



Andreia Maria Fernandes Rego

Licenciatura em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

Estudo da extração e caracterização de compostos bioativos a partir de casca, farelo e arroz de variedades portuguesas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica

Orientador (a): Doutora Isabel Palmira Joaquim Castanheira, Investigadora principal, Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Co-orientador (a): Prof.^a Doutora Ana Maria Martelo Ramos, Professora Associada, Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Paulo Barbosa Mota, FCT-UNL
Arguente: Prof.^a. Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando, FCT-UNL
Vogal: Doutora Isabel Palmira Joaquim Castanheira, DAN-INSA



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Novembro 2014

Andreia Maria Fernandes Rego

Licenciatura em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

Estudo da extração e caracterização de compostos bioativos a partir de casca, farelo e arroz de variedades portuguesas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica

Orientador (a): Doutora Isabel Palmira Joaquim Castanheira, Investigadora Principal, Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Co-orientador (a): Prof.^a Doutora Ana Maria Martelo Ramos, Professora Associada, Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa

Estudo da extração e caracterização de compostos bioativos a partir de casca, farelo e arroz de variedades portuguesas

Direitos de cópia

Estudo da extração e caracterização de compostos bioativos a partir de casca, farelo e arroz de variedades portuguesas

Copyright © 2014 – Andreia Maria Fernandes Rego – FCT/UNL – UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Todos os excertos e imagens retirados de diversos artigos, presentes ao longo desta dissertação são reproduzidos sob a permissão dos editores originais e sujeitos às restrições de cópia impostos pelos mesmos. A restante dissertação aplica-se a indicação de direitos de autor em nome de Andreia Maria Fernandes Rego, FCT/UNL e UNL.

Estudo da extração e caracterização de compostos bioativos a partir de casca, farelo e arroz de variedades portuguesas

Agradecimentos

É da minha vontade deixar aqui expresso o meu agradecimento e reconhecimento a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar, à minha orientadora, Doutora Isabel Castanheira, do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (DAN-INSA), pelos conhecimentos que me transmitiu, pela excelente orientação científica, pela pronta colaboração e disponibilidade face a todas as minhas solicitações no decorrer deste trabalho. Um grande obrigado por este apoio incondicional.

À Prof.^a Doutora Ana Maria Martelo Ramos, do Departamento de Química, por toda a compreensão, disponibilidade, ajuda e orientação no melhor caminho a tomar. E por todos os conhecimentos que me transmitiu, o meu sincero obrigado.

À Prof.^a Doutora Ana Sofia Matos, do Departamento de Engenharia e Gestão Industrial, por toda a disponibilidade prestada e contributo no tratamento estatístico.

À Dr.^a Catarina André, e Inês Delgado, bolsistas do Departamento de Alimentação e Nutrição, do Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge, pelo acolhimento que me prestaram, por todos os conselhos valiosos, críticas construtivas e pelo todo bom ambiente de trabalho que me proporcionaram.

A Dr.^a Carla Mota, do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, por todos os conhecimentos que me transmitiu.

Ao Ricardo Fitas, que acompanhou esta etapa praticamente desde o início, um grande obrigado por toda a dedicação e carinho que me foi dado, e em especial pela grande compreensão e paciência que teve, principalmente nas alturas menos boas durante o decorrer desta etapa.

E por último, um especial obrigado à minha família e aos meus amigos pelo apoio incondicional e pela enorme paciência em aturar todos os meus dias de intermináveis crises e neuras que toda esta etapa me proporcionou. Em especial, aos meus pais que sem eles, nada disto teria sido possível.

A todos os meu eterno agradecimento, Obrigado.

Estudo da extração e caracterização de compostos bioativos a partir de casca, farelo e arroz de variedades portuguesas

Resumo

O arroz é o alimento básico para milhões de pessoas no Mundo inteiro. Como tal, o seu valor nutricional é algo de extrema importância. Contudo, ao seu processamento está associado um desperdício dos resíduos que advêm do seu descasque e branqueamento, o farelo e a casca.

O principal objetivo deste trabalho consistiu no estudo do valor nutricional do grão de arroz e da valorização dos resíduos (farelo e casca) através da avaliação da atividade antioxidante. O estudo foi aplicado a três frações do bago de arroz: grão, farelo e casca, de três subvariedades diferentes: opale, ariete e ellebi.

Foi avaliado o perfil de macronutrientes nas amostras de arroz, entre eles o teor de humidade, cinza, proteína e gordura. O grão foi a fração que apresentou maior teor de humidade, o farelo a que apresentou maior teor de gordura e proteína e a casca maior teor de cinza.

Os compostos bioativos foram extraídos pelo método de extração sólido-líquido, usando como solvente uma mistura aquosa de metanol. A caracterização dos compostos antioxidantes dos extratos foi analisada através do teste da eliminação dos radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) e pelo método de Folin-Ciocalteu. Para a identificação dos compostos bioativos foi utilizada a técnica de UPLC-PDA (Cromatografia líquida de ultra eficiência - Detetor de matriz de Fotodíodos).

A casca foi o extrato que continha uma maior capacidade antioxidante e um maior conteúdo de fenólicos totais (TPC), e o extrato do grão o que apresentou menor valor. Identicamente, foi na casca onde se conseguiu identificar um maior número de compostos, entre os quais se destacam os ácidos genticóico, isoferúlico, vanílico, elágico, p-cumárico e levulínico.

A extração de compostos antioxidantes de farelo e casca de arroz demonstrou ser uma via bastante promissora para a valorização destes resíduos.

Palavras-chave

Arroz, macronutrientes, extração metanólica, DPPH^{*}, TPC, UPLC-PDA

Estudo da extração e caracterização de compostos bioativos a partir de casca, farelo e arroz de variedades portuguesas

Abstract

Rice is the staple food for millions of people around the world. Therefore, its nutritional value is something of utmost importance. However, its processing is associated with the production of waste residues which arises from its peel and bleaching, the bran and the husk.

The main objective of this work was to study the nutritional value of the rice grain and valuing the residues (bran and husk) by evaluating their antioxidant activity. The study was applied to three fractions of the rice: grain, bran and husk, of three different sub-varieties: opale, ariete and ellebi.

The macronutrient profile of the rice samples including, moisture, ash, protein and fat contents was evaluated. The grain was the fraction with the highest moisture content, bran presented the highest fat and protein content, and the husk the higher ash content.

Bioactive compounds were extracted by solid-liquid extraction method using as solvent an aqueous methanol. The characterization of antioxidant compounds in the extracts was performed by testing the elimination of free radicals DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and by the Folin-Ciocalteu method. For the identification of bioactive compounds, UPLC-PDA (Ultra Performance Liquid Chromatography–photodiode detector array efficiency) was used.

The husk extract was the one with the greatest antioxidant capacity and a greater total phenolic content (TPC), having the grain extract the lowest. Similarly, in the husk was where it was possible to identify a larger number of compounds, among which gentisic, isoferulic, vanillic, ellagic, p-coumaric and levulinic acids.

The extraction of antioxidant compounds from samples of bran and rice husk was a potential route to increase the value of these residues.

Key Words

Rice, macronutrients, methanol extraction, DPPH^{*}, TPC, UPLC–PDA

Estudo da extração e caracterização de compostos bioativos a partir de casca, farelo e arroz de variedades portuguesas

Índice de Matérias

Resumo	vii
Abstract.....	ix
Índice de Matérias	xi
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xvii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xxi
Comunicações apresentadas em congressos	xxiii
1. Objetivos.....	1
2. Introdução.....	3
2.1. Arroz	3
2.1.1. Produção e Consumo Mundial do Arroz	3
2.1.2. Estrutura e composição do bago de arroz	4
2.1.3. Processos de transformação do arroz e seus produtos e subprodutos.....	5
2.1.4. Aplicações dos resíduos provenientes dos processos de transformação	7
2.2. Macronutrientes	7
2.3. Compostos Antioxidantes.....	9
2.3.1. Compostos fenólicos	9
2.4. Métodos de extração dos compostos bioativos	11
2.5. Métodos de caracterização dos compostos bioativos.....	12
2.5.1. Determinação da Capacidade antioxidante – Princípio do método	12
2.5.2. Determinação do Conteúdo de fenólicos totais – Princípio do método	13
2.6. Método de identificação de compostos bioativos.....	13
2.6.1. Cromatografia líquida de ultra eficiência - UPLC	13
2.6.2. Colunas cromatográficas.....	14
2.6.3. Detetores	15
2.7. Outras amostras estudadas	16
2.7.1. Breve descrição das amostras	16
3. Materiais e Métodos	23
3.1. Amostras.....	23
3.2. Reagentes e Padrões.....	24
3.3. Instrumentação.....	24
3.4. Análise de macronutrientes	24
3.5. Análise de compostos bioativos	25
3.5.1. Extração de compostos bioativos.....	25
3.5.2. Preparação das soluções de extrato	25
3.5.3. Determinação da capacidade antioxidante	26
3.5.4. Determinação do conteúdo de fenólicos totais	26
3.5.5. Identificação e caracterização de compostos bioativos por UPLC-PDA.....	27
3.6. Análise estatística.....	28

4.	Apresentação e Discussão de Resultados.....	29
4.1.	Arroz	29
4.1.1.	Macronutrientes	29
4.1.2.	Análise de compostos bioativos	38
4.1.3.	Análise global entre o teste TPC e a quantificação de compostos por UPLC	66
4.2.	Outras amostras estudadas	66
4.2.1.	Identificação das amostras e métodos	66
4.2.2.	Apresentação e discussão dos resultados	67
5.	Conclusões e Proposta para trabalho futuro	83
5.1.	Propostas para trabalho futuro	85
6.	Referências Bibliográficas	87
7.	Anexos.....	93
	Anexo A – Determinação de água / humidade e resíduo seco em géneros alimentícios	93
	Anexo B – Determinação de Cinza em géneros alimentícios	96
	Anexo C – Determinação de azoto/Proteína em géneros alimentícios	98
	Anexo D – Determinação de Gordura em géneros alimentícios.....	101
	Anexo E – Extração de compostos bioativos das amostras de Oca Argentina	104
	Anexo F – Análise de variância aos macronutrientes	105
	Anexo G – Análise de variância ao teste do DPPH'	117
	Anexo H – Análise de variância ao teste do TPC	120
	Anexo I – Preparação das soluções para o cálculo do IC ₅₀ (outras amostras estudadas).....	124

Índice de Figuras

Figura 2.1 – Produção de arroz com casca (Milhares de Toneladas) por continente em 2012 [1]	3
Figura 2.2 – Representação gráfica da quantidade produzida e consumida (milhares de toneladas) em Portugal de 2007/2008 ⁽¹⁾ a 2011/2012 ⁽¹⁾ [4]	4
Figura 2.3 – Estrutura do bago de arroz	4
Figura 2.4 – Fluxograma do processo de transformação do arroz e seus produtos e subprodutos	6
Figura 2.5 – Esquema de Weende (adaptado de [13])	8
Figura 2.6 – Principais classes de compostos fenólicos [24].....	10
Figura 2.7 – Estrutura básica dos principais polifenóis (adaptado de [25])	10
Figura 2.8 – Espectro UV-Vis da reação do radical DPPH	12
Figura 2.9 – Processo geral do funcionamento do HPLC / UPLC	14
Figura 2.10 – Representação esquemática do detetor de matriz de díodos do DAN-INSA	15
Figura 2.11 – Imagem ilustrativa da planta de quinoa [59]	16
Figura 2.12 – Imagem ilustrativa das sementes de quinoa.....	18
Figura 2.13 – Imagem ilustrativa das sementes de amaranto	19
Figura 2.14 – Imagem ilustrativa das sementes de trigo-sarraceno	19
Figura 2.15 - Imagem ilustrativa do milho roxo	20
Figura 2.16 - Imagem ilustrativa de algumas variedades de Oca	21
Figura 3.1 – Representação esquemática do trabalho realizado no âmbito deste estudo	23
Figura 4.1 – Curva cinética da reação de DPPH' com os extratos metanólicos das três frações do bago de arroz	41
Figura 4.2 – Curva de inibição dos radicais de DPPH pelos extratos metanólicos em função do tempo nas três frações do bago de arroz.....	41
Figura 4.3 – Curva de calibração do ácido gálico	44
Figura 4.4 – Relação entre TPC e atividade antioxidante.....	47
Figura 4.5 – Cromatograma dos padrões a 280 nm, no primeiro teste	50
Figura 4.6 – Cromatograma dos padrões a 280 nm, no segundo teste	52
Figura 4.7 – Cromatograma do ácido ferúlico a 280 nm.....	54
Figura 4.8 – Cromatograma do ácido ferúlico dissolvido em água:acetoneitrilo (99:1) a 280 nm.....	54
Figura 4.9 – Cromatograma dos padrões a 310 nm, nas condições do quarto teste	54
Figura 4.10 – Cromatograma do extrato com os correspondentes padrões a 230 nm	55
Figura 4.11 – Cromatograma do extrato com os correspondentes padrões a 280 nm	55
Figura 4.12 – Cromatograma do extrato com os correspondentes padrões a 310 nm	56
Figura 4.13 – Cromatograma dos padrões (4 mg/L) detetados a 230 nm	58
Figura 4.14 – Cromatograma dos padrões (4 mg/L) detetados a 280 nm	58
Figura 4.15 – Cromatograma dos padrões (4 mg/L) detetados a 310 nm.....	59
Figura 4.16 – Identificação e quantificação dos compostos antioxidantes nas amostras	65
Figura 4.17 – Curva cinética da reação de DPPH' com os extratos metanólicos das amostras de cereais e pseudocereais.....	70

Figura 4.18 – Curva de inibição dos radicais DPPH pelos extratos metanólicos em função do tempo nas amostras de cereais e pseudocereais	70
Figura 4.19 – Curva cinética da reação de DPPH' com os extratos metanólicos das amostras de mel	72
Figura 4.20 – Curva de inibição dos radicais DPPH pelos extratos metanólicos em função do tempo nas amostras de mel	72
Figura 4.21 – Curva cinética da reação de DPPH' nas amostras de oca	73
Figura 4.22 – Curva de inibição dos radicais de DPPH em função do tempo nas amostras de oca ...	73
Figura 4.23 – Curva de calibração do ácido gálico para o cálculo do TPC nas amostras de mel e oca, (n=2)	75
Figura 4.24 – Relação entre TPC e atividade antioxidante nas amostras de milho roxo e trigo-sarraceno.....	78
Figura 4.25 – Relação entre TPC e atividade antioxidante nas amostras de mel português	78
Figura 4.26 – Relação entre TPC e atividade antioxidante nas amostras de oca	79
Figura F.1 – Verificação da normalidade para as diferentes determinações de macronutrientes nas amostras de grão de arroz	106
Figura F.2 – Verificação da independência para as diferentes determinações de macronutrientes para as amostras de grão de arroz	107
Figura F.3 – Verificação da homogeneidade da variância na determinação do teor humidade e proteína nas amostras de grão de arroz	108
Figura F.4 – Verificação da homogeneidade da variância na determinação do teor cinza e gordura nas amostras de grão de arroz	108
Figura F.5 – Verificação da normalidade na determinação do teor de humidade e gordura nas amostras de farelo de arroz.....	110
Figura F.6 – Verificação da normalidade na determinação do teor de cinza e proteína nas amostras de farelo de arroz	110
Figura F.7 – Verificação da independência nas determinações do teor de humidade e cinza nas amostras de farelo de arroz.....	111
Figura F.8 – Verificação da independência nas determinações do teor de proteína e gordura nas amostras de farelo de arroz.....	111
Figura F.9 – Verificação da homogeneidade da variância nas determinações de macronutrientes nas amostras de farelo de arroz.....	112
Figura F.10 – Verificação da normalidade na determinação do teor de humidade e cinza nas amostras de casca de arroz	114
Figura F.11 – Verificação da normalidade na determinação do teor de proteína e gordura nas amostras de casca de arroz	114
Figura F.12 – Verificação da independência nas determinações do teor de humidade e cinza nas amostras de casca de arroz	115
Figura F.13 – Verificação da independência nas determinações do teor de proteína e gordura nas amostras de casca de arroz	115

Figura F.14 – Verificação da homogeneidade da variância nas determinações do teor de humidade e cinza nas amostras de casca de arroz.....	116
Figura F.15 – Verificação da homogeneidade da variância nas determinações do teor de proteína e gordura nas amostras de casca de arroz.....	116
Figura G.1 – Verificação da normalidade para o teste do DPPH nas amostras de grão, farelo e casca de arroz.....	118
Figura G.2 – Verificação da independência para o teste de DPPH' nas amostras de grão, farelo e casca de arroz.....	118
Figura G.3 – Verificação da homogeneidade da variância na determinação da capacidade antioxidante nas amostras de grão e farelo de arroz.....	119
Figura G.4 – Verificação da homogeneidade da variância na determinação da capacidade antioxidante nas amostras de casca de arroz.....	119
Figura H.1 – Verificação da normalidade para o teste do TPC nas amostras de grão de arroz.....	121
Figura H.2 – Verificação da normalidade para o teste do TPC nas amostras de farelo e casca de arroz.....	121
Figura H.3 – Verificação da independência para o teste de TPC nas amostras de grão de arroz.....	122
Figura H.4 – Verificação da independência para o teste de TPC nas amostras de farelo e casca de arroz.....	122
Figura H.5 – Verificação da homogeneidade da variância na determinação do TPC nas amostras de grão de arroz.....	123
Figura H.6 – Verificação da homogeneidade da variância na determinação do TPC nas amostras de farelo e casca de arroz.....	123

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 – Identificação das restantes amostras.....	16
Tabela 2.2 – Principais aplicações da quinoa (adaptado de [15, 59])	17
Tabela 2.3 – Macronutrientes do grão da Quinoa (adaptado de [61])	17
Tabela 2.4 – Característica do tubérculo segundo a variedade estudada.....	21
Tabela 3.1 – Identificação e descrição das amostras de arroz usadas neste estudo.	23
Tabela 3.2 – Preparação das soluções para o cálculo do IC ₅₀	26
Tabela 3.3 – Parâmetros instrumentais e condições operacionais do sistema de UPLC-PDA.....	28
Tabela 4.1 – Resultados do teor de humidade, cinza, proteína e gordura nas amostras de grão arroz	30
Tabela 4.2 – Coeficiente de Spearman (ρ) para as correlações entre as determinações de macronutrientes nas amostras de grão de arroz estudadas.....	32
Tabela 4.3 – Resultados do teor de humidade, cinza, proteína e gordura nas amostras de farelo de arroz.....	32
Tabela 4.4 – Coeficiente de Spearman (ρ) para as correlações entre as determinações de macronutrientes nas amostras de farelo de arroz estudadas	34
Tabela 4.5 – Resultados do teor de humidade, cinza, proteína e gordura nas amostras de casca de arroz.....	34
Tabela 4.6 – Coeficiente de Spearman (ρ) para as correlações entre as determinações de macronutrientes nas amostras de casca de arroz estudadas.....	35
Tabela 4.7 – Média dos resultados de macronutrientes obtidos independentemente da variedade....	36
Tabela 4.8 – Coeficiente de Spearman (ρ) para as correlações entre as determinações de macronutrientes nas diferentes frações	37
Tabela 4.9 – Condições de extração das amostras.....	38
Tabela 4.10 – Médias dos rendimentos de extração das amostras.	39
Tabela 4.11 – Capacidade antioxidante nos extratos metanólicos das amostras de arroz determinada pelo método do DPPH'	42
Tabela 4.12 – Conteúdo de fenólicos totais nas amostras de arroz pelo método de Folin-Ciocalteu	44
Tabela 4.13 – Conteúdo de fenólicos totais nos extratos de arroz pelo método de Folin-Ciocalteu..	46
Tabela 4.14 – Coeficiente de Spearman (ρ) para as correlações entre as determinações de DPPH' e TPC nas diferentes frações	47
Tabela 4.15 – Comprimento de onda máximo de absorvância dos padrões determinado por UV-Vis	49
Tabela 4.16 – Condições UPLC-PDA utilizadas no primeiro teste	50
Tabela 4.17 – Tempos de retenção dos diferentes padrões de antioxidantes no primeiro teste	51
Tabela 4.18 – Condições UPLC-PDA utilizadas no segundo teste	52
Tabela 4.19 – Tempos de retenção dos diferentes padrões de antioxidantes, no segundo teste	53
Tabela 4.20 – Características analíticas para a determinação dos compostos antioxidantes	57
Tabela 4.21 – Compostos fenólicos identificados nas amostras de grão de arroz.....	60

Tabela 4.22 – Quantificação de compostos antioxidantes identificados nas amostras de farelo de arroz.....	61
Tabela 4.23 – Quantificação de compostos antioxidantes identificados nas amostras de casca de arroz.....	63
Tabela 4.24 – Identificação das novas matrizes e das determinações realizadas nas mesmas	67
Tabela 4.25 – Resultados do teor de humidade, cinza, proteína e gordura nas amostras de quinoa, arroz e amaranto	68
Tabela 4.26 – Rendimentos de extração das amostras.....	69
Tabela 4.27 – Capacidade antioxidante nos extratos metanólicos das amostras de cereais e pseudocereais determinada pelo método do DPPH'	71
Tabela 4.28 – Capacidade antioxidante nas amostras de mel determinada pelo método do DPPH' ..	72
Tabela 4.29 – Capacidade antioxidante nas amostras de oca determinada pelo método do DPPH' ..	73
Tabela 4.30 – Conteúdo de fenólicos totais nas amostras de milho e pseudocereais pelo método de Folin-Ciocalteu.....	74
Tabela 4.31 – Conteúdo de fenólicos totais nas amostras de mel pelo método de Folin-Ciocalteu ..	76
Tabela 4.32 – Conteúdo de fenólicos totais nas amostras de oca pelo método de Folin-Ciocalteu ..	77
Tabela 4.33 – Coeficiente de Spearman (ρ) para as correlações entre as determinações de DPPH' e TPC nas diferentes variedades de mel português	79
Tabela 4.34 – Coeficiente de Spearman (ρ) para as correlações entre as determinações de DPPH' e TPC nas diferentes variedades de oca	79
Tabela 4.35 – Compostos antioxidantes identificados nas amostras de oca	80
Tabela D.1 – Toma da amostra para análise	101
Tabela F.1 – ANOVA para as determinações de macronutrientes realizadas às amostras de grão de arroz.....	105
Tabela F.2 – Identificação das diferenças significativas pelo teste LSD	106
Tabela F.3 – ANOVA para as determinações de macronutrientes realizadas às amostras de farelo de arroz.....	109
Tabela F.4 – Identificação das diferenças significativas nas amostras de farelo de arroz pelo teste LSD	109
Tabela F.5 – ANOVA para as determinações de macronutrientes realizadas às amostras de casca de arroz.....	113
Tabela F.6 – Identificação das diferenças significativas nas amostras de casca de arroz pelo teste LSD	113
Tabela G.1 – ANOVA para o teste do DPPH' realizadas às amostras de grão, farelo e casca de arroz	117
Tabela G.2 – Identificação das diferenças significativas pelo teste LSD.....	117
Tabela H.1 – ANOVA para o teste do TPC realizadas às amostras de grão, farelo e casca de arroz	120
Tabela H.2 – Identificação das diferenças significativas pelo teste LSD	120
Tabela I.1 – Preparação das soluções de cereais e pseudocereais para o cálculo do IC ₅₀	124

Tabela I.2 – Preparação das soluções de mel para o cálculo do IC ₅₀	124
Tabela I.3 – Preparação das soluções de oca para o cálculo do IC ₅₀	124

Estudo da extração e caracterização de compostos bioativos a partir de casca, farelo e arroz de variedades portuguesas

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AG – Ácido Gálico

ANOVA – Análise de variância

BEH – Ethylene Bridged Hybrid

Cdo – Comprimento de onda

CV – Coeficiente de variação

DAN – Departamento de Alimentação e Nutrição do INSA

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Organização para a Agricultura e Alimentação das Nações Unidas

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*, Cromatografia líquida de Alta eficiência

INSA – Instituto de Saúde Doutor Ricardo Jorge

LD – Limite de deteção

LQ – Limite de quantificação

LSD – Teste da menor diferença significativa

MeOH – Metanol

ND – Não detetado

One-way ANOVA – Análise de variância com um fator e vários níveis

PDA – *Photodiode Array Detector*, Detetor de matriz de Fotodíodos

TPC – *Total Phenolic Content*, Conteúdo total de fenólicos

UPLC – *Ultra Performance Liquid Chromatography*, Cromatografia líquida de Ultra eficiência

USDA – *United States Department of Agriculture*, Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

UV-Vis – *Ultraviolet-visible spectroscopy*, espectroscopia ultravioleta visível

°C – Graus Celsius

Na₂CO₃ – Carbonato de sódio

n – Número de réplicas

N – Número de repetições

p – Nível mínimo de significância

α – Nível de significância

ρ – Coeficiente de correlação de Spearman

% – Percentagem

< LQ – Abaixo do limite de quantificação

R² – Coeficiente de correlação

Comunicações apresentadas em congressos

Do trabalho realizado durante o período de estágio no Instituto de Saúde Dr. Ricardo Jorge, foi possível realizar as seguintes comunicações apresentadas em congressos:

- C. André, T. Pinto, I. Delgado, A. Rego, C. Mota. "Determination of total phenolic content and antioxidant capacity in rice husk". 3rd IMEKO Symposium on Traceability in chemical, Food and Nutrition Measurements, Lisboa, Portugal, (2013).
- C. André, I. Delgado, A. Rego, C. Mota, A. Ramos. "Determinação do conteúdo fenólico total e atividade antioxidante em arroz branqueado, farelo e casca de arroz". 6^a Reunião anual PortFIR, Lisboa, Portugal, (2013).
- A. Rego, C. André, I. Castanheira. "Determinação do conteúdo fenólico total e atividade antioxidante do mel". 12^o Encontro de Química dos Alimentos, Lisboa, Portugal, (2014).
- I. Delgado, A. Rego, C. André, C. Mota, I. Castanheira. "Determinação de macronutrientes em três variedades de casca, farelo e grão de arroz português". 12^o Encontro de Química dos Alimentos, Lisboa, Portugal, (2014).
- I. Delgado, A. Rego, C. André, I. Castanheira. "Caracterização de antioxidantes na casca, farelo e grão de arroz português por UPLC-PDA". 12^o Encontro de Química dos Alimentos, Lisboa, Portugal, (2014).
- A. Rego, C. André, I. Delgado, N. Samman, I. Castanheira. "Antioxidant activity and characterization of antioxidants from Argentina Oca". [Apresentação oral], 1st IMEKOFOODS, Roma, Itália, (2014).
- C. André, I. Delgado, A. Rego, I. Castanheira. "Antioxidant activity and characterization from Portuguese rice husk". 28th EFFoST Conference and 7th International Conference on the Food Factory for the Future, Uppsala, Suécia, (2014). (Aceite para publicação).
- C. André, I. Delgado, A. Rego, I. Castanheira. "Polyphenols from rice husk cultivated in Portugal: Characterization and antioxidant activities assessment". 27th International Conference on polyphenols, Nagoya, Japão, (2014). (Aceite para publicação).

1. Objetivos

O arroz é o alimento básico para milhões de pessoas no Mundo inteiro. Como tal, o seu valor nutricional é algo de extrema importância. No entanto, associado ao processamento e produção de arroz está o desperdício de resíduos como, por exemplo, o farelo e, principalmente, a casca.

Sendo assim, o principal objetivo deste trabalho foi para além do estudo do valor nutricional do grão de arroz e foi estendido à valorização dos resíduos provenientes do branqueamento e descasque.

Foi então avaliado o perfil de macronutrientes nas três frações do bago, grão, farelo e casca, nomeadamente a determinação do teor de humidade, proteína, gordura e cinza.

Determinou-se, também, a capacidade antioxidante e o conteúdo fenólico das três frações.

Foi ainda feita a identificação de alguns compostos antioxidantes por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC), tendo sido necessário o desenvolvimento e otimização da técnica para estes produtos.

O segundo objetivo deste estudo surgiu como um complemento a este estudo e consistiu em alargar a aplicação dos métodos desenvolvidos a outras amostras de cereais (milho roxo), pseudocereais (amaranto, trigo-sarraceno e quinoa), mel e oca.

Estudo da extração e caracterização de compostos bioativos a partir de casca, farelo e arroz de variedades portuguesas

2. Introdução

2.1. Arroz

O arroz é uma planta monocotiledónea da família das gramíneas (*Poaceae*). É a segunda maior cultura cerealífera do mundo, (dados relativos ao ano de 2012), sendo responsável por alimentar cerca de metade da população mundial [1].

Atualmente, sabe-se que o arroz é um dos alimentos mais antigos consumidos pelo homem, sendo impossível fazer uma determinação exata do seu cultivo. Existem estudos genéticos que referem que foi o arroz selvagem (*Oryza rufipogo*) que deu origem ao arroz asiático nos Himalaias que, por sua vez, devido às diferenças climáticas deu origem a duas variedades diferentes: *Oryza sativa L.* Indica do lado indiano e *Oryza sativa L.* Japonica do lado chinês [2].

Além do arroz asiático existe outra variedade cultivada de origem africana: *Oryza glaberrima Steur.*

Como consequência da sua vasta história enquanto cultivo, existe atualmente um grande número de variedades, estimando-se em cerca de 120 000 [3].

2.1.1. Produção e Consumo Mundial do Arroz

O arroz (*Oryza sativa L.*) é o cereal mais importante do Mundo e uma fonte primária de alimento para cerca de metade da população mundial. Estima-se que, em média, alimente cerca de três bilhões de pessoas por dia [1].

Os principais dados estatísticos referentes à produção e consumo do arroz no Mundo encontram-se na Figura 2.1 e Figura 2.2.

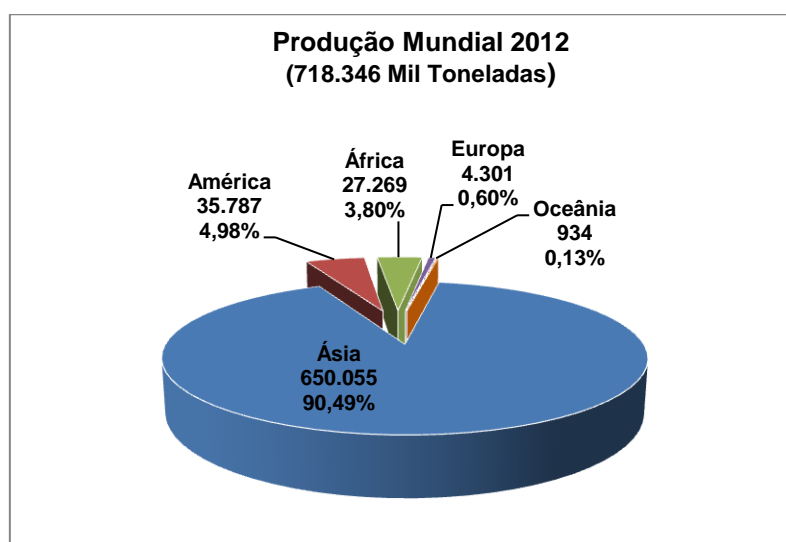


Figura 2.1 – Produção de arroz com casca (Milhares de Toneladas) por continente em 2012 [1]

A Ásia é o maior Produtor de arroz do Mundo, com cerca de 90 % da produção, seguido da América do Norte e Sul, com aproximadamente 5 % da produção, encontrando-se a Europa em penúltimo lugar, com cerca de 0,6 % da produção mundial no ano de 2012 [1].

No caso da Europa, Portugal é o quarto maior produtor de arroz com casca, ficando atrás da Itália, Espanha, e Grécia [1]. Os restantes países europeus contribuem com pequenas quantidades. Em 2012, Portugal teve uma produção de 184 mil toneladas de arroz com casca, cerca de 167 mil toneladas de arroz branqueado [1, 4].

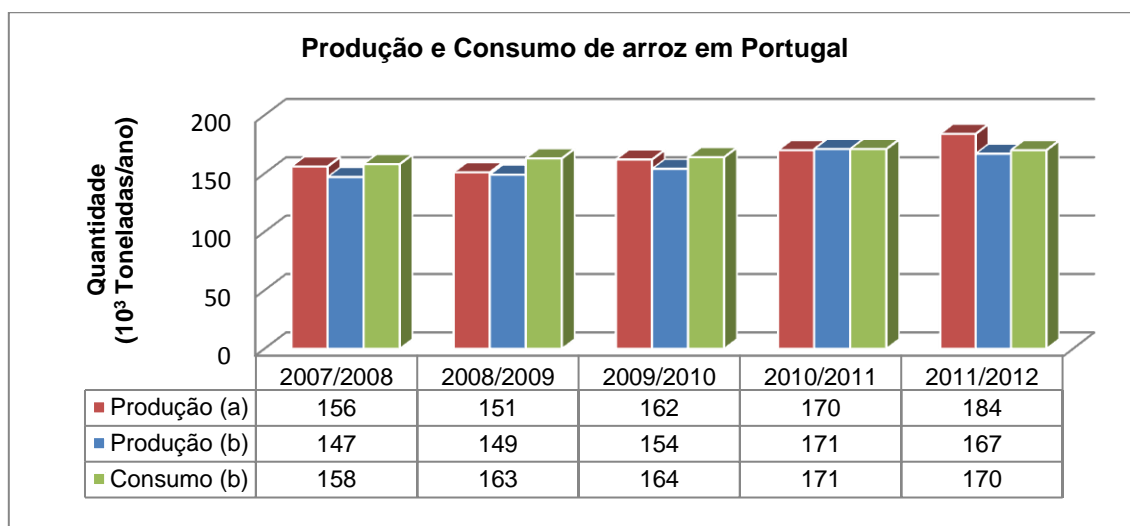


Figura 2.2 – Representação gráfica da quantidade produzida e consumida (milhares de toneladas) em Portugal de 2007/2008 ⁽¹⁾ a 2011/2012 ⁽¹⁾ [4]
a) Arroz com casca; b) Arroz branqueado; ⁽¹⁾ Período de referência: Setembro do ano n a Agosto do ano n+1.

Relativamente ao consumo humano de arroz, o total de arroz branqueado consumido em Portugal ultrapassa a quantidade produzida, pelo que se torna necessário a sua importação, como se pode verificar pela Figura 2.2.

Dados de 2011, reportam que Portugal é o maior consumidor de arroz por habitante, por dia da Europa, consumindo 167 Kcal/capita/dia, ou seja, cerca de 181 mil toneladas de arroz branqueado consumido nesse ano [1].

2.1.2. Estrutura e composição do bago de arroz

O bago de arroz é constituído essencialmente pela casca, farelo, endosperma e pelo embrião. Para uma melhor compreensão, a estrutura do bago é representada na Figura 2.3.

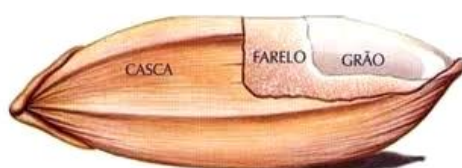


Figura 2.3 – Estrutura do bago de arroz

A casca é a camada protetora e é constituída pela lema e pálea, que representa em média cerca de 20 % do peso do bago (a maioria das variedades tem um teor de casca no intervalo de 19-22 %). Contém uma defesa antioxidante que impede a semente de sofrer *stress* oxidativo e é constituída por cerca de 22 % de lenhina, 38 % de celulose, 18 % hemicelulose, 2 % de extrativos e 20 % de resíduos orgânicos (maioritariamente cinzas) [2, 5, 6].

O farelo é formado por diferentes camadas entre as quais se destacam o pericarpo, o tegumento e a aleurona, representando cerca de 5-8 % da massa do arroz integral, e 10 % da massa do arroz em casca. O arroz integral é obtido através da separação da casca do farelo (descasque), como será abordado no subcapítulo seguinte, 2.1.3. O farelo constitui a parte mais nutritiva do arroz e é uma boa fonte de compostos fitoquímicos bioativos que têm propriedades benéficas para a saúde e atividade antioxidante. É constituído essencialmente por fibras de celulose, hemiceluloses e minerais [2, 6, 7].

O embrião fica localizado na base do grão e é quimicamente constituído por proteínas e lípidos (representa 2-3 % do arroz integral). O endosperma representa a maior parte do grão cerca de 89-94 % do arroz integral e consiste em células ricas em amido [6].

O arroz é rico em muitos nutrientes incluindo hidratos de carbono, proteínas, alguns ácidos gordos e micronutrientes tais como vitaminas e minerais traço. Para além disso, é uma fonte de compostos bioativos, conhecidos como antioxidantes, nomeadamente compostos fenólicos. Os micronutrientes importantes para os seres humanos, tais como vitaminas e minerais, estão largamente presentes no grão de arroz e nas suas camadas exteriores, isto é, dentro das camadas de farelo biologicamente ativas, incluindo o germe.

Entre as várias frações do bago de arroz, o farelo é a fração com maior teor de energia e de proteína, enquanto que a casca é a menor. O teor de fibra, por sua vez, é superior no farelo e na casca e inferior no grão [8].

Os valores acima referidos são apenas valores referência, dado que a percentagem e composição do farelo/casca/grão de arroz varia de acordo com a variedade do arroz, pré-tratamento sujeito antes do branqueamento/descasque, tipo de branqueamento/sistema e o grau de descasque/branqueamento [6, 7].

2.1.3. Processos de transformação do arroz e seus produtos e subprodutos

O processo de transformação do arroz pode ser dividido em duas fases. A fase de cultura e crescimento da planta do arroz é a primeira fase realizada. Esta compreende os processos de seleção de sementes, preparação dos terrenos de cultivo, crescimento e maturação da planta e por fim a colheitas dos grãos de arroz ainda com casca. Em Portugal, o arroz é cultivado em condições de inundação quase permanente, enquanto noutros continentes pode ser cultivado em condições de sequeiro ou submersão mais ou menos profunda (arroz flutuante). O arroz é uma planta anual, no

entanto, em algumas regiões tropicais, onde as condições climáticas são favoráveis, cresce como planta perene.

A segunda fase do processo inclui os processos de limpeza/lavagem, secagem, armazenamento, descasque, branqueamento e polimento, sendo o descasque e branqueamento os principais processos de transformação a que o arroz é sujeito. Destes resulta o produto final (grãos inteiros e brancos) e vários subprodutos como o farelo e a casca, e impurezas.

O fluxo de transformação de materiais com os vários produtos/subprodutos obtidos pelas indústrias de transformação encontram-se esquematizados na Figura 2.4.

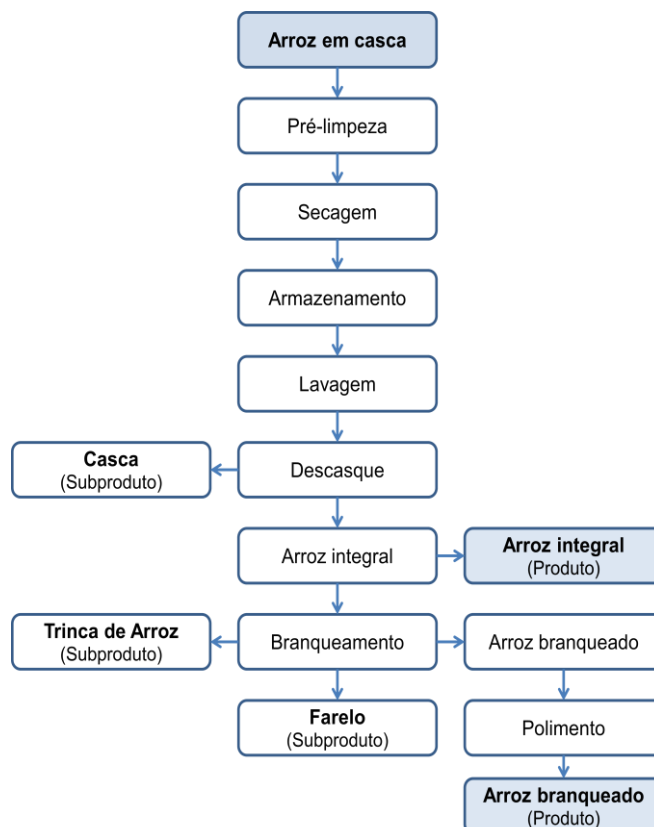


Figura 2.4 – Fluxograma do processo de transformação do arroz e seus produtos e subprodutos

O primeiro processo é a pré-limpeza que tem como objetivo fazer uma eliminação das impurezas mais grosseiras que dificultam o processo seguinte, a secagem. A secagem reduz o teor de humidade do bago para um nível seguro de armazenamento, (normalmente 14 %) [9]. Segue-se o armazenamento e a lavagem. Os processos seguintes compreendem as fases de remoção das várias camadas de arroz. Através do descasque, separa-se a casca (subproduto) do restante bago, obtendo-se arroz integral (produto). O processo seguinte corresponde ao branqueamento, que consiste no desgaste do grão removendo o farelo. Por fim, efetua-se o polimento do grão branqueado, obtendo-se como produto arroz branco que constitui a maior fração da produção [9].

No decorrer dos processos de transformação, a aplicação de forças externas aos grãos podem conduzir a quebra de grãos originando a trinca de arroz (fração de grãos quebrados com

comprimentos igual ou inferior a três quartos do grão inteiro). Apesar de apresentar uma qualidade nutricional inferior ao grão de arroz pode ser vendido para consumo humano, sendo vendido em muitos países africanos e até em Portugal para faixas mais pobres da população Portuguesa [10].

