens inerentes que limitam o seu uso. As proteases das plantas são consideradas demasiado proteolíticas, levando à geração de excesso de ácido, sabores amargos e também a alguns defeitos na textura do queijo (Veringa, 1961).

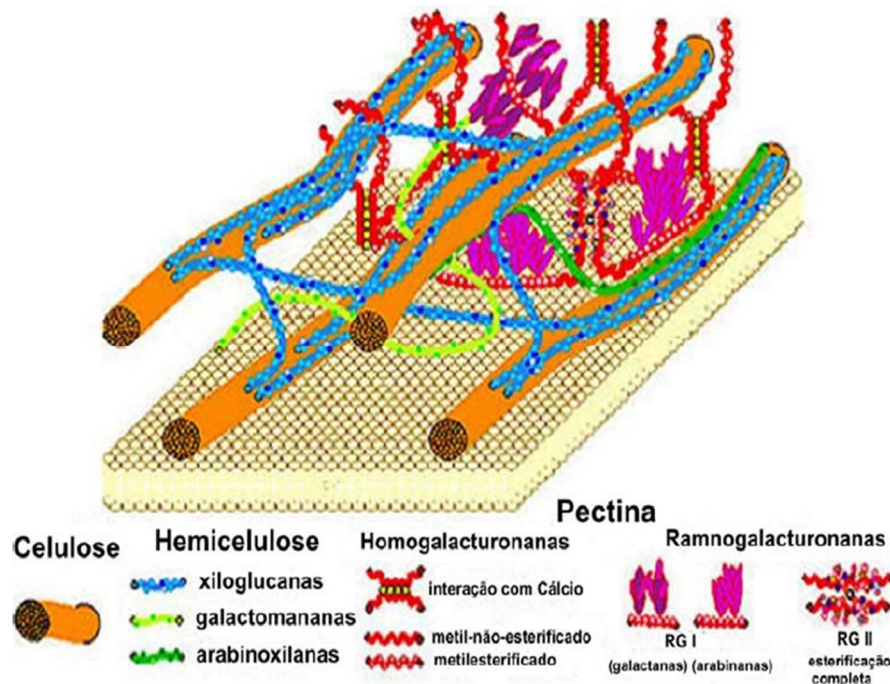
Os queijos com a "Denominação de Origem Protegida", como o "Serra da Estrela", só podem ser produzidos usando as flores do cardo como coagulante (Vioque *et al.*, 2000).

Sendo Junho, Julho e Agosto, os únicos meses em que o cardo está em flor (e portanto capaz de ser usado, pois é nesta parte da planta, principalmente nas pétalas e nos pistilos, que existe grande concentração da substância coagulante), estas têm que ser colhidas e armazenadas em locais secos de forma a serem posteriormente utilizadas na coagulação do leite (no Outono e no Inverno). Contudo, o cardo vai perdendo qualidade com o passar do tempo (Almeida *et al.*, 2009).

### 2.1.1. Parede celular vegetal

As paredes das células vegetais são matrizes de polissacarídeos complexos com diversas funções estruturais e fisiológicas. Em plantas superiores, a parede celular primária é predominantemente composta por água, celulose, hemicelulose e pectina, e, em menor extensão estrutural glicoproteínas, ésteres fenólicos, minerais e enzimas (Sila *et al.*, 2009).

A estrutura da parede celular é altamente organizada, formada por uma rede de celulose e hemicelulose embebida numa matriz de polissacarídeos pécnicos conforme a Figura 2, o que fornece ao mesmo tempo resistência e flexibilidade (Taiz e Zeiger, 2004).



**Figura 2** - Estrutura da parede celular vegetal (Fonte: Aquino, 2008)

A parede celular vegetal é uma estrutura dinâmica, cuja forma, composição e propriedades são constantemente alteradas ao longo da vida celular em resposta ao crescimento, diferenciação, ambiente e actividades da célula. Nas células vivas, a parede celular influencia a taxa de direcção do crescimento celular, exercendo uma profunda influência no desenvolvimento e morfologia vegetal. Assim, determina a forma da célula, a textura do tecido e a forma final do órgão vegetal (Carpita e McCann, 2000; Raven *et al.*, 2001).

Morfologicamente a parede celular é dividida em três regiões distintas, a lamela média, a parede primária e a parede secundária. A lamela média é a região que une as paredes primárias das células vizinhas. Esta camada intercelular é rica em substâncias pécnicas mergulhadas num meio aquoso (Carpita e McCann, 2000; Raven *et al.*, 2001).

A parede celular primária é o termo usado para denominar a parede celular das plantas em crescimento, das células de tecidos vegetais suculentos e das células

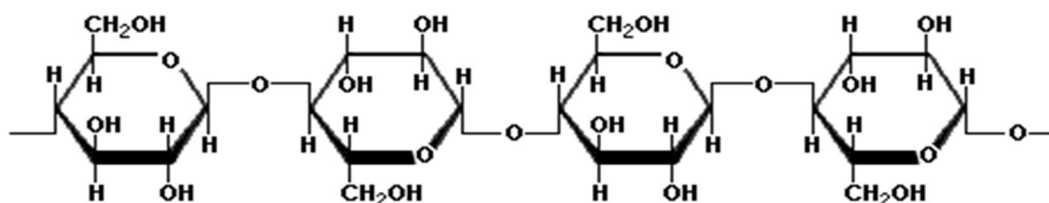
parenquimáticas de folhas de frutos (Marcon, 2004). Quando o crescimento celular é finalizado inicia-se o processo de diferenciação celular, com o início da formação da parede secundária, que se desenvolve a partir da primária e se localiza internamente a esta, sendo caracterizada pela presença de linhina (Raven *et al.*, 2001).

Os polissacarídeos são hidratos de carbono hidrolisáveis formados por mais de dez moléculas de monossacáridos ligados entre si através de ligações glicosídicas, constituindo longas cadeias lineares ou ramificadas. As principais funções desempenhadas pelos polissacarídeos são de reserva energética e estrutural (Lindhorst, 2007).

#### 2.1.1.1. Celulose

O principal componente da parede celular é a celulose, um polissacarídeo, formado por moléculas de glucose, unidas pelas extremidades. Associada à celulose aparecem outros hidratos de carbono como a hemicelulose, pectinas e proteínas estruturais chamadas glicoproteínas. É necessário considerar ainda a ocorrência de outras substâncias orgânicas tais como: linhina, compostos lipídicos (cutina, suberina e as ceras), taninos e resinas, além de substâncias minerais (sílica e carbonato de cálcio.) e da água. A proporção com que cada um destes componentes aparece, varia bastante nas diferentes espécies, tecidos e mesmo, nas diferentes camadas da parede de uma única célula (Castro, 2011).

A celulose é o hidrato de carbono mais abundante na natureza, estando presente em quantidades entre 20 e 40% da matéria seca de todas as plantas superiores. É insolúvel em água e constituída por cadeias lineares que contém três a cinco mil resíduos de D-glucose unidos por ligações  $-(1 \rightarrow 4)$  (Figura 3), que constituem a estrutura que dá suporte às outras molécula da parede celular primária. Pode ser encontrada nas formas amorfa e cristalina, sendo esta última livre de linhina e hemicelulose. Devido à sua linearidade e natureza estereoregular, as moléculas de celulose associam-se entre si formando grandes fibras de policristalinos chamadas microfibrilas, que são unidas através de pontes de hidrogénio intra e intermoleculares. As microfibrilas por sua vez, enrolam-se umas sobre as outras para formar as fibrilas (ou macrofibrilas) de celulose de  $\pm 0,5 \mu\text{m}$  de diâmetro e até  $4 \mu\text{m}$  de comprimento (Albert *et al.*, 1983).



**Figura 3** - Estrutura química da celulose, (Fonte: Scientificpsychic, 2012)

#### 2.1.1.2. Hemicelulose

As hemiceluloses são polissacarídeos da matriz da parede celular, distintos da celulose e pectinas, solúveis em soluções alcalinas e encontrados nas paredes celulares primárias e secundárias. Constituem cerca de 20% do peso seco da parede celular e representam um grupo heterogêneo de polissacarídeos em relação aos tipos de monossacarídeos e à natureza das ligações glicosídicas (Dey e Harborne, 1997; Wong e Saddler, 1993). Os principais monossacarídeos que compõem as hemiceluloses são D-xilose, D-galactose, D-glucose, L-arabinose, D-manose e o ácido D-glucorónico (Rowel *et al.*, 2005). As principais hemiceluloses são xiloglucanas e glucuronoarabinoxilanas que são constituintes das paredes celulares primárias, além das mananas, glucomananas e galactoglucomananas (Albersheim *et al.*, 1996).

A sua estrutura é constituída por ligações  $\beta$ (1-4) e os resíduos de glucose podem ser substituídos por resíduos de xilose via ligações  $\beta$ (1-6). O comprimento estimado desta cadeia é de 400-600 nm (Baumann *et al.*, 2007).

#### 2.1.1.3. Substâncias pécticas

Substâncias pécticas são macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular (Almeida *et al.*, 2005; Jayani *et al.*, 2005). Constituem um complexo coloidal de polissacarídeos ácidos, compostos de resíduos de ácido galacturónico, unidos por ligações  $\beta$ (1-4), parcialmente esterificados por grupos metilo e parcial ou completamente neutralizadas por iões de sódio, potássio ou amónio. Baseado no tipo de modificações das ligações da cadeia principal, as substâncias pécticas são

classificadas em protopectinas, ácido péctico, ácido pectínico e pectina (Kashyap *et al.*, 2000).

As protopectinas são compostas por unidades de ácido galacturónico ligadas ao cálcio por ligações iónicas de carácter acentuadamente forte, são insolúveis em água e estão presentes nos tecidos vegetais intactos. Em condições de hidrólise restrita produzem ácidos pectínicos ou pectina (Jayani *et al.*, 2005).

As pectinas somam cerca de um terço da matéria seca da parede celular de dicotiledóneas e muitas monocotiledóneas, onde exercem diferentes funções. A maior parte destes polissacarídeos é encontrada na lamela média das paredes celulares vegetais, onde são importantes para a adesão célula a célula. Já as pectinas presentes na parede celular primária contribuem para a retenção de água e formação de géis, que influenciam as propriedades mecânicas da parede celular (Carpita e MacCan, 2000).

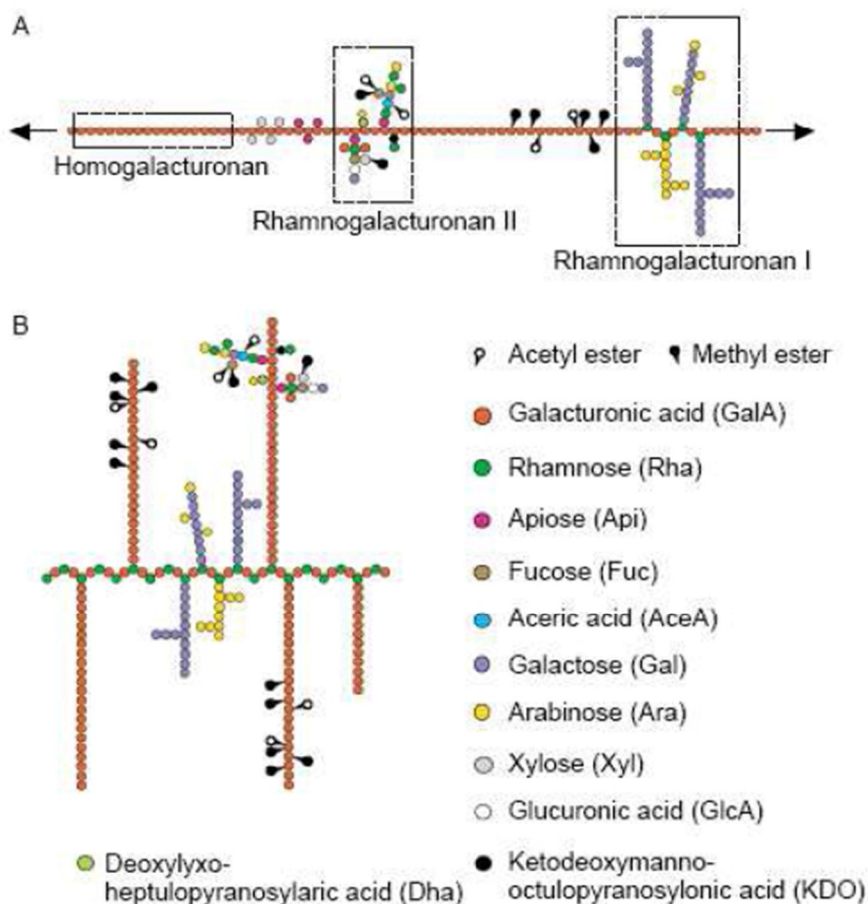
As pectinas são constituídas principalmente por ácido D-galacturónico e açúcares neutros, tais como L-ramnose, L-arabinose e D-galactose. São organizadas sob a forma de cadeia, principalmente de resíduos de ácido D-galacturónico unidos por ligações glicosídicas  $-(1 \rightarrow 4)$  formando uma cadeia linear. Os resíduos de ácido galacturónico podem ser parcialmente esterificados na posição C-6 com metanol, assim como os grupos hidroxilos nas posições C-2 e C-3 podem estar parcialmente esterificados em ácido acético (Yapo *et al.*, 2006).

As pectinas com mais de metade dos grupos carboxilos esterificados com o metanol são chamadas de pectinas HM (pectinas de alta metoxilação), frequentemente denominadas de apenas %pectinas+ e têm poder de gelificação na presença de açúcares e ácidos, enquanto que as mesmas, com menos de metade dos grupos carboxilos esterificados com metanol são chamadas de pectinas LM (pectinas de baixa metoxilação) e apresentam gelificação na ausência de açúcares e na presença de alguns iões metálicos, principalmente o cálcio (Lang e Dornenburg, 2000; Ordonez, 2005; Silva *et al.*, 2005)

A estrutura deste polissacarídeo é constituída por 65% de ácido galacturónico (GalA) e é bastante diversificada, pois consiste em três tipos de fracções conhecidas como a linear homogalacturonana (HG) e as ramificadas, ramnogalacturonanas (RG). A homogalacturonana (HG) consiste de ligações 1,4  $-D$ -GalA com 70 a 80 % dos grupos carboxílicos esterificados com o metanol, enquanto a ramnogalacturonana I (RGI) consiste no dissacarídeo repetido  $[ \rightarrow 4) -D$ -GalA-

(1 2)- -L-Rha-( ], para que uma variedade de diferentes cadeias glicosídicas (principalmente arabinanos e galactanos) fiquem presas aos resíduos de ramnose (Rha) em C-4. A ramnogalacturonana II (RGII) tem uma cadeia principal de HG com cadeias laterais complexas unidas aos resíduos de GalA em C-2 e C-3, possui alguns açúcares raros como a fucose, xilose, apiose e ácido acérico, além dos açúcares comuns como arabinose, glucose, ácido galacturônico e glucurônico (Buggenhout et al., 2009; Marcon, 2004; Willats et al., 2006).

A estrutura convencional da pectina era formada por homogalacturonanas, com ligações simples chamadas de %regiões lineares+ e as ramnogalacturonanas com ramificações contendo vários açúcares, chamadas de %regiões ramificadas+, como mostrado na Figura 4. Entretanto, uma estrutura alternativa foi proposta por alguns autores, na qual a HG pode ser considerada como uma cadeia lateral da RG-I (Figura B), o que causou grande impacto nos estudos da estrutura fina das pectinas (Vincken et al., 2003; Willats et al., 2006).



**Figura 4** - Representação esquemática da estrutura convencional da pectina (A) e da recentemente proposta (B) (Fonte: Willats et al., 2006).

Com base na análise de Marga *et al.*, (2003) a elasticidade da parede celular do cardo está relacionada com o teor e características da pectina, assim como com o tipo e quantidade de hemicelulose e celulose encontradas.

O elevado teor de xiloglucano das hemiceluloses parece ser crucial para a elasticidade celular da parede do filamento.

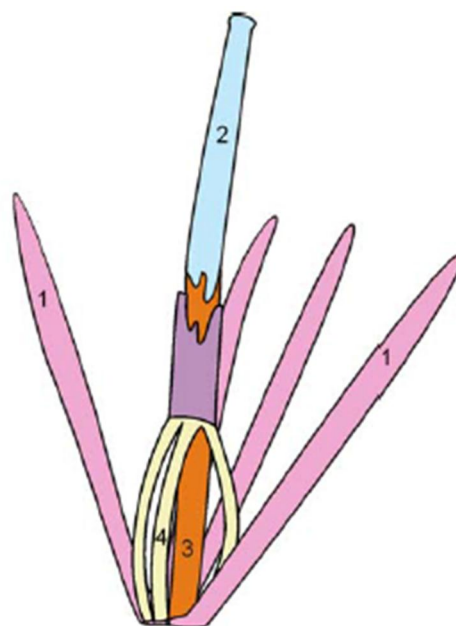
Em associação com o xiloglucano, as microfibrilas de celulose aumentam a extensibilidade. Contrariamente, os teores elevados de celulose na corola e no estilete apical resultam numa maior rigidez (Whitney *et al.*, 1999).

Na flor do cardo, a diferença entre a elasticidade do estilete apical e basal é baseada em pequenas variações na composição e natureza dos polissacarídeos. A rigidez do estilete apical resulta de um aumento da celulose, mas de uma redução do teor de pectina (Marga *et al.*, 2003)

A arabinogalactana é o polissacarídeo dominante na parte rígida do estilete apical e a elasticidade da parte basal está correlacionada com a presença de xiloglucano. O tipo de ligações cruzadas e a orientação das microfibrilas, nas diferentes camadas, podem também contribuir para a rigidez. Para além da composição da parede celular, as propriedades mecânicas do tecido são susceptíveis de ser influenciadas pela forma, espessura, tamanho das células e camadas de tecido (Kohn e Furda, 1968).

A corola é composta principalmente por duas camadas de epiderme, rodeadas por uma espessa cutícula sobre uma camada de pectina, que apresenta uma substancial estrutura rígida (Jeffree, 1996). Em contraste, os órgãos cilíndricos, tais como o filamento e o estilete, contêm várias camadas corticais que podem transmitir tensão / deformação entre a epiderme, córtex e tecido linhificado (Khalili *et al.*, 1998).

