



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**



Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Câmpus de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição

Flávia Marcussi

**Capacidade antioxidante e compostos bioativos em  
hortaliças analisadas em dois períodos de cultivo**

**Araraquara, SP**

**2015**



Flávia Marcussi

## **Capacidade antioxidante e compostos bioativos em hortaliças analisadas em dois períodos de cultivo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Mestre em Ciências dos Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Célia Maria de Sylos

**Araraquara, SP**

**2015**



**Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**M322c** Marcussi, Flávia  
Capacidade antioxidante e compostos bioativos em hortaliças analisadas em dois períodos de cultivo / Flávia Marcussi. – Araraquara, 2015  
74 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

Orientador: Célia Maria de Sylos

1. Compostos fenólicos totais. 2. Capacidade antioxidante total. 3. Hortaliças I. Sylos, Célia Maria de, orient. II. Título.

**CAPES: 50700006**

## **Comissão examinadora**

---

**Profa. Dra. CELIA MARIA DE SYLOS**

Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do  
Câmpus de Araraquara da UNESP

---

**Profa. Dra. PATRÍCIA MARIA VIEIRA**

Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

**Prof. Dr. LUIS VITOR SILVA DO SACRAMENTO**

Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

***Dedico este trabalho aos meus pais, Jordão e Maria Amélia e aos meus irmãos, Leandro e Izabella, que desde muito cedo incentivaram minha vida acadêmica e não mediram esforços para que pudesse alcançar meus sonhos.***

## **Agradecimentos**

À Deus, pela vida, força e coragem, minha eterna gratidão.

À minha família, em especial aos meus pais, meus exemplos de vida, minha fonte de inspiração, apoio e ensino diário, meu mais sincero agradecimento por me incentivarem a concluir mais essa etapa.

Ao meu namorado, Fabio Pedrosa Amano pelo amor, carinho, compreensão e companheirismo.

À minha orientadora Profa. Dra. Célia Maria de Sylos, meu muito obrigada pela oportunidade fornecida, pela paciência nos momentos mais difíceis, pelo incentivo, por acreditar em minha capacidade durante esses anos de trabalho.

Às minhas colegas do grupo de pesquisa, Lara Tschopoko Pedroso Perreira e Mariana da Costa de Campos pelos momentos de descontração, aprendizagem e boas conversas.

Aos meus colegas do departamento de Alimentos e Nutrição, em especial a Juliana Jabur P. Witzler, pela amizade, ajuda e palavras iluminadas em diversos momentos.

Aos meus eternos amigos, Rone De Grandis e Érica Oliveira Lopes, meu muito obrigada por esses anos de amizade, companheirismo e paciência.

Ao Prof. Dr. Luis Vitor da Silva Sacramento, Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos, Profa. Dra. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini pela ajuda com o empréstimo de equipamentos.

Ao Conselho de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição e a Seção Técnica de Pós-graduação pela oportunidade concedida como representante discente, pelos ensinamentos e apoio durante essa jornada.

À CAPES pela bolsa concedida.

E por fim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

## Lista de tabelas

### Capítulo II

**Tabela 1.** Total antioxidant capacity and total phenolics in lettuce analyzed in two periods of cultivation: August 2013 [1<sup>st</sup> period]; and January / February 2014 [2<sup>nd</sup> period]<sup>1</sup>. . 37

**Tabela 2.** Concentration of phenolic acids and flavonoids in lettuce analyzed in two periods of cultivation: August 2013 [1<sup>st</sup> period]; and January / February 2014 [2<sup>nd</sup> period]<sup>1</sup>.  
..... 42

**Tabela 3.** Concentration of carotenoids in lettuce analyzed in two periods of cultivation: August 2013 [1<sup>st</sup> period]; and January / February 2014 [2<sup>nd</sup> period]<sup>1</sup>. ..... 434

### Capítulo III

**Tabela 1.** Fenólicos totais em condimentos analisados em dois períodos de cultivo: agosto de 2013 [1<sup>o</sup> período]; e janeiro/fevereiro de 2014 [2<sup>o</sup> período]..... 58

**Tabela 2.** Concentração de ácidos fenólicos e flavonoides em condimentos analisados em dois períodos de cultivo: agosto de 2013 [1<sup>o</sup> período]; e janeiro/fevereiro de 2014 [2<sup>o</sup> período]..... 61

**Tabela 3.** Teor de Carotenoides totais de condimentos analisados em dois períodos de cultivo: agosto de 2013 [1<sup>o</sup> período]; e janeiro/fevereiro de 2014 [2<sup>o</sup> período]..... 62

**Tabela 4.** Clorofila *a*, *b* e total em condimentos analisados em dois períodos de cultivo: agosto de 2013 [1<sup>o</sup> período]; e janeiro/fevereiro de 2014 [2<sup>o</sup> período]..... 64

**Tabela 5.** Capacidade antioxidante total expressa em trolox e ácido ascórbico pelo método de ABTS e DPPH em condimentos analisados em dois períodos de cultivo: agosto de 2013 [1<sup>o</sup> período]; e janeiro/fevereiro de 2014 [2<sup>o</sup> período]..... 65

## Sumário

Resumo .....	10
Abstract.....	11
CAPÍTULO I.....	12
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	12
1. Introdução.....	13
2. Objetivos.....	14
2.1. Objetivo geral .....	14
2.2. Objetivo específicos .....	14
3. Revisão de Literatura.....	15
3.1. Características gerais das hortaliças.....	15
3.2. Alface .....	16
3.3. Condimentos .....	17
3.4. Compostos bioativos .....	18
3.4.1. Compostos fenólicos .....	18
3.4.2 Clorofila .....	20
3.4.3. Carotenoides .....	21
3.5. Atividade antioxidante .....	22
4. Referências.....	24
CAPÍTULO II.....	31
Analytical methods applied for the determination of phenolic compounds in lettuce and their antioxidant activity.....	31
Abstract.....	32
Introduction .....	32
Materials and Methods.....	34
Material .....	34
Extraction of phenolic and antioxidants .....	34
Determination of total phenolic content .....	35
Total antioxidant capacity .....	35
DPPH and ABTS .....	35
Determination of total carotenoids.....	36
Determination and quantification of phenolic acids and flavonoids by HPLC .....	36
Statistical Analysis.....	37
Results and discussion .....	37
Total phenolic content .....	37
Total antioxidant capacity (TAC) .....	38



Phenolic acids and flavonoids .....	39
Carotenoids .....	43
Conclusion .....	44
References .....	45
CAPÍTULO III.....	48
Compostos fenólicos e antioxidantes de condimentos analisados em dois períodos de cultivos.....	48
Resumo .....	49
1. Introdução.....	50
2. Material e Métodos .....	51
2.1. Material .....	51
2.2. Extração dos compostos fenólicos e antioxidantes .....	52
2.3. Determinação do conteúdo fenólico total .....	52
2.4. Determinação da atividade antioxidante .....	53
2.4.1. DPPH.....	53
2.4.2. ABTS .....	53
2.5. Determinação e quantificação de ácidos fenólicos e flavonoides por CLAE ..	54
2.6. Determinação dos Carotenoides totais .....	55
2.7. Clorofila .....	55
2.8. Análise estatística .....	56
3. Resultados e discussão .....	56
3.1. Umidade.....	57
3.2. Determinação de fenólicos totais .....	57
3.3. Determinação e quantificação de ácidos fenólicos e flavonoides .....	59
3.4. Teor de Carotenoides totais .....	62
3.5. Clorofila .....	63
3.6. Capacidade antioxidante total .....	65
4. Conclusão.....	67
5. Referências.....	68
6. Apêndices .....	71
Considerações Finais .....	74

## Resumo

O consumo regular de frutas, hortaliças e grãos com altos teores de substâncias antioxidantes, como os compostos fenólicos, vitamina C e Carotenoides, tem sido associado a diversos benefícios à saúde humana. Sua presença na alimentação pode auxiliar na proteção do organismo contra o estresse oxidativo, evitando e prevenindo assim, uma série de distúrbios crônico-degenerativos. Em vegetais pode ocorrer variação no conteúdo de compostos bioativos, dependendo da variedade genética, condições de cultivo, clima, estágio de maturação e fatores de pós-colheita. O objetivo deste trabalho foi avaliar três cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.), sendo elas a alface americana, crespa e lisa, e também três variedades de condimentos, sendo eles o coentro (*Coriandrum sativum* L.), a salsa (*Petroselinum crispum*, (Mill.) Nym.) e a cebolinha (*Allium fistulosum* L.) cultivados em dois períodos quanto ao conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT), capacidade antioxidante total (CAT), ácidos fenólicos e flavonoides, clorofilas e Carotenoides. Três lotes de cada amostra foram adquiridos no comércio local de Araraquara-SP em dois períodos de cultivo: agosto de 2013 [1º período]; e janeiro/fevereiro de 2014 [2º período] e suas folhas (partes comestíveis) foram secas para as determinações. As análises foram realizadas individualmente em triplicata e os resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. O coentro, a alface lisa e a alface crespa apresentaram teores elevados de CFT e CAT. Poucas hortaliças apresentaram diferença entre o período de cultivo nas análises realizadas, com destaque para o coentro. O teor de clorofila total dos condimentos foi maior nas amostras analisadas no 2º período. Entre as três variedades de alface, a alface crespa apresentou os maiores teores de CFT e CAT enquanto que a alface americana apresentou os menores. Conclui-se que é de grande importância o conhecimento dos diferentes compostos bioativos presentes nas hortaliças e a variação de seu teor em relação ao período de cultivo analisado.

**Palavras-chave:** compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante total, hortaliças.

## Abstract

Regular consumption of fruits, vegetables and grains rich in antioxidants, such as phenolic compounds, vitamin C and carotenoids, has been associated with many benefits to human health. His presence in the diet can help in protecting the body against oxidative stress, avoiding and preventing so, a number of chronic degenerative disorders. In plants there can be variations in the content of bioactive compounds, depending on the genetic variety, growing conditions, climate, maturity stage and postharvest factors. The objective of this study was to evaluate three lettuce cultivars (*Lactuca sativa* L.), which were the lettuce american, curly and smooth, and also three varieties of condiments, coriander (*Coriandrum sativum* L.), parsley (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym.) and spring onion (*Allium fistulosum* L.) cultivation in two periods on the content of phenolic compounds (TPC), total antioxidant capacity (TAC), phenolic acids and flavonoids, chlorophyll and carotenoids. Three lots of each sample were acquired in the local market of Araraquara-SP in two cultivation periods: August 2013 [1<sup>o</sup> period]; and January/February 2014 [2<sup>o</sup> period] and its leaves (edible parts) were dried for determination. Analyses were performed individually in triplicate and the results expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Coriander, Smooth lettuce and Curly lettuce showed high levels of and TAC. Few vegetables showed differences between the cultivation period in the analyzes, especially coriander. The total chlorophyll content of condiments was higher in the samples analyzed in the 2<sup>o</sup> period. Among the three varieties of lettuce, the curly lettuce showed the highest TPC and TAC levels while the cabbage lettuce had the lowest. It follows that it is of great importance to know the different bioactive compounds present in the vegetables and the variation of their content in the analyzed cultivation period.

**Keywords:** total phenolics, total antioxidant capacity, vegetables.

## *CAPÍTULO I*

---

# *REVISÃO BIBLIOGRÁFICA*

## 1. Introdução

O consumo de frutas e hortaliças é de grande importância para a saúde humana, pois esses alimentos apresentam uma grande variedade de nutrientes. As hortaliças constituem altos teores de vitaminas, como as vitaminas A, C, E e as do complexo B, além de minerais, como ferro, cálcio, potássio e magnésio. Fornecem ainda, fibras que auxiliam no processo digestivo (ZULETA et al., 2007; VINSON et al., 1998). São importantes fontes de pigmentos e compostos antioxidantes, como os compostos fenólicos e os Carotenoides (VINSON et al., 1998) e o seu consumo na dieta está relacionado com a diminuição de câncer de próstata (COHEN; KRISTAL; STANFORD, 2000). Esses benefícios nutricionais são partes das razões pela grande procura e aumento no consumo desses vegetais.

Os antioxidantes naturais vem ganhando destaque cada vez mais entre os consumidores e os pesquisadores, pois são encontrados principalmente em alimentos como frutas e vegetais, consideradas fontes importantes dessas substâncias. Nesses alimentos são encontrados os três principais grupos de antioxidantes: as vitaminas, as substâncias fenólicas e os Carotenoides (THAIPONG et al., 2006).

Os efeitos biológicos dos compostos fenólicos em dietas estão relacionados com a atividade anti-carcinogênica, anti-microbiana e anti-inflamatória (HERRERO; IBANEZ; CIFUENTES, 2005) sendo indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e inflamatórias (VAHER; KOEL, 2003; SCALBERT; WILLIAMSON, 2000; BRAVO, 1998).

Os Carotenoides apresentam propriedades que favorecem a manutenção da saúde ao exercer funções fisiológicas, atuando como antioxidantes, precursores da vitamina A e fotoprotetores. Desta forma os Carotenoides têm sido frequentemente utilizados como biomarcadores de estados de doença, pois sinalizam o estado nutricional

e a saúde do indivíduo humano (VON LINTIG, 2010). Outro composto bioativo é a clorofila *a* e seus derivados que apresentam propriedades antioxidantes, tendo papel fundamental na prevenção do câncer (HOSIKIAN et al., 2010; FERRUZZI; BLAKESLEE, 2007; LANFER-MARQUEZ; BARROS; SINNECKER, 2005).

Nos vegetais pode ocorrer variação no conteúdo de compostos bioativos, este fato é ocasionado pela variedade genética, condições de cultivo, clima, estágio de maturação e fatores de pós-colheita (CAPECKA; MARECZEK; LEJA, 2005; BAUR et al., 2004; LEE; KADER, 2000; BRAVO, 1998).

Com isso, cresce o interesse da população pela ingestão de alimentos com ações saudáveis sobre o organismo, como substâncias antioxidantes provenientes de produtos vegetais, e também devido a rejeição do uso de antioxidantes sintéticos pelos consumidores cresce o interesse na obtenção de substâncias antioxidantes provenientes de produtos vegetais.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo deste estudo foi avaliar e quantificar o conteúdo de compostos bioativos e a capacidade antioxidante de amostras de hortaliças analisadas em dois períodos de cultivo.