A concentração das principais vitaminas (vitaminas do complexo B, vitamina E), bem como de minerais importantes (cálcio, ferro, etc) diminuem progressivamente com o processo de transformação. Uma extensa moagem ou branqueamento do arroz integral produz um grão que é substancialmente desprovido desses micronutrientes essenciais [2].

2.1.4. Aplicações dos resíduos provenientes dos processos de transformação

Na indústria do arroz, existe um grande desperdício a nível Mundial dos subprodutos obtidos no processo de transformação, como o farelo e a casca.

Atualmente, os resíduos agrícolas têm sido alvo de grande foco, no sentido de minimizar o desperdício e, conseqüentemente, o detrimento ambiental causado. Desse modo, têm sido feitos estudos que nos conduzem a evidências de que os resíduos agrícolas são fontes de antioxidantes naturais. Como tal, e como já foi referido, o presente estudo visa, também, fazer uma valorização dos resíduos provenientes dos processos de transformação a que o arroz é sujeito, como a casca e o farelo.

O farelo e, principalmente, a casca de arroz são desvalorizados, pois são utilizados em aplicações de baixo valor económico, principalmente na agricultura animal, condicionamento e compostagem do solo.

Em alguns países, a casca também é usada como fonte de energia, mas muitas vezes é apenas deixada nos campos causando detrimento ambiental, onde demora cerca de 5 anos para se decompor. Apesar do farelo ser principalmente usado na alimentação animal, a casca não é aconselhada dado aos valores altos de cinza e lenhina presentes na sua constituição [5].

O farelo, normalmente, não é utilizado diretamente para consumo humano pois contém alto teor de fibra e, possivelmente, resíduos de casca [11]. No entanto, hoje em dia, é utilizado como alimento suplementar e na produção de óleo comestível [12].

Atualmente, os resíduos industriais e agrícolas, como a casca do arroz, por exemplo, têm sido fontes atrativas de antioxidantes naturais [5].

2.2. Macronutrientes

Uma das etapas realizadas neste trabalho foi a determinação de macronutrientes. Os macronutrientes são nutrientes que fornecem calorias e energia. Estes são essenciais para o crescimento, para o metabolismo e para outras funções corporais.

As técnicas utilizadas na determinação da composição química de produtos alimentares derivam da investigação realizada por Henneberg e Stohnann na Estação de Weende, tendo sido assim criado o esquema de Weende, que, praticamente, não tem sofrido alterações ao longo do

tempo, exceto na determinação do teor de proteína. Segundo Henneberg, a composição do alimento é descrita de acordo com o esquema representado na Figura 2.5.

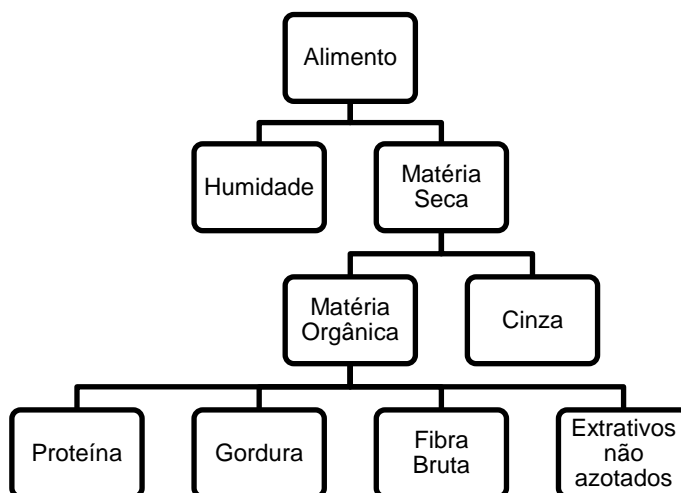


Figura 2.5 – Esquema de Weende (adaptado de [13])

Segundo o procedimento de Weende, a humidade determina-se pela perda de peso sofrida pela amostra quando seca a 100 – 105 °C até peso constante. Trata-se de uma técnica suscetível de numerosas críticas, uma vez que é comum haver erros por defeito ou por excesso, bastando considerar o facto de, por este método, serem englobados no resultado do teor de humidade substâncias voláteis eventualmente presentes na amostra (erros por excesso), ou o facto de, em alguns alimentos, não ser possível eliminar completamente a água (erros por defeito). O teor de humidade no arroz é variável, sendo elevado na altura da colheita e alterado conforme o tipo de armazenamento a que é sujeito, normalmente sendo reduzido.

Entende-se por cinza o resíduo calcinado obtido, submetendo a amostra a uma temperatura de 525 °C, no caso de cereais numa mufla. A temperatura escolhida afeta o resultado final, uma vez que se for demasiado baixa dificulta a calcinação da amostra e se for muito alta provocará decomposição e perda de alguns elementos minerais.

A gordura bruta é a fração da amostra extraída por um solvente orgânico num sistema de extração Soxhlet. A gordura é uma importante fonte de calorías e uma importante ajuda na absorção de vitaminas lipossolúveis. A base da gordura são os ácidos gordos e o glicerol, sendo que os ácidos gordos podem ser divididos em três grupos, ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados. Existem dois ácidos gordos estritamente essenciais ao ser humano, pois não são produzidos por síntese humana, o ácido linoleico, e o ácido α -linolenico [14].

A proteína neste estudo é determinada pelo método de Kjeldahl. A qualidade nutricional da proteína é determinada pela proporção dos aminoácidos essenciais ao ser humano, sendo que existem dez aminoácidos que são estritamente essenciais ao ser humano: lisina, isoleucina, leucina, fenilalanina, tirosina, treonina, triptofano, valina, histidina e metionina [15]. É recomendado que um

adulto, em média, consoma diariamente no mínimo 0,8 gramas de proteínas por cada quilograma de massa corporal.

2.3. Compostos Antioxidantes

Os antioxidantes são definidos como substâncias capazes de prevenir, ou retardarem, a oxidação de outras moléculas [16], [17]. Estes compostos geralmente apresentam uma estrutura química aromática e contêm, pelo menos, um grupo hidroxilo.

Cada vez mais, há um interesse nos antioxidantes naturais [17], em especial nos fenólicos, dadas as suas propriedades benéficas para a saúde, tais como, redução no risco de desenvolver doenças crónicas relacionadas com o stress oxidativo [17], [18] como, cancro [18]–[21], doenças cardiovasculares [18], e doenças neurais, como Alzheimer e Parkinson [17]. Os antioxidantes desempenham assim um papel importante na prevenção de doenças e envelhecimento. Como tal, os antioxidantes naturais como a vitamina E (α -tocoferol), vitamina C e polifenóis /flavonoides têm sido cada vez mais investigados.

Estes tipos de antioxidantes podem ser encontrados em frutos, vegetais, cereais e outras plantas alimentares.

Dos vários compostos antioxidantes que se conhecem, destacam-se nos cereais, os carotenoides, vitaminas antioxidantes e compostos fenólicos.

A casca e o farelo, como anteriormente referido, são as camadas protetoras do grão de arroz, que protegem os materiais internos, tendo na sua composição compostos com função protetora como os antioxidantes, maioritariamente compostos fenólicos.

2.3.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos ou polifenóis, segundo Naczki e Shahidi [22], são considerados metabolitos secundários que são sintetizados pelas plantas durante o seu desenvolvimento normal como resposta a condições *stress* como infeções, feridas, entre outros.

Os polifenóis são substâncias que possuem anel aromático, com um ou mais substituintes hidroxilo, incluídos nos seus grupos funcionais [21]. Estes compostos são classificados em cinco classes que são apresentadas na Figura 2.6, das quais se destacam os flavonoides e ácidos fenólicos [21, 23]; por sua vez, os ácidos fenólicos, dividem-se no grupo de compostos que derivam do ácido hidroxicinâmico ou que derivam do ácido hidrozibenzoico. Os flavonoides, por sua vez, podem ser divididos em três subclasses com estrutura semelhante: flavonóis, flavonas e flavanonas.

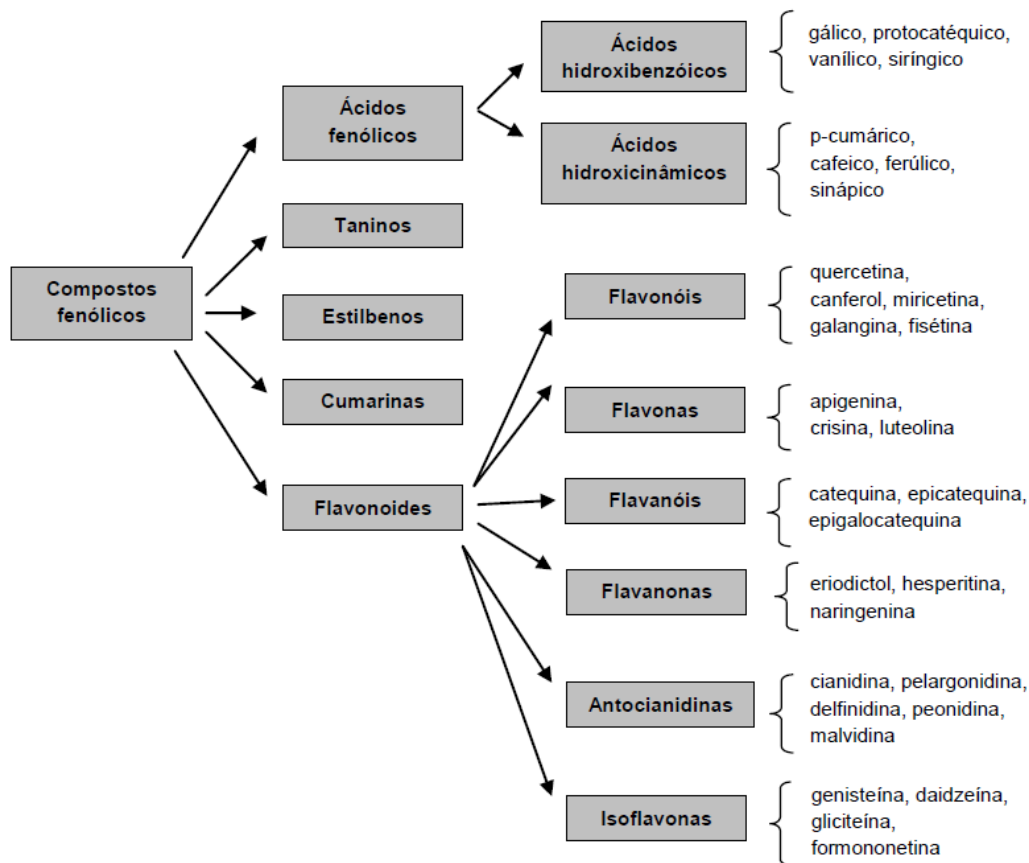


Figura 2.6 – Principais classes de compostos fenólicos [24]

As estruturas básicas das principais classes de compostos fenólicos, nomeadamente a estrutura dos ácidos hidrozibenzoico, hidroxicinâmicos e flavonoides, estão representadas na Figura 2.7.

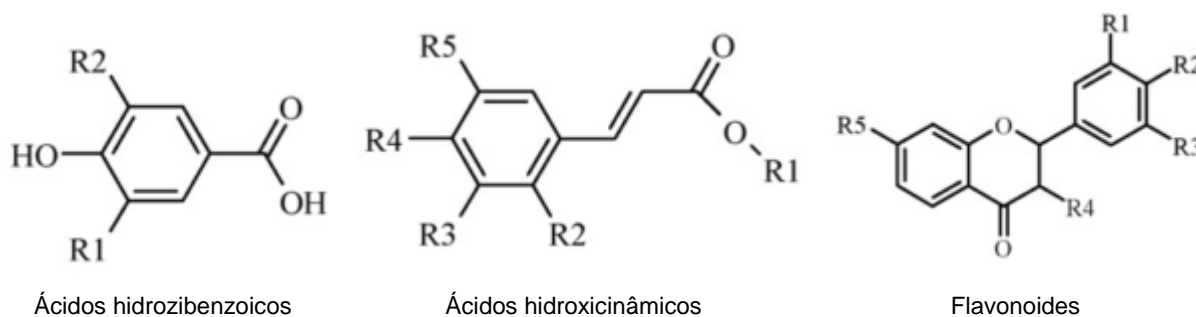


Figura 2.7 – Estrutura básica dos principais polifenóis (adaptado de [25])

Ácidos fenólicos como o cafeico, cumárico, vanílico, ferúlico e protocatecuico estão presentes em quase todas as plantas [26].

Os fenólicos referidos como sendo os mais predominantes no arroz são o ácido ferúlico e p-cumárico e existem nas formas conjugadas ou livres [27]. No entanto, na maioria dos casos, os

ácidos ferúlico não são encontrados no seu estado livre, e sim nas formas conjugadas solúveis ou insolúveis.

2.4. Métodos de extração dos compostos bioativos

Na extração de compostos fenólicos de plantas alimentares, é necessário ter em conta algumas considerações como a natureza química da planta, localização e acessibilidade dos compostos ativos [22, 28] (o que irá influenciar o método de preparação de amostra, ou seja, processos de moagem e homogeneização), método de extração utilizado (tempo de extração, temperatura, rácio solvente/amostra, solvente utilizado, número de extrações realizadas) [22, 28], tamanho de partícula da amostra [28], tempo e condições de armazenamento e presença de substâncias interferentes [22]. Para além desses fatores, o tipo de compostos que se pretendem extrair (frações solúveis ou insolúveis) também têm de ser tidos em conta, uma vez que na extração das frações insolúveis são necessários pré-tratamentos à extração como a hidrólise ácida, extração alcalina, ou enzimática [28], de forma a conseguirem quebrar-se as ligações entre os compostos fenólicos conjugados.

Em suma, a extração é geralmente influenciada pela natureza da planta (matriz), tamanho da partícula, tipo de solvente, assim como pelo método de extração utilizado [28].

A maioria das técnicas convencionais são baseadas no poder de extração dos diferentes solventes utilizados, sendo as técnicas mais comuns, a extração sólido-líquido e Soxhlet [29, 30]. Estes métodos utilizam solventes polares, sendo os mais utilizados a água, acetona, álcoois, como o metanol e etanol, e combinações entre solventes [22, 28, 31].

O metanol é o solvente mais eficiente na extração de compostos bioativos [31–35]. No entanto, de modo a garantir uma eficiência maior, usualmente é utilizada uma mistura aquosa de modo a aumentar a polaridade da mistura de extração, dada a natureza polar dos compostos fenólicos [30, 36, 37]. Vários investigadores usam 80 % v/v metanol [38–43].

Normalmente, para além do solvente mais apropriado, o aumento do tempo de extração e da temperatura (parâmetros críticos no método de extração) influencia, de forma positiva, o aumento do rendimento de extração. Porém, os compostos fenólicos são termolábeis, não devendo ser extraídos a temperaturas altas, em virtude de se degradarem [28].

Contudo, este tipo de extrações tem cada vez sido mais controversa, pois é utilizada uma grande quantidade de solventes que, para além das repressões a nível ambiental, têm um custo elevado [29]. Sendo assim, têm sido desenvolvidos e otimizados novos métodos que são considerados técnicas verdes [29]. Estes métodos de extração necessitam de menos quantidade de solvente e utilizam produtos químicos menos poluentes. Dentro desta gama destacam-se a extração com fluidos supercríticos, processamento de alta pressão hidrostática, aquecimento por micro-ondas, digestão enzimática, [28–30, 36, 44]. Porém, estes métodos são dispendiosos e necessitam de infraestruturas laboratoriais nem sempre disponíveis.

Face a estas limitações, este trabalho foi efetuado recorrendo-se ao método convencional de extração sólido-líquido.

2.5. Métodos de caracterização dos compostos bioativos

Existem inúmeros métodos usados para deteção de ações antioxidantes gerais (capacidade antioxidante) ou específicas (fenólicos totais). O método mais utilizado na determinação de fenólicos totais é o Folin-Ciocalteu. No caso da determinação da capacidade antioxidante, são utilizados diversos métodos, sendo os mais conhecidos o FRAP (poder redutor férrico), o ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) e o DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) [45], sendo este último um dos métodos mais populares [46].

2.5.1. Determinação da Capacidade antioxidante – Princípio do método

A capacidade antioxidante das amostras foi determinada através do método de eliminação do radical livre DPPH. Este é um método colorimétrico simples e rápido e altamente sensível. O DPPH[•] é caracterizado pela sua coloração roxa apresentando uma forte absorção na zona dos UV-Vis (espectroscopia ultravioleta visível) aos 517 nm, como se pode verificar pela Figura 2.8, [17, 45].

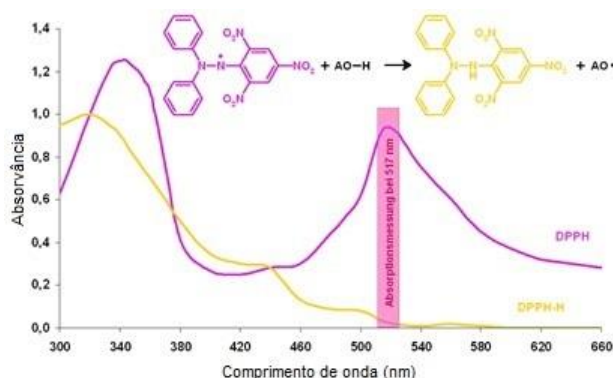
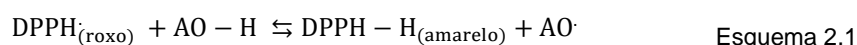
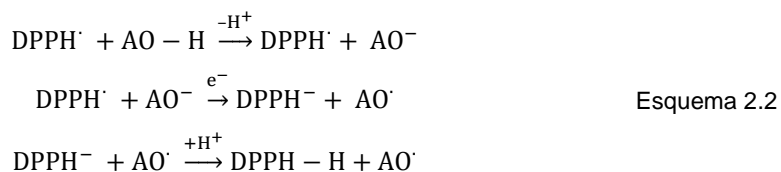


Figura 2.8 – Espectro UV-Vis da reação do radical DPPH

Este método é baseado na capacidade do DPPH[•] ao ser reduzido pelos antioxidantes. A redução do radical DPPH é facilmente perceptível, pois ocorre uma mudança de cor da solução de roxo para amarelo, originando uma descida acentuada na absorvância [17, 47]. A reação da redução entre o DPPH[•]/compostos antioxidantes (AO-H) presentes nas amostras está seguidamente representado, Esquema 2.1, [48, 49].



O mecanismo baseia-se na transferência de eletrão de um antioxidante para o DPPH[•] como se pode ver sequencialmente no esquema reacional a seguir descrito (Esquema 2.2).



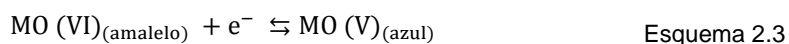
Como a quantidade de DPPH[·] que é reduzido é proporcional à capacidade da amostra em reduzir radicais, é possível assumir que a quantidade de DPPH[·] reduzido é equivalente à capacidade antioxidante das substâncias presentes na amostra.

2.5.2. Determinação do Conteúdo de fenólicos totais – Princípio do método

O conteúdo de fenólicos totais (TPC) foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu. Este é o método espectroscópico mais atrativo na determinação do TPC devido à sua sensibilidade, rápida resposta, reprodutibilidade e precisão em comparação com outros métodos.

O reagente de Folin-Ciocalteu apresenta uma coloração amarela e é constituído por uma mistura de ácido fosfomolibdénico e ácido fosfotungsténico. Este método baseia-se na capacidade dos compostos fenólicos reduzirem os complexos dos ácidos fosfomolibdénico/fosfotungsténico, formando cromóforos de cor azul que absorvem a um comprimento de onda máximo de 765 nm [50].

A reação de oxidação/redução entre o reagente de Folin-Ciocalteu e os compostos fenólicos está representada na seguinte reação, Esquema 2.3 [47, 51, 52].



Esta reação só ocorre apenas sob certas condições, ajustadas pela solução de carbonato de sódio a pH 10. Os valores finais de absorvância são normalmente proporcionais ao número de grupos hidroxilos (OH) fenólicos que reagiram [50, 51].

2.6. Método de identificação de compostos bioativos

O método usado para fazer a identificação de compostos bioativos foi a cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC), em fase reversa, com detetor de matriz de fotódodos (PDA).

2.6.1. Cromatografia líquida de ultra eficiência - UPLC

O sistema analítico HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) / UPLC é constituído principalmente pelos seis módulos que se encontram representados na Figura 2.9.

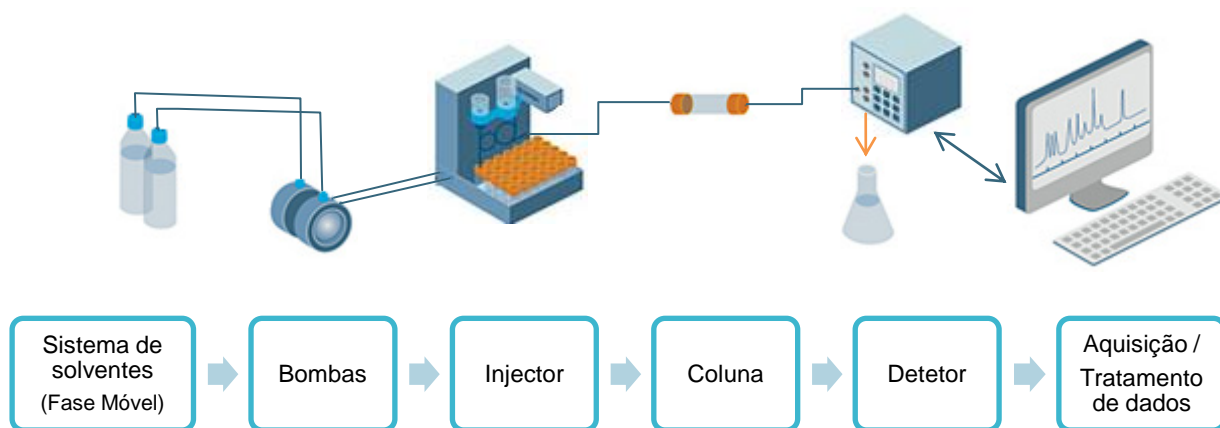


Figura 2.9 – Processo geral do funcionamento do HPLC / UPLC

A eluição da fase móvel pode ocorrer de duas formas: esta pode ser isocrática, onde a concentração da fase móvel é mantida durante toda a corrida; e por gradiente, onde, ao longo da corrida, a concentração do solvente vai variando.

O UPLC baseia-se nos mesmos princípios que a cromatografia líquida de alta eficiência. No entanto, este foi desenvolvido de modo a suportar pressões até 3 vezes superiores. Isto deve-se ao facto de a grande diferença entre estes dois métodos residir na diminuição do tamanho de partícula do enchimento da coluna (o que provoca uma perda de carga superior, originando um aumento da pressão), e no aumento da velocidade linear da fase móvel, comparativamente ao HPLC, o que resulta numa melhoria da *performance* cromatográfica [53].

O uso de partículas de menores dimensões (inferiores a 2 μm) proporciona um aumento da eficiência da coluna. Consequentemente, esta nova tecnologia de separação analítica, permite mais resolução, sensibilidade e, ao mesmo tempo, menor tempo de corrida, comparativamente com um sistema HPLC [53–55].

2.6.2. Colunas cromatográficas

A coluna cromatográfica é o elemento, juntamente com a fase móvel, responsável pela separação dos componentes da amostra. Como já foi referido, a cromatografia realizada neste estudo é em fase reversa. Este tipo de cromatografia utiliza uma fase estacionária apolar e fase móvel polar, logo, contrariamente à cromatografia clássica, a eluição dos compostos polares ocorre primeiro do que os apolares [56, 57].

A coluna escolhida para este estudo foi a coluna ACQUITY UPLC BEH (*ethylene bridged hybrid*) C18 da Waters.

2.6.3. Detetores

Os detetores são os responsáveis pela deteção dos componentes de uma amostra durante a sua eluição. Eles medem e indicam a variação da composição da fase móvel ao sair da coluna cromatográfica, através de um sinal elétrico, que é diretamente proporcional à concentração do componente na amostra [57].

A escolha do detetor a utilizar vai depender das propriedades exibidas pelos compostos a analisar. No caso presente, como os compostos que se pretendem analisar absorvem em UV, foi utilizado o detetor de matriz de fotodíodos (PDA).

2.6.3.1. Detetor de matriz de fotodíodos

Detetores deste tipo conseguem detetar qualquer absorção de luz desde a região do ultravioleta (190 nm) até à região do visível (720 nm). Uma das maiores vantagens de usar este detetor é ser possível monitorizar simultaneamente uma ampla gama de comprimentos de onda de uma só vez. Consequentemente, fornece benefícios a nível da redução do tempo da corrida e na redução no gasto de solvente [55, 56, 58].

Na Figura 2.10 encontra-se ilustrada a representação esquemática de um detetor do tipo PDA.

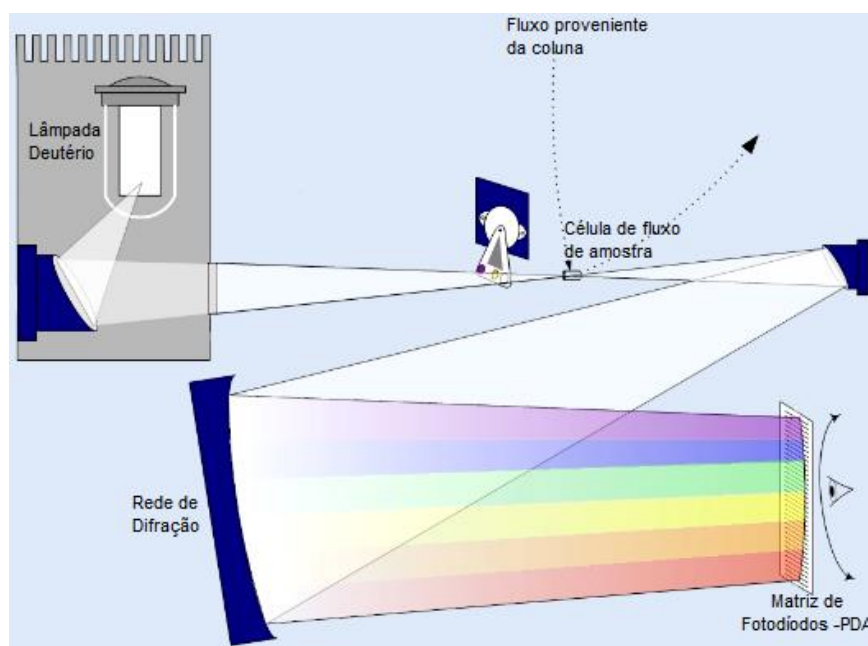


Figura 2.10 – Representação esquemática do detetor de matriz de diodos do DAN-INSA

O funcionamento do detetor PDA do DAN-INSA tem como base de funcionamento o seguinte: um feixe de luz proveniente da lâmpada de deutério é irradiado na rede de difração, depois de passar através da célula de fluxo de amostra. A rede de difração dispersa o feixe de luz na matriz de fotodíodos, onde a luz dispersa é convertida em sinais elétricos para cada comprimento de onda [55, 56, 58].

2.7. Outras amostras estudadas

Durante o período de estágio no INSA correspondente à realização da dissertação de mestrado, foi surgindo a possibilidade de aprofundar os conhecimentos adquiridos, no contexto do trabalho de antioxidantes a outras matrizes, para além das amostras de arroz que serviram de objeto a este estudo, como se encontra identificado na tabela abaixo, Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Identificação das restantes amostras.

Amostras
Quinoa
Mel
Oca
Milho Roxo
Trigo-sarraceno
Amaranto

2.7.1. Breve descrição das amostras

2.7.1.1. Quinoa

A Quinoa (*Chenopodium quinoa*) é um pseudocereal¹ herbáceo originário dos Andes, na América do Sul. Cresce como planta perene na Colômbia, Equador, Bolívia, Peru, Chile e na Argentina. É uma planta que possui cerca de 1 a 3 metros de altura e raízes profundas, Figura 2.11.

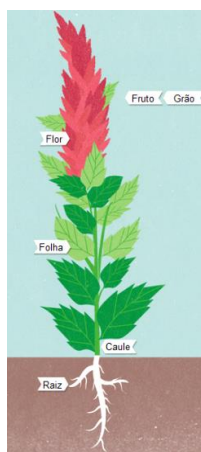


Figura 2.11 – Imagem ilustrativa da planta de quinoa [59]

¹ Plantas de famílias diferentes dos cereais (*Poaceae*) mas que apresentam valores proporcionalmente próximos de carboidratos, lipídeos, proteínas e fibras em relação a estes. Destacam-se pelo alto teor e qualidade da proteína, com ausência de glúten, possuindo ainda algumas vitaminas e minerais em maior quantidade.

Atualmente, é cultivada para uso comercial um pouco por todo o Mundo (em mais de 70 países), sendo os principais produtores a Bolívia e o Peru (com cerca de 92 % da produção em 2009), seguidos dos Estados Unidos, do Equador, da Argentina e do Canadá (com apenas 8 % da produção em 2009) [1, 59, 60].

As principais aplicações da quinoa encontram-se resumidas na tabela, Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Principais aplicações da quinoa (adaptado de [15, 59])

Principais Aplicações	Componente implicado	Órgão da planta
Nutrição humana	Vitaminas	Sementes, Folhas e Caule
	Proteínas	
Alimentação animal	Vitaminas	Resíduos da colheita
	Proteínas	
Medicina	Sistema imunitário	Sementes, Folhas e Caule
	Aplicações na pele	
	Aplicações no sistema circulatório	
Indústria	Repelentes de insetos	Revestimento da semente e Folhas
	Cosméticos (shampoo, etc.)	Saponina ²
	Farmacêuticos (antibióticos)	

Em comparação com outros cereais, como o arroz, o trigo ou o milho, o grão da quinoa (Figura 2.12) destaca-se por ser uma boa fonte de proteínas, fibra, gorduras polinsaturadas, e minerais. Para além disso, é um alimento que não contém glúten, recomendado para celíacos pela organização mundial de gastroenterologia, como parte da dieta dos mesmos.

A Tabela 2.3 apresenta os valores de referência de macronutrientes (uma vez que estes podem variar dependendo da espécie e da região de cultivo) citados por [15] e que reportam ao trabalho de Koziol [61].

Tabela 2.3 – Macronutrientes do grão da Quinoa (adaptado de [61])

Componente	g/100g de amostra
Energia (kcal/100g)	399
Proteína	14,6
Gordura	5,6
Cinza	3,4
Humidade (g/100g de amostra)	11,7

² A maior parte das variedades de quinoa contém saponinas, que são glicosídeos terpenos de sabor amargo que estão concentrados na casca da semente e que devem de ser removidos antes do consumo, uma vez que são tóxicas ao ser humano [61].

A quantidade de proteína na quinoa pode variar entre 10,4 a 17,0 % da sua porção comestível. É composta, essencialmente, por aminoácidos como a lisina, isoleucina, leucina e a metionina, entre outros, essenciais ao ser humano, que são comumente deficientes em outros cereais e estão todos presentes na quinoa [15, 59, 61].

O conteúdo total de gordura do óleo da quinoa provém essencialmente de ácidos gordos polinsaturados (mais de 50 %), de onde se destacam o ácido linoleico (ómega-6) e o ácido α -linolenico (ómega-3), os quais são dois ácidos gordos de extrema importância para o nosso organismo [14, 59].

A quinoa tem sido cada vez mais objeto de estudos dado a sua importância nutricional. Como tal, a Assembleia Geral da ONU proclamou o ano de 2013 como o Ano Internacional da Quinoa, com o tema “Um futuro semeado há milhares de anos” [59, 62].

Para além das sementes de quinoa, também foram estudadas duas formas processadas da mesma, floco e pipoca quinoa.



Figura 2.12 – Imagem ilustrativa das sementes de quinoa

2.7.1.2. Amarantho

O amarantho (*Amaranthus*) (Figura 2.13) é um pseudocereal herbáceo originário dos Andes. É uma planta anual que possui até 3 metros de altura.

Atualmente, são conhecidas cerca de 70 espécies, das quais aproximadamente 40 são nativas das Américas, e pelo menos 17 são comestíveis. Presentemente, são usadas três espécies de amarantho para produção de sementes: *Amaranthus cruentus* L., *A. caudatus* L. e *A. Hypochondriacus* L. [63].

As suas principais aplicações são a produção de farinha a partir das sementes, preparação de saladas e refogados (folhas frescas) e alimentação animal através de resíduos da planta [63].

Assim como a quinoa, o amarantho não tem glúten e contém um alto valor nutricional, atribuído, principalmente, ao elevado teor de proteína e à presença de aminoácidos essenciais [14]. Como tal, a nível nutricional, o amarantho é bastante semelhante à quinoa.

Segundo um estudo feito no DAN-INSA [64], não existem diferenças muito significativas nas determinações de macronutrientes realizadas entre o amarantho e a quinoa.

As folhas e as sementes são as partes da planta normalmente consumidas. López-Mejía *et. al.* [63] referiram que os níveis de macronutrientes eram significativamente diferentes ($p < 0,05$) nas

sementes e nas folhas, sendo que o teor de proteína e gordura era substancialmente maior nas sementes, enquanto que o teor de humidade, cinza e fibra era superior nas folhas.



Figura 2.13 – Imagem ilustrativa das sementes de amaranto

2.7.1.3. Trigo-sarraceno

O trigo-sarraceno (*Fagopyrum esculentum*, Figura 2.14) é um pseudocereal herbáceo sem glúten originário dos Andes, usado principalmente na alimentação humana [65]. Atualmente, é produzido em muitas regiões do Mundo, uma vez que as técnicas de cultivo encontram-se bem documentadas e é um cereal que se adapta a uma vasta gama de condições climáticas [66].

É um pseudocereal que tem vindo a fornecer nutrientes essenciais, vitaminas, energia e fibra há cerca de 8000 anos, sendo que é rico em fibras solúveis e amido. Além dos benefícios para a saúde conhecidos, cada vez há mais estudos relacionados com os flavonoides presentes no trigo-sarraceno, em especial a rutina que tem características benéficas como ajudar a controlar a pressão arterial, bem como por possuir propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas [66].



Figura 2.14 – Imagem ilustrativa das sementes de trigo-sarraceno

2.7.1.4. Milho roxo

O milho roxo (*Zea mays* L., Figura 2.15) é um cereal, com origem na região dos Andes, maioritariamente conhecido por possuir grandes quantidades de antocianinas. Assim, tem cativado a atenção da comunidade científica, dado que as antocianinas têm sido cada vez mais associadas a efeitos benéficos para a saúde. Para além disso, a maioria das propriedades atribuídas aos extratos de milho roxo, incluindo os atributos de coloração, atividade antioxidante, propriedades bioativas, etc, encontram-se também relacionadas com antocianinas [64, 67].

Para além das antocianinas, o milho roxo contém quantidades significativas de outros compostos fenólicos como ácidos e flavonoides.



Figura 2.15 - Imagem ilustrativa do milho roxo

2.7.1.5. Mel

O mel é um produto natural elaborado por abelhas e outros insetos a partir de néctar de flores e/ou exsudatos sacarínicos de plantas.

É uma solução sobresaturada de açúcares, sendo constituído maioritariamente por frutose (38 %) e glucose (31 %). Para além desses carboidratos, contém, em menor quantidade, certos constituintes como proteínas, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, lípidos, vitaminas, minerais e compostos com propriedades antioxidantes, de entre os quais se destacam os ácidos fenólicos e especialmente os flavonoides [68, 69].

A composição do mel e, conseqüentemente as suas propriedades antioxidantes, dependem de certos elementos como a origem geográfica e botânica (diversidade da flora), fatores sazonais (condições climáticas) e ambientais, composição do solo e o seu processamento [69–73]. Isto leva a que, com as diferenças na composição, o mel de diferentes origens mostra grande variabilidade no seu aspeto (cor, viscosidade), sabor e aroma (normalmente estas diferenças estão relacionadas com os flavonoides presentes) [69].

Muitos autores demonstraram que a atividade antioxidante do mel está relacionada com a cor deste, tendo concluído que um mel mais escuro é mais rico em compostos com propriedades antioxidantes (principalmente flavonoides) do que um mais claro [70–72]. Para além disso, Escuredo *et. al.* [68] demonstraram que a atividade antioxidante no mel também estava relacionada com a quantidade de flavonoides, proteína e minerais, tendo concluído que a atividade antioxidante era maior em amostras de mel com menor teor de açúcar.

2.7.1.6. Oca

A oca (*Oxalis tuberosa*) é um tubérculo amiláceo proveniente da região andina. É uma planta herbácea anual que é cultivada maioritariamente no Peru e na Bolívia, ocupando o segundo lugar na produção e no consumo, logo a seguir à batata. Este tubérculo foi introduzido na Europa no século XIX mas não se estabeleceu como uma cultura permanente [74].

A oca é cultivada como um substituto à batata comum, dado que apresenta um valor nutricional semelhante e um modo de cultivo idêntico, com a diferença que não é tão suscetível a doenças e pragas. É uma cultura que cresce facilmente em solos pobres e em condições climáticas severas [75].

Existe uma enorme diversidade de ocas, que diferem entre si, principalmente, na forma e na cor do tubérculo, podendo o tubérculo ser oval ou cilíndrico, com pele branca, amarela, laranja, rosa, roxa escura ou praticamente preta, características essas que variam dependendo do local do cultivo (solo e condições climáticas), Figura 2.16.

Não se encontram referidas na literatura outras aplicações da Oca para além do consumo humano, animal e uso medicinal. Tal como o tubérculo, as flores e as folhas são comestíveis, podendo ser consumidas tanto cozinhadas como cruas [75, 76].

Neste estudo, foram usadas as seis variedades principais que se encontram descritas e caracterizadas na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Característica do tubérculo segundo a variedade estudada

Variedade Oca	Característica do tubérculo	
	Forma	Cor
Oca Blanca	Cilíndrica	Branco
Oca Amarela	Oval	Amarelo
Oca Rosada	Cilíndrica	Rosa
Oca Overa	Oval	Roxo
Oca Morada	Cilíndrica	Roxo escuro (negro)
Oca Colorada	Cilíndrica	Amarelo e rosa

Segundo Campos *et. al.* [77], a oca, assim como os restantes tubérculos andinos estudados pelo autor, podem ser considerados como uma excelente fonte de compostos bioativos (essencialmente compostos fenólicos e carotenoides, que são os principais responsáveis pela atividade antioxidante presente nestes tubérculos). Campos *et. al.* concluíram que o teor de fenólicos totais nas amostras de oca depende da variedade, sendo mais alto nas amostras de oca roxa do que nas de oca amarela.

Chirinos *et. al.* [78] fizeram uma caracterização dos compostos fenólicos presentes em amostras de oca e a sua contribuição para a capacidade antioxidante, de onde concluem que os compostos que mais contribuem para uma maior capacidade antioxidante são a cafeína, o ácido vanílico, o ácido cinâmico e os flavonoides e seus derivados. Obtiveram, também, resultados indicativos de que as diferentes variedades de ocas estudadas continham os mesmos compostos fenólicos mas em concentrações diferentes.



Figura 2.16 - Imagem ilustrativa de algumas variedades de Oca

3. Materiais e Métodos

A sequência do trabalho experimental desenvolvido neste estudo encontra-se representada de forma esquemática na Figura 3.1.

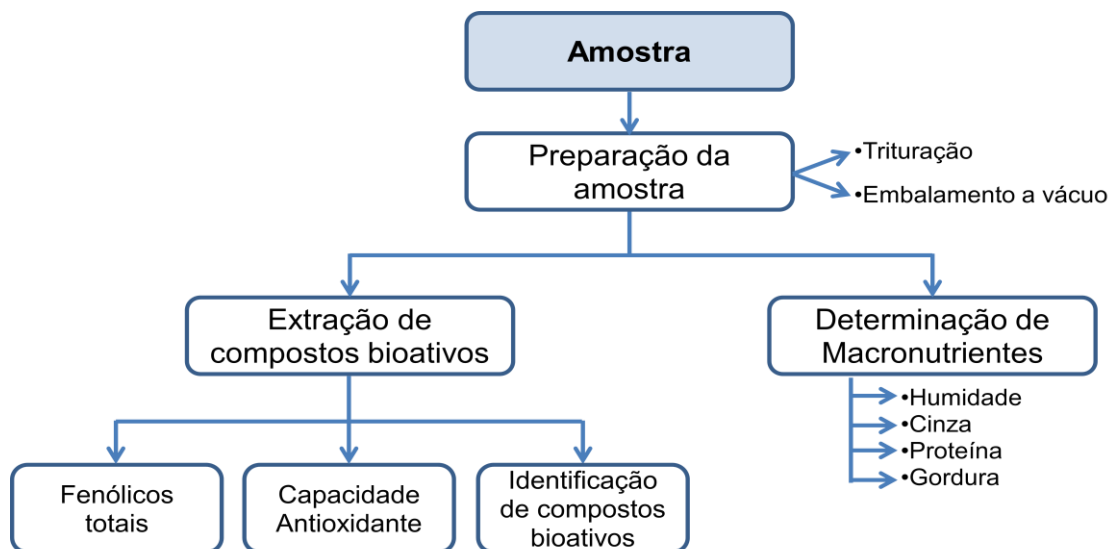


Figura 3.1 – Representação esquemática do trabalho realizado no âmbito deste estudo

3.1. Amostras

Foram fornecidas, pela indústria, nove amostras de grão, de farelo e de casca de arroz, três de cada tipo. São amostras de duas variedades típicas de Portugal: *Oryza sativa* Japonica, e *Oryza sativa* Indica, comumente designadas por arroz carolino e arroz agulha, respetivamente.