Na Figura 5 encontra-se uma ilustração da flor do cardo, onde é possível observar os seus principais constituintes.



**Figura 5** - Principais componentes da flor do cardo: 1 . corola; 2 . Estilete apical; 3 . Estilete basal; 4- Filamento (Fonte: Marga *et al.*, 2003)

A Tabela 1 apresenta as principais características físicas e químicas associadas aos componentes da flor do cardo (Figura 5), assim como, os teores expectáveis de polissacarídeos,

**Tabela 1** - Principais características dos componentes da flor do cardo e teores expectáveis de polissacarídeos (Fonte: Marga *et al.*, 2003)

Tecido	Elasticidade	Pectinas		Hemicelulose	Celulose
		Ligação	Conteúdo		
<b>1- Corola</b>	Baixa	Covalente	Elevado	Xilose	Elevada
<b>2 - Estilete apical</b>	Baixa	Iónica	Baixo	Arabinogalacturónico	Elevada
<b>3 - Estilete basal</b>	Elevada	Iónica	Elevado	Xiloglucano	Baixa
<b>4 - Filamento</b>	Elevada	Iónica	Elevado	Xiloglucano	Baixa

### 2.1.2. Composição: compostos fenólicos

Em condições climáticas severas, as plantas submetidas ao stresse produzem espécies reactivas de oxigénio (ROS) que conduzem ao dano celular e são conhecidas por se encontrarem envolvidas em várias perturbações das plantas, bem como em processos de senescência. ROS também pode reagir com moléculas biológicas, como DNA, proteínas ou lipídios, gerando mutações e danificando

membranas, resultando em lesões nos tecidos e nas células. Os stresses bióticos e abióticos exercem uma influência considerável sobre o pool (conjunto) de metabólitos secundários em plantas. Este conjunto varia muito na composição fenólica tanto qualitativa como quantitativamente. As suas variações são controladas por factores genéticos, desenvolvimento da planta e condições ambientais. Acredita-se que aumentando a síntese de determinados metabólitos secundários como resposta a condições de stress sirva para proteger as estruturas celulares contra a oxidação. Na verdade, a adaptação de muitas espécies de plantas para condições ambientais hostis sugere a presença de constituintes antioxidativas e antimicrobianas nos seus tecidos (Maisuthisakul *et al.*, 2007).

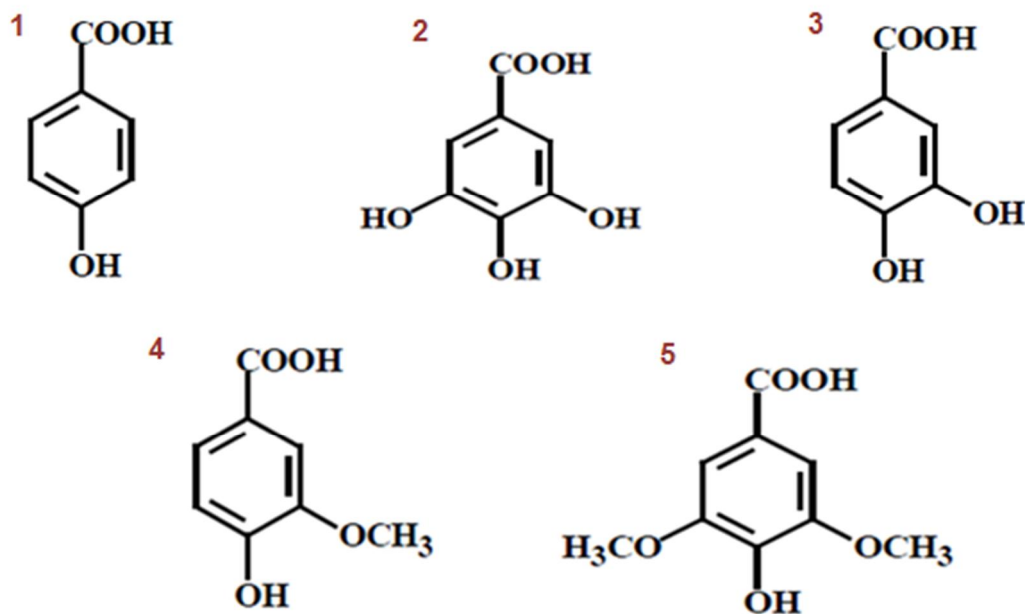
Estes compostos, um dos grupos de fitoquímicos que ocorrem mais amplamente, são de considerável importância fisiológica e morfológica em plantas. Estes compostos têm um papel importante no crescimento e reprodução, fornecendo protecção contra patógenos e predadores, além de contribuírem para a cor e para as características sensoriais das frutas e verduras. Os compostos fenólicos exibem uma vasta gama de propriedades fisiológicas, tais como anti-alérgicas, anti-inflamatórias, anti-microbianas, antioxidantes, efeitos cardioprotectores e vasodilatadores (Bano *et al.*, 2003).

Os antioxidantes são divididos em dois tipos principais de acordo com a sua acção. Antioxidantes primários podem inibir ou retardar a oxidação, eliminando as espécies reactivas de oxigénio, através de processos de redução. Por sua vez os antioxidantes secundários actuam ligando os iões metálicos, convertendo hidroperóxidos para espécies não-radicais, absorvendo as radiações UV ou desactivando o oxigénio singlete. De entre os vários tipos de antioxidantes naturais, os polifenóis são os que têm recebido mais atenção. Estruturalmente os compostos fenólicos compreendem um anel aromático, que ostenta um ou mais substituintes de hidroxilo, de uma serie que pode partir de moléculas fenólicas simples para compostos altamente polimerizados. Ácidos fenólicos, flavonóides e taninos são considerados os principais compostos fenólicos dietéticos. Além desta diversidade, os polifenóis podem encontrar-se associados a vários hidratos de carbono e ácidos orgânicos (Manach *et al.*, 2004).

Na família dos compostos largamente distribuídos na natureza estão os fenólicos encontrados geralmente em todo reino vegetal, mas às vezes podem estar localizados numa só planta. Este grupo, pode dividir-se em flavonóides

(antocianinas, flavonóis e seus derivados) e ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e taninos (King e Young, 1999).

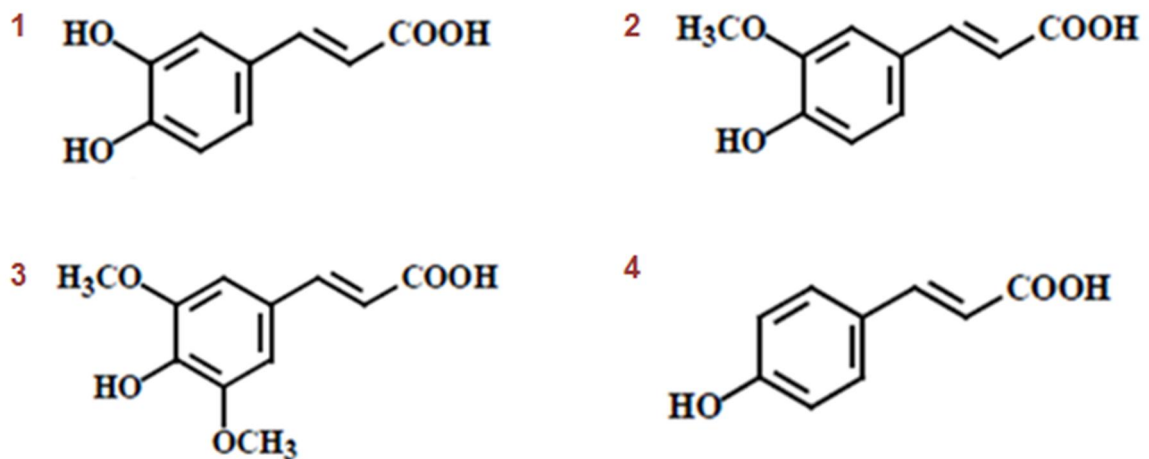
Os ácidos fenólicos consistem em dois subgrupos, isto é, os ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico. Os ácidos hidroxibenzóicos incluem o p-hidroxibenzóico, gálico, ácido protocatecuico, vanílico e siríngico, que têm em comum a estrutura C6-C1, como se pode observar na Figura 6.



**Figura 6** - Estrutura química dos seguintes ácidos: ( 1- Ácido p- hidroxibenzóico; 2- Ácido gálico; 3- Ácido protocatecuico; 4- Ácido vanílico; 5- Ácido siríngico), (Fonte: Lianda, 2009).

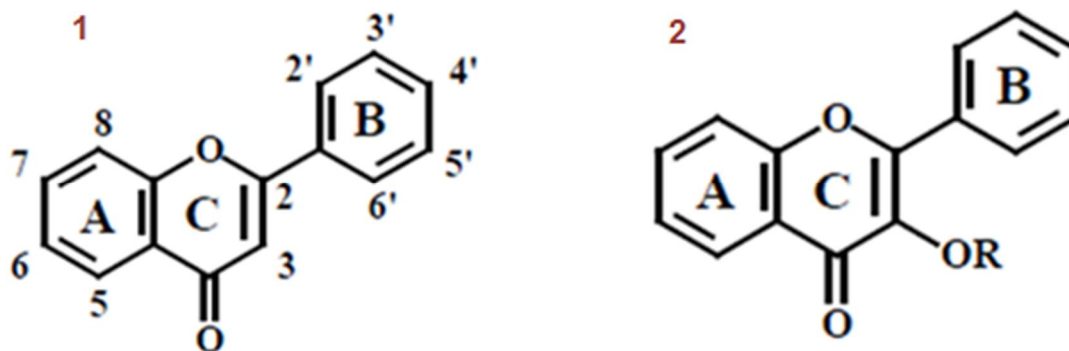
Os ácidos hidroxicinâmicos, por outro lado, são compostos aromáticos com uma cadeia lateral de três carbonos (C6-C3), com cafeico, ferúlico, p-cumárico, sendo o mais comum o ácido sinápico (Bravo, 1998).

Na Figura 7 encontram-se as respectivas estruturas químicas.



**Figura 7** - Estruturas químicas dos seguintes ácidos: ( 1- ácido cafeico; 2- ácido ferúlico; 3- ácido sinápico; 4- ácido p-cumárico), (Fonte: Lianda, 2009).

Os flavonóides constituem o maior grupo de compostos fenólicos da planta, representando mais de metade dos oito mil compostos fenólicos que ocorrem naturalmente. Os flavonóides são compostos de baixo peso molecular, que consistem de quinze átomos de carbono, dispostos numa configuração C6-C3-C6. Essencialmente a estrutura é constituída por dois anéis aromáticos A e B, ligados por uma ponte 3-carbono, geralmente sob a forma de um anel heterocíclico, C (Figura 8). O anel aromático A é derivado a partir da via de etilo / malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina através da via chiquimato. As diferentes variações da substituição do anel padrão C têm como resultado as classes principais, isto é, flavonóides, flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanonols, e antocianidinas, das quais flavonas e flavonóis são as mais estruturalmente diversas e as que ocorrem mais largamente. Substituições nos anéis A e B dão origem aos diferentes compostos de cada classe de flavonóides. Estas substituições podem incluir a oxigenação, a alquilação, glicosilação, acilação, e sulfatação (Hollman e Katan, 1999).



**Figura 8** - Estruturas químicas dos seguintes flavonóides: (1- Esqueleto básico da flavona; 2- Esqueleto básico do flavonol.), (Fonte: Lianda, 2009).

Os principais compostos fenólicos descritos na bibliografia do cardo podem agrupar-se em duas classes: ácidos cinâmicos e flavonas.

Na tabela 2 encontram-se os principais compostos referentes a essas classes.

**Tabela 2** - Compostos fenólicos descritos no Cardo (Fonte: Sevciková *et al.*, 2002)

CLASSE	COMPOSTO
<b>Ácidos cinâmicos</b>	Ácido cafeico
	Ácido 3-O-cafeoilquínico
	Ácido 5-O-cafeoilquínico (ácido clorogénico)
	Ácido 1,3-O-dicafeoilquínico (cinarina)
	Ácido 1,5-O-dicafeoilquínico
<b>Flavonas</b>	Luteolina
	Luteolina 7-Oglucósido (cinarósido)
	Apigenina

## 2.2. METODOLOGIAS ANALITICAS

### 2.2.1. Secagem

Um dos objectivos do estudo da tecnologia de alimentos é o aumento da vida de prateleira dos produtos, para reduzir o número de alimentos que se deterioram antes do consumo, logo, cada vez mais se aprimoram as técnicas de conservação de alimentos. Podem ser usados diversos métodos de conservação pelo emprego de calor ou frio, modificações de pH, atmosfera e actividade de água (com redução do teor de água ou sua imobilização). A escolha do método depende das características do alimento, aspectos que se tem o interesse de preservar, tempo de vida útil pretendido, viabilidade económica, entre outros factores (Garcia, 2009).

O processo de secagem tem por finalidade a redução da actividade da água de forma a inibir o crescimento microbiano e a degradação enzimática e oxidativa, promovendo a estabilização do alimento. Como consequência, é possível aumentar o tempo de conservação e vida útil dos produtos, além de facilitar o transporte, manuseamento e armazenamento devido à redução da massa (Park *et al.*, 2001).

Barbosa e Veja (1996) afirmam que apesar do processo de secagem promover melhorias em certas características desejáveis dos produtos, se este processo não for realizado adequadamente, poderão ocorrer mudanças físicas e químicas indesejáveis. Dessa forma, existe uma tendência para o aperfeiçoamento das técnicas de secagem com o intuito de fomentar a eficiência energética e as taxas de secagem, através do controlo optimizado dos processos, resultando em produtos de melhor qualidade (Mujumbar, 1992).

Os processos de secagem são distintos e classificados em natural e artificial. No natural, é utilizada a energia solar e eólica enquanto, na secagem artificial, recorre-se à energia térmica e mecânica (secagem convectiva, osmótica, liofilização, entre outros). Apesar do gasto energético, os métodos artificiais possibilitam um controlo eficaz de todo processo, permitindo um rigor de qualidade e uma previsão na produção, enquanto a secagem natural é dependente das condições climáticas, estando susceptível a interrupções não programadas. Segundo Gaspareto (2005), a escolha do método mais adequado será determinada pela natureza do produto, pela

forma e qualidade que se deseja atribuir ao produto processado, pelo valor económico e pelas condições de operação.

O princípio físico básico da secagem é a remoção de água do alimento por transferência de calor e massa com a evaporação da água do produto. O calor é fornecido ao alimento por meio de uma fonte que transporte esse calor, como o ar, e assim remova a água contida na superfície do alimento, sendo a taxa de evaporação determinada por parâmetros como: temperatura, humidade, pressão ou velocidade do ar.

Para que ocorra a secagem, o teor de água do produto deve estar acima da humidade de equilíbrio, para as condições de temperatura e humidade estabelecidas. Sendo assim, a água é removida por meio do calor latente de evaporação, por uma fonte de calor, evaporando a água superficial do alimento para o ar ambiente. A humidade migra assim do interior do alimento para a superfície devido ao gradiente de concentração que se estabelece (Park *et al.*,2001).

A evaporação da água de um produto submetido à secagem pode ser baseada em três mecanismos: condução, convecção ou radiação, ou então numa combinação destes. A transferência de calor depende da temperatura, humidade, fluxo e direcção do ar. Quanto à transferência de massa, o movimento da água do interior para a superfície do produto, é influenciada pela natureza física, porosidade e composição química da amostra (António, 2002).

Dois factores devem ser tidos em conta durante o processo de secagem: o transporte de água do interior do produto para a sua superfície e a sua retirada para o meio ambiente, sendo o segundo factor, determinante para a qualidade final do produto. A redução do teor de água deve ser efectuada até ao nível desejado, de acordo com o destino do produto final.

O conhecimento do teor de humidade é muito importante no processo de secagem, pois a sua incorrecta determinação pode induzir à deterioração (microbiológica e reacções enzimáticas) e consequente perda de qualidade dos produtos desidratados (Karathanos, 1999). Contudo, Fellows (2000) ressalta que o conhecimento do teor de humidade é insuficiente para prever a estabilidade do alimento, sendo necessário o conhecimento da actividade da água ( $a_w$ ), que representa a água disponível para o produto. A actividade da água pode ser definida como a razão entre a pressão de vapor da água no alimento e a pressão de vapor da água pura para a mesma temperatura, (Fellows, 2000). A actividade da água é

um dos factores mais importantes para a indústria alimentar, pois quantifica a água disponível para o crescimento de microorganismos e as reacções que podem alterar os alimentos, o que possibilita a previsão da sua estabilidade. A actividade da água pode ser determinada por um medidor de actividade da água e o seu valor varia numericamente de 0 a 1.

Aceita-se como regra geral que o crescimento de bactérias é inibido a valores de  $a_w$  inferiores a 0,90; há excepções a essa regra como, por exemplo, as bactérias hemofílicas, que podem crescer a  $a_w$  de até 0,76, e *Staphylococcus aureus*, que, sob condições aeróbias, pode chegar a crescer a 0,86. Alguns fungos podem crescer a actividades de água limite de até 0,60, o que faz com que esses microrganismos sejam de grande importância em alimentos desidratados. Valores de  $a_w$  inferiores a 0,60 não possibilitam deterioração microbiana, pois não permitem crescimento de microrganismos, embora eles ainda possam sobreviver. De acordo com a susceptibilidade a alterações microbiológicas, os alimentos podem ser classificados em:

- Alimentos de alta humidade ( $a_w > 0,85$ ), muito propensos a deteriorações microbiológicas em geral. O limite inferior de actividade de água (0,85) foi estabelecido com base na actividade de água mínima requerida para crescimento de *Staphylococcus aureus*, a bactéria patogénica mais tolerante nesse aspecto.
- Alimentos de humidade intermediária ( $0,60 < a_w < 0,85$ ), que podem sofrer deterioração por microrganismos xerofílicos e osmofílicos.
- Alimentos de baixa humidade ( $a_w < 0,60$ ), nos quais não há crescimento de microrganismos, embora eles possam sobreviver. Os valores óptimos e mínimos de  $a_w$  para crescimento microbiano nem sempre coincidem com aqueles válidos para produção de metabolitos (Insumos, 2014).