### **2.2. Objetivo específicos**

- Verificar o efeito do período de cultivo (agosto de 2013 [1º período]; e janeiro/fevereiro de 2014 [2º período]) no conteúdo de compostos bioativos e capacidade antioxidante das hortaliças estudadas.

- Comparar três variedades de alface (americana, lisa e crespa) quanto ao conteúdo de compostos fenólicos, Carotenoides e capacidade antioxidante.
- Comparar três espécies de condimentos (coentro, salsa e cebolinha) quanto ao conteúdo de compostos fenólicos, Carotenoides, clorofila e capacidade antioxidante.
- Determinar e quantificar os ácidos fenólicos e flavonoides das hortaliças por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

### **3. Revisão de Literatura**

#### **3.1. Características gerais das hortaliças**

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define como hortaliças plantas herbáceas das quais uma ou mais partes são utilizadas como alimentos na sua forma *in natura*, onde recebe as seguintes designações: verduras, quando as partes verdes são utilizadas; legumes, quando o fruto ou a semente são utilizados; tubérculos e rizomas, quando as partes subterrâneas são utilizadas (BRASIL, 2014).

O consumo de frutas e hortaliças é de grande importância para a saúde humana, pois esses alimentos possuem uma grande variedade de nutrientes. As hortaliças constituem altos teores de vitaminas, como as vitaminas A, C, E e as do complexo B, além de minerais, como ferro, cálcio, potássio e magnésio. Além disso, fornecem fibras que auxiliam no processo digestivo (ZULETA et al., 2007; VINSON et al., 1998). São importantes fontes de pigmentos e compostos antioxidantes, como os compostos fenólicos e os Carotenoides (VINSON et al., 1998) e o seu consumo na dieta humana reduz significativamente o risco de cânceres de próstata (COHEN; KRISTAL;

STANFORD, 2000). Esses benefícios nutricionais são partes das razões pela grande procura e aumento no consumo desses vegetais.

Os vegetais possuem dois tipos de metabólitos, os primários e os secundários. Os metabólitos primários são responsáveis pela sobrevivência do vegetal, estando relacionado ao processo de fotossíntese, respiração e absorção de nutrientes enquanto que os metabólitos secundários estão relacionados aos mecanismos de defesa dos vegetais. Os terpenos, os compostos fenólicos e os compostos que contem nitrogênio estão no grupo dos metabólitos secundários e são distribuídos de acordo com a rota biológica que a planta realiza (NASS, 2007; TAYZ; ZEIGER, 2004).

### **3.2. Alface**

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma das hortaliças folhosas mais populares e consumidas mundialmente, principalmente na forma de salada. (HENZ; SUINAGA; 2009; JAGGUER et al., 1941). No Brasil, informações levantadas por Sala e Costa (2012) apontam que os principais tipos de alface cultivados em ordem de importância econômica são a crespa, americana, lisa e a romana.

A alface é originária da região do mediterrâneo e foi trazida para o Brasil pelos portugueses. Registros de 4500 a.C indicam que a alface já era utilizada como planta medicinal e depois como alimento (RUBATZKY; YAMAGUCHI, 1963). Essa hortaliça é uma planta anual, de clima ameno e pertence à família Asteraceae (HENZ; SUINAGA; 2009; JAGGUER et al., 1941). Suas variedades apresentam folhas lisas ou crespas, com colorações variando do verde claro ao escuro e algumas apresentam coloração roxa, com formação ou não de cabeça. (FILGUEIRA, 2000; RUBATZKY; YAMAGUCHI, 1963).

As alfaces da variedade crespa (*L. sativa* L. var *crespa*) possuem folhas bem consistentes, crespas e não apresentam formação de cabeça. As alfaces lisas (*L. sativa*



L. var lisa) ou manteigas apresentam suas folhas muito delicadas e lisas, com aspecto amanteigado e coloração verde-amarelada, podendo formar ou não cabeça. As alfaces da variedade americana (*L. sativa* L. var americana) são caracterizadas pelas folhas crespas, consistentes e nervuras destacadas, além de apresentar cabeça compacta, sendo a preferida pelas redes de *fast-food* (RESENDE et al., 2007).

### 3.3. Condimentos

Os condimentos são mundialmente utilizados na cozinha para proporcionar ou intensificar sabor aos alimentos. Eles apresentam propriedades antimicrobianas e antioxidantes, conferindo a preservação e conservação dos alimentos (MORAIS et al., 2009). A atividade antioxidante que eles apresentam está diretamente relacionada com os níveis de compostos fenólicos que ocorrem naturalmente nessas plantas (MARANGONI; MOURA, 2011).

Os condimentos podem ser adicionados aos alimentos de diversas maneiras, como extratos, moídos ou na sua forma natural. Podendo apresentar diferentes compostos em quantidades variadas e com diferentes atividades antioxidantes, influenciado pela maneira de uso (MADSEN; BERTELSEN, 1995).

O coentro (*Coriandrum sativum* L.) é originário da região do mediterrâneo e suas folhas apresentam coloração verde clara amarelada. Sua cultura se adapta bem em regiões de clima quente e se mostra intolerante a baixas temperaturas (RUBATZKY; YAMAGUCHI, 1963). É muito consumido em diversas regiões do Brasil, especialmente no Norte, Nordeste e em menor proporção no Sudeste. Na culinária, suas folhas e sementes são utilizadas na composição e decoração de diversos pratos típicos e regionais, também utilizadas como especiarias pois ajudam a prevenir a deterioração oxidativa dos

alimentos, além do uso como temperos. O coentro possui altos teores de vitaminas A, B1, B2 e C, além de cálcio e ferro (LIMA et al., 2007; WANGENSTEEN; SAMUELSEN; MALTERUD, 2004; NASCIMENTO; PEREIRA, 2003; FILGUEIRA, 2000; PEDROSA; NEGREIROS; NOGUEIRA, 1984).

O condimento conhecido como cheiro verde é um conjunto das folhas de cebolinha (*Allium fistulosum* L.) com folhas de salsa (*Petroselinum crispum*, (Mill.) Nym.). É comercializado *in natura* e muito utilizado na culinária na forma fresca, como decoração, tempero e cozido, sendo muito apreciado pela população e cultivado em quase todos os lares brasileiros (HEREDIA et al., 2003).

A salsa é originária da região do mediterrâneo e vem sendo utilizada há séculos principalmente por suas propriedades medicinais e aromáticas, além de apresentar altos teores de pró-vitamina A e vitamina C. Suas folhas apresentam grandes diversidades de formas e coloração verde escura brilhante. A origem da cultura de cebolinha vem da China e é caracterizada pela presença de bulbos brancos e alongados, com folhas verdes, longas e cilíndricas, apresentando propriedades iguais as da salsa (RUBATZKY; YAMAGUCHI, 1963).

### **3.4. Compostos bioativos**

#### **3.4.1. Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos estão presentes em frutas, vegetais e outras plantas, sendo considerados produtos secundários do metabolismo vegetal, pois apresentam suas origens orgânicas relacionadas com a rota metabólica do ácido chiquímico e ao metabolismo do fenilpropanóides (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; ANTOLOVICH et al., 2000; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Esses compostos participam de processos responsáveis pela coloração, amargor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa em vários alimentos (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; PELEG; BODINE; NOBLE, 1998), sendo importantes na qualidade sensorial e nutricional de frutas e hortaliças (TOMAS-BARBERAN; FERRERES; GIL, 2000).

Nos vegetais, os fenólicos estão presentes na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas, englobando desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização (BRAVO, 1998).

Estruturalmente, os fenólicos são substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila, apresentando estrutura variável, podendo divergir de uma molécula fenólica simples, para um polímero complexo de massa molecular elevada (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; HERRERO; IBANEZ; CIFUENTES, 2005).

Os compostos fenólicos são considerados antioxidantes, inclusos na categoria de interruptores de radicais livres, apresentando grande eficiência na prevenção da oxidação, conferindo aos alimentos, e ao organismo, propriedade antioxidante (WROLSTAD; DURST; LEE, 2005; SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992).

Nas dietas ricas em frutas e verduras, a presença dos ácidos fenólicos e dos flavonoides, pode contribuir para efeitos protetores na saúde auxiliando na promoção de saúde das pessoas. Os ácidos fenólicos potencialmente envolvidos nesses efeitos benéficos são o ácido gálico, cumárico, caféico e o clorogênico (CROZIER et al., 2006).

O teor de compostos fenólicos pode variar entre os vegetais folhosos e estes podem ser incluídos na dieta como potenciais fornecedores de antioxidantes naturais (KHANAM et al., 2012).

As metodologias para determinação de compostos fenólicos com o reagente de Folin-Ciocalteu são as mais utilizadas. O mecanismo básico desse método é a ocorrência da reação de oxirredução, em meio básico, com formação de um produto de coloração azul intensa, a qual é medida em espectrofotômetro na região do visível. Quanto maior for o conteúdo de compostos fenólicos, maior será a intensidade da coloração azul do produto (ROGINSK; LISSI; 2005; BONOLI et al., 2004).

### 3.4.2 Clorofila

Clorofilas são compostos bioativos presentes naturalmente em plantas, proporcionando a sua coloração específica. Elas são os principais pigmentos absorventes de luz em algas, bactérias fotossintéticas e vegetais, sendo responsáveis pelo processo da fotossíntese. (CHITARRA; CHITARRA, 2005; SCHOEFS, 2002).

Existem dois principais tipos de clorofila, a clorofila *a* e clorofila *b*. Nas plantas verdes folhosas são encontradas a clorofila *a* e a clorofila *b* na proporção aproximada de 3:1, diferindo entre si no substituinte do carbono C-3. A clorofila *a* apresenta um grupo metil, enquanto que a clorofila *b* apresenta um grupo formil (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

A identificação da clorofila é baseada na absorção da luz visível. Os espectros visíveis das clorofilas são caracterizados pelas bandas de absorção máxima da luz entre 660 a 665 nm para clorofila *a* e entre 642 a 652 nm para clorofila *b* (HUMPHREY, 1980). A espectroscopia de absorção é a maneira mais simples de identificar os principais pigmentos presentes numa mistura e a concentração do pigmento é calculada a partir de um conjunto de equações definidas (SCHOEFS, 2002).

Na indústria de alimentos as clorofilas são utilizadas como corantes alimentares naturais devido à sua coloração verde (HOSIKIAN et al., 2010; SPEARS, 1988). A

clorofila *a* e seus derivados (feofitina e feoforbídeo) apresentam propriedades antioxidantes, tendo papel fundamental na prevenção do câncer (HOSIKIAN et al., 2010; FERRUZZI; BLAKESLEE, 2007; LANFER-MARQUEZ; BARROS; SINNECKER, 2005).

### **3.4.3. Carotenoides**

Os carotenóides são um conjunto de pigmentos lipossolúveis que apresentam, cores amarela, laranja e vermelha sendo as frutas e hortaliças as principais fornecedores destes compostos (CARLSEN et al., 2011; KRINSKY; JOHNSON, 2005). Nas plantas verdes os Carotenoides estão localizado nos cloroplastos como uma mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ -carotenos,  $\beta$ -criptoxantina, luteína, zeaxantina, violaxantina e neoxantina estando associados as proteínas e normalmente eles são mascarados pela presença de outros pigmentos clorofílicos dominantes (MALDONADO-ROBLEDO et al., 2003).

Os Carotenoides são sintetizados pelas plantas e os animais devem obtê-los desses alimentos. O conteúdo de Carotenoides nas frutas e vegetais depende de vários fatores como: variedade genética, estágio de maturação, armazenamento pós-colheita, processamento e preparo (CAPECKA; MARECZEK; LEJA, 2005).

Os Carotenoides têm sido extensivamente estudados em um grande número de produtos alimentares devido às suas propriedades benéficas à saúde. E ainda, são utilizados pelas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética como corantes naturais e para o enriquecimento de alimentos (NIIZU, 2003). Além disso, esses compostos exercem funções fisiológicas, atuando como antioxidantes, precursores da vitamina A e fotoprotetores. Desta forma os Carotenoides têm sido frequentemente utilizados como biomarcadores de estados de doença, pois sinalizam o estado nutricional e a saúde do indivíduo humano (VON LINTIG, 2010).

Os Carotenoides são representados por um grupo de compostos polifenólicos que proporcionam um envelhecimento saudável quando incluído em dietas (RAO; RAO, 2007). Exercem um papel fundamental pois são precursores de vitamina A, sendo o  $\beta$ -caroteno o que possui maior atividade como pró-vitamina A. Frutas e vegetais são exemplos de alimentos onde pode-se encontrar Carotenoides pró-vitamínicos. Sua ingestão está relacionada com a prevenção do câncer, catarata, arterosclerose e processos de envelhecimento (BARBOSA-FILHO et al., 2008). O  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina são considerados Carotenoides pró-vitamínicos A (TANAKA et al., 2012; KIM; GIRAUD; DRISKELL, 2007). Os Carotenoides luteína e zeaxantina estão relacionados com a proteção da degeneração macular e catarata, além da diminuição do risco de doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer (TANAKA et al., 2012).

Segundo dados epidemiológicos, o  $\beta$ -caroteno, licopeno, luteína e zeaxantina, demonstraram contribuir para a prevenção de doenças degenerativas, dentre elas as doenças cardiovasculares, diabetes e alguns tipos de câncer (CHAROENSIRI et al., 2009).

As hortaliças verdes, folhosas ou não, possuem um perfil qualitativo definido, sendo o  $\beta$ -caroteno, a violaxantina, a luteína e a neoxantina os Carotenoides majoritários. Podem conter também Carotenoides minoritários como  $\alpha$ -caroteno,  $\alpha$ -criptoxantina,  $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina, anteraxantina e luteína-5,6-epóxido. Nestes vegetais, os Carotenoides encontram-se em cloroplastos e não são esterificados (RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

### **3.5. Atividade antioxidante**

Os antioxidantes são substâncias que podem prevenir ou retardar o processo de oxidação de outras moléculas nas etapas de iniciação ou propagação de reações de

oxidação em cadeia causados por radicais livres, ajudando o organismo a reduzir certos danos oxidativo no corpo humano (ALI et al., 2008; NAMIKI, 1990).