A Tabela 3.1 sumariza as variedades das amostras e os códigos de classificação usados neste estudo.

Tabela 3.1 – Identificação e descrição das amostras de arroz usadas neste estudo.

Nº de Amostra	Descrição	Variedade - Subvariedade
24	Arroz branqueado	Japonica (Carolino) - Ariete
25		Indica (Agulha) - Ellebi
26		Japonica (Carolino) - Opale
27	Farelo de arroz	Japonica (Carolino) - Ariete
28		Indica (Agulha) - Ellebi
29		Japonica (Carolino) - Opale
30	Casca de arroz	Japonica (Carolino) - Ariete
31		Indica (Agulha) - Ellebi
32		Japonica (Carolino) - Opale

As amostras foram homogeneizadas com o auxílio de um moinho/homogeneizador de laboratório, fechadas a vácuo, e armazenadas em câmara refrigerada a 4 °C, até posterior análise.

3.2. Reagentes e Padrões

Reagentes

Para a realização do presente trabalho foram utilizados os seguintes reagentes: Metanol (gradient grade for liquid chromatography), acetonitrilo (gradient grade for liquid chromatography), reagente de Folin-Ciocalteu, carbonato de sódio anidrido (p.a.), Merck; metanol (p.a.), VWR CHEMICALS; 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, Aldrich; ácido gálico (97,5-102,5 %), Sigma; ácido fórmico (99 % for analysis), Group Carlo Erba Reagents e água ultrapura (tipo 1 e 2), captada a partir de um sistema de purificação Milli-Q.

Padrões

Os padrões que foram utilizados na identificação de compostos bioativos por UPLC-PDA foram: ácido gálico (97,5-102,5 %), ácido p-cumárico (≥ 98 %), ácido elágico (≥ 95 %) ácido siríngico (≥ 95 %), ácido cafeico (≥ 98 %), Sigma; ácido palmítico (analytical standard), ácido oleico (analytical standard), ácido vanílico (≥ 97 % purum), ácido protocatecuico (analytical standart), Fluka; β -sitosterol, Cayman Chemical; ácido p-hidroxibenzoico (99 %), ácido clorogénico (≥ 95 %), ácido sinápico (≥ 98 %), ácido isoferúlico (97 %), ácido cinâmico (≥ 99 %), ácido gentísico (98 %), ácido m-cumárico (99 %), ácido o-cumárico (97 %), Aldrich; β -tocoferol (>90 %), α -tocoferol, δ -tocoferol, γ -tocoferol, Supelco; xilose (>98 %), naringin, cafeína (99,7%), galangin (97 %), Alfa Aesar; ácido levulínico (99 %), SAFC; quercetina (≥ 95 %), ácido ferúlico (≥ 99 %), ácido salicílico (≥ 99 %), o-cresol (≥ 99 %), m-cresol (>99 %), p-cresol (>99 %), Sigma-Aldrich; γ -orizanol, TCI.

3.3. Instrumentação

Na extração dos compostos bioativos das amostras utilizaram-se filtros de membrana GHP 47 mm com 0,22 μ m de poro, evaporador rotativo Butchi, e liofilizador Heto HSC 500. Nas determinações da capacidade antioxidante e do conteúdo de fenólicos totais, foi usado o espectrofotómetro Thermo electron Corporation. Para a identificação e quantificação de compostos antioxidantes, utilizou-se um cromatógrafo líquido de ultra eficiência sistema ACQUITY UPLC, equipado com um sistema de deteção PDA ACQUITY UPLC e uma coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 μ m, 2,1 x 150 mm, todos de marca Waters.

3.4. Análise de macronutrientes

Foram determinados quatro parâmetros de composição de géneros alimentícios, designadamente humidade, cinza, proteína e gordura. Os métodos de análise para estas

determinações foram estabelecidos no laboratório de Química do Departamento de Alimentação e Nutrição do INSA, cujos procedimentos se encontram nos anexos A-D, respetivamente.

3.5. Análise de compostos bioativos

Na sequência dos objetivos propostos para este trabalho, com o intuito de analisar os compostos bioativos presentes nas amostras através dos testes de determinação do teor de fenólicos totais e da capacidade antioxidante e posterior identificação dos mesmos por UPLC, houve a necessidade de se recorrer inicialmente à extração dos compostos bioativos, através de uma extração sólido-líquido com metanol.

3.5.1. Extração de compostos bioativos

Procedeu-se à extração dos compostos bioativos das amostras recorrendo a uma mistura de dois solventes polares, metanol e água. Os extratos foram preparados de acordo com o procedimento descrito por Butsat *et. al.* [40], com algumas modificações.

Preparou-se, previamente, uma solução de metanol/água a 80:20 (v/v).

Pesou-se, aproximadamente, 5 g de amostra, com a precisão de $\pm 0,1$ mg, num erlenmeyer e adicionou-se 50 mL da solução de metanol/água. Colocou-se o erlenmeyer numa estufa a 30 °C e com agitação a 150 rpm, durante 24 horas.

Após o tempo de extração, a mistura foi filtrada sob pressão reduzida com filtros GHP. O filtrado foi transferido para um balão, guardado a 4 °C, e o resíduo da amostra foi sujeito a uma nova extração nas condições anteriores. Após as 24 horas, a mistura foi novamente filtrada, sendo o filtrado adicionado ao anterior.

A solução de extrato foi concentrada no evaporador rotativo a 45 °C e 200 mbar até um volume mínimo de solvente, de modo a se retirar o metanol e, posteriormente, congelada a -80 °C.

Para retirar a água remanescente o concentrado foi liofilizado durante 2 dias..

Após a secagem completa do extrato, este foi pesado e calculado o rendimento de extração. Todas as extrações foram efetuadas em duplicado, exceto as amostras de grão de arroz, que foram efetuadas em quintuplicado, devido ao baixo rendimento de extração obtido.

Todos os extratos foram armazenados em câmara refrigerada a 4 °C, até posterior análise.

3.5.2. Preparação das soluções de extrato

As soluções de extrato foram preparadas em metanol (p.a). O extrato seco foi pesado, numa balança com a precisão de $\pm 0,1$ mg em balões volumétricos de 10 mL e o volume foi perfeito com o solvente apropriado.

3.5.3. Determinação da capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante dos extratos foi analisada através do método da eliminação de radicais livres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]).

Diariamente, protegida da luz, foi preparada uma solução mãe de DPPH[•] a 0,1 mM (pesou-se 0,0038 g de DPPH[•] para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com metanol).

Para a determinação do tempo de inibição do radical do DPPH[•], foram traçadas curvas de inibição.

Em virtude da reação ser muito rápida, o ensaio foi realizado diretamente na célula do espectrofotómetro.

Acompanhou-se a reação da mistura reacional, medindo-se a absorvância a 517 nm, contra o branco de metanol, em intervalos espaçados de 5 minutos, até esta ficar constante, determinando-se assim, o tempo de inibição de cada amostra.

As soluções de amostras de extratos foram preparadas com cinco concentrações diferentes, para o cálculo do IC₅₀, quantidade de extrato necessária para reduzir a quantidade inicial de DPPH[•] a 50 %, de acordo com o representado na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Preparação das soluções para o cálculo do IC₅₀

Solução de extrato (µL)			Metanol (µL)			Solução-mãe de DPPH [•] (mL)
Grão	Farelo	Casca	Grão	Farelo	Casca	
0	0	0	1000	1000	1000	4
100	100	100	900	900	900	
250	250	200	750	750	800	
500	500	300	500	500	700	
750	750	400	250	250	600	
1000	1000	500	0	0	500	

Após a adição da solução-mãe de DPPH[•], agitou-se a mistura e deixou-se a reagir na ausência de luz durante o tempo determinado pela curva de inibição. Após o tempo de incubação, mediu-se a absorvância a 517 nm contra o branco de metanol.

A percentagem de inibição em função da concentração de extratos foi ajustada por regressão linear, através da qual se determinou o IC₅₀. Este parâmetro foi expresso em mg de extrato por mL de mistura reacional (mg/mL). Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

3.5.4. Determinação do conteúdo de fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos totais presentes nos extratos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu com algumas modificações [79].

Preparou-se uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 15 % (m/v). Pesou-se 37,5 g de Na_2CO_3 para um balão de 250 mL, adicionou-se 150 mL de água Milli-Q (tipo 1) e levou-se à ebulição durante 5 minutos. Deixou-se arrefecer até temperatura ambiente e completou-se o volume com água Milli-Q (tipo 1).

Foram preparadas sete soluções padrão de 10, 25, 50, 75, 100, 150 e 200 $\mu\text{g/mL}$, a partir de uma solução mãe de ácido gálico a 10 mg/mL (100 mg de ácido gálico foram dissolvidos em 1 mL de metanol e diluído com água milli-Q, até um volume final de 10 mL).

Pipetou-se 50 μL das soluções de extrato das amostras ou das soluções padrão para tubos de centrífuga, seguido de 3,70 mL de água e 250 μL de reagente de Folin-Ciocalteau. No caso dos brancos, o valor adicionado de amostra foi substituído por água. A solução foi agitada e deixada em repouso durante 5 minutos.

Após o tempo de repouso, neutralizou-se a reação com 1 mL da solução de Na_2CO_3 previamente preparada. A mistura foi agitada em vórtex e incubada a 40 °C em banho de água, durante 30 minutos.

Deixou-se arrefecer a mistura, durante 10 minutos, até à temperatura ambiente. Após arrefecimento, a absorvância foi lida a 760 nm num espectrofotómetro contra um branco.

Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

Com os valores de absorvância das soluções padrão traçou-se a respetiva curva de calibração. O valor das amostras foi calculado por interpolação da referida curva, e o resultado expresso em mg de equivalentes de ácido gálico por g de amostra (mg eq. AG/g amostra).

3.5.5. Identificação e caracterização de compostos bioativos por UPLC-PDA

Foi desenvolvido o método para identificação e quantificação de compostos bioativos por UPLC-PDA.

Devido à complexidade e diferença dos diversos padrões desenvolveu-se um gradiente cujas condições são apresentadas na Tabela 3.3

Tabela 3.3 – Parâmetros instrumentais e condições operacionais do sistema de UPLC-PDA

Temperatura da Coluna	45 °C	
Temperatura sample manager	4 °C	
Fluxo	0,45 mL/min	
Volume de injeção	10 µL	
Gradiente		
Tempo (min)	% A	% B
0	99	1
7	75	25
13	0	100
15	0	100
17,50	99	1
20	99	1
Solvente A	Água 0,1 % ácido fórmico	
Solvente B	Acetonitrilo	

Os 34 padrões foram dissolvidos em metanol e, posteriormente, diluídos em acetonitrilo/água 1:99 (v/v) para uma concentração de 4 mg/L. A análise de cada padrão foi realizada em três comprimentos de onda diferentes, 230, 280 e 310 nm, para encontrar o melhor comprimento de onda de cada padrão. Para a curva de calibração, cada padrão foi injetado com diferentes volumes de modo a obter cinco concentrações diferentes 0,4, 1, 2, 3 e 4 mg/L.

Identicamente aos padrões, os extratos das amostras foram dissolvidos em metanol e posteriormente diluídos em acetonitrilo/água 1:99 (v/v).

A identificação dos compostos antioxidantes presentes nas amostras extraídas foi feita por comparação dos tempos de retenção das amostras com os tempos de retenção das soluções padrão. A quantificação foi obtida através da interpolação das curvas de calibração dos padrões.

3.6. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância com um fator a vários níveis (*One-way ANOVA*) e o teste da menor diferença significativa (*LSD*) para um nível de significância igual a 5 % ($\alpha=0,05$). Foram também realizadas análises de correlação entre os diferentes testes, utilizando o coeficiente de correlação linear de Spearman (ρ). Os dados foram considerados significativos para $p<0,05$. Toda a análise estatística foi executada utilizando o programa SPSS.

4. Apresentação e Discussão de Resultados

4.1. Arroz

4.1.1. Macronutrientes

A determinação de macronutrientes entre diferentes variedades e diferentes frações do bago de arroz português não se encontra reportada na literatura científica. Assim, foi avaliado o perfil de macronutrientes nas amostras de arroz.

De modo a determinar a composição nutricional das diferentes amostras de arroz, determinou-se o teor de humidade, cinza, proteína e gordura. Os ensaios foram realizados em duplicado ($n=2$) e os resultados foram expressos em g por 100g de matéria fresca, sendo apresentados nas tabelas, Tabela 4.1, Tabela 4.3 e Tabela 4.5.

Para efetuar uma análise correta dos resultados, foi necessário ter em consideração algumas limitações verificadas na metodologia empregue. As limitações mais importantes provieram da preparação e o tempo de armazenamento da amostra. Como vem descrito nos anexos correspondentes às determinações de macronutrientes (Anexo A a D), a amostra necessita de ser homogeneizada previamente. Esta homogeneização nem sempre é conseguida, implicando que os resultados dos replicados não coincidam, uma vez que estas determinações são extremamente sensíveis à homogeneidade e a dimensão das partículas das amostras. Uma maior ação de moagem proporciona uma maior quebra dos compartimentos celulares onde os compostos estão armazenados ocorrendo conseqüentemente uma maior libertação dos compostos. Como estávamos perante diferentes tipos de amostra (grão, farelo e casca de diferentes variedades), a homogeneização e moagem destas não é idêntica, o que influencia o resultado final. Após homogeneização, a amostra foi embalada a vácuo e armazenada de forma a tentar preservar as propriedades destas. No entanto, de cada vez que foi necessário usar alíquotas das amostras, estas condições poderão ter sido alteradas. Deste modo, as suas propriedades também se alteraram, principalmente os teores de humidade. Outro facto relevante é o envelhecimento da amostra que, como o estudo realizado por Bhattacharya [2] indica, desde o momento de recolha da amostra (especificamente arroz) e o seu processamento, as suas propriedades variam ao longo do tempo (diminuem tendencialmente), com a exceção dos teores de gordura, que permanecem sem alterações significativas. Neste estudo, como as amostras foram entregues pela indústria sem qualquer indicação da data de recolha e processamento das mesmas, as diferenças encontradas entre subvariedades também poderão ser resultantes deste facto.

Com o intuito de se conseguir identificar entre que subvariedades existiam diferenças significativas, recorreu-se à análise de variância com um fator e vários níveis (*One-way ANOVA*) e ao teste da menor diferença significativa (*LSD*). Por forma a validar os resultados obtidos com o planeamento das experiências, procedeu-se à validação dos pressupostos subjacentes à ANOVA, através da análise de resíduos e respetivas representações gráficas: Verificação da normalidade,

verificação da independência e a verificação da homogeneidade da variância. As análises de variância, as respetivas verificações dos pressupostos e conclusões, assim como os testes LSD encontram-se em anexo, Anexo F – Análise de variância aos macronutrientes. É importante referir que, como apenas é feita uma comparação entre três subvariedades de cada fração do bago com duas réplicas, a dimensão da amostra é bastante reduzida, podendo colocar em causa a interpretação gráfica da análise de resíduos, dificultando desse modo a validação dos pressupostos subjacentes à ANOVA. Esta limitação pode conduzir a resultados pouco fiáveis, colocando em causa as conclusões retiradas da análise de variância.

Uma vez que se conseguiu observar, sem necessidade de se recorrer a tratamento estatístico, que existiam desigualdades nas determinações realizadas entre as diferentes frações dos bagos de arroz, apenas foi feita a verificação das diferenças significativas entre as subvariedades estudadas a cada componente do bago.

A fim de se identificar, se existia ou não, uma relação entre as diferentes determinações de macronutrientes no arroz, foram efetuadas correlações lineares. Utilizou-se o coeficiente de correlação linear de Spearman (ρ). Este coeficiente mede a intensidade da associação linear existente entre as variáveis e pode tomar valores entre -1 e 1. Quanto mais próximo estiver destes extremos, maior será a associação entre as variáveis. O sinal negativo da correlação significa que as variáveis variam em sentido contrário, isto é, as categorias mais elevadas de uma variável estão associadas a categorias mais baixas da outra variável.

4.1.1.1. Grão de arroz

Na Tabela 4.1, apresentam-se os resultados do teor humidade, cinza, proteína e gordura para as três subvariedades de grão de arroz analisadas (ariete, ellebi e opale).

Tabela 4.1 – Resultados do teor de humidade, cinza, proteína e gordura nas amostras de grão arroz

Amostra	Humidade (g/100g de amostra)	Cinza (g/100g de amostra)	Proteína (g/100g de amostra)	Gordura (g/100g de amostra)	
Grão	24	13,60 ^a ± 0,01	0,33 ^a ± 0,01	6,54 ^a ± 0,10	0,71 ^a ± 0,06
	25	12,72 ^b ± 0,01	0,41 ^b ± 0,00	6,56 ^a ± 0,09	0,94 ^b ± 0,02
	26	13,32 ^c ± 0,03	0,48 ^c ± 0,00	7,01 ^b ± 0,12	0,97 ^b ± 0,04

^{a,b,c} Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ($p < 0,05$). Os resultados estão expressos em Médias ± Desvio padrão, $n=2$.

Pela análise dos resultados apresentados na Tabela 4.1 pode constatar-se que, relativamente à determinação do teor de humidade nas amostras de grão, existem diferenças significativas entre as subvariedades de arroz estudado, sendo que essa diferença é mais acentuada na amostra de arroz agulha (amostra 25) do que entre as amostras de subvariedades diferentes de arroz carolino (amostras 24 e 26). Verifica-se ainda que as amostras de arroz carolino apresentam um teor de humidade superior ao da amostra de arroz agulha. Estes valores encontram-se de acordo com o estudo realizado por Nascimento *et. al.* (13,10 g/100g) [64], e indicados pela página da FAO (14 %)

[8]. Porém, são superiores aos reportados em várias bases de dados de composição de alimentos para arroz branqueado, de grão longo, cru, não enriquecido, como a base de dados do USDA (11,62 g/100g) [80] e a tabela de composição dos alimentos do INSA (10,7 g/100g) [81].

No que respeita à determinação do teor de cinza (Tabela 4.1), também se verificam diferenças significativas entre todas as subvariedades de arroz analisado, tendo-se obtido uma gama de valores entre 0,33 % a 0,48 % de conteúdo mineral presente nas amostras de grão de arroz. De entre as subvariedades estudadas, as amostras de arroz carolino são as que apresentaram menor (ariete) e maior (opale) teor de matéria inorgânica. Estes resultados encontram-se dentro da gama de valores citados pela FAO (0,3 % – 0,7 %) [8]. A amostra 25 apresenta valores similares aos determinados por Nascimento *et. al.* (0,42 g/100g) [64], estando a amostra 24 abaixo, e a amostra 26, acima do reportado. Os resultados obtidos são inferiores aos referenciados na base de dados de composição de alimentos para arroz branqueado, de grão longo, cru, não enriquecido do USDA (0,64 g/100g) [80] e ao indicado na tabela de composição dos alimentos do INSA (1 g/100g) [81]. Existem várias razões para esta discrepância, nomeadamente o tipo de processamento/transformação que o bago de arroz sofreu (descasque, branqueamento, entre outros) e o tipo de moagem realizado à amostra.

Em relação à determinação do teor de proteína, pode observar-se na Tabela 4.1 que, de acordo com o teste LSD ($p < 0,05$), as amostras 24 e 25 são significativamente diferentes da amostra 26, mas não diferentes entre si. Esta disparidade entre as amostras da mesma variedade poderá ter acontecido devido às limitações referidas acima (baixa homogeneidade do produto moído). No entanto, a diferença é muito pequena, pois todas as subvariedades contêm aproximadamente 7 % de proteína. Tal como o obtido para o teor de cinza, a amostra que apresenta maior teor de proteína é a 26, e a que apresenta menor a 24. Os resultados obtidos são ligeiramente inferiores aos determinados por Nascimento *et. al.* (7,10 g/100g) [64], e ao referido, na base de dados de composição de alimentos do INSA (7,4 g/100g) [81]. Contudo, o resultado é aproximado ao indicado na base de dados do USDA (6,83 g/100g) [80], e encontra-se acima da gama de valores referenciados pela FAO (5,2 % – 5,8 %) [8].

Comparando os valores obtidos na determinação do teor de gordura, Tabela 4.1, verifica-se que a subvariedade ariete (amostra 24) é significativamente diferente das restantes amostras, sendo estas, amostras 25 e 26, semelhantes entre si ($p > 0,05$). A diferença no teor de matéria gorda para a amostra 24, em relação ao determinado nas restantes amostras, é explicada através das considerações relatadas acima, uma vez que a determinação do teor de matéria gorda é uma análise extremamente sensível à homogeneização e dimensão da partícula da amostra obtida pela moagem. Identicamente ao obtido nas determinações do teor de cinza e proteína, a subvariedade ariete, é a amostra com menor teor de matéria gorda, e a subvariedade 27, a amostra que apresenta maior teor. Os teores de gordura obtidos são superiores aos reportados na página da FAO (0,3 % - 0,4 %) [8], por Nascimento *et. al.* (0,60 g/100g) [64] e aos indicados nas bases de dados de composição de alimentos do USDA e INSA, 0,66 g/100g [80] e 0,5 g/100g [81], respetivamente.

Correlação entre as determinações de macronutrientes nas amostras de grão de arroz

Na Tabela 4.2, apresentam-se os valores do coeficiente de Spearman para as correlações entre o teor humidade, cinza, proteína e gordura para as três subvariedades de grão de arroz analisadas (ariete, ellebi e opale).

Tabela 4.2 – Coeficiente de Spearman (ρ) para as correlações entre as determinações de macronutrientes nas amostras de grão de arroz estudadas

Determinações	Humidade ^a	Cinza ^a	Proteína ^a	Gordura ^a
Humidade ^a	1,000			
Cinza ^a	-0,486	1,000		
Proteína ^a	-0,257	0,771	1,000	
Gordura ^a	-0,714	0,829*	0,771	1,000

*Correlação fortemente significativa para $p < 0,05$.

^a g/100g de amostra.

Analisando os valores do coeficiente de Spearman, para as correlações entre as determinações realizadas, Tabela 4.2, verifica-se uma correlação fortemente positiva ($\rho = 0,829$) entre o teor de cinza e de gordura.

A determinação da humidade parece variar de uma forma independente, uma vez que não se verifica a existência de associações significativas com as restantes determinações, com a exceção da determinação da gordura, onde se verifica uma correlação moderadamente negativa ($\rho = -0,714$).

A determinação do teor de proteína mostra uma correlação moderadamente positiva com as determinações do teor de cinza e gordura ($\rho = 0,771$).

4.1.1.2. Farelo de arroz

Na Tabela 4.3, apresentam-se os resultados do teor humidade, cinza, proteína e gordura para as três subvariedades de farelo de arroz analisadas (ariete, ellebi e opale).

Tabela 4.3 – Resultados do teor de humidade, cinza, proteína e gordura nas amostras de farelo de arroz

Amostra	Humidade (g/100g de amostra)	Cinza (g/100g de amostra)	Proteína (g/100g de amostra)	Gordura (g/100g de amostra)	
Farelo	27	10,30 ^a ± 0,10	7,17 ^a ± 0,13	13,83 ^a ± 0,19	14,31 ^a ± 0,27
	28	9,40 ^b ± 0,19	7,49 ^a ± 0,19	11,50 ^b ± 0,20	15,69 ^a ± 1,12
	29	10,46 ^a ± 0,04	8,06 ^b ± 0,02	13,51 ^a ± 0,30	15,38 ^a ± 0,21

^{a,b} Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ($p < 0,05$). Os resultados estão expressos em Médias ± Desvio padrão, $n = 2$.

Nas amostras de farelo, Tabela 4.3, as subvariedades de arroz carolino, ariete e opale (amostras 27 e 29 respetivamente) são significativamente semelhantes entre si, apresentando valores superiores ao detetado na variedade de arroz agulha (amostra 28), nas determinações do teor de humidade e de proteína. Esta semelhança poderá ser explicada com o facto de serem ambas pertencentes à mesma variedade. O teor de humidade obtido encontra-se dentro dos valores citados

por Fabian e Ju (8 % - 12 %) [11], e por Sharif *et. al.* (10 % - 15 %) [7] com exceção da subvariedade 28 que fica ligeiramente abaixo da gama de valores referidos. Todos os resultados obtidos, nas diferentes subvariedades, para a humidade, encontram-se muito acima do valor tabelado, para farelo de arroz, bruto, pela base de dados USDA (6,13 g/100g) [80] e são ligeiramente superiores ao reportado por Bhatnagar *et. al.* em amostras de farelo de arroz indiano (9 g/100g) [82]. Estas diferenças poderão dever-se às diferenças no processo de transformação e armazenamento a que a amostra foi sujeita, o que influencia muito o teor de humidade desta. Relativamente, ao conteúdo de proteína, os valores determinados também se encontram dentro da gama de valores referidas por Fabian e Ju [11] e por Sharif *et. al.* [7] (10 - 16 %, 11 - 17%, respetivamente) e por Friedman (10 % - 15 %) [83]. Encontram-se, também, próximos do valor referenciado na base de dados de composição de alimentos do USDA (12,79 g/100g) [80]. Apenas a amostra 28 apresenta valores semelhantes aos reportados pela FAO (9,3 % - 12,3 %) [8], sendo que nas restantes amostras foram encontrados resultados superiores. Porém, estão abaixo dos valores reportados por Rao (15,05 g/100g) [12].

O teor total de minerais, quando expresso por cinza, encontra-se reportado na Tabela 4.3, e é semelhante só para as amostras 27 e 28, tendo sido encontrado um valor mais elevado na amostra 29. Estas variações devem-se às diferenças de tamanho de partícula obtidas pela moagem da amostra. Os valores de cinza obtidos estão dentro dos limites referidos na página da FAO (5,7 % - 8,5 %) [8] e por Fabian e Ju (6,6 % - 9,9 %) [11]. As subvariedade estudadas, com a exceção da opale (amostra 29, que contém um valor próximo), apresentam valores inferiores aos determinados por Sharif *et. al.* (8 % - 17 %) [7] e por Friedman (8,3 g/100g) [83]. O conteúdo de cinza obtido para as três amostras encontra-se abaixo do publicado na base de dados de composição de alimentos do USDA (9,98 g/100g) [80].

Em relação à determinação do teor de gordura total, Tabela 4.3, verifica-se que não existem diferenças significativas entre as três subvariedades estudadas ($p > 0,05$). A amostra de arroz agulha é a que contém mais gordura na sua composição. Estes resultados encontram-se dentro dos valores estabelecidos pela FAO (12,9 % - 16,9 %) [8], por Fabian e Ju (15 % - 22 %, com a exceção da amostra 24 que se encontra ligeiramente abaixo) [11] e por Sharif *et. al.* (12 % - 22 %) [7], mas são inferiores aos reportados por Rao (21,3 g/100g) [12], ao descrito na base de dados do USDA (20,85 g/100g) [80] e aos reportados por Bhatnagar *et. al.* (19,9 g/100g) [82].

Bhatnagar *et. al.* realizaram vários estudos sobre o efeito que o peneiramento (300 μm) e o tamanho da partícula das amostras induzem na determinação do teor de gordura. Relativamente ao efeito do peneiramento, obtiveram uma diferença de 3,4 % no teor de gordura obtido entre a amostra antes do peneiramento (19,9 g/100g) e a amostra após o peneiramento (20,6 g/100g). No estudo realizado ao efeito do tamanho da partícula, não foram encontradas diferenças significativas com tamanhos de partícula entre 600 - 710 μm (19,6 g/100g) e inferiores ou iguais a 300 μm (17,7 g/100g), tendo obtido valores muito inferiores para tamanhos superiores ou iguais a 710 μm (6,1 g/100g) e valores na ordem dos 14,2 g/100g para um tamanho de partícula compreendido entre 300 - 600 μm [82]. Este estudo veio, então, confirmar os pressupostos que as variações encontradas entre as diferentes variedades neste estudo e as diferenças com outros estudos se devem, não só à

variedade, mas também à homogeneidade e tamanho de partícula da amostra. Estas conclusões poderão explicar as variações observadas nos nossos resultados.

Correlação entre as determinações de macronutrientes nas amostras de farelo de arroz

Na Tabela 4.4, apresentam-se os valores do coeficiente de Spearman para as correlações entre o teor humidade, cinza, proteína e gordura para as três subvariedades de farelo de arroz analisadas (ariete, ellebi e opale).

Tabela 4.4 – Coeficiente de Spearman (ρ) para as correlações entre as determinações de macronutrientes nas amostras de farelo de arroz estudadas

Determinações	Humidade ^a	Cinza ^a	Proteína ^a	Gordura ^a
Humidade ^a	1,000			
Cinza ^a	0,486	1,000		
Proteína ^a	0,543	-0,200	1,000	
Gordura ^a	-0,086	0,771	-0,314	1,000

^a g/100g de amostra.

Analisando os valores do coeficiente de Spearman, para as correlações entre as determinações realizadas, Tabela 4.4, verifica-se que não existe nenhuma correlação fortemente positiva entre as determinações de macronutrientes efetuadas. Contrariamente às amostras de grão de arroz, as determinações de macronutrientes nas amostras de farelo parece que variam de forma independente, não dependendo linearmente uma das outras, com a exceção do teor de cinza e gordura, onde se verifica uma correlação moderadamente positiva ($\rho=0,771$) entre ambas as determinações.

4.1.1.3. Casca de arroz

Na Tabela 4.5, apresentam-se os resultados do teor humidade, cinza, proteína e gordura para as três subvariedades de casca de arroz analisadas (ariete, ellebi e opale).

Tabela 4.5 – Resultados do teor de humidade, cinza, proteína e gordura nas amostras de casca de arroz

Amostra		Humidade (g/100 g de amostra)	Cinza (g/100 g de amostra)	Proteína (g/100 g de amostra)	Gordura (g/100 g de amostra)
Casca	30	9,57 ^a ± 0,06	16,62 ^a ± 0,19	2,19 ^a ± 0,03	0,38 ^a ± 0,07
	31	8,88 ^b ± 0,10	12,08 ^b ± 0,08	2,33 ^b ± 0,00	0,41 ^a ± 0,07
	32	9,28 ^c ± 0,01	15,24 ^c ± 0,04	2,30 ^b ± 0,01	0,32 ^a ± 0,06

^{a,b,c} Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ($p<0,05$). Os resultados estão expressos em Médias ± Desvio padrão, $n=2$.

Identicamente ao concluído para as amostras de grão de arroz, não existem semelhanças entre as diferentes amostras de casca nos resultados obtidos nas determinações de humidade e

cinza, Tabela 4.5. No presente caso, a amostra da subvariedade de arroz carolino, ariete, é a que mostra simultaneamente maior teor de humidade e de conteúdo mineral, e a de arroz agulha a que mostra menor conteúdo de ambas as determinações. No conteúdo de cinza, nota-se uma grande discrepância entre as amostras de variedades diferentes. Uma vez que essa diferença não se verifica nas outras análises, admite-se que essa disparidade é devida às limitações anteriormente descritas. O teor de humidade, nas três amostras, é superior ao citado por Friedman, (6,18 %) [83]. Contrariamente, o teor de matéria inorgânica é muito inferior (18,71 %). No entanto, comparativamente à gama de valores reportados pela FAO (11,4 % - 18,1 %) [8], o conteúdo de cinza obtido nas amostras analisadas encontra-se dentro do reportado.

No que respeita aos teores de proteína reportados nas amostras, Tabela 4.5, verifica-se que as subvariedades, ellebi e opale (amostras 31 e 32 respetivamente) são significativamente semelhantes entre si, mas apresentam diferenças com a subvariedade ariete (amostra 30). Neste caso, observa-se que a amostra agulha contém maior teor de proteína seguida das subvariedades de arroz carolino, opale e ariete por ordem decrescente. Estes valores encontram-se de acordo com os citados nas duas referências referidas acima [8, 83], (1,6 % - 2,3 % e 2,33 %, respetivamente).

Analogamente às amostras de farelo, o teor de gordura não apresenta diferenças significativas entre as amostras de casca de arroz analisadas. Observa-se que, a nível de teor de gordura, a amostra 31 é a que contém menor quantidade, e a amostra 32 a que contém maior. A gama de valores obtida (0,32 % - 0,42 %) é superior ao valor citado por Friedman, (0,29 %) [83]. Contudo, encontram-se dentro dos valores referidos pela FAO (0,3% - 0,7%) [8] e é muito inferior ao reportado por Bhatnagar *et. al.* para amostras de casca de arroz indiano (0,76 g/100g) [82].

Correlação entre as determinações de macronutrientes nas amostras de casca de arroz

Na Tabela 4.6, apresentam-se os valores do coeficiente de Spearman para as correlações entre o teor humidade, cinza, proteína e gordura para as três subvariedades de casca de arroz analisadas (ariete, ellebi e opale).

Tabela 4.6 – Coeficiente de Spearman (ρ) para as correlações entre as determinações de macronutrientes nas amostras de casca de arroz estudadas.

Determinações	Humidade ^a	Cinza ^a	Proteína ^a	Gordura ^a
Humidade ^a	1,000			
Cinza ^a	0,886*	1,000		
Proteína ^a	-0,829*	-0,829**	1,000	
Gordura ^a	-0,143	-0,143	0,314	1,000

*Correlação fortemente significativa para $p < 0,05$.

** Correlação fortemente significativa para $p < 0,01$.

^a g/100g de amostra.

Analisando os valores do coeficiente de Spearman, para as correlações entre as determinações realizadas, Tabela 4.6, a determinação de gordura não parece indicar qualquer relação linear com as restantes determinações efetuadas. Todavia, o teor de humidade, encontra-se

fortemente relacionado com o teor de cinza ($\rho=0,886$, $p<0,05$), e apresenta uma correlação fortemente negativa com o teor de proteína ($\rho=-0,829$, $p<0,05$). Verifica-se, ainda, que o teor de cinza apresenta uma correlação fortemente negativa com o teor de proteína ($\rho=-0,829$, $p<0,01$).

4.1.1.4. Análise global dos resultados das determinações de macronutrientes

Com a finalidade de se fazer uma análise global entre as diferentes frações do bago, independentemente da subvariedade, procedeu-se ao cálculo da média das três subvariedades, como se encontra representado na Tabela 4.7.

Devido à grande discrepância entre a amostra 24 e as restantes amostras de grão de arroz, no resultado do conteúdo de gordura, esta não foi considerada no cálculo da média, o mesmo acontece para a amostra 31 na determinação da cinza.

Tabela 4.7 – Média dos resultados de macronutrientes obtidos independentemente da variedade

Amostra	Humidade (g/100 g de amostra)	Cinza (g/100 g de amostra)	Proteína (g/100 g de amostra)	Gordura (g/100 g de amostra)
Grão	13,21 ± 0,40	0,41 ± 0,07	6,70 ± 0,26	0,90 ± 0,13*
Farelo	10,05 ± 0,52	7,57 ± 0,42	12,95 ± 1,14	15,13 ± 0,84
Casca	9,25 ± 0,32	15,93 ± 0,80*	2,27 ± 0,07	0,37 ± 0,07

*Só foram consideradas duas das subvariedades analisadas.
Os resultados estão expressos em Médias ± Desvio padrão, n=2.

Analisando, simultaneamente, as três tabelas correspondentes à determinação de macronutrientes nas várias frações do bago (Tabela 4.1, Tabela 4.3 e Tabela 4.5), pode constatar-se que, na determinação do teor de humidade, a variação é significativamente maior entre as amostras de variedades distintas do que nas da mesma variedade, independentemente da fração do bago de arroz.

Pode também concluir-se, pela Tabela 4.7, que, independentemente da subvariedade, o grão é a fração que contém maior teor de humidade (aproximadamente 13 %), seguindo-se das restantes frações (aproximadamente 10 % e 9 % no farelo e casca respetivamente).

Relativamente ao teor de cinza, a subvariedade que apresenta, sempre, maior conteúdo é a opale, e a que apresenta menor a ariete, nas frações de grão e farelo de arroz (Tabela 4.1 e Tabela 4.3 respetivamente). Quanto à casca, (Tabela 4.5) não se conseguem tirar conclusões a esse nível, uma vez que a amostra 31 (subvariedade ellebi) apresenta uma grande diferença das restantes subvariedades, o que não se verifica nas restantes frações. Sendo assim, e dado que não ocorreram diferenças entre as réplicas, os resultados obtidos foram aceites, através da equação descrita no Anexo B – Determinação de Cinza em géneros alimentícios, confirmando-se, deste modo, o suposto em 4.1.1.3. Casca de arroz, que tal disparidade se deve às diferenças de homogeneidade/moagem da amostra.

Contrariamente ao teor de humidade, a casca (aproximadamente 16 %) é a fração que apresenta maior teor de conteúdo mineral, seguido do farelo e do grão (aproximadamente 8 % e 0,4

% no farelo e grão respetivamente), como se pode verificar pela Tabela 4.7, o que justifica o interesse deste subproduto (casca) em várias indústrias.

No que respeita aos teores de proteína, não se encontra nenhuma relação para cada subvariedade e as várias frações respetivas Tabela 4.1, Tabela 4.3 e Tabela 4.5.

Pela Tabela 4.7, a nível proteico, observa-se uma grande diferença entre as três frações, sendo o farelo a parte do bago mais rica em proteína (aproximadamente 13 %), seguido do grão de arroz (aproximadamente 7 %) e, por fim, da casca, com um conteúdo proteico muito baixo (aproximadamente 2 %).

Identicamente à proteína, pela análise dos valores de gordura obtidos, nas Tabela 4.1, Tabela 4.3 e Tabela 4.5, não existe nenhuma relação visível entre as subvariedades e as frações do bago.

Observando-se os teores de gordura obtidos nas diversas frações, Tabela 4.7, verifica-se uma grande diferença entre o farelo e as restantes partes do bago, sendo que o farelo contém cerca de 15 % mais teor de gordura que as restantes.

Correlação entre as determinações de macronutrientes nas diferentes frações de arroz

Na Tabela 4.8, apresentam-se os valores do coeficiente de Spearman para as correlações entre o teor humidade, cinza, proteína e gordura para as três frações de arroz analisadas (Grão, Farelo e Casca de arroz - Tabela 4.7).

Tabela 4.8 – Coeficiente de Spearman (ρ) para as correlações entre as determinações de macronutrientes nas diferentes frações

Determinações	Humidade ^a	Cinza ^a	Proteína ^a	Gordura ^a
Humidade ^a	1,000			
Cinza ^a	-0,789**	1,000		
Proteína ^a	0,309	-0,459	1,000	
Gordura ^a	0,267	-0,393	0,920**	1,000

**Correlação fortemente significativa para $p < 0,01$.
^a g/100g de amostra.

Considerando apenas as frações do bago, independentemente da subvariedade, Tabela 4.8, não se verificam relações nas várias determinações efetuadas entre as diferentes frações do bago de arroz, com a exceção da humidade e cinza, que se encontram negativamente relacionadas entre si ($\rho = -0,789$, $p < 0,01$) e o teores de gordura e cinza que apresentam uma forte relação entre si ($\rho = 0,920$, $p < 0,01$).

Comparando as várias correlações feitas, Tabela 4.2, Tabela 4.4, Tabela 4.6 e Tabela 4.8, não se verifica uma igualdade a nível das relações entre determinações de macronutrientes. Podemos assim afirmar, no geral, que as determinações de macronutrientes variam de forma independente, não dependendo linearmente uma das outras.

4.1.2. Análise de compostos bioativos

4.1.2.1. Rendimento de extração de compostos bioativos

A eficiência do método de extração é um importante fator na determinação da atividade antioxidante. Tal como se encontra referido no subcapítulo 2.4. Métodos de extração dos compostos bioativos, vários estudos realizados com o objetivo de comparar a capacidade de vários solventes na extração de compostos bioativos revelam o extrato metanólico como sendo o que obtém melhores resultados nas determinações de atividade antioxidante [31–35], onde vários investigadores preferem uma mistura aquosa de 80 % metanol v/v [38–43].

Independentemente do método de extração e solvente usado, os compostos antioxidantes nas amostras de arroz são difíceis de extrair, uma vez que a solubilidade dos compostos varia muito e muitos estão ligados covalentemente ao material da parede celular. Assim como o grão, o farelo e a casca de arroz tem uma estrutura celular, com paredes espessas, que inibem a extração [84].

As extrações dos compostos bioativos das amostras foram então realizadas com um solvente orgânico líquido convencional, o metanol (MeOH). As condições das extrações encontram-se sumarizadas na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 – Condições de extração das amostras

Solvente (% v/v)	MeOH 80 %
Razão amostra/solvente (g/mL)	1:10
Condições de incubação/extração	
Temperatura (°C)	30
Agitação (rpm)	150
Condições no evaporador rotativo	
Temperatura (°C)	45
Pressão (bar)	200
Tempo de extração/re-extração	24 h + 24 h

Inicialmente, todas as extrações foram realizadas em duplicado (n=2). No entanto, constatou-se que no grão de arroz, o rendimento de extração era extremamente baixo, como tal, a extração, desta fração, passou a ser realizada em quintuplicado (n=5).

No decorrer do estágio realizado no DAN-INSA, houve a necessidade de se efetuar várias extrações às amostras devido à degradação do extrato ao longo do tempo. Sendo assim, foram realizadas cinco extrações às amostras de grão de arroz (N=5), duas às amostras de farelo (N=2) e três às amostras da casca (N=3).

