



Instituto Politécnico
de Castelo Branco
Escola Superior
Agrária

Validação de métodos para a determinação de compostos fenólicos em melancia

Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar

Ana Lúcia Colaço Silveira

Orientadores

Maria de Fátima Pratas Peres
Paulo José Freire Antunes

Agosto de 2013



Instituto Politécnico
de Castelo Branco
Escola Superior
Agrária

Validação de métodos para a determinação de compostos fenólicos em melancia

Ana Lúcia Colaço Silveira

Orientadores

Maria de Fátima Pratas Peres
Paulo José Freire Antunes

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar, realizada sob a orientação científica do Técnico Superior Especialista Doutor Paulo Antunes e da Professor Adjunto Fátima Peres, do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Agosto de 2013

Aos meus pais e irmã

Agradecimentos

Ao professor Luís Pinto de Andrade, pelo convite para integrar este projeto, pela simpatia e confiança depositada.

Ao Dr. Paulo Antunes, responsável pelo Laboratório de Físico-Química da Associação Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar (CATAA), agradeço o facto de ter aceite orientar-me. Obrigada pela extrema paciência, pela disponibilidade e pela partilha dos seus valiosos conhecimentos.

À professora Fátima Peres, minha orientadora também, agradeço todo o apoio, toda a partilha de informação, a preocupação e a inteira disponibilidade que sempre teve para comigo.

À Dtra. Cristina Miguel agradeço por me ter acolhido desde o início e por desde sempre ter partilhado os seus conhecimentos, auxiliando-me, principalmente, na execução e interpretação da técnica para a determinação dos fenóis totais.

À Dtra. Luísa Paulo e à engenheira Mafalda Resende, agradeço pela disponibilidade para o esclarecimento de qualquer dúvida ou resolução de qualquer questão prática e por me terem acolhido no seu espaço de trabalho de uma forma tão simpática.

À empresa Hortas d'Idanha o facto de terem disponibilizado todas as melancias utilizadas nos testes realizados.

À minha família, aos meus pais e irmã, pelo apoio incondicional, por todo o amor depositado em cada momento, estando incansavelmente presentes e plenos de paciência e compreensão. Agradeço todos os dias a sorte de tê-los!

Ao Vítor por toda a compreensão, pela inteira disponibilidade e pela alegria que trouxe aos meus dias.

A todos os meus amigos, principalmente aqueles que, mesmo distantes fisicamente, estiveram sempre tão próximos e disponíveis tanto quanto possível para me ajudarem a tornar esta fase de estudo ainda mais valiosa. Com todos eles fui valorizando os momentos de partilha e companheirismo.

Enfim, agradeço a todos os que, de uma ou de outra forma, contribuíram para que este mestrado e, nomeadamente este estágio, se tornasse numa experiência extremamente enriquecedora e valiosa.

Este trabalho foi financiado no âmbito do projeto Rede de Investigação Transfronteiriça da Extremadura, Centro e Alentejo (RITECA), financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do Programa Operacional de Cooperação Transfronteiriça Portugal/Espanha 2007-2013 (POCTEP).

Resumo

O presente trabalho teve por principal objetivo o desenvolvimento de uma metodologia para a determinação do perfil de compostos fenólicos em melancia, por cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de díodos (HPLC-DAD).

Foram testadas diversas formas de preparação de amostras, diferentes programações de eluentes, entre outros, tendo como propósito a otimização do método. Os compostos pesquisados foram os seguintes: ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido gentísico, ácido clorogénico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido o-cumárico, luteolina, apigenina e campeferol.

Após a implementação e otimização do método, o mesmo foi validado para os seguintes parâmetros: a reprodutibilidade do sistema, a especificidade/seletividade, a exatidão que compreende a precisão e a recuperação, a linearidade/sensibilidade, os limites de detecção e de quantificação, a amplitude e a estabilidade das soluções de trabalho. Para a avaliação de compostos fenólicos na melancia foram selecionadas vinte e cinco amostras de melancias de cinco cultivares diferentes (Crimson sweet, Augusta, Crimstar, Romeria e Romalinda) em função dos seus teores em polifenóis totais e em sólidos solúveis totais, aplicando-se a metodologia previamente validada.

De acordo com os resultados, provou-se que a metodologia era válida para os onze compostos fenólicos testados, sendo que para o ácido gálico, o ácido clorogénico, o ácido cafeico e o ácido ferúlico se confirmou a sua presença em amostras de melancia.

Os resultados demonstraram que o ácido gálico e o ácido cafeico foram identificados apresentando valores inferiores ao limite de quantificação. Já o ácido clorogénico, apesar de ter sido identificado nas cinco cultivares, apenas é quantificável na cultivar Romalinda, com teores entre 0,57 mg L⁻¹ e 0,61 mg L⁻¹, enquanto que a presença do ácido ferúlico é quantificável em todas as cultivares em quantidades mais abundantes em comparação com os restantes compostos identificados, em teores compreendidos entre 0,47 mg L⁻¹ e 4,52 mg L⁻¹.

Não obstante, além destes compostos, os resultados permitiram também verificar a existência de muitos outros para os quais não foi possível a sua classificação. Alguns destes compostos apresentam-se em quantidades mais elevadas, pelo que a sua identificação poderá ter importância relevante para a caracterização do valor nutricional da melancia.

Assim, neste trabalho foi possível a validação de uma metodologia simples e célere para a identificação e quantificação de compostos fenólicos em melancia. É de salientar ainda a detecção de quatro compostos fenólicos e a quantificação de ácido ferúlico nas cultivares de melancia Crimson sweet, Augusta, Crimstar, Romeria e Romalinda.

Palavras chave

Melancia, compostos fenólicos, validação, HPLC-DAD, ácido ferúlico

Abstract

The main purpose of the present work was the development of a methodology for determination of phenolic compounds in watermelon, by high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD).

For this purpose were tested several sample preparations and different elutions in order to do the optimization of the method. The compounds investigated were: gallic acid, protocatechuic acid, gentisic acid, chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid, ferulic acid, o-coumaric acid, luteolin, apigenin and kaempferol.

After the implementation and optimization of the method, the same was validated for the following parameters: the system reproducibility, the specificity/selectivity, the accuracy comprehending the precision and the recovery, the linearity/sensitivity, the limits of detection and quantification, the amplitude and stability of the working solutions. In what concerns the evaluation of the presence of phenolic compounds in watermelon, twenty five samples from five different cultivars (Crimson sweet, Augusta, Crimstar, Romeria e Romalinda) were selected, in accordance to its total polyphenol levels and total soluble solids, applying the methodology previously validated.

According to the results, it was proved that the methodology was valid for the eleven phenolic compounds, and for gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid and ferulic acid its presence was confirmed in watermelons samples.

The results showed that gallic acid and caffeic acid were identified in lower contents than the quantification limit. The chlorogenic acid, although being identified in the five cultivars, was only quantified in the Romalinda cultivar, with contents between 0,57 mg L⁻¹ and 0,61 mg L⁻¹; the presence of ferulic acid was quantified in all cultivars in more abundant quantities in comparison to the others identified compounds, that vary between 0,47 mg L⁻¹ and 4,52 mg L⁻¹.

Nevertheless, besides these compounds, the results showed the existence of several others for whom no classification was possible. Some of these compounds present themselves higher quantities, highlighting its nutritional importance for watermelon fruits.

In this work it was possible to validate a simple and rapid method for the identification and quantification of phenolic compounds in watermelon. It is noteworthy also four detection and quantification of phenolic compounds ferulic acid cultivars of watermelon Crimson sweet, Augusta, Crimstar, Romeria and Romalinda.

Keywords

Watermelon, phenolic compounds, validation, HPLC-DAD, ferulic acid

Índice geral

1. Introdução	
1.1. Importância e Caracterização da Melancia	2
1.2. Compostos Fenólicos	4
1.3. Caracterização dos Compostos Fenólicos	5
1.4. Métodos Analíticos	9
1.4.1. Fenóis Totais	9
1.4.2. Perfil de Compostos Fenólicos	11
1.5. Validação	15
2. Material e Métodos	
2.1. Caracterização das Amostras	21
2.2. Preparação Inicial das Amostras	21
2.3. Quantificação dos fenóis totais	22
2.3.1. Equipamentos e Materiais	22
2.3.2. Reagentes	22
2.3.3. Preparação de padrões	22
2.3.4. Procedimento Analítico	23
2.4. Identificação e quantificação do perfil de compostos fenólicos por HPLC-DAD	24
2.4.1. Equipamentos e Materiais	24
2.4.2. Reagentes	24
2.4.3. Método cromatográfico	24
2.4.4. Calibração – Preparação das soluções-mãe de cada padrão	25
2.4.5. Preparação da solução PF8 e respectivas diluições	26
2.4.6. Preparação das amostras	27
2.4.7. Sequência de trabalho	27
2.5. Validação da metodologia	28
3. Resultados e Discussão	
3.1. Fenóis totais	30
3.2. Seleção das amostras a analisar	31
3.3. Perfil de compostos fenólicos por HPLC-DAD	31
3.3.1. Desenvolvimento da metodologia	31
3.3.2. Validação da metodologia	35
3.3.3. Perfil de compostos fenólicos em melancia por HPLC-DAD	45
4. Considerações Finais	50
Referências Bibliográficas	52
Anexos	53

Índice de figuras

Figura 1 – Melancias da cultivar Crimstar (à esquerda) e da cultivar Romeria (à direita).	2
Figura 2 – Cultivar Romalinda: imagem do interior do fruto (à esquerda) e do exterior de vários frutos (à direita).	3
Figura 3 - Classificação dos Compostos Fenólicos (Adaptado de Neveu <i>et al.</i> , 2010).	6
Figura 4 – Estrutura química dos ácidos benzóicos (Soares, 2002).	7
Figura 5 – Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos (Soares, 2002).	7
Figura 6 – Estrutura básica dos flavonóides (Dornas <i>et al.</i> ,2007).	8
Figura 7 – Estrutura química da luteolina (Neveu <i>et al.</i> , 2010).	8
Figura 8 – Estrutura química do sesamol (Neveu <i>et al.</i> , 2010).	8
Figura 9 – Estrutura química do resveratrol (Neveu <i>et al.</i> , 2010).	9
Figura 10 – Estrutura química do tirosol (Neveu <i>et al.</i> , 2010).	9
Figura 11 – Espectrofotômetro UV-Visível, utilizado para a determinação dos fenóis totais.	10
Figura 12 – Sistema HPLC utilizado, constituído por uma bomba binária, amostrador, compartimento de coluna, detetor DAD e sistema de registo de dados.	11
Figura 13 – Fenóis totais das cinco cultivares em diferentes momentos de colheita – zona central.	30
Figura 14 – Cromatograma obtido a partir do gradiente de eluição testado inicialmente.	31
Figura 15 – Cromatograma obtido a partir do gradiente de eluição utilizado neste trabalho.	32
Figura 16 – Comparação dos solventes: acetonitrilo puro (azul) e acetonitrilo a 8% (preto).	32
Figura 17 – Cromatogramas obtidos nos diferentes comprimentos de onda testados.	33
Figura 18 – Comparação de uma amostra de melancia, após preparação com a técnica de SPE (preto) e uma amostra de framboesa (azul).	34
Figura 19 – Cromatograma de um ensaio em branco.	36
Figura 20 – Cromatogramas de uma das amostras de melancia com fortificação (azul) e sem fortificação (preto).	37
Figura 21 – Espetros do padrão e em amostras de melancia do composto puro - ácido siríngico.	37
Figura 22 – Espetros do padrão e em amostras de melancia do composto puro - ácido ferúlico.	38
Figura 23 – Retas de calibração obtidas para o ácido ferúlico em três dias para a validação da metodologia.	41
Figura 24 – Estabilidade das soluções de trabalho (1).	43
Figura 25 – Estabilidade das soluções de trabalho (2).	44
Figura 26 – Cromatograma de uma amostra de melancia da cultivar Crimson sweet.	45
Figura 27 – Espetros de absorção UV-Vis para os quatro compostos fenólicos (AGál e AClo), mostrando a pureza de cada pico.	48
Figura 28 – Espetros de absorção UV-Vis para os quatro compostos fenólicos (ACaf e AF), mostrando a pureza de cada pico.	48
Figura 29 – Comparação dos espectros de absorção UV-Vis do ácido gálico com um dos picos que mais se destacam nas amostras de melancia analisadas.	49
Figura 30 – Comparação dos espectros de absorção UV-Vis do ácido gálico com um dos picos que mais se destacam nas amostras de melancia analisadas.	49

Lista de tabelas

Tabela 1 – Classificação taxonómica da melancia (<i>Citrullus lanatus</i>).	2
Tabela 2 – Valores por 100g de parte edível dos vários componentes em diferentes frutos. Legenda: Monoins. – Monoinsaturados e Polins. – Polinsaturados. (Adaptado de INSA, 2007)	3
Tabela 3 – Compilação de algumas metodologias para a determinação do perfil de compostos fenólicos segundo vários autores.	12
Tabela 4 – Compilação de algumas metodologias para a determinação do perfil de compostos fenólicos segundo vários autores (cont.).	13
Tabela 5 – Compilação de algumas metodologias para a determinação do perfil de compostos fenólicos segundo vários autores (cont.).	14
Tabela 6 – Compilação e descrição de alguns métodos para a determinação do perfil de compostos fenólicos por HPLC segundo vários autores.	14
Tabela 7 – Compilação e descrição de alguns métodos para a determinação do perfil de compostos fenólicos por HPLC segundo vários autores (cont.).	15
Tabela 8 – Datas de colheita das cinco cultivares de melancia estudadas.	21
Tabela 9 – Preparação dos padrões de calibração.	22
Tabela 10 – Identificação dos compostos utilizados como padrões.	25
Tabela 11 – Concentração das solução-mãe de cada padrão.	25
Tabela 12 - Preparação da solução PF8 e respetiva concentração final de cada um dos padrões.	26
Tabela 13 - Preparação das soluções-padrão a partir da solução PF8.	26
Tabela 14 – Avaliação dos parâmetros e pré-requisitos de validação.	28
Tabela 15 – Coeficiente de variação (CV) obtidos nos três dias de ensaios realizados.	35
Tabela 16 – Comparação de resultados para avaliação da especificidade/seletividade do método.(Área em mAU*minutos e tempo de retenção em minutos).	36
Tabela 17 – Coeficientes de variação das recuperações das amostras fortificadas de cada um dos compostos fenólicos nos três dias de ensaio.	38
Tabela 18 – Comparação das percentagens de recuperações de cada composto fenólico em cada uma das retas realizadas.	39
Tabela 19 – Comparação das percentagens de recuperações de cada composto fenólico em cada uma das retas realizadas (cont.).	40
Tabela 20 – Valores do intervalo de b, valores de r^2 e dos desvios associados nas três retas de calibração para o ácido ferúlico.	41
Tabela 21 - Valores médios de LQ e LD, bem como os erros padrão (S_{xy}) obtidos na execução das três retas de calibração para cada um dos compostos.	42
Tabela 22 – Intervalo de concentração correspondente a cada composto, desde o LQ até à solução PF8.	42
Tabela 23 – Intervalo de concentração correspondente a cada composto, desde o LQ até à solução PF8.	42
Tabela 24 – Resultados dos ensaios realizados com as vinte e cinco amostras de melancia selecionadas.	46
Tabela 25 – Compostos fenólicos quantificados em cada cultivar (média \pm desvio-padrão).	47

Lista de abreviaturas e siglas

A - Augusta
ACaf - Ácido Cafeico
AClor - Ácido Clorogénico
AF - Ácido Ferúlico
AGál - Ácido Gálico
AGent - Ácido Gentísico
AO - Ácido o-cumárico
AP - Ácido Protocatecuico
Api - Apigenina
AS - Ácido Siríngico
AV - Ácido Vanílico
C - Crimstar
Camp - Campeferol
CATAA - Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar
CS - Crimson Sweet
CV - Coeficiente de Variação
DAD - *Diode array detector*
HPLC - *High-performance liquid chromatography*
int. - Interferente
LD - Limite de Detecção
LQ - Limite de Quantificação
Lut - Luteolina
MRC - Material de referência certificado
n.d. - Não detetado
R - Romeria
RITECA - Rede de Investigação Transfronteiriça Extremadura - Centro - Alentejo
RM - Romalinda
SPE - *Solid-phase extraction*
SST - Sólidos solúveis totais
Tir - Tirosol
Tr - Tempo de retenção
UV-Vis - Ultravioleta Visível

1. Introdução

A família das Cucurbitáceas tem uma importância económica considerável, uma vez que compreende cerca de 122 géneros e 900 espécies diferentes que são muito utilizados na alimentação humana (Simpson, 2010). Desta família destaca-se a melancia, como um dos frutos mais largamente cultivados em todo o mundo (Abu-Reidah *et al.*, 2013).

A melancia (*Citrullus lanatus*) é reconhecida, principalmente, pela elevada capacidade antioxidante natural, um atributo que destaca a qualidade de muitos alimentos. Neste caso em concreto, a responsabilidade desta capacidade é atribuída aos compostos fenólicos, que são referidos como sendo os principais compostos que contribuem para a sua atividade antioxidante (Tlili *et al.*, 2011).

Os compostos fenólicos apresentam estruturas muito diversas e, portanto, também são suscetíveis de apresentar diferentes propriedades funcionais. Neste sentido, é indispensável analisar a composição destes compostos nos alimentos, realizando estudos antes da atribuição das respetivas propriedades (Abu-Reidah *et al.*, 2013).

Nesta ordem de ideias, o desenvolvimento e a validação de uma metodologia para a análise da presença de compostos fenólicos nos alimentos deve ser parte integrante da caracterização e do controlo de qualidade dos mesmos (Abu-Reidah *et al.*, 2013). É neste contexto que se desenvolveu o presente trabalho, que consistiu na validação de métodos para a determinação de compostos fenólicos na melancia.

O trabalho insere-se no âmbito do projecto RITECA e realizou-se em colaboração com a empresa Hortas d'Idanha. Foram estudadas cinco cultivares de melancia – Crimson sweet, Augusta, Crimstar, Romeria e Romalinda - e numa primeira fase foi avaliada a sua composição em fenóis totais. Estes resultados iniciais permitiram seleccionar as amostras com mais fenóis totais por diferentes datas de colheita, zona da melancia e cultivar para posterior caracterização do perfil fenólico por HPLC-DAD.

Por último, o que se traduz no principal objetivo deste trabalho foi a validação da metodologia em HPLC-DAD para a determinação do perfil de compostos fenólicos já referido.

1.1 Importância e Caracterização da Melancia

A melancia é um fruto muito apreciado pelo seu poder refrescante, uma vez que é maioritariamente constituída por água, mas também pelo seu baixo teor calórico (Tlili *et al.*, 2011). Comercializado durante as épocas mais quentes do ano, entre os meses de maio a setembro, a melancia é um fruto consumido sazonalmente.

Relativamente à sua taxonomia, tal como referenciado na Tabela 1, este fruto pertence à família *Cucurbitaceae* e a sua espécie é *Citrullus lanatus*.

Tabela 1 - Classificação taxonómica da melancia (*Citrullus lanatus*).

Reino	<i>Plantae</i>
Filo	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordem	<i>Cucurbitales</i>
Família	<i>Cucurbitaceae</i>
Género	<i>Citrullus</i>
Espécie	<i>C. lanatus</i>

Esta planta teve origem no continente africano, mas é já largamente cultivada em todo o mundo, ocupando a maior produção de todos os frutos e legumes pertencentes a esta família. Estima-se que a produção mundial atual de melancia seja em torno de 99 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2010). Demonstra ser muito adaptável e resistente, mas para o seu desenvolvimento prefere solos arenosos e profundos, mas suficientemente drenados (Rocha, 2010).

Citrullus lanatus é uma planta rasteira, com folhas triangulares e divididas em três lobos e as suas flores são pequenas e amareladas. Frutifica uma vez por ano e os seus frutos têm uma forma arredondada ou alongada, sendo que a sua polpa é suculenta e doce e, normalmente, de cor vermelha. Apresenta um alto teor de água e um diâmetro variável entre 20 e 50 cm. A casca é espessa, verde e lustrosa e algumas variedades apresentam estrias numa tonalidade de verde mais escura, como a Figura 1 demonstra.



Crimstar

Romeria

Figura 1 - Melancias da cultivar Crimstar (à esquerda) e da cultivar Romeria (à direita).

Ao contrário da maioria dos frutos desta família, as sementes da melancia estão distribuídas pelo fruto desordenadamente. No entanto, atualmente e fruto de vários testes de campo, desenvolvidos na zona do Ladoeiro, uma cultivar de melancia sem sementes tem vindo a ser produzida. A cultivar é designada por Romalinda e também será caracterizada no presente estudo. A Figura 2 representa o interior do fruto (à esquerda) demonstrando a inexistência de sementes escuras e apresentando apenas pequenas sementes de cor clara, menos perceptíveis aquando da degustação da melancia. Na mesma imagem é possível ver o aspeto exterior dos frutos desta cultivar (à direita) que apresentam um diâmetro mais pequeno que cultivares já existentes.



Figura 2 - Cultivar Romalinda: imagem do interior do fruto (à esquerda) e do exterior de vários frutos (à direita).

Já no que diz respeito à sua composição nutricional, além de ser rica em água, a sua composição também apresenta vitaminas, como a A e C, fenóis e aminoácidos específicos (Rimando e Perkins-Veazie, 2005).

Por norma, as frutas, como é o caso da melancia, são consumidas sem qualquer necessidade de preparação, sendo ingeridas ao natural, sendo que assim não existem perdas ao nível do seu valor nutritivo.

Na Tabela 2 são apresentados os valores de macronutrientes, ácidos gordos, vitaminas e minerais da melancia, destacando apenas alguns exemplos, bem como de outros frutos com os quais pode ser comparada.