A actividade de água afecta não apenas as taxas de alterações microbiológicas como, também, influencia alterações químicas.

De entre as várias vantagens de se utilizar o processo de secagem são destacadas: a facilidade na conservação do produto; estabilidade dos componentes aromáticos à temperatura ambiente por longos períodos de tempo; protecção contra a degradação enzimática e oxidativa; redução do peso; economia de energia por não necessitar de refrigeração; redução de custos no transporte, embalagem e

armazenamento, e a disponibilidade do produto durante qualquer época do ano (Park, 2006).

De entre os muitos métodos utilizados para a secagem de tecidos vegetais destacam-se dois métodos, pela sua importância para o estudo realizado: secagem convectiva com ar quente em estufa e liofilização.

#### 2.2.1.1. Liofilização

A liofilização, também denominada por criodesidratação ou criosecagem, é um processo diferenciado de desidratação de produtos, pois ocorre em condições especiais de pressão e temperatura, possibilitando que a água previamente congelada (estado sólido) passe directamente ao estado gasoso (sem passar pelo estado líquido), ou seja, a mudança de estado físico ocorre por sublimação.

O processo tem por objectivo estabilizar produtos (diminuição da actividade de água) através de uma série de operações a que o material é submetido durante o processamento: congelamento, sublimação, secagem a vácuo e armazenagem do produto.

Assim obtêm-se produtos de qualidade superior, fácil reconstituição (hidratação) e longa vida de prateleira (Garcia, 2009).

#### 2.2.1.2. Secagem Convectiva

A secagem convectiva é um processo de remoção da humidade do alimento através da exposição do mesmo a um fluxo contínuo de ar quente (Ratti, 2001). Durante este processo, o calor fornecido pelo ar quente é transferido para a superfície da amostra por convecção e, posteriormente, para o centro por condução, promovendo a vaporização do líquido no seu interior até à superfície onde ocorre a remoção pela corrente de ar, através de dois processos simultâneos: transferência de calor para evaporar o líquido; e transferência de massa, na forma de líquido ou vapor no interior, e na forma de vapor na superfície da amostra, como ilustra a Figura 9.



**Figura 9** - Representação esquemática do movimento de água durante a secagem (Fonte: Fellows, 2000)

Desta forma, um gradiente de pressão de vapor de água é estabelecido a partir do interior húmido do alimento para o ar de secagem, representando a força motriz para a transferência de água (Barbosa e Veja, 1996).

A água contida nos alimentos é classificada em água livre ou capilar, localizada no interior celular e espaços intercelulares, retida por forças capilares e água higroscópica, que se encontra nos espaços microscópicos da parede celular, ligada por forças físico-químicas. A primeira água a ser removida é a água livre ou capilar que se encontra em maior quantidade, sendo retida por forças capilares, que são consideravelmente menores do que as forças que mantêm a água de saturação existente na parede celular (Skaar, 1972). A remoção da água higroscópica é um processo lento e complexo, pois pode ocorrer através da difusão de vapor, difusão de água e uma combinação de ambos. Segundo Okada (1997), os mecanismos de difusão são predominantes para os materiais amorfos e os mecanismos de capilaridade para os materiais porosos. O tipo de mecanismo também varia entre os períodos do processo de secagem.

Os mecanismos de migração da humidade do interior do alimento até à sua superfície durante o processo de secagem variam de acordo com a estrutura do material e da temperatura de secagem. Considerando que a maior parte da água se encontra no meio intracelular, o conteúdo de água capilar presente é rapidamente removido, dando início ao movimento da água higroscópica.

Quando a secagem ocorre em temperaturas reduzidas, as membranas celulares não são danificadas e conferem uma maior resistência ao transporte da humidade, uma vez que apresentam permeabilidade de pelo menos três ordens de grandeza menor do que as encontradas nas paredes celulares e no espaço extracelular. Desta forma, a via de transporte predominante da humidade é intracelular e ocorre através da difusão celular, em que a água enfrenta a resistência das membranas das células, das paredes celulares e dos espaços intercelulares. Durante a secagem a altas temperaturas, as membranas celulares são danificadas e a via de transporte de humidade é principalmente extracelular (através do espaço intercelular e lacunas criadas por células mortas), que oferece menor resistência, levando a um maior valor na difusão da humidade (Halder *et al.* 2010).

Existem muitos métodos para determinar a humidade. A escolha do método depende: da forma como a água está presente na amostra, da natureza da amostra, da quantidade relativa de água, da rapidez desejada na determinação e do equipamento disponível (Park e António, 2006). Assim, a humidade pode ser determinada recorrendo a uma balança de halogéneo, que indica directamente a humidade dos produtos testados. Este método é particularmente recomendado para análises em série e controlos de fabricação, onde se pretende, essencialmente, rapidez de execução, já que é menos moroso e permite a obtenção de resultados precisos.

### 2.2.2. Processo de Secagem

O conhecimento do conteúdo inicial e final (equilíbrio) de humidade do material, da relação da água com a estrutura sólida e do transporte da água do interior do material até a sua superfície possibilitam fundamentar o fenómeno da secagem. O fenómeno da secagem não pode ser generalizado para materiais biológicos, pois possuem características próprias e propriedades que podem sofrer importantes alterações durante a secagem.

As características específicas de cada produto, associadas às propriedades do ar de secagem e ao meio de transferência de calor adoptado, determinam diversas condições de secagem. Entretanto, a transferência de calor e de massa entre o ar de secagem e o produto é um fenómeno comum para qualquer condição de secagem. O processo de secagem, baseado na transferência de calor e de

massa, pode ser dividido em três períodos, como se pode observar na Figura 10 (Park *et al.* 2001).

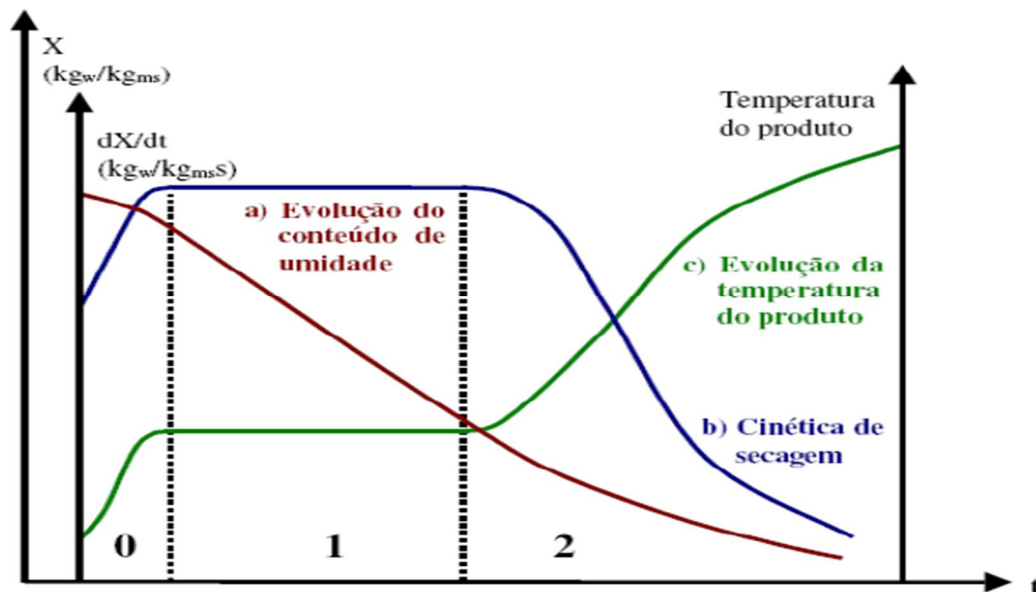


Figura 10 - Curvas típicas de secagem (Fonte: Park *et al.* 2001)

A curva (a) representa a diminuição do teor de água do produto durante a secagem (conteúdo de humidade do produto em base seca ( $X$ ), em relação à evolução do tempo de secagem ( $t$ )) isto é, a curva obtida através da pesagem do produto durante a secagem numa determinada condição.

A curva (b) representa a velocidade (taxa) de secagem do produto (variação do conteúdo de humidade do produto por tempo,  $dX/dt$  em relação à evolução do tempo ( $t$ )), isto é, a curva obtida discriminando a curva (a).

A curva (c) representa a variação da temperatura do produto durante a secagem (variação da temperatura do produto ( $T$ ) em relação à evolução do tempo  $t$ ), isto é, a curva obtida medindo a temperatura do produto durante a secagem.

Analisando os períodos:

- O primeiro período representa o início da secagem. Nesse período ocorre uma elevação gradual da temperatura do produto e da pressão de vapor de água. Essas elevações têm prosseguimento até ao ponto em que a transferência de calor é equivalente à transferência de massa (água).
- O segundo período caracteriza-se pela taxa constante de secagem. A água que evapora é a água livre. A transferência de massa e de calor é equivalente e, portanto, a velocidade de secagem é constante. Enquanto houver

quantidade de água na superfície do produto suficiente para acompanhar a evaporação, a taxa de secagem será constante.

- No terceiro período, a taxa de secagem é decrescente. A quantidade de água presente na superfície do produto é menor, reduzindo-se, portanto, a transferência de massa. A transferência de calor não é compensada pela transferência de massa; o factor limitante nessa fase é a redução da migração da humidade do interior para a superfície do produto. A temperatura do produto aumenta, atingindo a temperatura do ar de secagem.

Quando o produto atinge o ponto de humidade de equilíbrio em relação ao ar de secagem, o processo é encerrado (Park *et al.* 2001).

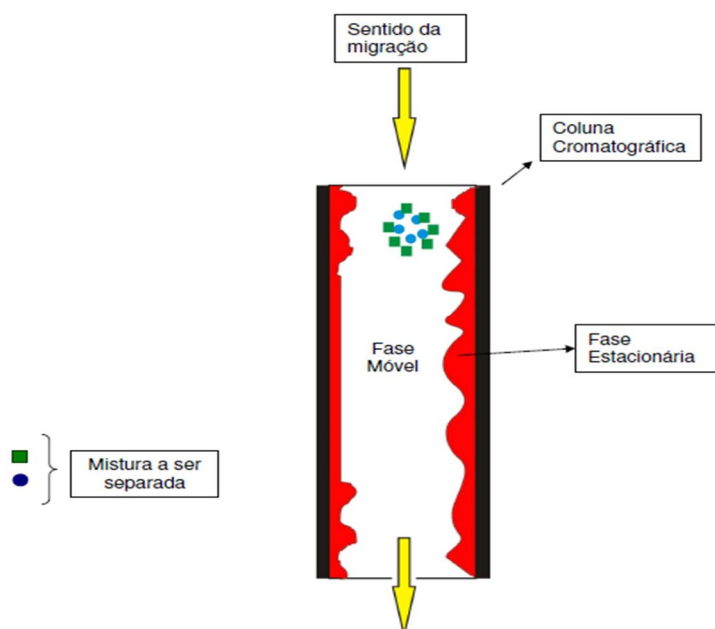
### 2.2.3. Cromatografia

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna-a uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação. O termo cromatografia foi primeiramente aplicado em 1906 e a sua utilização é atribuída a um botânico russo ao descrever as suas experiências na separação dos componentes de extractos de folhas. Nesse estudo, a passagem de éter de petróleo (fase móvel) através de uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio (fase estacionária), à qual se adicionou o extracto, levou à separação dos componentes em faixas coloridas. Este é provavelmente o motivo pelo qual a técnica é conhecida como cromatografia (chrom = cor e graphie = escrita), podendo levar à errónea ideia de que o processo seja dependente da cor (Collins *et al.* 1993).

Apesar deste estudo e de outros anteriores, que também poderiam ser considerados precursores do uso dessa técnica, a cromatografia foi praticamente ignorada até à década de 30, quando foi redescoberta. A partir daí, diversos trabalhos na área possibilitaram o seu aperfeiçoamento e, em conjunto com os avanços tecnológicos, levaram-na a um elevado grau de sofisticação, o qual resultou no seu grande potencial de aplicação em muitas áreas. A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação com padrões

previamente existentes, para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis e para a separação dos componentes de uma mistura (Collins *et al.* 1993).

A Figura 11 representa de uma forma esquematizada o processo de separação dos compostos da amostra.



**Figura 11** - Esquema base de uma cromatografia, (Fonte: Naoum, 2006)

### 2.2.3.1. HPLC

O grande avanço na cromatografia em coluna foi o desenvolvimento e a utilização de suportes com partículas diminutas responsáveis pela alta eficiência, as quais tornam necessário o uso de bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel, devido à sua baixa permeabilidade. A Figura 12 mostra o equipamento de HPLC utilizado no ensaio.



**Figura 12** - Equipamento de HPLC utilizado.

As fases móveis utilizadas em HPLC devem possuir alto grau de pureza e estar livres de oxigénio ou outros gases dissolvidos, sendo filtradas e desgaseificadas antes do uso (Lough e Wainer, 1995).

A bomba deve proporcionar ao sistema extracção contínua, sem pulsos com alta reprodutibilidade, possibilitando a eluição da fase móvel a um fluxo adequado. As válvulas de injeção usadas possuem uma alça de amostragem para a introdução da amostra com uma seringa e duas posições, uma para o preenchimento da alça e outra para sua liberação para a coluna. As colunas utilizadas em HPLC são geralmente de aço inoxidável e reaproveitáveis, sendo empacotadas com suportes de alta resolução, não sendo necessária a sua regeneração após cada separação. Os detectores que podem ser utilizados para a identificação dos compostos separados por HPLC são detector de UV-Vis, Diode array ultravioleta, sendo também empregues detectores de fluorescência, de índice de refração, e electroquímicos, entre outros. O registro de dados pode ser feito através de um registrador, um integrador ou um microcomputador.

A versatilidade desta técnica reside no grande número de fases estacionárias existentes, as quais possibilitam análises e separações de uma ampla gama de compostos com alta eficiência. Tem sido utilizada em várias áreas da ciência, no acompanhamento de sínteses, em análises de pesticidas, feromonas, no isolamento

de produtos naturais e sintéticos e na produção e controle de qualidade de medicamentos, dentre tantas outras aplicações.

As separações em HPLC podem efectuar-se por adsorção, partição ou ambos. O suporte mais comumente utilizado é a sílica. O uso de fases estacionárias líquidas adsorvidas a um suporte não tem grande aplicação devido à perda de fase estacionária, mas o uso de suportes modificados possibilita a produção de uma imensa variedade de colunas com diferentes propriedades e tipos de selectividade. As fases assim obtidas são chamadas de quimicamente ligadas. Essas fases, dependendo da modificação feita ao suporte, podem actuar no modo normal, reverso ou ambos. Na cromatografia em fase normal, a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, e em fase reversa, a fase móvel é mais polar (Lough e Wainer, 1995).

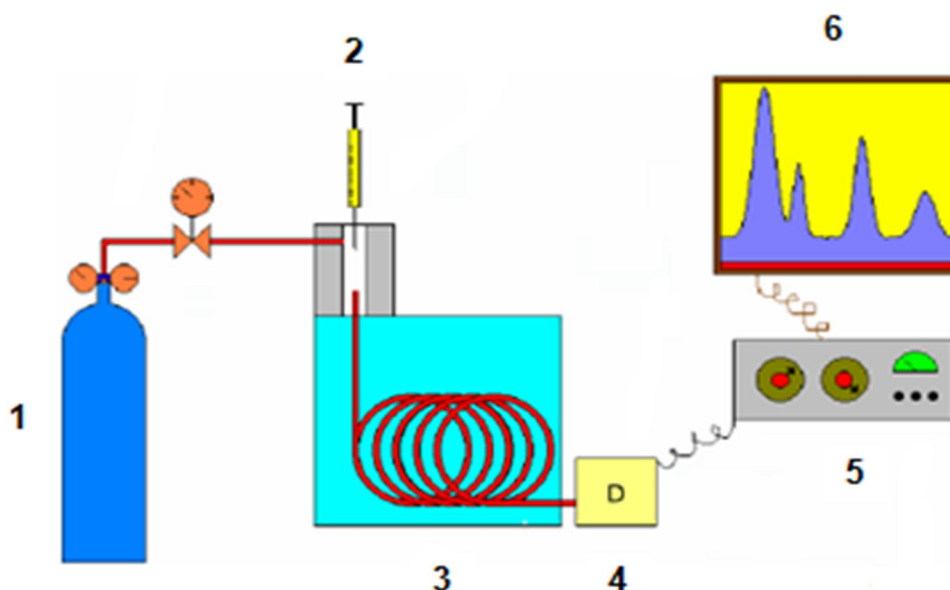
#### 2.2.3.2. Cromatografia gasosa

Devido à importância da determinação dos polissacarídeos, algumas metodologias têm sido estudadas, entre as quais, as fundamentadas nas técnicas cromatográficas (Herter *et al.* 2001).

O principal mecanismo de separação da cromatografia gasosa está baseado na partição dos componentes de uma amostra entre a fase móvel gasosa e a fase estacionária líquida. A utilização de fases estacionárias sólidas, as quais levariam à separação por adsorção, apresenta poucas aplicações.

Na cromatografia gasosa, a amostra é injectada no topo de uma coluna cromatográfica. A eluição é feita por fluxo de um gás de arraste inerte que actua como fase móvel. Ao contrário da maioria dos outros tipos de cromatografia, a fase móvel não interage com as moléculas do analito, a sua função é transportar o analito através da coluna. O gás de arraste geralmente mais utilizado é o hélio, o azoto, e o hidrogénio. Este deve ser quimicamente inerte e a sua escolha depende da disponibilidade, pureza, consumo e tipo de detector utilizado (Júlio, 2002; Skoog *et al.*, 2000).

A Figura 13 ilustra os componentes básicos de um equipamento para cromatografia gasosa.



**Figura 13** - Esquema de um cromatografo gasoso: 1- Reservatório do gás de arraste, 2 - Local onde a amostra será injectada, 3 - Coluna Cromatográfica, 4 . Detector, 5 - Amplificador de sinal, 6 - Formação do Cromatograma, (Fonte: Naoum, 2006).