Os rendimentos de extração foram, assim, calculados pela média das extrações realizadas. Na Tabela 4.10, encontra-se apresentada a média dos rendimentos das várias extrações metanólicas realizadas a cada fração.

Tabela 4.10 – Médias dos rendimentos de extração das amostras.

Amostras		Rendimento de Extração (%)
Grão	24	0,90 ± 0,08
	25	1,14 ± 0,17
	26	0,91 ± 0,11
Farelo	27	20,79 ± 1,74
	28	20,55 ± 1,83
	29	21,44 ± 1,28
Casca	30	2,31 ± 0,18
	31	2,66 ± 0,26
	32	2,52 ± 0,21

Os resultados estão expressos em Médias ± Desvio padrão.

Como se pode ver pela Tabela 4.10, não existem grandes diferenças no rendimento de extração entre as diferentes variedades de arroz estudado. Contudo, no que respeita aos componentes do bago, os valores são significativamente diferentes. Este facto deve-se aos diferentes valores de composição nutricional dos componentes do bago, especificamente o conteúdo de gordura. O farelo é a fração com maior teor de gordura, sendo o que apresenta maior percentagem de extratáveis com solventes orgânicos, apresentado um rendimento de aproximadamente 20,9 %, seguido da casca, com um rendimento de aproximadamente 2,5 % e do grão de arroz com um rendimento de apenas 1 %, aproximadamente. Uma das explicações para este baixo rendimento de extração no grão de arroz poderá ser a diferença de solubilidade dos compostos ativos [84].

Os rendimentos de extração obtidos nas amostras correspondentes ao grão de arroz variam entre 0,90 % a 1,14 %, gama de valores inferior ao reportado por Choi *et. al.* em amostras de arroz branco cultivado na Coreia extraídas em metanol (2,3 %) [35]. A diferença no rendimento de extração poderá dever-se, essencialmente, ao tipo de método utilizado, que é diferente do realizado neste estudo, mas também se poderá dever ao facto de serem amostras de zonas diferentes do Mundo, o que influencia as suas propriedades e consequentemente a quantidade de extratáveis com solventes orgânicos.

Arab *et. al.* [31], extraíram os compostos bioativos de duas variedades de farelo de arroz Iraniano, Fajr e Tarem, em condições de extração ligeiramente diferentes das usadas neste estudo (tempo de incubação/extração 3 h) e usando três solventes diferentes, metanol, etanol e acetato de etilo, obtiveram rendimentos de extração superiores utilizando metanol como solvente. Na variedade Fajr, obtiveram um rendimento de 20,16 %, valor próximo ao obtido nas amostras de farelo de arroz português, no entanto na variedade de Tarem, obtiveram apenas um rendimento de 8,8 %, valor muito abaixo do obtido neste estudo, Tabela 4.10. Chen e Chiu [32], realizaram um estudo idêntico a Arab *et. al.* [31]. Compararam a percentagem de extração obtida por três solventes diferentes, metanol, acetato de etilo e n-hexano, em amostras de arroz Japonica de Taiwan, obtendo um rendimento superior na extração realizada com metanol (16 %, tempo de extração: 3 h), mas inferior

ao obtido neste estudo. Os rendimentos de extração obtidos nas subvariedades de farelo, no presente trabalho, são superiores aos reportados por Lai *et. al.*, utilizando metanol como solvente, 16,27 % [33].

Os rendimentos da extração metanólica realizada na casca estão de acordo com os resultados apresentados por Butsat *et. al.* em amostras de casca de arroz agulha tailandês. Obtiveram um rendimento de 2,5 %, em condições de extração semelhantes [40]. Salanti *et. al.* [5], por um método de extração diferente, recorreram a uma extração soxhlet em duas etapas, com água e etanol em amostras de casca de arroz produzida em Itália, conseguiram obter rendimentos de extração superiores, 4,7 %.

Independentemente da origem das amostras, pode constatar-se que, para além do solvente utilizado, o método de extração utilizado também influencia o rendimento e, conseqüentemente, a capacidade antioxidante.

4.1.2.2. Determinação da capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante nas amostras foi analisada através da eliminação de radicais livres de DPPH. A absorvância de cada solução foi medida a 517 nm. Os resultados são reportados como IC₅₀, quantidade necessária de extrato para inibir o DPPH' a 50 %. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

Durante a realização deste método verificaram-se algumas limitações, tais como, dificuldade da dissolução dos extratos em metanol e a determinação da concentração nos extratos de grão de arroz necessária para se inibir 50 % dos radicais de DPPH.

Os extratos de grão e farelo de arroz apresentavam características extremamente gordurosas, ficando agarrados às paredes do balão, impossibilitando a sua dissolução total. Conseqüentemente, ocorriam diferenças inaceitáveis entre as réplicas realizadas. Desde modo, houve a necessidade de se repetir o ensaio até essas diferenças deixarem de se verificar. Considerou-se um coeficiente de variação (CV) entre as réplicas inferior ou igual a 5 %, como aceitável.

Relativamente à identificação da concentração do extrato metanólico nas amostras de grão de arroz, verificou-se que a capacidade antioxidante destas amostras, usando a mesma concentração que a usada nas restantes amostras, era extremamente baixa, não se conseguindo obter percentagens de inibição superiores a 20 %. Uma vez que o rendimento de extração desta fração é extremamente baixo, só ao fim de se repetir o processo de extração mais quatro vezes é que se conseguiu ter extrato suficiente para se conseguir fazer a determinação correta da capacidade antioxidante. De modo a se conseguir encontrar a concentração ideal, sem gastar extrato das amostras de grão de arroz, realizaram-se curvas de inibição com extrato metanólico de amaranto, pseudocereal que apresentava resultados similares às amostras de grão de arroz. Desta forma, encontrou-se uma concentração aproximada à ideal. Identicamente às outras frações, assim que se conseguiu a quantidade de extrato necessário para se preparar as soluções de extrato metanólico do grão de arroz, houve apenas a necessidade de se otimizar o método.

Foram construídas curvas de inibição dos radicais de DPPH acompanhando o decréscimo de absorvância ao longo do tempo, Figura 4.1. Recorrendo à Equação 4.1, transformaram-se esses dados em termos de percentagem de inibição, Figura 4.2.

A percentagem de inibição dos radicais de DPPH pela ação dos componentes da amostra relaciona-se com a absorvância lida ao longo do tempo de reação ($Abs_{amostra}^{517}$) face à absorvância da solução de DPPH' a 80 % v/v ($Abs_{controle}^{517}$), de acordo com a equação seguinte:

$$\% \text{ Inibição} = 100 \times \frac{Abs_{controle}^{517} - Abs_{amostra}^{517}}{Abs_{controle}^{517}} \quad \text{Equação 4.1}$$

Uma vez que não se verificaram grandes diferenças entre as subvariedades da mesma fração do bago de arroz, foi apenas realizada uma curva para cada fração, independentemente da subvariedade.

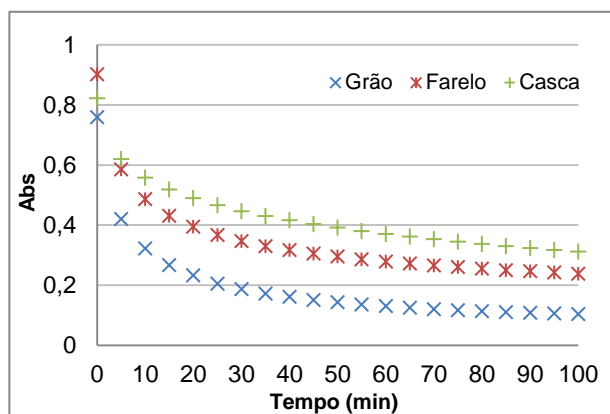


Figura 4.1 – Curva cinética da reação de DPPH' com os extratos metanólicos das três frações do bago de arroz

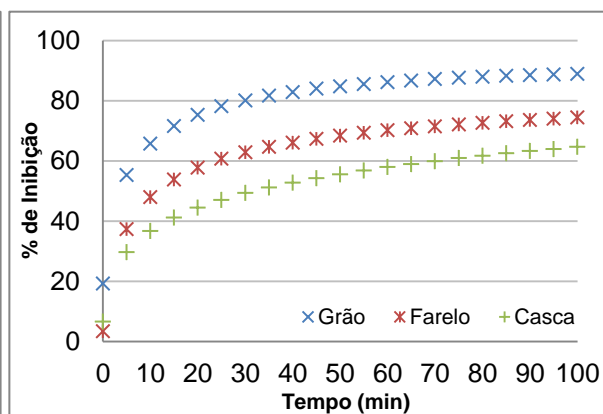


Figura 4.2 – Curva de inibição dos radicais de DPPH pelos extratos metanólicos em função do tempo nas três frações do bago de arroz

Através das curvas acima representadas, Figura 4.1 e Figura 4.2, verifica-se que, para uma concentração de extrato metanólico de 2 mg/mL nas amostras de farelo (concentração do extrato na mistura reacional: 0,4 mg/mL) e casca (concentração do extrato na mistura reacional: 0,2 mg/mL), se atingiram inibições de aproximadamente 75 % e 65 % respetivamente, ao fim de 100 minutos. Nas amostras de grão de arroz, atingiu-se uma inibição de aproximadamente 89 %, para uma concentração de extrato metanólico de 4,5 mg/mL (concentração do extrato na mistura reacional: 0,9 mg/mL), ao fim dos 100 minutos. Como tal, a atividade antioxidante foi analisada em soluções de extrato com diferentes concentrações, ao fim do mesmo tempo de reação.

De modo idêntico às análises aos macronutrientes, recorreu-se à *One-way* ANOVA e ao teste LSD, para se verificar se existiam, ou não, diferenças significativas entre as diferentes subvariedades. As análises de variância e as respetivas verificações dos pressupostos e conclusões, assim como os testes LSD encontram-se em anexo, Anexo G – Análise de variância ao teste do DPPH'. Apesar de, neste caso, a dimensão da amostra ser maior (n=3), continua a ser muito pequena, podendo a

validação dos pressupostos subjacentes à ANOVA ser igualmente dificultada. Esta limitação pode conduzir a resultados pouco fiáveis, colocando em causa as conclusões retiradas da análise de variância.

Na tabela seguinte, Tabela 4.11, encontram-se os resultados relativos à determinação da capacidade antioxidante pelo método do DPPH^{*}. A concentração do extrato necessária para inibir 50 % do radical DPPH (IC₅₀) é expressa em mg de extrato por mL de mistura reacional (mg/mL) e foi obtida por interpolação a partir de análise de regressão linear % de inibição do radical DPPH vs concentração de extrato. A um menor valor de IC₅₀ está associado uma maior capacidade antioxidante.

Tabela 4.11 – Capacidade antioxidante nos extratos metanólicos das amostras de arroz determinada pelo método do DPPH^{*}

Amostra		IC ₅₀ (mg/mL)	Amostra		IC ₅₀ (mg/mL)	Amostra		IC ₅₀ (mg/mL)
Grão	24	0,46 ^a ± 0,01	Farelo	27	0,23 ^a ± 0,01	Casca	30	0,14 ^a ± 0,00
	25	0,47 ^a ± 0,01		28	0,24 ^a ± 0,00		31	0,12 ^b ± 0,00
	26	0,34 ^b ± 0,01		29	0,22 ^a ± 0,01		32	0,13 ^c ± 0,00

^{a,b,c} Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste LSD (p<0,05). Os resultados estão expressos em Médias ± Desvio padrão, n = 3.

Pela análise dos resultados apresentados na Tabela 4.11 pode constatar-se que, relativamente às amostras de grão de arroz, não existem diferenças significativas entre os extratos das variedades 24 e 25, sendo estas significativamente diferentes da amostra 26, segundo o teste LSD (p<0,05). A subvariedade opale é a que apresenta um IC₅₀ menor, logo possui uma maior capacidade antioxidante, comparativamente com as outras subvariedade de grão de arroz. Esta diferença entre os extratos pode dever-se, não só, ao facto de ser uma subvariedade diferente, como também à extração, podendo ter-se conseguido extrair uma maior quantidade de compostos bioativos, neste caso.

Nos extratos de farelo não se encontram diferenças significativas entre as subvariedades (p>0,05), Tabela 4.11. Estes valores são superiores aos reportados por Chotimarkorn *et. al.* [34], que obtiveram valores de IC₅₀ entre 0,38 mg/mL a 0,74 mg/mL, em extratos de amostras de farelo de arroz tailandês de cinco variedades diferentes. Tal diferença poderá dever-se, não só, ao caso de se tratar de amostras de outras variedades, oriundas de outra zona com outras condições climáticas e tipos de solo diferentes, como também ao tipo de transformação a que foram sujeitas (tipo de descasque e branqueamento), preparação da amostra pré-extração e ao método de extração usado. O autor refere que na preparação de amostra, estas foram aquecidas durante 15 minutos a 100 °C com o intuito de inativar a lipase endógena. Este fator também poderá ser uma explicação para os resultados obtidos serem muito inferiores aos reportados neste estudo, uma vez que os antioxidantes se degradam com a temperatura.

Contrariamente ao farelo, nos extratos das amostras de casca, Tabela 4.11, pelo teste LSD, foram encontradas diferenças significativas entre todas as subvariedades, sendo a diferença menor entre os extratos da mesma variedade (extratos de arroz carolino, 30 e 32). Obtiveram-se resultados de IC₅₀ compreendidos entre 0,12 mg/ml (extrato 31) a 0,14 mg/mL (extrato 30). Os resultados da determinação da capacidade antioxidante realizadas na casca são ligeiramente superiores aos valores apresentados por Salanti *et. al.*, que obtiveram um IC₅₀ de 0,11 mg/mL em amostra de casca extraídas com etanol [5].

Verifica-se, pela Tabela 4.11, que o extrato da casca de arroz é o que possui maior capacidade antioxidante, seguido do farelo e, por fim, do grão de arroz. Esta ordem faz sentido, uma vez que a casca e o farelo são as camadas protetoras do bago, pois contêm um sistema de defesa antioxidante que protege a semente do *stress* oxidativo [43, 85].

A determinação da capacidade antioxidante pelo método do DPPH' não é universal. Dependendo do procedimento usado, os resultados podem ser reportados de inúmeras formas. Butsat e Siriamornpun [43], realizaram um estudo a quatro extratos de diferentes frações de arroz (arroz integral, grão, farelo e casca de arroz) de três zonas distintas, com o objetivo de investigar a significância do arroz como fonte de antioxidantes. Os resultados foram apresentados em termos de % de inibição do radical DPPH. A ordem dos resultados obtidos por estes dois investigadores para a capacidade de eliminar o radical de DDPH por frações de arroz é diferente da reportada neste estudo, sendo o farelo a fração que apresentou maior capacidade antioxidante (85,9 % - 86,7 %), seguido da casca (42 % - 89,5 %), do arroz integral (37,5 % - 68 %) e do grão (25,2 % - 39 %). Esta variação pode ser explicada pelas diferenças no processo de transformação a que a amostra foi sujeita, nomeadamente percentagem de descasque e branqueamento.

4.1.2.3. Determinação do teor total de compostos fenólicos

O conteúdo de fenólicos totais presentes nos extratos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu. Este é um método colorimétrico cuja absorvância foi lida a 760 nm. Foi realizada uma curva de calibração com ácido gálico. O valor das amostras foi calculado por interpolação da referida curva. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

A curva de calibração do ácido gálico que correlaciona a absorvância a 760 nm com a concentração das soluções padrão de ácido gálico encontra-se na figura seguinte, Figura 4.3.

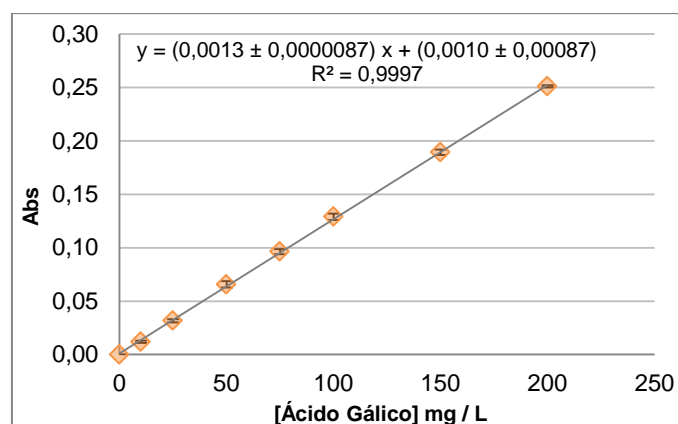


Figura 4.3 – Curva de calibração do ácido gálico

O uso do ácido gálico para determinação do TPC deve-se ao facto de este ser um dos compostos fenólicos com maior capacidade antioxidante. A gama de trabalho utilizada foi de 0 a 200 mg AG/L. Como se pode constatar pela análise da Figura 4.3, obteve-se um coeficiente de correlação superior a 0,9997.

Recorreu-se à *One-way* ANOVA e ao teste LSD, para se encontrar se existiam, ou não, diferenças significativas entre as subvariedade diferentes. As análises de variância, as respetivas verificações dos pressupostos e conclusões, assim como os testes LSD encontram-se em anexo, Anexo H – Análise de variância ao teste do TPC. À semelhança dos outros testes, os resultados obtidos pelas análises de variância no teste do TPC terão de ser postos em causa.

A composição em compostos fenólicos a cada fração do bago de arroz, preparadas de acordo com o método descrito anteriormente, é apresentada na Tabela 4.12. De modo a se conseguir fazer uma comparação com os resultados reportados na literatura, o TPC foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico por g de amostra (mg eq. AG/g amostra). Considerou-se valores aceitáveis entre réplicas com coeficientes de variação inferiores a 5 %.

Tabela 4.12 – Conteúdo de fenólicos totais nas amostras de arroz pelo método de Folin-Ciocalteu

Amostra		TPC*	Amostra		TPC*	Amostra		TPC*
Grão	24	0,08 ^a ± 0,00	Farelo	27	4,09 ^a ± 0,06	Casca	30	1,67 ^a ± 0,02
	25	0,09 ^b ± 0,00		28	4,02 ^a ± 0,18		31	2,40 ^b ± 0,08
	26	0,11 ^c ± 0,00		29	4,51 ^b ± 0,18		32	1,96 ^c ± 0,02

^{a,b,c} Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ($p < 0,05$). Os resultados estão expressos em Médias ± Desvio padrão, $n=3$.

* Resultados expressos em mg eq. AG/g amostra.

Pela Tabela 4.12, verifica-se que os teores em compostos fenólicos variam entre 0,08 e 0,11 mg eq. AG/g grão de arroz para as amostras de grão, sendo que a variedade que apresenta maior teor em compostos fenólicos é a opale, seguida da ellebi e da ariete. Todas as amostras apresentam diferenças significativas entre si pelo teste LSD ($p < 0,05$). Os resultados reportados neste estudo são

superiores aos obtidos por Butsat e Siriamornpun [43], e Qui *et. al.* [41], que obtiveram para as amostras de grão de arroz de três zonas distintas, valores compreendidos entre 0,05 a 0,07 mg eq. AG/g grão de arroz e, para amostras de arroz selvagem, valores na ordem de 0,046 mg eq. AG/g grão de arroz, respetivamente. Expressando o conteúdo de fenólicos totais presentes nos extratos de grão de arroz por grama de extrato, obtém-se a seguinte gama de valores, 8,16 a 12,69 mg eq. AG/g extrato de grão de arroz. Os resultados reportados por Shao *et. al.* [86], para amostras de grão de arroz, encontram-se dentro dos resultados obtidos neste estudo, 9,45 mg eq. AG/g extrato de grão de arroz.

Relativamente às amostras de farelo, verifica-se que não existem semelhanças entre as subvariedades estudadas ($p < 0,05$), sendo a subvariedade opale a amostra que apresenta um teor de compostos fenólicos maior. Este facto pode ser explicado pelo rendimento de extração que é superior ao das restantes subvariedades. De igual modo às amostras de grão, os valores publicados por Butsat e Siriamornpun [43], para as amostras de farelo, também são inferiores aos obtidos neste estudo, 2,5 a 2,7 mg eq. AG/g farelo de arroz. Os valores referidos por Wanyo *et. al.* [85], para amostras de farelo de arroz provenientes da Tailândia, também são inferiores aos obtidos neste estudo para amostras de farelo de arroz português (3,52 mg eq. AG/g farelo de arroz), assim como os resultados obtidos por Iqbal *et. al.* [42] em cinco variedades de arroz cultivado no Paquistão (2,51 a 3,59 mg eq. AG/g farelo de arroz).

Os resultados nas amostras da casca são todos significativamente diferentes entre si, ou seja, não existe nenhuma semelhança a nível do teor de compostos fenólicos entre as subvariedades de casca de arroz estudada. Obtiveram-se valores compreendidos entre 1,96 a 2,40 mg eq. AG/g de casca de arroz. Verifica-se que a amostra de arroz agulha (amostra 31) contém um maior teor de compostos fenólicos. Apesar de serem significativamente diferentes entre si, a diferença entre as subvariedades de arroz carolino é menor do que comparativamente à amostra de arroz agulha. Os valores reportados por Butsat e Siriamornpun nas amostras de casca de arroz de três zonas diferentes variam de 1,2 a 2,2 mg eq. AG/g casca de arroz. Com a exceção da subvariedade ellebi, que o valor obtido é superior ao publicado por Butsat e Siriamornpun, as restantes subvariedades deste estudo encontram-se dentro da gama de valores obtidos pelos dois investigadores [43]. Para além do estudo referido anteriormente, Butsat *et. al.* [40] analisaram amostras de casca da variedade Indica (arroz agulha), tendo obtido um resultado inferior ao obtido neste estudo, 1,3 mg eq. AG/g casca de arroz. Os resultados deste estudo estão próximos do resultado referidos por Wanyo *et. al.* [85], para amostras de casca de arroz provenientes da Tailândia, 1,68 mg eq. AG/g de casca de arroz.

Estas diferenças entre os resultados obtidos neste estudo e os publicados por outros autores, poderão resultar do método de extração utilizado ter sido mais ou menos eficiente, e até mesmo devido a se tratar de amostras de variedades diferentes, de zonas completamente distintas, e que sofreram, à partida, processos de tratamento diferentes.

Embora, maioritariamente, o TPC, seja traduzido em termos de equivalentes de ácido gálico, alguns autores optam por usar outro modo de expressão de resultados, como utilizar o ácido ferúlico como termo de comparação.

4.1.2.4. Análise global dos resultados de DPPH^{*} e TPC

Para se conseguir fazer uma comparação correta entre os resultados do DPPH^{*} e TPC, este último terá que ser expresso em mg eq. AG/g extrato, uma vez que o DPPH^{*} se encontra expresso em mg de extrato por mL de mistura reacional, Tabela 4.13.

Tabela 4.13 – Conteúdo de fenólicos totais nos extratos de arroz pelo método de Folin-Ciocalteu

Amostra		TPC*	Amostra		TPC*	Amostra		TPC*
Grão	24	9,31 ^a ± 0,23	Farelo	27	20,89 ^a ± 0,29	Casca	30	77,83 ^a ± 0,83
	25	8,16 ^b ± 0,16		28	20,02 ^a ± 0,86		31	82,75 ^b ± 2,73
	26	12,89 ^c ± 0,56		29	21,98 ^a ± 0,88		32	82,62 ^b ± 0,80

^{a,b,c} Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ($p < 0,05$). Os resultados estão expressos em Médias ± Desvio padrão, $n=3$.

* Resultados expressos em mg eq. AG/g extrato.

Fazendo uma pequena análise aos resultados do TPC expressos por extrato (Tabela 4.13), verifica-se que a maior diferença encontrada em comparação com o TPC expresso por amostra (Tabela 4.12) reside nas frações de farelo e casca de arroz. O teor de fenólicos totais expresso por extrato de farelo não apresenta diferenças significativas entre subvariedades ($p > 0,05$), no entanto, igualmente ao analisado na Tabela 4.12, o extrato da amostra 29 é o que contém maior teor de fenólicos totais, o que pode ser explicado pela eficiência da extração, tendo a extração de compostos antioxidantes sido mais eficaz nesta amostra, o que se pode verificar pelo rendimento de extração, uma vez que é superior. Relativamente à casca, apenas o extrato 30 é significativamente diferente dos restantes ($p < 0,05$), apresentando um teor de compostos fenólicos inferior.

A nível de conteúdo de fenólicos totais por fração, verifica-se, pela Tabela 4.13, que o extrato metanólico da casca é o que contém um maior teor de fenólicos, seguido do farelo e do grão. Esta ordem difere da discutida no subcapítulo anterior (4.1.2.3. Determinação do teor total de compostos fenólicos). Esta diferença reside, mais uma vez, no rendimento de extração que foi muito superior no farelo. Assim, devido ao rendimento de extração ser muito diferente, quando os resultados são expressos em mg eq. AG/g amostra, os valores obtidos nos extratos de farelo e casca vão alterar-se muito.

Com a finalidade de se fazer uma análise global entre as diferentes frações do bago, independentemente da subvariedade, representou-se graficamente a inibição de radicais DPPH em termos de IC₅₀ em função do conteúdo fenólico das médias das três subvariedades, Figura 4.4.

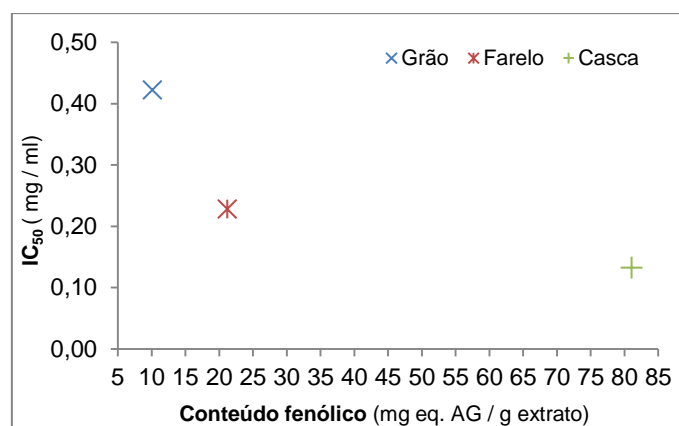


Figura 4.4 – Relação entre TPC e atividade antioxidante

Pela análise da Figura 4.4, verifica-se uma relação entre o teor total de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante, sendo possível identificar os extratos metanólicos da casca e do grão de arroz como os extratos com maior e menor capacidade antioxidante e conteúdo de fenólicos totais, respetivamente. Os resultados estão de acordo com o princípio de que um maior conteúdo fenólico está associado um maior poder antioxidante.

Para uma identificação mais correta, se existe ou não, uma relação entre a capacidade antioxidante e o conteúdo de fenólicos totais nos extratos metanólicos das diferentes frações (grão, farelo e casca), foram efetuadas correlações lineares utilizando o coeficiente de correlação linear de Spearman (ρ), Tabela 4.14. A correlação foi feita individualmente a cada fração para uma análise mais objetiva. É de notar que, uma vez que a capacidade antioxidante é tanto maior quanto menor for o valor de IC₅₀, caso haja alguma relação, espera-se uma correlação negativa entre o IC₅₀ e o conteúdo de fenólicos totais.

Tabela 4.14 – Coeficiente de Spearman (ρ) para as correlações entre as determinações de DPPH' e TPC nas diferentes frações

	DPPH' grão ^a	DPPH' farelo ^a	DPPH' casca ^a
TPC grão ^b	-0,957**		
TPC farelo ^b		-0,815**	
TPC casca ^b			-0,656

**Correlação fortemente significativa para $p < 0,01$.

^a IC₅₀ (mg/mL); ^b mg eq. AG/g de extrato.

Pela análise do coeficiente de Spearman, verifica-se uma correlação fortemente negativa entre os métodos de TPC e DPPH' nos extratos de grão e farelo ($\rho = -0,957$ e $-0,815$, $p < 0,01$ respetivamente), no entanto, na casca não se verifica essa correlação o que é explicado pelo facto de o extrato da subvariedade 31 conter mais teor de fenólicos totais mas não ser a subvariedade que apresenta maior capacidade antioxidante.

Correlações similares ao extrato do grão e farelo foram encontradas na literatura. Adom e Liu [87] realizaram um estudo semelhante em amostras de arroz integral, milho, trigo e aveia, tendo

obtido uma forte relação entre a atividade antioxidante (com um método diferente) e os fenólicos para $p < 0,01$, usando o coeficiente de Pearson.

4.1.2.5. Identificação e quantificação de compostos bioativos por UPLC-PDA

A caracterização de compostos antioxidantes foi realizada por UPLC-PDA. Foram utilizados 34 padrões de antioxidantes que poderão estar presentes no grão, farelo e casca de arroz. De entre os compostos antioxidantes, os compostos fenólicos representam o maior grupo em frutos, vegetais e cereais, sendo que os compostos fenólicos presentes em maior quantidade nos grãos são reportados como sendo o ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido vanílico e os ácidos cafeico e siríngico, [38].

Otimização das condições cromatográficas

Numa primeira fase, 25 dos 34 padrões adquiridos foram dissolvidos em metanol e foi traçado o espectro UV-Vis, a fim de se determinar o comprimento de onda (λ) máximo de absorvância de cada composto. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.15.

Tabela 4.15 – Comprimento de onda máximo de absorvância dos padrões determinado por UV-Vis

Padrão	cdo por UV-Vis	cdo selecionado
Ácido palmítico	218,4	230
Ácido oleico	225,0	
β-sitosterol	230,2	
Ácido p-hidroxibenzoico	230,4	
β-tocoferol	271,6	270
δ-tocoferol	271,8	
γ-tocoferol	273,8	
α-tocoferol	275,8	
Ácido cinâmico	276,8	280
Xilose	279,4	
Ácido protocatecuico	280,6	
Ácido levulínico	281,8	
Ácido clorogénico	282,0	
Ácido p-cumárico	282,0	
Quercetina	282,0	
Ácido elágico	288,6	
Ácido siríngico	299,6	300
Ácido vanílico	299,8	
Ácido gálico	300,8	
Ácido sinápico	305,6	
Ácido ferúlico	306,0	
Ácido salicílico	318,6	320
γ-orizanol	321,4	
Ácido isoferúlico	322,0	
Ácido cafeico	327,0	

Após se ter selecionado o comprimento de onda para se identificar os antioxidantes, foi então desenvolvido o método de identificação de compostos bioativos por UPLC-PDA.

Num primeiro teste, foi criado um gradiente cujas condições se encontram representadas na tabela seguinte, Tabela 4.16.

Tabela 4.16 – Condições UPLC-PDA utilizadas no primeiro teste

Temperatura da Coluna	30 °C	
Temperatura sample manager	4 °C	
Fluxo	0,3 mL/min	
Volume de injeção	10 µL	
Gradiente		
Tempo (min)	% A	% B
0	99	1
30	1	99
35	1	99
40	99	1
43	99	1
Solvente A	Água 0,1 % ácido fórmico	
Solvente B	Acetonitrilo	

Segundo Tian *et. al.*, um sistema de gradiente composto por água e acetonitrilo numa coluna C18 melhora a performance cromatográfica na identificação de compostos fenólicos, através do melhoramento da sensibilidade analítica e da resolução em comparação com outros solventes [27]. Como tal, a mistura de solvente escolhida teve como base o critério anterior. Utilizando as condições e o gradiente acima descritos, obtiveram-se cromatogramas, cujo exemplo se encontra representado na Figura 4.5. O tempo de retenção obtido para cada composto encontra-se descrito na Tabela 4.17.

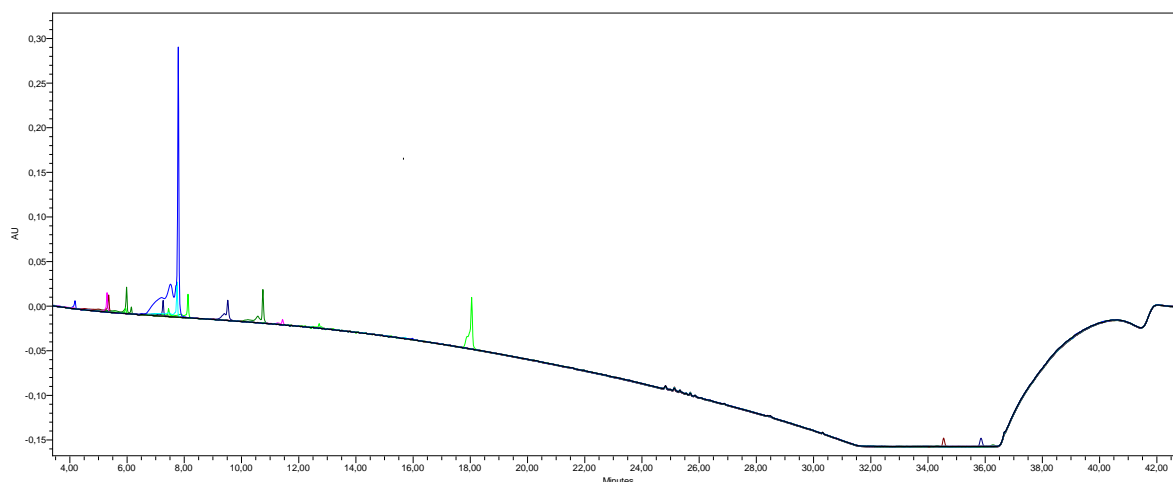


Figura 4.5 – Cromatograma dos padrões a 280 nm, no primeiro teste

Pelo cromatograma representado na Figura 4.5, consegue visualizar-se que existem picos sobrepostos e também que alguns picos apresentam um *fronting* muito grande, o que poderá ser devido ao facto do tempo de corrida ser bastante longo, bem como à polaridade do solvente.

Tabela 4.17 – Tempos de retenção dos diferentes padrões de antioxidantes no primeiro teste

Padrão	cdo (nm)	Tempo de retenção (min)
Ácido palmítico	230	-
Ácido oleico	230	-
β-sitosterol	230	-
Ácido p-hidroxibenzoico	230	5,356
β-tocoferol	270	-
δ-tocoferol	270	34,547
γ-tocoferol	270	35,855
α-tocoferol	270	34,038
Ácido cinâmico	280	11,436
Xilose	280	15,732
Ácido protocatecuico	280	4,18
Ácido levulínico	280	-
Ácido clorogénico	280	5,299
Ácido p-cumárico	280	7,259
Quercetina	280	10,749
Ácido elágico	280	7,45
Ácido siríngico	300	6,149
Ácido vanílico	300	5,949
Ácido gálico	300	-
Ácido sinápico	300	7,746
Ácido ferúlico	300	7,79
Ácido salicílico	320	9,519
γ-orizanol	320	-
Ácido isoferúlico	320	18,047
Ácido cafeico	320	5,983

No entanto, a análise dos tempos de retenção, pela Tabela 4.17, permite uma decisão mais rigorosa sobre a otimização das condições. Através dos tempos de retenção, pode confirmar-se que existem alguns picos sobrepostos e também que alguns dos compostos não foram detetados, pelo que se teve de otimizar o método no sentido de melhorar estas questões. Foi então desenvolvido um novo gradiente, que se encontra descrito na Tabela 4.18.

Tabela 4.18 – Condições UPLC-PDA utilizadas no segundo teste

Temperatura da Coluna	45 °C	
Temperatura sample manager	4 °C	
Fluxo	0,3 mL/min	
Volume de injeção	10 µL	
Gradiente		
Tempo (min)	% A	% B
0	99	1
15	0	100
17,5	0	100
20	99	1
22	99	1
Solvente A	Água 0,1 % ácido fórmico	
Solvente B	Acetonitrilo	

Com as novas condições, o tempo de corrida foi reduzido para 22 minutos. O cromatograma resultante das novas condições encontra-se representado na figura seguinte, Figura 4.6.

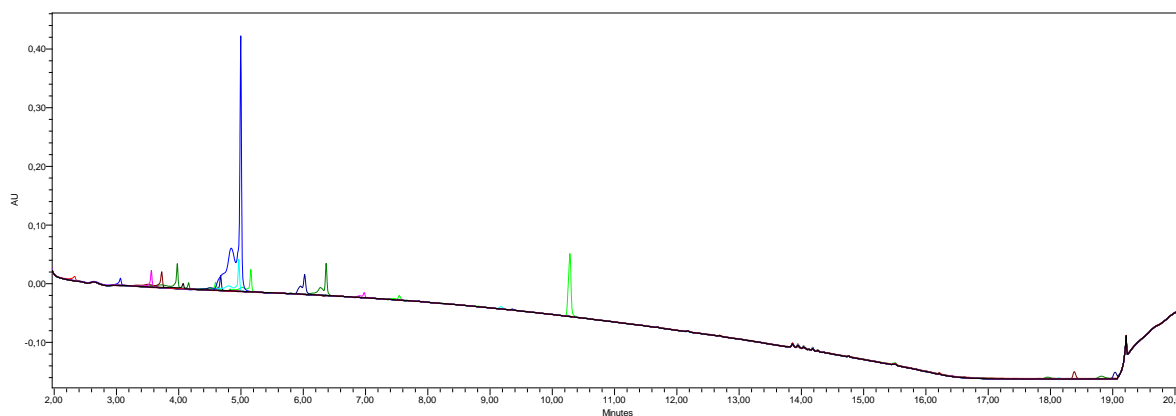


Figura 4.6 – Cromatograma dos padrões a 280 nm, no segundo teste

Com o novo gradiente, nota-se uma ligeira melhoria no *fronting* de alguns picos, no entanto ainda se pode visualizar que existem alguns picos sobrepostos. O comprimento de onda a que os padrões foram observados também se modificou com as alterações feitas às condições.

Tabela 4.19 – Tempos de retenção dos diferentes padrões de antioxidantes, no segundo teste

Padrão	cdo (nm)	Tempo de retenção (min)
Ácido palmítico	310	7,541
Ácido oleico	230	-
β-sitosterol	230	-
Ácido p-hidroxibenzoico	310	3,727
β-tocoferol	230	17,681
δ-tocoferol	230	18,386
γ-tocoferol	230	19,041
α-tocoferol	310	18,135
Ácido cinâmico	230	6,977
Xilose	280	9,183
Ácido protocatecuico	230	3,064
Ácido levulínico	280	-
Ácido clorogénico	310	3,56
Ácido p-cumárico	280	4,673
Quercetina	280	6,368
Ácido elágico	310	4,591
Ácido siríngico	230	4,159
Ácido vanílico	230	4,071
Ácido gálico	230	2,329
Ácido sinápico	280	4,966
Ácido ferúlico	310	4,996
Ácido salicílico	230	6,022
γ-orizanol	320	-
Ácido isoferúlico	230	10,283
Ácido cafeico	310	3,977

A maioria dos antioxidantes que não tinham sido detetados pelas condições anteriores são, agora, visíveis utilizando o novo gradiente, Tabela 4.18. Verifica-se, ainda, uma melhoria a nível dos tempos de retenção, apesar de ainda existirem alguns compostos sobrepostos, Tabela 4.19. Contudo, conseguiu reduzir-se o tempo de corrida para metade.

Como tal, alteraram-se novamente as condições utilizadas. Experimentou-se, então, apenas para o ácido ferúlico, uma vez que é um dos antioxidantes mais importantes neste trabalho, aumentar o fluxo para 0,45 mL/min e diminuir a concentração do padrão de modo a se verificar o perfil cromatográfico (terceiro teste). O cromatograma obtido encontra-se na Figura 4.7.

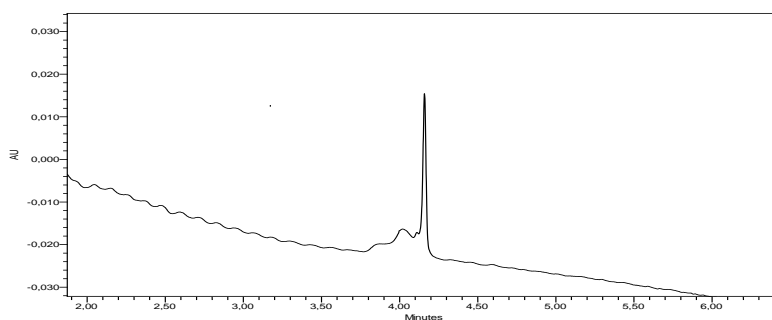


Figura 4.7 – Cromatograma do ácido ferúlico a 280 nm

Apesar das alterações realizadas no fluxo e na concentração do padrão, verifica-se, pela Figura 4.7, que não se obteve um cromatograma com o perfil desejado. Como os picos não tiveram o *lay-out* pretendido, optou-se por solubilizar os padrões na mistura correspondente à primeira linha do gradiente do processo cromatográfico: água:acetonitrilo (99:1). Foi, então, novamente, realizado um cromatograma do ácido ferúlico com as novas condições (quarto teste), Figura 4.8.

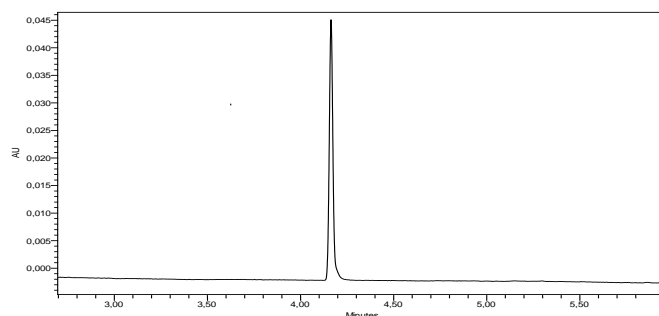


Figura 4.8 – Cromatograma do ácido ferúlico dissolvido em água:acetonitrilo (99:1) a 280 nm

Ao alterar o solvente de dissolução dos padrões obteve-se, assim, o pico do ácido ferúlico com o *lay-out* pretendido. Deste modo, todos os padrões foram dissolvidos na nova mistura de solvente, como se pode observar pelo cromatograma seguinte, Figura 4.9.