Tabela 2 - Valores por 100g de parte edível dos vários componentes em diferentes frutos. Legenda: Monoins. - Monoinsaturados e Polins. - Polinsaturados. (Adaptado de INSA, 2007)

	Macronutrientes	Ácidos Gordos		Vitaminas		Minerais	
	Água (g)	Monoins. (g)	Polins. (g)	C (mg)	B6 (mg)	Potássio (mg)	Cinza (g)
Kiwi	82,9	0,1	0,2	72	0,02	302	0,72
Manga	83,5	0,1	0,1	23	0,13	115	0,50
Melancia	93,6	0,1	0,1	4,0	0,14	100	0,29
Morango	90,1	0,1	0,2	47	0,05	138	0,58
Papaia	88,2	0,1	0	68	0,03	210	0,59

Sabe-se que, apesar da melancia ter um menor teor de compostos fenólicos em comparação com outros frutos é consumida em grandes quantidades. Tendo em conta esta realidade, Vinson *et al.* (2001) concluíram que esta fruta é um dos frutos que fornecem maiores quantidades de compostos fenólicos para a dieta americana e espanhola.

No que respeita aos hábitos alimentares, nos últimos anos, tem-se verificado cada vez mais deficiências nutricionais que potenciam problemas de obesidade e doenças crónicas relacionadas com o consumo excessivo e/ou desequilibrado de alimentos (Claro *et al.*, 2007). Nestes casos, aquando da existência de distúrbios, a dieta alimentar é caracterizada principalmente pelo consumo insuficiente de frutas, legumes, verduras e pelo consumo em excesso de alimentos de alto valor energético e ricos em gorduras, açúcares e sal. Entende-se assim que, o consumo insuficiente de hortaliças e frutas é um fator de risco relacionado com doenças crónicas. Estes alimentos são importantes para uma dieta saudável, uma vez que são fontes de micronutrientes, fibras e de outros componentes com propriedades funcionais.

Uma alimentação saudável compreende um padrão alimentar adequado às necessidades biológicas e sociais dos indivíduos de acordo com as fases de desenvolvimento de cada um. Neste sentido, pode afirmar-se que existem dois princípios:

- a variedade – consumir alimentos variados que pertençam aos diversos grupos alimentares;
- o equilíbrio - consumir alimentos variados, respeitando a quantidade de porções recomendadas para cada grupo de alimentos.

Assim, a alimentação saudável e adequada deve, além da composição nutricional, compreender também a perceção dos padrões de vida e a introdução de alimentos funcionais na dieta alimentar.

A fruta é o grupo de alimentos mais abordado quando se debate esta questão da alimentação saudável. Neste caso das frutas, além dos nutrientes essenciais e dos micronutrientes, ainda contribuem com diversos componentes provenientes do metabolismo secundário, principalmente os de natureza fenólica. Estas podem assim ser apontadas como boas fontes de antioxidantes naturais que podem ser mais efetivas e económicas do que o uso de suplementos dietéticos na proteção do organismo contra os danos oxidativos e, portanto, o seu consumo deve ser estimulado (Melo *et al.*, 2008).

1.2 Compostos Fenólicos

O consumo de frutas e hortaliças está associado ao baixo risco de incidência e mortalidade devido a problemas cancerígenos ou a doenças cardíacas e devido à presença, em especial, dos flavonóides e das antocianinas que pertencem à diversificada classe dos compostos fenólicos. Estão descritos para estes compostos numerosos efeitos biológicos, como o combate a radicais livres, a modificação da atividade de algumas enzimas, a inibição da proliferação celular, bem como o seu potencial como agente antibiótico, anti-alérgico e anti-inflamatório. De uma forma geral, estes compostos podem proteger os constituintes celulares da sua oxidação e assim limitar o risco de várias doenças associadas à degeneração por oxidação. (D'Archivio *et al.*, 2007).

A presença destes compostos num dado alimento pode variar de acordo com a variedade, as condições agrícolas em que foram produzidos, as condições de armazenamento e de processamento do mesmo (Amarowicz *et al.*, 2009).

Este grupo de compostos constitui um dos mais numerosos e amplamente distribuídos grupos de produtos naturais no reino vegetal. Mais de 8000 estruturas fenólicas são atualmente conhecidas e entre elas mais de 4000 flavonóides foram identificados (Harborne e Williams, 2000), sendo compostos caracterizados como sendo fortes antioxidantes.

Quimicamente, os compostos fenólicos são um grupo de compostos naturais com características estruturais fenólicas. Trata-se de um termo coletivo para vários subgrupos de compostos fenólicos, levando à existência de uma nomenclatura variada, pois estes apresentam significativas diferenças estruturais.

Os efeitos na saúde dependem da quantidade consumida e da sua biodisponibilidade. De salientar que, devido à sua elevada diversidade estrutural, esta biodisponibilidade é naturalmente muito influenciável. Esta difere assim entre os diferentes compostos e é importante assinalar que os mais comuns na dieta humana não são os mais ativos biologicamente. Tal é justificado por inúmeras razões, como a baixa atividade intrínseca, a absorção intestinal reduzida ou a rápida metabolização e excreção. Não obstante, nem todos os compostos fenólicos são absorvidos com a mesma eficácia, sendo que são extensivamente metabolizados pela microflora intestinal.

Neste sentido, um conhecimento mais profundo da biodisponibilidade das diferentes classes deste grupo de compostos poderá ajudar a identificar os que são mais susceptíveis de exercer efeitos protetores da saúde.

1.3 Caracterização dos Compostos Fenólicos

A distribuição da diversidade e variedade de compostos fenólicos em plantas conduziram a formas diferentes de classificar estes compostos naturais. Normalmente, estes compostos são classificados pela sua estrutura de origem, pela sua função biológica e pela sua natureza química.

Estes subgrupos podem também diferir significativamente em termos de estabilidade, biodisponibilidade e funções fisiológicas relacionadas com a saúde humana.

De qualquer modo, é unânime que este grupo de compostos apresenta grandes benefícios para a saúde humana, apesar de existirem outros, como as vitaminas, aos quais também tem sido dada atenção devido à sua atividade antioxidante contra radicais livres.

Este grande grupo é assim dividido em classes de acordo com o número de anéis fenólicos que possuem e das estruturas que ligam estes anéis entre si. Deste modo, tal como representado na Figura 3, distinguem-se cinco classes de fenóis: os ácidos fenólicos, flavonóides, lignanos, estilbenos e outros compostos fenólicos (Neveu *et al.*, 2010).

De seguida, apresenta-se uma pequena descrição de cada uma.

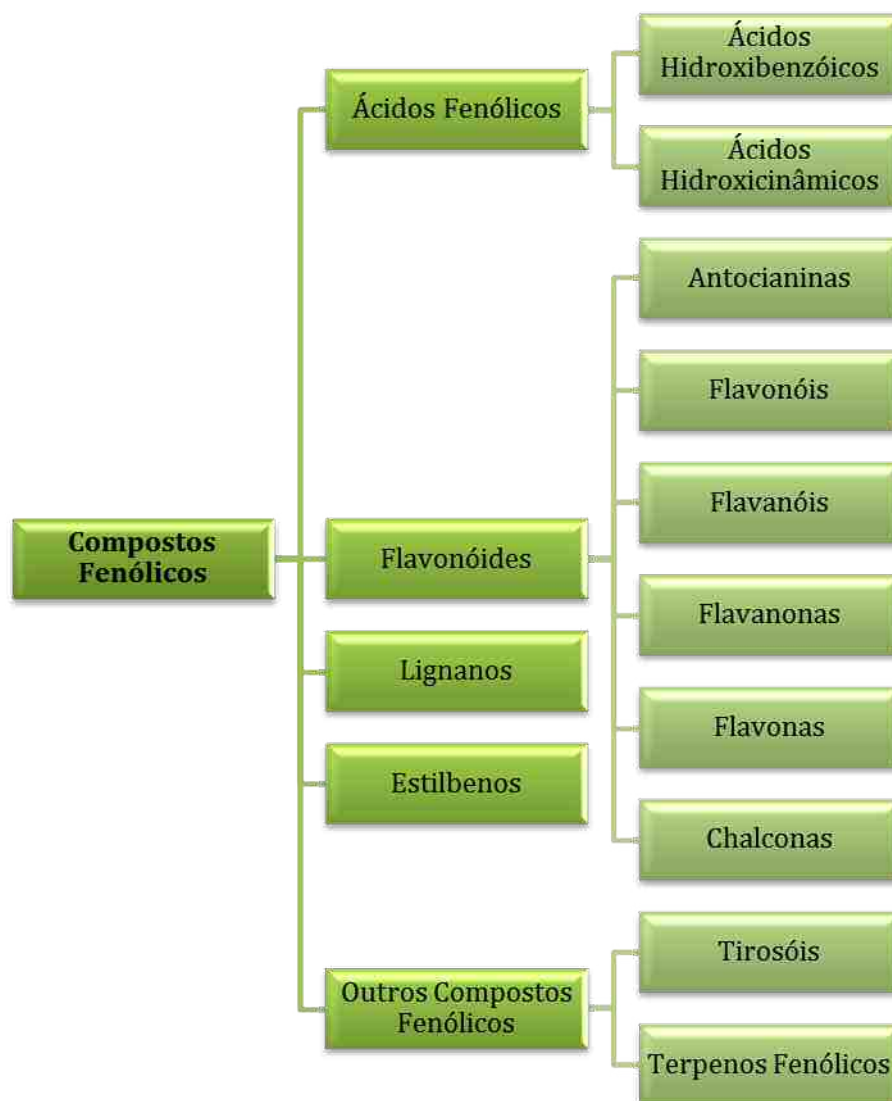


Figura 3- Classificação dos Compostos Fenólicos (Adaptado de Neveu *et al.*, 2010).

A. Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos são compostos não flavonóides caracterizados por terem um anel benzénico, um grupo carboxílico e um ou mais grupos hidroxilo e/ou metoxilo conferindo propriedades antioxidantes para os vegetais (Castro, 2008).

Este grupo de compostos pode ainda ser dividido em dois tipos principais: ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos.

- Os ácidos hidroxibenzóicos (Figura 4) compreendem, por exemplo, o ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido gentísico, ácido vanílico e ácido sirínico, que têm uma estrutura comum, C₆-C₁.

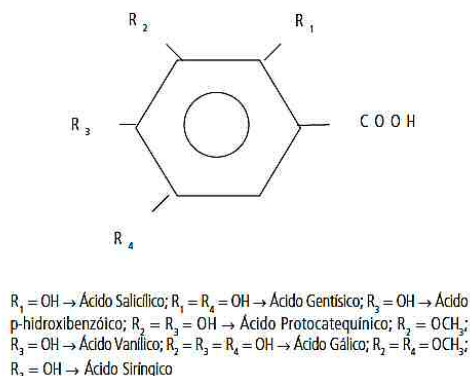


Figura 4- Estrutura química dos ácidos hidroxibenzoicos (Soares, 2002).

• Os ácidos hidroxicinâmicos (Figura 5) compreendem, por exemplo, o ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido cumárico. Estão presentes nos tecidos vegetais principalmente na forma de ésteres e caracterizam-se por serem compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral ($\text{C}_6\text{-C}_3$).

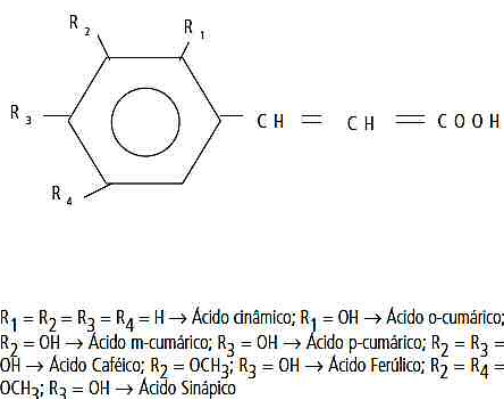


Figura 5 - Estrutura química dos principais ácidos hidroxicinâmicos (Soares, 2002).

Os ácidos hidroxicinâmicos, como o ácido ferúlico e o cumárico, são antioxidantes mais ativos do que os derivados do ácido benzóico, tais como o protocatecuico, siríngico e vanílico. Tal situação é justificada pela dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido cinâmico que intervém na estabilidade do radical por ressonância do deslocamento do elétron desemparelhado, enquanto que os derivados do ácido benzóico não apresentam essa característica.

Podemos também salientar que, enquanto que os frutos e os vegetais contêm muitos ácidos fenólicos livres, quando falamos em grãos, sementes ou cascas estão muitas vezes na forma ligada. Estes ácidos fenólicos só podem ser libertados ou hidrolisados mediante hidrólise ácida ou alcalina ou através da ação enzimática.

B. Flavonóides

Este grupo é um dos que se encontra largamente distribuído nos vegetais na forma de glicosídeos ou agliconas. Tratam-se de compostos de baixo peso molecular, sendo

constituídos por quinze átomos de carbono, organizados na configuração C₆-C₃-C₆. A estrutura destes compostos compreende dois anéis aromáticos, anel A e B, que são unidos por três carbonos formando um anel heterocíclico, o anel C (Figura 6).

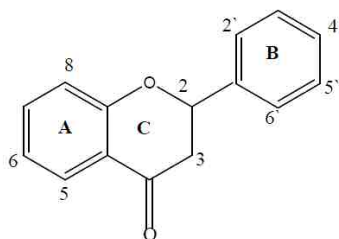


Figura 6 - Estrutura básica dos flavonóides (Dornas *et al.*, 2007).

Na realidade, é a disposição deste anel C que é responsável pela grande variedade de compostos que estão presentes neste grupo, como sendo:

- Antocianinas
- Flavonóis: Campeferol.
- Flavanóis
- Flavanonas
- Flavonas: Luteolina (Figura 7) e Apigenina.
- Chalconas

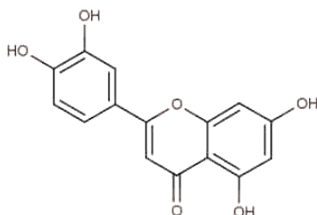


Figura 7 - Estrutura química da luteolina (Neveu *et al.*, 2010).

C. Lignanós

Relativamente ao grupo dos lignanos, estes são produzidos por dimerização oxidativa de duas unidades de fenilpropano, que estão na sua maioria presentes na natureza sob a forma livre.

Um dos exemplos de um composto pertencente a este grupo é o sesamol, que se encontra representado na Figura 8.

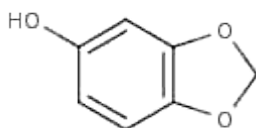


Figura 8 - Estrutura química do sesamol (Neveu *et al.*, 2010).

D. Estilbenos

Este grupo de compostos fenólicos está presente na dieta humana em pequenas quantidades, sendo que o composto fenólico principal é o resveratrol (Figura 9). Este

composto é produzido pelas plantas em resposta a infecções por agentes patogénicos ou quando sujeitas a diversas situações de stresse. Já foi detetado em mais de setenta espécies de plantas, nomeadamente em uvas e amendoins. Relativamente ao resveratrol existem vários estudos a relatar o seu potencial efeito contra agentes cancerígenos.

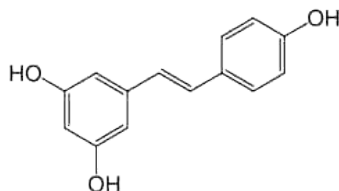


Figura 9 - Estrutura química do resveratrol (Neveu *et al.*, 2010).

E. Outros Compostos Fenólicos

Todos os outros compostos fenólicos que não se enquadram num grande grupo, como os descritos anteriormente, são, com a indicação de alguns exemplos para cada um, enumerados de seguida.

- Alquimetoxifenóis: 4-Etilguaiacol, 4-Vinilguaiacol e 4-Vinilsiringol.
- Alquifenóis: 4-Etilfenol, 4-Metilcatecol, 4-Vinilfenol, entre outros.
- Curcuminóides: Bisdemetoxicurcumino, Curcumino, Demetoxicurcumino
- Furanocumarinos: Bergapteno, Isopimpinelio, Xantotoxina, entre outros.
- Hidroxibenzaldeídos: 4-Hidroxibenzaldeído, Siringaldeído, Vanilina, entre outros.
- Hidroxibenzocetonas: 2,3-Dihidroxi-1-guaiacilpropanona e 3-Metoxiacetofenona.
- Hidroxicinamaldeídos: Ferulaldeído e Sinpaldeído.
- Hidroxicumarinos: Cumarino, Esculino, Meleino, entre outros.
- Hidroxifenilpropenos: Acetil eugenol, Anetole, Eugenol, entre outros.
- Metoxifenóis: Guaiacol.
- Naftoquinonas: 1,4-Naftoquinona e Juglona.
- Terpenos fenólicos: Ácido carnosico, Carvacrol, Rosmanol, entre outros.
- Tirosóis: Hidroxitirosol, Oleuropeína, Tirosol (Figura 10), entre outros.
- Outros fenóis: Arbutina, Catecol, Pirogalol, entre outros.

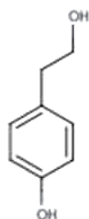


Figura 10 - Estrutura química do tirosol (Neveu *et al.*, 2010).

1.4 Métodos Analíticos

No que diz respeito às determinações a realizar é desde o início que devem ser tomadas precauções com as amostras a testar. Estas devem ser obtidas, manipuladas e tratadas de modo a que a probabilidade de detecção da substância a analisar seja máxima. Os

procedimentos para tal devem evitar a possibilidade de uma contaminação acidental ou da perda das substâncias que se pretendem analisar (JOCE, 2002).

1.4.1 Fenóis Totais

No que concerne à determinação dos fenóis totais, de uma forma geral, a mesma pode ser realizada pelos métodos espectrofotométricos de Folin-Ciocalteu ou do azul da Prússia modificado, que se baseiam em reações de oxidação-redução entre os compostos fenólicos e iões metálicos (Silva *et al.*, 2010). O método colorimétrico segundo Folin-Ciocalteu é o mais utilizado neste tipo de determinações e será o colocado em prática no corrente trabalho.

Numa primeira fase, pode realizar-se a extração dos compostos que se pretendem testar, tendo como principal objetivo a obtenção de uma extração completa. Com a utilização do reagente de Folin-Ciocalteu, pretende-se que o mesmo reaja, ocorrendo a sua redução pelos compostos fenólicos das amostras, formando-se um complexo azul. No final, temos então a análise espectrofotométrica que permitirá a quantificação dos compostos fenólicos presentes (Figura 11). Para esta quantificação é necessária a realização de um reta de calibração, tal como será detalhado ainda no decorrer deste trabalho, e o composto utilizado nesta calibração, por norma, é o ácido gálico.



Figura 11 - Espectrofotómetro UV-Visível, utilizado para a determinação dos fenóis totais.

1.4.2 Perfil de Compostos Fenólicos

Para estas determinações recorre-se habitualmente a metodologias cromatográficas.

O objetivo da cromatografia é a separação individual de diversos constituintes de uma mistura, quer se pretenda a identificação, quantificação ou, simplesmente, a obtenção de uma substância pura. Esta separação ocorre por passagem de uma mistura através de uma fase estacionária, tendo como intermediário um fluido que será considerado a fase móvel, sabendo que estas duas serão miscíveis (Kenndler, 2004).

Devido à diversidade de combinações entre estas duas fases, existem diferentes técnicas de cromatografia. De entre todos os tipos de cromatografia, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma das mais relevantes. Trata-se de uma técnica de cromatografia em que a fase móvel é líquida e encontra-se sobre pressão, passando através de uma coluna que contém a fase estacionária, sendo um processo bastante eficiente e rápido.

Mais recentemente, a capacidade desta técnica para separar os compostos fenólicos foi bem conhecida, sendo a técnica de separação mais utilizada para a determinação de compostos bioativos (Abu-Reidah *et al.*, 2013).

Para a leitura dos resultados existem diferentes detetores que podem ser utilizados. Temos como exemplos os de índice de refração, os de espectrofotometria ou ainda os de fluorescência. Dentro dos espectrofotométricos destacam-se os de UV-Visível (UV-Vis) e os de díodos (DAD). Este último apresenta vantagens em relação ao anterior, uma vez que permite monitorizar todos os comprimentos de onda simultaneamente, permitindo a seleção do melhor para cada um dos compostos que se pretendem pesquisar, aumentando a sensibilidade do sistema. Tal não acontece com o detetor de UV-Vis que apenas permite a seleção de um só comprimento de onda, podendo este não ser o adequado para todos os compostos (CRQ, 2010).

Neste contexto e para uma melhor interpretação dos resultados, importa referir a definição de eficiência e resolução do sistema. A eficiência é avaliada a partir do número de pratos teóricos e esta designação corresponde a uma etapa em que ambas as fases estão em equilíbrio. Assim, quanto maior for o número de pratos teóricos, mais situações de equilíbrio existirão. Tal, levará a uma maior eficiência, permitindo uma melhor separação dos compostos. Já a resolução do sistema avalia, precisamente, a capacidade da coluna na separação de dois componentes.

Relativamente a esta metodologia em concreto, para a determinação do perfil de compostos fenólicos na melancia, recorrer-se-á à cromatografia líquida de alta pressão (HPLC - *High-performance liquid chromatography*) com detetor de díodos (DAD - *Diode array detector*) – Figura 12.

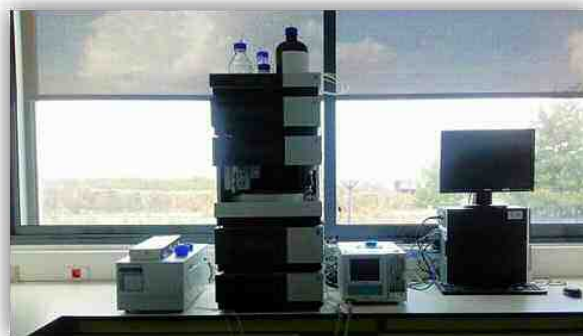


Figura 12 - Sistema HPLC utilizado, constituído por uma bomba binária, amostrador, compartimento de coluna, detetor DAD e sistema de registo de dados.

Através desta técnica é possível separar as moléculas com base nas suas diferenças de hidrofobicidade. A fase estacionária é apolar sendo a coluna mais utilizada a C18 (octadecil - sílica), em que a matriz de suporte (sílica) se encontra ligada um n-alcano com 18 átomos de carbono. Os eluentes, também designados por fase móvel, que serão utilizados na coluna, deverão ser testados no sistema cromatográfico. Como sabemos, a preparação das amostras deve ser realizada tendo em conta a fase móvel selecionada, pois os eluentes utilizados deverão ser semelhantes a esta mesma fase móvel. Sendo assim, apenas após a seleção dos eluentes, poderá ser determinado também o modo de preparação das amostras.