Produzidos como metabólicos secundários de plantas, os antioxidantes naturais possuem uma ampla aplicação no setor farmacêutico, cosmético e nutricional. Atualmente, têm ganhado uma importância crescente na indústria de alimentos, pois os antioxidantes sintéticos como o BHA (butil-hidroxianisol), o BHT (butil-hidroxitolueno) e o TBHQ (terc-butilhidroquinona) tem despertado preocupações quanto as suas doses de segurança e toxicidade (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Ainda não há um método padrão para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, dessa forma, vários ensaios têm sido testados para essa finalidade, como o sistema  $\beta$ -caroteno/ ácido linoléico, o ABTS, o DPPH, o FRAP, ORAC entre outros (MOON; SHIBAMOTO, 2009). Segundo pesquisas que analisaram a atividade antioxidante em frutas e vegetais, os métodos mais utilizados são o ensaio do DPPH e o ensaio do ABTS devido a sua relativa simplicidade por serem métodos práticos, rápidos e sensíveis (WU et al., 2006; HUANG; OU; PRIOR, 2005 ; STRATIL; KLEJDUS; KUBAN; ARNAO, 2006). Esses ensaios medem a habilidade do antioxidante de sequestrar o radical e impedir a reação dele com o substrato, onde a absorvância da reação decai a medida que os radicais vão sendo consumidos (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

O DPPH é um radical de hidrogênio de cor violeta e a redução desse radical, visa avaliar a habilidade que uma substância tem de sequestrar o radical livre estável DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), sendo os resultados da atividade sequestrante obtidos através da redução da absorvância e conseqüentemente perda de cor do radical (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

O ensaio ABTS avalia a atividade antioxidante através da captura do radical 2,2-azinobis (3-etilbenzoatiazolina-6-ácido sulfônico) pela inibição do cátion ABTS na

presença de antioxidantes na reação (KUSKOSKI et al., 2006). O radical ABTS é gerado diretamente por uma reação de persulfato de potássio formando um cromóforo verde azulado (FREITAS et al., 2006; VILLANO et al., 2004). A mistura do antioxidante com o radical faz com que ocorra a redução do ABTS<sup>•+</sup> a ABTS com a perda da coloração (HUANG et al., 2005).

#### 4. Referências

ALI, S. S.; KASOJU, N.; LUTHRA, A.; SINGH, A.; SHARANABASAVA, H.; SAHU, A. Indian medicinal herbs as source of antioxidants. **Food Research International**, v. 41, p. 1-15, 2008.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Analyst**, v. 125, p. 989–1009, 2000.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191–203, 2006.

BARBOSA-FILHO, J. M.; ALENCAR, A. A.; NUNES, X. P.; TOMAZ, A. C. A.; SENA-FILHO, J. G.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; SOUZA, M. F. V.; LEITÃO-DA-CUNHA, E. V. Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 135-154, 2008.

BAUR, S.; KLAIBER, R. G.; KOBLO, A.; CARLE, R. Effect of different washing procedures on phenolic metabolism of shredded, packaged iceberg lettuce during storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7017–7025, 2004.

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 16, p. 5195-5200, 2004.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução CNNPA nº12 de 1978. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)> Acesso em: 10/03/2014.



BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

CAPECKA, E.; MARECZEK, A.; LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. **Food Chemistry**, v. 93, n. 2, p. 223-226, 2005.

CARLSEN, M. H.; KARLSEN, A.; LILLEGAARD, I. T., GRAN, J. M.; DREVON, C. A.; BLOMHOFF, R.; ANDERSEN, L. F. Relative validity of fruit and vegetable intake estimated from an FFQ, using carotenoid and flavonoid biomarkers and the method of triads. **British Journal of Nutrition**, v. 105, p. 1530-8, 2011.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, v. 113, p. 859-871, 2009.

CHAROENSIRI, R.; KONGKACHUICHA, R.; SUKNICOM, S.; SUNGPUAG, P. Beta-carotene, lycopene, and alpha-tocopherol contents of selected Thai fruits. **Food Chemistry**, v. 113, p. 202-207, 2009.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2.ed. rev. Lavras: UFLA. p.783, 2005.

COHEN, J. H.; KRISTAL, A. R.; STANFORD, J. L. Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 1, 2000.

CROZIER, A.; YOKOTA, T.; JAGANATH, I. B.; MARKS, S. C.; SALTMARSH, M.; CLIFFORD, M. N. Secondary metabolites in fruits, vegetables, beverages and other plant based dietary components. In **Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet**; CROZIER, A., CLIFFORD, M. N., ASHIHARA, H., EDS.; BLACKWELL: Oxford, U.K., p. 208-302, 2006.

FERRUZZI, M. G.; BLAKESLEE, J. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. **Nutrition Research**, v. 27, n. 1, p. 1-12, 2007.

FILGUEIRA, F. A. R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, p. 402, 2000.

FREITAS, G. L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Avaliação da atividade antioxidante de diferentes cervejas aplicando os métodos ABTS e DPPH. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 17, n. 3, p. 303-307, 2006.

HENZ, G. P.; SUINAGA, F. A. Tipos de alface cultivados no Brasil. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças (Embrapa Hortaliças. Comunicado Técnico, 75). p. 7, 2009.

HEREDIA Z., N. A.; VIEIRA, M. C.; WEISMANN, M.; LOURENÇÃO, A. L. F. Produção e renda bruta de cebolinha e de salsa em cultivo solteiro e consorciado. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 574-577, 2003.

HERRERO, M.; IBANEZ, E.; CIFUENTES, A. Analysis of natural antioxidants by capillary electromigration methods. **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 883-897, 2005.

HOSIKIAN, A.; LIM, S.; HALIM, R.; DANQUAH, M. K. Chlorophyll extraction from microalgae: A review on the process engineering aspects. **International Journal of Chemical Engineering**, Article ID 391632, p. 11, 2010.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays – review **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUMPHREY, A. M. Chlorophyll. **Food Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 57–67, 1980.

JAGGER, I. C.; WHITAKER, T. W.; USELMAN, J. J.; OWEN, W. M. The Imperial strains of lettuce. United States Department of Agriculture, Washington, p.15 (Circular, 596), 1941.

KHANAM, U. K. S.; OBA, S; YANASE, E; MURAKAMI, Y. Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. **Journal Functional Foods**, v. 4, p. 979–987, 2012.

KIM, Y.; GIRAUD, D. W.; DRISKELL, J. A. Tocopherol and carotenoid contents of selected Korean fruits and vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, Netherlands, v. 20, n. 6, p. 458-465, 2007.

KRINSKY N. I.; JOHNSON E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, p. 459–516, 2005.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.

LANFER-MARQUEZ, U. M.; BARROS, R. M. C.; SINNECKER, P. Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. **Food Research International**, v. 38, n. 8-9, p. 885–891, 2005.

LEE, S. K.; KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest Biology Technology**, v. 20, n. 3, p. 207-220, 2000.

LIMA, J. S. S.; NETO, F. B.; NEGREIROS, M. Z.; FREITAS, K. K. C.; JÚNIOR, A. P. B. Desempenho agroecômico de coentro em função de espaçamentos e em dois cultivos, **Revista Ciência Agrônômica**, v. 38, n. 4, p. 407-413, 2007.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 5, p. 1655-1666, 2009.

MALDONADO-ROBLEDO, G.; RODRIGUEZ-BUSTAMANTE, E.; SANCHEZ CONTRERAS A.; RODRIGUEZ-SONOJA, R.; SANCHEZ, S. Production of tobacco aroma from lutein. Specific role of the microorganisms involved in the process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, n. 5-6, p. 484-488, 2003.

NAMIKI, M. Antioxidants/anti-mutagens in food. Critical Reviews. **Food Science and Nutrition**, v. 29, p. 273–300, 1990.

NASCIMENTO, W. M.; PEREIRA, R. S. Coentro: produção e qualidade de sementes. In **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 2, 2003.

NIIZU, P. Y. Fontes de Carotenoides Importantes para a Saúde Humana. Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

PEDROSA, F. S.; NEGREIROS, M. Z.; NOGUEIRA, I. C. C. Aspectos da cultura do coentro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 10, n. 120, p.75-78, 1984.

PELEG, H., BODINE, K. K., NOBLE, A. C. The influence of acido on adstringency of alum and phenolic compounds. **Chemical Senses**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 371-378, 1998.

RAO A. V.; RAO L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacol Res**, v. 55, p. 207–16, 2007.

RESENDE, F. V., SAMINÊZ, T. C. O.; VIDAL, M. C.; SOUZA, R. B.; CLEMENTE, F. M. V. Cultivo do alface em sistema orgânico de produção. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 56), p. 16, 2007.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 21, n. 3, p. 933-956, 1996.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. Fontes brasileiras de carotenóides: tabela brasileira de composição de Carotenoides em alimentos. Brasília:MMA/SBF, 2008.

ROGINSK, Y. V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.

RUBATZKY, V. E.; YAMAGUCHI, M. World Vegetables: principles, production and nutritive values. 2. rev. Gaithersburg: Aspen publication, 1963.

SALA, F. C.; COSTA, C. P. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 187-194, 2012.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of nutrition**, v. 103, p. 2073S-2085S, 2000.

SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Food Science and Technology**, v. 13, p. 361-371, 2002.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. Critical Reviews. **Food Science Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SPEARS, K. Developments in food colourings: the natural alternatives. **Trends in Biotechnology**, v. 6, n. 11, p. 283-288, 1998.

STRATIL, P.; KLEJDUS, B.; KUBAN, V. Determinations of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 3, p. 607-616, 2006.

TANAKA, T.; SHNIMIZU, M.; MORIWAKI, H. Cancer Chemoprevention by Carotenoids. **Molecules**, v. 17, p. 3202-3242, 2012.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 669–675, 2006.

TOMAS-BARBERAN, F. A., FERRERES, F., GIL, M. I. Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing. In: A. Rahman (Ed.) *Bioactive natural products (Part D)* p. 739–795, 2000.

VAHER, M.; KOEL, M. Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 990, p. 225-230, 2003.

VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; TRONCOSO, A. M.; GARCÍA-PARRILLA, M. C. The antioxidant activity of wines determined by the ABTS method: influence of sample dilution and time. **Talanta**, v. 64, p. 501–509, 2004.

VINSON, J. A.; HAO, Y.; SU, X.; ZUBIK, L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3630–3634, 1998.

VON LINTIG, J. Colors with functions: Elucidating the biochemical and molecular basis of carotenoid metabolism. **Annual Review of Nutrition**, v. 30, p. 35–56, 2010.

WROLSTAD, R. E.; DURST, R. W.; LEE, J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 423-428, 2005.

WU, L. C.; HSU, H. W.; CHEN, Y. C.; CHIU, C. C.; LIN, Y. I.; HO, J. A. A. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. **Food Chemistry**, v. 95, p. 319–327, 2006.

ZULETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRASQUET, I.; FRÍGOLA, A. Vitamin C, vitamin A, phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice and skim milk mixture beverages marketed in Spain. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1365-1374, 2007.

MADSEN, H. L., BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, n. 8, p. 271-277, 1995.

MARANGONI, C.; MOURA, N. F.. Antioxidant activity of essential oil from *Coriandrum Sativum* L. in Italian salami. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 31, n. 1, p. 124-128, 2011.

DE MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S.; COSTA, S. M.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Braz J Pharmacognosy**, v. 19, n. 1B, p. 315-320, 2009.

## CAPÍTULO II

---

*Analytical methods applied for the  
determination of phenolic compounds  
in lettuce and  
their antioxidant activity*

## Abstract

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is one of the most popular leafy vegetables and consumed mainly in *nature* in the form of salads. Varieties have smooth or curly leaves, with colors ranging from light green to dark green and some have purple color, with training or no head. It is rich in vitamins, minerals, fiber and other phytochemicals such as phenols and natural antioxidants, so the interest of the population in eating foods with healthy actions on the body is growing. The objective of this study was to evaluate three lettuce varieties (Smooth, Curly and Cabbage) in two periods, to evaluate the total phenolic compounds (TPC), total antioxidant capacity (TAC), carotenoids and quantification of phenolic acids and flavonoids. Three lots of each sample were acquired in the local market in two seasons, 1<sup>st</sup> period (August/2013) and 2<sup>nd</sup> period (January and February/2014) and its leaves (edible parts) were dried for determination. Analyses were performed individually in triplicate and the results expressed as mean  $\pm$  standard deviation. The Curly lettuce showed the highest TPC and TAC levels while Smooth lettuce showed. The hydroxycinnamic acids were identified on lettuce, being the most predominant chlorogenic acid, following ferulic acid and caffeic acid. Among the flavonoids, rutin was the most common form found in leafy vegetables used in this study. Thus, Smooth, Curly and Cabbage lettuce can be characterized potential sources of bioactive compounds when included in the human diet. And among the three cultivars, Curly lettuce presents greater amounts of bioactive compounds.

Keywords: lettuce, bioactive compounds, antioxidants, analytical methods

## Introduction



Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is one of the most popular leafy vegetables and consumed mainly in *nature* in the form of salads and it is a good dietary source of natural antioxidants [1, 2]. In Brazil, information gathered by Sala and Costa [3] pointed out that the main types of lettuce grown in economic importance order are Curly, Cabbage and Smooth.

This vegetable is native of the Mediterranean region and was brought to Brazil by the Portuguese. Records from 4.500 BC indicate that lettuce was firstly used as a medicinal plant and later as food [4]. This vegetable is an annual plant with a mild climate and belongs to the family Asteracea [1, 3]. Varieties have smooth or curly leaves, with colors ranging from light green to dark green and some have purple color, with training or no head [5, 4].

This vegetable is rich in vitamins, minerals and other phytochemicals such as phenols and fiber, essential compounds in disease prevention and health promotion in people [6]. Also, high concentrations of antioxidants and phenolic compounds have been detected [7].

Phenolic compounds are considered antioxidants, being included in the category of free radical switches, with great efficiency in preventing oxidation, giving the food and the body antioxidant property [8, 9]. It is also reported the biological effects related to this compound in the diet as anticarcinogenic, antimicrobial and anti-inflammatory [10] that are indicated for the treatment and prevention of cancer, cardiovascular and inflammatory diseases [11, 12, 13]. Concentrations of phenolic acids in lettuce are sensitive to environmental conditions [14].

Natural antioxidants are standing out more and more between consumers and researchers, as they are mostly found in foods such as fruits and vegetables, considered important sources of this compound. These foods are found the three main groups of

antioxidants: vitamins, carotenoids and phenolic substances [15]. Thus, there is a growing interest of the population in eating foods with healthy actions on the body.