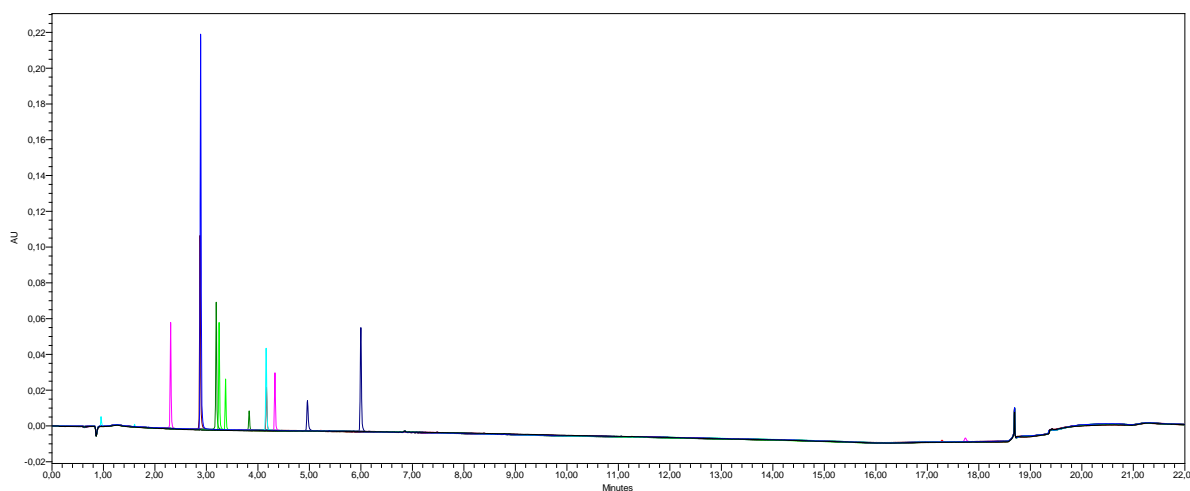


Figura 4.9 – Cromatograma dos padrões a 310 nm, nas condições do quarto teste

Analisando pormenorizadamente o cromatograma, observa-se que existem padrões com o mesmo tempo de retenção. No entanto, os picos deste cromatograma já apresentam o perfil desejado.

Antes de se fazer a identificação nas amostras usadas neste estudo, recorreu-se a um extrato não identificado de casca arroz, de modo a verificar se estas condições cromatográficas se adequavam aos extratos efetuados neste estudo. Os resultados encontram-se apresentados nas figuras seguintes, Figura 4.10 à Figura 4.12.

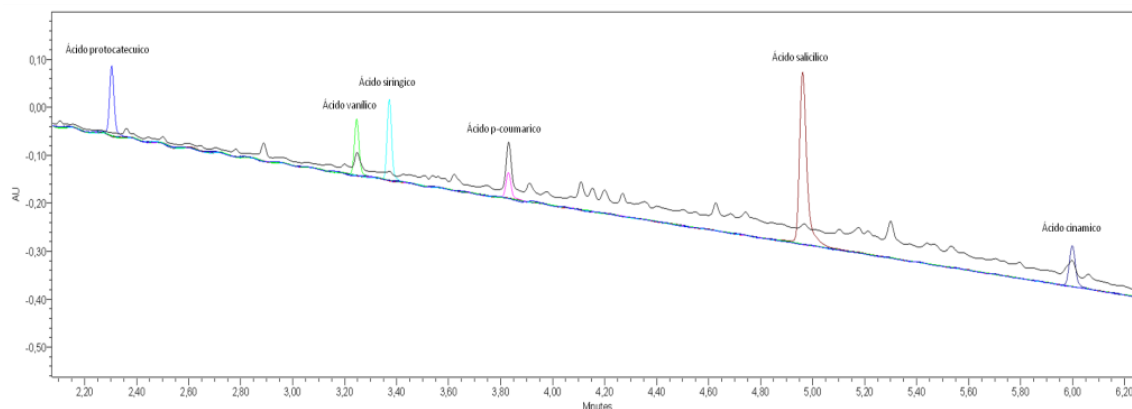


Figura 4.10 – Cromatograma do extrato com os correspondentes padrões a 230 nm

Ao comprimento de onda 230 nm, foram detetados seis antioxidantes: ácidos protocatecuico, vanílico, siríngico, p-cumárico, salicílico e cinâmico, mas, no entanto, apenas se conseguiu quantificar o ácido p-cumárico, pois foi o único que se encontrava acima do limite de quantificação (LQ), Figura 4.10.

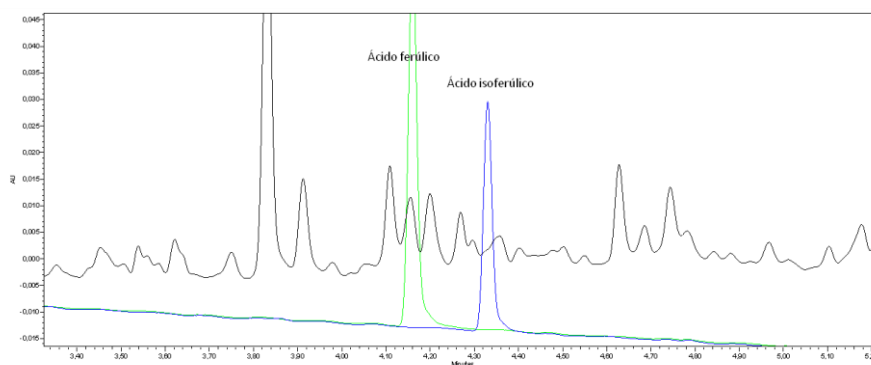


Figura 4.11 – Cromatograma do extrato com os correspondentes padrões a 280 nm

Analisando o cromatograma representado na Figura 4.11, verifica-se que a um comprimento de onda de 280 nm foram detetados dois antioxidantes no extrato, o ácido ferúlico e isoferúlico, no entanto, encontravam-se ambos abaixo do limite de quantificação.

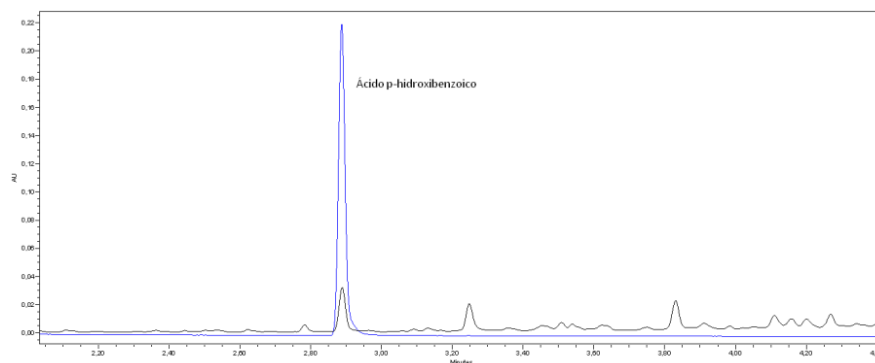


Figura 4.12 – Cromatograma do extrato com os correspondentes padrões a 310 nm

Pelo cromatograma acima, Figura 4.12, observa-se que se conseguiu detetar o ácido p-hidroxibenzoico no extrato mas não foi possível a sua quantificação, pois encontrava-se abaixo do limite de quantificação.

Uma vez que, apesar de se conseguirem detetar 9 antioxidantes no extrato de casca de arroz, apenas foi possível quantificado um dos compostos. Efetuou-se um novo teste com outras condições cromatográficas na tentativa de corrigir esta problemática. Para além disso, verificou-se ainda que a dissolução dos extratos e dos padrões no solvente era insuficiente e pouco eficaz. Foram então efetuadas alterações ao gradiente e ao modo de preparação dos padrões e amostras. As novas condições estão representadas na Tabela 3.3, e descritas no capítulo dos materiais e métodos, 3.5.5. Identificação e caracterização de compostos bioativos por UPLC-PDA.

Aplicação do método desenvolvido

Na Tabela 4.20, apresentam-se as figuras de mérito do método analítico utilizado para a determinação dos antioxidantes.

Tabela 4.20 – Características analíticas para a determinação dos compostos antioxidantes

Padrão	Tempo de retenção (min)	cdo lido (nm)	Equação linear	R ²	LD (mg/L)	LQ (mg/L)
Ácido gálico	1,78	230	$Y = (8,15 \times 10^4)X - 1,44 \times 10^4$	0,9944	0,38	1,27
Ácido levulínico	2,11	310	$Y = (1,37 \times 10^2)X - 2$	0,9943	0,32	1,07
Ácido protocatecuico	2,74	310	$Y = (3,62 \times 10^4)X + 4,65 \times 10^2$	0,9963	0,31	1,03
Ácido gentísico	3,64	310	$Y = (8,60 \times 10^4)X + 4,63 \times 10^3$	0,9923	0,45	1,49
Ácido p-hidroxibenzoico	3,66	310	$Y = (1,27 \times 10^5)X + 1,97 \times 10^4$	0,9931	0,42	1,41
Ácido clorogénico	3,95	310	$Y = (6,19 \times 10^4)X + 7,90 \times 10^3$	0,9913	0,47	1,58
Cafeína	4,17	230	$Y = (1,18 \times 10^5)X - 5,65 \times 10^3$	0,9966	0,30	0,99
Ácido cafeico	4,30	310	$Y = (7,76 \times 10^4)X + 1,20 \times 10^4$	0,9956	0,34	1,12
Ácido vanílico	4,34	310	$Y = (5,79 \times 10^4)X + 7,80 \times 10^3$	0,9934	0,41	1,37
Ácido siríngico	4,65	310	$Y = (1,94 \times 10^4)X + 2,29 \times 10^3$	0,9944	0,38	1,27
Ácido p-cumárico	5,38	230	$Y = (5,57 \times 10^4)X + 1,03 \times 10^4$	0,9958	0,33	1,09
Ácido elágico	5,87	310	$Y = (1,83 \times 10^4)X - 3,82 \times 10^2$	0,9975	0,25	0,84
Ácido ferúlico	6,01	280	$Y = (1,68 \times 10^5)X + 1,93 \times 10^4$	0,9915	0,47	1,56
Ácido sinápico	6,10	310	$Y = (3,34 \times 10^4)X + 5,04 \times 10^3$	0,9921	0,45	1,51
Ácido o-cumárico	6,27	230	$Y = (1,12 \times 10^5)X - 1,23 \times 10^4$	0,9991	0,15	0,50
Ácido isoferúlico	6,34	280	$Y = (5,44 \times 10^4)X + 3,76 \times 10^3$	0,9937	0,40	1,35
Ácido salicílico	7,08	230	$Y = (9,97 \times 10^4)X - 1,49 \times 10^4$	0,9940	0,39	1,30
Ácido m-cumárico	7,09	230	$Y = (9,84 \times 10^4)X + 3,85 \times 10^3$	0,9912	0,48	1,59
Naringin	7,11	310	$Y = (5,41 \times 10^3)X + 9,56 \times 10^1$	0,9974	0,26	0,86
m-cresol	7,88	230	$Y = (4,68 \times 10^4)X + 1,02 \times 10^4$	0,9977	0,24	0,81
p-cresol	7,91	230	$Y = (4,20 \times 10^4)X + 2,22 \times 10^4$	0,9964	0,31	1,02
o-cresol	8,09	230	$Y = (4,94 \times 10^4)X - 1,07 \times 10^3$	0,9906	0,49	1,64
Ácido cinâmico	8,76	230	$Y = (8,42 \times 10^4)X - 1,11 \times 10^4$	0,9908	0,49	1,63
δ-tocoferol	15,38	310	$Y = (4,42 \times 10^3)X + 1,57 \times 10^3$	0,9901	0,51	1,69
β-tocoferol	15,77	310	$Y = (3,62 \times 10^3)X + 4,50 \times 10^2$	0,9960	0,32	1,07
γ-tocoferol	15,79	310	$Y = (4,10 \times 10^3)X + 1,15 \times 10^2$	0,9902	0,50	1,67
Ácido palmítico			ND			
Ácido oleico			ND			
β-sitosterol			ND			
Xilose			ND			
Quercetina			ND			
γ-orizanol			ND			
Galangin			ND			
α-tocoferol			ND			

ND – não detetado; LD – Limite de deteção; LQ – limite de quantificação

Devido às alterações realizadas na preparação dos padrões, verifica-se, pela Tabela 4.20, que alguns dos compostos que tinham sido detetados deixaram de o ser, nomeadamente o ácido

palmítico, quercetina, α -tocoferol, e xilose. No caso dos ácidos gordos (ácidos oleico e palmítico), uma das explicações possíveis para ser difícil de os detetar é o facto de serem extremamente voláteis.

A quantificação nos extratos foi realizada usando as curvas de calibração dos 26 padrões detetados na gama de 0,4 a 4 mg/L. As curvas de calibração foram lineares na faixa estudada e apresentam coeficientes de correlação superiores a 0,99. O limite de deteção (LD) e o limite de quantificação (LQ) são expressos em mg/L e também se encontram representados na Tabela 4.20.

Nas Figura 4.13, Figura 4.14 e Figura 4.15 encontram-se representados os cromatogramas dos compostos detetados e que se pretenderam identificar neste estudo.

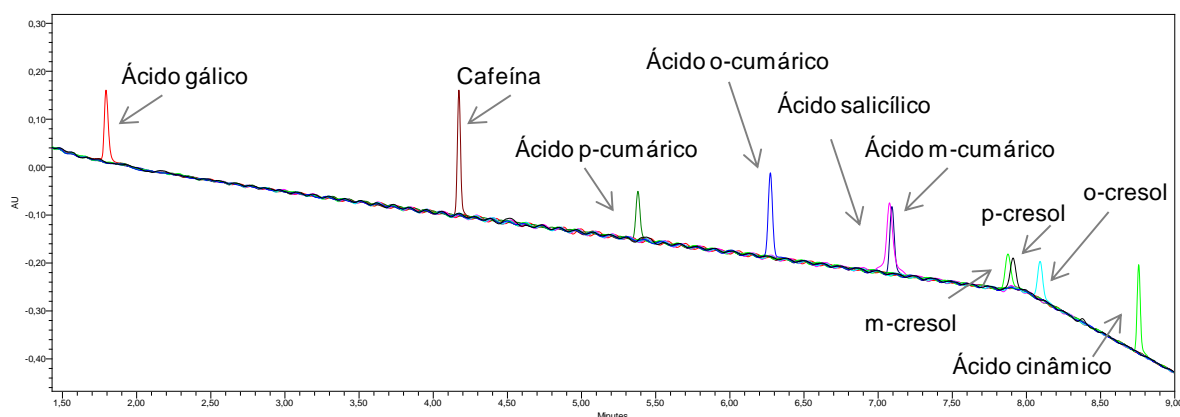


Figura 4.13 – Cromatograma dos padrões (4 mg/L) detetados a 230 nm

Verifica-se que, para os padrões detetados a 230 nm, Figura 4.13, estes apresentam o perfil de pico desejado, no entanto ainda existem compostos com tempos de retenção semelhantes. Uma explicação poderá ser as semelhanças de afinidades com as fases móvel e estacionária. Para além disso, o m, p e o-cresol são isómeros o que poderá dificultar a sua separação.

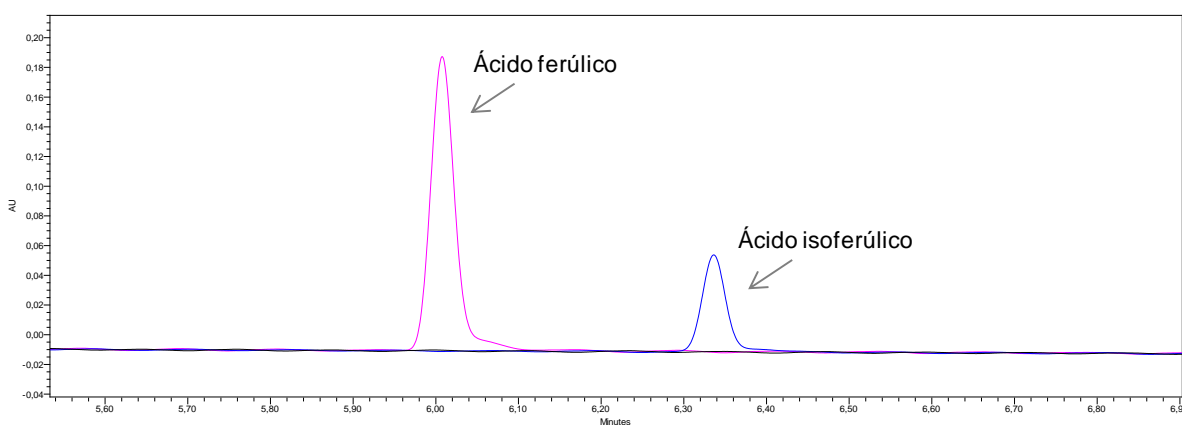


Figura 4.14 – Cromatograma dos padrões (4 mg/L) detetados a 280 nm

O ácido ferúlico e o seu isómero isoferúlico foram detetados a 280 nm, Figura 4.14. Observa-se um ligeiro *tailing* no pico do ácido ferúlico, no entanto, este não é significativo. Os picos apresentam, então, o *lay-out* desejado.

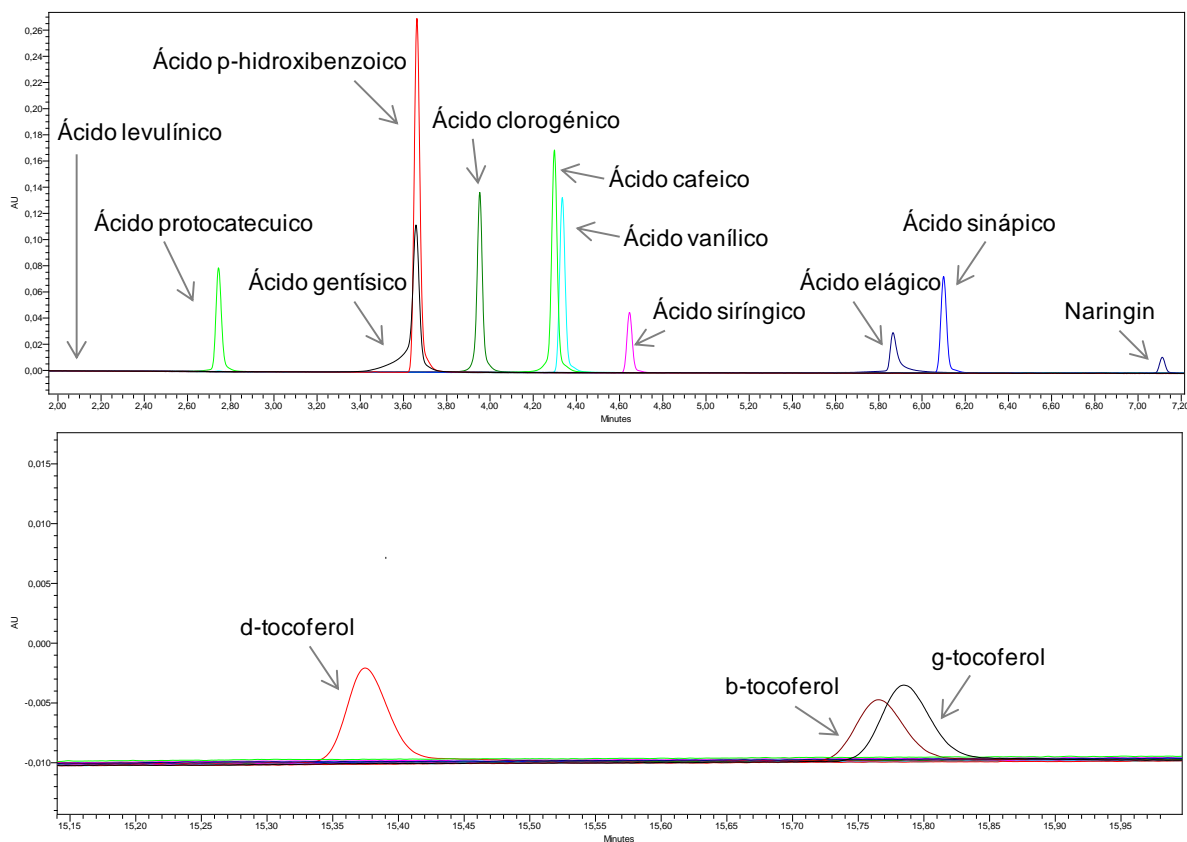


Figura 4.15 – Cromatograma dos padrões (4 mg/L) detetados a 310 nm

Na Figura 4.15 estão representados os cromatogramas dos compostos detetados a 310 nm. À semelhança do obtido para os compostos detetados a 230 nm, existem picos sobrepostos. Com as condições utilizadas não foi possível separar certos compostos. Uma possível solução seria alterar o pH, por exemplo, através da quantidade de acetonitrilo usada como solvente.

Foi então feita a análise às amostras nas mesmas condições utilizadas para os padrões.

Nas Tabela 4.21, Tabela 4.22 e Tabela 4.23 encontram-se descritos e quantificados os compostos antioxidantes identificados nas amostras de grão, farelo e casca de arroz, respetivamente. Os resultados são expressos em g de composto por 100g de amostra. A identificação dos compostos nas amostras foi conseguida através da comparação dos tempos de retenção e dos respetivos comprimentos de onda anteriormente reconhecidos. No caso dos ácidos gentísico e p-hidroxibenzoico, uma vez que os tempos de retenção são bastante próximos, a sua identificação nas amostras também foi baseada de acordo com o formato do pico. No entanto, terá que se ter em conta que poderá haver um erro de identificação.

Tabela 4.21 – Compostos fenólicos identificados nas amostras de grão de arroz

Amostra		Ácido protocatecuico (g/100g de amostra)	Ácido siríngico (g/100g de amostra)	Ácido ferúlico (g/100g de amostra)
Grão	24	< LQ	ND	< LQ
	25	$1,30 \times 10^{-5}$	< LQ	< LQ
	26	< LQ	ND	< LQ

ND – não detetado; < LQ – abaixo do limite de quantificação.

Foram identificados três compostos fenólicos nos extratos de grão de arroz, no entanto, apenas foi possível quantificar o ácido protocatecuico na amostra 25 ($1,30 \times 10^{-5}$ g/100g de amostra). Os restantes compostos mencionados na Tabela 4.21, apesar de detetados, a sua quantificação não é possível. Assume-se que se encontram abaixo do limite de quantificação. Uma possível solução para esta problemática seria tentar aumentar a concentração da amostra, no entanto, uma vez que o rendimento de extração das amostras de grão de arroz é extremamente baixo, não foi possível repetir a análise a uma concentração superior dentro do tempo da finalização deste estudo. Outra possível solução seria tentar baixar a concentração mínima usada no padrão para a realização da curva de calibração, o que também não seria concretizável, em tempo útil, a este estudo.

Shao *et. al.* [86] analisaram seis compostos com capacidade antioxidante: ácidos protocatecuico, vanílico, siríngico, p-cumárico, ferúlico e isoferúlico em amostras de arroz, no entanto, contrariamente a este estudo, não conseguiram detetar o ácido protocatecuico. Estas diferenças encontradas entre estudos devem-se às diferenças no método de extração, nas condições cromatográficas e solventes e também aos equipamentos usados, como o detetor e sistema cromatográfico.

Finocchiaro *et. al.* [88] fizeram a identificação de quatro compostos fenólicos (ácido sinápico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido p-cumárico) em duas amostras de arroz de duas variedades cultivadas em Itália, onde conseguiram identificar na variedade Eusebio todos os compostos, assim como na variedade Carnaroli, com a exceção do ácido cafeico. Para além do grão de arroz, o estudo foi aplicado ao bago com casca e descascado, tendo os investigadores chegado à conclusão de que o grau de descasque e branqueamento do bago tem uma grande influência no conteúdo destes, causando uma diminuição acentuada no teor destes compostos, em especial o ácido ferúlico e o sinápico. Uma vez que, neste estudo, se tentou fazer a identificação destes mesmos compostos, contudo sem sucesso, com a exceção do ácido ferúlico, tal disparidade entre resultados deve-se, não só ao facto de se tratar de amostras de variedades e origens diferentes, mas essencialmente às diferenças no método de extração, sendo que Finocchiaro *et. al.* realizou hidrólise alcalina após a extração também realizada em condições e com solventes muito diferentes aos deste estudo.

Qiu *et. al.* [41] também realizaram um estudo de identificação de seis compostos fenólicos em amostras de grão arroz (ácido p-hidroxibenzoico, vanílico, siríngico, p-cumárico, ferúlico e sinápico), tendo conseguido quantificar o ácido vanílico, p-cumárico e ferúlico e detetado traços de ácido siríngico e sinápico, utilizando um método de extração seguido de uma hidrólise alcalina.

Zhou *et. al.* [89] realizaram um estudo a três amostras de grão de arroz de variedades diferentes, com um dos objetivos propostos ser verificar se a composição de compostos fenólicos variava ao longo do tempo. Fizeram a comparação com seis compostos fenólicos: ácidos ferúlico, p-cumárico, gálico, vanílico, cafeico e siríngico. A identificação de compostos foi realizada em extrato fresco e em extratos guardados durante seis meses a 4 °C e a 37 °C. Nos extratos frescos, conseguiram detetar e quantificar todos os fenólicos com a exceção do ácido siríngico que, em duas das variedades, não foi possível quantificar. No entanto, ao fim de seis meses, obtiveram grandes diferenças, tendo alguns dos compostos que tinham sido quantificados deixado de o ser, e o conteúdo de fenólicos baixado muito. Ainda assim, concluíram que, comparando os extratos armazenados a 4 °C e a 37 °C, a diferença não é tão significativa, existindo apenas uma ligeira diferença, tendo os extratos a 4 °C apresentado um maior teor de fenólicos do que os de 37 °C.

Muitos outros autores como Vichapong *et. al.* [36], e Huang e Ng [38] conseguiram identificar e quantificar muitos outros compostos fenólicos em amostras de várias regiões e variedades diferentes. Como tal, pode assumir-se que a extração realizada necessita de ser otimizada e/ou que os restantes fenólicos se encontram abaixo do limite de deteção. Verifica-se, pela Tabela 4.20, que o limite de quantificação é bastante elevado. Esta situação poder-se-ia resolver com um aumento da concentração da amostra ou, eventualmente, com a diminuição da gama de alguns compostos. No entanto, também se verificou que, na maioria dos casos, as maiores diferenças encontradas entre este trabalho e os publicados residiam no método de extração e, menos significativamente, nas condições cromatográficas e equipamentos usados.

Tabela 4.22 – Quantificação de compostos antioxidantes identificados nas amostras de farelo de arroz

Compostos/Amostra	Farelo		
	27	28	29
Acido levulínico (g/100g de amostra)	$8,44 \times 10^{-2}$	ND	$6,87 \times 10^{-2}$
Acido p-hidroxibenzoico (g/100g de amostra)	$1,23 \times 10^{-2}$	< LQ	< LQ
Acido vanílico (g/100g de amostra)	< LQ	< LQ	< LQ
Acido siríngico (g/100g de amostra)	ND	< LQ	ND
Acido elágico (g/100g de amostra)	$1,96 \times 10^{-3}$	ND	ND
Acido ferúlico (g/100g de amostra)	< LQ	< LQ	< LQ
Naringin (g/100g de amostra)	$6,57 \times 10^{-3}$	ND	$5,78 \times 10^{-3}$

ND – não detetado; < LQ – abaixo do limite de quantificação.

Como se pode verificar pela Tabela 4.22, quantificaram-se quatro de sete compostos detetados nos extratos de farelo de arroz. Os ácidos p-hidroxibenzoico, vanílico, siríngico, ferúlico, apesar de identificados, não foram possíveis de quantificar em algumas das amostras, uma vez que se encontram abaixo do limite de quantificação. Neste caso, aumentar a concentração do extrato não seria uma solução pois o cromatograma deixaria de ter o perfil desejado. No entanto, poder-se-ia

tentar diminuir a concentração mais baixa utilizada para a realização das curvas de calibração dos padrões em questão. Observa-se ainda que o ácido levulínico e o naringin são apenas detetados nas amostras de arroz carolino e o ácido siríngico nas amostras de arroz agulha (amostra 31). A subvariedade ariete é a que apresenta um maior número de compostos antioxidantes identificados e quantificados, seguida da subvariedade opale, e da amostra de arroz agulha, onde não se consegue quantificar nenhum composto.

Através deste método, quantificou-se $1,05 \times 10^{-1}$ g compostos antioxidantes/100g de farelo de arroz, na subvariedade ariete e $7,45 \times 10^{-2}$ g compostos antioxidantes/100g de farelo de arroz, na subvariedade opale.

Os resultados obtidos neste trabalho são inferiores aos reportados por Huang e Ng [38], pois conseguiram, em média, detetar e quantificar sete compostos fenólicos em amostras de arroz carolino e cinco em amostras de arroz agulha proveniente da Tailândia. De entre os compostos quantificados, destacam-se os ácidos clorogénico, cafeico e p-cumárico, que foram detetados nas amostras de farelo de arroz tailandês, contrariamente às deste estudo. No entanto, foi detetado o ácido p-hidroxibenzoico em todas as amostras de farelo deste trabalho, não tendo sido detetado nas amostras de Huang e Ng. Identicamente a este estudo, detetaram ácido vanílico e ácido ferúlico em todas as amostras de farelo tailandês independentemente da variedade, e ácido elágico em duas das quatro subvariedades de arroz carolino ($3,38 \times 10^{-3}$ e $6,23 \times 10^{-3}$ g/100g de amostra), valor de ácido elágico que é superior ao detetado neste estudo. Estas diferenças devem-se, provavelmente, ao facto de serem amostras de zonas diferentes e às diferenças usadas no método de extração.

Wanyo *et. al* [85] fizeram a identificação de nove compostos fenólicos em amostras de farelo de arroz oriundo da Tailândia. Contrariamente a este estudo, detetaram os ácidos: gálico, protocatecuico, clorogénico, cafeico, p-cumárico e sinápico. Ainda assim, não detetaram ácido p-hidroxibenzoico. Identicamente a este estudo, também identificaram os ácidos: vanílico, ferúlico e siríngico, valor deste último composto superior ao obtido neste trabalho. O método de extração usado por Wanyo *et. al.* foi muito diferente do usado neste estudo, tendo usado como solvente água destilada, com isto e com o facto de se tratarem de amostras provenientes de zonas diferentes, são justificáveis as diferenças encontradas.

Tabela 4.23 – Quantificação de compostos antioxidantes identificados nas amostras de casca de arroz

Compostos/Amostra	Casca		
	30	31	32
Acido levulínico (g/100g de amostra)	$6,08 \times 10^{-2}$	$6,00 \times 10^{-2}$	$8,49 \times 10^{-2}$
Acido gentísico (g/100g de amostra)	$1,28 \times 10^{-3}$	$1,88 \times 10^{-3}$	$1,68 \times 10^{-3}$
Acido vanílico (g/100g de amostra)	$3,56 \times 10^{-4}$	$6,37 \times 10^{-4}$	$1,88 \times 10^{-4}$
Acido p-cumárico (g/100g de amostra)	$6,38 \times 10^{-3}$	$1,29 \times 10^{-2}$	$7,58 \times 10^{-3}$
Acido elágico (g/100g de amostra)	$1,37 \times 10^{-3}$	$1,40 \times 10^{-3}$	$2,29 \times 10^{-3}$
Acido ferúlico (g/100g de amostra)	< LQ	< LQ	< LQ
Acido o-cumárico (g/100g de amostra)	< LQ	< LQ	< LQ
Acido sinápico (g/100g de amostra)	< LQ	< LQ	< LQ
Acido isoferúlico (g/100g de amostra)	$6,52 \times 10^{-4}$	$7,83 \times 10^{-4}$	$3,06 \times 10^{-3}$
β-tocoferol (g/100g de amostra)	$2,33 \times 10^{-3}$	ND	$8,76 \times 10^{-4}$

ND – não detetado; < LQ – abaixo do limite de quantificação.

A casca de arroz é a fração em que se detetou e quantificou um maior número de compostos antioxidantes. Como se pode verificar pela Tabela 4.23, foram quantificados sete de dez compostos detetados. Os ácidos ferúlico, o-cumárico e isoferúlico apesar de identificados, não foi possível a sua quantificação, uma vez que se encontram abaixo do limite de quantificação. Neste caso, aumentar a concentração do extrato não seria uma solução, no entanto poder-se-ia tentar diminuir a concentração mais baixa utilizada para a realização das curvas de calibração dos padrões em questão.

Por UPLC, nas amostras de casca foi possível quantificar $1,01 \times 10^{-1}$ g compostos antioxidantes/100g de casca de arroz, na subvariedade opale, $7,76 \times 10^{-2}$ g compostos antioxidantes/100g de casca de arroz, na subvariedade ellebi e $7,32 \times 10^{-2}$ g compostos antioxidantes/100g de casca de arroz, na subvariedade ariete.

Butsat *et. al.* [40] identificaram oito compostos fenólicos em extratos de casca de arroz, sendo eles os ácidos gálico, ácido protocatecuico, ácido p-hidroxibenzoico, clorogénico, vanílico ($1,41 \times 10^{-4}$ g/100g de extrato), siríngico, p-cumárico ($1,98 \times 10^{-4}$ g/100g de extrato) e ferúlico ($1,81 \times 10^{-4}$ g/100 g de extrato). Para efeitos de comparação, é necessário reportar os resultados deste estudo para g/100g de extrato. Sendo assim, nos extratos de casca de arroz, encontraram-se os seguintes valores: $1,56 \times 10^{-4}$, $2,38 \times 10^{-4}$ e $7,07 \times 10^{-5}$ g de ácido vanílico/100g de extrato nas amostras 30, 31 e 32 respetivamente, $2,80 \times 10^{-3}$, $4,82 \times 10^{-3}$ e $2,85 \times 10^{-3}$ g de ácido p-cumárico/100 g de extrato nas amostras 30, 31 e 32 respetivamente. Estes valores são superiores aos obtidos por Butsat *et. al.* no seu estudo. Uma das explicações é o facto de serem amostras de variedades e de zonas diferentes, dado que o método de extração foi idêntico ao realizado neste estudo.

Huang e Ng [38] fizeram a identificação de compostos fenólicos em quatro subvariedades de casca de arroz Japonica (carolino) e três Indica (agulha) provenientes da Tailândia, tendo conseguido identificar, em média, sete compostos nas variedades de casca de arroz carolino e seis nas variedades de casca de arroz agulha, entre os quais se destacam o ácido vanílico ($4,65 \times 10^{-4}$ a $6,92 \times 10^{-4}$ g/100g de amostra nas amostras de casca de arroz carolino e $5,53 \times 10^{-4}$ a $9,20 \times 10^{-4}$ g/100g de amostra, nas amostras de casca de arroz agulha), valores que se assemelham aos obtidos neste estudo, com a exceção das amostras 30 e 31 (arroz carolino), que são muito inferiores; ácido p-cumárico ($1,90 \times 10^{-3}$ a $2,57 \times 10^{-3}$ g/100g de amostra nas amostras de casca de arroz carolino e $1,14 \times 10^{-3}$ a $1,30 \times 10^{-3}$ g/100g de amostra, nas amostras de casca de arroz agulha), valores que são inferiores aos obtidos neste estudo; ácido ferúlico e ácido elágico ($3,34 \times 10^{-3}$ a $5,23 \times 10^{-3}$ g/100g de amostra nas amostras de casca de arroz carolino), valores superiores aos reportados neste estudo. Estas diferenças devem-se provavelmente ao facto de serem amostras de zonas diferentes.

Os resultados reportados neste estudo, em relação ao ácido vanílico e ácido p-cumárico, são inferiores e superiores aos obtidos por Wanyo *et. al.* [85], ($7,39 \times 10^{-4}$ g ácido vanílico/100g de amostra, $3,13 \times 10^{-4}$ g ácido p-cumárico/100g de amostra), respetivamente. Para além destes compostos, Wanyo *et. al.* conseguiram identificar e quantificar, nas amostras de casca, os compostos: ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico. Dado que, dos compostos acima mencionados apenas foram detetados o ácido ferúlico e sinápico nas amostras deste estudo, sem ter sido possível a sua quantificação, pode supor-se que os restantes compostos se encontram abaixo do limite de deteção.

Análise global dos resultados

Na Figura 4.16, encontra-se esquematizado os compostos antioxidantes quantificados por amostra.

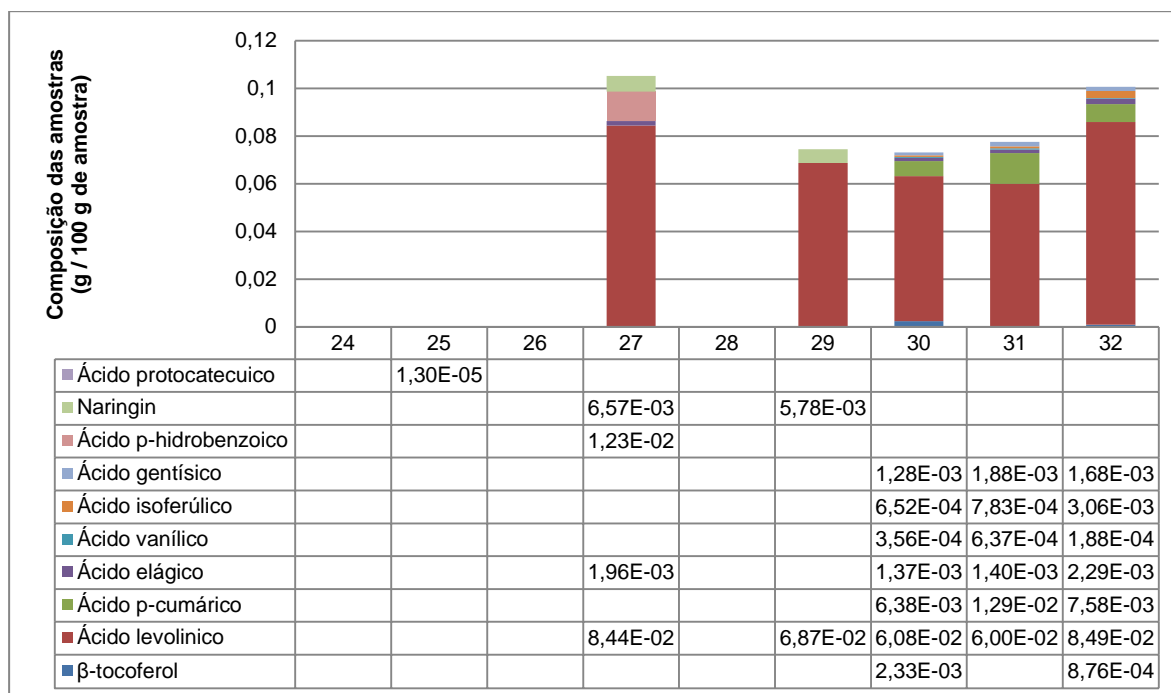


Figura 4.16 – Identificação e quantificação dos compostos antioxidantes nas amostras

Analisando, globalmente, os resultados, por ordem decrescente da concentração de compostos antioxidantes obtidos por UPLC, Figura 4.16, observa-se que a amostra 27 ($1,05 \times 10^{-1}$ g compostos antioxidantes/100g de farelo de arroz) é a que apresenta uma maior concentração, seguida das amostras 32 ($1,01 \times 10^{-1}$ g compostos antioxidantes/100g de casca de arroz), 31 ($7,76 \times 10^{-2}$ g compostos antioxidantes/100g de casca de arroz), 29 ($7,45 \times 10^{-2}$ g compostos antioxidantes/100g de farelo de arroz), 30 ($7,32 \times 10^{-2}$ g compostos antioxidantes/100g de casca de arroz) e 25 ($1,30 \times 10^{-5}$ g compostos fenólicos/100g de grão de arroz). Verifica-se que a diferença entre a amostra 27 e a amostra 32 e as amostras 20 e 30 são extremamente baixas, tendo sido nas amostras de casca onde foram detetados um maior número de compostos com capacidade antioxidante diferentes, seguido do farelo e, por fim, do grão de arroz. Estas observações estão de acordo com o verificado por Butsat e Siriamornpun [43], que concluíram que a concentração de fenólicos aumentava desde o endosperma até à camada de aleurona, sendo que a fração que fornece maior capacidade antioxidante é a casca. Huang e Ng [38], concluíram que o farelo foi a fração que apresentou níveis mais altos de compostos fenólicos, seguido da casca e do grão de arroz que, na sua maioria, só apresentava alguns traços. Estes resultados fazem sentido, uma vez que é nas camadas mais externas dos grãos, como a casca e o farelo, onde se encontram os compostos fitoquímicos, em especial os fenólicos, com maior capacidade antioxidante para proteger os componentes internos [85].