Tendo em conta esta metodologia, quando a amostra é injectada no HPLC, a mesma percorre a fase estacionária ficando retidas, por mais tempo, as moléculas que apresentam

maior afinidade com a coluna, através de ligações hidrofóbicas. As moléculas que apresentam menor afinidade atravessam a coluna mais rapidamente. Após atravessarem a coluna, os analitos são detectados pelo DAD e quantificados. Cada composto é identificado através do seu tempo de retenção, que depende do modo de interação do mesmo com a fase estacionária (Ball, 2006).

Neste campo, para se obter a identidade de um composto fenólico, o método mais comum é a comparação do tempo de retenção de um composto particular com o padrão desse mesmo composto. Assim, se verificarmos que o tempo de retenção obtido coincide com o tempo de retenção do padrão podemos, com reservas, presumir que o composto possa estar identificado. Tendo em conta que com o DAD podemos analisar os espectros de absorção UV-Vis dos compostos que são separados, uma das formas de confirmar esta identificação passará por comparar o espectro obtido e o espectro do padrão. Se os mesmos coincidirem, podemos ter a certeza desta identificação. Assim, a combinação do tempo de retenção e o espectro de absorção UV-Vis resulta na identificação dos compostos testados, para os quais existe padrão.

Importante também é a forma como é realizada a quantificação utilizando-se o método do padrão externo. Para tal, realiza-se uma reta de calibração com diferentes níveis de concentração do padrão. Posteriormente, ao injetar-se a amostra cuja concentração se pretende determinar, verifica-se a área obtida e, utilizando-se a reta de calibração é possível a quantificação do composto pesquisado.

Nas Tabelas 3, 4 e 5 são descritas metodologias que serviram de base à formulação da metodologia utilizada neste trabalho. As Tabelas 3 e 4 resumem uma pesquisa mais abrangente desta temática, utilizando-se HPLC para a determinação de compostos fenólicos e focando a preparação da amostra e os compostos determinados.

Já nas Tabelas 6 e 7, a informação presente é mais centralizada no método cromatográfico a utilizar, descrevendo as fases utilizadas, bem como o sistema de deteção e as condições gerais de trabalho.

Tabela 3 - Compilação de algumas metodologias para a determinação do perfil de compostos fenólicos segundo vários autores.

Amostra	Compostos Fenólicos detetados	Preparação da Amostra	Fase Estacionária	Sistema de Deteção	Referência
Extratos de Chá	Maioritariamente ácidos fenólicos.	Extratos de chá imergidos em água a ferver, evaporação, filtração em lã de algodão, o resíduo lavado com água destilada e o extrato levado até à secura. Reextração com adição de solvente e diluição. Filtração (0,45 µm).	Hypersil ODS S5 (250x4,6 mm; 5 µm) coluna (10x4 mm)	DAD	Yao <i>et al.</i> (2004)

Tabela 4 - Compilação de algumas metodologias para a determinação do perfil de compostos fenólicos segundo vários autores (cont.).

Amostra	Compostos Fenólicos detetados	Preparação da Amostra	Fase Estacionária	Sistema de Detecção	Referência
Extratos de Chá	Maioritariamente ácidos fenólicos.	Extratos de chá dissolvidos em metanol durante 4 min a 20 °C, evaporação, filtração em lã de algodão, resíduo lavado com metanol e o extrato levado até à secura. Adição de metanol para dissolução completa dos componentes secos. Diluição com metanol.	Hypersil ODS S5 (250x4,6 mm; 5 µm) coluna (10x4 mm)	DAD	Yao <i>et al.</i> (2004)
Extratos de Chá	Maioritariamente ácidos fenólicos.	Extratos de chá dissolvidos em metanol durante 4 min a 20 °C, evaporação, filtração em lã de algodão e o resíduo lavado com metanol. Diluição com metanol.	Hypersil ODS S5 (250x4,6 mm; 5 µm) coluna (10x4 mm)	DAD	Yao <i>et al.</i> (2004)
Cultivares de Framboesa	Ácido Elágico e derivados e compostos desconhecidos.	Framboesas homogeneizadas a partir de um homogeneizador (Polytron PT 1200E); 5g de fruto foram misturadas com 50ml de metanol acidificado (HCl 2M), ficando em repouso 20h a 85 °C. Após a hidrólise foram arrefecidas à temperatura ambiente e perfeitas com 100mL de metanol.	LiChroCART LiChrospher 100 RP-18 (125x4 mm; 5 µm) coluna (4x4 mm)	UV-Vis	Bobinaité <i>et al.</i> (2012)

Tabela 5 - Compilação de algumas metodologias para a determinação do perfil de compostos fenólicos segundo vários autores (cont.).

Amostra	Compostos Fenólicos detetados	Preparação da Amostra	Fase Estacionária	Sistema de Deteção	Referência
Vegetais e Frutas	Diferentes compostos dependendo do produto analisado.	As porções comestíveis foram escolhidas aleatoriamente e posteriormente trituradas e homogeneizados em azoto líquido.	Capcell C18 UG120 (250x4,6 mm, S-5, 5 µm) coluna (10x4 mm)	DAD	Sakakibara <i>et al.</i> (2002)
Chás, Caucau e Café	Diferentes compostos dependendo do produto analisado.	As porções obtidas foram trituradas e de seguida liofilizadas.	Capcell C18 UG120 (250x4,6 mm, S-5, 5 µm) coluna (10x4 mm)	DAD	Sakakibara <i>et al.</i> (2002)

Tabela 6 - Compilação e descrição de alguns métodos cromatográficos para a determinação do perfil de compostos fenólicos por HPLC segundo vários autores.

Amostra	Tempo de análise	Eluentes	Fase Estacionária	Sistema de Deteção	Observações	Referência Bibliográfica
Extratos de Chá	65 minutos	A: Acetonitrilo B: Ácido Acético	Hypersil ODS S5 (250x4,6 mm; 5 µm) com pré-coluna	DAD	Fluxo: 1,2 mL/min Volume de injeção: 20 µL	Yao <i>et al.</i> (2004)
Cultivares de Framboesa	40 minutos	A: Ácido Fórmico B: Acetonitrilo/ Metanol (85:15)	Lichrocart Lichrospher 100RP-18 (125x4 mm; 5µm) com pré-coluna	UV-Vis	Fluxo: 1,0 mL/min	Bobinaité <i>et al.</i> (2012)
<i>Maytenus ilicifolia</i> - "Espinheira-santa"	25 minutos	A: Água (0,05% TFA) B: Acetonitrilo (0,05% TFA)	Phenomenex® Gemini RP C18 (250x4,6mm; 5µm) com pré-coluna	UV	Fluxo: 0,8 mL/min; Volume de injeção: 100 µL	Lopes <i>et al.</i> (2010)

Tabela 7 - Compilação e descrição de alguns métodos para a determinação do perfil de compostos fenólicos por HPLC segundo vários autores (cont.).

Amostra	Tempo de análise	Eluentes	Fase Estacionária	Sistema de Detecção	Observações	Referência Bibliográfica
Chás, Frutas e Vegetais	95 minutos	A: Fosfato de Sódio 50 mM (pH 3,3) e 10% de Metanol B: 70% de Metanol	Capcell pak C18 UG120 (250 x4,6 mm i.d.; S-5, 5µm)	DAD	Fluxo: 1,0 mL/min; Volume de injeção: 10 µL	Sakakibara <i>et al.</i> (2002)

1.5 Validação

A validação de um método tem como objetivo demonstrar que o mesmo é indicado para o fim que se pretende. De acordo com a Diretiva 96/23 do Conselho Europeu (JOCE, 2002), a validação é a confirmação, mediante exame e o fornecimento de provas cabais de que são respeitados os requisitos específicos para uma determinada utilização pretendida. Neste caso e de acordo com o objetivo, pretende-se a validação de um método que seja adequado para a determinação de compostos funcionais em melancia, nomeadamente os compostos fenólicos.

A mesma diretiva é também muito útil quando nos elucida acerca dos critérios de desempenho e dos requisitos comuns. Refere-nos que quando uma substância é confirmada através da cromatografia, deve obter-se apenas um pico, cujo incremento na altura (ou área) deverá ser equivalente à quantidade de substância a analisar adicionada. No caso da cromatografia líquida, a largura do pico a metade da sua altura máxima deverá estar compreendida entre 90 % e 110 % da largura inicial, e os tempos de retenção deverão ser idênticos, com um desvio de 5 %.

Relativamente às curvas de calibração, quando estas são usadas para a quantificação, deve ter-se em conta que:

- Na construção da curva devem usar-se, pelo menos, cinco níveis, incluindo o zero;
- Deve descrever-se o intervalo de trabalho da curva de calibração;
- Deve indicar-se a equação da curva;
- Devem mencionar-se os intervalos de aceitabilidade dos parâmetros da curva – limites de deteção e quantificação.

De salientar que, sempre que seja necessária uma calibração em série baseada numa solução padrão, devem indicar-se intervalos aceitáveis para os parâmetros da curva de calibração, os quais podem variar em cada série.

Neste sentido, para que a validação desta metodologia seja possível, é necessário que se verifiquem pré-requisitos dos equipamentos a serem usados, bem como alguns parâmetros que se enumeram de seguida:

A. Reprodutibilidade do Sistema

- B. Especificidade / Seletividade
- C. Exatidão
 - C.1. Veracidade ou Recuperação
 - C.2. Precisão
- D. Linearidade / Sensibilidade
- E. Limite de Detecção
- F. Limite de Quantificação
- G. Amplitude
- H. Estabilidade

A. Reprodutibilidade do Sistema

Destacamos este pré-requisito porque está principalmente relacionado com o equipamento utilizado e com a metodologia em si. Este tem como objetivo verificar se o equipamento, nas mesmas condições e com as mesmas amostras, apresenta valores concordantes.

Para a avaliação deste pré-requisito, seleciona-se uma diluição dos compostos a ser testados, repete-se a leitura da diluição selecionada e calcula-se o coeficiente de variação (CV) dos valores obtidos. Para esta determinação utiliza-se a equação seguinte e o resultado obtido deve ser menor que 10%, para concentrações próximas de 1 mg kg⁻¹ (JOCE, 2002).

(1)

$$CV(\%) = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{média}} \times 100$$

B. Especificidade / Seletividade

A especificidade de um método é a capacidade do mesmo distinguir a substância a analisar de outras substâncias. Esta característica depende, essencialmente, do tipo de detetor utilizado, mas também varia de acordo com o tipo de composto ou de matriz. A presença de uma dada substância deve ser determinada mesmo que estejam também presentes impurezas, componentes da matriz ou mesmo produtos de alguma degradação. Para tal, é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos e estruturas relacionadas que podem estar presentes.

Os termos especificidade e seletividade são muitas vezes utilizados indistintamente. No entanto, podemos indicar de uma forma simples que um método que produz uma resposta para apenas um analito é considerado específico, já um método que produz respostas para vários analitos, mas que consegue distinguir a resposta de um analito relativamente a outros, é considerado seletivo.

No que diz respeito à determinação da especificidade de um método, deve estimar-se em que medida a mesma é possível. Devem usar-se estratégias para ultrapassar qualquer interferência previsível de outras substâncias, como por exemplo isómeros, metabolitos, produtos de degradação, substâncias endógenas ou componentes da matriz.

Assim, deve realizar-se a comparação de amostras com ensaios em branco e com outras amostras semelhantes. Desta forma, será possível verificar quais os possíveis interferentes suscetíveis de produzir efeitos nos resultados esperados.

C. Exatidão

A exatidão de um método analítico é o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite. Este parâmetro é determinado através da precisão e da veracidade (JOCE, 2002).

C.1 Precisão

A precisão é o grau de concordância entre resultados de ensaios independentes, repetições de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, obtidos em condições específicas (pré-estabelecidas). É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetibilidade e a reprodutibilidade, sendo normalmente expressas em termos de incerteza.

Para verificar este parâmetro comparam-se as áreas das amostras fortificadas calculando o respetivo coeficiente de variação. Espera-se que o coeficiente de variação obtido seja menor que 10%.

C.2 Veracidade / Recuperação

A veracidade é o grau de concordância entre o valor médio de uma longa série de resultados de ensaios e um valor de referência aceite. A veracidade é geralmente expressa como o desvio sistemático ou enviesamento e só pode ser estabelecida através de um Material de Referência Certificado (MRC).

Quando não existe um MRC, a opção passa pela realização de testes de recuperação. Neste sentido, a determinação de recuperações é realizada através de experiências com uma matriz em branco fortificada, sendo a recuperação calculada da seguinte forma:

(2)

$$\text{Recuperação} = 100 \times \frac{\text{teor medido}}{\text{nível de fortificação}}$$

De salientar que, ao contrário da substância a analisar, o elemento adicionado não se encontra ligado quimicamente à matriz real e, neste sentido, os resultados obtidos com este método são menos fiáveis que os resultados da utilização de um MRC. Os dados relativos à recuperação, obtidos através da aplicação da equação da figura 12, só são aceitáveis se se encontrarem entre os 70 e os 120% (SANCO, 2007).

D. Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método analítico demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Para esta quantificação é necessário que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. Este parâmetro pode ser representado pela equação da reta $y = mx + b$.

Em que:

y = resposta medida

m = declive da reta

x = concentração do analito

b = interseção com o eixo das ordenadas (dos yy)

Após a realização da reta de calibração para cada padrão, avalia-se a correlação da linearidade dos valores obtidos e, para tal, determina-se o coeficiente de correlação (r^2). Este coeficiente de correlação é utilizado para avaliar a adequação da representação do modelo matemático expresso pela equação de cada reta.

Assim, a linearidade da curva de calibração é determinada pela determinação deste coeficiente, que deverá ser superior ou igual a 0,99 e também pela verificação dos desvios dos valores obtidos, que deverá ser inferior a 10%. Do mesmo modo, deverá ser verificada a passagem da reta pela origem, ou seja, b não deverá ser diferente de 0 (zero).

E. Limite de Detecção

O limite de deteção (LD) é a concentração mínima do analito presente numa amostra que pode ser detetada, mas não necessariamente quantificada pelo método (Ribani *et al.*, 2004). Mede e declara com 95% ou 99% de confiança que a concentração do analito é maior que zero. Desta forma, este limite é detetado através da análise de uma solução contendo o composto que se pretende detetar e, posteriormente, recorrendo a fórmulas como as descritas no ponto F, relativo ao limite de quantificação.

F. Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) de um método é a menor quantidade do analito numa amostra que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão, sob as condições experimentais estabelecidas. Na prática, deve usar-se o LQ como início da zona em que se reportam valores numéricos, pois corresponde ao início da gama em que o coeficiente de variação do sinal e o erro relativo se reduziram a valores razoáveis, por norma 10%, para que se possa realizar uma avaliação quantitativa (IPAC, 2011).

Tendo em conta as definições de ambos os limites, no caso de amostras abaixo ou próximas do LQ, o primeiro padrão de calibração deve ser igual ou próximo ao LQ.

Para estimar estes limites existem três métodos

a) Experimentalmente, a partir da razão sinal/ruído instrumental:

$$(3) \quad LD = \frac{y_0 + 3,3s_{y_0}}{\text{declive}} \quad \text{e} \quad LQ = \frac{y_0 + 10s_{y_0}}{\text{declive}}$$

Nestas equações, y_0 é o valor médio do sinal (ruído) e s_{y_0} é o desvio padrão do sinal (ruído).

b) Experimentalmente, a partir de uma série de ensaios com um branco representativo (ou um padrão de baixa concentração, caso o branco não tenha flutuação significativa) e calculando a respectiva média e desvio-padrão.

Neste caso, recomenda-se que sejam usados brancos independentes para obter esta estimativa.

c) Teoricamente, a partir da estatística de mínimos quadráticos da reta de calibração, admitindo-se que o desvio-padrão da estimativa ($S_{y/x}$) representa o desvio-padrão do branco e interpolando o correspondente valor em concentração obtém-se:

(4)

$$LD = \frac{3,3s_{y0}}{\text{declive}} \quad \text{e} \quad LQ = \frac{10s_{y0}}{\text{declive}}$$

$$\text{sendo} \quad s_0 \approx S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_{\text{teórico}} - y_{\text{experimental}})^2}{n-2}}$$

Apesar da opção c) ser a recomendada e ter sido a utilizada, este método, no entanto, pode conduzir a valores irrealistas caso não haja homogeneidade de variâncias ou não haja linearidade até à origem, ou seja, caso não se exclua branco da curva de calibração.

Em qualquer caso, o LQ e o LD são referentes à variável medida, pelo que deverão ser tidas em conta as diluições efetuadas nas amostras.

Deve também ser verificado experimentalmente o valor estimado para o LQ obtido por cálculo teórico. Normalmente, o coeficiente de variação e o erro relativo médio neste ponto são na ordem dos 10%, podendo, no entanto, estes valores variar (e ser superiores a 10%) conforme as metodologias analíticas e os parâmetros a determinar (nomeadamente na análise de microelementos e de vestígios). Salienta-se que as incertezas associadas devem ser coerentes com os valores destes parâmetros estatísticos.

Dado que o LQ e o LD dependem de vários fatores que variam no tempo, como por exemplo contaminações, tipo de amostra, equipamento ou operador, eles devem ser reavaliados sempre que haja variação de equipamento, de pessoal ou de critérios, quando se trabalha na gama baixa. Como precaução, o laboratório pode adotar o uso de um valor “típico” de LQ majorado por excesso.

Ainda no que respeita a estes dois últimos pontos, o intervalo entre o LD e o LQ deve ser entendido como uma zona de deteção semi-quantitativa e não quantitativa, pelo que não se devem reportar valores numéricos neste intervalo.

G. Amplitude

A amplitude corresponde à gama de trabalho que será utilizada para a determinação que se pretende. Pode definir-se a amplitude ou o intervalo do método analítico como a faixa do maior ao menor nível que possa ser determinado com precisão e exatidão, usando a linearidade. Por norma, os analistas seguem um caminho inverso. Em primeiro lugar, selecionam o intervalo de trabalho, tendo como base o nível de concentração do composto que pretendem estudar e, de seguida, determinam se a relação entre o sinal obtido versus a concentração é linear.

Esta verificação foi realizada mediante a análise dos valores obtidos no primeiro ensaio.

H. Estabilidade

Deve assegurar-se que todos os reagentes, em especial, os padrões utilizados para a validação desta metodologia apresentam estabilidade de acordo com a qualidade exigida. É importante que os produtos adquiridos sejam de qualidade, mas não menos importante são os cuidados com o manuseamento e o acondicionamento dos mesmos.

Quando falamos em condições de armazenamento, destaca-se a importância da temperatura e esta deve estar de acordo com a indicada em cada produto. Do mesmo modo, a preparação das soluções também deve ser realizada tendo em conta uma correta junção de reagentes e corretas metodologias.

Não obstante, durante o acondicionamento é importante que se mantenha uma avaliação permanente da qualidade do produto, para que aquando da ocorrência de possíveis alterações, as mesmas sejam facilmente perceptíveis e permitam aferir o intervalo de tempo que pode ser indicado como o período estável do mesmo.

Assim, para que seja possível indicar a estabilidade de um produto são realizados testes às amostras de trabalho ao longo do tempo, considerando estáveis as amostras que apresentem um desvio inferior a 5%.

2. Material e Métodos

2.1 Caracterização das Amostras

As cultivares de melancia analisadas neste trabalho são comercializadas pela empresa “Hortas d’Idanha”. A sua proveniência é o Ladoeiro e as cinco cultivares selecionadas para este estudo foram as seguintes:

- ➔ Augusta (A)
- ➔ Crimson Sweet (CS)
- ➔ Crimstar (C)
- ➔ Romeria (R)
- ➔ Romalinda (RM)

Relativamente à colheita dos frutos na campanha de 2012, a mesma ocorreu no período compreendido entre 13/07 a 27/08, em seis datas distintas, tal como representado na Tabela 8.

Tabela 8 - Datas de colheita das cinco cultivares de melancia estudadas.

Cultivar	Data de Colheita					
	13-07	18-07	08-08	20-08	22-08	27-08
Crimson Sweet	X	X	X	X	X	
Augusta	X	X	X	X	X	
Crimstar	X	X	X	X		
Romeria			X	X	X	
Romalinda				X	X	X

2.2 Preparação Inicial da Amostra

Em todas as datas de receção dos frutos, prepararam-se de forma cuidada todas as melancias para as análises a que seriam sujeitas.

Inicialmente as melancias foram individualmente caracterizadas relativamente à cultivar a que pertenciam, à sua textura, ao seu peso e dimensão, ao seu teor de sólidos solúveis totais ou ainda relativamente à sua cor.

Prepararam-se ainda, para posterior análise, amostras que foram utilizadas no presente estudo para as determinações de compostos fenólicos. Enumeram-se, de seguida, todas as etapas desta preparação de amostras:

- Identificação e caracterização de cada melancia;
- Corte longitudinal do fruto;
- Divisão de cada metade em 4 zonas: pedúnculo, periferia, apical e central;
- Cada um das zonas foi separadamente triturada após retiradas as sementes;
- O sumo da melancia obtido de cada zona foi reservado em sacos plásticos;
- Congelação das amostras a -80°C;
- Conservação das amostras a -20°C.

2.3 Quantificação dos fenóis totais

O método de análise para esta quantificação foi baseado no procedimento descrito por Tlili *et al.* (2011), tendo sido adaptado tendo em conta o objetivo proposto e os resultados obtidos durante a optimização.

2.3.1 Equipamentos e materiais

- Centrifugadora refrigerada Biofuge Primo R (Heareus-Thermo Scientific)
- Espectrofotómetro UV-Vis (GBC – Cintra 202) (Figura 16)
- Software: Cintral

2.3.2 Reagentes

- Ácido gálico monohidratado (Fluka);
- Carbonato de sódio a 7 % (Merck);
- Metanol (Prolabo);
- Reagente de Folin-Ciocalteau (Merck);
- Gelo.