As amostras podem ser gasosas, líquidas ou sólidas, sendo o método de injeção diferente para cada caso. O método mais comum de injeção envolve o uso de micro-seringas, injectando a amostra através de um orifício de borracha ou silicone localizado no topo da coluna. A temperatura do injetor deve ser suficiente para que a amostra líquida vaporize rapidamente sem decomposição ou fraccionamento. Sendo normalmente mantida cerca de 50°C acima do ponto de ebulição dos componentes da amostra (Skoog *et al.*, 2000).

A separação dos componentes da amostra é feita na coluna. Em cromatografia gasosa, as colunas podem dividir-se em, colunas capilares e empacotadas. Estas variam em comprimento de 2 a 50 metros, sendo construídas por aço inoxidável, vidro, sílica fundida ou teflon. As colunas capilares são mais eficientes que as empacotadas, obtendo-se melhores separações a baixa temperatura e a intervalos de tempo menores. A temperatura da coluna é uma variável importante que deve ser controlada. A temperatura óptima da coluna depende do ponto de ebulição da amostra e do grau de separação que se deseja. De grosso modo, uma temperatura igual ou ligeiramente acima do ponto de ebulição de uma amostra, resulta num tempo de eluição de 10 a 30 minutos. Quando se pretende separar amostras com volatilidades diferentes, é necessário criar uma rampa de temperatura, porque os

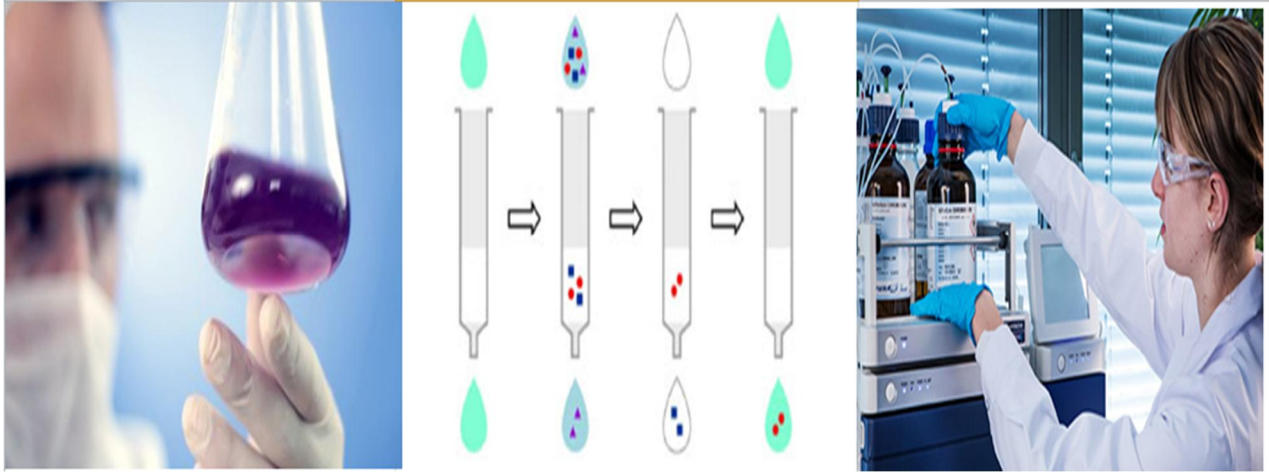
componentes com um ponto de ebulição baixo são eluídos rapidamente, enquanto as espécies menos voláteis levam mais tempo a eluir (Skoog *et al.*, 2000).

A função do detector, situado à saída da coluna, é registar e medir pequenas quantidades dos componentes da mistura separados na coluna e levados pelo fluxo do gás de arraste. Os detectores de maior aplicação são os por ionização em chama e os por condutividade térmica. Os dados podem ser obtidos através de um registador potenciométrico, um integrador ou um microcomputador, sendo as amostras identificadas pelos seus tempos de retenção. Nesses equipamentos é necessário o controlo da temperatura do injector, da coluna e do detector, a qual é mantida por termostatos (Degani *et al.* 1998).

A escolha do detector depende de vários factores, nomeadamente: sensibilidade adequada; boa estabilidade e reprodutibilidade; resposta linear para os analitos; intervalo de temperaturas, que abranja desde a temperatura ambiente até, pelo menos, 400°C e uma similaridade na resposta para todos os analitos.

A escolha da fase estacionária é de fundamental importância, sendo ela o componente crítico da coluna. As fases estacionárias podem ser polares, apolares ou quirais. As fases polares são baseadas em polietileno glicol puro ou modificado e as apolares em metilsiloxano puro ou modificado. As fases quirais mais comuns são compostas de ciclodextrinas.

Os, espectrofotómetros de massa têm sido acoplados a equipamentos de cromatografia gasosa, possibilitando a identificação das substâncias presentes na amostra (Degani *et al.* 1998).



# CAPITULO III

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. AMOSTRAS

#### 3.1.1. Cardo

As amostras de flor de cardo usadas neste estudo eram da espécie *Cynara cardunculus* L. colhido na zona centro, mais propriamente em Oliveira do Hospital, na ANCOSE (Associação Nacional de Criadores de Ovinos da Serra da Estrela) na época da florescência, em Junho.

Quando recepcionadas, as amostras foram de imediato congeladas, com o intuito de preservar as suas características originais e de forma a possibilitar a análise química e utilização a longo prazo das mesmas.

### 3.2. METODOLOGIA

#### 3.2.1. Secagem

A secagem convectiva foi realizada com flores de cardo, a diferentes temperaturas (40°C, 50°C e 60°C) em estufa com circulação e renovação de ar forçada (WTB Binder, com uma velocidade de ar de 0,5 m/s.). As amostras foram colocadas numa bandeja de papelão onde foram inferidos alguns furos para melhor contacto entre o ar quente e a amostra. Dos processos resultaram 3 amostras, correspondentes ao cardo secado a 40, 50 e 60°C.

Foram realizados duplicados para cada processamento, com determinações do teor de humidade a cada 15 minutos, até obtenção de um valor constante de cerca de 1% de humidade. A humidade foi determinada numa balança de Halogénio, Halogen Moisture Analyser HG 53 da Mettler Toledo.

Paralelamente, a flor do cardo foi liofilizada num liofilizador TDF 5505 da Uniequip, após ter sido congelada a uma temperatura de . 18°C. O processo de liofilização decorreu durante 24 horas, e as condições operatórias foram temperaturas entre . 52°C e . 49°C e pressão de 0,7 Pa.

Após obtenção dos extractos secos, a sua actividade da água foi medida. O equipamento de medição de actividade da água usado foi um LabMaster da Novasina.

### 3.2.2. Extracção sólida - líquida

Pesaram-se em duplicado cerca de 5 gramas de flor de cardo, referente a cada temperatura de secagem, de forma a se realizarem duas extracções diferentes. As amostras foram depois extraídas sucessivamente com 100 mL de acetona (60% v/v) e com 100 mL de metanol. Estas mantiveram-se em agitação magnética, durante 1 hora, à temperatura ambiente.

Decorrido esse tempo a mistura foi filtrada e o sobrenadante colocado num porta-amostras. Este procedimento de extracção foi repetido 3 vezes. O total de sobrenadantes foi colocado no mesmo porta-amostras e designado como extracto de metanol e extracto de acetona.

Após todo o processo estar concluído, os extractos foram congelados para posterior utilização.

### 3.2.3. Extracção em fase sólida

O método de extracção em fase sólida (SPE) é uma técnica de preparação de amostras cada vez mais utilizada. O cartucho de SPE é utilizado mais frequentemente para preparar amostras líquidas e extrair analitos semi-voláteis ou não voláteis, mas também pode ser utilizado com sólidos que são pré-extraídos em solventes. A extracção em fase sólida consiste assim num processo de separação através do qual os compostos que se encontram dissolvidos ou suspensos numa mistura líquida, são separados de acordo com as suas propriedades químicas e físicas.

Para o processo de fraccionamento dos compostos fenólicos foram utilizadas mini-colunas Discovery DSC-18, com capacidade de 60 mL e com 10 gramas de material de preenchimento C18. As colunas foram activadas com 100 mL de metanol e de seguida lavadas com 100 mL de água destilada, seguindo-se um pré-condicionamento com 50 mL de solução tampão comercial de fosfato de pH 7,0 antes da sua utilização. O pH da amostra foi neutralizado por adição de NaOH.

A amostra foi cuidadosamente carregada na coluna C-18 preconditionada, com um fluxo de menos de 2 mL/min. A Figura 14 ilustra o procedimento efectuado. O fraccionamento começou adicionando-se 100 mL de solução tampão fosfato pH 7,0 (1:8 v/v) para eluir os ácidos fenólicos (fracção tampão). De seguida, a coluna foi

lavada com 50 mL de água destilada e seca sob vácuo por alguns segundos. A eluição com 100 mL de acetato de etilo permitiu isolar a fracção constituída por monómeros e oligómeros das procianidinas. Os compostos fenólicos fixados na coluna, compostos por antocianinas e pigmentos poliméricos foram eluídos finalmente com 100 mL de metanol acidificado com 0,1% de HCl (extracto metanol).

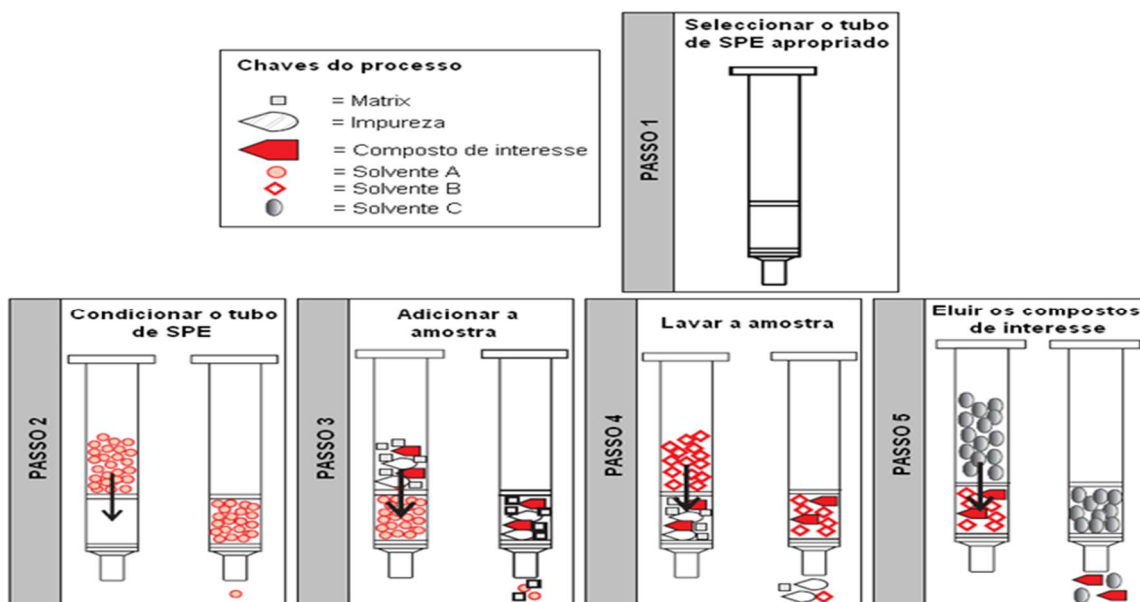


Figura 14 - Etapas da extração em fase sólida

Os extractos obtidos foram depois concentrados com o auxílio de um evaporador rotativo Laborota 4000 da Heidolph, até um volume final de cerca de 2 mL (Figura 15).

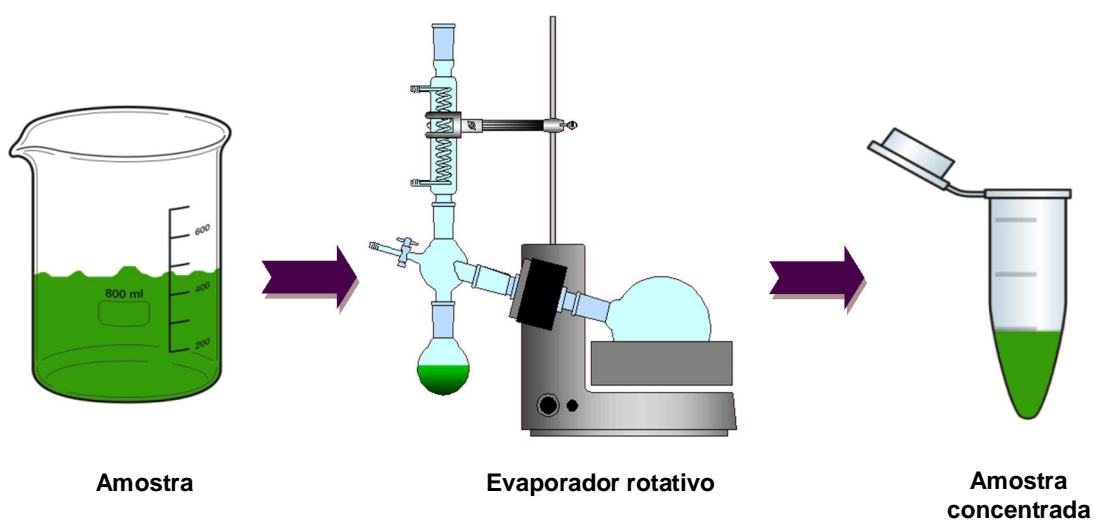


Figura 15 - Esquema representativo da concentração da amostra

A fracção tampão foi utilizada para a determinação dos ácidos fenólicos e a extracção metanol foi usada para a determinação das antocianinas monoméricas, recorrendo-se à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Para tal utilizou-se o equipamento Dionex Ultimate 3000 Chromatographic System (Sunnyvale, California, USA) (Figura 11) equipado com bomba quaternária 46 modelo GPL-3400 A, um injector automático ACC-3000, um compartimento de colunas com termóstato (regulável até 35 °C) e um detector UV/Vis modelo MWD-300.

A fase móvel A foi uma solução aquosa de ácido fórmico a 5% (usada como fase móvel, para ajustar o pH, devido à sua volatilidade e características acidificantes) e a fase móvel B metanol, ambos de qualidade analítica dos laboratórios Panreac. A água ultrapura foi obtida de um sistema de purificação Milli-Q da marca Millipore. A eluição decorreu com um fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> de acordo com o descrito na Tabela 3. O gradiente utilizado foi 5% B, 5 min; gradiente até 60% de B em 60 min; 60% B, 5 min; 5% B, 5 min.

**Tabela 3** - Gradiente de eluição utilizado na análise dos ácidos fenólicos dos frutos analisados por HPLC

TEMPO (min)	SOLVENTE A (%)	SOLVENTE B (%)
0.0	95.0	5.0
5.0	95.0	5.0
65.0	40.0	60.0
70.0	40.0	60.0
75.0	95.0	5.0

A detecção foi feita a 280 e a 325 nm e foi utilizado o programa de software Chromeleon (versão 6.8) (Sunnyvale, Califórnia, EUA) para traçar o perfil cromatográfico dos ácidos fenólicos.

O volume de amostra injectada foi de 50  $\mu$ L e o fluxo foi de 1 mL/min, sendo a análise realizada a 25 °C.

### 3.2.4. Análise de açúcares neutros

A análise de açúcares neutros foi efectuada após a hidrólise com ácido sulfúrico do material polisacárido, seguindo-se a derivatização dos açúcares libertados a acetatos de alditol por adaptação do método proposto por Coimbra *et al.* (1994).

Pesou-se entre 2 a 3 mg de amostra para um tubo Soviril, e procedeu-se à hidrólise. Às amostras adicionou-se 200  $\mu$ L de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 72% e deixou-se incubar à temperatura ambiente durante 3 horas, com agitação ocasional, adicionando-se depois 2,2 mL de água destilada. Colocaram-se todas as amostras a 100°C durante 2,5 horas.

Decorrido esse tempo, arrefeceram-se os tubos num banho de gelo e seguiu-se para a fase de redução e acetilação. Adicionou-se 200  $\mu$ L de padrão interno (2-desoxiglucose 1 mg/mL) e transferiu-se 1,0 mL para novos tubos, neutralizando-se com 200  $\mu$ L de NH<sub>3</sub> a 25%. Para a reacção de redução dos açúcares a alditois, adicionou-se 100  $\mu$ L de NaBH<sub>4</sub> (15% (m/v) em NH<sub>3</sub> 3M, (solução preparada imediatamente antes da adição) e colocou-se a 30°C durante 1 hora. Arrefeceu-se num banho de gelo e adicionou-se 2 x 50  $\mu$ L de ácido acético glacial. Transferiu-se 300  $\mu$ L para tubos Soviril e, ainda no banho de gelo, adicionou-se 450  $\mu$ L de 1-metilimidazol e 3 mL de anidrido acético, agitou-se bem e colocou-se a incubar em banho maria a 30°C durante 30 min. Adicionou-se 3,0 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano, tendo o cuidado de o fazer no banho de gelo e de se agitar muito bem sem a utilização do vórtex. De seguida centrifugou-se cerca de 30 segundos a 3000 rpm, obtendo-se a separação de duas fases: a fase orgânica e a aquosa (extracção líquido-líquido). Esta última, foi aspirada por sucção com o auxílio de um sistema de vácuo de água e uma pipeta de Pasteur. Este passo foi repetido mais uma vez. Procedeu-se à dupla lavagem da fase orgânica, com mais 3 mL de água destilada, agitou-se, centrifugou-se e retirou-se totalmente a fase aquosa. Na última lavagem, certificou-se de que se retirou toda a água existente no tubo.

Transferiu-se a fase orgânica para tubos apropriados para o evaporador centrífugo (Speed-Vac) com vista à evaporação do diclorometano. Adicionou-se 1 mL de acetona e evaporou-se na Speed-Vac, sendo este passo repetido mais uma vez.

Os compostos foram depois separados em coluna capilar FID. Este detector de ionização de chama consiste numa chama de hidrogénio (H<sub>2</sub>)/ar e de um prato colector. O efluente passa na coluna do CG através da chama, a qual divide a

amostra em moléculas orgânicas e produz iões. Os iões são depois recolhidos por um eléctrodo negativo que é responsável por produzir um sinal eléctrico.

O FID é extremamente sensível e oferece uma grande faixa dinâmica, proporcionando uma leitura rápida, precisa e contínua. A sua única desvantagem é que destrói a amostra após efectuar o processo.