The objective of this study was to provide information about the potential use of lettuces as an effective source of natural antioxidants occurring naturally in foods; specifically to compare three different varieties of lettuce (Smooth, Curly and Cabbage) with respect to its contents of total phenolic, antioxidante capacity and identification phenolic acids and flavonoids

## **Materials and Methods**

### **Material**

The samples of lettuce were acquired in trade in Araraquara-SP, Brazil in two different periods of cultivation: August 2013 [1<sup>st</sup> period]; and January/February 2014 [2<sup>nd</sup> period]. Three lettuce cultivares (*Lactuca sativa* L.) were used, and distinct as the morphological type (Embrapa, 2009): smooth loose lettuce (Smooth), curly loose lettuce (Curly) and cabbage curly lettuce (Cabbage). The average ambient temperature was 19.6 °C (12.5 °C minimum and maximum 26.8 °C) for the first period (1<sup>st</sup> period) and 26.0 °C (minimum 20.6 and maximum 31.4 °C) for the second period (2<sup>nd</sup> period) [16].

Three lots collected from each sample and aerial parts (edible parts) were analyzed. The samples were washed and dried in an air circulation oven (320 UP, Fanem) for 72 hours at 40 °C. Dried samples were ground in a blender (Laboratory Blender), sieved and stored in glass jars at room temperature and away from light. Analyses were performed in three lots in triplicate.

### **Extraction of phenolic and antioxidants**

The extraction of total phenolics compounds and antioxidant was carried out with 1 g of sample in 25 mL of 30% methanol in water bath with stirring for 1 hour at 60 ° C (Dubnoff bath ET-053, Tecnal) after centrifuged (HIMAC CR22CII, Hitachi) for 30 minutes at 27.000 g and filtered directly into a 25 mL volumetric flask. The extracts were stored at -18 ° C [5].

### **Determination of total phenolic content**

The total phenolics content was determined according to Singleton and Rossi [17]. The calibration curve was prepared using gallic acid in concentrations ranging from 2.0 to 8.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and the results were expressed as milligrams of gallic acid (GA) per gram of dry weight (DW).

### **Total antioxidant capacity**

#### **DPPH and ABTS**

The total antioxidant capacity by DPPH was determined according to the method described by Brand-Williams [12] with modifications. In the dark, 0.1 ml of the extracts was transferred to tubes with 3.9 mL of 0.006 mM DPPH radical and followed by homogenization. Readings were taken after 30 minutes in a spectrophotometer (DU®640 Spectrophotometer, Beckman) at a wavelength of 515 nm. Two calibration curves were prepared by using Trolox and ascorbic acid. The curves showed concentrations ranging from 0.5 to 4.6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The results were expressed as milligrams of ascorbic acid (AA) and/or Trolox (TR) per gram DW.

In the ABTS test, the total antioxidant capacity was determined according to the method described by Rufino et al., [18]. Two standard curves were prepared (ascorbic acid and trolox). The ascorbic acid calibration curve was prepared with concentrations ranging

from 0.05 to 3.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and the results were expressed as milligrams of AA per gram DW. A Trolox calibration curve showed concentrations ranging from 0.05 to 5.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and results were expressed in mg of TR per gram DW.

### **Determination of total carotenoids**

1 g of dry sample was weighed and extraction was performed with pure acetone cooled using vortex until complete extraction of the pigments. The carotenoids were transferred into petroleum ether and brought to volume in a volumetric flask. The absorbance was read with a spectrophotometer (DU@640 Spectrophotometer, Beckman) at 450 nm and the content of carotenoid expressed in  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  based concerning terms of  $\beta$ -carotene ( $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  the 2592 in petroleum ether), applying Beer Law.

### **Determination and quantification of phenolic acids and flavonoids by HPLC**

The extraction of the compounds was performed with 1 g of sample in 25 mL of 80% methanol by vortexing for 4 minutes, after centrifuged (HIMAC CR22CII, Hitachi) for 15 minutes at 26,723.25 g and filtered directly into a 25 mL volumetric flask. The extracts were filtered through Millipore membrane 0.22 microns and analyzed.

We used a High pressure liquid chromatography (Shimadzu, Kyoto, Japan) controlled by Class-VP software equipped with pump, autosampler and photodiode array detector (DAD). The analysis was conducted using Thermo<sup>®</sup> C18 column (4.6 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), maintained at 25 °C and the injected sample volume was 20  $\mu\text{L}$ .

The mobile phase used was acetic acid solution 2% (A) and acetonitrile (B) with the following gradient: initially 90% A and 10% B; 0-7 minutes 90% A and 10% B; 7-15 minutes 85% A and 15% B; 15-32 minutes 45% A and 55 B; 32-38 minutes 25% A and

75% B; 38-50 minutes 90% A and 10% B with a flow rate of 0.5 ml/min. The mobile phases and standards were filtered before injection at 0.22 µm millipore membrane.

The wavelengths used for detection were 280, 320 and 360 nm. The standards used were phenolic acids (caffeic, ferulic and chlorogenic) and flavonoids (rutin and apigenin). Compounds were identified and quantified by conventional retention times using appropriate standards. The results were expressed as µg.g<sup>-1</sup> DW.

### **Statistical Analysis**

The whole experiment was conducted with three lots of samples individually analyzed in triplicate and the results were expressed as means ± SD (standard deviation). Statistical analysis was performed using the software Origin<sup>®8</sup>. The results were submitted to analysis of variance (ANOVA), assuming p <0.05 (5%), followed by comparison of means by Tukey test.

## **Results and discussion**

### **Total phenolic content**

The amount of total phenolic content, estimated with Folin-Ciocalteu varied greatly between selected vegetables (Table 1). The total phenolic content ranged from 3.06 to 11.99 mg AG.g<sup>-1</sup> DW for the 1<sup>st</sup> period and from 3.65 to 13.58 mg AG.g bs<sup>-1</sup> for the 2<sup>nd</sup> period.

**Tabela 1.** Total antioxidant capacity and total phenolics in lettuce analyzed in two periods of cultivation: August 2013 [1<sup>st</sup> period]; and January / February 2014 [2<sup>nd</sup> period]<sup>1</sup>.

Vegetable/ Period	Total antioxidant capacity (mg.g <sup>-1</sup> DW)				Total phenolics (mg AG.g <sup>-1</sup> DW)
	Trolox		Ascorbic acid		
	DPPH	ABTS	DPPH	ABTS	
<b>Cabbage lettuce</b>					
1 <sup>st</sup> period	4.48 ± 0.52 <sup>a</sup>	2.21 ± 0.26 <sup>a</sup>	3.19 ± 0.36 <sup>a</sup>	1.99 ± 0.20 <sup>a</sup>	3.06 ± 0.27 <sup>a</sup>
2 <sup>nd</sup> period	3.90 ± 0.53 <sup>a</sup>	2.02 ± 0.51 <sup>a</sup>	2.79 ± 0.30 <sup>a</sup>	1.84 ± 0.39 <sup>a</sup>	3.65 ± 0.49 <sup>a</sup>
<b>Smooth lettuce</b>					
1 <sup>st</sup> period	12.01 ± 3.92 <sup>a</sup>	11.72 ± 1.58 <sup>a</sup>	9.54 ± 2.67 <sup>a</sup>	10.46 ± 1.23 <sup>a</sup>	9.73 ± 1.29 <sup>a</sup>
2 <sup>nd</sup> period	17.46 ± 3.42 <sup>a</sup>	9.56 ± 2.00 <sup>a</sup>	12.60 ± 2.40 <sup>a</sup>	8.79 ± 1.56 <sup>a</sup>	9.45 ± 1.62 <sup>a</sup>
<b>Curly lettuce</b>					
1 <sup>st</sup> period	15.14 ± 5.24 <sup>a</sup>	13.85 ± 1.03 <sup>a</sup>	11.67 ± 3.57 <sup>a</sup>	12.12 ± 0.80 <sup>a</sup>	11.99 ± 1.25 <sup>a</sup>
2 <sup>nd</sup> period	26.41 ± 7.55 <sup>a</sup>	15.21 ± 3.00 <sup>a</sup>	18.74 ± 5.10 <sup>a</sup>	13.18 ± 2.34 <sup>a</sup>	13.58 ± 2.90 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Values are means ± SD of three sample lots analysed individually in triplicate. Values with the same letter for the analyse level in the 1<sup>st</sup> period and in the 2<sup>st</sup> period for the same vegetable are not significantly different (p>0.05).

It was observed that the highest level of TPC in Curly lettuce followed by Smooth lettuce (9.73 [1<sup>st</sup> period] and 9.45 [2<sup>nd</sup> period] mg AG.g<sup>-1</sup> DW) while the lower concentration was observed in Cabbage lettuce (3.06 [1<sup>st</sup> period] and 3.65 [2<sup>nd</sup> period] mg AG.g<sup>-1</sup> DW). It can be seen that the Smooth and Curly lettuce have three and four times more phenolic compounds variety of Cabbage lettuce. The TPC showed no statistical difference (p> 0.05) between the studied periods, but the highest values were found in the 2<sup>nd</sup> period (Table 1).

### Total antioxidant capacity (TAC)

The total antioxidant capacity (TAC) reflects inhibition of the production of free radicals in a given food. The TAC was measured using DPPH and ABTS assays (Table 1), assays which are widely used because of their relative simplicity they practical, rapid and sensitive [20, 21, 22]. Also, because of the wide variation of the results the TAC between

analytical methods it is necessary to use more than one method for this determination [23], so the methods of ABTS and DPPH were those recommended in this study.

The TAC in lettuce, which were expressed as Trolox and ascorbic acid are two antioxidants widely used as reference standards, ranging from methods of analysis (Table 1). The lettuce used in this study had higher TAC values when we used the DPPH test compared with the use of ABTS test, both values expressed in Trolox as ascorbic acid. CAT values expressed in Trolox equivalents were higher than the values found in ascorbic acid equivalents for both ABTS and methods DPPH (Table 1). The Curly lettuce presented, in the two culture periods analyzed to have the highest TAC values compared to other varieties of lettuce, regardless the assay used. Cabbage lettuce contained significantly lower amounts of TAC and TPC.

Khanam et al., [24] analyzing leafy vegetables including lettuce (unidentified cultivars) had lower TAC values than those found in this study. When they used the ABTS assay they obtained 0.05 mg TR.g bs<sup>-1</sup> and 0, 03 mg AA.g<sup>-1</sup> bs and when they used DPPH, they obtained 0.02 mg TR.g bs<sup>-1</sup> and 0.01 mg AA.g bs<sup>-1</sup>. Smaller CAT values were also observed used when the test DPPH was used.

The present study provides a new approach by analyzing the total antioxidant capacity expressed in Trolox and ascorbic acid equivalent in different varieties of lettuce using two methods (DPPH and ABTS) that span multiple different oxidation products for biological mechanisms of action.

### **Phenolic acids and flavonoids**

The composition and concentration of the phenolics were determined by HPLC analysis are shown in Table 2. The hydroxycinnamic acids were identified in these leafy vegetables being the most predominant chlorogenic acid, at concentrations as high as 1.21 mg.g<sup>-1</sup> DW in Smooth lettuce, followed by Curly lettuce (1.07 mg.g<sup>-1</sup> DW) and

cabbage lettuce ( $0.35 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) in the 1<sup>st</sup> period and 2<sup>nd</sup> period the highest concentrations were found in Curly lettuce presenting  $2.99 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ , followed by Smooth lettuce ( $1.01 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) and Cabbage lettuce ( $0.59 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ).

The second most abundant hydroxycinnamic acid was caffeic acid, which reached concentrations of  $0.89 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$  Curly lettuce in the 1<sup>st</sup> period and  $1.14 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$  in Smooth lettuce in the 2<sup>nd</sup> period. The ferulic acid was also identified in the lettuce, but in lower concentrations when compared to other acids, where the Curly lettuce contained higher concentration in the 1<sup>st</sup> period ( $0.57 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) and 2<sup>nd</sup> period ( $1.11 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ).

Khanam et al., [24] identified no hydroxycinnamic acids in the sample lettuce, varieties not specified, but identified as vanillyl hydroxybenzoic acid, salicylic acid, gallic acid and p-hydroxybenzoic acid.

Among the flavonoids, rutin (quercetin-3-rutinoside) was the most common form found in leafy vegetables used in this study. The curly lettuce contained the highest rutin content in both the 1<sup>st</sup> period ( $1.59 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) and in the 2<sup>nd</sup> period ( $1.80 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ). In Smooth lettuce rutin also was identified, with higher concentration in the 2<sup>nd</sup> period ( $1.52 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) than in the 1<sup>st</sup> period ( $0.73 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ). The apigenin was detected only in Smooth lettuce with high concentrations in the 2<sup>nd</sup> period ( $4.36 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) and low in the 1<sup>st</sup> period ( $2.21 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ). In the Cabbage lettuce no flavonoids were identified. Huber et al., [25] found the presence of quercetin in Smooth lettuce ( $0.0067$  to  $0.0098 \text{ mg.g}^{-1}$ ) and Curly lettuce ( $0.0072$  to  $0.031 \text{ mg.g}^{-1}$ ) analyzed in winter and summer, and it was also observed higher value of this flavonoid in the summer period. The flavonoid kaempferol and apigenin were not detected in these samples in accordance with the non-detection in this study (data not shown). Franke et al. [26] found quercetin and kaempferol in higher concentrations in lettuce cultivar Iceberg and lower concentrations of apigenin, luteolin and kaempferol. Diets rich in flavonoids may help to improve the cellular antioxidant defenses



and neutralize the free radicals that damage cells providing the maintenance of health and consequently providing a healthy life [27, 28].

**Tabela 2.** Concentration of phenolic acids and flavonoids in lettuce analyzed in two periods of cultivation: August 2013 [1<sup>st</sup> period]; and January / February 2014 [2<sup>nd</sup> period]<sup>1</sup>.