2.3.3 Preparação dos padrões

- Preparação da solução-mãe de ácido gálico, em metanol, com uma concentração de 500 mg L⁻¹ (C_i);
- Preparação das sete soluções de calibração de acordo com a Tabela 9, sabendo que o volume final de cada um é também completado com metanol;

Tabela 9 - Preparação dos padrões de calibração.

Solução	V_i (mL)	V_f (mL)	C_f (mg ácido gálico L⁻¹)
Ácido gálico 1 (branco)	0	10	0
Ácido gálico 2	0,5	10	25
Ácido gálico 3	1	10	50
Ácido gálico 4	2	10	100
Ácido gálico 5	3	10	150
Ácido gálico 6	4	10	200
Ácido gálico 7	5	10	250

- A quantificação a realizar de seguida está de acordo com o descrito no ponto 2.3.4 - b) posteriormente descrito.

No final, pretende-se que a reta de calibração apresente um coeficiente de correlação (R²) superior a 0,98, mantendo-se válida cerca de 15 dias, desde que os reagentes utilizados sejam os mesmos.

2.3.4 Procedimento Analítico

a) Preparação da amostra e extração dos compostos

A amostra de melancia previamente triturada que se pretende analisar é retirada, no dia anterior à análise, de uma temperatura de -20°C para 4°C, de modo a sofrer um processo de descongelamento gradual. Para que ocorra a extração dos compostos que se pretendem analisar, uma quantidade conhecida de melancia é dissolvida em metanol, permanecendo durante 24 horas na ausência de luz.

b) Quantificação

Caso não exista uma reta de calibração válida, é necessário efetuar uma nova calibração antes de quantificar as amostras. Utilizam-se os padrões já descritos no ponto 2.3.3 que são quantificados da mesma forma que os extratos. O procedimento para tal está descrito tendo em conta os ensaios em branco e as amostras a analisar.

Para cada série de amostras, prepara-se um branco constituído por:

- 500 µL de metanol;
- 2 mL de água ultrapura;
- 500 µL de reagente Folin-Ciocalteu;
- 5 mL de carbonato de sódio a 7% , perfazendo o volume a 12 mL com água ultrapura.

Para as amostras, a preparação é constituída por 500 µL de extrato metanólico e a restante preparação segue a mesma sequência do ensaio em branco anteriormente descrito.

A partir desta fase, o procedimento a ter é o mesmo para todas as soluções, as amostras e o branco. O mesmo passa pela:

- agitação durante cerca de 10 segundos;
- repouso na ausência da luz, durante 150 minutos;
- centrifugação, durante 5 minutos a 2500 rpm e à temperatura ambiente.

A leitura das absorvâncias é realizada a 760 nm. No entanto, ainda é necessário proceder à correção do valor do teor de fenóis, tendo em conta a massa que efetivamente foi pesada para cada determinação. Assim, para o cálculo da concentração de fenóis totais é aplicada a seguinte equação:

(5)

$$\text{Teor de fenóis totais (mg ácido gálico anidro/kg fruta)} = \frac{C_{\text{lida}}}{m_{\text{amostra}}} \times 10$$

Em que:

C_{lida} - Concentração da amostra lida (mg ácido gálico anidro L⁻¹);

m_{amostra} - Massa da amostra (g).

Os resultados obtidos são expressos em mg de ácido gálico kg⁻¹ de fruta.

2.4 Identificação e quantificação do perfil de compostos fenólicos por HPLC-DAD

O método de análise para esta quantificação foi baseado no procedimento descrito por Yao *et al.* (2004), tendo sido adaptado tendo em conta o objetivo proposto e os resultados obtidos durante a optimização.

2.4.1 Equipamentos e materiais

- Sistema HPLC (Dionex – Ultimate 3000) (Figura 17)
- Detetor DAD (Dionex – DAD 3000RS) (Figura 17)
- Coluna Restek Pinnacle Ultra C18 (250 mm x 4,6 mm i.d. x 5 µm)
- Membrana de nylon, 0,22 µm, 25 mm de Ø
- Software: Chromeleon.

2.4.2 Reagentes

- Ácido Fórmico a 0,1% (Merck);
- Acetonitrilo (Merck);
- Metanol para HPLC (Prolabo).

Além dos enumerados, utilizaram-se também os padrões, cuja identificação está representada na Tabela 10.

Relativamente aos compostos utilizados, podemos verificar no Anexo A uma caracterização mais detalhada de cada um.

Tabela 10 - Identificação dos compostos utilizados como padrões.

Composto	Marca	CAS	Pureza
Ácido Gálico	Sigma- Aldrich	5995-86-8	≥99% (HPLC)
Ácido Protocatecuico	Sigma- Aldrich	99-50-3	≥ 97 %
Ácido Clorogénico	Sigma- Aldrich	327-97-9	≥ 95 %
Campeferol	Sigma- Aldrich	520-18-3	≥ 97 % HPLC
Apigenina	Sigma- Aldrich	520-36-5	95.4 %
Luteolina	Extrasynthese	491-70-3	> 90%
Ácido Gentísico	Extrasynthese	490-79-9	> 90%
Tirosol	Aldrich	501-94-0	98 %
Ácido Cafeico	Sigma- Aldrich	331-39-5	≥ 98 % HPLC
Ácido Siríntrico	Acros	530-57-4	97 %
Ácido Vanílico	Fluka	121-34-6	≥ 97 % HPLC
Ácido Ferúlico	Fluka	531-98-4	≥ 99 % HPLC
Ácido o-cumárico	Aldrich	614-60-8	97 %

2.4.3 Método cromatográfico

- a) Fases Móveis (Eluentes)

Eluente A: Acetonitrilo

Eluente B: Ácido Fórmico a 0,1 %

b) Descrição do Método

Condições operacionais utilizadas no HPLC:

- Coluna a 35°C;
- Detetor: 200 a 600 nm, com os canais selecionados a 280 nm, 310 nm e 340 nm;
- Temperatura do amostrador: 5°C;
- Fluxo de 1,2 mL.min⁻¹;
- Volume injetado: 20 µL;
- Gradiente linear de eluição: Inicia-se com 4% de eluente A, aos 30 minutos atinge os 18% e aos 45 minutos 50% do mesmo eluente. Aos 47 minutos apresenta 100% de eluente A, mantendo este valor até aos 50 minutos. Aos 55 minutos retoma o valor inicial de 4% de eluente A mantendo-o até aos 65 minutos;
- Tempo total de eluição: 65 minutos.

c) Quantificação

A leitura das absorvâncias foi realizada em três comprimentos de onda diferentes: 280nm, 310nm e 340nm (Yao *et al.*, 2004).

Assim, para esta quantificação utilizaram-se as áreas dos picos no comprimento de onda definido para cada composto, definiram-se as respetivas retas de calibração e estabeleceu-se a verificação com as áreas dos picos dos padrões injetados.

2.4.4 Calibração - Preparação das soluções-mãe dos padrões

A solução-mãe de cada padrão é preparada de acordo com a Tabela 11. Pesam-se as massas indicadas para cada um (m_{pesada}), o volume final é completado com metanol até ao volume pretendido para cada caso e obtém-se uma concentração final (C_f) para cada padrão.

A Tabela 11 expressa as concentrações que são obtidas em cada caso.

Tabela 11 - Concentração das solução-mãe de cada padrão.

Padrão	$m_{\text{a pesar}}$ (mg)	V_f (ml)	C_f (mg L⁻¹)
Ácido Gálico	25,0	50,0	500,0
Ácido Protocatecuico	25,0	50,0	500,0
Ácido Clorogénico	25,0	50,0	500,0
Campeferol	10,0	50,0	200,0
Apigenina	10,0	50,0	200,0
Luteolina	25,0	50,0	500,0
Ácido Gentísico	25,0	50,0	500,0
Tirosol	5,0	100,0	50,0
Ácido Cafeico	5,0	100,0	50,0
Ácido Siríntrico	0,15	10,0	15,0
Ácido Vanílico	5,0	100,0	50,0
Ácido Ferúlico	5,0	100,0	50,0
Ácido o-cumárico	5,0	100,0	50,0

No final da preparação, todas as soluções devem ser conservadas no frio de acordo com as indicações de cada fornecedor.

2.4.5 Preparação das soluções para a reta de calibração

A mistura dos padrões preparada a partir das respectivas soluções-mãe é designada por solução PF8 e a sua composição está representada na Tabela 12. O volume final (V_f) de 50 ml é obtido perfazendo a solução com água ultrapura.

Tabela 12 - Preparação da solução PF8 e respetiva concentração final de cada um dos padrões.

Composto	V_i (ml)	V_f (ml)	C_{final} (mg L ⁻¹)
Ácido Gálico	1,0	50	10,0
Ácido Protocatecuico	1,0		10,0
Ácido Clorogénico	0,5		5,0
Campeferol	3,0		12,0
Apigenina	1,0		4,0
Luteolina	1,0		10,0
Ácido Gentísico	1,0		10,0
Tirosol	3,0		3,0
Ácido Cafeico	1,0		1,0
Ácido Sirínico	3,0		0,9
Ácido Vanílico	2,0		2,0
Ácido Ferúlico	2,0		2,0
Ácido o-cumárico	2,0		2,0

A partir desta solução PF8 são então realizadas as respetivas diluições, sendo obtidos no final seis níveis de concentrações. Estas diluições são também preparadas com água ultrapura e na Tabela 13 pode verificar-se o volume inicial (V_i) e final (V_f) de cada uma delas.

Tabela 13 - Preparação das soluções-padrão a partir da solução PF8.

Diluições	V_i (mL)	V_f (mL)
PF3	1	10
PF4	2	10
PF5	4	10
PF6	6	10
PF7	8	10

Para o cálculo das concentrações finais, além das massas e volumes de diluições, também foi tido em conta o grau de pureza e humidade dos padrões.

2.4.6 Preparação das amostras

À semelhança do procedimento para a determinação dos fenóis totais, a amostra de melancia previamente triturada que se pretende analisar é retirada, no dia anterior à análise, de uma temperatura de -20°C para 4°C , de modo a sofrer um processo de descongelamento gradual.

De seguida, é realizada uma filtração (membrana de nylon) de cerca de 1 mL da amostra da melancia para um vial.

2.4.7 Sequência de trabalho

A sequência de trabalho definida para esta metodologia compreende diferentes etapas com objetivos distintos.

- a. Em primeiro lugar, realizam-se duas eluições em branco, de maneira a proporcionar a estabilização do sistema;
- b. De seguida, faz-se correr uma série de cinco repetições da diluição PF3, possibilitando a verificação da reprodutibilidade/adequabilidade do sistema;
- c. Posteriormente, realiza-se a calibração do sistema injetando em duplicado todas as diluições preparadas de acordo com o ponto 2.4.5, da mais diluída à mais concentrada;
- d. No seguimento desta ordem, após cada sequência de dez amostras, é injetado um branco seguido de um padrão de controlo, por norma o segundo padrão mais baixo utilizado na reta de calibração;
- e. Após a calibração, seguem-se as amostras de melancia que se pretendem analisar.

2.5 Validação da metodologia

Relativamente à validação da metodologia foram testados todos os parâmetros já descritos na introdução a esta fase do estudo.

Na Tabela 14, para cada um dos parâmetros definidos, bem como para o pré-requisito considerado, é indicada a forma como é concretizada cada avaliação, sendo que a mesma é repetida em três dias diferentes consecutivos, e também o critério de aceitação para cada um deles.

Tabela 14 - Avaliação dos parâmetros e pré-requisito de validação.

Parâmetro	Como avaliar?	Critérios de aceitação
Reprodutibilidade do sistema	Repetição da diluição PF3 (cinco vezes)	CV < 10%
Especificidade/ Seletividade	Comparação entre amostras com os brancos e com amostras fortificadas	- Comparação espectros
Exatidão - Precisão	Comparação das áreas das amostras fortificadas	CV < 10%
Exatidão - Recuperação	Fortificação de amostras, com quantidades conhecidas da solução PF8	70% < Recuperação < 120%
Linearidade/ Sensibilidade	Medição dos seis níveis de concentração, construção do gráfico com a reta de calibração correspondente a cada composto e determinação do coeficiente de correlação para cada caso	$r^2 \geq 0,99$ Desvio < 10% b não $\neq 0$
Limite de Detecção e de Quantificação	Aplicação das fórmulas indicadas para o efeito, de acordo com os valores obtidos	-
Amplitude	Análise dos resultados obtidos no 1º ensaio	-
Estabilidade	Teste a amostras de trabalho armazenadas ao longo do tempo	Desvio < 5%

Apesar de a mesma sequência de trabalho ser utilizada para a determinação de vários parâmetros, cada um deles foi avaliado distintamente. Assim, a programação realizada para esta etapa é a que se encontra descrita de seguida.

- 1º Ensaio

Este primeiro ensaio teve como principal objetivo a seleção da gama de trabalho, ou seja, a amplitude do método a ser validado. Neste ensaio prepararam-se diluições a partir da solução PF8, com diferentes concentrações para os diferentes padrões que variaram entre os 0,9 e os 10,0 mg L⁻¹.

Assim, os parâmetros avaliados desde logo são os seguintes:

- Reprodutibilidade do sistema
- Especificidade

- c. Linearidade
- d. Limite de Detecção e de Quantificação
- e. Amplitude

- 2º, 3º e 4º Ensaio

Após a determinação da gama de trabalho todos os ensaios realizados mantiveram sempre a amplitude selecionada no 1º ensaio. Neste sentido, definiu-se uma sequência de trabalho que foi repetida nos três ensaios seguintes, portanto, no segundo, terceiro e quarto ensaios.

Importa referir que as diluições a partir das soluções-mãe foram preparadas de novo por cada ensaio realizado e as condições do método mantiveram-se sempre as mesmas em cada um deles.

Neste conjunto de ensaios, à exceção da amplitude e além dos parâmetros já avaliados no 1º ensaio são considerados ainda:

- a. Precisão
- b. Recuperação
- c. Estabilidade

3. Resultados e Discussão

3.1 Fenóis totais

Os resultados obtidos nesta quantificação foram determinados mediante a fórmula (5).

Em primeiro lugar, foram agrupados por zonas: pedúnculo, periferia, apical e central. Posteriormente, agruparam-se os valores das diferentes datas de colheita e, dentro da mesma data, distinguiram-se as diferentes cultivares (Figura 13).

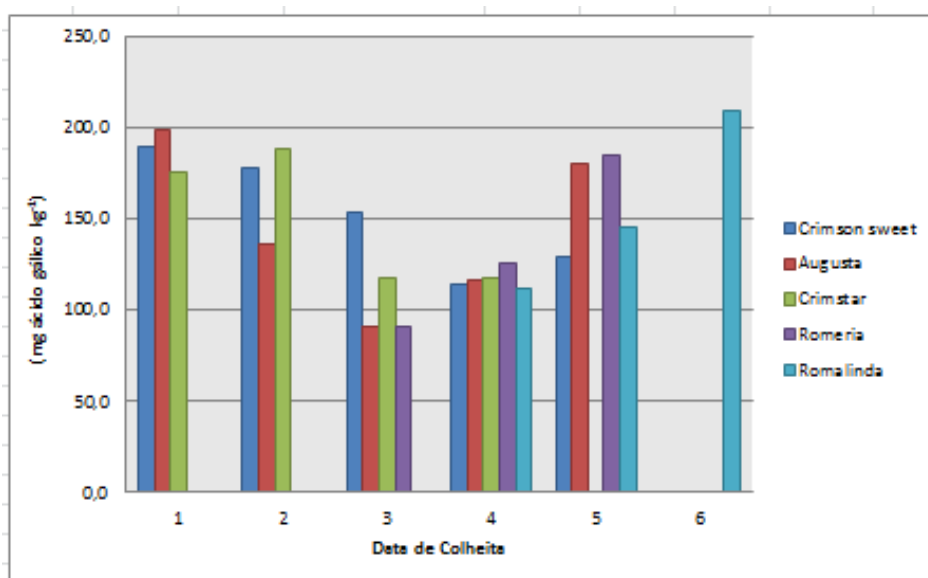


Figura 13 - Fenóis totais das cinco cultivares em diferentes momentos de colheita - zona central.

Para avaliar os valores obtidos, é necessário ter em conta que não foi realizado qualquer controlo ao estado de maturação das melancias. Inicialmente definiu-se um critério de aceitação para as mesmas em termos de sólidos solúveis totais considerando que deveriam conter, no mínimo, 8 °Brix, parâmetro este avaliado num outro estudo desenvolvido também no âmbito deste mesmo projeto, como já havia sido referido.

Na Figura 13 apresentam-se os resultados apenas para a zona central, onde foram obtidos valores de fenóis totais mais elevados. A partir da leitura dos valores, em termos médios, é a cultivar Romalinda que apresenta teores superiores de fenóis totais, seguida pela Crimson sweet, pela Crimstar, Augusta e, por fim, pela cultivar Romeria. De qualquer modo e segundo a análise de variância (ANOVA) realizada, estes valores estatisticamente não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$).

De acordo com a bibliografia e em comparação com outros frutos, os valores de fenóis totais na melancia são, de um modo geral, inferiores. No entanto e tal como já havia sido abordado, o facto de a melancia ser consumida em grandes quantidades, faz com que, mesmo sendo menos rica em compostos fenólicos, forneça maiores quantidades dos mesmos (Vinson *et al.*, 2001).

3.2 Seleção das amostras a analisar

A seleção das amostras a analisar, de acordo com o que se pretendia, também foi realizada de forma cuidada. Para os ensaios de validação, nomeadamente para os testes de recuperação, as melancias selecionadas foram as que apresentavam menores teores de fenóis totais.

Para a quantificação do perfil de compostos fenólicos, de um total de sessenta e cinco melancias foram selecionadas vinte e cinco. Esta seleção teve como base os resultados obtidos na determinação dos fenóis totais, mas também dos sólidos solúveis totais (SST). A determinação dos SST está também incluída no âmbito deste projeto, sendo desenvolvida num outro estudo. Neste sentido, as vinte e cinco melancias selecionadas foram as que apresentaram teores elevados, mas tendo atenção para não selecionar valores anormalmente elevados, em ambas as determinações. Para o perfil de compostos fenólicos por HPLC-DAD, a zona da melancia que foi avaliada foi a central, uma vez que, tal como já havia sido indicado, é a que apresenta valores de fenóis totais superiores relativamente às restantes.

3.3 Perfil de compostos fenólicos por HPLC-DAD

3.3.1 Desenvolvimento da metodologia

Para a otimização desta metodologia foram efetuados vários procedimentos que serão descritos neste capítulo.

a) Ajustes de gradiente

Neste âmbito, foram testados diferentes tempos de eluição e diferentes gradientes.

Uma das programações realizadas era composta por um aumento de acetonitrilo mais acentuado ao longo do tempo, não permitindo a separação de alguns compostos, que necessitavam que este aumento fosse realizado mais lentamente no tempo. O grande objetivo destes ajustes era o aumento da resolução dos picos dos compostos testados.

De seguida, apresentam-se dois exemplos dos resultados obtidos com os diferentes ajustes de gradiente, utilizando padrões. Importa referir que os tempos de retenção foram determinados através da injeção de soluções padrão individuais. O primeiro exemplo, a Figura 14, diz respeito a um cromatograma obtido aquando dos testes iniciais para a separação dos compostos, utilizando variações mais bruscas de gradiente. Neste caso, é notória a não separação de dois compostos: o ácido cafeico e o ácido siríngico, exigindo alterações ao nível do método definido para contornar esta questão.

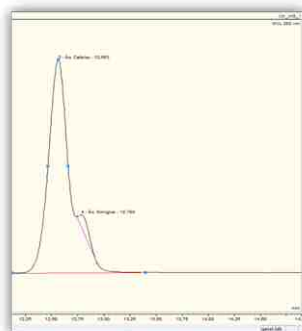


Figura 14 - Cromatograma obtido a partir do gradiente de eluição testado inicialmente.

Surge assim o gradiente que foi descrito já na metodologia deste trabalho e que permitiu a separação de todos os compostos em estudo. A Figura 15 é um dos bons exemplos obtidos com as alterações realizadas. Salienta-se a já conseguida separação entre o ácido cafeico e o ácido siríngico.

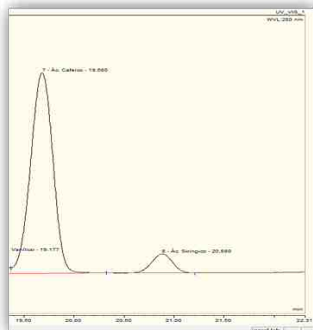


Figura 15 - Cromatograma obtido a partir do gradiente de eluição utilizado neste trabalho.

b) Preparação dos padrões com diferentes solventes

A preparação dos padrões foi também uma das fases deste estudo em que várias tentativas foram realizadas. A preparação das soluções-mãe foi realizada utilizando como solvente o metanol, que de acordo com a literatura solubiliza os compostos em estudo e confere estabilidade às soluções.

Os solventes utilizados para a preparação das soluções a analisar em HPLC deverão ser semelhantes aos eluentes escolhidos para cada metodologia. Como tal, testou-se a utilização de acetonitrilo puro, acetonitrilo a 8%, para que se assemelhasse às condições iniciais da fase móvel, e ainda água ultrapura.

Relativamente ao acetonitrilo puro, os resultados demonstraram que a eficiência da coluna diminuía, como é verificável na Figura 16.

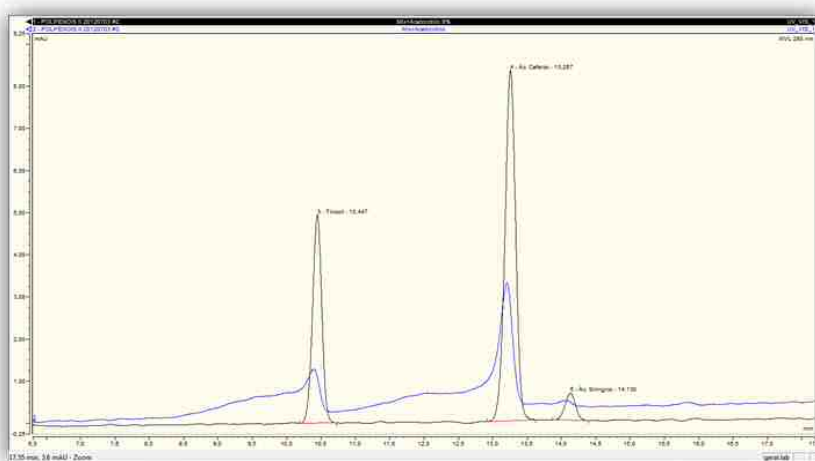


Figura 16 - Comparação dos solventes: acetonitrilo puro (azul) e acetonitrilo a 8% (preto).