O cromatografo gasoso usado apresenta as características referidas na Tabela 4.

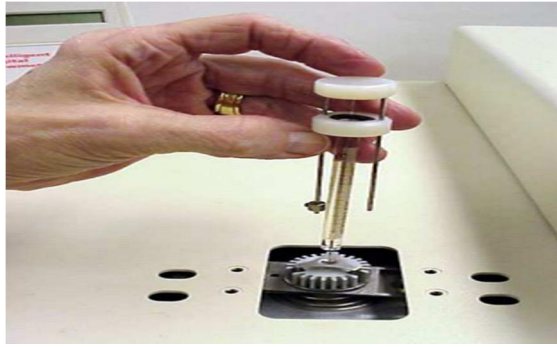
**Tabela 4** - Características do cromatografo gasoso usado na realização dos ensaios.

<b>CARACTERISTICAS</b>	
<b>Detector</b>	<b>De chama, FID</b>
<b>Gás de arraste</b>	<b>Hidrogénio</b>
<b>Coluna</b>	<b>DB 225</b>
<b>Comprimento da coluna</b>	<b>30 metros</b>
<b>Diâmetro interno da coluna</b>	<b>0,25 mm</b>
<b>Espessura do filme</b>	<b>0,15 µL</b>
<b>Temperatura do injector</b>	<b>220 °C</b>
<b>Temperatura do detector</b>	<b>230 °C</b>
<b>Tempo do ensaio</b>	<b>10 minutos</b>

A temperatura da coluna é também uma variável importante e por isso deve ser controlada. A temperatura óptima da coluna depende directamente do ponto de ebulição do composto, para isso o programa de temperaturas usado no ensaio foi escolhido segundo as características da amostra e apresenta a seguinte rampa de tempo/temperatura:

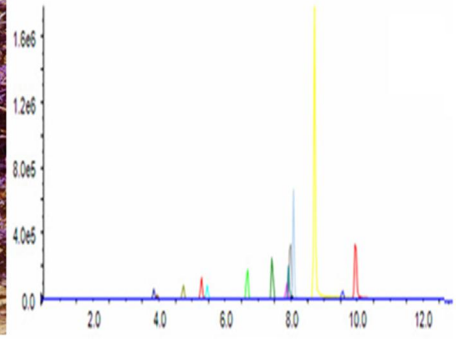
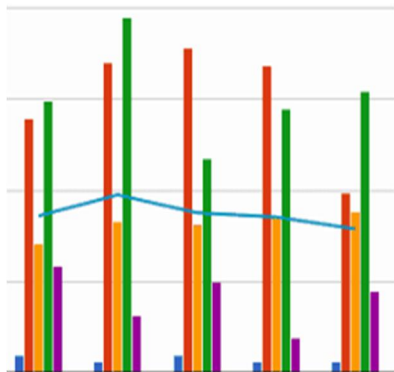
- 1 minuto a 200 °C
- 40°C por minuto até 220 °C
- 7 minutos a 220 °C
- 20 por minuto até 230 °C
- 1 minuto a 230 °C

O volume de amostra usado na injeção foi de apenas 2 µL e medido com o auxílio de uma microseringa como mostra a Figura 16.



**Figura 16** - Injecção da amostra no cromatografo

Após medição do volume, a injeção no cromatografo necessitou de ser precisa e imediata visto que a rapidez da evaporação é essencial para evitar a discriminação de compostos.



# CAPÍTULO IV

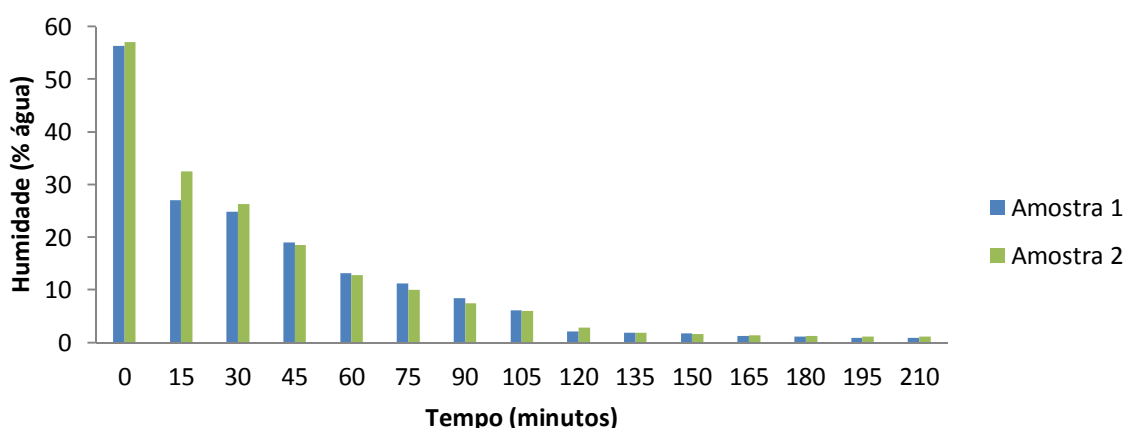
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. SECAGENS

Após a secagem da flor de cardo, efectuada pelos diferentes métodos já anteriormente referidos, obtiveram-se as relações entre o tempo de secagem e humidade das amostras para as diferentes temperaturas de secagem.

O objectivo destes ensaios foi verificar qual a temperatura de secagem que consegue manter a maior parte das características da amostra intactas proporcionando estabilidade e qualidade na composição da mesma, e que exista simultaneamente uma redução de actividade de água no menor espaço de tempo possível.

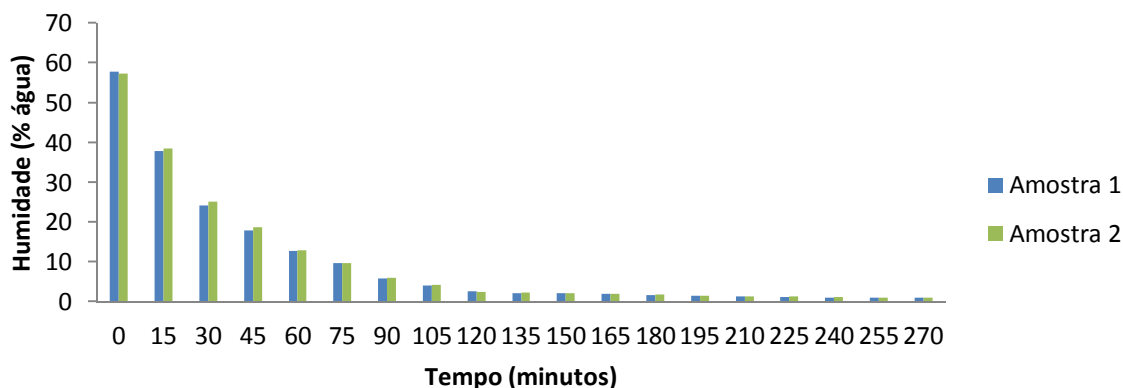
A Figura 17 representa a perda de água ao longo do processo em dois ensaios de secagem realizados à temperatura de 60°C.



**Figura 17** - Percentagem de água existente na flor de cardo por cada 15 minutos de secagem numa estufa à temperatura de 60°C, ao longo de dois ensaios de secagem

Conforme se pode observar na Figura 17, e como seria também de se esperar, nas fases iniciais do processo, quando o conteúdo de humidade é ainda elevado, o processo de secagem é mais rápido e a taxa de variação da massa da amostra também é superior. A flor de cardo necessitou, nestas condições de secagem, de apenas 195 minutos para atingir um teor de humidade de cerca 1%.

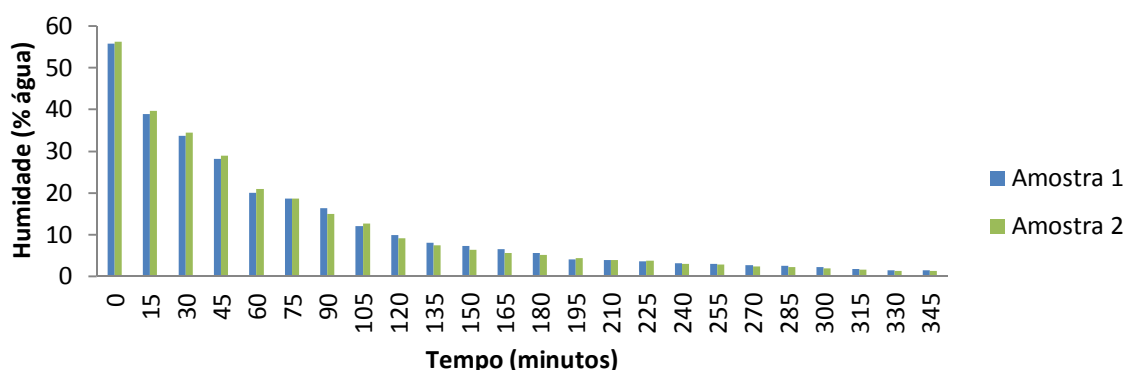
A Figura 18 mostra as curvas de secagem obtidas para os dois ensaios de secagem realizados a 50 °C.



**Figura 18** - Percentagem de água existente na flor de cardo por cada 15 minutos de secagem numa estufa à temperatura de 50°C, ao longo de dois ensaios de secagem.

No gráfico pode ser observado que o processo de secagem, tendo-se em consideração a perda de massa (humidade), ocorreu praticamente a uma taxa de secagem decrescente durante os primeiros 100 minutos, seguida por uma taxa constante, e já muito próxima do zero. Este fenómeno a uma taxa constante ocorre em função das propriedades termodinâmicas do ar de secagem, mais especificamente o binómio temperatura de ar de secagem/humidade relativa do ar e ainda ao facto do conteúdo de água inicial do produto ser considerável por a amostra se encontrar congelada (57,55 %). Nestas condições operacionais pode-se assumir que os fenómenos de transferência de água e calor envolvidos neste processo a uma temperatura de 50 °C ocorreram a uma taxa mais lenta até se obter a humidade de equilíbrio.

A Figura 19 apresenta as curvas de secagem obtidas a 40 °C



**Figura 19** - Percentagem de água existente na flor de cardo por cada 15 minutos de secagem numa estufa à temperatura de 40°C, ao longo de dois ensaios de secagem.

Como é representado na Figura 19, a diminuição da temperatura de secagem desacelera o processo, fazendo com que a amostra sofra redução da humidade mais lentamente no início da secagem e conseqüentemente maior tempo de secagem é requerido. Foram necessários 330 minutos de secagem para obter um resíduo seco, com os mesmos teores de humidade que as amostras anteriormente secas (1,46%).

A tabela 4 apresenta os teores médios e desvios padrão da humidade das amostras de flor de cardo inicial e depois de secado às temperaturas de 60, 50, 40°C, e ainda liofilizado.

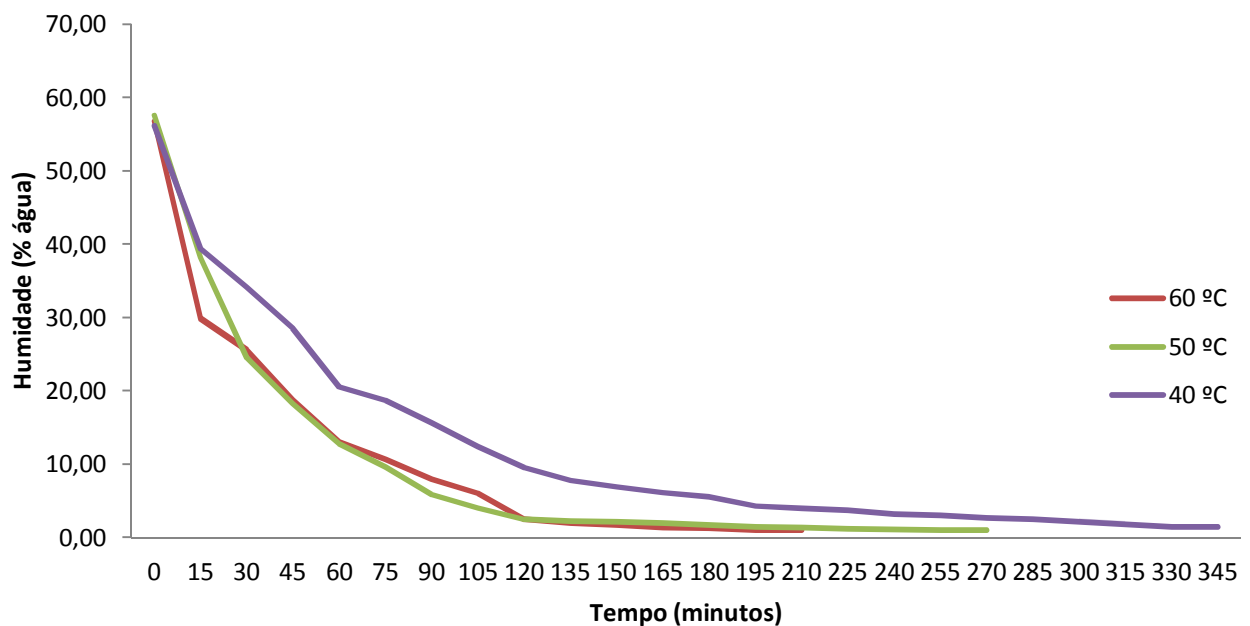
**Tabela 5** - Humidade das amostras de flor de cardo (Média  $\pm$  desvio padrão)

	HUMIDADE (%)			
	60	50	40	L
INICIAL	56,75 $\pm$ 0,49	57,55 $\pm$ 0,35	56,5 $\pm$ 0,35	57,47 $\pm$ 0,76
APÓS SECAGEM	1,03 $\pm$ 0,14	1,025 $\pm$ 0,06	1,46 $\pm$ 0,16	1,44 $\pm$ 0,11

De uma maneira geral os teores de humidade não apresentaram diferenças significativas entre o cardo secado com diferentes temperaturas.

Observou-se uma semelhança nos teores de humidade, ou seja nas amostras analisadas o valor do desvio padrão em relação à média foi baixo, indicando a existência de uma secagem com comportamento uniforme.

A Figura 20 representa as curvas de secagem do cardo para as diferentes temperaturas aplicadas, considerando uma média dos dois ensaios realizados pra cada temperatura.



**Figura 20** - Curvas médias de secagem do cardo para as temperaturas de 40, 50 e 60°C.

Através dos resultados apresentados na Figura 20, podemos observar que a taxa de perda de humidade decresce de forma exponencial ao longo do tempo, tal como era esperado. É possível concluir ainda que a 40 °C o processo é consideravelmente mais lento, enquanto os processos a 50 e 60 °C são muito similares.

Verifica-se que para a temperatura de 40°C a curva da taxa de secagem não apresentou um período decrescente tão acentuado como se verifica nas duas outras temperaturas (50 e 60°C). Provavelmente, em temperaturas elevadas, toda a água livre presente na superfície do cardo, evapora rapidamente, impossibilitando a formação de um período de taxa constante.

Durante a secagem por ar aquecido, ocorre primeiramente, o aquecimento da superfície do material em contacto com o ar quente, e também evaporação da humidade superficial. A partir deste ponto, a transferência de calor da superfície aquecida para o interior ainda frio, acontece pelo processo de condução de calor devido ao gradiente de tempo. Desta forma, a migração da humidade ocorre principalmente por difusão de humidade do interior para a superfície impulsionada pela diferença de concentração (Véras, 2010). A humidade da superfície do produto está em equilíbrio com a humidade do ar de secagem. A diferença entre estas humidades permite a difusão e, à medida que diminui essa diferença diminui a velocidade de secagem, dado isto, as amostras acabaram apenas por diferir no tempo de secagem necessário para tal objectivo, visto a dimensão da amostra, ser igual em todos os casos.

A Tabela 6 apresenta os teores médios e desvios padrão da actividade da água das amostras de cardo secado às temperaturas de 60, 50, 40°C e liofilizado.

**Tabela 6** - Actividade da água das amostras de cardo secado (Média  $\pm$  desvio padrão)

	$a_w$			
	60	50	40	L
APÓS SECAGEM	0,34 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,05	0,43 $\pm$ 0,03	0,31 $\pm$ 0,02

Da observação dos valores da Tabela 4 é possível verificar que em termos gerais há uma similaridade de resultados, quer no que respeita à influência do processo de secagem, quer ainda quando se comparam as diferentes temperaturas de secagem.

Os valores de actividade da água obtidos em todos os extractos analisados, são baixos, ou seja atingiu-se a zona de adsorção primária na qual não há dissolução dos componentes do alimento pela água, o que reduz a velocidade das reacções com excepção da oxidação lipídica pois esta pode ocorrer tanto em actividade da água baixa como elevada.

A redução da  $a_w$  durante a secagem afecta a evolução da maturação por redução da actividade. Uma  $a_w$  inferior a 0,6 é sinal de estabilidade do produto e um parâmetro chave para a conservação do mesmo. Esta baixa  $a_w$  permite assim que o produto tenha um tempo de vida mais longo, tornando-se utilizável durante mais tempo e não apenas nas estações onde é produzido.

As amostras de flor de cardo antes de iniciarem o processo de secagem, encontravam-se congeladas. Na Tabela 7 podemos ver as médias e desvios padrões das massas de cardo antes e após secagem.

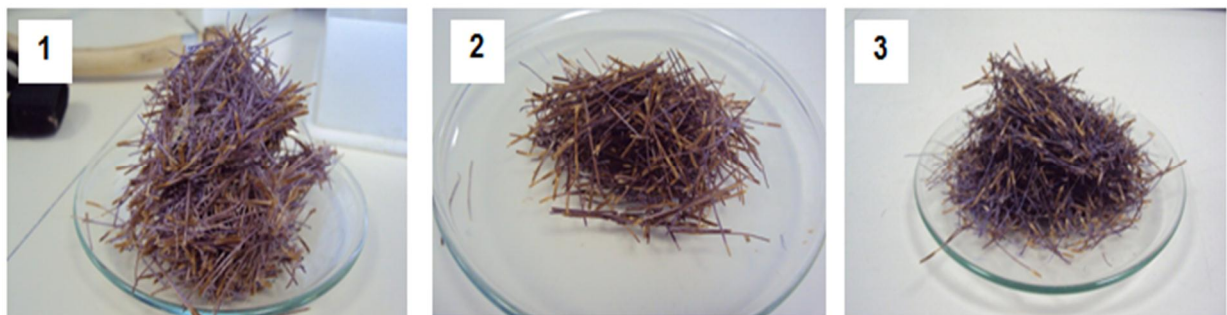
**Tabela 7** - Massa das amostras antes do processo de secagem e após secagem (Média  $\pm$  desvio padrão).