Lettuces	Chlorogenic acid		Caffeic acid		Ferulic acid	
	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>
<b>Cabbage</b>	0.35±0.16 <sup>Ba</sup>	0.59±155.7 <sup>Ba</sup>	0.36±0.17 <sup>Ba</sup>	0.13±0.04 <sup>Ba</sup>	0.19±0.06 <sup>Bb</sup>	0.37±0.09 <sup>Ca</sup>
<b>Smooth</b>	1.21±0.22 <sup>Aa</sup>	1.01± 294.2 <sup>Ba</sup>	0.86±0.17 <sup>Aa</sup>	1.14±0.37 <sup>Aa</sup>	0.39±0.10 <sup>Aa</sup>	0.51±0.44 <sup>Ba</sup>
<b>Curly</b>	1.07±0.03 <sup>Ab</sup>	2.99±0.50 <sup>Aa</sup>	0.89±0.11 <sup>Aa</sup>	0.36±0.12 <sup>Bb</sup>	0.57±0.05 <sup>Ab</sup>	1.11±0.26 <sup>Aa</sup>
	Rutin		Apigenin			
Periods	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>		
<b>Cabbage</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
<b>Smooth</b>	0.73±0.14 <sup>Ba</sup>	1.52±0.89 <sup>Ba</sup>	2.21±0.37 <sup>a</sup>	4.36±2.18 <sup>a</sup>		
<b>Curly</b>	1.59±0.24 <sup>Aa</sup>	1.80±0.36 <sup>Aa</sup>	n.d.	n.d.		

<sup>1</sup> Values are means ± SD of three sample lots analysed individually in triplicate. Values with the same letter for the acid fenolic and flavonoid level in 1<sup>st</sup> period and 2<sup>nd</sup> period for the same vegetable are not significantly different (p>0.05). Values with the same letter in column not significantly different (p>0.05) between the lettuces; n.d.: not detected.

## Carotenoids

Carotenoids are represented by a group of polyphenolic compounds that provide a healthy aging when included in the diet [29] and fruits and vegetables major dietary source of this compound [30, 31]. The concentrations of carotenoids which were determined by spectrophotometric analysis are shown in Table 3. The total carotenoid content ranged from 36.38 to 122.75  $\mu\text{g.g}^{-1}$  DW for the 1<sup>st</sup> period, and 135.06 to 219.67  $\mu\text{g.g}^{-1}$  DW for the 2<sup>nd</sup> period. In the analyzes carried out during the 1<sup>st</sup> period the Curly lettuce presented the highest value (122.75  $\mu\text{g.g}^{-1}$  DW) of total carotenoids, followed by Smooth lettuce (112.67  $\mu\text{g.g}^{-1}$  DW) and Cabbage lettuce (36.38  $\mu\text{g.g}^{-1}$  DW), unlike in the 2<sup>nd</sup> period, the highest concentrations were found in Smooth lettuce (219.67  $\mu\text{g.g}^{-1}$  DW), followed by Cabbage lettuce (209.53  $\mu\text{g.g}^{-1}$  DW) and Curly lettuce (135.06  $\mu\text{g.g}^{-1}$  DW).

Burns et al. [32] studied originating lettuce samples of Spain (cultivar unidentified) quantified total carotenoid content of 585.7  $\mu\text{g.g}^{-1}$  DW and carotenoids were identified in greater quantity the  $\beta$ -carotene (225.7  $\mu\text{g.g}^{-1}$  DW) and to a lesser extent the neoxanthin (51.8  $\mu\text{g.g}^{-1}$  DW), also being identified in violaxanthin and lutein.

The large variation in carotenoid content can be related by factors such as seasonal variation, farming practices such as organic farming and food processing, factors that are not very studied, requiring specific research [29].

**Tabela 3.** Concentration of carotenoids in lettuce analyzed in two periods of cultivation: August 2013 [1<sup>st</sup> period]; and January / February 2014 [2<sup>nd</sup> period]<sup>1</sup>.

Lettuces	Carotenoids ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW)	
	1 <sup>st</sup> period	2 <sup>nd</sup> period
<b>Cabbage</b>	36.38 $\pm$ 9.65 <sup>Ab</sup>	209.53 $\pm$ 10.55 <sup>Aa</sup>
<b>Smooth</b>	112.67 $\pm$ 78.39 <sup>Aa</sup>	219.67 $\pm$ 7.92 <sup>Aa</sup>
<b>Curly</b>	122.75 $\pm$ 76.82 <sup>Aa</sup>	135.06 $\pm$ 71.88 <sup>Aa</sup>

<sup>1</sup> Values are means  $\pm$  SD of three sample lots analysed individually in triplicate. Values with the same letter in line are not significantly different ( $p>0.05$ ) between the 1<sup>st</sup> period and the 2<sup>nd</sup> period; values with the same letter in column not significantly different ( $p>0.05$ ) between the lettuces.

## Conclusion

The phenolic compounds, the carotenoids and the antioxidant capacity varied among of lettuce cultivars and between the analyzed periods. The Curly lettuce showed the highest TPC and TAC levels while the cabbage lettuce showed the lowest levels, for both analyzed periods. Regarding the carotenoids, it can be concluded that the second period presented high levels of these compounds, especially the Smooth lettuce. The hydroxycinnamic acids were identified in the lettuce. The most predominant acid was the chlorogenic acid followed by caffeic acid and ferulic acid. Among the flavonoids, rutin was the most common form found in leafy vegetables used in this study. Thus, Curly, Smooth and Cabbage lettuce can be characterized potential sources of natural antioxidants and bioactive compounds when included in the human diet. And among the three cultivars, Curly lettuce presents greater amounts of bioactive compounds.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Sao Paulo State University for technical support.

## Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Compliance with Ethics Requirements

This article does not contain any studies with human or animal subjects.

## References

1. Henz GP, Suinaga FA (2009) Types of lettuce grown in brazil. *Embrapa vegetables* 75:7
2. Jagger IC, Whitaker TW, Uselman JJ, Owen, WM (1941) The imperial strains of lettuce. United states department of agriculture, 15
3. Sala FC, Costa CP (2012) Retrospective and trend of brazilian alfacultura. *Brazilian horticulture* 30:187-194
4. Rubatzky EV, Yamaguchi M (1963) *World vegetables: principles, production and nutritive values*. Gaithersburg: aspen publication 2:3-4
5. Gomes T, Delgado T, Ferreira A, Pereira JA, Baptista P, Casal S, Ramalhosa E (2013) Application of response surface methodology for obtaining lettuce (*lactuca sativa* L.) By-products extracts with high antioxidative properties. *Industrial crops and products* 44:622-629
6. Llorach R, Martínez-sánchez A, Tomás-Basberán FA, Gil MI, Ferreres F (2008) Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food chemistry* 108:1028-1038
7. Heimler D, Isolani L, Vignolini P, Tombelli S, Romani A (2007) Polyphenol content and antioxidant activity some species of freshly consumed salads. *Journal of agricultural and food chemistry* 55:1724–1729
8. Wrolstad RE, Durst RW, Lee J (2005) Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in food science & technology* 16:423-428
9. Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD (1992) Phenolic antioxidants. *Critical reviews. Food science nutrition* 32:67-103

10. Herrero M, Ibanez E, Cifuentes, A (2005) Analysis of natural antioxidants by capillary electromigration methods. *Journal of separation science* 28:883-897
11. Vaher M, Koel M (2003) Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis. *Journal of chromatography* 990:225-230
12. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel wissenschaft und technologie* 28:25-30
13. Bravo L (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. *Nutrition reviews* 56:317-333
14. Liu X, Ardo S, Bunning M, Parry J, Zhou K, Stushnoff (2007) Total phenolic content and dpph radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) Grown in colorado. *Food science and technology* 40:552–557
15. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Byrne DH (2006) Comparison of abts, dpph, frap, and orac assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis* 19:669-675
16. Ipmet, meteorological research institute of Bauru. Available in: <<http://www.ipmet.unesp.br>>. Access: February 2014
17. Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American journal of enology and viticulture* 16:144-158
18. Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Péres-Jiménez J, Saura-Calixto F, Mancini-Filho J (2010) Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from brazil. *Food chemistry* 121:996-1002
19. Rodriguez-Amaya DB (2001) A guide to carotenoid analysis in foods 64
20. Wu LC, Hsu HW, Chen YC, Chiu CC, Lin YL, Ho, JAA (2006) Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food chemistry* 95:319–327
21. Huang D, Ou B, Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays – review *journal of agricultural and food chemistry* 53:1841-1856

22. Stratil P, Klejdus B, Kuban V (2006) Determinations of total contents of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables: evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of agricultural and food chemistry* 54:607-616
23. Schlesier K, Harwat M, Böhm V, Bitsch R (2002) Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free radical research* 36: 177-187
24. Khanam UKS, Oba S, Yanase E, Murakami Y (2012) Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. *Journal functional foods* 4:979–987
25. Huber LS, Hoffmann-Ribani R, Rodriguez-Amaya DB (2009) Quantitative variation in Brazilian vegetable sources of flavonols and flavones. *Food Chemistry* 113:1278–1282
26. Franke AA, Custer LJ, Arakaki C, Murphy SP (2004) Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. *Journal of food composition and analysis* 17:1–35
27. Ross JA, Kasum CM (2002) Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr* 22:19-34
28. Carvalho IS, Cavaco T, Brodelius M (2011) Phenolic composition and antioxidant capacity of six Artemisia species. *Industrial crops and products* 33:382-388
29. Rao AV, Rao LG (2007) Carotenoids and human health. *Pharmacol res* 55:207-216
30. Krinsky NI, Johnson EJ (2005) Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol aspects med* 26:459–516
31. Carlsen MH, Carlsen A, Lillegaard IT (2011) Relative validity of fruit and vegetable intake estimated from an FFQ, using carotenoid and flavonoid biomarkers and the method of triads. *Br j nutr* 105:1530-1538
32. Burns J, Fraser PD, Bramley PM (2003) Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. *Phytochemistry* 62:939–947

## *CAPÍTULO III*

---

*Compostos fenólicos e antioxidantes de  
condimentos analisados em dois períodos de  
cultivos*



## Resumo

Os condimentos são mundialmente utilizados na cozinha para proporcionar ou intensificar sabor aos alimentos. Eles apresentam propriedades antimicrobianas e antioxidantes, conferindo a preservação e conservação dos alimentos. Eles podem ser adicionados aos alimentos de diversas maneiras, como extratos, moídos ou na sua forma natural, apresentando diferentes compostos em quantidades variadas e com diferentes atividades antioxidantes, influenciado pela maneira de uso. O objetivo deste estudo foi verificar e quantificar os compostos fenólicos totais (CFT), capacidade antioxidante total (CAT), ácidos fenólicos, flavonoides, clorofilas e Carotenoides presentes em três variedades de condimentos analisados em diferentes períodos. Utilizaram-se três tipos de condimentos, o coentro (*Coriandrum sativum* L.), a salsa (*Petroselinum crispum*, (Mill.) Nym.) e a cebolinha (*Allium fistulosum* L.), sem a identificação de cultivares. Três lotes de cada amostra foram adquiridos no comércio local de Araraquara-SP em dois períodos do ano, 1º período (agosto/2013) e 2º período (janeiro e fevereiro/2014) e suas folhas (partes comestíveis) foram secas para as determinações. As análises foram realizadas individualmente em triplicata e os resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Os teores de Carotenoides pouco variaram entre os condimentos e entre os períodos analisados. O coentro mostrou ser o condimento que apresentou o maior teor de CFT com concentrações maiores no 1º período de cultivo analisado. As maiores concentrações de Carotenoides totais e clorofila *a*, *b* e total foram encontradas no 2º período de cultivo analisado, com destaque para o coentro com maiores teores desses compostos. Desta forma, os condimentos podem ser caracterizados potenciais fornecedores de compostos bioativos e antioxidantes naturais quando incluídas na dieta humana. O coentro recebeu grande destaque entre os demais condimentos, no entanto ele não é muito consumido em nossa região, porém esse estudo fornece informações científicas para as pessoas adquirirem novos hábitos alimentares saudáveis e incluírem esse novo condimento na dieta.

**Palavras-chave:** condimentos, compostos bioativos e antioxidantes.

## 1. Introdução

Os condimentos são mundialmente utilizados na cozinha para proporcionar ou intensificar sabor aos alimentos. Eles apresentam propriedades antimicrobianas e antioxidantes, conferindo a preservação e conservação dos alimentos (MORAIS et al., 2009). A atividade antioxidante que eles apresentam está diretamente relacionada com os níveis de compostos fenólicos que ocorrem naturalmente nessas plantas (MARANGONI; MOURA, 2011).

Os condimentos podem ser adicionados aos alimentos de diversas maneiras, como extratos, moídos ou na sua forma natural. Podendo apresentar diferentes compostos em quantidades variadas e com diferentes atividades antioxidantes, influenciado pela maneira de uso (MADSEN; BERTELSEN, 1995).

O cheiro verde é um conjunto das folhas de cebolinha (*Allium fistulosum* L.) com folhas de salsa (*Petroselinum crispum*, (Mill.) Nym.), condimento muito utilizado na culinária na forma fresca, como decoração, tempero e cozido, sendo muito apreciado pela população e cultivado em quase todos os lares brasileiros (HEREDIA et al., 2003).

O coentro (*Coriandrum sativum* L.) é muito consumido em diversas regiões do Brasil, especialmente no Norte, Nordeste e em menor proporção no Sudeste. Na culinária, suas folhas e sementes são utilizadas na composição e decoração de diversos pratos típicos e regionais (WANGENSTEEN; SAMUELSEN; MALTERUD, 2004; PEDROSA; NEGREIROS; NOGUEIRA, 1984).

A concentração e a composição dos compostos presentes nos condimentos sofrem a influência de alguns fatores como o cultivar, a origem geográfica, a estação climática, as práticas agrícolas, condições de crescimento, estádios de maturação e a parte da planta que foi utilizada (ROBBINS, 2003; MADSEN; BERTELSEN, 1995). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar e quantificar os compostos bioativos e a capacidade antioxidante presentes em três espécies de condimentos analisados em diferentes períodos.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Material**

As amostras de condimentos foram adquiridas no comércio de Araraquara-SP, Brasil em dois períodos: agosto de 2013 [1º período]; e janeiro/fevereiro de 2014 [2º período]. Foram coletadas amostras com tipo de cultivo tradicional. Utilizaram-se três tipos de condimentos, o coentro (*Coriandrum sativum* L.), a salsa (*Petroselinum crispum*, (Mill.) Nym.) e a cebolinha (*Allium fistulosum* L.), sem a identificação de cultivares. A temperatura ambiente média foi de 19,6°C (mínima de 12,5°C e máxima de 26,8°C) para o 1º período e 26,0°C (mínima de 20,6 e máxima de 31,4°C) para o 2º período (IPMET, 2013; 2014).

Foram coletados três lotes de cada amostra e as partes aéreas (partes comestíveis) foram analisadas. As amostras foram lavadas e secadas em estufa de circulação de ar (320-SE, Fanen) durante 72 horas a 40°C. As amostras secas foram trituradas em liquidificador (Laboratory Blender),

peneiradas e armazenadas em frascos de vidros em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As análises foram realizadas nos três lotes em triplicata.