4.1.3. Análise global entre o teste TPC e a quantificação de compostos por UPLC

Verificou-se, pelo teste TPC, que a fração com maior conteúdo de compostos fenólicos é o farelo, seguido da casca e, por último, o grão, Tabela 4.12. Contudo, tal não se verifica na caracterização feita por UPLC (Tabela 4.21 à Tabela 4.23 e Figura 4.16), tendo obtido resultados ligeiramente diferentes. Um exemplo disso é a amostra 29 que, apesar de conter maior conteúdo fenólico pelo teste do TPC, não é a que contém uma maior concentração de compostos antioxidantes identificados pelo método do UPLC, ficando abaixo de duas das subvariedades da casca. Como foi anteriormente referido, uma possível explicação, é que os compostos antioxidantes não foram quantificados devido a estarem abaixo do limite de quantificação ou por não corresponderem aos padrões que foram analisados, ou mesmo pelo método utilizado ainda não ser o mais adequado, tendo que ser otimizado futuramente nesse sentido. Com os resultados obtidos pelo método do TPC pode descartar-se a hipótese de a extração não ser a mais acertada para a identificação e quantificação de compostos bioativos, uma vez que se obteve resultados concordantes com a literatura nesse aspeto.

4.2. Outras amostras estudadas

4.2.1. Identificação das amostras e métodos

No decorrer da elaboração deste trabalho, para além das frações do bago de arroz referidas nos capítulos anteriores, foram analisadas outras matrizes, apresentadas na Tabela 4.24. Estas amostras foram facultadas pela indústria portuguesa, com exceção das amostras de oca que provém da Argentina e de Mel A e B que são oriundas da África do Sul.

Tabela 4.24 – Identificação das novas matrizes e das determinações realizadas nas mesmas

Amostras		Código	Macronutrientes	Extração	DPPH'	TPC	ULPC - PDA
Quinoa	Pipoca de Quinoa	PQ	X	X	X	X	
	Quinoa Real	QR		X		X	
	Floco de Quinoa	FQ		X		X	
	Quinoa	Q	X	X			
Mel	Mel C	MC			X	X	
	Mel 1	M1			X	X	
	Mel 2	M2			X	X	
	Mel da Africa do Sul A	MA				X	
	Mel da Africa do Sul B	MB				X	
Oca	Oca Blanca	OB		X	X	X	X
	Oca Amarela	OA		X	X	X	X
	Oca Rosada	OR		X	X	X	X
	Oca Overa	OO		X	X	X	X
	Oca Morada	OM		X	X	X	X
	Oca Colorada	OC		X	X	X	X
Arroz	Farelo	F	X				
	Casca	C	X				
Milho Roxo		MR		X	X	X	
Trigo-sarraceno		TS		X	X	X	
Amarantos		A	X	X	X	X	

O procedimento de preparação das amostras (antes da extração), de quinoa, arroz, trigo-sarraceno e amarantos foi idêntico ao descrito em 3.1. Amostras.

Todas as extrações realizadas, à exceção das amostras de Mel (não foi necessário a realização de qualquer método de extração) e de Oca, foram efetuadas seguindo o procedimento descrito em 3.5.1. Extração de compostos bioativos. O procedimento de preparação de amostras (pré extração) e da extração dos compostos bioativos das amostras de oca encontra-se em anexo, Anexo E – Extração de compostos bioativos das amostras de Oca Argentina.

4.2.2. Apresentação e discussão dos resultados

4.2.2.1. Macronutrientes

De modo a determinar a composição nutricional das duas amostras de quinoa (pipoca quinoa e quinoa), de duas frações do bago de arroz (farelo e casca) e do pseudocereal amaranto, determinou-se o teor de humidade, cinza e proteína e da gordura para a amostra de casca de arroz. Os ensaios foram realizados em duplicado (n=2) para evidenciar a repetibilidade das condições de ensaio e os resultados foram expressos em g por 100g de matéria fresca, sendo apresentados na Tabela 4.25.

No subcapítulo 4.1.1. Macronutrientes, abordaram-se algumas limitações a estas análises. É importante referir que essas limitações também se aplicam a estas amostras.

A identificação das diferenças significativas foi realizada com o auxílio da ANOVA e do teste LSD.

Tabela 4.25 – Resultados do teor de humidade, cinza, proteína e gordura nas amostras de quinoa, arroz e amaranto

Amostra		Humidade (g/100g amostra)	Cinza (g/100g de amostra)	Proteína (g/100g de amostra)	Gordura (g/100g de amostra)
Quinoa	Q	10,61 ^a ± 0,05	2,32 ^a ± 0,05	10,08 ^a ± 0,00	-
	PQ	11,03 ^b ± 0,07	1,35 ^b ± 0,00	7,22 ^b ± 0,06	-
Arroz	F	10,56 ^a ± 0,03	7,97 ^c ± 0,02	13,16 ^c ± 0,00	-
	C	10,57 ^a ± 0,03	13,47 ^d ± 0,04	-	0,43 ± 0,01
Amaranto		9,89 ^c ± 0,02	2,13 ^e ± 0,08	13,65 ^c ± 1,20	-

^{a,b,c} Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ($p < 0,05$). Os resultados estão expressos em Médias ± Desvio padrão, $n=2$.

Pela análise dos resultados apresentados na Tabela 4.25, pode constatar-se que, relativamente à determinação do teor de humidade, existem diferenças significativas entre as amostras de pipoca de quinoa e amaranto e as restantes amostras estudadas, sendo que a amostra de pipoca quinoa é a que apresenta maior teor de humidade e a de amaranto é a que contém valor mais baixo. Nas restantes amostras (quinoa, farelo e casca de arroz), não foram encontradas diferenças significativas entre si. Os resultados obtidos nas amostras de quinoa são inferiores ao reportado na revisão da literatura publicada por Koziol, 11,07 g/100g de amostra [61]. Comparando as amostras de farelo e casca (F e C) com os resultados obtidos para as amostras deste trabalho analisadas anteriormente (amostras 27 a 32) verifica-se que, nas amostras de farelo e casca (F e C, respetivamente), o teor de humidade é superior. Esta diferença pode residir na variedade da amostra ou no tipo de armazenamento e tratamento a que foi sujeita, uma vez que não se conhece nenhuma informação acerca das mesmas. O teor obtido para a amostra de amaranto encontra-se abaixo do reportado por Nascimento *et. al.*, 10,50 g/100g de amostra [64].

No que respeita à determinação do teor de cinza (Tabela 4.25), verificam-se diferenças significativas entre todas amostras estudadas, obtendo-se uma gama de valores entre 1,35 % a 13,47 %. A pipoca de quinoa é a que apresenta menor teor de matéria inorgânica e a de casca de arroz a que apresenta maior. Os resultados obtidos na amostra de quinoa e pipoca quinoa são muito inferiores ao reportado por Koziol, 3,4 g/100g de amostra [61]. Comparando os resultados das amostras de farelo e casca de arroz com os obtidos nas amostras 27 a 32, verifica-se que a amostra de farelo se encontra dentro da gama de valores obtidos para as amostras 27 a 29, mas, no entanto, o teor de cinza obtido na amostra de casca é muito inferior ao obtido nas amostras 30 a 32. Esta diferença pode dever-se ao tamanho da partícula resultante da moagem, uma vez que estas não foram peneiradas. O resultado obtido na amostra de amaranto encontra-se em linha com o reportado por Nascimento *et. al.*, 2,29 g/100g de amostra [64].

Na Tabela 4.25 estão também presentes os valores obtidos para a proteína. Pela aplicação do teste LSD ($p < 0,05$), verifica-se que as amostras de farelo de arroz e amaranto são significativamente diferentes das restantes, mas não diferentes entre si. O amaranto é o mais rico em proteína e a pipoca de quinoa a mais pobre.

A determinação de gordura apenas foi realizada à amostra de casca, cujos resultados estão apresentados na Tabela 4.25, tendo-se obtido um teor de gordura de 0,43 g/100g de amostra. Este resultado é ligeiramente superior ao obtido nas outras amostras de casca de arroz estudadas (amostras 30 a 32). Esta diferença poderá ter varias explicações, entre as quais o facto importante de se tratar de amostras de subvariedades diferentes, pela sazonalidade da amostra, ou mesmo pelo tipo de descasque sofrido assim como à diferença da homogeneização das mesmas.

4.2.2.2. Análise de compostos bioativos

Extração de compostos bioativos

Na Tabela 4.26, encontram-se apresentados os rendimentos das extrações metanólicas realizadas nas outras amostras estudadas.

A extração dos compostos bioativos das amostras de oca foi realizado por um método diferente, não se tendo procedido à secura do extrato, pelo que não foram calculados rendimentos de extração, sendo assim a extração destas amostras não será discutida.

Tabela 4.26 – Rendimentos de extração das amostras.

Amostras		Rendimento de Extração (%)
Quinoa	PQ	10,91
	QR	12,13
	FQ	5,84
	Q	14,35
MR		8,48
TS		4,18
A		5,02

Como se pode ver pela Tabela 4.26, existem grandes diferenças no rendimento de extração entre as diferentes amostras de quinoa, onde a quinoa é a que apresenta um rendimento de extração superior, 14 %, sendo o floco de quinoa, o que apresenta um rendimento de extração inferior de aproximadamente 6 %, o que faz sentido uma vez que se trata de uma forma da quinoa já processada. Em relação às restantes amostras, obteve-se um rendimento de extração de 8 % para o milho roxo, de 5 % para o amaranto e de 4 % para o trigo-sarraceno.

Fazendo uma comparação do rendimento de extração obtido nas sementes de quinoa, amaranto e trigo-sarraceno com o obtido para as amostras de grão de arroz (0,9 a 1,14 %), Tabela 4.10, verifica-se que o método de extração é mais eficiente nos pseudocereais estudados do que no

grão de arroz, pelo que poderá indicar que estas amostras terão um maior número de compostos bioativos.

Determinação da capacidade antioxidante

A determinação da capacidade antioxidante foi realizada de acordo com o descrito em 3.5.3. Determinação da capacidade antioxidante. No entanto, houve a necessidade de se otimizar o método a cada amostra. Os dados referentes à preparação das soluções para o cálculo do IC₅₀ encontram-se em anexo, Anexo I – Preparação das soluções para o cálculo do IC₅₀ (outras amostras estudadas).

Foram construídas, para cada amostra, curvas de inibição dos radicais de DPPH acompanhando o decréscimo de absorvância ao longo do tempo. Recorrendo à Equação 4.1 transformaram-se esses dados em termos de percentagem de inibição.

Aplicou-se a ANOVA e o teste LSD, sempre que possível, para se verificar se existiam, ou não, diferenças significativas entre as amostras.

Cereais e pseudocereais

As curvas de inibição correspondentes às amostras de milho roxo, trigo-sarraceno, pipoca quinoa e amaranto estão representadas na Figura 4.17 e Figura 4.18.

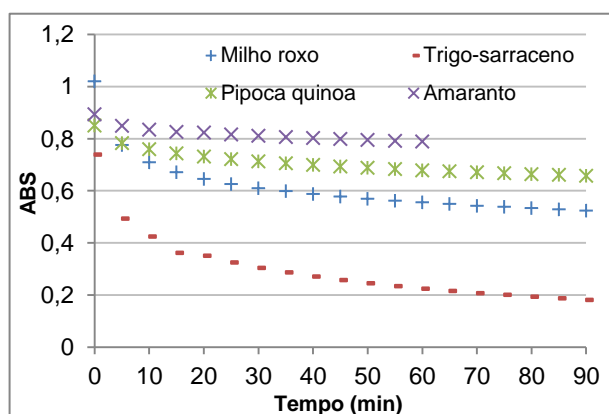


Figura 4.17 – Curva cinética da reação de DPPH* com os extratos metanólicos das amostras de cereais e pseudocereais

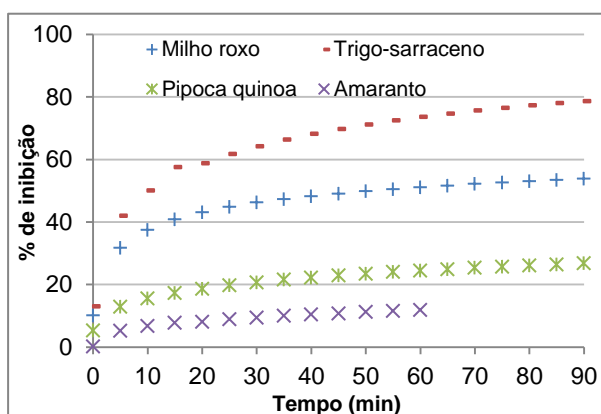


Figura 4.18 – Curva de inibição dos radicais DPPH pelos extratos metanólicos em função do tempo nas amostras de cereais e pseudocereais

Através das curvas representadas, Figura 4.17 e Figura 4.18, verifica-se que, para uma concentração de extrato metanólico de 2 mg/mL nas amostras de milho roxo, trigo-sarraceno, pipoca quinoa (concentração do extrato na mistura reacional: 0,1 mg/mL) e amaranto (concentração do extrato na mistura reacional: 0,4 mg/mL), se atingiram inibições de aproximadamente 53 %, 79 %, 27 % e 12 % respetivamente, ao fim de 90 minutos, com a exceção da amostra de amaranto que estabilizou ao fim de 60 minutos. Como tal, a atividade antioxidante foi analisada em soluções de extrato com diferentes concentrações, ao fim de 90 minutos de reação. No entanto, para o caso das amostras de pipoca quinoa e amaranto, não foi possível obter os valores de IC₅₀ por interpolação, uma vez que se obteve inibições inferiores a 50 %. Contudo, verifica-se, pelas curvas acima

representadas, que o trigo-sarraceno possui uma maior percentagem de inibição seguido do milho roxo, da pipoca quinoa e, por fim, do amaranto.

Na tabela seguinte, Tabela 4.27, apresentam-se os resultados relativos à determinação da capacidade antioxidante pelo método do DPPH[•].

Tabela 4.27 – Capacidade antioxidante nos extratos metanólicos das amostras de cereais e pseudocereais determinada pelo método do DPPH[•]

Amostra	IC ₅₀ (mg/mL)
MR	0,07 ^a ± 0,00
TS	0,05 ^b ± 0,00

^{a,b} Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ($p < 0,05$). Os resultados estão expressos em Médias ± Desvio padrão, $n = 3$.

Pela análise dos resultados da Tabela 4.27 pode constatar-se que, segundo o teste LSD ($p < 0,05$), existem diferenças significativas entre os extratos das diferentes amostras. O trigo-sarraceno apresenta um IC₅₀ menor (0,05 mg/mL), logo possui uma maior capacidade antioxidante, comparativamente com o milho roxo (0,07 mg/mL), o que também é verificado pela Figura 4.18, onde se consegue visualizar uma maior percentagem de inibição do radical do DPPH no caso do trigo-sarraceno, utilizando a mesma concentração e após o mesmo tempo de reação. Estes valores são superiores aos reportados por Yang e Zhai [90], que obtiveram valores de IC₅₀ próximos de 0,04 mg/mL, em extratos de milho roxo proveniente da China.

Alvarez-Jubete *et. al.* [91] compararam a atividade antioxidante de três pseudocereais, quinoa, amaranto e trigo-sarraceno, pelo método do DPPH[•]. No trabalho deste autor, o trigo-sarraceno foi o extrato com maior capacidade antioxidante, seguido da quinoa e amaranto. Estes resultados estão concordantes com as curvas de inibição obtidas no nosso trabalho e apresentadas na Figura 4.18.

Chirinos *et. al.* [92] realizaram um estudo a plantas andinas conhecidas pelo seu valor nutricional e propriedades medicinais. A quinoa e o amaranto foram duas das amostras estudadas, sendo que a quinoa apresenta uma maior atividade antioxidante pelo método do DPPH[•] do que o amaranto. Estes resultados estão de acordo com o observado pelas curvas de inibição presentes na Figura 4.18. Pasko *et. al.* [93] obtiveram resultados semelhantes com amostras de amaranto e quinoa provenientes da Polónia e Bolívia, respetivamente.

Mel

As curvas de inibição correspondentes às amostras de mel C e 2 encontram-se representadas nas Figura 4.19 e Figura 4.20. O mel 1 demonstrou ter propriedades semelhantes ao mel C portanto não houve a necessidade de se realizar uma curva de inibição para a determinação do tempo de reação ótimo.

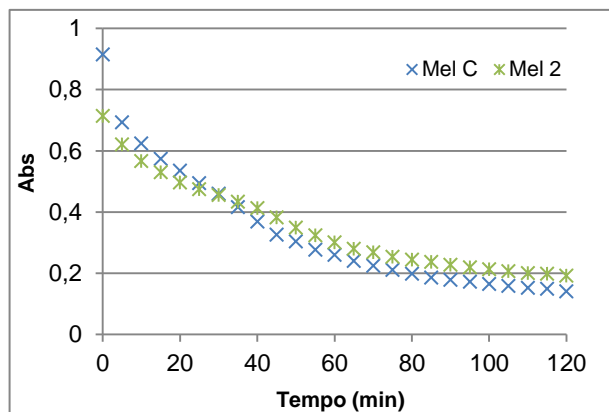


Figura 4.19 – Curva cinética da reação de DPPH* com os extratos metanólicos das amostras de mel

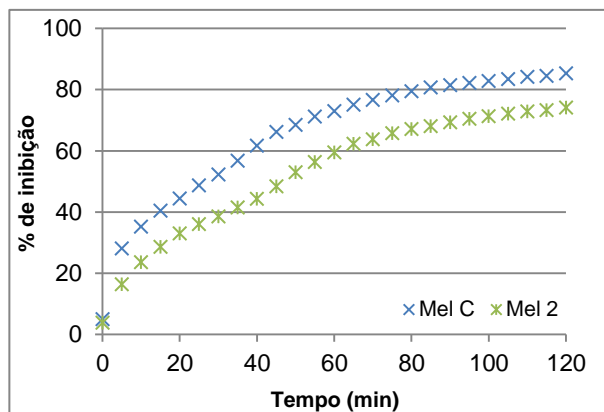


Figura 4.20 – Curva de inibição dos radicais DPPH pelos extratos metanólicos em função do tempo nas amostras de mel

Pela análise crítica comparativa das curvas apresentadas nas Figura 4.19 e Figura 4.20, verifica-se que, para uma concentração de extrato metanólico de 200 mg/mL nas amostras de mel (concentração do extrato na mistura reacional: 40 mg/mL), se atingiram inibições de aproximadamente 85 % no mel C, e 74 % no mel 2, ao fim de duas horas. Como tal, a atividade antioxidante foi analisada em soluções de extrato com diferentes concentrações, ao fim de duas horas de reação.

Na tabela seguinte, Tabela 4.28, encontram-se os resultados relativos à determinação da capacidade antioxidante pelo método do DPPH*.

Tabela 4.28 – Capacidade antioxidante nas amostras de mel determinada pelo método do DPPH*

Amostra	IC ₅₀ (mg/mL)
MC	28,10 ^a ± 0,18
M1	27,23 ^a ± 1,60
M2	48,82 ^b ± 0,77

^{a,b} Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ($p < 0,05$). Os resultados estão expressos em Médias ± Desvio padrão, $n = 3$.

Pela análise dos resultados apresentados na Tabela 4.28, verifica-se que o mel 1 e C não são significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$ pelo teste LSD), sendo os extratos com menor IC₅₀, 27,23 e 28,10 mg/mL respetivamente, o que implica que têm uma capacidade antioxidante maior que o extrato do mel 2, situação já verificada pela análise das curvas de inibição, Figura 4.20, onde, para um mesmo tempo de reação e concentração, o mel 2 obteve uma percentagem de inibição inferior à do mel C.

Como se encontra referido no subcapítulo 2.7.1.5 Mel, existe uma correlação entre a composição do mel e consequentemente as suas propriedades antioxidantes e certos elementos como a origem geográfica e botânica (diversidade da flora), fatores sazonais (condições climatéricas) e ambientais, composição do solo e o seu processamento [69–73]. Apesar de se tratar de amostras

de mel colhidas em Portugal, não se sabe exatamente a sua origem, podendo as três amostras ser de diferentes zonas do país, conseqüentemente a flora, assim como, as condições climáticas, serão diferentes.

Oca

As curvas de inibição correspondentes às amostras de oca encontram-se representadas nas Figura 4.21 e Figura 4.22.

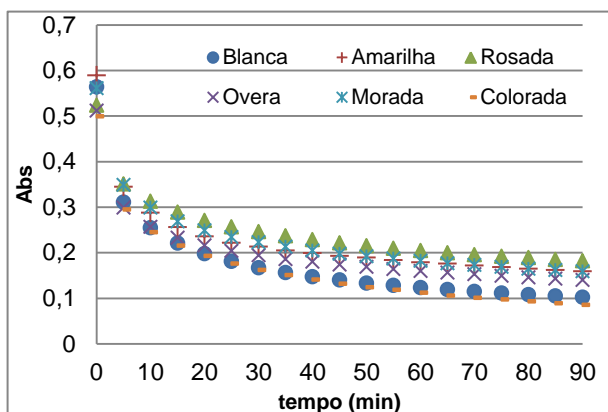


Figura 4.21 – Curva cinética da reação de DPPH* nas amostras de oca

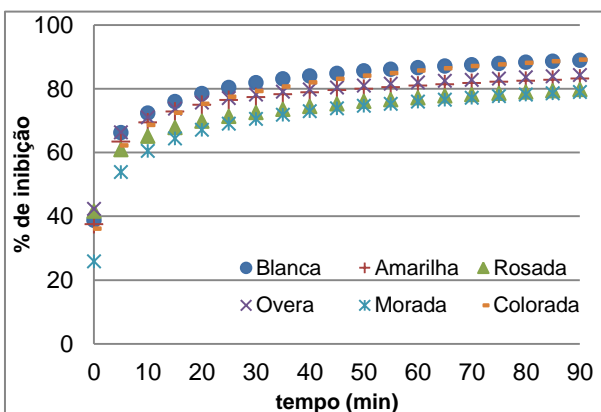


Figura 4.22 – Curva de inibição dos radicais de DPPH em função do tempo nas amostras de oca

Através das curvas acima representadas na Figura 4.21 e Figura 4.22, verifica-se que, para uma concentração de extrato de 45 mg/mL nas variedades de oca Blanca, Overa (concentração do extrato na mistura reacional: 2,7 mg/mL) Amarilha, Morada (concentração do extrato na mistura reacional: 1,8 mg/mL) Rosada (concentração do extrato na mistura reacional: 3,6 mg/mL) e Colorada (concentração do extrato na mistura reacional: 2,25 mg/mL), se atingiram inibições entre aproximadamente 79 % a 89 %, ao fim de 90 minutos. Como tal, a atividade antioxidante foi analisada em soluções de extrato com diferentes concentrações, ao fim de 90 minutos de reação.

Na Tabela 4.29, encontram-se os resultados relativos à determinação da capacidade antioxidante pelo método do DPPH*, n=1.

Tabela 4.29 – Capacidade antioxidante nas amostras de oca determinada pelo método do DPPH*

Amostra	IC ₅₀ (mg/mL)
OB	1,36
OA	1,02
OR	1,93
OO	1,38
OM	0,82
OC	1,05

Pela análise dos resultados apresentados na Tabela 4.29, pode constatar-se que a variedade Morada (OM) apresenta um IC_{50} menor (0,82 mg/mL), logo, possui uma maior capacidade antioxidante, sendo a variedade Rosada (OR) a que apresenta um IC_{50} maior (1,93 mg/mL), logo é a variedade de oca estudada que tem menor capacidade antioxidante. Como foi citado no subcapítulo 2.7.1.6 Oca, Campos *et. al.* [77], consideram a oca como uma excelente fonte de compostos bioativos, tendo concluído que a capacidade antioxidante das amostras de oca depende da variedade, sendo mais alto nas amostras de oca roxa do que nas de oca amarela. Os nossos resultados estão de acordo com o trabalho de Campos *et. al.*, uma vez que a oca morada é a variedade que apresenta uma coloração mais escura, e a rosada uma das variedades que apresenta uma coloração mais clara, atribuindo-se esta coloração à presença de antocianinas.

Determinação do teor total de compostos fenólicos

A determinação do teor total de compostos fenólicos foi realizado de modo idêntico ao descrito no subcapítulo 3.5.4 Determinação do conteúdo de fenólicos totais.

Recorreu-se à ANOVA e ao teste LSD, sempre que possível, para se verificar se existem, ou não, diferenças significativas entre as subvariedade diferentes.

Cereais e pseudocereais

A curva de calibração do ácido gálico que correlaciona a absorvância a 760 nm com a concentração das soluções padrão de ácido gálico encontra-se na Figura 4.3, presente no subcapítulo 4.1.2.3 Determinação do teor total de compostos fenólicos.

A composição em compostos fenólicos de cada amostra é apresentada na Tabela 4.30. Considerou-se valores aceitáveis entre réplicas com coeficientes de variação inferiores a 5 %.

Tabela 4.30 – Conteúdo de fenólicos totais nas amostras de milho e pseudocereais pelo método de Folin-Ciocalteu

Amostra		TPC*
Quinoa	PQ	2,68 ^a ± 0,06
	QR	2,46 ^b ± 0,12
	FQ	1,16 ^c ± 0,03
MR		5,55 ^d ± 0,22
TS		2,89 ^e ± 0,08
A		0,30 ^f ± 0,00

^{a-f} Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ($p < 0,05$). Os resultados estão expressos em Médias ± Desvio padrão, $n=3$.

* Resultados expressos em mg eq. AG/g amostra.

Os teores em compostos fenólicos variam entre 0,30 e 2,89 mg eq. AG/g amostra para as amostras de pseudocereais e 5,55 mg eq. AG/g amostra para a amostra de milho roxo, Tabela 4.30, sendo, então, o milho roxo a amostra que apresenta maior teor de fenólicos totais e o amaranto a que

contém menor teor de fenólicos totais. Nas amostras de quinoa, verifica-se que as quinooas processadas, pipoca e floco, apresentam maior e menor teor de fenólicos entre as três amostras estudadas, respetivamente. Todas as amostras apresentam diferenças significativas entre si pelo teste LSD ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos neste estudo, nas amostras de quinoa real e amaranto, são ligeiramente diferentes aos reportados por Alvarez-Jubete *et. al.* [91], tendo reportado valores inferiores aos obtidos, 0,71 e 0,21 mg eq. AG/g amostra, respetivamente. No entanto, para o trigo-sarraceno, obtiveram um valor próximo ao deste estudo, 2,23 mg eq. AG/g amostra. Estas diferenças podem ser atribuídas às diferenças geográficas, sendo que tanto como as amostras de amaranto como as de quinoa analisadas pelos investigadores são originárias da região andina. Chirinos *et. al.* [92] obtiveram valores inferiores nas amostras de quinoa, 1,3 mg eq. AG/g amostra, no entanto, o resultado reportado nas amostras de amaranto é idêntico ao deste estudo 0,3 mg eq. AG/g amostra.

Pasko *et. al.* [93] fizeram a determinação de compostos fenólicos a duas variedades diferentes de amaranto proveniente da Polónia e a uma variedade de quinoa proveniente da Bolívia, tendo obtido valores superiores aos reportados neste estudo. Nas amostras de amaranto obtiveram valores próximos de 3,0 mg eq. AG/g amostra e nas amostras de quinoa 3,75 mg eq. AG/g amostra. Carciocchi *et. al.* [94], em amostras de quinoa oriundas da Argentina obteve valores inferiores às deste estudo, 0,39 mg eq. AG/g amostra. As diferenças encontradas entre os estudos referidos e o presente trabalho podem ser atribuídas à origem geográfica das amostras.

Mel

A curva de calibração do ácido gálico que correlaciona a absorvância a 760 nm com a concentração das soluções padrão de ácido gálico encontra-se na figura abaixo, Figura 4.23.

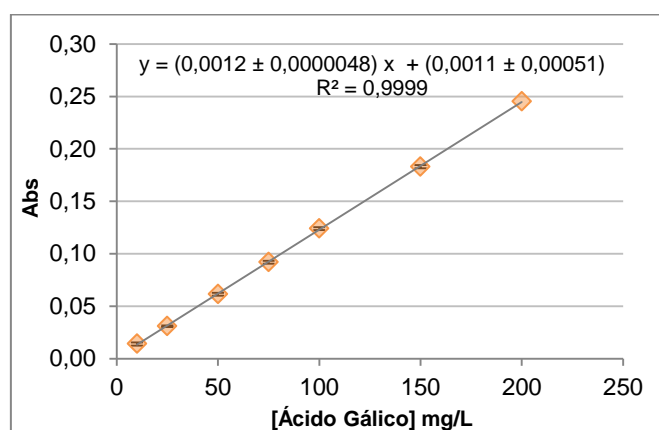


Figura 4.23 – Curva de calibração do ácido gálico para o cálculo do TPC nas amostras de mel e oca, (n=2)

A composição em compostos fenólicos de cada amostra é apresentada na Tabela 4.31 Considerou-se valores aceitáveis entre réplicas com coeficientes de variação inferiores a 10%, uma vez que foram encontradas algumas limitações na dissolução do mel em metanol. Os resultados do

TPC, nas amostras de mel, devem ser interpretados como estimativas quantitativas, uma vez que os açúcares do mel podem, também, reagir com o reagente de Folin-Ciocalteu.

Tabela 4.31 – Conteúdo de fenólicos totais nas amostras de mel pelo método de Folin-Ciocalteu

Amostra	TPC*
MC	0,64 ^a ± 0,00
M1	0,84 ^b ± 0,04
M2	0,66 ^a ± 0,02
MA	0,61 ^a ± 0,05
MB	0,26 ^c ± 0,01

^{a,b,c} Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ($p < 0,05$). Os resultados estão expressos em Médias ± Desvio padrão, $n=3$.

* Resultados expressos em mg eq. AG/g amostra.

Os teores em compostos fenólicos variam entre 0,64 e 0,84 mg eq. AG/g mel para as amostras de mel proveniente de Portugal e 0,26 e 0,61 mg eq. AG/g mel para as amostras de mel provenientes da África do Sul. Verifica-se que as amostras de mel português têm maior teor de fenólicos totais que as duas amostras provenientes da África do Sul, principalmente em comparação com o mel B que é a amostra que apresenta conteúdo fenólico mais baixo, 0,26 mg eq. AG/g mel, Tabela 4.31. As amostras de mel C, 2 e A, apesar de serem amostras distintas e oriundas de zonas diferentes, não são significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$, pelo teste LSD), sendo as restantes amostras, mel 1 e B diferentes significativamente de todas as amostras ($p > 0,05$, pelo teste LSD).

Um fator importante do TPC do mel é que amostras com coloração mais escura apresentam um TPC maior do que amostras com coloração mais clara [71].

O estudo de Kus *et. al.* [70], a seis amostras de mel monofloral provenientes da Polónia demonstrou que um dos fatores de impacto no TPC era a origem floral tendo obtido resultados entre 0,14 e 1,11 mg eq. AG/g mel, sendo que o mel proveniente da planta do trigo-sarraceno foi o que apresentou um maior conteúdo. Os resultados obtidos estão, na sua maioria, abaixo dos obtidos neste estudo, com a exceção do mel do trigo-sarraceno, que apresenta um resultado superior.

Oca

A curva de calibração do ácido gálico que correlaciona a absorvância a 760 nm com a concentração das soluções padrão de ácido gálico encontra-se na Figura 4.23.

A composição em compostos fenólicos de cada variedade de oca é apresentada na Tabela 4.32.

Tabela 4.32 – Conteúdo de fenólicos totais nas amostras de oca pelo método de Folin-Ciocalteu

Amostra	TPC*
OB	5,28
OA	7,00
OR	4,41
OO	6,07
OM	9,15
OC	6,10

* Resultados expressos em mg eq. AG/g amostra, n=1.

Nas diferentes variedades de oca, o conteúdo de fenólicos totais varia de 4,41 a 9,15 mg eq. AG/g oca, sendo que o valor mais baixo corresponde à variedade rosada e o mais alto à variedade morada.

Estes resultados são superiores aos reportados por Chirinos *et. al.* [78], que estudaram seis variedades de oca diferentes, tendo obtido resultados entre 0,41 a 1,62 mg eq. AG/g amostra, os resultados mais altos correspondem a ocas com casca mais escura e os mais baixo a ocas com casca clara.

Análise global dos resultados de DPPH[•] e TPC

Identicamente ao realizado para as amostras de arroz, representou-se graficamente a inibição de radicais DPPH em termos de IC₅₀ em função do conteúdo fenólico das amostras estudadas. Sempre que necessário, foram também efetuadas correlações lineares, utilizando o coeficiente de correlação linear de Spearman (ρ), para uma análise mais precisa.

Cereais e pseudocereais

Como apenas foi possível calcular o IC₅₀ das amostras de milho roxo e trigo-sarraceno, só foi possível fazer a correlação entre os dois testes para essas duas amostras. A relação entre estes dois testes encontra-se representada na Figura 4.24. Para se conseguir fazer uma comparação correta entre os resultados do DPPH[•] e TPC, este último terá que ser expresso em mg eq. AG/g extrato, uma vez que o DPPH[•], neste caso, também se encontra expresso em mg de extrato por mL de mistura reacional.

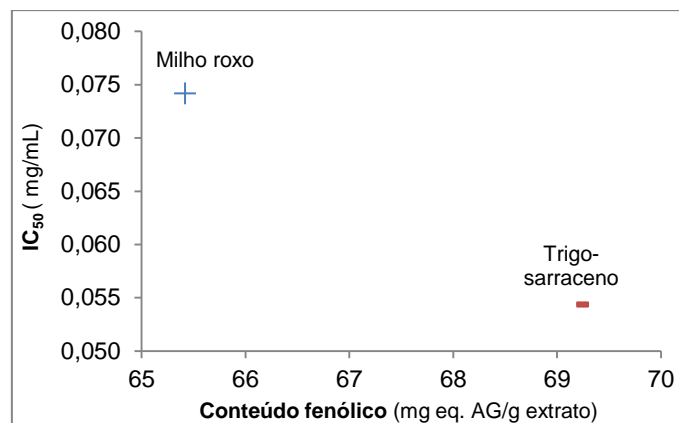


Figura 4.24 – Relação entre TPC e atividade antioxidante nas amostras de milho roxo e trigo-sarraceno

Pela análise da Figura 4.24, é visível uma relação fortemente negativa entre os testes de DPPH' e TPC. Este resultado era esperado, uma vez que a um maior conteúdo fenólico está normalmente associado um maior poder antioxidante. Neste presente caso, não há necessidade de se recorrer ao coeficiente de correlação linear de Spearman uma vez que a análise da figura é suficiente.

Mel

Uma vez que não se realizou a determinação de fenólicos totais nas amostras de mel provenientes da África do Sul, a correlação apenas será feita às variedades de mel provenientes de Portugal, mel 1, 2 e C.

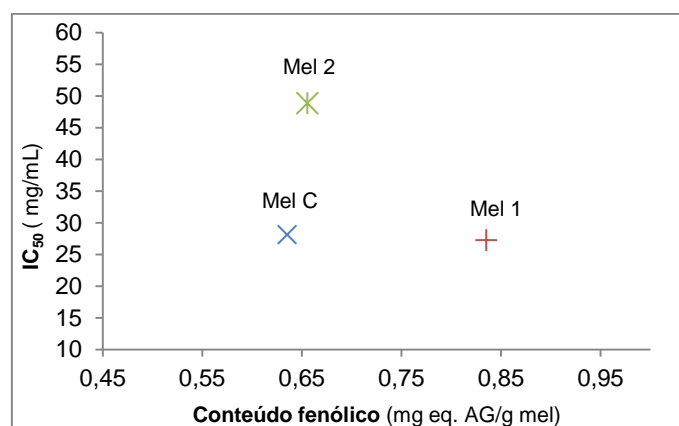


Figura 4.25 – Relação entre TPC e atividade antioxidante nas amostras de mel português

Pela análise da Figura 4.25, não é visível uma relação entre o teor total de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante. Para uma análise mais correta, foram efetuadas correlações lineares, utilizando o coeficiente de correlação linear de Spearman (ρ), Tabela 4.33. É de notar que, uma vez que a capacidade antioxidante é tanto maior quanto menor for o valor de IC₅₀, caso haja alguma relação, espera-se uma correlação negativa entre o IC₅₀ e o conteúdo de fenólicos totais.

Tabela 4.33 – Coeficiente de Spearman (ρ) para as correlações entre as determinações de DPPH' e TPC nas diferentes variedades de mel português

	DPPH' Mel C ^a	DPPH' Mel 1 ^a	DPPH' Mel 2 ^a
TPC Mel C ^b	-0,500		
TPC Mel 1 ^b		-0,500	
TPC Mel 2 ^b			-0,500

^a IC₅₀ (mg/mL); ^b mg eq. AG/g de amostra.

Pelo coeficiente de Spearman Tabela 4.33, confirma-se o pressuposto anterior, não se verificando nenhuma correlação entre os testes do DPPH' e do TPC nas amostras de mel.

Oca

A representação gráfica da inibição de radicais DPPH, em termos de IC₅₀, em função do conteúdo fenólico das médias das três subvariedades está representada na Figura 4.26.

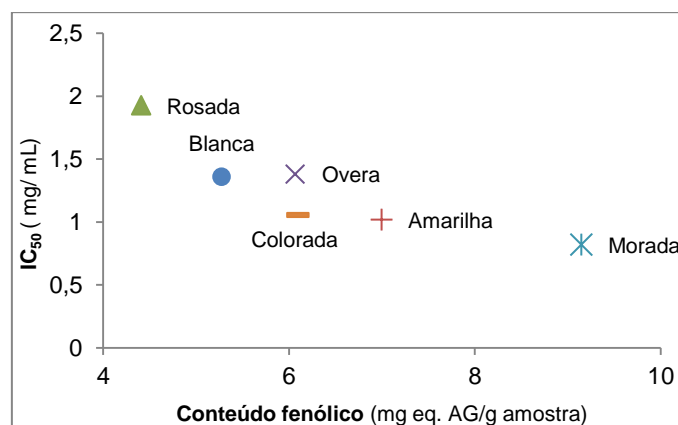


Figura 4.26 – Relação entre TPC e atividade antioxidante nas amostras de oca

Pela análise da Figura 4.26, observa-se uma relação entre os testes, com exceção nas variedades Overa e Blanca. Para uma análise mais eficiente, recorreu-se então ao coeficiente de Spearman, Tabela 4.34.

Tabela 4.34 – Coeficiente de Spearman (ρ) para as correlações entre as determinações de DPPH' e TPC nas diferentes variedades de oca

	DPPH' ^a
TPC ^b	-0,943**

**Correlação fortemente significativa para $p < 0,01$.

^a IC₅₀ (mg/mL); ^b mg eq. AG/g de amostra.

Pela análise do coeficiente de Spearman, verifica-se uma correlação fortemente negativa entre o TPC e o DPPH' nas amostras de oca independentemente da variedade ($\rho = -0,943$), pelo que se verifica então uma relação entre os testes de TPC e DPPH':

4.2.2.3. Identificação e caracterização dos compostos bioativos

O método de identificação e caracterização de compostos bioativos por UPLC-PDA nas amostras de oca foi o mesmo que foi desenvolvido para as amostras de arroz analisadas neste trabalho.

As figuras de mérito do método analítico utilizado para a determinação dos antioxidantes, estão apresentadas na Tabela 4.20, presente no subcapítulo: Aplicação do método desenvolvido do capítulo 4.1.2.5. Identificação e quantificação de compostos bioativos por UPLC-PDA. Os cromatogramas dos compostos que se pretenderam identificar encontram-se representados nas Figura 4.13, Figura 4.14 Figura 4.15.

Tabela 4.35 – Compostos antioxidantes identificados nas amostras de oca

Compostos/Amostra	OB	OA	OR	OO	OM	OC
Ácido gálico (g/g de amostra)	< LQ	< LQ	< LQ	$2,38 \times 10^{-6}$	$7,13 \times 10^{-8}$	< LQ
Ácido levulínico (g/g de amostra)	ND	$4,70 \times 10^{-5}$	ND	ND	$3,35 \times 10^{-5}$	$5,20 \times 10^{-5}$
Ácido gentísico (g/g de amostra)	< LQ	< LQ	ND	ND	< LQ	ND
Ácido clorogénico (g/g de amostra)	< LQ	$1,73 \times 10^{-7}$	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cafeína (g/g de amostra)	ND	ND	< LQ	$1,15 \times 10^{-6}$	ND	ND
Ácido cafeico (g/g de amostra)	$5,14 \times 10^{-6}$	$1,15 \times 10^{-5}$	< LQ	< LQ	$3,95 \times 10^{-6}$	$4,80 \times 10^{-6}$
Ácido elágico (g/g de amostra)	$9,05 \times 10^{-6}$	$1,30 \times 10^{-5}$	$1,78 \times 10^{-5}$	ND	$3,31 \times 10^{-5}$	$1,14 \times 10^{-5}$
Ácido ferúlico (g/g de amostra)	< LQ	< LQ	ND	< LQ	< LQ	< LQ
Ácido sinápico (g/g de amostra)	ND	ND	ND	< LQ	< LQ	ND
Ácido isoferúlico (g/g de amostra)	ND	ND	< LQ	ND	ND	ND
Ácido salicílico (g/g de amostra)	ND	ND	$8,95 \times 10^{-7}$	ND	ND	ND
Ácido m-cumárico (g/g de amostra)	ND	ND	< LQ	ND	ND	ND
Naringin (g/g de amostra)	ND	ND	$8,27 \times 10^{-7}$	ND	ND	ND

ND – não detetado; < LQ – abaixo do limite de quantificação

Identificam-se, no total das amostras de oca, treze compostos antioxidantes, de onde se destacam o ácido gálico ($7,13 \times 10^{-8}$ e $2,38 \times 10^{-6}$ g/g de amostra), o clorogénico ($1,37 \times 10^{-7}$ g/g de amostra) e o cafeico ($3,95 \times 10^{-6}$ - $1,15 \times 10^{-5}$ g/g de amostra) que são detetados em todas as variedades, apesar de, em algumas, a sua quantificação não ter sido possível por estarem abaixo do limite de quantificação. Como se pode verificar pela Tabela 4.35, o ácido ferúlico também é identificado na maioria das amostras, no entanto, a sua quantificação também não é possível. Nestes casos, aumentar a concentração do extrato não seria uma solução pois os picos do cromatograma

deixariam de ter o *lay-out* desejado. No entanto, poder-se-ia tentar diminuir a concentração mais baixa utilizada para a realização das curvas de calibração dos padrões em questão.