	MASSA (g)			
	60	50	40	L
INICIAL	15,77 $\pm$ 0,07	15,27 $\pm$ 0,25	15,27 $\pm$ 0,36	15,24 $\pm$ 0,01
APÓS SECAGEM	5,67 $\pm$ 0,21	5,72 $\pm$ 0,05	5,97 $\pm$ 0,06	5,05 $\pm$ 0,04

Os resultados revelam que a flor de cardo perdeu cerca de 63,60 % da sua massa inicial. Esta grande perda de massa explica-se, pelo facto de a massa inicial ser essencialmente composta por água.

Perante tal constatação, para se obter uma quantidade de massa final superior, seria necessário ter em conta a perda total de água que o produto sofreria na sua secagem. Desse modo, sempre que seja necessário obter um resíduo seco a partir de um extracto congelado, esta proporcionalidade deverá ser sempre realizada.

Na Figura 21 pode observar-se o aspecto da flor de cardo (1) antes da secagem (congelado), depois de (2) secado e (3) liofilizado.



**Figura 21** - Aspecto da flor de cardo : (1- Congelado; 2- Secado; 3- Liofilizado.).

As flores do cardo congelado encontravam-se bastante compactadas devido à existência de cristais de gelo, o que dificultava a sua manipulação, enquanto as flores do cardo secado em estufa e o liofilizado se encontravam bastante desagregáveis, sendo as liofilizadas mais facilmente desfeitas que as secadas em estufa, devido ao facto de possuírem menos quantidade de água na sua constituição, e terem também uma estrutura mais porosa resultante do processo de liofilização, que se caracteriza por uma baixa taxa de encolhimento volumétrico (Oliveira, 2012).

Verificou-se que, em termos de aparência, a partir das amostras desidratadas obtidas, que as temperaturas de secagem mais altas podem ser utilizadas, pois a coloração não foi alterada nas condições experimentais testadas.

## 4.2. DETERMINAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

O resíduo sólido da flor do cardo obtido após secagem foi utilizado para a determinação dos açúcares neutros constituintes dos polissacarídeos. A análise em polissacarídeos das amostras de flor de cardo fez-se por cromatografia gasosa após hidrólise e derivatização. Os cromatogramas seguintes (Figura 22 . 25) mostram o perfil em monossacarídeos obtidos na análise de açúcares das diferentes amostras de flores de cardo secado à temperatura de 40, 50, 60°C e liofilizado, respectivamente.

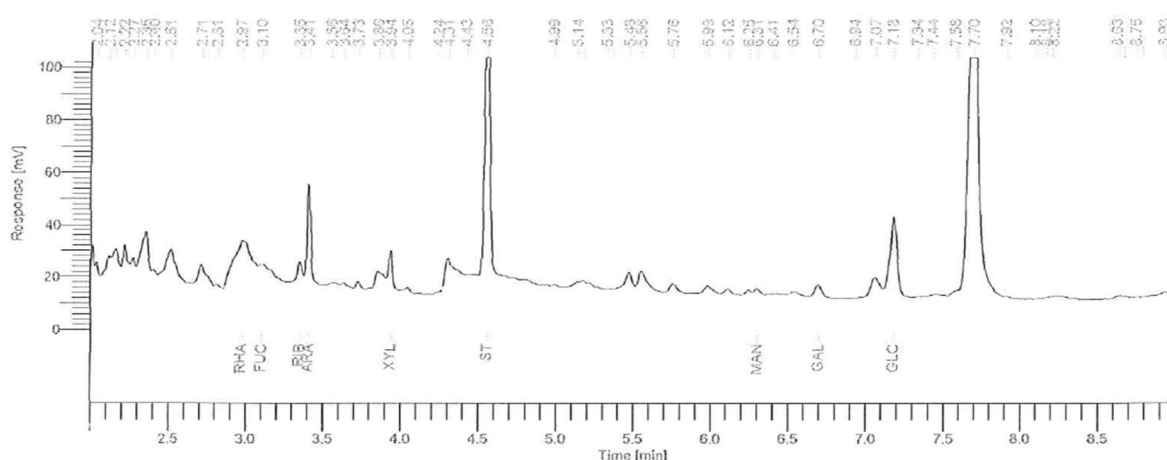


Figura 22 - Cromatograma obtido para a amostra secada a 40°C.

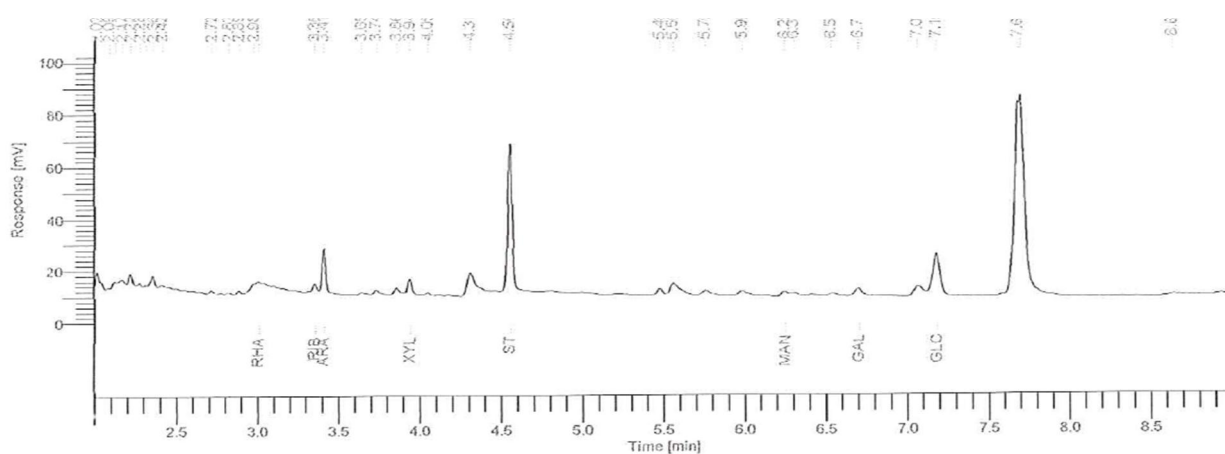


Figura 23 - Cromatograma obtido para a amostra secada a 50°C.

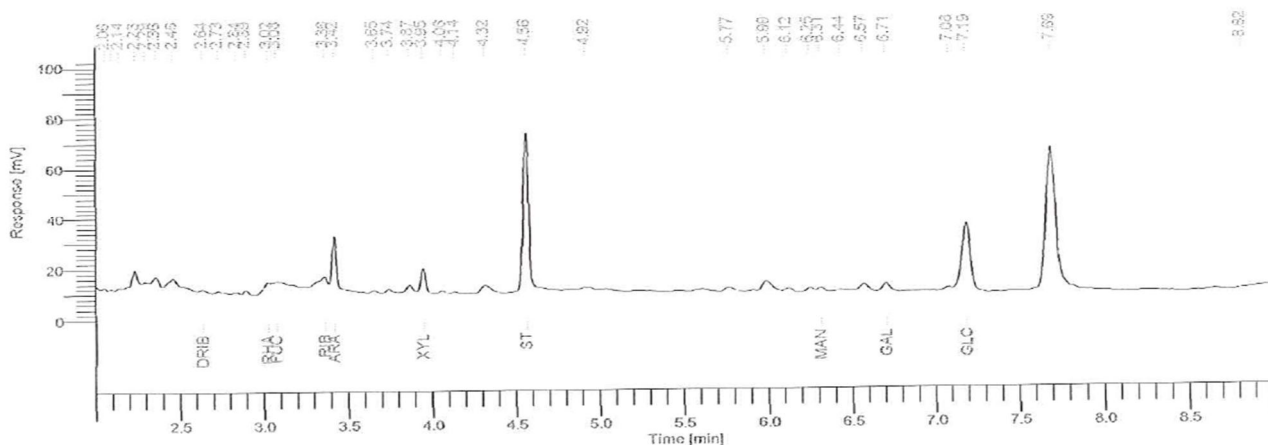


Figura 24 - Cromatograma obtido para a amostra secada a 60°C.

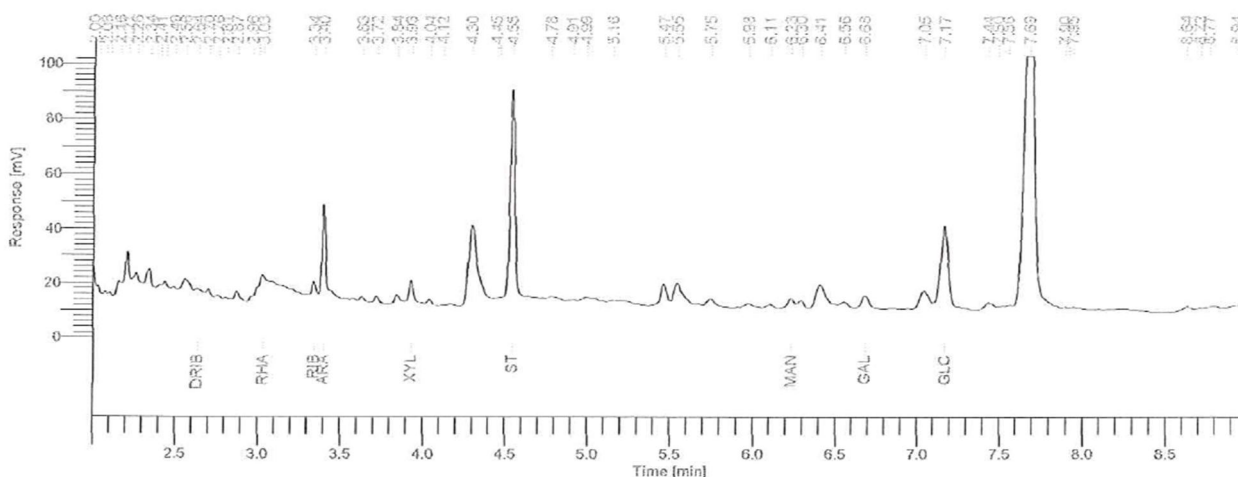


Figura 25 - Cromatograma obtido para a amostra liofilizada.

Cada um dos picos correspondente a um monossacarídeo neutro, foi identificado por comparação com os tempos de retenção de substâncias padrão. Com o objectivo de determinar a sua quantidade, padrões conhecidos de açúcares foram usados para determinar a recta padrão. A partir da composição dos diversos monossacarídeos identificados é possível propor uma estrutura para os polissacarídeos constituintes da flor do cardo (Rosenbohm *et al.* 2002).

Na Tabela 8 encontra-se a composição em monossacarídeos neutros, expressos em miligramas de açúcar por grama de amostra, para cada uma das amostras em estudo.

**Tabela 8** - Composição em monossacarídeos das amostras de cardo estudadas.

Amostra	AÇUCARES NEUTROS (mg/g)					
	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
40 ° C	5,3	18,5	5,6	1,5	3,8	29,3
50 ° C	2,2	15,9	3,8	0,2	2,1	14,7
60 ° C	0,3	17,0	8,4	1,7	3,9	44,5
Liofilizado	1,4	16,8	6,2	1,7	4,6	32,5

A quantidade total de monossacarídeos quantificados para a amostra secada a 40°C foi 64,0 mg/g, para a secada a 50°C foi 38,9 mg/g, a 60°C 75,8 mg/g e na amostra liofilizada um total de 63,2 mg/g. Comparativamente com as restantes temperaturas aplicadas, verificou-se que a amostra secada a 50°C foi a que apresentou uma menor quantia em termos de açúcares neutros, sendo bastante perceptível principalmente nos teores de glucose encontrados.

Pode observar-se que a glucose foi o monossacarídeo mais abundante, com valores a variar entre os 14,7 e os 44,5 mg/g, o que representava entre 38 e 59% do total quantificado. A glucose presente pode ser proveniente de polissacarídeos como a celulose, podendo também haver uma contribuição de glucose monomérica. O conjunto das 4 amostras parece mostrar que a glucose quantificada na amostra secada a 50°C era inferior à que estaria realmente presente, pois não é expectável que esta temperatura de secagem tenha um efeito de degradação na mesma. A arabinose foi para todas as amostras o segundo açúcar presente em maior quantidade, variando entre 15,9 e 18,5 mg/g. Nas amostras secadas a 40 e a 60°C e na liofilizada representava entre 22 e 29%. No caso da amostra secada a 50°C o seu valor correspondia a 41% do total quantificado.

Por sua vez, a quantidade de xilose (Xyl) mostrou-se praticamente constante em todas as amostras, representando cerca de 10% de todos os açúcares quantificados, com valores a variar entre os 3,8 e os 8,4 mg/g.

Os valores de manose (Man) mantiveram-se baixos em todos os extractos analisados, traduzindo-se por um sinal cromatográfico muito fraco (média de 1,3 mg/g).

Já a quantidade de ramnose (Rha) mostrou-se baixa nas amostras de cardo secado a 40 e a 50°C, como se pode ver nas Figuras 21 e 22, e à medida que a

temperatura de secagem aumentava, a detecção deste composto tornou-se praticamente nula.

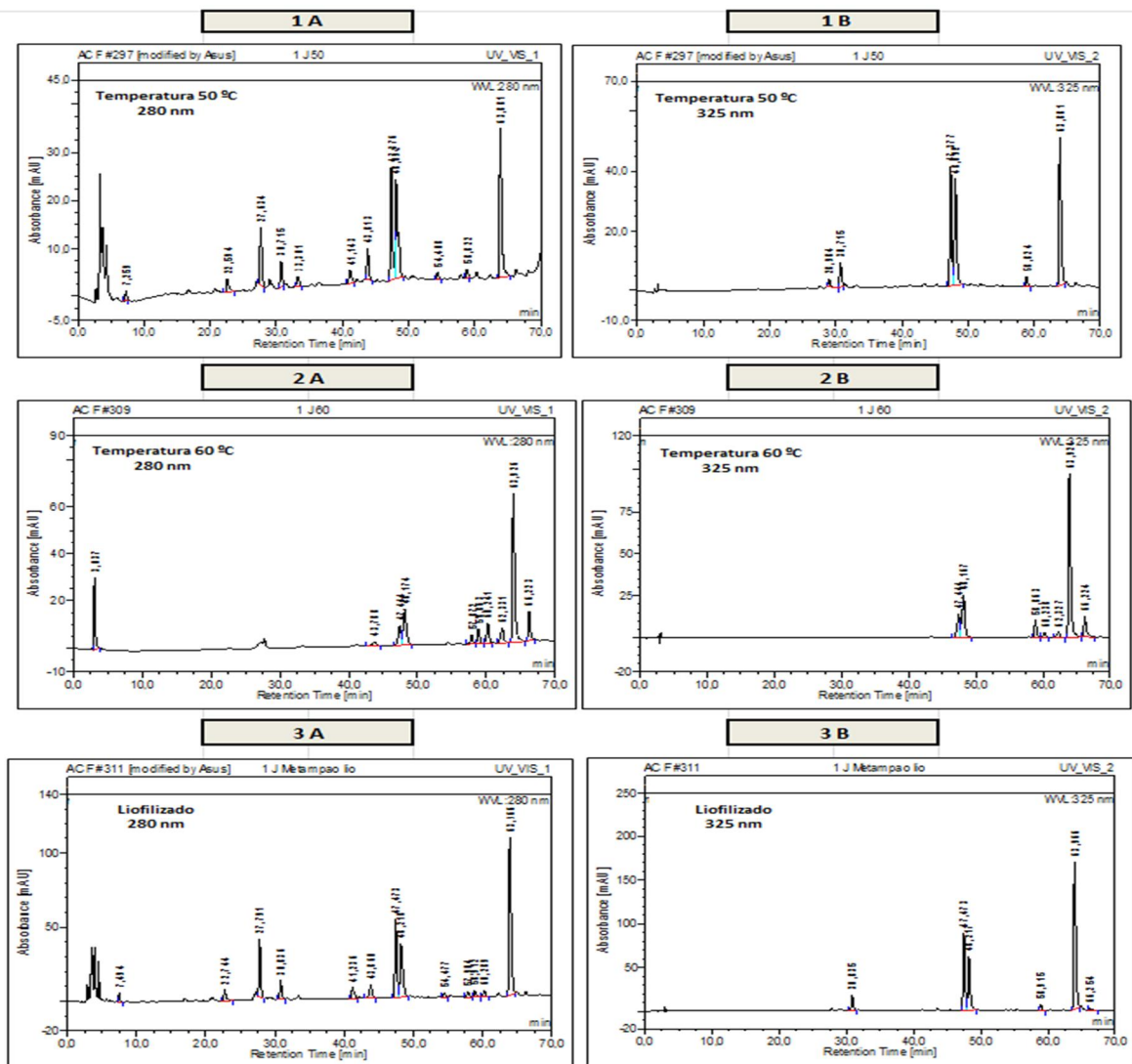
Dentro do grupo dos açúcares neutros foram assim detectados a glucose, arabinose, xilose, manose e galactose, evidenciando a presença de substâncias pécicas (Brett e Waldron, 1990).

### 4.3. DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Os extractos obtidos foram purificados em coluna de fase sólida C-18, sendo a fracção obtida pela eluição com solução diluída de tampão fosfato a PH 7 usada para a análise dos ácidos fenólicos. As famílias de compostos fenólicos que se procuraram identificar foram os ácidos hidroxibenzóicos e os ácidos hidroxicinâmicos por análise por HPLC a dois comprimentos de onda (280 e 325 nm). A detecção ao comprimento de onda de 280 nm permite identificar os ácidos hidroxibenzoicos, hidroxicinâmicos e os seus derivados. A detecção a 325 nm permite identificar apenas os ácidos hidroxicinâmicos, devido à presença da ligação dupla na cadeia carbonada.