Por fim e para evitar a ocorrência de todas estas questões, prepararam-se as soluções de trabalho utilizando como solvente a água ultrapura, tida como a opção mais prática para o pretendido.

c) Leitura em diferentes comprimentos de onda

Segundo a literatura, os comprimentos de onda mais utilizados para a leitura deste tipo de compostos são: 280, 310, 340, 380, 450 e 510 nm (Yao *et al.*, 2004).

Todos eles foram testados nesta metodologia (Figura 17), no entanto, para cada composto foi verificado qual o comprimento de onda onde a absorção era máxima e onde existia também um menor ruído. A partir desta verificação, distinta para cada composto, foi escolhido o comprimento de onda a utilizar para a leitura dos resultados.

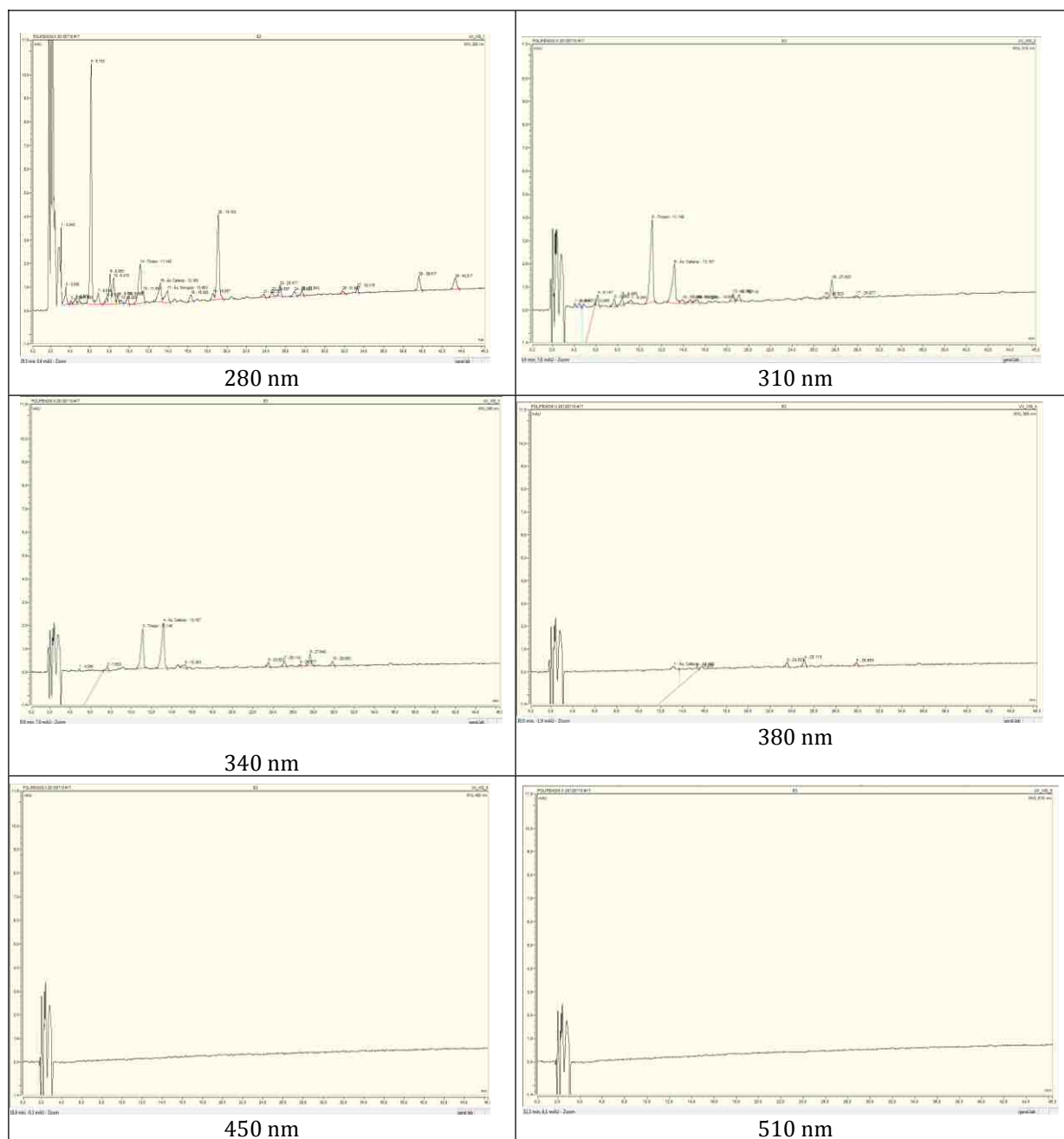


Figura 17 - Cromatogramas obtidos nos diferentes comprimentos de onde testados.

Em conclusão optou-se por escolher três dos comprimentos de onda testados: 280, 310 e 340 nm, uma vez que facilmente se observa que a partir dos 340 nm os cromatogramas obtidos são limpos, sem deteção de compostos (Sakakibara *et al.*, 2002).

Segundo o apurado nestas tentativas, podemos assinalar que o comprimento de onda de 280 nm será o adequado para os ácidos hidroxibenzoicos, 310 nm para os ácidos hidroxicinâmicos, enquanto que 340 nm adequar-se-á à família dos flavonóides. Esta dedução obteve-se a partir da análise do máximo de absorção de cada composto.

d) Diversas formas de preparação de amostra

Para a determinação da forma de preparação das amostras foram realizados diferentes testes: injeção direta do sumo, extração em metanol da amostra liofilizada, *Solid-phase extraction* (SPE) ou ainda a hidrólise ácida dos compostos.

No que concerne à hidrólise ácida, os resultados demonstraram uma clara redução do número de picos com um aumento significativo das áreas dos mesmos, sendo que estes picos também não eram identificados com os padrões utilizados.

Já no que diz respeito à técnica de SPE e extração em metanol da amostra após liofilização, os resultados obtidos foram idênticos entre eles. No entanto, ambos revelaram que estas técnicas, apesar de apresentarem resultados também semelhantes aos da injeção direta do sumo, não apresentam vantagens relativamente a esta última que justificassem os custos.

Posto isto, a forma de preparação da amostra utilizada foi, de entre as possibilidades, a injeção direta do sumo de melancia.

e) Testes com outros alimentos

Outros alimentos, ricos em polifenóis, também foram testados com a técnica de SPE e também com esta metodologia em HPLC, como sendo a romã, a framboesa, a cereja e o mel.

A Figura 18 serve de exemplo para os resultados obtidos nesta experiência com diferentes alimentos. Verifica-se que, apesar da técnica permitir a separação aceitável dos compostos, é necessário confirmar a identificação dos mesmos através dos espectros de absorção.

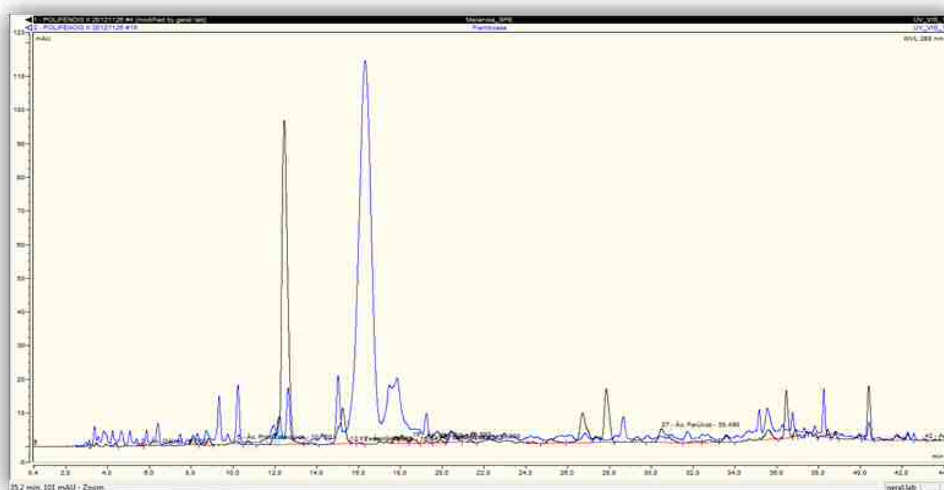


Figura 18 - Comparação de uma amostra de melancia, após preparação com a técnica de SPE (preto) e uma amostra de framboesa (azul).

3.3.2 Validação da metodologia

A. Reprodutibilidade do Sistema

A forma como foi avaliado este pré-requisito do equipamento, isto é, a repetição da diluição PF3, permitiu obter os resultados através da utilização da fórmula indicada para o efeito (1) que são os apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Coeficiente de variação (CV) obtidos nos três dias de ensaios realizados.

	Coeficiente de Variação		
	1º Dia	2º Dia	3º Dia
AGál	0,9%	0,9%	0,9%
AP	0,9%	0,9%	0,9%
Tir	0,9%	0,9%	0,9%
AGen	0,9%	0,9%	0,9%
AClor	0,9%	0,9%	0,9%
AV	9,1%	3,3%	3,4%
ACaf	0,6%	0,6%	0,6%
AS	4,4%	7,2%	7,2%
AF	4,4%	1,2%	2,8%
AO	0,5%	2,8%	2,0%
Lut	5,1%	2,8%	19,2%
Api	3,3%	2,0%	7,0%
Camp	4,4%	2,6%	12,1%

O sistema é reprodutível para todos os compostos, excetuando a luteolina e o campeferol.

Para estes dois compostos os valores do coeficiente de variação no 3º dia estão acima do intervalo aceitável. Esta situação poderá ser justificada pelo facto dos mesmos se degradarem com facilidade, pelo que terá que ter-se em atenção este aspeto na utilização destes padrões.

B. Especificidade / Seletividade

Nesta fase, os resultados obtidos a partir dos testes em branco, da solução PF4, bem como de melancias fortificadas e não fortificadas são apresentados de seguida.

Na Tabela 16 estão apresentados os resultados de todos os valores relativos ao segundo ensaio utilizado para a validação da metodologia. Os ensaios em branco e a solução PF4 foram repetidos três vezes cada um, ao contrário dos ensaios com melancia e melancia fortificada que foram repetidos seis vezes cada um. Os valores apresentados correspondem à média dos resultados obtidos em cada caso. Na mesma tabela é também referido o comprimento de onda escolhido para a leitura dos resultados de cada composto em particular.

Tabela 16 - Comparação de resultados para avaliação da especificidade/seletividade do método. (Área em mAU*minutos e tempo de retenção em minutos).

Composto Fenólico	λ (nm)	Branco		PF 4		Melancia		Melancia Fortificada	
		Tr	Área	Tr	Área	Tr	Área	Tr	Área
AGál	280	--	--	5,51	1,56	5,54	0,03	5,49	1,54
AP	280	--	--	10,25	0,91	10,21	0,03	10,22	0,97
Tir	280	--	--	15,51	1,02	15,30	1,97	15,42	2,66
AGen	340	--	--	15,97	0,60	--	--	15,93	0,66
AClo	310	--	--	16,77	0,70	16,67	0,03	16,74	0,73
AV	280	--	--	19,10	0,18	--	--	19,07	0,19
ACaf	310	--	--	19,58	2,64	19,32	0,02	19,54	2,42
AS	280	--	--	20,80	14,54	--	--	20,76	15,54
AF	310	--	--	30,50	0,50	30,48	0,56	30,46	1,13
AO	340	--	--	36,75	0,23	--	--	36,73	0,24
Lut	340	--	--	40,68	1,84	--	--	40,68	1,85
Api	340	--	--	43,09	0,89	--	--	43,08	0,97
Camp	340	--	--	43,64	1,53	--	--	43,64	1,35

Na leitura destes resultados é importante salientar que a concentração de PF4 corresponde à concentração adicionada na melancia, ou seja, a concentração de fortificação. Como tal, podemos verificar que os valores da área da melancia somados aos valores da área da solução PF4 resultam no valor da área da melancia fortificada.

De acordo com o que era expectável, em todos os ensaios em branco, ensaios estes realizados com água ultrapura, não são detetados compostos fenólicos (Figura 19).

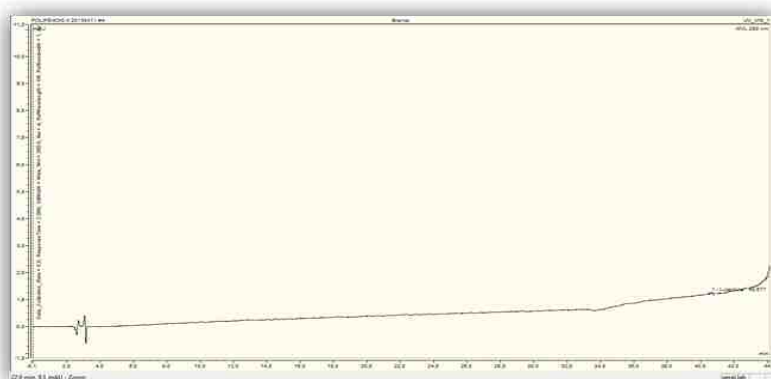


Figura 19 - Cromatograma de um ensaio em branco.

Já a Figura 20 apresenta-nos a sobreposição dos cromatogramas de uma amostra fortificada e uma amostra não fortificada.

A partir da comparação dos mesmos é claramente perceptível a diferença entre ambas. Para a melhor avaliação destes resultados foi necessário recorrer aos espectros de absorção no UV-Vis de composto.

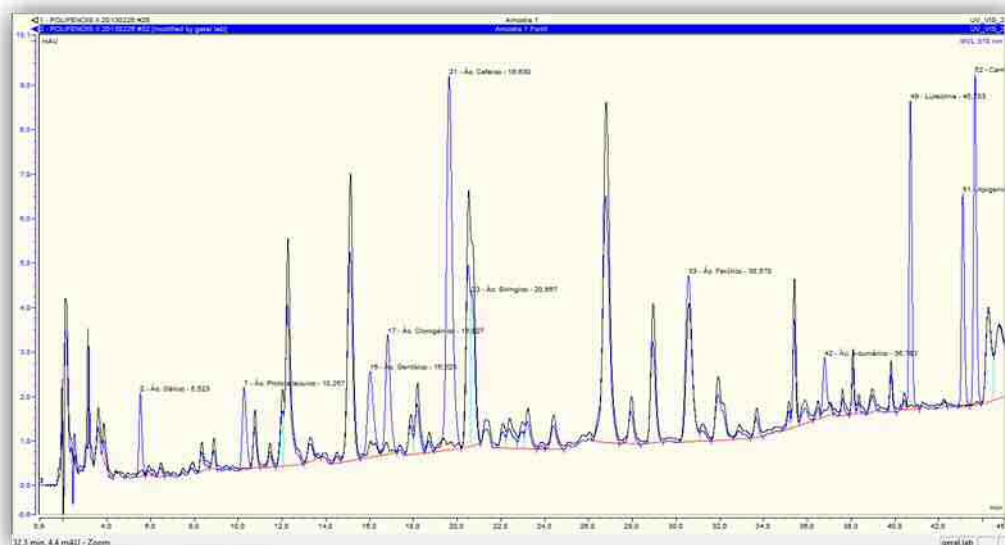


Figura 20 - Cromatogramas de uma das amostras de melancia com fortificação (azul) e sem fortificação (preto).

Na Figura 21 e 22 estão retratados um caso em que o composto é confirmado e outro em que a confirmação não se realiza, através do cromatograma (1 e 1'), do espectro do composto (2 e 2') bem como do *Isoplot* (3 e 3'). Verifica-se que para o ácido siríngico (Figura 21) não se confirma a identificação do composto, pois os espectros (2 e 2') não são coincidentes.

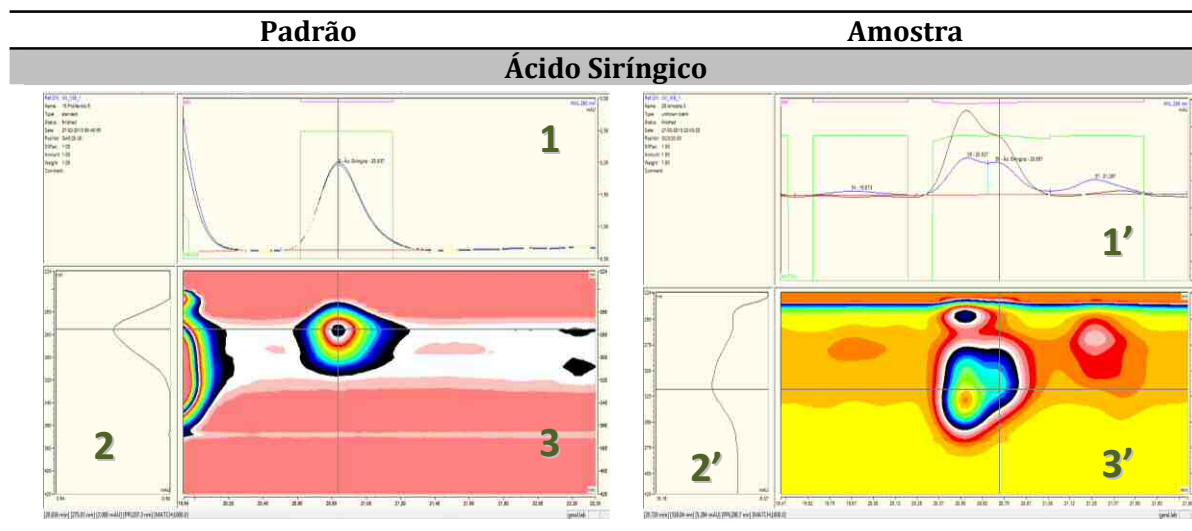


Figura 21 - Cromatogramas, espectros e isoplot do padrão (à esquerda) e de amostras de melancia (à direita) do composto puro - ácido siríngico.

Já para o ácido ferúlico (Figura 22), esta confirmação é positiva, provando-se a presença deste composto.

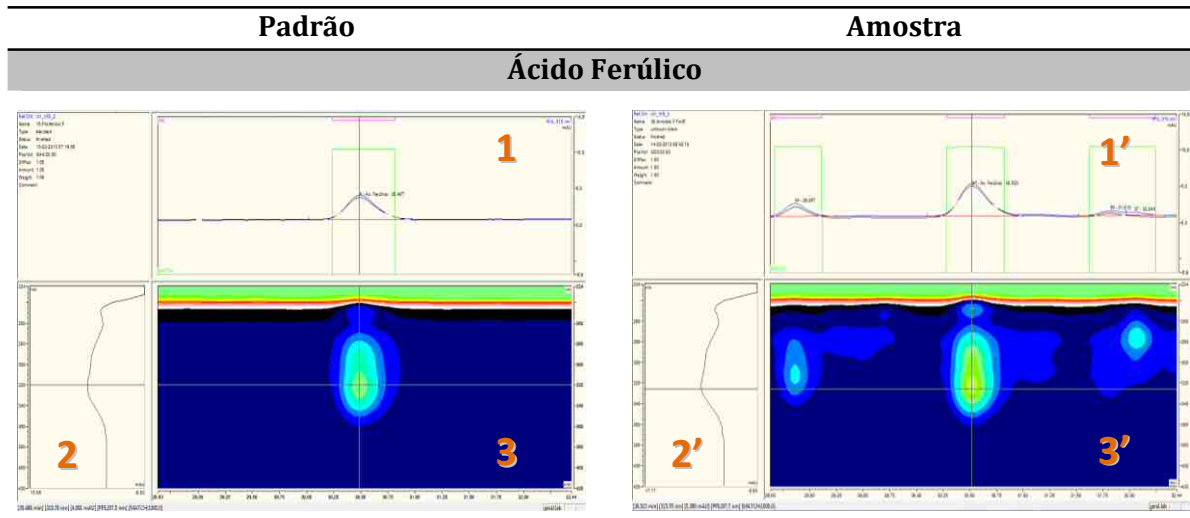


Figura 22 - Cromatogramas, espectros e *isoplot* do padrão (à esquerda) e de amostras de melancia (à direita) do composto puro - ácido ferúlico

Este sistema demonstrou ser seletivo para todos os compostos, à exceção do tirosol e do ácido siríngico. Como tal, a partir desta ilação, os dados destes dois compostos deixarão de ser tratados no decorrer deste trabalho.

C. Exatidão

C.1. Precisão

Para a verificação da precisão da metodologia estipulada, como já foi indicado, procedeu-se à avaliação dos coeficientes de variação obtidos nas seis recuperações realizadas em cada uma das retas, para cada um dos compostos.

Na Tabela 17 são apresentados os valores do coeficiente de variação referidos, que deverá ser, em todos os casos, inferior a 10 %.

Tabela 17 - Coeficientes de variação das recuperações das amostras fortificadas de cada um dos compostos fenólicos nos três dias de ensaio.

		CV		
		1º dia	2º dia	3 dia
% Recuperação	AGál	6,75	3,10	3,14
	AP	1,12	1,52	2,60
	AGen	2,79	2,51	1,33
	AClor	2,57	2,52	1,27
	AV	5,68	2,20	8,03
	ACaf	3,42	2,49	3,33
	AF	6,00	17,07	11,10
	AO	2,18	6,04	2,86
	Lut	2,16	1,79	9,42
	Api	1,79	1,01	3,91
	Camp	8,02	5,57	13,62

De acordo com os valores obtidos verifica-se que, existem apenas dois compostos que apresentam valores que ultrapassam o valor limite definido. Nestes casos a precisão deve ser repetida, preparando-se as fortificações a partir da mesma solução pois as fortificações foram efetuadas em seis amostras diferentes, podendo assim provocar variações no ensaio, como poderá ser o caso do ácido ferúlico. Já o campeferol, tal como será possível assinalar ainda no decorrer deste trabalho, demonstrou ser um composto instável de acordo com a preparação realizada. Neste sentido, esta deverá ser a razão que para a qual o resultado ultrapassou o limite estabelecido.