Os ácidos isoferúlico, salicílico, m-cumárico e naringin apenas são detetados na variedade de oca rosada, sendo esta amostra a que teve um maior número de compostos identificados (nove), no entanto, a maioria destes compostos ficaram abaixo do limite de quantificação, tendo sido apenas quantificados três dos nove compostos detetados.

Comparando os resultados obtidos por UPLC com o teste do TPC (Tabela 4.32), verifica-se que apesar de a variedade rosada ter o TPC mais baixo, contém uma concentração de compostos identificados mais alta do que as variedades blanca e overa. Através destes dois resultados, pode concluir-se que alguns dos compostos antioxidantes não foram quantificados porque se encontram abaixo do limite de quantificação ou por não corresponderem aos padrões analíticos que foram usados. Pela mesma razão, a variedade morada deveria ter tido mais compostos antioxidantes quantificados que a amarela.

5. Conclusões e Proposta para trabalho futuro

O principal objetivo deste trabalho consistiu, como já foi anteriormente referido, no estudo do valor nutricional e antioxidante de três frações do bago de arroz (grão, farelo e casca) de três subvariedades diferentes (ariete, opale e ellebi). Para além disso, existiu o propósito de se fazer uma valorização de duas das frações, farelo e casca, oriundas do processo de transformação a que o arroz é sujeito.

Através da avaliação do perfil de macronutrientes concluiu-se que, independentemente da variedade, as determinações realizadas (teor de humidade, cinza, proteína e gordura) variam de forma independente, não dependendo linearmente uma das outras. Concluiu-se ainda que a casca foi a fração que apresentou um maior conteúdo mineral (15,93 g/100g de amostra), o que poderá levar a um interesse por parte de muitas indústrias. O farelo apresentou um maior teor de gordura e proteína, sendo o grão de arroz a fração que teve um menor valor nutricional. Relativamente às variedades, nenhuma se destacou globalmente. No entanto, a nível do grão, a subvariedade opale apresentou ligeiramente maiores teores de cinza, proteína e gordura.

Verificou-se que não existiam grandes diferenças no rendimento de extração entre as distintas variedades de arroz. Contudo, entre as diferentes frações do bago, obtiveram-se grandes diferenças, o que é explicado pelas diferenças também encontradas no conteúdo de gordura. Para além disso, uma vez que se tratou de uma extração de compostos bioativos, é natural que o farelo e a casca sejam as frações com maior quantidade, uma vez que são as camadas externas que têm como um dos objetivos proteger o grão. O rendimento de extração nas amostras de grão foi extremamente baixo (inferior a 2 %) pelo que, no futuro, se poderá tentar otimizar a extração neste tipo de amostras, recorrendo a outros solventes e métodos.

Os resultados dos testes de DPPH^{*} e TPC mostraram que o extrato da casca foi o que possuiu uma maior capacidade antioxidante (0,12 a 0,14 mg/mL) e conteúdo de fenólicos totais (77,83 a 82,75 mg eq. AG/g extrato), seguido do farelo (0,22 a 0,24 mg/mL, 20,02 a 21,98 mg eq. AG/g extrato) e por fim do grão (0,34 a 0,47 mg/mL, 8,16 a 12,89 mg eq. AG/g extrato). Estes resultados são extremamente importantes para as frações resultantes do processamento do arroz, uma vez que são fatores positivos na procura da valorização destes subprodutos. Verificou-se, também, pelo teste de Spearman, que os resultados obtidos nas amostras de grão e farelo ($\rho=-0,957$ e $-0,815$, $p<0,01$ respetivamente) estão de acordo com o princípio de que um maior conteúdo fenólico está associado um maior poder antioxidante. A diferença entre os resultados obtidos neste trabalho e os de outros autores pode ser parcialmente explicada pela diferença de solventes e métodos de extração usados. É também importante mencionar que a quantidade de compostos fenólicos nas sementes é fortemente influenciada pelo genótipo (variedade/cultivar), solo, condições ambientais, nível de maturidade na colheita e condições de armazenagem.

Foi desenvolvido um método de identificação de compostos bioativos por UPLC-PDA. Conseguiram detetar-se 26 dos 34 padrões adquiridos. Os picos apresentavam o *lay-out* pretendido, embora alguns dos compostos apresentassem tempos de retenção muito próximos ou mesmo

sobrepostos. Uma possível solução que poderá ser aplicada no futuro será alterar o pH, por exemplo através da quantidade de acetonitrilo usada como solvente, e, ou, alteração da temperatura da coluna.

Apesar dessas limitações, foi feita a identificação desses compostos nos extratos. Dos 26 padrões identificaram-se 10 nos extratos de casca, 7 no farelo e 3 no grão. Esta ordem faz sentido, uma vez que é nas camadas mais externas dos grãos como a casca e farelo, que se encontram os compostos com maior capacidade antioxidante.

O ácido ferúlico, apesar de estar abaixo do limite de quantificação, foi detetado em todas as frações de todas as variedades. O ácido siríngico, também abaixo do limite de quantificação, apenas foi detetado na subvariedade ellebi nas frações do grão e farelo. O ácido protocatecuico foi identificado nas três subvariedades do grão ($1,30 \times 10^{-5}$ g/100g de amostra, na amostra 25). Os ácidos levulínico, vanílico e elágico foram identificados nas amostras de casca e farelo, sendo que nas variedades de casca foi possível fazer a sua quantificação.

Para além dos compostos referidos, no farelo ainda se conseguiu identificar o ácido hidroxibenzoico nas três subvariedades, sendo que a sua quantificação apenas foi realizada na amostra 27 e o naringin quantificado nas amostras 27 e 29, não tendo sido detetado na amostra 28. Na casca, foi possível, ainda, quantificar, em todas as amostras, os ácidos gentísico, p-cumárico, e isoferúlico. Foram também detetados, em todas as amostras, os ácidos o-cumárico e sinápico. O β -tocoferol foi apenas detetado e quantificado nas duas amostras de arroz carolino.

Verificou-se, também, que nas amostras de arroz carolino (subvariedades ariete e opale) foram sempre identificados os mesmos compostos, com a exceção do ácido elágico na amostra do farelo, que apenas foi identificado na subvariedade ariete.

Apesar do método ainda precisar de ser um pouco mais desenvolvido e otimizado para colmatar algumas das limitações encontradas, foi um avanço importante na determinação e identificação de compostos antioxidantes em amostras de arroz português.

Relativamente às outras espécies analisadas, elas surgiram como um complemento a este trabalho. Verificou-se que, relativamente à determinação de macronutriente, a quinoa processada, nomeadamente a pipoca quinoa, apresentou um valor nutricional mais baixo. De entre as extrações realizadas, as duas amostras de quinoa, quinoa e quinoa real destacaram-se, tendo-se obtido rendimentos de extração de 14,35 % e 12,13 % respetivamente; por outro lado, o trigo-sarraceno foi a amostra que apresentou o menor rendimento 4,18%.

Nos testes de DPPH^{*} e TPC, verificou-se uma relação entre os dois testes nas amostras de cereais/ pseudocereais e oca; no entanto, tal relação não foi verificada nas amostras de mel.

A análise das curvas de inibição do radical de DPPH^{*} revelou que o trigo-sarraceno foi a espécie que apresentou uma maior capacidade antioxidante e que o amaranto a que possuía a menor. Nas três amostras de mel sujeitas ao teste do DPPH^{*}, o mel 2 apresentou uma capacidade antioxidante muito inferior (48,82 mg/mL) ao mel 1 e C (27,23 e 28,10 mg/mL, respetivamente). Nas diferentes variedades de oca obtiveram-se resultados compreendidos entre 0,82 e 1,93 mg eq. AG/g amostra, sendo a variedade morada a que apresentou um menor IC₅₀, logo uma maior capacidade

antioxidante, e a variedade rosada um maior IC_{50} . No que diz respeito ao teste do TPC, observou-se que o milho roxo, de entre as amostras de cereais e pseudocereais, foi a que conteve um maior teor de fenólicos totais (5,55 mg eq. AG/g amostra), e o amaranto menor conteúdo (0,30 mg eq. AG/g amostra). Nas amostras de oca, o conteúdo de fenólicos totais foi superior na morada (9,15 mg eq. AG.g amostra) e inferior na rosada (4,41 mg eq. AG/g amostra).

Foi também realizada a identificação e quantificação de compostos bioativos por UPLC-PDA nas amostras de Oca. O método utilizado foi o que foi desenvolvido para as amostras de arroz. Foram identificados treze compostos antioxidantes nas amostras de oca, de onde se destacam os ácidos gálico, o clorogénico e o cafeico que foram detetados em todas as variedades. Os ácidos isoferúlico, salicílico, m-cumárico e naringin apenas foram detetados na variedade de oca rosada, sendo esta amostra a que teve um maior número de compostos identificados (nove) mas, no entanto, a maioria destes compostos (seis) ficaram abaixo do limite de quantificação, não tendo esta sido possível.

Em suma, foi possível fazer uma avaliação com sucesso da atividade antioxidante das amostras de arroz português, e das restantes amostra, em especial das amostras de oca. Este trabalho deu origem a apresentações em formato de poster em três congressos internacionais: IMEKO (2013), 27^o international Conference on polyphenols (2014) e EFFoST (2014); e quatro em congressos nacionais: um para o PORTFIR 2013 e três para o 12^o encontro da química dos alimentos 2014, e uma apresentação oral num congresso internacional IMEKOFOODS (2014).

5.1. Propostas para trabalho futuro

Uma vez que as amostras de arroz português, em especial o farelo e a casca, não se encontram muito estudadas, sendo escassa a informação referida na literatura, seria do interesse das indústrias de transformação de arroz e da comunidade científica que se continue a fazer um estudo mais aprofundado da atividade antioxidante das amostras em questão.

Sugere-se assim, para trabalho futuro, fazer uma otimização do método de extração, estudar e aplicar novos métodos, como a extração por fluido supercrítico que, atualmente, já é aplicada em amostras alimentares. Neste tipo de método, os solventes mais usados são o dióxido de carbono e a água, sendo a água o mais apropriado dado à sua natureza polar. Contudo, este tipo de extração é realizada a temperaturas muito superiores a 100 °C [95], o que poderá dar origem à degradação dos compostos fenólicos.

Uma vez que o tempo de extração e a temperatura influenciam quer o rendimento quer, posteriormente, os resultados obtidos pelos testes de avaliação da atividade antioxidante, seria importante estudar a influência destas variáveis nas características dos extratos. Poder-se-ia ainda avaliar as alterações do extrato ao longo do tempo, em diferentes condições de armazenamento.

Seria também recomendável estender as análises realizadas a outros parâmetros de determinação da atividade antioxidante, como, por exemplo, a avaliação dos teores dos flavonoides,

carotenoides e antocianinas; e fazer uma análise do potencial dos resíduos provenientes do processamento do arroz, em especial a casca, como fonte de compostos biocidas.

Dado que se verificou que, pelo método desenvolvido para determinação e quantificação dos compostos bioativos por UPLC-PDA, existiam tempos de retenção muito próximos que não se conseguiram detetar alguns dos padrões e que nas amostras estudadas muitos dos compostos ficaram abaixo do limite de quantificação, seria importante continuar a desenvolver o método de modo a se ultrapassarem as limitações encontradas.

6. Referências Bibliográficas

- [1] FAOSTAT, "Food and Agriculture Organization of the United Nations-Statistics Division." [Online]. Disponível em: http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/*E. [Acedido: 18-12-2013].
- [2] K. R. Bhattacharya, *Rice quality: A guide to rice properties and analysis*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited Series in Food Science, Technology and Nutrition, (2011).
- [3] J. L. Maclean, D. C. Dawe, B. Hardy, and G. P. Hettel, *Rice almanac: source book for the most important economic activity on earth*, 3rd ed. Wallingford: CABI Publishing, (2002).
- [4] I. N. de Estatística, Ed., "Estatísticas Agrícolas 2012", Lisboa, (2013).
- [5] A. Salanti, L. Zoia, M. Orlandi, F. Zanini, and G. Elegir, "Structural Characterization and Antioxidant Activity Evaluation of Lignins from Rice Husk", *J. Agric. Food Chem.*, (2010), **58**, 10049–10055.
- [6] M. Walter, E. Marchezan, and L. A. De Avila, "Arroz: composição e características nutricionais", *Ciência Rural*, (2008), **38**, 1184–1192.
- [7] M. K. Sharif, M. S. Butt, F. M. Anjum, and S. H. Khan, "Rice bran: a novel functional ingredient", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, (2014), **54**, 807–16.
- [8] O. Juliano, "Rice in human nutrition - Contents," *FAO Corporate Document Repository*, (1993). [Online]. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/t0567e/T0567E00.htm#Contents>. [Acedido: 22-04-2014].
- [9] S. Gomes, "Transformação - ARROZ." [Online]. Disponível em: <http://nossoarroz.weebly.com/transformaccedilatildeo.html>. [Acedido: 08-04-2014].
- [10] "European Commission: Arroz." [Online]. Disponível em: http://exporthelp.europa.eu/thdapp/display.htm?page=re/re_Arroz.html&docType=main&languageId=pt. [Acedido: 20-04-2014].
- [11] C. Fabian and Y.-H. Ju, "A review on rice bran protein: its properties and extraction methods", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, (2011), **51**, 816–827.
- [12] B. S. N. Rao, "Nutritive Value Of Rice Bran", (1999).
- [13] V. Cruz, "Bromatologia Aplicada À Produção Animal", Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho.
- [14] S. V. Palombini, T. Claus, S. A. Maruyama, A. K. Gohara, A. Henrique, P. Souza, N. E. De Souza, J. V. Visentainer, S. Terezinha, M. Gomes, and M. Matsushita, "Evaluation of nutritional compounds in new amaranth and quinoa cultivars", *Food Sci. Technol.*, (2013), **33**, 339–344.
- [15] A. Vega-Gálvez, M. Miranda, J. Vergara, E. Uribe, L. Puente, and E. A. Martínez, "Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.), an ancient Andean grain: a review", *J. Sci. Food Agric.*, (2010), **90**, 2541–2547.
- [16] S. J. S. Flora, "Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure", *Oxid. Med. Cell. Longev.*, (2009), **2**, 191–206.
- [17] J.-K. Moon and T. Shibamoto, "Antioxidant assays for plant and food components", *J. Agric. Food Chem.*, (2009), **57**, 1655–1666.
- [18] A. Scalbert and G. Williamson, "Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols", *J. Nutr.*, (2000), **130**, 2073–2085.
- [19] G. M. Williams, C. L. Williams, and J. H. Weisburger, "Diet and cancer prevention: the fiber first diet", *Toxicol. Sci.*, (1999), **52**, 72–86.
- [20] G. M. Forster, K. Raina, A. Kumar, S. Kumar, R. Agarwal, M.-H. Chen, J. E. Bauer, A. M. McClung, and E. P. Ryan, "Rice varietal differences in bioactive bran components for inhibition of colorectal cancer cell growth", *Food Chem.*, (2013), **141**, 1545–1552.
- [21] R. H. Liu, "Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action", *J. Nutr.*, (2004), **134**, 3479–3485.
- [22] M. Naczek and F. Shahidi, "Extraction and analysis of phenolics in food", *J. Chromatogr. A*, (2004), **1054**, 95–111.

- [23] M. W. Zhang, R. F. Zhang, F. X. Zhang, and R. H. Liu, "Phenolic profiles and antioxidant activity of black rice bran of different commercially available varieties", *J. Agric. Food Chem.*, (2010), **58**, 7580–7587.
- [24] E. M. N. Rasteiro, "Avaliação das propriedades antioxidantes e antimutagénicas de diferentes cultivares de *Vaccinium* spp., do grupo 'Southern Highbush', produzidas em Portugal", Dissertação para obtenção de Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar, Faculdade de Ciência e Tecnologias - Universidade Nova de Lisboa, (2012).
- [25] Z. Spáčil, L. Nováková, and P. Solich, "Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography", *Talanta*, (2008), **76**, 189–199.
- [26] R. J. Robbins, "Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology", *J. Agric. Food Chem.*, (2003), **51**, 2866–2887.
- [27] S. Tian, K. Nakamura, T. Cui, and H. Kayahara, "High-performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in rice", *J. Chromatogr. A*, (2005), **1063**, 121–128.
- [28] A. Khoddami, M. A. Wilkes, and T. H. Roberts, "Techniques for analysis of plant phenolic compounds", *Molecules*, (2013), **18**, 2328–2375.
- [29] J. Azmira, I. S. M. Zaidul, M. M. Rahmana, K. M. Sharif, A. Mohameda, F. Sahena, M. H. A. Jahurul, K. Ghafoor, N. A. N. Norulaini, and A. K. M. Omar, "Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review", *J. Food Eng.*, (2013), **117**, 426–436.
- [30] M. N. Irakli, V. F. Samanidou, C. G. Biliaderis, and I. N. Papadoyannis, "Development and validation of an HPLC-method for determination of free and bound phenolic acids in cereals after solid-phase extraction", *Food Chem.*, (2012), **134**, 1624–1632.
- [31] F. Arab, I. Alemzadeh, and V. Maghsoudi, "Determination of antioxidant component and activity of rice bran extract", *Sci. Iran.*, (2011), **18**, 1402–1406.
- [32] H. H. Chen and T. H. Chiu, "Phytochemicals characterization of solvent extracts from taro-scented japonica rice bran", *J. Food Sci.*, (2011), **76**, 656–662.
- [33] P. Lai, K. Y. Li, S. Lu, and H. H. Chen, "Phytochemicals and antioxidant properties of solvent extracts from Japonica rice bran", *Food Chem.*, (2009), **117**, 538–544.
- [34] C. Chotimarkorn, S. Benjakul, and N. Silalai, "Antioxidant components and properties of five long-grained rice bran extracts from commercial available cultivars in Thailand", *Food Chem.*, (2008), **111**, 636–641.
- [35] Y. Choi, H.-S. Jeong, and J. Lee, "Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea", *Food Chem.*, (2007), **103**, 130–138.
- [36] J. Vichapong, M. Sookserm, V. Srijesdaruk, P. Swatsitang, and S. Srijaranai, "High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant activities in rice varieties", *LWT - Food Sci. Technol.*, (2010), **43**, 1325–1330.
- [37] H.-I. Jun, G.-S. Song, E.-I. Yang, Y. Youn, and Y.-S. Kim, "Antioxidant activities and phenolic compounds of pigmented rice bran extracts", *J. Food Sci.*, (2012), **77**, 759–764.
- [38] S.-H. Huang and L.-T. Ng, "Quantification of polyphenolic content and bioactive constituents of some commercial rice varieties in Taiwan", *J. Food Compos. Anal.*, (2012), **26**, 122–127.
- [39] P.-Y. Lin and H.-M. Lai, "Bioactive compounds in rice during grain development", *Food Chem.*, (2011), **127**, 86–93.
- [40] S. Butsat, N. Weerapreeyakul, and S. Siriamornpun, "Changes in Phenolic Acids and Antioxidant Activity in Thai Rice Husk at Five Growth Stages during Grain Development", *J. Agric. Food Chem.*, (2009), **57**, 4566–4571.
- [41] Y. Qiu, Q. Liu, and T. Beta, "Antioxidant properties of commercial wild rice and analysis of soluble and insoluble phenolic acids", *Food Chem.*, (2010), **121**, 140–147.
- [42] S. Iqbal, M. I. Bhangar, and F. Anwar, "Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan", *Food Chem.*, (2005), **93**, 265–272.
- [43] S. Butsat and S. Siriamornpun, "Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice", *Food Chem.*, (2010), **119**, 606–613.
- [44] M. Herrero, M. Castro-Puyana, J. a. Mendiola, and E. Ibañez, "Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds", *TrAC Trends Anal. Chem.*, (2013), **43**, 67–83.

- [45] G. Marinova and V. Batchvarov, "Evaluation on the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH", *Bulg. J. Agric. Sci.*, (2011), **17**, 11–24.
- [46] O. P. Sharma and T. K. Bhat, "DPPH antioxidant assay revisited", *Food Chem.*, (2009), **113**, 1202–1205.
- [47] R. L. Prior, X. Wu, and K. Schaich, "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements", *J. Agric. Food Chem.*, (2005), **53**, 4290–4302.
- [48] K. Mishra, H. Ojha, and N. K. Chaudhury, "Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results", *Food Chem.*, (2012), **130**, 1036–1043.
- [49] V. Bondet, W. Brand-Williams, and C. Berset, "Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH • Free Radical Method", *LWT - Food Sci. Technol.*, (1997), **30**, 609–615.
- [50] A. Karadag, B. Ozcelik, and S. Saner, "Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities", *Food Anal. Methods*, (2009), **2**, 41–60.
- [51] D. Huang, B. Ou, and R. L. Prior, "The chemistry behind antioxidant capacity assays", *J. Agric. Food Chem.*, (2005), **53**, 1841–1856.
- [52] R. Apak, K. Güçlü, B. Demirata, M. Ozyürek, S. E. Celik, B. Bektaşoğlu, K. I. Berker, and D. Ozyurt, "Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay", *Molecules*, (2007), **12**, 1496–1547.
- [53] B. Srivastava, B. K. Sharma, U. S. Baghel, and N. Sethi, "Ultra performance liquid chromatography (UPLC): A chromatography technique", *Int. J. Pharm. Qual. Assur.*, (2010), **2**, 19–25.
- [54] M. E. Swartz, "Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction", *Sep. Sci. Redefined*, (2005), 8–14.
- [55] R. P. W. Scott, "Liquid Chromatography", in *Chrom-Ed Book Series*, (2003), pp. 1–104.
- [56] V. R. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 5th ed. St. Gallen: Wiley, (2010).
- [57] A. R. Carvalho, "Monitorização de Desreguladores Endócrinos em águas de rede e águas residuais por SPE-UPLC-ESI-MS / MS", Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, (2012).
- [58] R. P. W. Scott, "Liquid Chromatography Detectors", in *Chrom-Ed Book Series*, (2003), pp. 1–104.
- [59] FAO, "2013 International Year of Quinoa", (2013). [Online]. Disponível em: <http://www.fao.org/quinoa-2013/en/>. [Acedido: 22-05-2014].
- [60] J. E. H. Bermejo and J. León, "Quinoa", *FAO Corporate Document Repository*, 1994. [Online]. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/t0646e/T0646E0f.htm#Quinoa> (Chenopodium quince). [Acedido: 11-06-2014].
- [61] M. J. Koziol, "Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (Chenopodium quinoa Willd)", *J. Food Compos. Anal.*, (1992), **5**, 35–68.
- [62] Centro Regional de Informação das Nações Unidas (UNRIC), "Ano Internacional da Quinoa: para conhecer melhor um velho cereal." [Online]. Disponível em: <http://www.unric.org/pt/actualidade/31040-ano-internacional-da-quinoa-para-conhecer-melhor-um-velho-cereal>. [Acedido: 27-03-2014]
- [63] O. A. López-Mejía, A. López-Malo, and E. Palou, "Antioxidant capacity of extracts from amaranth (Amaranthus hypochondriacus L.) seeds or leaves", *Ind. Crops Prod.*, (2014), **53**, 55–59.
- [64] A. C. Nascimento, C. Mota, I. Coelho, S. Gueifão, M. Santos, A. S. Matos, A. Gimenez, M. Lobo, N. Samman, and I. Castanheira, "Characterisation of nutrient profile of quinoa (Chenopodium quinoa), amaranth (Amaranthus caudatus), and purple corn (Zea mays L.) consumed in the North of Argentina: proximates, minerals and trace elements", *Food Chem.*, (2014), **148**, 420–426.
- [65] E. S. Oplinger, E. A. Oelke, M. A. Brinkman, and K. A. Kelling, "Buckwheat." [Online]. Disponível em: <https://www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/buckwheat.html>. [Acedido: 09-07-2014].
- [66] S. Edwardson, "Buckwheat: Pseudocereal and Nutraceutical", (1996). [Online]. Disponível em: <https://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1996/V3-195.html>. [Acedido: 09-07-2014].
- [67] E. Cuevas Montilla, S. Hillebrand, A. Antezana, and P. Winterhalter, "Soluble and bound phenolic compounds in different Bolivian purple corn (Zea mays L.) cultivars", *J. Agric. Food Chem.*, (2011), **59**, 7068–7074.

- [68] O. Escuredo, M. Míguez, M. Fernández-González, and M. Carmen Seijo, "Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area", *Food Chem.*, (2013), **138**, 851–856.
- [69] T. M. S. Silva, F. P. dos Santos, A. Evangelista-Rodrigues, E. M. S. da Silva, G. S. da Silva, J. S. de Novais, F. D. A. R. dos Santos, and C. A. Camara, "Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey", *J. Food Compos. Anal.*, (2013), **29**, 10–18.
- [70] P. M. Kuś, F. Congiu, D. Teper, Z. Sroka, I. Jerković, and C. I. Tuberoso, "Antioxidant activity, color characteristics, total phenol content and general HPLC fingerprints of six Polish unifloral honey types", *LWT - Food Sci. Technol.*, (2014), **55**, 124–130.
- [71] A. Alves, A. Ramos, M. M. Gonçalves, M. Bernardo, and B. Mendes, "Antioxidant activity, quality parameters and mineral content of Portuguese monofloral honeys", *J. Food Compos. Anal.*, (2013), **30**, 130–138.
- [72] M. I. Khalil and S. A. Sulaiman, "The potencial role of honey and its polyphenol in preventing heart diseases: A review", *Afr J Tradit Complement Altern Med.*, (2010), **7**, 315–321.
- [73] S. Z. Hussein, K. M. Yusoff, S. Makpol, and Y. A. M. Yusof, "Antioxidant Capacities and Total Phenolic Contents Increase with Gamma Irradiation in Two Types of Malaysian Honey", *Molecules*, (2011), **16**, 6378–6395.
- [74] J. E. H. Bermejo and J. León, "Oca (*Oxalis tuberosa*)", *FAO Corporate Document Repository*, (1994). [Online]. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/t0646e/T0646E0g.htm#Oca> (*Oxalis tuberosa*). [Acedido: 17-06-2014].
- [75] C. Alcalde-Eon, G. Saavedra, S. De Pascual-Teresa, and C. Rivas-Gonzalo, "Liquid chromatography – mass spectrometry identification of anthocyanins of isla oca (*Oxalis tuberosa*, Mol.) tubers", *J. Chromatogr. A*, (2004), **1054**, 211–215.
- [76] B. Condori, P. Mamani, R. Botello, F. Patiño, A. Devaux, and J. F. Ledent, "Agrophysiological characterisation and parametrisation of Andean tubers: Potato (*Solanum* sp.), oca (*Oxalis tuberosa*), isaño (*Tropaeolum tuberosum*) and papalisa (*Ullucus tuberosus*)", *Eur. J. Agron.*, (2008), **28**, 526–540.
- [77] D. Campos, G. Noratto, R. Chirinos, C. Arbizu, W. Roca, and L. Cisneros-Zevallos, "Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of Andean tuber crops : native potato (*Solanum* sp.), mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav on), Oca (*Oxalis tuberosa* Molina) and ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas)", *J. Sci. Food Agric.*, (2006), **86**, 1481–1488.
- [78] R. Chirinos, I. Betalleguz-pallardel, A. Huamán, C. Arbizu, R. Pedreschi, and D. Campos, "HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity", *Food Chem.*, (2009), **113**, 1243–1251.
- [79] V. L. Singleton, R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventós, "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-cioclateu reagent", *Methods Enzymol.*, (1999), **299**, 152–178.
- [80] "USDA database." [Online]. Disponível em: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/6500?fg=Cereal+Grains+and+Pasta&man=&facet=&format=&count=&max=25&offset=25&sort=&qlookup=Rice>. [Acedido: 14-06-2014].
- [81] "Tabela de composição dos alimentos do INSA." [Online]. Disponível em: <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/DetailheAlimento.aspx?ID=IS400>. [Acedido: 14-06-2014].
- [82] A. S. Bhatnagar, D. S. Prabhakar, P. K. P. Kumar, R. G. R. Rajan, and A. G. G. Krishna, "Processing of commercial rice bran for the production of fat and nutraceutical rich rice brokens, rice germ and pure bran", *LWT - Food Sci. Technol.*, (2014), **58**, 306–311.
- [83] M. Friedman, "Rice brans, rice bran oils, and rice hulls: composition, food and industrial uses, and bioactivities in humans, animals, and cells", *J. Agric. Food Chem.*, (2013), **61**, 45, 10626–10641.
- [84] H. E. Miller, F. Rigelhof, L. Marquart, A. Prakash, and M. Kanter, "Antioxidant Content of Whole Grain Breakfast Cereals, Fruits and Vegetables", *J. Am. Coll. Nutr.*, (2000), **19**, 312–319.
- [85] P. Wanyo, N. Meeso, and S. Siriamornpun, "Effects of different treatments on the antioxidant properties and phenolic compounds of rice bran and rice husk", *Food Chem.*, (2014), **157**, 457–463.

- [86] Y. Shao, F. Xu, X. Sun, J. Bao, and T. Beta, "Phenolic acids, anthocyanins, and antioxidant capacity in rice (*Oryza sativa* L.) grains at four stages of development after flowering", *Food Chem.*, (2014), **143**, 90–96.
- [87] K. K. Adom and R. H. Liu, "Antioxidant Activity of Grains", *J. Agric. Food Chem.*, (2002), **50**, 6182–6187.
- [88] F. Finocchiaro, B. Ferrari, A. Gianinetti, C. Dall'asta, G. Galaverna, F. Scazzina, and N. Pellegrini, "Characterization of antioxidant compounds of red and white rice and changes in total antioxidant capacity during processing", *Mol. Nutr. Food Res.*, (2007), **51**, 1006–1019.
- [89] Z. Zhou, K. Robards, S. Helliwell, and C. Blanchard, "The distribution of phenolic acids in rice", *Food Chem.*, (2004), **87**, 401–406.
- [90] Z. Yang and W. Zhai, "Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.)", *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, (2010), **11**, 169–176.
- [91] L. Alvarez-Jubete, H. Wijngaard, E. K. Arendt, and E. Gallagher, "Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking", *Food Chem.*, (2010), **119**, 770–778.
- [92] R. Chirinos, R. Pedreschi, H. Rogez, Y. Larondelle, and D. Campos, "Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region", *Ind. Crops Prod.*, (2013), **47**, 145–152.
- [93] P. Paško, H. Bartoń, P. Zagrodzki, S. Gorinstein, M. Folta, and Z. Zachwieja, "Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth", *Food Chem.*, (2009), **115**, 994–998.
- [94] R. A. Carciochi, G. D. Manrique, and K. Dimitrov, "Changes in phenolic composition and antioxidant activity during germination of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd)", *Int. Food Res. J.*, (2014), **21**, 767–773.
- [95] L. He, X. Zhang, H. Xu, C. Xu, F. Yuan, Ž. Knez, Z. Novak, and Y. Gao, "Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC–ABTS assay", *Food Bioprod. Process.*, (2012), **90**, 215–223.

7. Anexos

Anexo A – Determinação de água / humidade e resíduo seco em géneros alimentícios

Resumo do processo - Evaporação da água existente na amostra por secagem em estufa até obtenção de peso constante.

Reagentes

- Os reagentes utilizados têm de ter qualidade analítica reconhecida. A água deve ser no mínimo de grau 2 ou de qualidade equivalente, de acordo com a norma ISO 3696.
- Sílica gel ou outra substância com indicador de humidade.

Aparelhos e utensílios

- Material corrente de laboratório.
- Cápsulas de metal (ex. níquel, alumínio, aço inoxidável) com tampa, com um diâmetro de pelo menos 60 mm e uma altura de pelo menos 20 mm.
- Balança analítica com resolução de 0,0001 g.
- Estufa de secagem, regulável a $102\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Moinho homogeneizador de laboratório.
- Exsicador, com sílica ou outra substância exsicante equivalente.

Preparação da amostra

Homogeneizar a amostra, recorrendo ao auxílio de um moinho /homogeneizador, de forma a garantir que não haja separação de nenhum constituinte da amostra.

Técnica

As pesagens são efetuadas ao decimilograma.

Efetuar o ensaio em duplicado (X_1 e X_2).

- Colocar as cápsulas e respetivas tampas dentro da estufa durante 1 h à temperatura de $102\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão atmosférica.
- Cobrir a cápsula com a respetiva tampa, retirar da estufa, colocar no exsicador, deixar arrefecer até atingir a temperatura ambiente e pesar (m_0).
- Pesar 5 mg de amostra para as cápsulas ($m_1 = m_0 + \text{amostra}$).
- Colocar as cápsulas contendo a amostra em estufa durante 2 horas, arrefecer em exsicador até atingir a temperatura ambiente e pesar.

- Voltar a colocar as cápsulas em estufa durante 1 hora.
- Repetir os passos de secagem, arrefecimento e pesagem até obtenção de peso constante, ou seja, até uma variação de peso $\leq 0,0010$ g (m_2) (ver notas 1 e 2).

Nota 1: Quando ocorre um aumento de peso relativamente à pesagem anterior, considera-se peso constante o da pesagem anterior. Isto pode suceder quando a amostra se encontra completamente desidratada e adquire humidade durante a sua manipulação.

Nota 2: Quando ocorre uma perda de peso superior à perda nas pesagens anteriores, considera-se peso constante o da pesagem imediatamente anterior. Isto pode suceder quando o produto começa a sofrer degradação enzimática durante as secagens.

Resultados

- O teor de água / humidade, expresso em gramas por 100 g ou 100 mL de amostra, é:

$$\frac{(m_1 - m_2)}{(m_1 - m_0)} \times 100$$

- O teor de resíduo seco, expresso em gramas por 100 g ou 100 mL de amostra, é:

$$\frac{(m_2 - m_0)}{(m_1 - m_0)} \times 100$$

Apresentação dos Resultados

Os resultados são apresentados com aproximação às décimas.

Critérios de aceitação dos resultados

Os resultados dos replicados da amostra são avaliados para verificar se a repetibilidade é cumprida usando a seguinte fórmula:

$$|X_1 - X_2| \leq 2,8 \times \frac{cv \times M}{100}$$

Sendo:

X_1 - valor da réplica 1;

X_2 - valor da réplica 2;

cv - coeficiente de variação da repetibilidade (%), que é igual a 2;

M – Média aritmética das duas réplicas.

Se a repetibilidade for cumprida, apresentar o resultado como a média das 2 réplicas. Caso contrário, repetir o ensaio obtendo mais 2 resultados e verificar se a precisão intermédia é cumprida usando a seguinte fórmula:

$$(X_{máx} - X_{mín}) \leq 3,6 \times \frac{cv \times M}{100}$$

Sendo:

$X_{máx}$ – valor máximo dos quatro resultados;

$X_{mín}$ – valor mínimo dos quatro resultados;

cv- coeficiente de variação da precisão intermédia (%) que é igual a 3;

M – Média aritmética das quatro réplicas.

Se a precisão intermédia for cumprida, apresentar o resultado como a média das 4 réplicas. Caso contrário, apresentar o resultado como o valor da mediana.

Anexo B – Determinação de Cinza em géneros alimentícios

Resumo do processo - Evaporação da amostra à secura. Calcinação a $525\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e respetiva pesagem.

Reagentes

- Os reagentes utilizados têm de ter qualidade analítica reconhecida. A água deve ser no mínimo de grau 2 ou de qualidade equivalente, de acordo com a norma ISO 3696.
- Sílica gel ou outra substancia com indicador de humidade.

Aparelhos e utensílios

- Material corrente de laboratório.
- Balança analítica com resolução de 0,0001 g.
- Banho de areia.
- Bico de Bunsen.
- Exsicador, com sílica ou outra substancia exsicante equivalente.
- Mufla elétrica regulável a $525\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Moinho homogeneizador de laboratório.

Preparação da amostra

Homogeneizar a amostra, recorrendo ao auxílio de um moinho /homogeneizador, de forma a garantir que não haja separação de nenhum constituinte da amostra.

Técnica

Efetuar o ensaio em duplicado (X_1 e X_2).

- Colocar os cadinhos de porcelana, em mufla a $525\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 1 hora. Arrefecer em exsicador e pesar (m_0).
- Pesar 5 g de amostra ao decimilograma para o cadinho (m_1).
- Carbonizar lentamente em banho de areia seguido de bico de Bunsen até a amostra se reduzir a carvão. Considerar a operação finalizada quando deixar de observar fumos brancos.
- Calcinar em mufla a $525\text{ }^{\circ}\text{C}$, até que fique isento de carvão (cinza branca ou ligeiramente acinzentada).
- Arrefecer em exsicador e pesar.
- Colocar novamente na mufla durante 2 horas. Arrefecer e pesar.
- Repetir as operações de calcinação/pesagem até atingir peso constante (m_2), ou seja até uma variação de peso $\leq 0,0005\text{ g}$.

Resultados

- Teor de cinza expresso em gramas por 100 g de amostra, é:

$$\frac{(m_2 - m_0)}{(m_1 - m_0)} \times 100$$

Apresentação dos Resultados

Os resultados são apresentados com aproximação às centésimas.

Critérios de aceitação dos resultados

Os resultados dos replicados da amostra são avaliados para verificar se a repetibilidade é cumprida usando a seguinte fórmula:

$$|X_1 - X_2| \leq 2,8 \times \frac{cv \times M}{100}$$

Sendo:

X_1 - valor da réplica 1;

X_2 - valor da réplica 2;

cv - coeficiente de variação da repetibilidade (%) é igual a 6 para amostras cujo teor de cinza seja ≤ 1 g/100g ou g/100mL e 2 para amostras cujo teor de cinza seja > 1 g/100g .

M - Média aritmética das duas réplicas.

Se a repetibilidade for cumprida, apresentar o resultado como a média das 2 réplicas. Caso contrário, repetir o ensaio obtendo mais 2 resultados e verificar se a precisão intermédia é cumprida usando a seguinte fórmula (valores obtidos nos quatro ensaios):

$$(X_{máx} - X_{mín}) \leq 3,6 \times \frac{cv \times M}{100}$$

Sendo:

$X_{máx}$ - valor máximo dos quatro resultados;

$X_{mín}$ - valor mínimo dos quatro resultados;

cv - coeficiente de variação da repetibilidade (%) é igual a 6 para amostras cujo teor de cinza seja ≤ 1 g/100g ou g/100mL e 4 para amostras cujo teor de cinza seja > 1 g/100g;

M - Média aritmética das quatro réplicas.

Se a precisão intermédia for cumprida, apresentar o resultado como a média das 4 réplicas. Caso contrário, apresentar o resultado como o valor da mediana.

Anexo C – Determinação de azoto/Proteína em géneros alimentícios

Resumo do processo - Mineralização do azoto pelo ácido sulfúrico concentrado, em presença de um catalisador; alcalinização dos produtos da reação; destilação e titulação do amoníaco libertado para obtenção do teor de azoto. Cálculo da proteína total pela multiplicação do teor de azoto por um fator de 5,7 correspondente para cereais.

Reagentes

- Os reagentes utilizados têm de ter qualidade analítica reconhecida. A água deve ser no mínimo de grau 2 ou de qualidade equivalente, de acordo com a norma ISO 3696.
- Ácido sulfúrico 98 % concentrado (H_2SO_4 , $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/cm}^3$).
- Mistura catalisadora: 3,5 g K_2SO_4 + 0,4 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$.
- Solução de ácido bórico, a 4 % (m/v).
- Solução de hidróxido de sódio a 40 % (m/v).
- Solução de H_2SO_4 0,1N.
- Soluções padrão de pH 4,0 e 7,0.

Aparelhos e utensílios

- Material corrente de laboratório.
- Balança analítica com resolução de 0,0001 g.
- Equipamento Tecator Kjeltec.
- Titulador automático “Titrande 808-Metrohm” ou sistema equivalente.
- Tubos de digestão de 250 mL.
- Moinho homogeneizador de laboratório.

Preparação da amostra

Homogeneizar a amostra, recorrendo ao auxílio de um moinho /homogeneizador, de forma a garantir que não haja separação de nenhum constituinte da amostra.

Toma da amostra

Pesar a amostra tendo em conta: Produtos com teor de azoto >5 %, pesar 0,5 g de amostra. Restantes produtos pesar 1 g de amostra.

Técnica

As pesagens são efetuadas ao decimilgrama.

- Efetuar duas determinações paralelas.
- Antes da destilação das amostras efetuar um ensaio em branco da destilação.