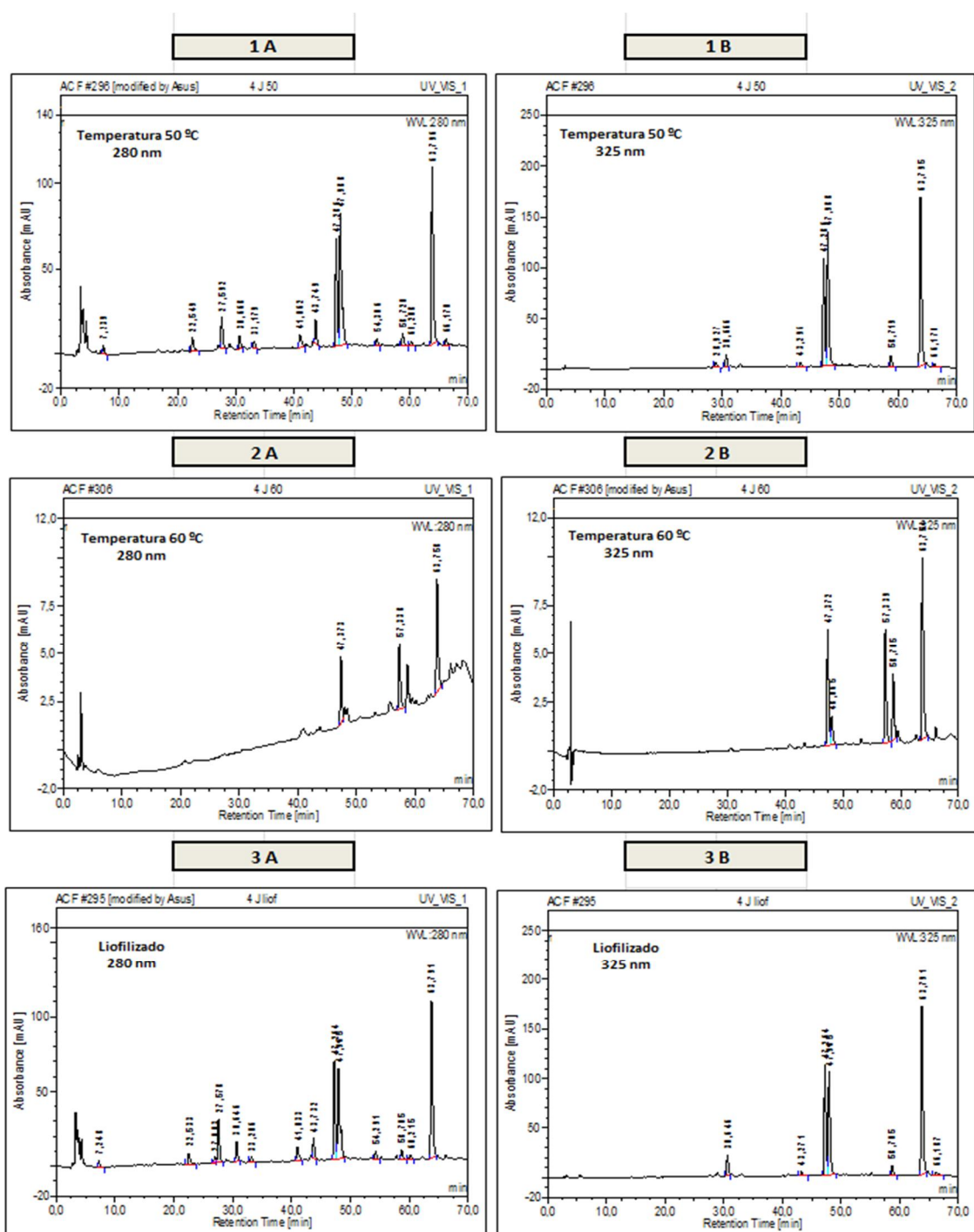
Os tempos de retenção e os espectros UV-Vis dos compostos eluídos nas amostras estudadas foram comparados com padrões conhecidos com o objectivo de identificar compostos desconhecidos.

A Figura 26 apresenta os diferentes perfis cromatográficos obtidos relativamente aos compostos fenólicos detectados, nos extractos de metanol das amostras de flor de cardo secados às temperaturas de 50 e 60 °C e liofilizado.



**Figura 26** - Perfis cromatográficos (A-280 e B-325 nm) relativos aos compostos fenólicos quantificados nos extractos de flor de cardo em estudo.

A Figura 27 apresenta os diferentes perfis cromatográficos obtidos relativamente aos compostos fenólicos detectados, nos extractos de acetona das amostras de flor de cardo secados às temperaturas de 50 e 60 °C e liofilizado.



**Figura 27** - Perfis cromatográficos (A-280 e B-325 nm) relativos aos compostos fenólicos quantificados nos extractos de flor de cardo em estudo.

A partir da análise dos cromatogramas foi possível constatar a presença de 44 picos com tempos de retenção entre os 3,04 e os 66,30 minutos. Em particular foi

---

possível identificar o ácido 5-O-cafeoilquínico (clorogénico) que estava presente nas amostras de flor de cardo secado a 50°C e no extracto liofilizado.

O extracto de metanol mostrou-se menos rico em ácidos fenólicos comparativamente com o extracto de acetona, apresentando o primeiro um total de 26 compostos com uma concentração total de ácidos benzóicos de 38,30 mg/L e 81,07 mg/L de ácidos hidroxinâmicos, já no extracto de acetona obteve-se um total de 37 compostos com concentrações totais de 66,38 e 168,08 mg/L de ácidos benzóicos e hidroxinâmicos, respectivamente. Da análise dos dois extractos verificou-se que os compostos detectados são praticamente comuns entre eles (P10,P13,P14,P16,P17,P23,P26,P28,P29,P31,P32,P35,P39,40,P43 e P44)

Nas Tabelas 9-11 encontram-se os tempos de retenção e as concentrações de ácidos benzóicos e hidroxinâmicos nos extractos analisados de acetona e metanol de flores de cardo secado à temperatura de 50, 60°C e liofilizado, respectivamente.

**Tabela 9** - Tempo de retenção e concentrações obtidas expressas em mg/L dos ácidos benzóicos e hidroxicinâmicos do extracto secado a 50°C (Média ± desvio padrão).

HIDROXICINÂMICOS			BENZÓICOS		
Composto	Tempo retenção (min.)	Concentração (mg/L)	Composto	Tempo retenção (min.)	Concentração (mg/L)
P14	28,93	0,95 ± 0,54	P2	3,31	8,7
P15	29,19	1,07 ± 0,06	P3	3,49	1,14
P16	30,67	2,30 ± 0,65	P4	3,78	5,2
P17	30,83	2,70 ± 0,59	P5	4,4	3,43
P24	43,3	1,58	P6	7,24	0,98 ± 0,75
P25	43,55	1,55	P7	7,4	1,53
P27	47,29	21,85 ± 7,86	P9	22,55	2,22 ± 1,42
P28	47,38	8,65 ± 2,73	P10	22,73	3,25
P29	47,47	20,16 ± 7,23	P12	27,59	5,10 ± 1,31
P30	47,99	33,30 ± 8,74	P13	27,79	5,84
P31	48,09	9,38 ± 2,44	P18	33,18	1,73
P32	48,21	30,39 ± 7,73	P19	33,3	0,84
P38	58,72	2,73 ± 0,89	P20	33,38	1,52
P39	58,82	1,38 ± 0,83	P21	41,06	3,53
P42	63,8	39,27 ± 12,96	P22	41,14	1,28
P43	63,88	14,72 ± 4,71	P23	41,23	3,54
P98	66,17	1,49 ± 0,64	P26	43,75	4,61 ± 2,39
<b>TOTAL</b>		<b>193,47</b>	P33	54,31	1,52
			P34	54,41	0,51
			P35	54,5	1,13
			P40	60,21	1,14 ± 0,06
			P44	66,29	2
			<b>TOTAL</b>		<b>60,74</b>

**Tabela 10** - Tempo de retenção e concentrações obtidas expressas em mg/L dos ácidos benzóicos e hidroxicinâmicos do extracto secado a 60°C (Média ± desvio padrão).

HIDROXICINÂMICOS			BENZÓICOS		
Composto	Tempo retenção (min.)	Concentração (mg/L)	Composto	Tempo retenção (min.)	Concentração (mg/L)
P28	47,37	1,24 ± 0,56	P1	3,04	5,67
P29	47,44	3,99 ± 1,44	P26	43,79	1,16
P31	48,06	0,44	P37	57,87	1,42
P32	48,17	8 ± 2,38	P42	63,76	2,14
P36	57,34	1,25 ± 0,45	<b>TOTAL</b>		<b>10,39</b>
P38	58,71	0,92			
P39	58,86	2,51 ± 0,89			
P40	60,24	1,80 ± 1,15			
P41	62,33	1,90 ± 0,80			
P42	63,75	2,72			
P43	63,92	24,89 ± 7,33			
P44	66,22	3,63 ± 0,48			
<b>TOTAL</b>		<b>53,29</b>			

**Tabela 11** - Tempo de retenção e concentrações obtidas expressas em mg/L dos ácidos benzóicos e hidroxicinâmicos do extracto liofilizado (Média ± desvio padrão).

HIDROXICINÂMICOS			BENZÓICOS		
Composto	Tempo retenção (min.)	Concentração (mg/L)	Composto	Tempo retenção (min.)	Concentração (mg/L)
P16	30,65	4,51 ± 1,25	P5	4,39	3,27
P17	30,82	4,22 ± 1,06	P6	7,25	1,43
P24	43,27	1,39	P7	7,39	1,5
P25	43,55	1,21	P8	7,49	1,27
P27	47,26	23,01 ± 8,27	P9	22,53	3,18
P29	47,47	18,86 ± 5,53	P10	22,72	2,94 ± 0,47
P30	47,97	26,39 ± 6,33	P11	27	0,88
P32	48,21	19,32 ± 5,66	P12	27,58	10,48
P38	58,71	2,45 ± 0,82	P13	27,78	9,73 ± 1,51
P39	58,91	1,51 ± 0,41	P18	33,21	1,37
P42	63,79	40,16 ± 13,22	P20	33,4	1,28
P43	63,97	27,72 ± 16,73	P21	41,03	4,08
P44	66,19	1,18 ± 0,29	P23	41,23	3,53 ± 0,47
<b>TOTAL</b>		<b>171,93</b>	P26	43,73	4,51 ± 1,23
			P33	54,29	1,67
			P35	54,48	1,17 ± 0,23
			P37	57,9	1,36
			P40	60,22	1,41 ± 0,33
			<b>TOTAL</b>		<b>55,06</b>

Relativamente aos compostos detectados, pode-se observar que as suas proporções variam em função da temperatura de secagem: nos extractos das amostras secadas a temperaturas baixas, 50°C e liofilizado, a intensidade dos picos é grande e a quantidade de compostos detectados é elevada, contrariamente nos extractos de flor de cardo secado a temperaturas elevadas observou-se uma detecção quase que residual.

Da análise dos cromatogramas, podemos verificar que os picos existentes são praticamente comuns representando 70,45 % dos totais quantificados. No caso dos ácidos hidroxicinâmicos os compostos que apresentaram maiores concentrações foram o P30 com uma concentração média de 29,85 mg/L e o P42 com 29,85 mg/L.

Nos ácidos benzóicos os compostos comuns que apresentaram as concentrações médias mais elevadas foram o P12 com 7,79 mg/L e o P26 com 3,43 mg/L.

. Existem também outros compostos que representam 29,55 % dos totais quantificados mas que só aparecem em alguns cromatogramas exibindo picos de pequena intensidade. Os picos que transmitiram o sinal mais fraco dizem respeito aos compostos P19 e P34 com concentrações de 0,84 e 0,51 mg/L, respectivamente e encontram-se situados no tempo de retenção 33,30 e 54,41 minutos.

Apesar da informação relativa à composição fenólica do Cardo ser escassa, observou-se que as flores de cardo exibiram quantidades significativas de compostos fenólicos, tendo-se destacado o ácido 5-O-cafeoilquínico (clorogénico) nas amostras de cardo secado a 50°C e no extracto liofilizado. O ácido 5-O-cafeoilquínico exibe potencial antioxidante, aumenta a resistência do colesterol LDL para a peroxidação lipídica e diminui os danos no DNA (Gonthier *et al*, 2003).

O extracto analisado mais rico em ácidos fenólicos foi o da amostra de flor de cardo secado a 50°C, apresentando uma concentração total de 193,47 mg/L de ácidos hidroxicinâmicos e 60,74 mg/L de ácidos benzóicos.

Não foi possível efectuar ensaio de HPLC aos extractos de flor de cardo secado a 40°C, devido à volatilização da amostra, antes da injeção no cromatografo.



# CAPITULO V

## 5. CONCLUSÕES

Observou-se que para se obter flor de cardo secado com o mínimo de humidade possível, foram necessários cerca de 300 minutos de secagem em estufa na temperatura mais baixa (40°C) e cerca de 200 minutos nas temperaturas mais elevadas. A flor de cardo seca, foi depois submetida a diferentes tipos de extracções, para que fosse possível separar de acordo com as suas propriedades químicas e físicas todos os compostos de interesse.

A análise de açúcares mostrou a presença de monossacarídeos constituintes de polissacarídeos pécnicos em quantidades entre os 0,2 e os 44,5 mg/g, tendo-se destacado a glucose como o monossacarídeo mais abundante representando entre 38 e 59% do total quantificado. No entanto, será importante fazer uma caracterização estrutural detalhada dos polissacarídeos presentes, de forma a conhecer a natureza dos polissacarídeos e a sua função no cardo.

Relativamente à análise de compostos fenólicos por HPLC, verificou-se que os extractos de acetona continham ácidos fenólicos em maior número e concentração do que os extractos de metanol.

Dos 44 compostos detectados, foi apenas possível identificar o ácido 5-O-cafeoilquínico (clorogénico). Assim, no futuro deve tentar identificar-se o maior número de compostos de modo a que possam funcionar como marcadores da flor do cardo.

Os objectivos deste trabalho não foram totalmente conseguidos, uma vez que não foi possível identificar compostos específicos e característicos da flor do cardo, que permitissem avaliar a autenticidade do queijo da serra.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albersheim, P.; Darvill, G.; O'Neill, A.; Schols, A.; Voragen, J. (1996) An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of the higher plants . Progress in Biotechnonology. Amsterdam: Elsevier, 14, 47-55.

Albert, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. (1983). Molecular biology of the cell. Nova York: Garland Publishing.

Almeida, C.; Branyik, T.; Ferreira, P. (2005). Use of two diferente carriers in a packed endopolygalacturonase production by a bed reactor for yeast strain. Process Biochemistry, 40, 1937-1942.

Almeida, D.; Ventura, D.; Pereira, D.; Lages, S. (2009). Produção de Queijo Serra da Estrela. Processamento Geral de Alimentos. Escola Superior Agrária de Coimbra. Coimbra.

Amico, F.; Sorce, E. (1997). Medicinal plants and phytotherapy in Mussomeli area (Caltanissetta, Sicily, Italy) - Fitoterapia, 68, 143-159.

Antônio, C. (2002). Influência da estrutura celular e da geometria da amostra na taxa de transferência de massa no processo de desidratação osmótica de Banana Nania (*Musa Cavendish*) e do Mamão Formosa (*Carica Papaya L.*). Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

Aquino, A. (2008). Eficiência da maceração enzimática na polpa de bacuri (*Platonia insignis Mart.*). Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

Bano, M.J.; Lorente, J.; Castillo, J.; Benavente-Garcia, O.; Rio, J.A.; Otuno, A.; Quirin, K.W.; Gerard, D. (2003). Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis* and antioxidant activity - Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 4247. 4253.

Barbosa, V.; Veja, H. (1996) Dehydration of foods. New York: Chapman & Hall, 330.

Bastos, M. (1995). Informações de sistema de qualidade NB 9.000 em laticínios em produção de iogurte e leite longa vida (UHT). Tese de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Baumann, M.; Eklöf, J.; Michel, G.; Kallas, M.; Teeri, T.; Czjzek, M.; Brumer, H. (2007). Structural evidence for the evolution of xyloglucanase activity from xyloglucan endo-transglycosylases: Biological implications for cell wall metabolism - *Plant Cell*, 19, 1947-1963.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317-333.

Brett, C.; Waldron, K. (1990). *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*. London: Unwin Hyman, 194.

Buggenhout, V.; Sila, N.; Duvetter, T.; Loey, V.; Hendrickx, M. (2009). Pectins in Processed Fruits and Vegetables: Part III . *Texture Engineering. Comprehensive reviews in food science and food safety*. Institute of Food Technology, 8, 105-117.

Carpita, C.; McCann, C. (2000). The cell wall. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 3<sup>o</sup> ed. American society of plant physiologist, Rockville: Maryland, 52-108.

Castro, N. (2011). *Anatomia e Morfologia de Plantas Vasculares*. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia.

Cerretani, G. (2001). Da *metersivoq* a coagulante: le molteplici azioni del cardo. *Caseus - Via Lattea*, 16.

Collins, C.; Braga, G.; Bonato, P. (1993). *Introdução a métodos cromatográficos*. 5<sup>a</sup> ed. Campinas: Editora da Unicamp.

Coimbra, M.; Waldron, K.; Selvendran, R. (1994). Isolation and characterization of cell wall polymers from olive pulp (*Olea Europaeal*), *Carbohydrate Research*, 252, 245-262.

Degani, A.; Cass, Q.; Vieira, P. (1998). *Cromatografia . Química Nova na Escola*, 7. Dey, M.; Harborne, B. (1997). *Plant Biochemistry*. San Diego: Academic Press.

Fellows, P. (2000). Food Processing Technology - Principles and Practice. 2. Ed. Boca Raton: CRC Press.

Foti, S.; Mauromicale, G.; Raccuia, S.; Fallico, B.; Fanella, F.; Maccarone, E. (1999). Possible alternative utilization of *Cynara* spp. I. Biomass, grain yield and chemical composition of grain - *Industrial Crops and Products*, 10, 219-228.