## **2.2. Extração dos compostos fenólicos e antioxidantes**

A extração dos compostos fenólicos totais e dos antioxidantes foi realizada a partir de 1 g de amostra em 25 mL de metanol 30% em banho-maria com agitação durante 1 hora a 60°C (Banho Dubnoff TE-053, Tecnal), após centrifugadas (Himac CR22CII, Hitachi) durante 30 minutos a 27.000 g e filtradas diretamente para balão volumétrico de 25 mL. Os extratos foram armazenados a -18°C (GOMES et al., 2013).

## **2.3. Determinação do conteúdo fenólico total**

A quantificação de fenólicos totais foi determinada através do método colorimétrico Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965). Um volume de 0,5 mL de extrato foi misturado com 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 10%. Após 5 minutos, adicionou-se 2,0 mL de uma solução de carbonato de sódio 7,5%. A reação foi mantida em banho-maria (Quimis) durante 5 minutos a 50°C e a leitura da absorbância foi realizada a 750 nm em espectrofotômetro (DU®640 Spectrophotometer, Beckman). A curva de calibração foi preparada utilizando ácido gálico em concentrações que variaram de 2,0 a 8,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Apêndice A) e os resultados foram expressos em miligramas de ácido gálico (AG) por grama de base seca ( $\text{mg AG.g}^{-1}$  bs).

## **2.4. Determinação da atividade antioxidante**

### **2.4.1. DPPH**

A atividade antioxidante foi determinada de acordo com o método descrito por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995), com modificações. Em ambiente escuro, foi transferido 0,1 mL dos extratos para tubos com 3,9 mL do radical DPPH 0,006 mM e seguidos de homogeneização. As leituras foram realizadas após 30 minutos em espectrofotômetro (DU<sup>®</sup>640 Spectrophotometer, Beckman) no comprimento de onda de 515 nm. Foram preparadas duas curvas de calibração utilizando ácido ascórbico e trolox. As curvas apresentaram concentrações que variaram de 0,5 a 4,6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  como podem ser vistas nos apêndices B e C. Os resultados foram expressos em miligramas de ácido ascórbico (AA) e/ ou trolox (TR) por grama de base seca.

### **2.4.2. ABTS**

A atividade antioxidante foi determinada de acordo com o método descrito por Rufino et al. (2010). Em ambiente escuro, 30  $\mu\text{L}$  do extrato foi transferido para tubos com 3,0 mL do radical ABTS<sup>•+</sup> e seguidos de homogeneização. Após 6 minutos da mistura, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (DU<sup>®</sup>640 Spectrophotometer, Beckman) a 734 nm. Foram preparadas duas curvas padrão (ácido ascórbico e trolox). A curva de calibração de ácido ascórbico foi preparada com concentração que variaram de 0,05 a 3,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Apêndice D) e os resultados foram expressos em mg AA.g<sup>-1</sup> bs. A curva de calibração de trolox apresentou concentrações que variaram de 0,05 a 5,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Apêndice E) e os resultados foram expressos em mg TR.g<sup>-1</sup> bs.

## 2.5. Determinação e quantificação de ácidos fenólicos e flavonoides por CLAE

A extração dos compostos foi realizada com 1 g de amostra em 25 mL de metanol 80% em vortex por 4 minutos, após centrifugadas (Himac CR22CII, Hitachi) durante 15 minutos a 26.723,25 g e filtradas diretamente para balão volumétrico de 25 mL. Os extratos foram filtrados em membrana milipore 0,22 µm e analisados.

Foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, Kyoto, Japan) controlado pelo software Class-VP, equipado com bomba, injetor automático e detector por arranjo de fotodiodos (DAD). A análise foi conduzida utilizando coluna Thermo® C<sub>18</sub> (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), mantida a 25°C e o volume de amostra injetado foi de 20 µL.

Como fase móvel foi utilizada solução aquosa de ácido acético 2% (A) e acetonitrila (B) com o seguinte gradiente: 0 a 7 minutos 90% de A e 10 % de B; 7 a 15 minutos 85% de A e 15% de B; 15 a 32 minutos 45% de A e 55% de B; 32 a 38 minutos 25% de A e 75% de B; 38 a 50 minutos 90% de A e 10% de B, com vazão de 0,5 mL/min. As fases móveis e padrões foram filtradas antes da injeção em membrana milipore 0,22 µm.

Os comprimentos de onda utilizados para detecção foram 325 e 355 nm. Os padrões utilizados foram os ácidos fenólicos (caféico, ferúlico e clorogênico) e os flavonoides (rutina e apigenina). As curvas de calibração foram feitas em triplicata a partir de sete concentrações.

A identificação dos ácidos fenólicos e flavonoides foi realizada por comparação de tempo de retenção e dos espectros de absorção obtidos pelo detector DAD, das amostras com os dos padrões. A quantificação foi realizada

aplicando os valores de área obtidos na amostra na curva de calibração de cada padrão e os resultados foram expressos em  $\text{mg.g}^{-1}$  bs.

## 2.6. Determinação dos Carotenoides totais

A extração foi realizada com acetona pura refrigerada em 1 g de amostra, sob agitação até completa extração dos pigmentos. Os Carotenoides foram transferidos para éter de petróleo e levados a um volume em balão volumétrico. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (DU®640 Spectrophotometer, Beckman) a 450 nm e o teor de Carotenoides totais expresso em  $\mu\text{g.g}^{-1}$  bs referentes a termos de  $\beta$ -caroteno ( $A^{1\%}_{1\text{cm}}$  de 2592, em éter de petróleo), aplicando-se a Lei de Beer (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

## 2.7. Clorofila

Os teores de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total foram analisados de acordo com Lichtenthaler (1987). A extração foi realizada com 0,3 g de amostra e 15 mL de acetona 80% em banho de ultrassom (T14, Thornton) durante 10 minutos. A extração foi realizada duas vezes e a solução extraída foi filtrada diretamente para balão volumétrico de 25 mL e o volume aferido. As leituras das absorbâncias dos extratos foram realizadas em espectrofotômetro (DU®640 Spectrophotometer, Beckman), nos comprimentos de onda 470 nm, 647 nm e 663 nm logo após a extração. Os resultados foram expressos em miligramas de clorofila por 100 gramas de base seca ( $\text{mg.100g}^{-1}$  bs).

Os teores de clorofila foram estimados com base nas equações:

$$\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g.g}^{-1}\text{)} = 12,25 \times A_{663} - 2,79 \times A_{647}$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (}\mu\text{g.g}^{-1}\text{)} = 21,50 \times A_{647} - 5,10 \times A_{663}$$

$$\text{Clorofila T (}\mu\text{g.g}^{-1}\text{)} = 7,15 \times A_{663} + 18,71 \times A_{647}$$

## 2.8. Análise estatística

Todo o experimento foi realizado com três lotes de amostras, analisados individualmente, em triplicata. Os resultados foram expressos pela média  $\pm$  DP (desvio padrão). A análise estatística foi realizada utilizando o software Origin<sup>®</sup>8. Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), assumindo  $p < 0,05$  (5%) seguida de comparação de médias pelo teste Tukey.

## 3. Resultados e discussão

As amostras de coentro, salsa e cebolinha foram avaliadas quanto ao conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT), identificação e quantificação de ácidos fenólicos e flavonoides por CLAE, capacidade antioxidante total (CAT), clorofila e Carotenoides totais (CT). Três lotes de cada condimentos foram coletados em dois períodos de cultivo diferentes: agosto de 2013 [1º período]; e janeiro/fevereiro de 2014 [2º período] e analisadas individualmente em triplicata. Todas as análises foram realizadas nas amostras secas (bs).



### 3.1. Umidade

A secagem das amostras diminui a velocidade de deterioração por meio da redução da atividade de água, conservando-as por maior tempo (SILVA; CASALI, 2000). A temperatura da secagem exerce influência na quantidade e qualidade dos compostos bioativos presentes nas plantas secas, onde a utilização de baixas temperaturas (40° a 60°C) não causa alterações nas amostras (MELO; RADÜNZ; MELO, 2004).

Dessa forma foi realizada a secagem das amostras em estufa de ar circulado por 72 horas a 40°C. Após a secagem o teor de umidade foi de 7- 9% para os condimentos analisados nos dois períodos. Para manter a integridade e propriedades os condimentos permaneceram armazenadas em frascos de vidros ao abrigo da luz durante toda a pesquisa.

### 3.2. Determinação de fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método Folin-Ciocalteu nos condimentos cultivados em diferentes períodos, assim como indicados na **Tabela 1**.

Em relação ao período de cultivo analisado, observou-se variações significativas na concentração de CFT do coentro, o qual apresenta valores significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) no 1º período (23,20 mg AG.g<sup>-1</sup> bs) do que no 2º período (16,64 mg AG.g<sup>-1</sup> bs). No entanto, a salsa e a cebolinha não mostraram diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os períodos de cultivo.

**Tabela 1.** Fenólicos totais em condimentos analisados em dois períodos de cultivo: agosto de 2013 [1º período]; e janeiro/fevereiro de 2014 [2º período].

Condimento	Fenólicos totais (mg AG.g <sup>-1</sup> bs)	
	1º período	2º período
<b>Coentro</b>	23,20 ± 1,81 <sup>Aa</sup>	16,64 ± 1,00 <sup>Ab</sup>
<b>Salsa</b>	6,33 ± 0,64 <sup>Ba</sup>	6,23 ± 1,02 <sup>Ba</sup>
<b>Cebolinha</b>	6,98 ± 0,70 <sup>Ba</sup>	5,58 ± 0,52 <sup>Ba</sup>

Valores são médias ± DP de três lotes de amostras analisados individualmente em triplicata; letras maiúsculas iguais na mesma coluna não apresentam diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os condimentos e letras minúsculas iguais na mesma linha não apresentam diferenças significativas entre os períodos de cultivo analisado ( $p > 0,05$ ).

De modo geral, os maiores teores de CFT foram encontrados nos condimentos analisados no 1º período e variaram de 6,33 a 23,20 mg AG.g<sup>-1</sup> bs. Diferentemente, no 2º período os condimentos analisados apresentaram teores menores de CFT, variando entre 5,58 a 16,64 mg AG.g<sup>-1</sup> bs.

Da mesma forma que se encontra diferença no teor de fenólicos totais entre o período de cultivo analisado, pode-se observar diferenças significativas entre os diferentes grupos de condimentos. De modo geral, observa-se que o coentro mostrou ser o condimento que apresentou o maior teor de CFT entre os condimentos para os dois períodos de cultivo analisado.

Isabelle et al. (2010) estudando amostras de coentro da Malásia, determinou os fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu e verificou o teor de 4 mg equivalentes de ácido gálico.g<sup>-1</sup> base seca nas folhas, valor bem abaixo do que o encontrado no presente estudo.

Dois cultivares de salsa tiveram teores elevados de fenólicos totais, variando de 30,51 a 46,04 g.kg<sup>-1</sup> base seca (KAISER et al., 2013), valores estes superiores ao encontrado nas amostras de salsa analisada nos dois períodos.

Em estudos realizados com amostras de salsa e coentro, verificaram que a salsa apresentava uma concentração mais elevada de compostos fenólicos que o coentro, mostrando que os compostos fenólicos extraídos da salsa e do coentro, são responsáveis pela atividade antioxidante dessas amostras (WONG; KITTS, 2006).

### **3.3. Determinação e quantificação de ácidos fenólicos e flavonoides**

A composição e concentração dos ácidos fenólicos e flavonoides determinados por análise de CLAE estão apresentadas na **Tabela 2**.

Os ácidos hidroxicinâmicos foram identificados nos condimentos, onde o ácido clorogênico, caféico e ferrúlico foram encontrados no coentro e o ácido caféico foi o predominante, com concentrações tão altas quanto  $1138,06 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  bs (1º período). Na amostra de cebolinha, somente o ácido ferrúlico foi determinado com concentração de  $347,61 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  bs no 1º período e  $299,15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  bs no 2º período. Nenhum dos ácidos hidroxicinâmicos foram identificados na salsa.

A atividade antioxidante do coentro provém da presença de derivados do ácido caféico, flavonoides, terpenos e outras moléculas (WANGENSTEEN et al., 2004).

No coentro ocorreu diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos teores de ácidos clorogênico e caféico entre os períodos de cultivo e no 2º período não foi detectado o ácido ferrúlico. Já na cebolinha, não foi constatado diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os períodos de cultivo no teor de ácido ferrúlico.

Na identificação dos flavonoides, a rutina foi identificada nas amostras de coentro com concentrações de 2932,10  $\mu\text{g.g}^{-1}$  bs no 1º período e 2582,33  $\mu\text{g.g}^{-1}$  bs no 2º período. Na salsa e na cebolinha a rutina não foi identificada.

Outro flavonóide identificado foi a apigenina, que apresentou maiores concentrações no 2º período (3755,59  $\mu\text{g.g}^{-1}$  bs) e menores concentrações no 1º período (2557,26  $\mu\text{g.g}^{-1}$  bs) na amostra de salsa. No coentro e na cebolinha a apigenina não foi identificada.

Em relação ao período de cultivo analisado, observou-se que não ocorreu diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os teores de flavonoides identificados no coentro e na salsa.

Kaiser et al. (2013), analisando dois cultivares de salsa, obtiveram a separação de 11 compostos fenólicos designados em ácido fenólicos e derivados de flavonoides, sendo a apigenina o composto principal dos dois cultivares. Os compostos fenólicos e flavonoides particularmente a apigenina e a apiin são os compostos bioativos identificados em salsinha (FARZAEI et al., 2013).

**Tabela 2.** Concentração de ácidos fenólicos e flavonoides em condimentos analisados em dois períodos de cultivo: agosto de 2013 [1º período]; e janeiro/fevereiro de 2014 [2º período].