Assim, o sistema provou ser preciso, com exceção do ácido ferúlico e do campeferol. No caso do ácido ferúlico, deveria ser realizado um novo teste de validação com amostras sem ácido ferúlico, no entanto, tal não foi possível concretizar.

Neste sentido é necessário ter especial cuidado aquando da utilização de ambos os compostos.

C.2. Recuperação

Nesta determinação, é necessário que se avaliem os resultados das recuperações testadas. Como foi já indicado os dados relativos à recuperação só são aceitáveis se se encontrarem num limite estipulado. Assim, neste caso em concreto, pretende-se que a percentagem de recuperação se encontre entre os 70% e os 120%.

Das recuperações indicadas na Tabela 18 o caso mais preocupante é o do ácido vanílico, para o qual existem valores além do intervalo estipulado. Nesta situação, como este composto apresenta um nível de fortificação muito próximo do LQ, leva a que as percentagens de recuperação possam apresentar valores superiores.

Tabela 18 - Comparação das percentagens de recuperações de cada composto fenólico em cada uma das retas realizadas.

		% Recuperação						
		AGál	AP	AGen	AClor	AV	ACaf	
1º Dia	Amostra Fortificada	1	104,2%	102,8%	106,9%	100,2%	107,6%	92,2%
		2	102,6%	104,9%	110,7%	103,8%	99,8%	100,9%
		3	101,5%	104,1%	112,5%	102,1%	109,5%	99,8%
		4	102,9%	101,2%	105,5%	100,7%	96,4%	99,3%
		5	84,6%	103,3%	113,9%	97,1%	111,1%	93,7%
		6	99,2%	102,8%	112,3%	105,1%	112,9%	95,3%
2º Dia	Amostra Fortificada	1	95,7%	109,6%	111,4%	101,0%	127,2%	98,3%
		2	96,3%	108,6%	103,8%	97,2%	121,6%	102,8%
		3	104,5%	108,3%	103,4%	97,1%	126,8%	99,4%
		4	100,0%	112,9%	107,7%	104,2%	128,2%	99,9%
		5	96,5%	111,9%	107,1%	101,5%	128,2%	98,2%
		6	97,8%	110,2%	107,8%	101,5%	122,1%	94,5%
3º Dia	Amostra Fortificada	1	95,2%	113,6%	104,8%	99,2%	131,7%	102,3%
		2	102,3%	117,0%	106,0%	102,5%	118,0%	95,7%
		3	102,1%	118,4%	108,3%	102,7%	132,3%	101,1%
		4	99,2%	116,6%	106,4%	99,9%	109,9%	103,7%
		5	94,4%	123,7%	107,2%	101,5%	107,3%	95,7%
		6	97,3%	119,4%	109,0%	101,9%	120,5%	96,5%

O mesmo acontece na Tabela 19 na qual o ácido ferúlico apresenta algumas percentagens que também não estão de acordo com o intervalo referido, para o qual também não se conseguiu apurar a causa do comportamento.

Tabela 19 - Comparação das percentagens de recuperações de cada composto fenólico em cada uma das retas realizadas (cont.).

		% Recuperação					
		AF	AO	Lut	Api	Camp	
1º Dia	Amostra Fortificada	1	113,4%	103,1%	98,5%	106,1%	93,4%
		2	126,2%	106,0%	99,0%	107,3%	90,6%
		3	134,7%	106,8%	95,5%	102,1%	81,3%
		4	118,6%	102,6%	98,1%	105,0%	92,4%
		5	131,0%	108,7%	92,9%	107,9%	73,8%
		6	119,4%	102,8%	97,2%	104,9%	88,6%
2º Dia	Amostra Fortificada	1	109,6%	98,0%	98,4%	109,9%	86,4%
		2	105,7%	96,7%	97,0%	107,8%	91,7%
		3	113,4%	98,9%	93,7%	108,3%	76,8%
		4	144,0%	97,7%	99,0%	110,5%	88,1%
		5	79,3%	111,9%	97,2%	110,8%	83,5%
		6	109,8%	109,6%	95,8%	109,6%	82,2%
3º Dia	Amostra Fortificada	1	99,0%	109,5%	107,9%	113,2%	106,4%
		2	98,4%	111,3%	111,7%	114,4%	113,1%
		3	99,6%	117,2%	114,6%	116,7%	113,6%
		4	90,8%	117,3%	94,1%	115,1%	88,8%
		5	127,2%	117,9%	90,5%	103,5%	82,6%
		6	105,7%	116,6%	93,4%	115,8%	83,7%

As recuperações obtidas com esta metodologia estão de acordo com o limite definido, à exceção dos casos do ácido vanílico e do ácido ferúlico.

D. Linearidade/Sensibilidade

Nesta avaliação da linearidade/seletividade procedeu-se à regressão linear de cada composto, a partir dos seis pontos testados em cada uma das três retas de calibração.

O que se pretende é que o coeficiente de correlação (r^2) seja maior ou igual a 0,99, que o valor da ordenada na origem (b) não seja diferente de 0 (zero) e que os desvios obtidos sejam inferiores a 10%.

Na Tabela 20 são apresentados os valores detalhados para o ácido ferúlico, verificando-se que todos os critérios aplicados estão em conformidade.

Tabela 20 - Valores do intervalo de b, valores de r^2 e dos desvios associados nas três retas de calibração para o ácido ferúlico.

	1ª reta	2ª reta	3ª reta
	desvio		
PF3	0,0%	-3,6%	-0,6%
PF3	-0,1%	-5,4%	2,6%
PF3	-1,8%	-1,5%	3,9%
PF4	2,0%	-0,4%	3,1%
PF4	1,8%	0,9%	2,5%
PF4	0,8%	-2,4%	2,5%
PF5	0,9%	0,1%	-0,7%
PF5	0,0%	-1,7%	-1,0%
PF5	-0,3%	-2,9%	-2,7%
PF6	-1,1%	1,0%	-1,0%
PF6	-1,9%	2,5%	-0,8%
PF6	-1,1%	2,8%	-1,3%
PF7	0,0%	2,6%	0,2%
PF7	1,2%	2,0%	-0,2%
PF7	0,3%	0,6%	-0,2%
PF8	-0,9%	-2,5%	0,5%
PF8	0,5%	0,0%	0,4%
PF8	0,7%	-2,1%	0,6%
	r^2		
	0,9970	0,9986	0,9997
	b		
	[-0,023 a 0,004]	[-0,008 a 0,050]	[-0,008 a 0,018]

Para cada um dos compostos foram realizadas as três retas de calibração e apresenta-se como exemplo o caso do ácido ferúlico (Figura 23). Os restantes compostos estão presentes no Anexo B e C.

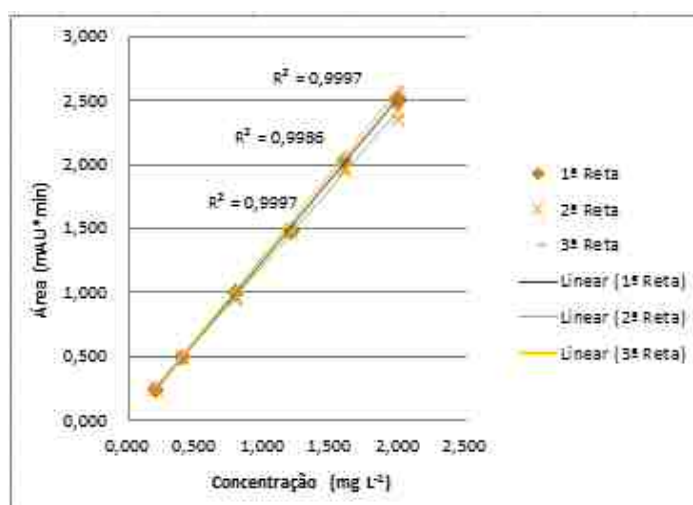


Figura 23 - Retas de calibração obtidas para o ácido ferúlico em três dias para a validação da metodologia.

O sistema é linear/sensível para todos os compostos, cumprindo-se em todos os casos os critérios de aceitação.

E. Limites de Detecção e de Quantificação

A determinação dos limites descritos na Tabela 21 foi realizada recorrendo às fórmulas descritas para este fim (4) e os resultados apresentam-se em termos de concentração (mg L⁻¹).

Estes resultados revelam um grande interesse para a avaliação e a validação da metodologia em causa e para que seja possível confirmar a presença ou a ausência de um dado composto fenólico na melancia.

Tabela 21 - Valores médios de LQ e LD, bem como os erros padrão (S_{xy}) obtidos na execução das três retas de calibração para cada um dos compostos.

	S _{xy}	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
AGál	0,05	0,25	0,75
AP	0,03	0,26	0,80
Tir	0,03	0,07	0,22
AGen	0,02	0,25	0,75
AClor	0,03	0,13	0,42
AV	0,01	0,08	0,25
ACaf	0,14	0,04	0,11
AF	0,02	0,04	0,15
AO	0,01	0,06	0,17
Lut	0,09	0,46	1,01
Api	0,05	0,18	0,44
Camp	0,10	0,66	1,50

F. Amplitude

Neste ponto, importa salientar que a amplitude para cada um dos compostos foi determinada desde o primeiro ensaio.

Nas Tabelas 22 e 23 descreve-se o intervalo de concentrações de cada composto desde o LQ até à solução de concentração mais elevada, a solução PF8.

Tabela 22 - Intervalo de concentração correspondente a cada composto, desde o LQ até à solução PF8.

Composto	[LQ] (mg L ⁻¹)	[PF8] (mg L ⁻¹)
Ácido Gálico	0,75	10,102
Ácido Protocatecuico	0,8	10,597
Ácido Gentísico	0,8	9,162
Ácido Clorogénico	0,42	4,861
Ácido Vanílico	0,3	2,000

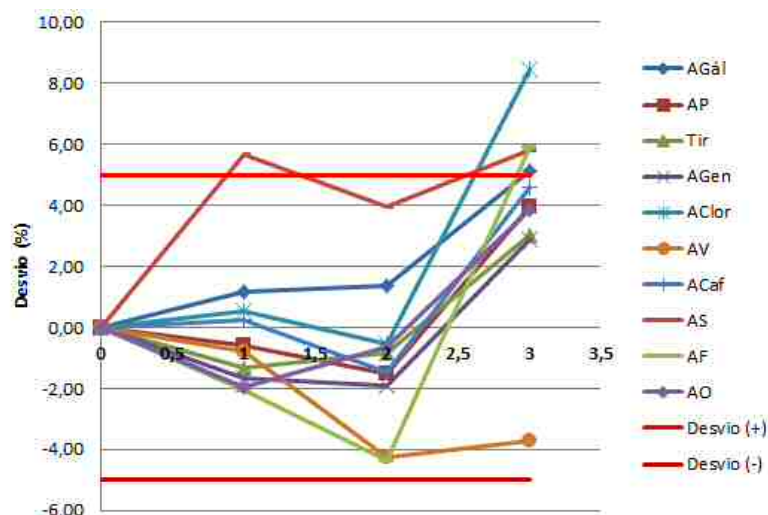
Tabela 23 - Intervalo de concentração correspondente a cada composto, desde o LQ até à solução PF8 (cont.)

Composto	[LQ] (mg L ⁻¹)	[PF8] (mg L ⁻¹)
Ácido Cafeico	0,11	1,000
Ácido Ferúlico	0,15	2,000
Ácido o-cumárico	0,2	2,000
Luteolina	1,0	9,025
Apigenina	0,4	3,804
Campeferol	1,5	10,888

G. Estabilidade

Neste caso em concreto, testaram-se as amostras de trabalho armazenadas a temperatura controlada, cerca de 3 °C, ao longo do tempo.

A partir da Figura 24, relativa às soluções de trabalho preparadas no dia 22/01/2013, podemos assumir que, tendo em conta os desvios obtidos, os compostos fenólicos das soluções de trabalho apresentam-se estáveis até duas semanas após a sua preparação. Na terceira semana alguns compostos apresentam variações, não estando já em condições para serem utilizados. Esta preparação teve como solvente água ultrapura e, dependendo do solvente utilizado, os comportamentos serão diferentes. Conforme a literatura, a preparação das soluções-mãe dissolvidas em metanol apresentam uma maior estabilidade ao longo do tempo.

**Figura 24** - Estabilidade das soluções de trabalho (1).

Tal como representado na Figura 25, no caso concreto da luteolina, da apigenina e do campeferol, os resultados obtidos demonstraram-se diferentes dos restantes. Estes compostos fenólicos demonstraram que são instáveis desde a primeira semana. Neste sentido, além desta situação implicar um maior cuidado com as amostras, a preparação de padrões destes compostos também deverá ser inevitavelmente realizada de novo para cada ensaio a realizar.

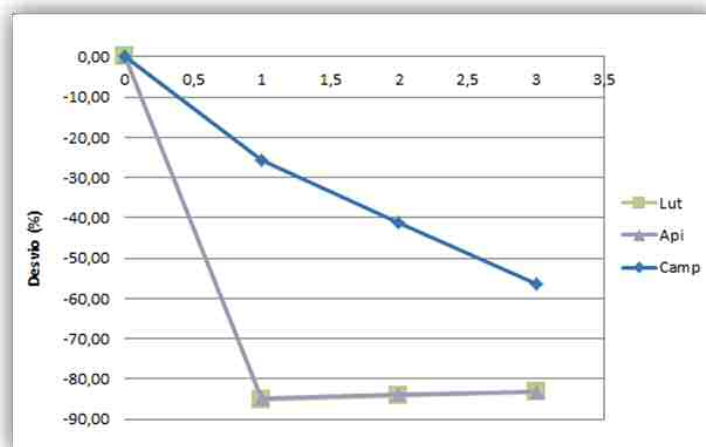


Figura 25 - Estabilidade das soluções de trabalho (2).

No final da avaliação de todos os parâmetros, o sistema demonstrou ser reprodutível, existindo apenas valores que ultrapassam o limite estabelecido para a luteolína e o campeferol. Sabe-se, no entanto que, estes dois compostos juntamente com a apigenina revelaram-se instáveis de acordo com as condições em que foram preparados. No que diz respeito à seletividade, o método permite a separação dos compostos em estudo, no entanto é necessário proceder à sua confirmação através do espectro de absorção UV-Vis do padrão do composto fenólico em causa. O método é exato, as recuperações cumprem os critérios definidos para a maioria dos compostos, apenas no caso do ácido vanílico e do ácido ferúlico, os valores de percentagens de recuperação que se obtiveram revelaram pontualmente ser superiores ao esperado, devido aos baixos teores de ácido vanílico testados e à presença irregular de ácido ferúlico nas amostras que foram fortificadas. Esta metodologia também determinou ser precisa para a maioria dos casos, bem como a linearidade que foi provada em todos os compostos fenólicos testados.

3.3.3 Perfil de compostos fenólicos em melancia por HPLC-DAD

Na Figura 26 é apresentado um exemplo de um cromatograma de uma amostra de melancia da cultivar Crimson sweet.

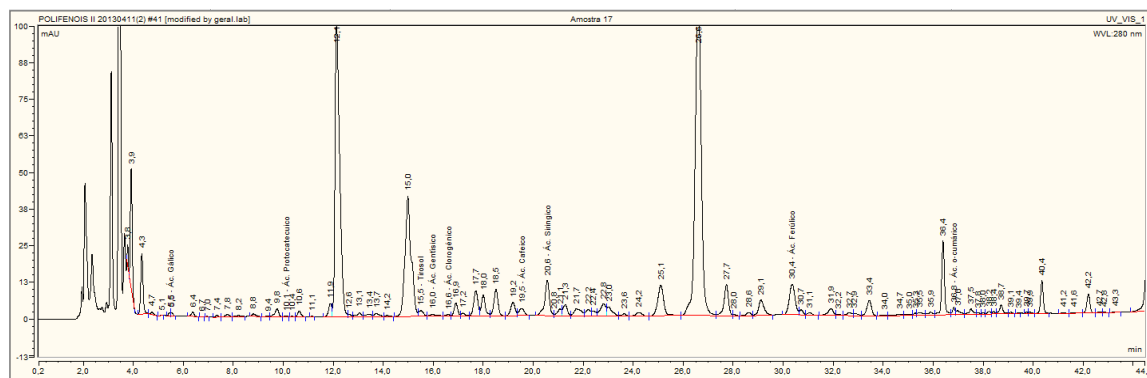


Figura 26 - Cromatograma de uma amostra de melancia da cultivar Crimson sweet.

Neste ponto temos os resultados conseguidos com os ensaios das vinte e cinco melancias selecionadas, recorrendo à metodologia que tem vindo a ser descrita.

Na Tabela 24 apresentam-se todos os resultados obtidos nos referidos ensaios sendo que a respetiva legenda é a seguinte:

(valor numérico)	Quantificável
<LQ	Detetado
n.d.	Não Detetado (<LD)
int.	Interferente

Quando é apresentado o valor numérico significa que o composto fenólico é detetado em quantidades quantificáveis. Já quando se apresenta <LQ enuncia-se que o composto é detetado mas em quantidades que não permitem a sua quantificação. No que diz respeito a n.d. clarifica que o composto não terá sido detetado e quanto à abreviatura int. indica que o cromatograma apresenta um pico, mas o composto, recorrendo ao espetro de absorção UV-Vis do padrão, não é confirmado.

De todos os resultados obtidos para os onze compostos, nas amostras de melancia apenas a presença de quatro compostos é confirmada: ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico e ácido ferúlico.

O composto que claramente se destaca é o ácido ferúlico, pois apresenta valores perfeitamente quantificáveis, comprovando a presença do mesmo em quantidades mais elevadas na melancia.

Quanto ao ácido clorogénico e ácido cafeico também estão presentes na melancia, no entanto, em quantidade menores que permitem apenas a sua identificação.

No que diz respeito ao ácido gálico, apenas em duas amostras é possível a identificação deste composto. Noutras amostras, a sua presença na melancia é indiciada, mas em quantidades muito baixas, sendo inferiores ao LD.

Tabela 24 - Resultados dos ensaios realizados com as vinte e cinco amostras de melancia selecionadas.

Cultivar	AGál	AP	AGen	AClo	AV	ACaf	AF	AO	Lut	Api	Camp	Melancia N ^o
Crimson sweet	n.d.	int.	int.	<LQ	n.d.	<LQ	0,98	n.d.	n.d.	n.d.	int.	12
	n.d.	int.	int.	<LQ	n.d.	<LQ	0,54	n.d.	n.d.	n.d.	int.	13
	n.d.	int.	int.	<LQ	int.	<LQ	0,94	n.d.	int.	n.d.	int.	14
	n.d.	int.	int.	<LQ	int.	<LQ	4,52	int.	int.	int.	int.	17
	n.d.	int.	int.	<LQ	n.d.	<LQ	1,35	n.d.	n.d.	n.d.	int.	19
Augusta	n.d.	int.	int.	<LQ	n.d.	<LQ	2,12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4
	n.d.	int.	int.	<LQ	n.d.	<LQ	2,08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5
	n.d.	int.	int.	<LQ	n.d.	<LQ	2,19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6
	n.d.	int.	int.	<LQ	n.d.	<LQ	0,57	int.	n.d.	n.d.	int.	78
	n.d.	int.	int.	<LQ	int.	<LQ	1,15	n.d.	n.d.	n.d.	int.	79
Crimstar	n.d.	int.	int.	<LQ	n.d.	<LQ	1,79	int.	int.	n.d.	int.	8
	n.d.	int.	int.	<LQ	int.	<LQ	0,47	n.d.	n.d.	n.d.	int.	9
	n.d.	int.	int.	<LQ	int.	<LQ	0,92	n.d.	n.d.	n.d.	int.	10
	<LQ	int.	int.	<LQ	n.d.	<LQ	2,30	n.d.	int.	n.d.	int.	26
	n.d.	int.	int.	<LQ	n.d.	<LQ	1,45	n.d.	n.d.	n.d.	int.	28
Romeria	n.d.	int.	n.d.	n.d.	int.	<LQ	1,00	n.d.	n.d.	n.d.	int.	47
	n.d.	int.	n.d.	<LQ	int.	<LQ	1,52	n.d.	n.d.	n.d.	int.	48
	n.d.	int.	n.d.	<LQ	int.	<LQ	1,31	n.d.	n.d.	n.d.	int.	49
	n.d.	int.	int.	<LQ	n.d.	<LQ	2,92	n.d.	n.d.	n.d.	int.	50
	n.d.	int.	int.	<LQ	int.	<LQ	2,13	n.d.	n.d.	n.d.	int.	71
Romalinda	n.d.	int.	int.	0,61	n.d.	<LQ	1,07	n.d.	n.d.	n.d.	int.	61
	n.d.	int.	n.d.	<LQ	n.d.	<LQ	0,63	n.d.	n.d.	n.d.	int.	62
	<LQ	int.	n.d.	0,57	n.d.	<LQ	3,40	int.	int.	int.	int.	63
	n.d.	int.	int.	<LQ	int.	<LQ	0,64	int.	n.d.	n.d.	int.	81
	n.d.	int.	int.	<LQ	int.	<LQ	1,24	int.	n.d.	n.d.	int.	82

Na Tabela 25 encontram-se agrupados os valores médios dos compostos confirmados para cada uma das diferentes cultivares de melancia.

Tabela 25 - Compostos fenólicos quantificados em cada cultivar (média \pm desvio-padrão).

Cultivar	Ácido Gálico (mg L⁻¹)	Ácido Clorogénico (mg L⁻¹)	Ácido Cafeico (mg L⁻¹)	Ácido Ferúlico (mg L⁻¹)
Crimson Sweet	n.d.	<LQ	<LQ	1,67\pm1,45
Augusta	n.d.	<LQ	<LQ	1,62\pm0,65
Crimstar	<LQ	<LQ	<LQ	1,39\pm0,64
Romeria	n.d.	<LQ	<LQ	1,78\pm0,68
Romalinda	<LQ	0,59\pm0,16	<LQ	1,40\pm1,03

O ácido gálico não é detetado em todas as cultivares e na Crimstar e Romalinda é identificado, mas em quantidades que não permitem a sua quantificação. Já o ácido clorogénico é detetado em todas elas, mas apenas na Romalinda é possível a sua quantificação. O ácido cafeico está também presente em todas as cultivares, mas o seu teor não é quantificável.