Garcia, L. (2009). Liofilização Aplicada a Alimentos. Disciplina de Seminários em Alimentos. Departamento de Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

Gasparetto, P. (2005). Secagem osmo-convectiva de banana nanica (*musa cavendishii*, L.), mamão formosa (*carica papaya*, L.) e jaca (*artocarpus integrifolia* L.). Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Gominho, J.; Lourenço, A.; Curt, M.; Fernández, J.; Pereira, H. (2009). Characterization of hairs and pappi from *Cynara cardunculus capitula* and their suitability for paper production. *Industrial Crops and Products*, 29, 116-125.

Gonthier, M.; Verny, M.; Besson, C.; Rémésy, C.; Scalbert, A. (2003). Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats - *Journal of Nutrition*, 133, 1853-1859.

Halder, A.; Datta, K.; Spanswick, M. (2010). Water Transport in Cellular Tissues During Thermal Processing. *Bioengineering, Food, and Natural Products*.

Herter, G.; Veríssimo, V.; Camelatto, D.; Gardin, P.; Trevisan, R. (2001). Abortamento de gemas florais de pereira no Brasil. Seminário sobre fruticultura de clima temperado. Florianópolis.

Hollman, P.; Katan, M. (1999). Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 937-942.

Jayani, S.; Saxena, S.; Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, Kidlington, 40, 2931-2944.

Jeffree, C. (1996). Structure and ontogeny of plant cuticles, in: G. Kerstiens (Ed.), *Plant cuticles. An integrated functional approach* - Bios Scientific Publishers, Oxford, 33. 82.

Júlio, A. (2002). Análise Química Quantitativa. Livros Técnicos e Científicos, 6ª Edição.

Karathanos, T. (1999). Determination of water content of dried fruits by drying kinetics. - Journal of Food Engineering, 39, 337-344.

Kashyap, R.; Vohra, K. Chopra, S.; Tewari, R. (2000). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. Applied Sciences Research, London, 217-225.

Khalili, D.; Himmelsbach, S.; Akin, D. (1998). FT-IR microspectroscopic imaging of flax (*Linum usitatissimum* L.) stems. Cell Mol. Biol, 44, 99. 108.

King, A.; Young, G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals - Journal of the American Dietetic Association, 50(2), 213-8.

Kohn, R.; Furda, I. (1968). Interaction of cations with free carboxyl groups of pectins, Chain - Soc. Sp. Pub, 22, 283. 291.

Lang, C.; Dornenburg, H. (2000). Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. Applied Microbiology and Biotechnology, 53, 366-375.

Lianda, R. (2009). Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante. Departamento de Química. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.

Lindhorst, T. (2007). Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. 1ª edição. ISBN: 978-3-527-31528-4.

Lough, W.; Wainer, I. (1995). High Performance liquid chromatography: fundamental principles and practice. Blackie Academic and Professional.

Mccann, M.; Roberts, K. (1991). The cytoskeletal basis of plant growth and form. Academic Press, 109-129.

Maisuthisakul, P.; Suttajit, M.; Pongsawatmanit, R. (2007). Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants - Food Chemistry, 100(4), 1409. 1418.

Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. (2004). Polyphenols, food sources and bioavailability - American Journal of Clinical Nutrition, 79, 727. 747.

Marcon, V. (2004). Extração e caracterização de pectinas obtidas de farinha de bagaço de maçã. Dissertação no Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Centro de Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná.

Marga, F.; Gallo, A.; Hasenstein, K. (2003). Cell wall components affect mechanical properties: studies with thistle flowers - Plant Physiology and Biochemistry, 41, 792. 797

Marur, J.; Sodek, L. (1995). Microwave drying of plant material for biochemical analysis - Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 7(1), 111-114.

Mujumbar, S. (1998). Innovative industrial drying technologies of the future - Drying of solids. New York: International Science Publisher, 9, 3-20.

Naoum, P. (2006). Métodos de Avaliação Laboratorial . Academia de Ciência e Tecnologia.

Okada, M. (1997). Fundamentos sobre secagem de sólidos: Desidratação de frutas e hortaliças - Manual técnico. Campinas: ITAL.

Oliveira, G. (2012). Aplicação do processo de liofilização na obtenção de cajá em pó: Avaliação das características físicas, físico-químicas e higroscópicas. Pós-graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Ceará: Fortaleza.

Ordonez, A.; Rodriguez, C.; Álvarez, F.; Sanz, L; Minguillón, F.; Perales, H.; Cortecero, S. (2005). Tecnologia de alimentos - Componentes dos alimentos e processos. São Paulo: Artmed, 294.

Paris, R.; Moyse, H. (1971). Matière Médicale. Vol. 3. Paris, Masson & Cie.

Park, B. (2006). Construção de um simulador para otimização de secadores. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Agrícola. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

Park, K. J; António, G. C. (2006). Análises de materiais biológicos. Faculdade de Engenharia agrícola. Universidade Estadual de Campinas. Campinas

Park, K.J.; Yado, M.K.M.; Brod, F.P.R. (2001). Estudo de secagem de pêra bartlett (*Pyrus sp.*) em fatias . *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21(3), 288-292.

Ratti, C. (2001). Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review - *Journal of Food Engineering*, 49, 311-319.

Raven, H.; Evert, F.; Eichhorn, E. (2001). *Biologia Vegetal*, 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Ribéreau-Gayon, P. (1968). *Métabolisme et propriétés des composés phénoliques. Les composés phénoliques des végétaux*. Paris: Dunod.

Rosenbohm, C.; Inge, I.; Christensen, M.; Young N. (2002). Chemically methylated and reduced pectins: preparation, characterization by H NMR spectroscopy, enzymatic degradation, and gelling properties - *Carbohydrate Research*, 8.

Rowell, R.; Pettersen, R.; Han, S.; Rowell, S.; Tshabalala, A. (2005). *Handbook of Wood chemistry and Wood composites . Cell wall chemistry*. CRC press, 487.

Salguero, J.; Sanjuán, E. (1999). Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewes' milk cheese - *Food chemistry*, 177-183.

Sevcíková, P.; Glatz, Z.; Slanina, J. (2002). Analysis of artichoke (*Cynara cardunculus L.*) extract by means of micellar electrokinetic capillary chromatography. *Electrophoresis*, 23, 249-252.

Sila, N.; Van Buggenhout, S.; Duvetter, T; Fraeye, I.; De Roeck, A.; Van Loey, A.; Hendrickx, M. (2009). Pectins in Processed Fruits and Vegetables: Part II- Structure Function Relationships - *Comprehensive reviews in food science and food safety*. Institute of Food Technology, 3, 86-104.

Silva, G.; Borges, F.; Medina, C; Piccoli, H.; Schwan, F. (2005). Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits - *FEMS Yeast*. Amsterdam, 5, 859 . 865.

Silva, M. (1993). Isolamento e Caracterização dos Polissacarídeos das Paredes Celulares da Azeitona. Tese de doutoramento: Universidade de Aveiro.

Skaar, C. (1972). Water in wood. Syracuse: Syracuse University Press, 318.

Skoog; West; Holler; Crouch.(2000). Fundamentos de Química Analítica. 8ª Edição, Editora Thomson, 8ª Edição, 889-945.

Taiz, L.; Zeiger, E. (2004). Paredes celulares: estrutura biogénese e expansão. Fisiologia Vegetal, 3ª ed. Porto Alegre: Artmed.

Valentão, P. (2002). Limonete, Hipericão-Do-Gerês, Cardo-Do-Coalho, Fel-Da-Terra - Metodologias de controlo de qualidade com base na fracção fenólica Estudos de acção antioxidante e hepatoprotectora. Tese de doutoramento: Universidade do Porto.

Véras, A. (2010). Secagem de Pimenta Dedo-de-Moça (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*) em secador convectivo horizontal. Pós - graduação em engenharia química: Universidade Federal de São Carlos.

Veringa, H. (1961). Rennet substitutes - Dairy Science Abstracts, 23, 197. 200.

Vincken, P.; Schols, A.; Oomen, J.; McCann, C.; Ulvskov, P.; Voragen, G. (2003). If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. Plant Physiology, 132, 1781-1789.

Vioque, M.; Gomez, R.; Sanchez, E.; Mata, C.; Tejada, L.; Fernandez-Salguero, J. (2000). Chemical and microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants - Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 451-456.

Whitney, S.; Gothard, M.; Mitchell, J.; Gidley, M. (1999) Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls - Plant Physiol, 121, 657. 663.

Wiklund, A. (1992). The genus *Cynara* L. (Asteraceae- Cardueae) - Botanical Journal of the Linnean Society, 109, 75. 123.

---

Willatsa, W.; Knox, P.; Mikkelsen, J. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel - Trends in Food Science & Technology, 17, 97-104.

Wong, Y.; Saddler, N. (1993) Applications of hemicellulases in the food, feed and pulp and paper industries . Hemicellulose and hemicellulases. London: Portland Research Monograph, 127-143.

Yapo, M.; Koffi, L. (2006). Yellow passion fruit rind . a potencial source of lowmethoxyl pectin - Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, 54, 2738-2744.

## REFERÊNCIAS ELECTRÓNICAS

Comunidade . Folha de Poesia. Disponível em WWW:URL: <http://comunidade.sol.pt/blogs/josecarreiro/archive/2012/09/26/visita.aspx> [Consult. 19 Janeiro 2014].

Insumos . Vegetais Desidratados. Disponível em WWW:URL: [http://www.insumos.com.br/aditivos\\_e\\_ingredientes/materias/125.pdf](http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/125.pdf) [Consult. 19 Janeiro 2014].

Scientificpsychic - Carbohidratos o Glúcidos - Estructura Química. Disponível em WWW:URL: <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos2.html> [Consult. 3 Maio 2012].

---

# ANEXOS

---

# ANEXO I

---

## TABELAS

### Secagens

**Tabela 12** - Percentagem de água existente na flor de cardo por cada 15 minutos de secagem numa estufa à temperatura de 40°C (Média ± desvio padrão)

Tempo (minutos)	Humidade %		Média ± desvio padrão
	Amostra 1	Amostra 2	
0	55,9	56,4	56,15 ± 0,35
15	39	39,8	39,40 ± 0,57
30	33,81	34,61	34,21 ± 0,57
45	28,22	28,99	28,61 ± 0,54
60	20,17	20,97	20,57 ± 0,57
75	18,77	18,64	18,71 ± 0,09
90	16,36	15,04	15,70 ± 0,93
105	12,12	12,71	12,42 ± 0,42
120	9,93	9,16	9,55 ± 0,54
135	8,13	7,49	7,81 ± 0,45
150	7,41	6,47	6,94 ± 0,67
165	6,61	5,73	6,17 ± 0,62
180	5,72	5,25	5,49 ± 0,33
195	4,18	4,42	4,30 ± 0,17
210	3,92	4,03	3,98 ± 0,08
225	3,61	3,78	3,70 ± 0,12
240	3,23	3,07	3,15 ± 0,11
255	3,02	2,96	2,99 ± 0,04
270	2,81	2,49	2,65 ± 0,23
285	2,59	2,32	2,46 ± 0,19
300	2,21	1,96	2,09 ± 0,18
315	1,83	1,68	1,76 ± 0,11
330	1,57	1,35	1,46 ± 0,16

**Tabela 13** - Percentagem de água existente na flor de cardo por cada 15 minutos de secagem numa estufa à temperatura de 50°C (Média ± desvio padrão)

Tempo (minutos)	Humidade %		Média ± desvio padrão
	Amostra 1	Amostra 2	
0	57,8	57,3	57,55 ± 0,35
15	37,87	38,57	38,22 ± 0,50
30	24,12	25,07	24,60 ± 0,67
45	17,92	18,64	18,28 ± 0,51
60	12,73	12,89	12,81 ± 0,11
75	9,63	9,71	9,67 ± 0,06
90	5,82	5,98	5,90 ± 0,11
105	3,99	4,16	4,08 ± 0,12
120	2,54	2,49	2,52 ± 0,04
135	2,18	2,21	2,20 ± 0,02
450	2,07	2,14	2,11 ± 0,05
165	1,89	1,99	1,94 ± 0,07
180	1,63	1,76	1,70 ± 0,09
195	1,44	1,47	1,46 ± 0,02
210	1,25	1,38	1,32 ± 0,09
225	1,12	1,29	1,21 ± 0,12
240	1,04	1,18	1,11 ± 0,10
255	0,98	1,07	1,03 ± 0,06

**Tabela 14**- Percentagem de água existente na flor de cardo por cada 15 minutos de secagem numa estufa à temperatura de 60°C (Média ± desvio padrão)

Tempo (minutos)	Humidade %		Média ± desvio padrão
	Amostra 1	Amostra 2	
0	56,4	57,1	56,75 ± 0,50
15	27,1	32,6	29,85 ± 3,89
30	24,9	26,4	25,65 ± 1,06
45	19,03	18,55	18,79 ± 0,34
60	13,23	12,88	13,06 ± 0,25
75	11,31	10,03	10,67 ± 0,91
90	8,43	7,54	7,99 ± 0,63
105	6,2	5,97	6,09 ± 0,16
120	2,16	2,86	2,51 ± 0,50
135	1,89	1,95	1,92 ± 0,04
450	1,76	1,63	1,70 ± 0,09
165	1,28	1,37	1,33 ± 0,06
180	1,18	1,24	1,21 ± 0,04
195	0,93	1,13	1,03 ± 0,14

**Tabela 15** - Percentagem de água existente na flor de cardo antes e após liofilização (Média ± desvio padrão)

Tempo (horas)	Humidade %		Média ± desvio padrão
	Amostra 1	Amostra 2	
0	56,93	58,01	57,47 ± 0,76
24	1,36	1,52	1,44 ± 0,11

## Actividade da água

**Tabela 16** - Valores da actividade da água dos diferentes extractos analisados.

	AW			
	60	50	40	L
Amostra 1	0,34	0,31	0,41	0,29
Amostra 2	0,33	0,39	0,45	0,33

## Pesagens

**Tabela 17** - Massas das amostras antes do processo de secagem e após secagem e respectivos duplicados

	Massa (gramas)							
	60		50		40		Liofilizado	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Inicial	15,72	15,82	15,09	15,44	15,52	15,01	15,25	15,23
Após secagem	5,52	5,82	5,68	5,75	5,92	6,01	5,02	5,08

## Cromatografia gasosa

**Tabela 18-** Tempos de retenção e respectivas áreas dos diferentes compostos existentes no extracto analisado, de flor de cardo secado a 40°C (dRib- 2-deoxy-dribose; Rha-ramnose; Fuc- Fucoose; Ara-arabinose; Xyl-xilose; St- 2 desoxyglucose Man-manose; Gal-galactose; Glc- Glucose)

Pico	Tempo (minutos)	Área (μV.s)	Altura (μV)	Área (%)	Nome do Componente
36	2,974	17684,99	3210,97	3,78	Rha
37	3,102	127,96	181,86	0,03	Fuc
38	3,351	17075,3	8059,83	3,65	Rib
39	3,409	61730,49	38232,92	13,18	Ara
44	3,937	18701,02	12443,76	3,99	Xyl
50	4,559	237277,2	111409,24	50,67	St
62	6,306	5160,16	2172,71	1,1	Man
66	6,698	12737,41	4397,1	2,72	Gal
69	7,182	97780,83	30534,72	20,88	Glc
Soma:		468275,35	210643,12	100	

**Tabela 19 -** Tempos de retenção e respectivas áreas dos diferentes compostos existentes no extracto analisado, flor de cardo secado a 50°C (dRib- 2-deoxy-dribose; Rha-ramnose; Fuc- Fucoose; Ara-arabinose; Xyl-xilose; St- 2 desoxyglucose Man-manose; Gal-galactose; Glc- Glucose).

Pico	Tempo (minutos)	Área (μV.s)	Altura (μV)	Área (%)	Nome do Componente
33	2,636	2839,42	1128,40	0,83	dRib
40	3,030	9276,87	4538,80	2,71	Rha
41	3,341	6845,67	4782,10	2,00	Rib
42	3,399	46727,51	32543,65	13,64	Ara
46	3,929	13400,00	7841,37	3,91	Xyl
52	4,545	155585,87	75806,35	45,40	St
62	6,233	645,74	429,65	0,19	Man
66	6,683	11687,07	4238,23	3,41	Gal
68	7,172	95685,95	30131,18	27,92	Glc
Soma:		342694,10	161439,73	100,00	

**Tabela 20** - Tempos de retenção e respectivas áreas dos diferentes compostos existentes no extracto analisado, na flor de cardo secado a 60°C (dRib- 2-deoxy-dribose; Rha-ramnose; Fuc- Fucose; Ara-arabinose; Xyl-xilose; St- 2 desoxyglucose Man-manose; Gal-galactose; Glc- Glucose).

Pico	Tempo (minutos)	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Altura ( $\mu\text{V}$ )	Área (%)	Nome do Componente
22	2,637	1871,42	891,83	0,58	dRib
26	3,025	559,13	296,45	0,17	Rha
27	3,075	33,70	58,52	0,01	Fuc
28	3,363	15639,64	4385,66	4,84	Rib
29	3,418	37122,58	20411,53	11,50	Ara
33	3,947	18282,04	9402,59	5,66	Xyl
37	4,564	139645,79	62177,92	43,26	St
43	6,315	3,777,57	1444,79	1,17	Man
46	6,707	8608,08	3015,31	2,67	Gal
48	7,188	97288,73	26668,10	30,14	Glc
Soma:		322828,68	128752,70	100,00	

**Tabela 21** - Tempos de retenção e respectivas áreas dos diferentes compostos existentes no extracto analisado, flor de cardo liofilizado (dRib- 2-deoxy-dribose; Rha-ramnose; Fuc- Fucose; Ara-arabinose; Xyl-xilose; St- 2 desoxyglucose Man-manose; Gal-galactose; Glc- Glucose).

Pico	Tempo (minutos)	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Altura ( $\mu\text{V}$ )	Área (%)	Nome do Componente
29	3,009	2230,45	1279,82	1,06	Rha
30	3,358	4846,70	3002,14	2,30	Rib
31	3,413	25922,59	16738,94	12,29	Ara
35	3,943	9534,04	5619,07	4,52	Xyl
38	4,557	108503,91	56487,25	51,44	St
43	6,253	2658,50	1183,12	1,26	Man
46	6,707	7036,59	2506,39	3,34	Gal
48	7,186	50216,82	15970,24	23,81	Glc
Soma:		210949,60	15970,24	100,00	