Condimentos	Ácido clorogênico		Ácido caféico		Ácido ferrúlico	
	1º Período	2º Período	1º Período	2º Período	1º Período	2º Período
<b>Coentro</b>	804,00 ± 0,29 <sup>a</sup>	272,64 ± 0,15 <sup>b</sup>	206,42 ± 0,02 <sup>a</sup>	1138,06 ± 0,37 <sup>b</sup>	784,89 ± 0,08 <sup>A</sup>	n.d.
<b>Salsa</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Cebolinha</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	347,61 ± 0,06 <sup>Ba</sup>	299,15 ± 0,03 <sup>a</sup>
Condimentos	Rutina		Apigenina			
	1º Período	2º Período	1º Período	2º Período		
<b>Coentro</b>	2932,10 ± 0,44 <sup>a</sup>	2582,33 ± 0,54 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.		
<b>Salsa</b>	n.d.	n.d.	2557,26 ± 0,24 <sup>a</sup>	3755,59 ± 0,81 <sup>b</sup>		
<b>Cebolinha</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		

\*Valores são médias ± DP de três lotes de amostras analisados individualmente em triplicata; letra maiúscula diferente na mesma coluna representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os condimentos; letra minúscula diferente na mesma linha, para o mesmo composto, corresponde a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os períodos de cultivo analisados. Resultados expressos em  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  base seca.

\*n.d.: nenhum valor detectado.

### 3.4. Teor de Carotenoides totais

Os teores de Carotenoides totais dos condimentos analisados foram expressos em  $\mu\text{g.g}^{-1}$  base seca referentes a  $\beta$ -caroteno. Os resultados podem ser observados na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Teor de Carotenoides totais de condimentos analisados em dois períodos de cultivo: agosto de 2013 [1º período]; e janeiro/fevereiro de 2014 [2º período].

Condimentos	Carotenoides ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ bs)	
	1º período	2º período
<b>Coentro</b>	155,50±46,28 <sup>Aa</sup>	220,02±42,47 <sup>Aa</sup>
<b>Salsa</b>	201,96±11,60 <sup>Aa</sup>	152,23±77,95 <sup>Aa</sup>
<b>Cebolinha</b>	104,82±73,87 <sup>Aa</sup>	222,06±37,93 <sup>Aa</sup>

\*Valores são médias  $\pm$  DP de três lotes de amostras analisados individualmente em triplicata; letra maiúscula diferente na mesma coluna representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os condimentos; letra minúscula diferente na mesma linha representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os períodos de cultivo analisados.

A **Tabela 3** mostra a variação do teor de Carotenoides totais (CT) dos condimentos analisados em dois períodos de cultivo. No 1º período de cultivo dos condimentos analisados os teores de CT variaram de 104,82 a 201,96  $\mu\text{g.g}^{-1}$  bs enquanto que no 2º período os teores de CT variaram de 152,23 a 222,06  $\mu\text{g.g}^{-1}$  bs.

Observou-se que a salsa apresentou o maior teor de CT no 1º período e a cebolinha no 2º período, porém não foi estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). Em relação aos períodos de cultivo analisado, nenhum condimento apresentou diferença estatística entre os períodos ( $p > 0,05$ ), porém, de maneira geral, os maiores teores de CT foram encontrados no 2º período.

Foi verificado altas concentrações de  $\beta$ -caroteno em amostra de coentro provenientes da Índia com teor de  $470 \mu\text{g.g}^{-1}$  bs (SINGH et al., 2001), da Malásia com teor de  $560 \mu\text{g.g}^{-1}$  bs (ISABELLE et al., 2010) e de Israel com teor de  $100 \mu\text{g.g}^{-1}$  bs (DALY et al., 2010).

Mercadante e Rodriguez-Amaya (2001) identificando a presença de Carotenoides em vegetais de folhas verdes, detectou a presença dos Carotenoides  $\alpha$ -criptoxantina, 9-cis e 13-cis- $\beta$ -caroteno e também a presença do  $\beta$ -caroteno em amostras de salsinha.

### 3.5. Clorofila

O teor de clorofila nos condimentos foi quantificado utilizando com o solvente acetona 80% e os valores das absorbâncias obtidos foram calculados com as equações proposta por Lichtenthaler (1987) para estimar os teores de clorofila *a*, *b* e total. Os valores de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total dos condimentos cultivados em dois períodos são mostrados na **Tabela 4**.

Os teores de clorofila *a*, *b* e total foram maiores nos condimentos analisados no 2º período do que no 1º período de cultivo analisado. Entretanto, a salsa não apresentou diferença significativa ( $p>0,05$ ) nos teores de clorofila *a*, *b* e total entre os períodos de cultivo analisado.

Pode-se observar que os teores de clorofila *a* não apresentaram diferença significativa ( $p>0,05$ ) na cebolinha entre o 1º período e o 2º período, porém apresentou diferença significativa ( $p<0,05$ ) nos teores de clorofilas *b* e total entre os períodos de cultivo analisados.

**Tabela 4.** Clorofila *a*, *b* e total em condimentos analisados em dois períodos de cultivo: agosto de 2013 [1º período]; e janeiro/fevereiro de 2014 [2º período].

Hortaliça/período	Concentrações (mg.100g <sup>-1</sup> bs)		
	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila total
<b>Coentro</b>			
1º período	206,21 ± 10,66 <sup>a</sup>	79,95 ± 6,65 <sup>a</sup>	286,17 ± 15,46 <sup>a</sup>
2º período	230,64 ± 10,14 <sup>b</sup>	94,23 ± 4,15 <sup>b</sup>	324,87 ± 14,29 <sup>b</sup>
<b>Salsa</b>			
1º período	160,64 ± 13,04 <sup>a</sup>	74,91 ± 6,57 <sup>a</sup>	235,56 ± 19,53 <sup>a</sup>
2º período	182,92 ± 30,39 <sup>a</sup>	86,08 ± 16,70 <sup>a</sup>	269,01 ± 46,06 <sup>a</sup>
<b>Cebolinha</b>			
1º período	138,68±16,55 <sup>a</sup>	49,67 ± 6,88 <sup>a</sup>	188,35 ± 23,03 <sup>a</sup>
2º período	155,3 ± 21,99 <sup>a</sup>	80,48 ± 12,50 <sup>b</sup>	235,79 ± 9,55 <sup>b</sup>

Valores são médias ± DP de três lotes de amostras analisados individualmente em triplicata; diferentes letras para valores de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total, no período de cultivo para o mesmo condimento representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Os teores de clorofila *a* foram maiores que os da clorofila *b* para todas as amostras analisadas nos dois períodos. O teor de clorofila *a* variou de 138,68 a 230,64 mg.100g<sup>-1</sup> bs, enquanto que os teor de clorofila *b* variou de 49,67 a 94,23 mg.100g<sup>-1</sup> bs.

Entre os condimentos analisados, o coentro apresentou os maiores teores de clorofila total nos dois períodos de cultivo, sendo uma boa fonte de pigmentos naturais. Em folhas de coentro foi verificado teor de clorofila *a* e *b* maior que o encontrado no presente estudo, sendo este teor de 508,51 mg.100g<sup>-1</sup> bs para clorofila *a* e 233,91 mg.100g<sup>-1</sup> bs para clorofila *b* (DIAS, 2011).

Cada vez mais as opções de corantes naturais alimentares começam a ganhar mais mercado (HOSIKIAN et al., 2010). Diante disso, o uso dos



condimentos em forma de aditivos para produtos alimentícios é uma opção mais natural e aplicável, além de proporcionar coloração verde.

### 3.6. Capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total (CAT) foi medida utilizando o método de ABTS e DPPH, expressa em trolox e ácido ascórbico, diferentes antioxidantes amplamente utilizados como padrão de referência. Os resultados obtidos podem ser observados na **Tabela 5**.

**Tabela 5.** Capacidade antioxidante total expressa em trolox e ácido ascórbico pelo método de ABTS e DPPH em condimentos analisados em dois períodos de cultivo: agosto de 2013 [1º período]; e janeiro/fevereiro de 2014 [2º período].

Hortaliças/ Estação	Atividade antioxidante total (mg.g <sup>-1</sup> bs)			
	Trolox		Ácido Ascórbico	
	ABTS	DPPH	ABTS	DPPH
<b>Coentro</b>				
1º período	23,76 ± 5,58 <sup>a</sup>	7,77 ± 0,56 <sup>b</sup>	16,85 ± 3,80 <sup>a</sup>	8,73 ± 0,44 <sup>b</sup>
2º período	14,10 ± 3,06 <sup>a</sup>	19,89 ± 1,42 <sup>a</sup>	10,24 ± 2,15 <sup>a</sup>	18,16 ± 1,10 <sup>a</sup>
<b>Salsa</b>				
1º período	8,04 ± 0,84 <sup>a</sup>	1,66 ± 0,07 <sup>a</sup>	5,61 ± 0,57 <sup>a</sup>	1,56 ± 0,05 <sup>a</sup>
2º período	5,48 ± 0,77 <sup>b</sup>	1,59 ± 0,24 <sup>a</sup>	3,81 ± 0,59 <sup>b</sup>	1,50 ± 0,19 <sup>a</sup>
<b>Cebolinha</b>				
1º período	9,12 ± 1,52 <sup>a</sup>	2,08 ± 0,22 <sup>a</sup>	6,35 ± 1,04 <sup>a</sup>	1,88 ± 0,17 <sup>a</sup>
2º período	6,07 ± 1,18 <sup>a</sup>	1,64 ± 0,02 <sup>b</sup>	4,27 ± 0,80 <sup>a</sup>	1,54 ± 0,02 <sup>b</sup>

Valores são médias ± DP de três lotes de amostras analisados individualmente em triplicata; diferentes letras para valores de atividade antioxidante no período de cultivo analisado para o mesmo condimento representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

De maneira geral, os resultados da CAT diferem dependendo do método escolhido, sendo necessário utilizar mais de um método para essa

determinação (SCHLESIER et al., 2002), assim os métodos de ABTS e DPPH foram os preconizados nesse estudo.

Entre as amostras analisadas com o método de ABTS a CAT foi maior para o coentro e menor para a salsa, tanto para o padrão trolox (5,48 a 23,76 mg TR.g<sup>-1</sup> bs) quanto para o padrão de ácido ascórbico (3,81 a 16,85 mg AA.g<sup>-1</sup> bs), respectivamente.

Igualmente, quando utilizando o método de DPPH, o coentro apresentou o maior valor de CAT enquanto que a salsa o menor valor, tanto para o padrão trolox (1,59 a 19,89 mg TR.g<sup>-1</sup> bs) quanto para o padrão de ácido ascórbico (1,50 a 18,16 mg AA.g<sup>-1</sup> bs), respectivamente.

Em ensaios realizados com o método de DPPH em folha de salsa e coentro extraídos com metanol, constatou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na capacidade antioxidante entre eles, onde a salsa apresentou o maior poder antioxidante (WONG; KITTS, 2006).

A diferença da CAT entre os períodos de cultivo foi significativa ( $p < 0,05$ ) para a salsa e apresentou maior CAT no 1º período, quando utilizado o método de ABTS e independente do padrão. A variação da CAT entre os períodos também foi observado pelo método de DPPH, nas amostras de coentro e cebolinha, apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os períodos, independente do padrão utilizado.

Nos vegetais podem ocorrer grandes variações no conteúdo inicial de antioxidantes, este fato é ocasionado pela variedade genética, pelas condições de cultivo, pelo clima e pelo estágio de maturação (BAUR et al., 2004; LEE; KADER, 2000; BRAVO, 1998) e a ação antioxidante de cada condimento

depende ainda da metodologia analítica utilizada para sua determinação (SCHLESIER et al., 2002; MADSEN; BERTELSEN, 1995).

Marangoni e Moura (2011) relataram que o uso de óleo essencial de coentro em salame tipo italiano apresentou efeito antioxidante mais intenso do que o antioxidante sintético BHT (butil-hidroxitolueno) sobre o retardamento da oxidação lipídica, sendo uma alternativa de antioxidante natural, além de proporcionar sabor agradável ao alimento.

Em folhas de cebolinha e coentro, foi relatado baixa capacidade antioxidantes, porém o coentro apresentou o dobro de capacidade antioxidante que a cebolinha (WONG; LEONG; KOH, 2006). Devido a baixa atividade antioxidante da cebolinha, verificada em ensaio prévio por Guerra e Lajolox (2005), decidiu-se não avaliar sua capacidade antioxidante neste estudo..

#### **4. Conclusão**

Os teores de Carotenoides pouco variaram entre os condimentos nos períodos analisados. O coentro mostrou ser o condimento que apresentou o maior teor de compostos fenólicos totais com concentrações maiores no 1º período de cultivo. As maiores concentrações de Carotenoides e clorofilas foram encontradas no 2º período de cultivo, com destaque para o coentro. Os ácidos hidroxicinâmicos identificados entre os condimentos foram, os ácidos clorogênico, caféico e ferrúlico, no coentro e somente o ácido ferrúlico na cebolinha, e na salsa nenhum ácido foi detectado. Foi identificado no coentro o flavonóide rutina e na salsa a apigenina.

Também foi comprovado que a concentração e a composição dos compostos bioativos presentes nos condimentos sofrem a influência de alguns

fatores como o cultivar, a origem geográfica, a estação climática, as práticas agrícolas e as partes da planta. Desta forma, os condimentos podem ser caracterizados potenciais fornecedores de compostos bioativos e antioxidantes naturais quando incluídas na dieta humana. O coentro recebeu grande destaque entre os demais condimentos, no entanto ele não é muito consumido em nossa região. Este estudo fornece informações relevantes, embasadas em procedimentos científicos, que deverão ser divulgadas para que a população possa adquirir novos hábitos alimentares saudáveis e incluírem esse novo condimento na dieta.

## 5. Referências

- BAUR, S.; KLAIBER, R. G.; KOBLO, A.; CARLE, R. Effect of different washing procedures on phenolic metabolism of shredded, packaged iceberg lettuce during storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7017–7025, 2004.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.
- DALY, T.; JIWAN, M. A.; O'BRIEN, N. M. Carotenoid content of commonly consumed herbs and assessment of their bioaccessibility using an in vitro digestion model. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, p. 164-169, 2010.
- DE MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S.; COSTA, S. M.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Braz J Pharmacognosy**, v. 19, n. 1B, p. 315-320, 2009.
- DIAS, M. I. M. F. Caracterização química e molecular de amostras de *Coriandrum sativum* L. obtidas *in vivo* e *in vitro*. **Dissertação de mestrado**. Escola Superior Agrária de Bragança, 2011.

FARZAEI, M. H.; ABBASABADI, Z.; ARDEKANI, M. R. S.; RAHIMI, R.; FARZAEI, F. Parsley: a review of ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 33, p. 815-826, 2013.

GOMES, T.; DELGADO, T., FERREIRA, A., PEREIRA, J. A., BAPTISTA, P., CASAL, S., RAMALHOSA., E. Application of response surface methodology for obtaining lettuce (*Lactuca sativa* L.) by-products extracts with high antioxidative properties. **Industrial crops and products**, v. 44, p. 622-629, 2013.