O contrário acontece com o ácido ferúlico que é quantificado nas cinco cultivares. No que diz respeito a este ácido são muitos os alimentos básicos que fazem parte da alimentação diária, como por exemplo, cereais integrais, citrinos, banana, café, brócolos ou espinafres, que são importantes fontes de ingestão ricas neste composto fenólico. De todos os efeitos biológicos que lhe podem ser atribuídos, as propriedades antioxidantes são as que mais se salientam, sendo que as mesmas permitem considerá-lo benéfico na prevenção e/ou tratamento de problemas relacionados com o stresse oxidativo, como a doença de Alzheimer, a diabetes, o cancro, a hipertensão ou ainda a aterosclerose (Manaia, 2011). Estudos mais recentes avaliaram a capacidade do ácido ferúlico na eliminação de radicais livres em culturas de neurónios e sistemas de sinaptossomas. Nestes foi possível perceber que a presença do ácido ferúlico reduz de forma significativa os danos provocados pelos radicais livres nos sistemas de células neuronais, mas sem provocar a morte celular. Estes dados sugerem assim a importância que este composto tem na intervenção terapêutica contra doenças neurodegenerativas (Kanski *et al.*, 2002). Para os valores obtidos nesta quantificação foi realizada uma análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey e os resultados provaram que os valores obtidos para as diferentes cultivares não são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$).

Nas Figuras 27 e 28 representam-se os espetros dos quatro compostos fenólicos referidos na Tabela 22. Pela utilização do detetor de díodos, existe a possibilidade de determinar a pureza dos picos cromatográficos (Antunes *et al.*, 2008). Assim, para cada caso pode verificar-se a coincidência do espetro no máximo do pico, bem como na meia altura, antes e depois do mesmo. Quanto mais coincidentes, mais elevado será o grau de pureza.

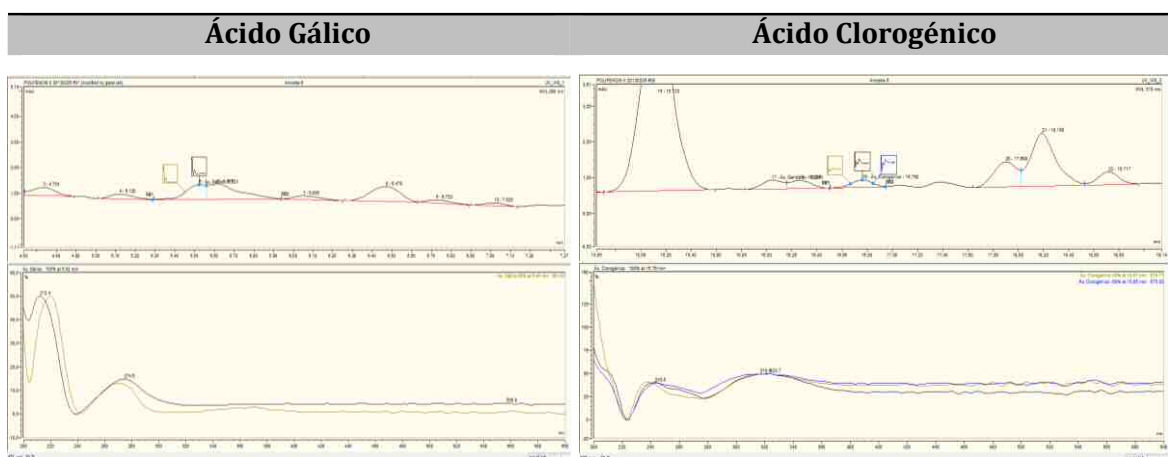


Figura 27 - Espectros de absorção UV-Vis para os dois compostos fenólicos (AGál e AClo), mostrando a pureza de cada pico.

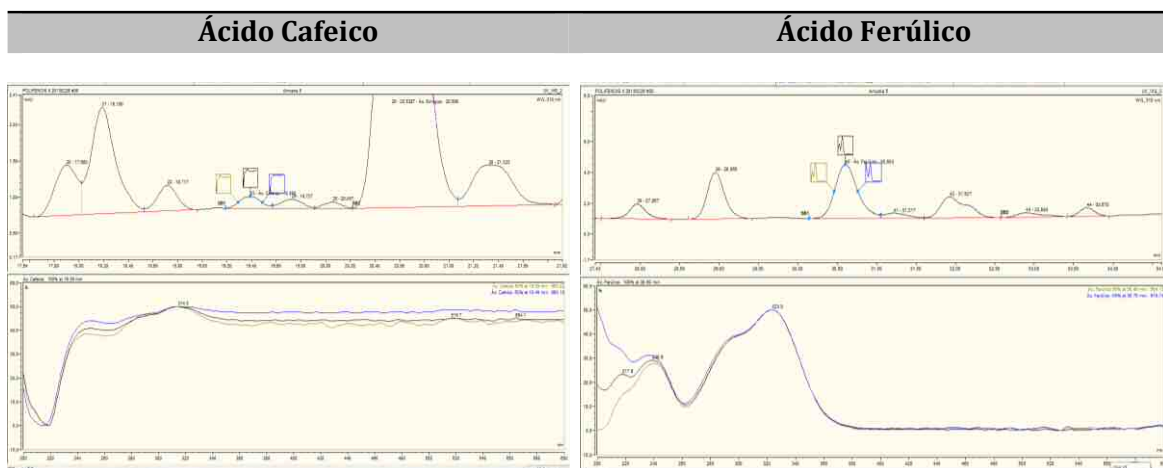


Figura 28 - Espectros de absorção UV-Vis para os dois compostos fenólicos (ACaf e AF), mostrando a pureza de cada pico.

Além destes quatro compostos fenólicos, que se provou estarem presentes na melancia, existem outros que, apesar de não ter sido possível a sua identificação, surgem nas análises realizadas. Na Figura 29 e 30 é possível verificar a existência de alguns destes mesmos compostos não identificados.

A partir destes resultados compararam-se os espectros dos picos que mais se destacam com os espectros dos padrões utilizados nesta metodologia e é possível perceber a que grupo de compostos pertencem.

Assim, e de acordo com as ilações que Inbaraja *et al.* (2010) realizaram, comparando o espectro do pico destacado na Figura 29 podemos concluir que o mesmo coincide com o espectro do ácido gálico, indicando que, provavelmente, este composto é um derivado deste mesmo ácido, pertencendo aos ácidos hidroxibenzoicos.

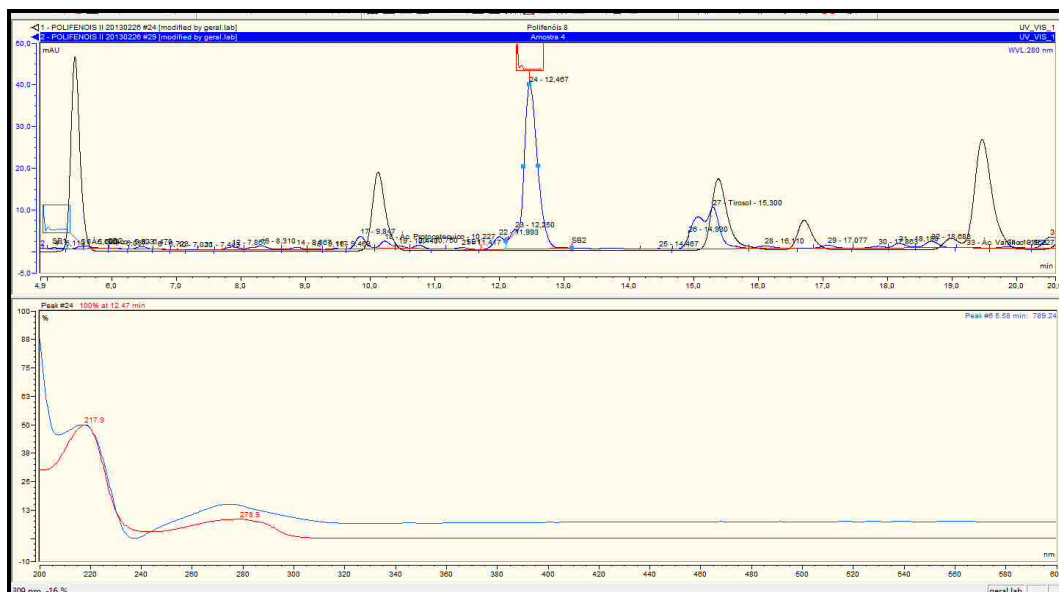


Figura 29 - Comparação dos espectros de absorção UV-Vis do ácido gálico com um dos picos que mais se destaca nas amostras de melancia analisadas.

Já o composto destacado na Figura 30 foi comparado com os espectros dos compostos puros e a comparação permitiu também perceber que coincide com o ácido protocatecuico e que, por isso, se assume que o composto fenólico não identificado poderá ser um derivado deste meso ácido, fazendo também parte dos ácidos hidroxibenzoicos.

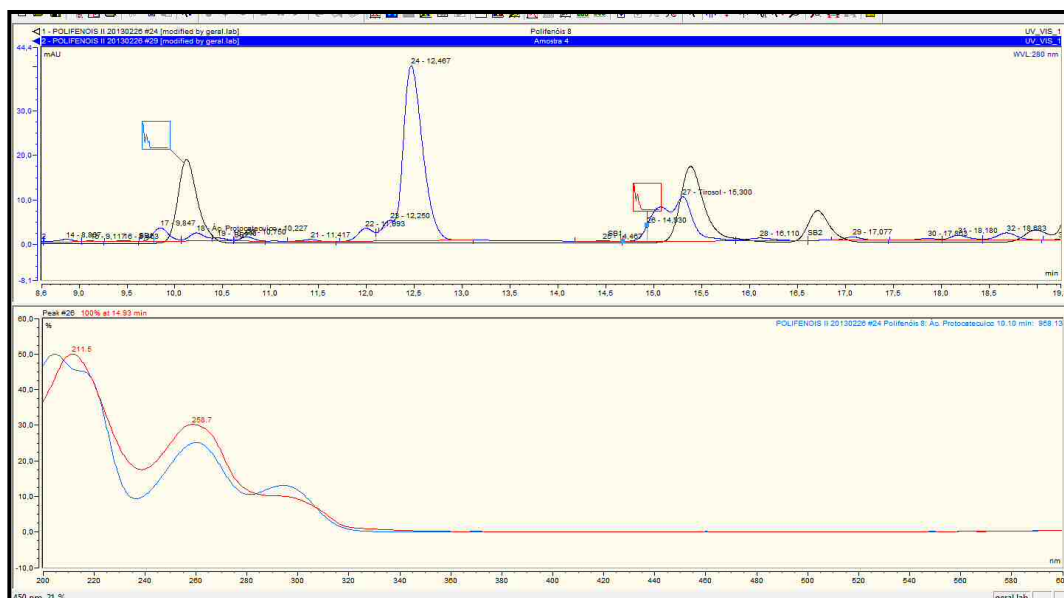


Figura 30 - Comparação dos espectros de absorção UV-Vis do ácido protocatecuico com um dos picos que mais se destaca nas amostras de melancia analisadas.

4. Considerações Finais

O trabalho desenvolvido tratou essencialmente da validação de metodologias que permitissem a determinação de compostos fenólicos em melancia. Para tal, inicialmente recorreu-se a todo um conjunto de recursos bibliográficos, testando-se vários métodos até se obter um que fosse considerado viável para que se atingissem os objetivos propostos. Esta meta foi atingida e do grupo de compostos testados foi possível validar a metodologia para onze compostos fenólicos.

Como foi detalhado ao longo do trabalho foram vários os parâmetros a ter em conta para esta validação. Quanto à reprodutibilidade do sistema, o mesmo demonstrou ser reprodutível, existindo apenas valores que ultrapassam o limite estabelecido para a luteolina e o campeferol. Sabe-se, no entanto que, estes dois compostos e a apigenina revelaram-se instáveis de acordo com as condições em que foram preparados. No que diz respeito à seletividade, o método comprovou separar os compostos em estudo, no entanto é necessário realizar a sua confirmação através do espectro de absorção UV-Vis do padrão do composto fenólico em causa. No caso do ácido vanílico e ácido ferúlico, os valores de percentagens de recuperação obtidas revelaram pontualmente ser superiores ao esperado. Esta metodologia também mostrou ser precisa, bem como linear em todos os compostos fenólicos enumerados.

Dos onze compostos fenólicos para os quais a validação da metodologia foi conseguida, nomeadamente para o ácido gálico, o ácido clorogénico, o ácido cafeico e o ácido ferúlico foi também possível a sua deteção nas amostras de melancia. Relativamente ao ácido ferúlico conseguiu-se ainda a sua quantificação nas mesmas amostras, demonstrando estar presente no fruto em quantidades superiores relativamente aos restantes, dado relevante para o valor nutricional da melancia, já que este ácido fenólico pelas suas propriedades antioxidantes, é considerado muito importante na prevenção e/ou tratamento de problemas relacionados com o stresse oxidativo.

Além dos compostos identificados, verificou-se também a existência de muitos outros para os quais não foi possível a sua identificação. Apesar de existir um grande número de investigações analíticas para os compostos fenólicos, a sua separação e quantificação tem-se revelado difícil.

No presente trabalho, por comparação com os compostos conhecidos, procedeu-se a uma tentativa para a sua classificação, reconhecendo as famílias às quais podem pertencer, no entanto, esta certeza não foi conseguida. Neste sentido, seria de todo o interesse em trabalhos futuros identificar estes compostos, que surgem em quantidades superiores relativamente aos que foram quantificados e que podem representar grande importância no valor nutricional da melancia.

Já para os compostos que foram detetados, mas que não foram quantificáveis (<LQ), como é o caso do ácido gálico, ácido clorogénico, quantificado apenas na cultivar Romalinda, e ácido cafeico poderá recorrer-se a outras formas de preparação de amostras, nomeadamente por SPE, como aliás foi ainda testado neste trabalho. Esta forma de preparação de amostras, ao conduzir a uma concentração dos compostos fenólicos, permitirá melhorar os limites de deteção.

Assim, destaca-se deste trabalho, a validação de uma metodologia para identificação e quantificação de compostos fenólicos em melancia, que por sua vez pode ser aplicada a outros frutos. É de salientar ainda a deteção de quatro compostos fenólicos e a quantificação

de ácido ferúlico nas cultivares de melancia Crimson sweet, Augusta, Crimstar, Romeria e Romalinda.

Estes resultados são pioneiros na avaliação de compostos fenólicos em melancia e revelaram-se animadores e encorajadores para a progressão da investigação em futuros estudos.

Referências bibliográficas

- Abu-Reidah, I., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Profiling of phenolic and other polar constituents from hydro-methanolic extract of watermelon (*Citrullus lanatus*) by means of accurate-mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF-MS). *Food Research International*, 51: 354-362
- Amarowicz, A., Carle, R., Dongowski, G., Durazzo, A., Galensa, R., Kammerer, D., Maiani, G., Piskula, M. K. (2009) Influence of postharvest processing and storage on the content of flavonoids and phenolic acids in foods. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53: S151-S183.
- Antunes, M. V., Lazzaretti, C., Gamaro, G. D., Linden, R. (2008). Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44 (2): 279-287.
- Ball, G. F. M. (2006). Vitamins in foods: Analysis, bioavailability, and stability, *CRC Press*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 785p.
- Bobinaité, R., Viškelis, P., Venskutonis, P., R. (2012). Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars. *Food Chemistry*, 132: 1495-1501.
- Castro, N. M. N. (2008). Estudo e caracterização química dos compostos extractáveis em metanol da polpa de baobá (*Adansonia digitata*). Dissertação do Mestrado em Bioquímica e química dos alimentos, Universidade de Aveiro.
- Claro, R. M., Carmo, H. C. E., Machado, F. M. S., Monteiro, C. A. (2007). Renda, preço dos alimentos e participação de frutas e hortaliças na dieta. *Revista Saúde Pública*, 41(4):557-64.
- CRQ (2010). Conceitos fundamentais de cromatografia a líquido de alto desempenho (HPLC). *Conselho Regional de Química*, Minicursos CRQ-IV.
- D'Archivio, M., Filesi, Benedetto, R. D., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Istituto Superiore di Sanità*, 43: 348-361.
- Dornas, W. C., Oliveira, T. T., Rodrigues das Dores, R. G., Santos, A. F., Nagem, T. J. (2007). Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 38 (3): 241-249.
- FAOSTAT (2010). The Statistics Division of the Food and Agriculture Organization of the United Nations, from http://faostat3.fao.org/home/index.html#SEARCH_DATA
- Harborne, J. B., Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55: 481-504.
- INSA (2007). Tabela de Composição de Alimentos. Centro de Segurança Alimentar e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 1ª Edição, páginas 96-97.

IPAC (2011) Guia para a acreditação de laboratórios químicos. *Instituto Português de Acreditação*, OGC002 de 16/05/2011.

JOCE (2002). Decisão da Comissão de 12 de Agosto de 2002, que dá execução ao disposto na Diretiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 221: 8-36 de 17/08/2002.

Kanski, J., Aksenova, M., Stoyanova, A., Butterfield, D. A. (2002). Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure-activity studies. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 273-281.

Kenndler, E. (2004). Introduction to chromatography. *Institute for Analytical Chemistry*, University of Vienna.

Lopes, G. C., Blainski, A., Pires dos Santos, P. V., Diciaula, M. C., Palazzo de Mello, J. C. (2010). Development and validation of an HPLC method for the determination of epicatechin in *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch., Celastraceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 2610.

Manaia, M. (2011). Mecanismos redox relativos à atividade antioxidante de sistemas fenólicos. Dissertação do Mestrado em Química, Universidade de Coimbra.

Melo, E. A., Maciel, M. I. S., Lima, V. L. A. G., Nascimento, R. J. (2008). Capacidade antioxidante de frutas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44: 193-201.

Neveu, V., Perez-Jiménez, J., Vos, F., Crespy, V., du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D., Scalbert, A. (2010). Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database*, 2010, 1-9.

Ribani, M., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., Jardim, I. S. F., Melo, L. F. C. (2004). Validação em métodos cromatográficos e electroforéticos. *Química Nova*, 27 (5): 771-780.

Rimando, A. M., Perkins-Veazie, P. M. (2005). Determination of citrulline in watermelon rind. *Journal of Chromatography A*, 1078: 196-200.

Rocha, M. (2010). Sistema de cultivo para a cultura da melancia. Dissertação do Mestrado em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS, Brasil.

Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., Kanazawa, K. (2002). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Department of Life Science, Graduate School of Science and Technology, Kobe University*, 657-8501.

SANCO (2007). Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed (2007). SANCO/2007/3131.

Silva, M. L. C., Costa, R. S., Santana, A. S., Koblitz, M. G. B. (2010). Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 31 (3): 669-682.

Simpson, M. (2010). Plant systematics (2nd). London: *Academic Press* (Chapter 8).

Soares, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, 15(1): 71-81.

Tlili, I., Hdider, C., Lenucci, M. S., Ilahy, R., Jebari, H., Dalessandro, G. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activities of different watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansfeld) cultivars as affected by fruit sampling area. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24: 307-314.

Tlili, I., Hdider, C., Lenucci, M. S., Ilahy, R., Jebari, H., Dalessandro, G. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activities during fruit ripening of watermelon cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24: 923-928.

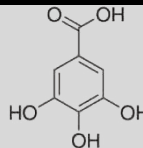
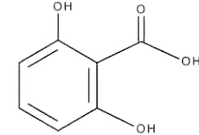
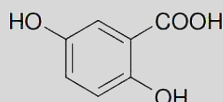
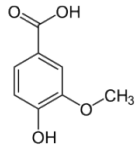
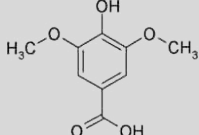
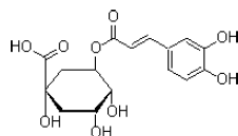
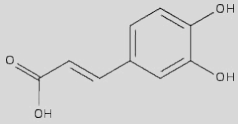
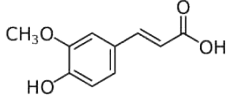
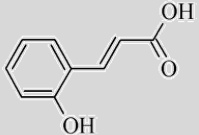
Vinson, J.A., Su, X., Zubic, S.K., Bose, P. (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5315-5321.

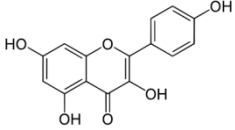
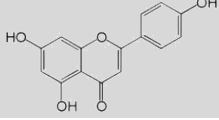
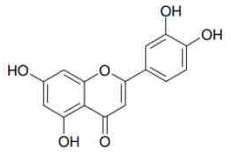
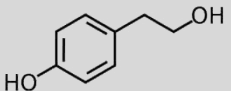
Yao, L., Jiang, Y., Datta, N., Singanusong, R., Liu, X., Duan, J., Raymont, K., Lisle, A., Xu, Y. (2004). HPLC analyses of flavanols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia. *Food Chemistry*, 84: 253-263.