GUERRA, N. B.; LAJOLO, F. M. Ação antioxidante de especiarias face diferentes atividades de água. **Ciências e Tecnologia de alimentos**, v. 25, p. 45-50, 2005.

HEREDIA Z., N. A.; VIEIRA, M. C.; WEISMANN, M.; LOURENÇÃO, A. L. F. Produção e renda bruta de cebolinha e de salsa em cultivo solteiro e consorciado. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 574-577, 2003.

HOSIKIAN, A.; LIM, S.; HALIM, R.; DANQUAH, M. K. Chlorophyll extraction from microalgae: A review on the process engineering aspects. **International Journal of Chemical Engineering**, Article ID 391632, p. 11, 2010.

**IPMET**, Instituto de Pesquisas Meteorológicas. Bauru. Disponível em: <<http://www.ipmet.unesp.br>>. Acesso em: agosto de 2013 e fevereiro de 2014.

ISABELLE, M.; LEE, B. L.; LIM, M. T.; KOH, W-P.; HUANG, D.; ONG, C. N. Antioxidant activity and profiles of common vegetables in Singapore. **Food Chemistry**, v. 120, p. 993-1003, 2010.

KAISER, A.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Effects of blanching on polyphenol stability of innovative paste-like parsley (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym ex A. W. Hill) and marjoram (*Origanum majorana* L.) products. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1648–1656, 2013.

LEE, S. K.; KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest Biology Technology**, v. 20, n. 3, p. 207-220, 2000.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.

MADSEN, H. L., BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, n. 8, p. 271-277, 1995.

MARANGONI, C.; MOURA, N. F.. Antioxidant activity of essential oil from *Coriandrum Sativum* L. in Italian salami. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 31, n. 1, p. 124-128, 2011.

MELO, E. C.; RADÜNZ, L. L.; MELO, R. C. A. Influência do processo de secagem na qualidade de plantas medicinais, revisão. **Engenharia na Agricultura**, v. 12, n. 4, p. 307-15, 2004.

MERCADANTE, A., RODRIGUEZ-AMAYA, D. Confirmação da identidade da  $\alpha$ -criptoxantina e incidência de Carotenoides minoritários provitamínicos a em verduras folhosas verdes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p. 216-222, 2001.

PEDROSA, F. S.; NEGREIROS, M. Z.; NOGUEIRA, I. C. C. Aspectos da cultura do coentro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 10, n. 120, p.75-78, 1984.

ROBBINS, R. J. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2866–2887, 2003.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington: ILSI Press, p. 64, 2001.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉRES-JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F. MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, Barking, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

SCHLESIER, K.; HARWAT, M.; BÖHM, V.; BITSCH, R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. **Free Radical Research**, v. 36, p. 177-187, 2002.

SILVA, F.; CASALI, V. W. D. Plantas medicinais e aromáticas: pós-colheita e óleos essenciais. Viçosa: Arte e Livros, p. 135, 2000.

SINGH, G.; KAWATRA, A.; SEHGAL, S. Nutritional composition of selected green leafy vegetables, herbs and carrots. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 56, p. 359-364, 2001

SINGLETON, V. L.; ROSSI J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

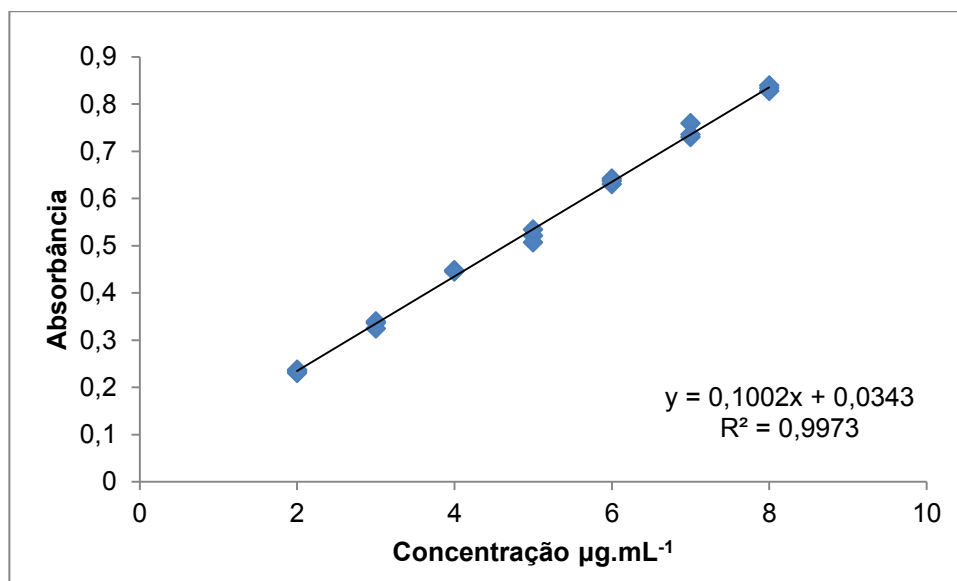
WANGENSTEEN, H.; SAMUELSEN, A. B.; MALTERUD, K. E. Antioxidant activity in extracts from coriander. **Food Chemistry**, v. 88, p. 293–297, 2004.

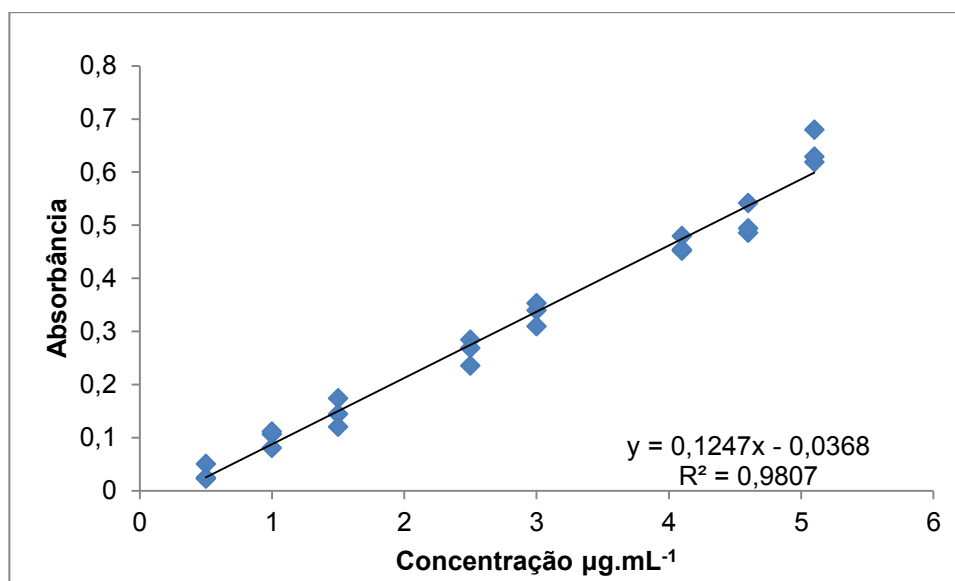
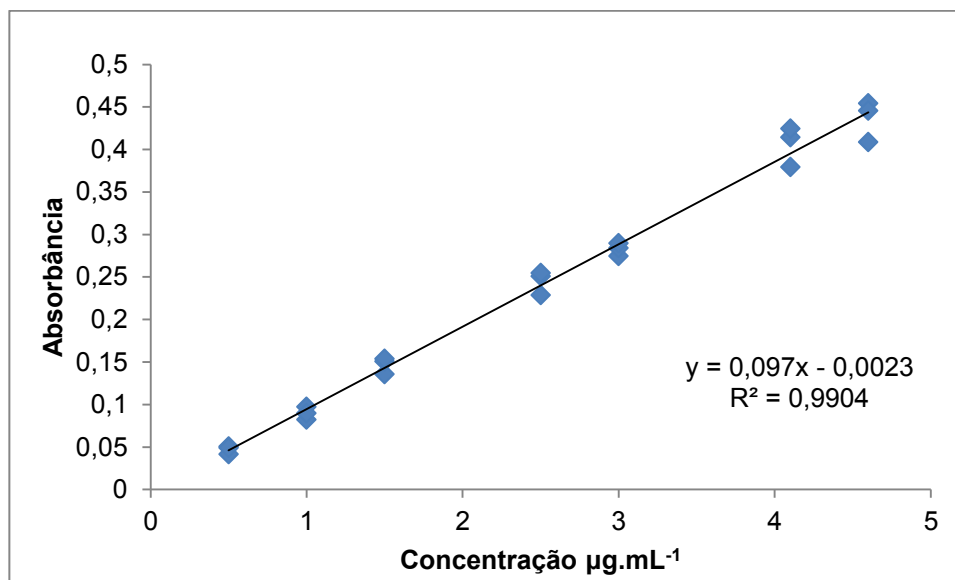
WONG, P. Y. Y.; KITTS, D. D. Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. **Food Chemistry**, v. 97, p. 505–515, 2006.

WONG, S. P.; LEONG, L. P.; KOH, J. H. W. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. **Food Chemistry**, v. 99, p. 775–783, 2006

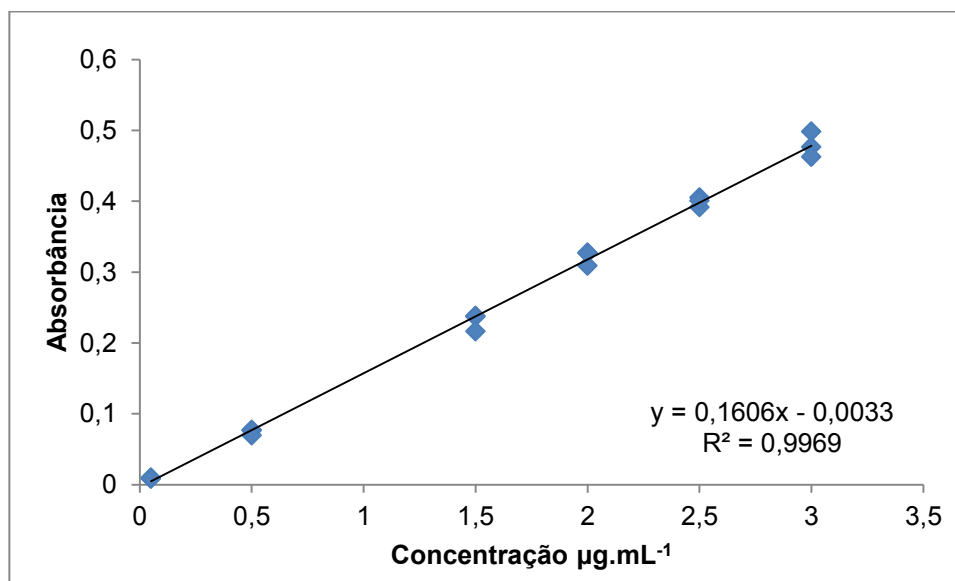
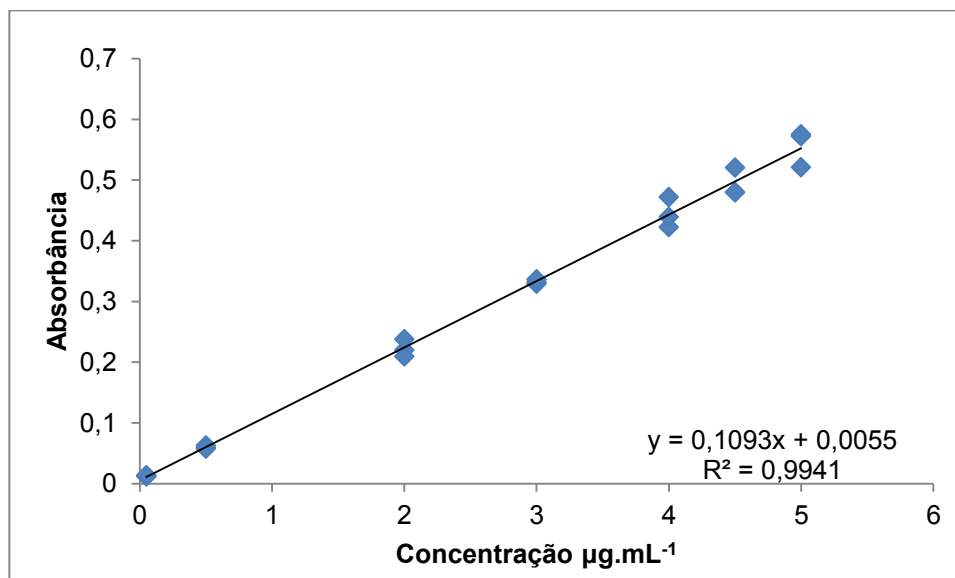
## 6. Apêndices

### Apêndice A - Curva de calibração de ácido gálico.



**Apêndice B - Curva de calibração de ácido ascórbico para DPPH.****Apêndice C – Curva de calibração de trolox para DPPH.**



**Apêndice D - Curva de calibração de ácido ascórbico para ABTS.****Apêndice E - Curva de calibração de trolox para ABTS.**

## Considerações Finais

Poucos são os estudos que verificam a época de cultivo de hortaliças sobre o teor de seus compostos bioativos e antioxidantes, como apresentando neste estudo. É de grande importância o conhecimento dos diferentes compostos bioativos presentes nas hortaliças e a variação de seu teor por meio da época de cultivo analisada.

Os três cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.), sendo elas a alface americana, crespa e lisa, e também três variedades de condimentos, o coentro (*Coriandrum sativum* L.), a salsa (*Petroselinum crispum*, (Mill.) Nym.) e a cebolinha (*Allium fistulosum* L.) podem ser caracterizados como potenciais fontes de compostos bioativos e antioxidantes naturais quando incluídas na dieta humana.

Entre as alfaces, a variedade que mais se destacou com valores elevados de compostos bioativos e antioxidantes foi a alface crespa, que normalmente não é a mais preferida entre os consumidores, porém apresenta ótimas quantidades de compostos benéficos a saúde e, a alface americana, que é a preferida pelos consumidores, é a variedade que apresenta menores teores de compostos bioativos e antioxidantes, como comprovado neste estudo.

Entre os condimentos, o coentro recebeu grande destaque, no entanto ele não é muito consumido em nossa região, porém esse estudo fornece informações científicas para as pessoas adquirirem novos hábitos alimentares saudáveis e incluírem esse novo condimento na dieta.