Anexos

ANEXO A

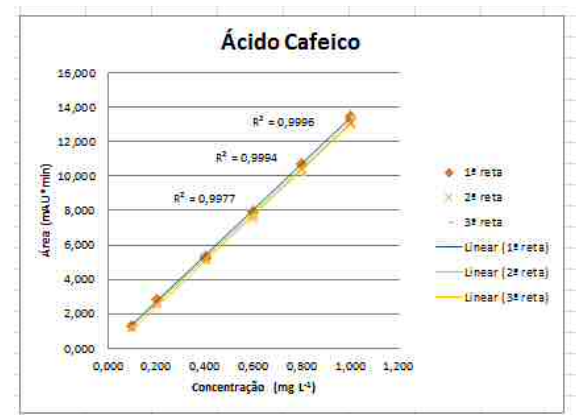
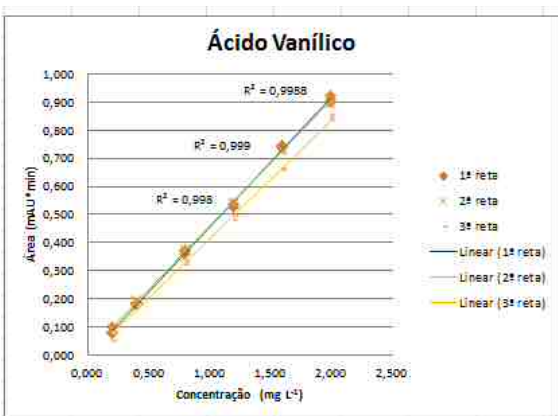
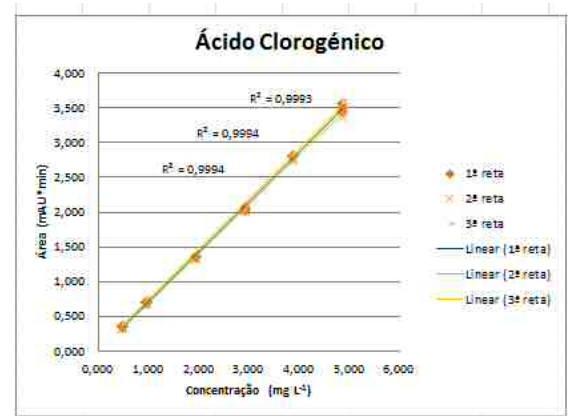
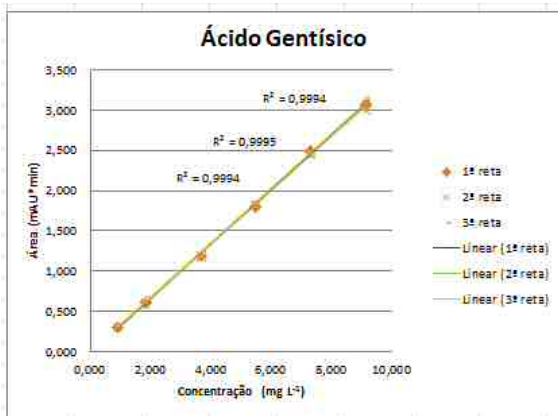
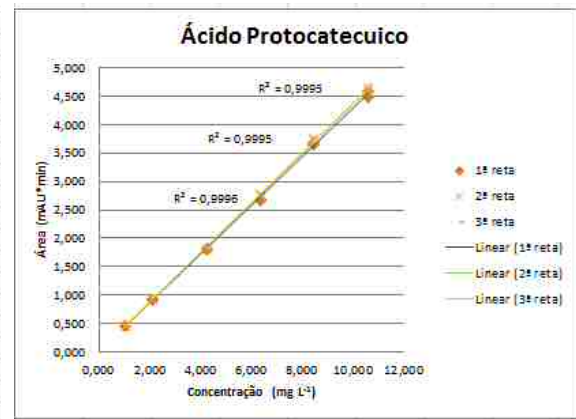
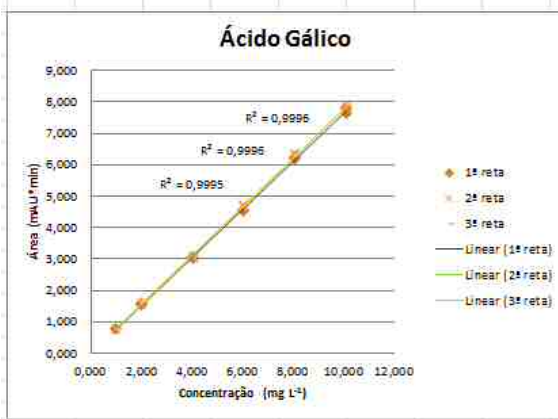
Identificação dos treze padrões utilizados neste estudo.

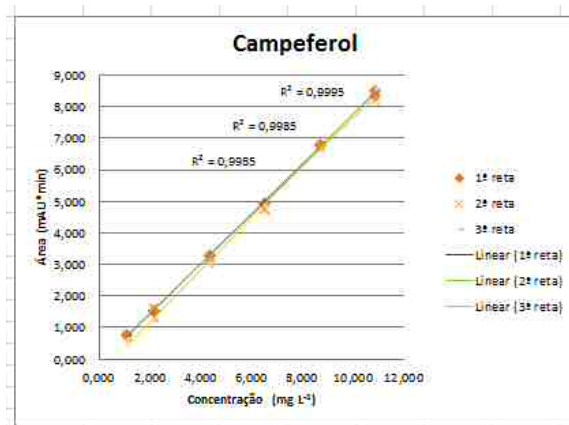
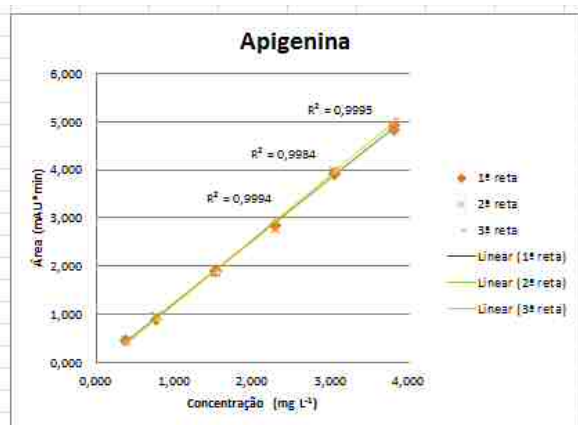
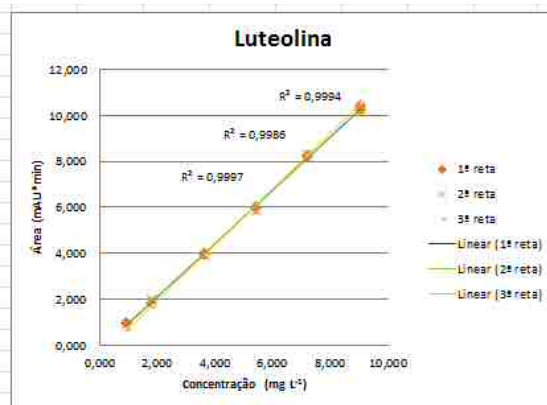
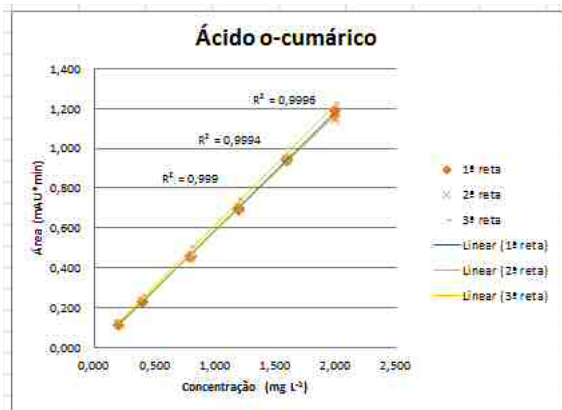
Classe	Sub-classe	Composto	Fórmula Química	Estrutura Química
Ácidos Fenólicos	Ácidos Hidroxiarilbenzoides	Ácido Gálico	$C_7H_6O_5$	
		Ácido Protocatecuico	$C_7H_6O_4$	
		Ácido Gentísico	$C_7H_6O_4$	
		Ácido Vanílico	$C_8H_8O_4$	
		Ácido Sirínico	$C_9H_{10}O_5$	
	Ácidos Hidroxicinâmicos	Ácido Clorogénico	$C_{16}H_{18}O_9$	
		Ácido Cafeico	$C_9H_8O_4$	
		Ácido Ferúlico	$C_{10}H_{10}O_4$	
		Ácido o-cumárico	$C_9H_8O_3$	

Flavonóides	Flavonóis	Campeferol	$C_{15}H_{10}O_6$	
	Flavonas	Apigenina	$C_{15}H_{10}O_5$	
		Luteolina	$C_{15}H_{10}O_6$	
Outros Polifenóis	Tirosóis	Tirosol	$C_8H_{10}O_2$	

ANEXO B

Retas de calibração dos restantes compostos testados.





ANEXO C

Tratamento dos valores obtidos aquando da realização de cada uma das retas de calibração.

Nº	Sequência	Ácido Gálico					Ácido Protocatecuico				Ácido Gentísico			
		Conc.	Área	Conc.	Desvio	Conc.	Área	Conc.	Desvio	Conc.	Área	Conc.	Desvio	
		mg L ⁻¹	mAU*min 280 nm	Calc. mg L ⁻¹	(%)	mg L ⁻¹	mAU*min 280 nm	Calc. mg L ⁻¹	(%)	mg L ⁻¹	mAU*min 340 nm	Calc. mg L ⁻¹	(%)	
4	Polifenóis 3													
5	Polifenóis 3	1,010	0,747	1,0061		1,060	0,441	1,0453		0,916	0,300	0,9643		
6	Polifenóis 3	1,010	0,763	1,0266		1,060	0,458	1,0837		0,916	0,294	0,9469		
7	Polifenóis 3	1,010	0,768	1,0328	2,2%	1,060	0,449	1,0622	0,2%	0,916	0,297	0,9551	4,2%	
8	Polifenóis 3	1,010	0,756	1,0176	0,7%	1,060	0,452	1,0704	1,0%	0,916	0,297	0,9545	4,2%	
9	Polifenóis 3	1,010	0,755	1,0161	0,6%	1,060	0,464	1,0984	3,6%	0,916	0,294	0,9459	3,2%	
10	Polifenóis 4	2,020	1,554	2,0583	1,9%	2,119	0,905	2,1235	0,2%	1,832	0,595	1,8352	0,2%	
11	Polifenóis 4	2,020	1,575	2,0849	3,2%	2,119	0,923	2,1655	2,2%	1,832	0,615	1,8939	3,4%	
12	Polifenóis 4	2,020	1,547	2,0495	1,4%	2,119	0,912	2,1402	1,0%	1,832	0,601	1,8511	1,0%	
13	Polifenóis 5	4,041	3,031	3,9835	-1,4%	4,239	1,800	4,2042	-0,8%	3,665	1,191	3,5948	-1,9%	
14	Polifenóis 5	4,041	3,046	4,0035	-0,9%	4,239	1,820	4,2499	0,3%	3,665	1,189	3,5867	-2,1%	
15	Polifenóis 5	4,041	3,066	4,0295	-0,3%	4,239	1,813	4,2330	-0,1%	3,665	1,186	3,5782	-2,4%	
16	Polifenóis 6	6,061	4,537	5,9467	-1,9%	6,358	2,670	6,2261	-2,1%	5,497	1,798	5,3855	-2,0%	
17	Polifenóis 6	6,061	4,589	6,0144	-0,8%	6,358	2,692	6,2773	-1,3%	5,497	1,817	5,4424	-1,0%	
18	Polifenóis 6	6,061	4,566	5,9854	-1,3%	6,358	2,686	6,2636	-1,5%	5,497	1,816	5,4383	-1,1%	
19	Polifenóis 7	8,082	6,173	8,0801	0,0%	8,478	3,651	8,5063	0,3%	7,330	2,499	7,4539	1,7%	
20	Polifenóis 7	8,082	6,237	8,1638	1,0%	8,478	3,684	8,5829	1,2%	7,330	2,502	7,4633	1,8%	
21	Polifenóis 7	8,082	6,188	8,0995	0,2%	8,478	3,662	8,5311	0,6%	7,330	2,483	7,4072	1,1%	
22	Polifenóis 8	10,102	7,641	9,9941	-1,1%	10,597	4,488	10,4523	-1,4%	9,162	3,050	9,0834	-0,9%	
23	Polifenóis 8	10,102	7,759	10,1480	0,5%	10,597	4,567	10,6354	0,4%	9,162	3,068	9,1357	-0,3%	
24	Polifenóis 8	10,102	7,830	10,2403	1,4%	10,597	4,608	10,7310	1,3%	9,162	3,090	9,2008	0,4%	
Média Polifenóis 4			1,559				0,914				0,604			

Nº	Sequência	Ácido Clorogénico				Ácido Vanílico				Ácido Cafeico			
		Conc. mg L ⁻¹	Área mAU*min 310 nm	Conc. Calc. mg L ⁻¹	Desvio (%)	Conc. mg L ⁻¹	Área mAU*min 280 nm	Conc. Calc. mg L ⁻¹	Desvio (%)	Conc. mg L ⁻¹	Área mAU*min 310 nm	Conc. Calc. mg L ⁻¹	Desvio (%)
4	Polifenóis 3												
5	Polifenóis 3	0,486	0,343	0,4988		0,200	0,082	0,1891		0,100	1,284	0,1005	
6	Polifenóis 3	0,486	0,349	0,5075		0,200	0,089	0,2047		0,100	1,289	0,1009	
7	Polifenóis 3	0,486	0,363	0,5264	8,3%	0,200	0,077	0,1781	-10,9%	0,100	1,288	0,1008	0,8%
8	Polifenóis 3	0,486	0,342	0,4982	2,5%	0,200	0,098	0,2248	12,4%	0,100	1,309	0,1024	2,4%
9	Polifenóis 3	0,486	0,346	0,5029	3,5%	0,200	0,079	0,1836	-8,2%	0,100	1,281	0,1004	0,4%
10	Polifenóis 4	0,972	0,686	0,9735	0,1%	0,400	0,188	0,4202	5,1%	0,200	2,654	0,2028	1,4%
11	Polifenóis 4	0,972	0,702	0,9966	2,5%	0,400	0,180	0,4039	1,0%	0,200	2,629	0,2009	0,4%
12	Polifenóis 4	0,972	0,704	0,9997	2,8%	0,400	0,176	0,3936	-1,6%	0,200	2,674	0,2042	2,1%
13	Polifenóis 5	1,944	1,364	1,9122	-1,7%	0,800	0,358	0,7898	-1,3%	0,400	5,236	0,3953	-1,2%
14	Polifenóis 5	1,944	1,363	1,9120	-1,7%	0,800	0,370	0,8165	2,1%	0,400	5,317	0,4014	0,3%
15	Polifenóis 5	1,944	1,369	1,9198	-1,3%	0,800	0,373	0,8232	2,9%	0,400	5,321	0,4016	0,4%
16	Polifenóis 6	2,917	2,035	2,8419	-2,6%	1,200	0,526	1,1547	-3,8%	0,600	7,824	0,5883	-1,9%
17	Polifenóis 6	2,917	2,040	2,8484	-2,3%	1,200	0,537	1,1786	-1,8%	0,600	7,857	0,5908	-1,5%
18	Polifenóis 6	2,917	2,072	2,8926	-0,8%	1,200	0,539	1,1835	-1,4%	0,600	7,880	0,5925	-1,2%
19	Polifenóis 7	3,889	2,802	3,9043	0,4%	1,600	0,745	1,6324	2,0%	0,800	10,689	0,8021	0,3%
20	Polifenóis 7	3,889	2,824	3,9339	1,2%	1,600	0,740	1,6220	1,4%	0,800	10,784	0,8092	1,1%
21	Polifenóis 7	3,889	2,800	3,9010	0,3%	1,600	0,736	1,6133	0,8%	0,800	10,696	0,8026	0,3%
22	Polifenóis 8	4,861	3,454	4,8062	-1,1%	2,000	0,899	1,9668	-1,7%	1,000	13,197	0,9891	-1,1%
23	Polifenóis 8	4,861	3,510	4,8833	0,5%	2,000	0,923	2,0185	0,9%	1,000	13,404	1,0045	0,5%
24	Polifenóis 8	4,861	3,561	4,9542	1,9%	2,000	0,913	1,9963	-0,2%	1,000	13,491	1,0110	1,1%
	Média Polifenóis 4		0,697				0,181				2,652		

Nº	Sequência	Ácido Ferúlico				Ácido o-cumárico				Luteolina			
		Conc. mg L ⁻¹	Área mAU*min 310 nm	Conc. Calc. mg L ⁻¹	Desvio (%)	Conc. mg L ⁻¹	Área mAU*min 340 nm	Conc. Calc. mg L ⁻¹	Desvio (%)	Conc. mg L ⁻¹	Área mAU*min 340 nm	Conc. Calc. mg L ⁻¹	Desvio (%)
4	Polifenóis 3												
5	Polifenóis 3	0,200	0,235	0,1939		0,200	0,117	0,2119		0,903	0,881	0,9200	
6	Polifenóis 3	0,200	0,226	0,1863		0,200	0,117	0,2129		0,903	0,863	0,9043	
7	Polifenóis 3	0,200	0,243	0,2000	0,0%	0,200	0,116	0,2106	5,3%	0,903	0,974	1,0000	10,8%
8	Polifenóis 3	0,200	0,243	0,1998	-0,1%	0,200	0,116	0,2112	5,6%	0,903	0,964	0,9914	9,8%
9	Polifenóis 3	0,200	0,239	0,1965	-1,8%	0,200	0,116	0,2099	5,0%	0,903	0,968	0,9950	10,2%
10	Polifenóis 4	0,400	0,506	0,4082	2,0%	0,400	0,227	0,3981	-0,5%	1,805	1,838	1,7434	-3,4%
11	Polifenóis 4	0,400	0,505	0,4070	1,8%	0,400	0,230	0,4019	0,5%	1,805	1,846	1,7500	-3,0%
12	Polifenóis 4	0,400	0,500	0,4033	0,8%	0,400	0,233	0,4066	1,6%	1,805	1,833	1,7391	-3,7%
13	Polifenóis 5	0,800	1,010	0,8075	0,9%	0,800	0,456	0,7817	-2,3%	3,610	3,949	3,5603	-1,4%
14	Polifenóis 5	0,800	1,001	0,8002	0,0%	0,800	0,460	0,7889	-1,4%	3,610	4,020	3,6213	0,3%
15	Polifenóis 5	0,800	0,998	0,7980	-0,3%	0,800	0,461	0,7900	-1,2%	3,610	3,990	3,5951	-0,4%
16	Polifenóis 6	1,200	1,490	1,1868	-1,1%	1,200	0,694	1,1821	-1,5%	5,415	5,984	5,3114	-1,9%
17	Polifenóis 6	1,200	1,477	1,1770	-1,9%	1,200	0,702	1,1962	-0,3%	5,415	6,033	5,3532	-1,1%
18	Polifenóis 6	1,200	1,490	1,1872	-1,1%	1,200	0,697	1,1872	-1,1%	5,415	6,038	5,3577	-1,1%
19	Polifenóis 7	1,600	2,012	1,6001	0,0%	1,600	0,951	1,6141	0,9%	7,220	8,240	7,2525	0,4%
20	Polifenóis 7	1,600	2,036	1,6195	1,2%	1,600	0,946	1,6065	0,4%	7,220	8,270	7,2781	0,8%
21	Polifenóis 7	1,600	2,017	1,6042	0,3%	1,600	0,941	1,5980	-0,1%	7,220	8,198	7,2166	0,0%
22	Polifenóis 8	2,000	2,494	1,9815	-0,9%	2,000	1,169	1,9802	-1,0%	9,025	10,226	8,9612	-0,7%
23	Polifenóis 8	2,000	2,529	2,0094	0,5%	2,000	1,189	2,0139	0,7%	9,025	10,327	9,0486	0,3%
24	Polifenóis 8	2,000	2,535	2,0139	0,7%	2,000	1,194	2,0231	1,2%	9,025	10,456	9,1592	1,5%
	Média Polifenóis 4		0,504				0,230				1,839		

Nº	Sequência	Apigenina				Campeferol			
		Conc.	Área	Conc.	Desvio	Conc.	Área	Conc.	Desvio
		mg L ⁻¹	mAU*min 340 nm	Calc. mg L ⁻¹	(%)	mg L ⁻¹	mAU*min 340 nm	Calc. mg L ⁻¹	(%)
4	Polifenóis 3								
5	Polifenóis 3	0,380	0,434	0,3899		1,089	0,729	1,0996	
6	Polifenóis 3	0,380	0,430	0,3867		1,089	0,712	1,0772	
7	Polifenóis 3	0,380	0,467	0,4148	9,1%	1,089	0,789	1,1748	7,9%
8	Polifenóis 3	0,380	0,456	0,4066	6,9%	1,089	0,791	1,1781	8,2%
9	Polifenóis 3	0,380	0,463	0,4116	8,2%	1,089	0,784	1,1683	7,3%
10	Polifenóis 4	0,761	0,895	0,7429	-2,3%	2,178	1,533	2,1174	-2,8%
11	Polifenóis 4	0,761	0,896	0,7434	-2,3%	2,178	1,535	2,1205	-2,6%
12	Polifenóis 4	0,761	0,893	0,7412	-2,6%	2,178	1,529	2,1127	-3,0%
13	Polifenóis 5	1,522	1,898	1,5114	-0,7%	4,355	3,280	4,3304	-0,6%
14	Polifenóis 5	1,522	1,916	1,5252	0,2%	4,355	3,312	4,3697	0,3%
15	Polifenóis 5	1,522	1,905	1,5167	-0,3%	4,355	3,296	4,3506	-0,1%
16	Polifenóis 6	2,282	2,836	2,2303	-2,3%	6,533	4,922	6,4093	-1,9%
17	Polifenóis 6	2,282	2,869	2,2558	-1,2%	6,533	4,971	6,4706	-0,9%
18	Polifenóis 6	2,282	2,857	2,2469	-1,5%	6,533	4,947	6,4410	-1,4%
19	Polifenóis 7	3,043	3,928	3,0673	0,8%	8,710	6,791	8,7760	0,8%
20	Polifenóis 7	3,043	3,942	3,0779	1,1%	8,710	6,818	8,8105	1,2%
21	Polifenóis 7	3,043	3,906	3,0509	0,3%	8,710	6,757	8,7323	0,3%
22	Polifenóis 8	3,804	4,839	3,7654	-1,0%	10,888	8,369	10,7747	-1,0%
23	Polifenóis 8	3,804	4,906	3,8171	0,4%	10,888	8,482	10,9172	0,3%
24	Polifenóis 8	3,804	4,950	3,8505	1,2%	10,888	8,551	11,0049	1,1%
	Média Polifenóis 4		0,895				1,533		