Mineralização:

- Pesar 1 g de amostra para os tubos de Kjeldahl com a precisão de 0,0001 g.
- Lavar as paredes dos tubos de Kjeldahl com um pouco de água.
- Adicionar duas pastilhas de mistura catalisadora.
- Adicionar cuidadosamente 15 mL de H₂SO₄ concentrado, junto às paredes internas do tubo de Kjeldahl, e misturar suavemente.
- Colocar os tubos a mineralizar na Unidade de Digestão.

Nota 1: Depois de arrefecer, o mineralizado pode apresentar a formação de cristais que devem ser dissolvidos com adição de um pequeno volume de água seguida de agitação e/ou aquecimento

Destilação

- Ligar a Unidade de Destilação do Sistema Tecator Kjeltec.
- Efetuar o ciclo de limpeza diário. Este ciclo é repetido pelo menos 3 vezes antes de se iniciar a destilação do branco e das amostras.
- Efetuar a destilação do branco (branco de destilação): medir 10 mL de H₂SO₄ para um tubo de Kjeldahl e destilar.
- Seguidamente destilar as amostras.

Nota 2: Terminada cada destilação, retirar o erlenmeyer com o destilado e lavar com água os tubos que estiveram em contacto com o destilado.

Titulação

- Titular o branco e as amostras até ao ponto de pH 4,4 ± 0,1, medido por potenciómetro.

Nota 3: Se o volume da solução de ácido (H₂SO₄ a 0,1 N) gasto na titulação do branco de destilação for superior a 0,30 mL, repetir o ciclo de limpeza da unidade de destilação e confirmar o valor da titulação do branco.

Resultados

- Teor de azoto expresso em gramas por 100 g ou 100 mL de amostra.
O teor de azoto total da amostra, expresso em percentagem, é:

$$\frac{0,14x(V_1 - V_0)}{m \text{ ou } v}$$

Sendo:

V₁ o volume, em mililitros, da solução de ácido 0,1 N gasto na titulação da amostra;

V₀ o volume, em mililitros da solução de ácido 0,1 N gasto na titulação do branco;

m a massa, em gramas, da toma de amostra;

v o volume, em mililitros, da toma de amostra.

O teor de proteína total obtém-se multiplicando a percentagem de azoto por um fator de 5,7 para cereais.

Apresentação dos Resultados

Os resultados são apresentados com aproximação às centésimas para o azoto e com aproximação às décimas para a proteína.

Critérios de aceitação dos resultados

Os resultados dos replicados da amostra são avaliados para verificar se a repetibilidade é cumprida usando a seguinte fórmula:

$$|X_1 - X_2| \leq 2,8 \times \frac{cv \times M}{100}$$

Sendo:

X_1 - valor da réplica 1;

X_2 - valor da réplica 2;

cv - coeficiente de variação da repetibilidade (%), que é igual a 2;

M – Média aritmética das duas réplicas.

Se a repetibilidade for cumprida, apresentar o resultado como a média das 2 réplicas. Caso contrário, repetir o ensaio obtendo mais 2 resultados e verificar se a precisão intermédia é cumprida usando a seguinte fórmula:

$$(X_{máx} - X_{mín}) \leq 3,6 \times \frac{cv \times M}{100}$$

Sendo:

$X_{máx}$ – valor máximo dos quatro resultados;

$X_{mín}$ – valor mínimo dos quatro resultados;

cv- coeficiente de variação da repetibilidade (%), que é igual a 2;

M – Média aritmética das quatro réplicas.

Se a precisão intermédia for cumprida, apresentar o resultado como a média das 4 réplicas. Caso contrário, apresentar o resultado como o valor da mediana.

Anexo D – Determinação de Gordura em géneros alimentícios

Resumo do processo - A amostra é hidrolisada com uma solução de ácido clorídrico fervente, seguindo-se uma filtração. Secagem da matéria gorda retida no filtro e extração pelo éter de petróleo. Eliminação do solvente por evaporação, secagem e pesagem do extrato.

Reagentes

- Os reagentes utilizados têm de ter qualidade analítica reconhecida. A água deve ser no mínimo de grau 2 ou de qualidade equivalente, de acordo com a norma ISO 3696.
- Ácido clorídrico 37 % (HCl - $\rho_{20} = 1,183 \text{ g/cm}^3$).
- Éter de Petróleo (40-60 °C).

Aparelhos e utensílios

- Material corrente de laboratório.
- Balança analítica com resolução de 0,0001 g.
- Cartuchos de extração.
- Papel de filtro, Whatman N° 40.
- Copos de extração de alumínio
- Moinho homogeneizador de laboratório.
- Estufa elétrica regulada a $102 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$.

Preparação da amostra

Homogeneizar a amostra, recorrendo ao auxílio de um moinho /homogeneizador, de forma a garantir que não haja separação de nenhum constituinte da amostra.

Técnica

Efetuar o ensaio em duplicado (X_1 e X_2).

- Pesar a amostra (m_0), para um copo de 400 mL, de acordo com o teor de matéria gorda esperado (Tabela D.1).

Tabela D.1 – Toma da amostra para análise

Teor de matéria gorda (aprox.)	Toma de Amostra
$\geq 50 \%$	0,5 – 1 g
$\geq 25 \%$ – $< 50 \%$	1,0 – 2,0 g
$\geq 10 \%$ – $< 25 \%$	2,0 – 3,0 g
$\geq 5 \%$ – $< 10 \%$	3,0 – 5,0 g
$< 5 \%$	5,0 – 10,0 g

Nota 1: Pesar 5 g para as amostras de grão e farelo de arroz, e 10 g para as amostras de casca de arroz.

- Adicionar cuidadosamente 75 mL de água + 45 mL de HCl e agitar com auxílio de uma vareta de vidro.
- Tapar com um vidro de relógio e aquecer à fervura, durante 20 minutos, agitando de vez em quando, de forma a garantir uma hidrólise homogênea da amostra.
- Deixar arrefecer e filtrar o hidrolisado através de papel de filtro, para um frasco de Erlenmeyer. Lavar o vidro de relógio e as paredes do copo, com água quente. Deixar arrefecer e passar os líquidos de lavagem pelo filtro, até que não deem reação ácida ao papel indicador de pH.
- Colocar o(s) filtro(s) com o resíduo em cápsulas de porcelana e secar em estufa a $102 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ até ficarem secos (aproximadamente 1h30m).

Extração em Sistema Automático Soxtec:

- Secar os copos de extração de alumínio (m_1), em estufa a $102 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 hora, arrefecer em exsiccador e tarar.
- Colocar o(s) papel(eis) de filtro como resíduo depois de seco dentro do cartucho de extração tapando o topo do cartucho com algodão.
- Adaptar o cartucho ao suporte magnético do equipamento.
- Colocar em cada copo de extração 75 mL de éter de petróleo.
- Iniciar o processo de extração de acordo com a programação pré definida.
- Terminado o processo de extração retirar os copos do equipamento.
- Secar os copos que contém o extrato em estufa a $102 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1h e 30 min, arrefecer em exsiccador e pesar. Repetir as operações de aquecimento e arrefecimento de 30 em 30 minutos até peso constante (m_2), ou seja, até uma variação de peso $\leq 0,0010$.

Resultados

- Teor de matéria gorda expressa em gramas por 100 g de amostra.

$$\frac{(m_2 - m_1)}{(m_0)} \times 100$$

Apresentação dos Resultados

Os resultados apresentam-se com aproximação às décimas.

Critérios de aceitação dos resultados

Os resultados dos replicados da amostra são avaliados para verificar se a repetibilidade é cumprida usando a seguinte fórmula:

$$|X_1 - X_2| \leq 2,8 \times \frac{cv \times M}{100}$$

Sendo:

X_1 - valor da réplica 1;

X_2 - valor da réplica 2;

cv – coeficiente de variação da repetibilidade (%), que é igual a 7 para amostras com teor de gordura ≤ 1 % e 2 amostras com teor de gordura > 1 %;

M – Média aritmética das duas réplicas.

Se a repetibilidade for cumprida apresentar o resultado como a média das 2 réplicas. Caso contrário, repetir o ensaio obtendo mais 2 resultados. E verificar se a precisão intermédia é cumprida usando a seguinte fórmula:

$$(x_{m\acute{a}x} - x_{m\acute{i}n}) \leq 3,6 \times \frac{cv \times M}{100}$$

Sendo:

$X_{m\acute{a}x}$ – valor máximo dos quatro resultados;

$X_{m\acute{i}n}$ – valor mínimo dos quatro resultados;

cv – coeficiente de variação da repetibilidade (%), que é igual a 7 para amostras com teor de gordura ≤ 1 % e 2 amostras com teor de gordura > 1 %;

M – Média aritmética das quatro réplicas.

Se a precisão intermédia for cumprida apresentar o resultado como a média das 4 réplicas, caso contrário, apresentar o resultado como o valor da mediana.

Anexo E – Extração de compostos bioativos das amostras de Oca Argentina

Reagentes

- Água ultrapura (tipo 1), captada a partir de um sistema de purificação Milli-Q.
- Metanol (gradient grade for liquid chromatography).

Aparelhos e utensílios

- Material corrente de laboratório.
- Balança analítica com resolução de 0,0001 g.
- Moinho homogeneizador de laboratório.
- Centrifuga eppendorf centrifuge 5804 R.
- Liofilizador Heto HSC 500.

Preparação da amostra

Lavar as amostras e cortar em pedaços pequenos, e após congelação liofilizar.

Homogeneizar a amostra, recorrendo ao auxílio de um moinho /homogeneizador

Técnica

As pesagens são efetuadas ao decimilograma.

- Pesar 5 g de amostra para tubos de centrífuga
- Adicionar 20 mL de 80% Metanol e deixar no ultrassons a extrair durante 15 minutos.
- Colocar os tubos na centrífuga e centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
- Decantar o sobrenadante.
- Repetir a extração no resíduo, nas mesmas condições da anterior (repetir a partir do segundo ponto os passos anteriores).

Anexo F – Análise de variância aos macronutrientes

Grão de arroz

Tabela F.1 – ANOVA para as determinações de macronutrientes realizadas às amostras de grão de arroz

Fonte de variação		SS	g.l.	MS	F ₀	Sig. (p)
Humidade	Entre variedades	0,802	2	0,401	1230,280	0,000
	Erro (interior)	0,001	3	0,000		
	Total	0,803	5			
Cinza	Entre variedades	0,023	2	0,011	195,534	0,001
	Erro (interior)	0,000	3	0,000		
	Total	0,023	5			
Proteína	Entre variedades	0,292	2	0,146	12,889	0,034
	Erro (interior)	0,034	3	0,011		
	Total	0,326	5			
Gordura	Entre variedades	0,081	2	0,041	22,173	0,016
	Erro (interior)	0,005	3	0,002		
	Total	0,087	5			

Onde,

SS – Soma dos quadrados (*Sum of Squares*)

g.l – Graus de liberdade

MS – Quadrados médios (*Mean Square*)

F₀ – Distribuição de Fisher

Sig. (p) – p-value/Nível mínimo de significância

Pela análise da ANOVA (Tabela F.1) pode-se concluir que existem diferenças significativas para $p < 0,05$ entre as diferentes variedades de grão de arroz, para qualquer uma das análises determinadas (humidade, cinza, proteína e gordura). Como tal, recorreu-se ao teste da menor diferença significativa (LSD) de modo a se determinar quais as variedades que apresentavam diferenças significativas entre si, Tabela F.2.

Tabela F.2 – Identificação das diferenças significativas pelo teste LSD

Parâmetros	Amostra (A)	Amostra (B)	Diferença entre médias ($ \bar{A} - \bar{B} $)	Sig. (p)
Humidade	24	25	0,875*	0,000
		26	0,272*	0,001
	25	26	0,603*	0,000
Cinza	24	25	0,081*	0,002
		26	0,150*	0,000
	25	26	0,069*	0,003
Proteína	24	25	0,017	0,882
	25	26	0,476*	0,021
Gordura	24	25	0,234*	0,012
		26	0,258*	0,009
	25	26	0,025	0,604

*As diferenças entre as médias são significativamente diferentes para $p < 0,05$.

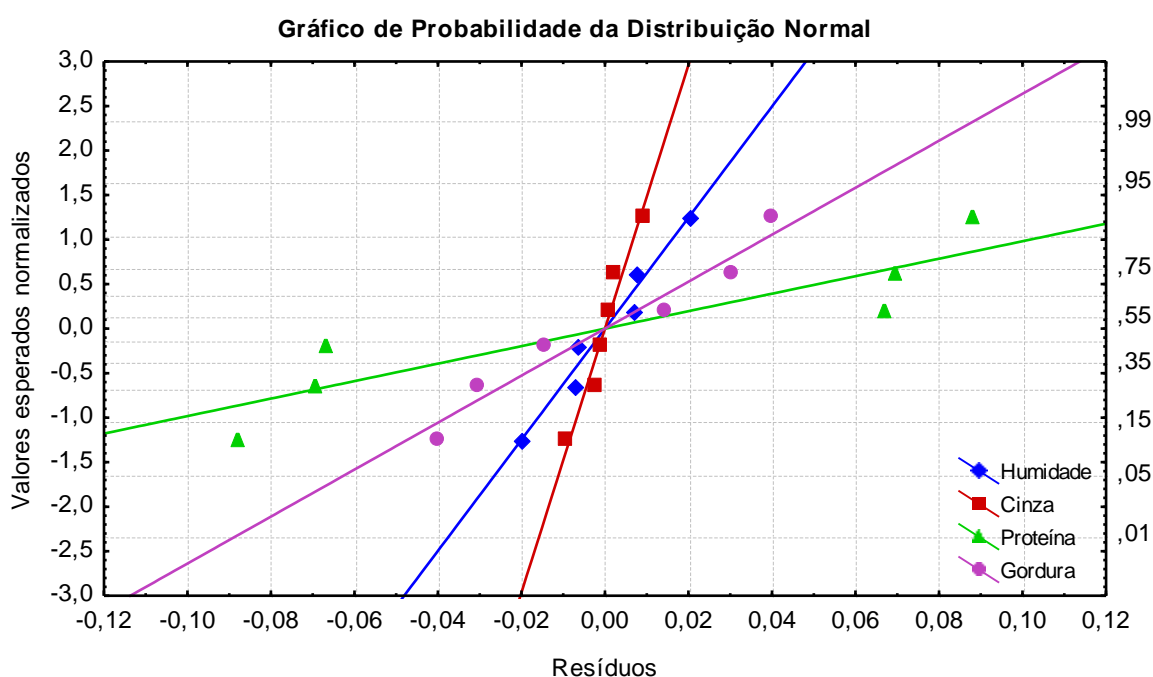


Figura F.1 – Verificação da normalidade para as diferentes determinações de macronutrientes nas amostras de grão de arroz

O gráfico anterior (Figura F.1) indica que o pressuposto da normalidade para as determinações de macronutrientes nas amostras de grão de arroz é satisfeito, uma vez que os resíduos se dispõem à volta da reta, não indicando uma violação dos pressupostos.

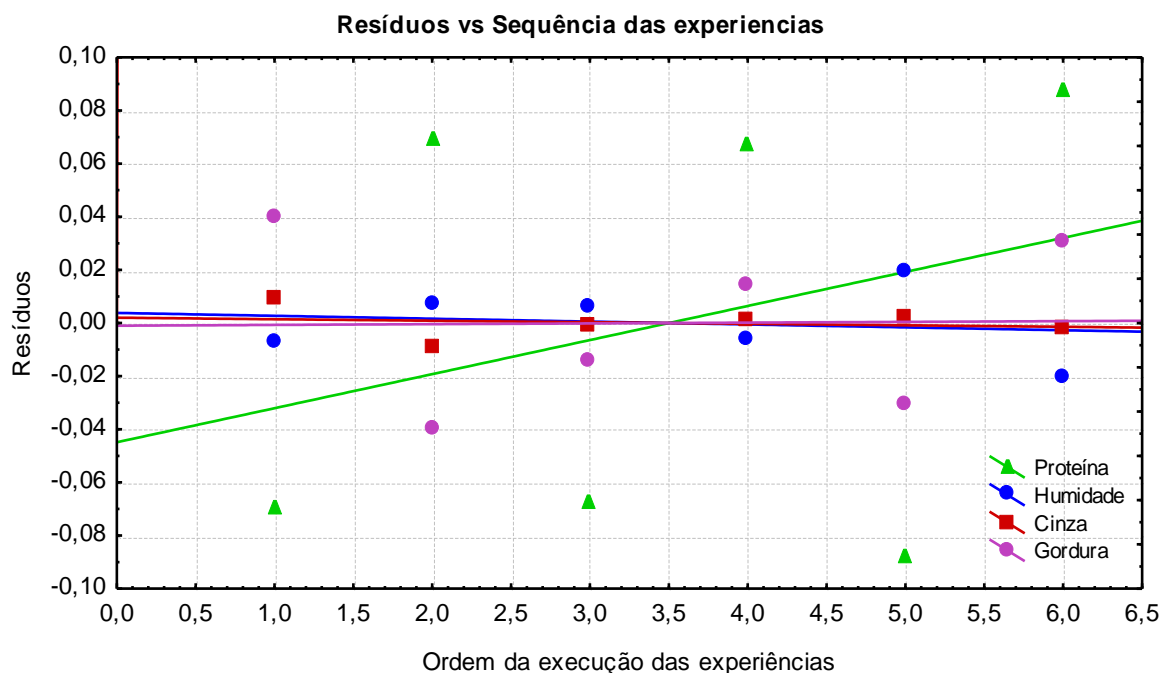


Figura F.2 – Verificação da independência para as diferentes determinações de macronutrientes para as amostras de grão de arroz

O gráfico dos resíduos em função da ordem aleatória de execução das experiências (Figura F.2) não parece mostrar qualquer violação aos pressupostos nas determinações do teor de humidade, cinza e gordura, uma vez que não se verifica qualquer tendência especial na disposição dos resíduos. No caso do teor de proteína, tal já não acontece, onde se consegue visualizar uma tendência na disposição dos resíduos. No entanto, assume-se que não existe violação, uma vez que a dimensão da amostra é muito pequena, o que impossibilita de tirar conclusões concretas, ficando estas em causa.

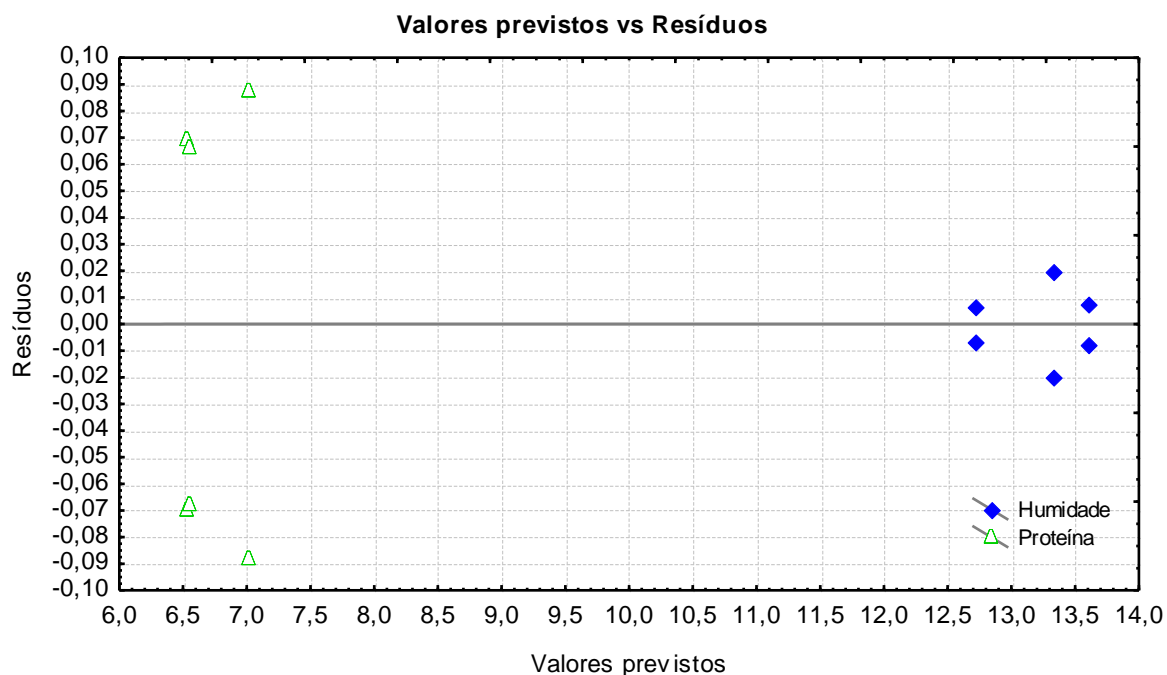


Figura F.3 – Verificação da homogeneidade da variância na determinação do teor humidade e proteína nas amostras de grão de arroz

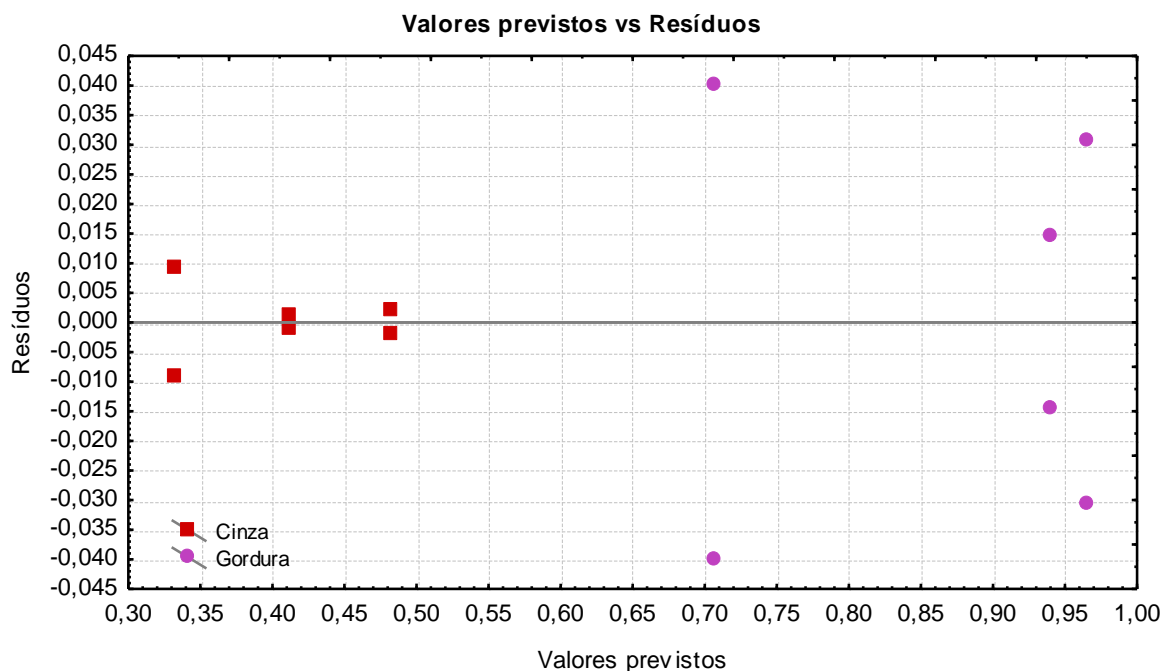


Figura F.4 – Verificação da homogeneidade da variância na determinação do teor cinza e gordura nas amostras de grão de arroz

Os gráficos anteriores (Figura F.3 e Figura F.4) parecem indicar uma violação do pressuposto da homogeneidade da variância em todas as determinações realizadas, uma vez que apresentam uma estrutura especial, no entanto, mais uma vez é relevante o facto de a dimensão da amostra ser muito pequena o que conduz a um resultado inconclusivo. Como tal, recorreu-se ao teste de

Levene, onde se obteve resultados concordantes com o parecer anterior, com a exceção da determinação do teor de cinza, sendo assim verifica-se uma violação do pressuposto da homogeneidade da variância apenas nas determinações de humidade, proteína e gordura.

Farelo de arroz:

Tabela F.3 – ANOVA para as determinações de macronutrientes realizadas às amostras de farelo de arroz

Fonte de variação		SS	g.l.	MS	F ₀	Sig. (p)
Humidade	Entre variedades	1,303	2	0,651	40,976	0,007
	Erro (interior)	0,048	3	0,016		
	Total	1,350	5			
Cinza	Entre variedades	0,809	2	0,404	22,223	0,016
	Erro (interior)	0,055	3	0,018		
	Total	0,863	5			
Proteína	Entre variedades	6,370	2	3,185	56,567	0,004
	Erro (interior)	0,169	3	0,056		
	Total	6,539	5			
Gordura	Entre variedades	2,114	2	1,057	2,294	0,249
	Erro (interior)	1,383	3	0,461		
	Total	3,497	5			

Pela análise da ANOVA (Tabela F.3) pode-se concluir que existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes variedades de farelo nas análises determinadas, à exceção da determinação do teor de gordura. O teste LSD (Tabela F.4) foi apenas realizado às determinações onde as diferentes variedades estudadas apresentavam diferenças significativas entre si.

Tabela F.4 – Identificação das diferenças significativas nas amostras de farelo de arroz pelo teste LSD

Parâmetros	Amostra (A)	Amostra (B)	Diferença entre médias ($ \bar{A} - \bar{B} $)	Sig. (p)
Humidade	27	28	0,896050*	0,006
		29	0,164200	0,284
	28	29	1,060250*	0,004
Cinza	27	28	0,315249	0,101
		29	0,886961*	0,007
	28	29	0,571711*	0,024
Proteína	27	28	2,327674*	0,002
		29	0,318680	0,272
	28	29	2,008994*	0,003

*As diferenças entre as médias são significativamente diferentes $p < 0,05$.

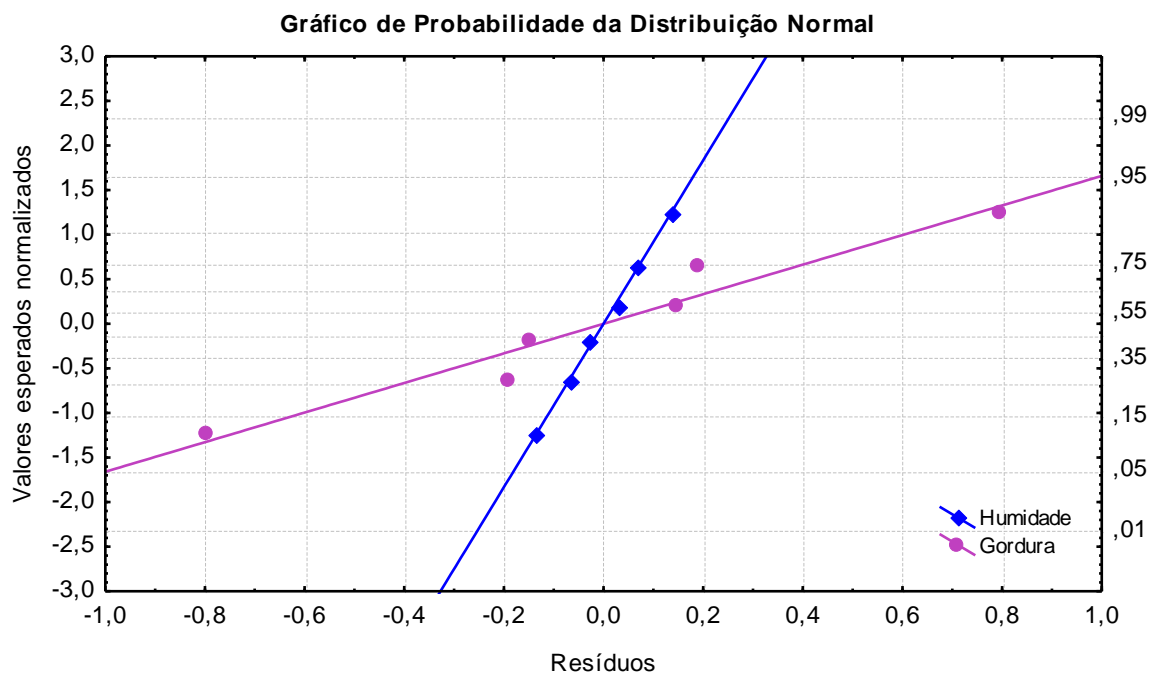


Figura F.5 – Verificação da normalidade na determinação do teor de humidade e gordura nas amostras de farelo de arroz

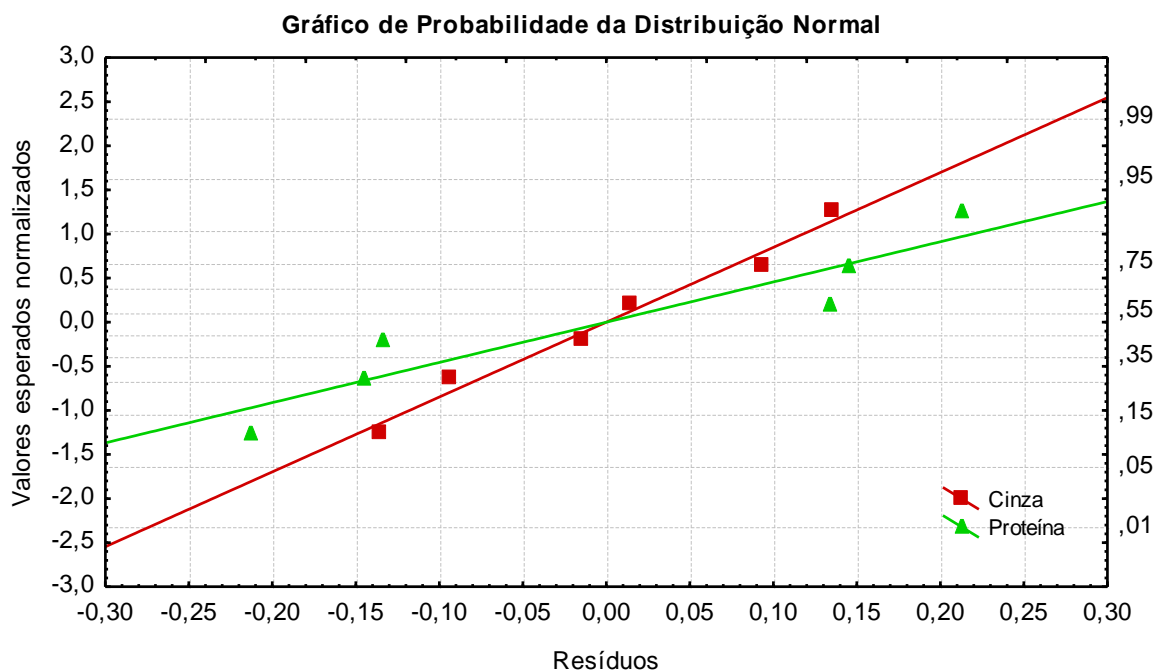


Figura F.6 – Verificação da normalidade na determinação do teor de cinza e proteína nas amostras de farelo de arroz

Os gráficos anteriores (Figura F.5 e Figura F.6) indicam que o pressuposto da normalidade para as determinações de macronutrientes nas amostras de farelo de arroz é satisfeito, uma vez que os resíduos se dispõem à volta da reta, não indicando uma violação dos pressupostos.

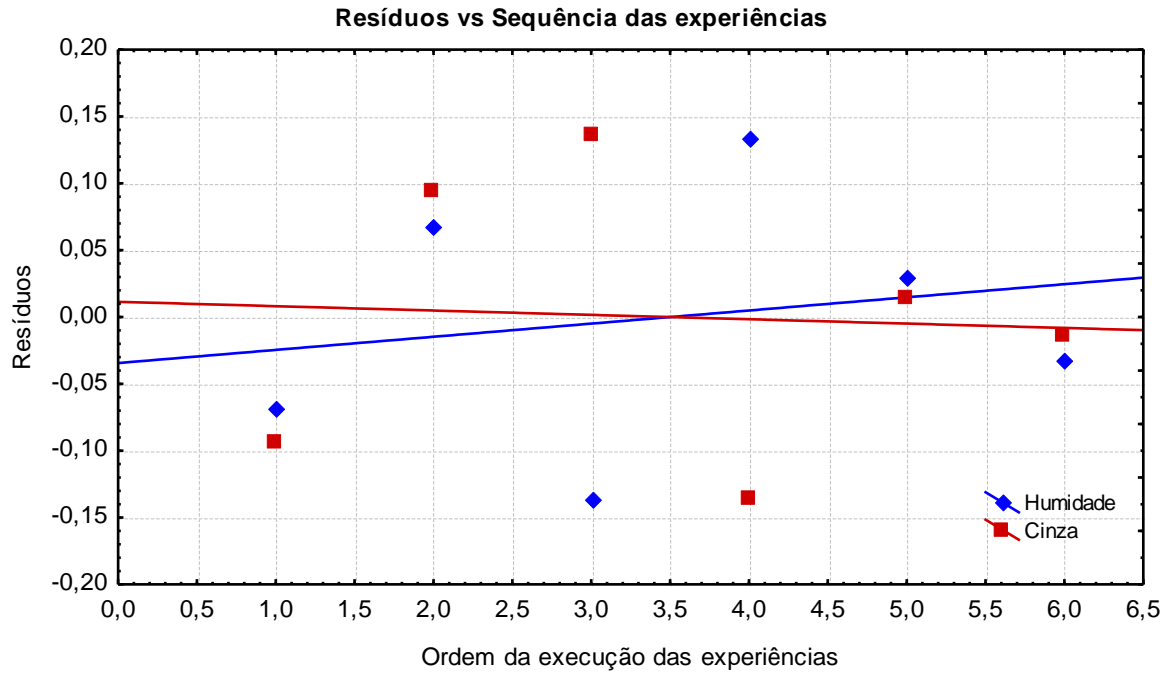


Figura F.7 – Verificação da independência nas determinações do teor de humidade e cinza nas amostras de farelo de arroz

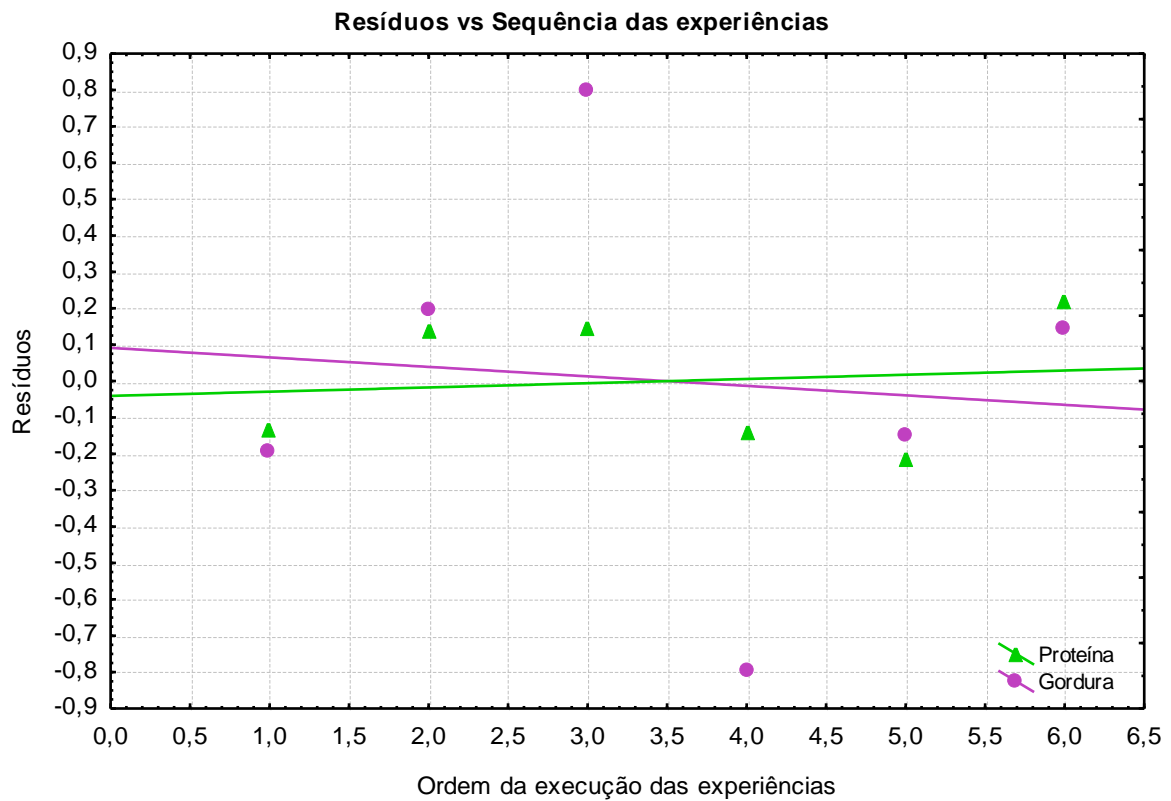


Figura F.8 – Verificação da independência nas determinações do teor de proteína e gordura nas amostras de farelo de arroz

Os gráficos dos resíduos em função da ordem aleatória de execução das experiências (Figura F.7 e Figura F.8) não parecem mostrar qualquer violação aos pressupostos, uma vez que não se verifica qualquer tendência especial na disposição dos resíduos.

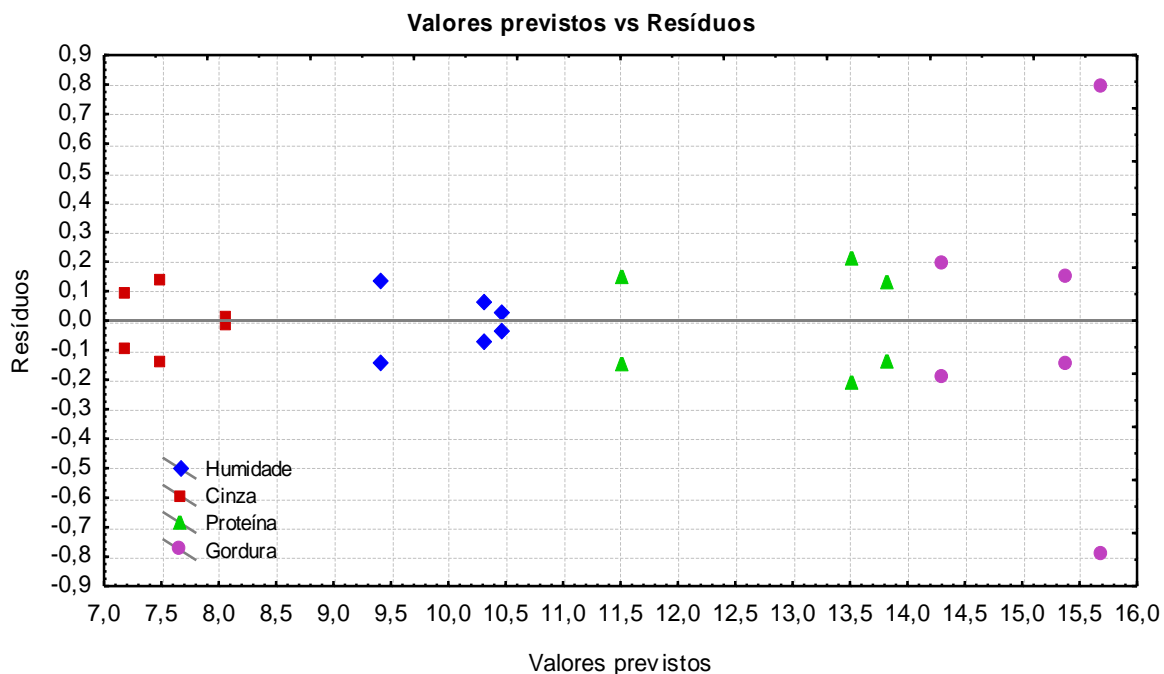


Figura F.9 – Verificação da homogeneidade da variância nas determinações de macronutrientes nas amostras de farelo de arroz

O gráfico anterior (Figura F.9) parece indicar uma violação do pressuposto da homogeneidade da variância em todas as determinações realizadas, uma vez que apresentam uma estrutura especial, no entanto, mais uma vez é relevante o facto de a dimensão da amostra ser muito pequena o que conduz a um resultado inconclusivo. Como tal, recorreu-se ao teste de Levene, onde se obteve resultados concordantes com o parecer anterior, com as exceções das determinações do teor de cinza e de gordura, sendo assim verifica-se uma violação do pressuposto da homogeneidade da variância apenas nas determinações de humidade e proteína.

Casca de arroz:

Tabela F.5 – ANOVA para as determinações de macronutrientes realizadas às amostras de casca de arroz

Fonte de variação		SS	g.l.	MS	F ₀	Sig. (p)
Humidade	Entre variedades	0,482	2	0,241	52,712	0,005
	Erro (interior)	0,014	3	0,005		
	Total	0,496	5			
Proteína	Entre variedades	0,022	2	0,011	31,125	0,010
	Erro (interior)	0,001	3	0,000		
	Total	0,023	5			
Cinza	Entre variedades	21,595	2	10,798	731,701	0,000
	Erro (interior)	0,044	3	0,015		
	Total	21,639	5			
Gordura	Entre variedades	0,009	2	0,004	0,874	0,502
	Erro (interior)	0,015	3	0,005		
	Total	0,023	5			

Pela análise da ANOVA referente às amostras de casca de arroz (Tabela F.5) pode-se concluir que existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes variedades das cascas de arroz na maior parte das análises determinadas, à exceção da determinação do teor de gordura. Como tal, o teste LSD (Tabela F.6) foi apenas realizado às determinações onde as diferentes variedades estudadas apresentavam diferenças significativas entre si.

Tabela F.6 – Identificação das diferenças significativas nas amostras de casca de arroz pelo teste LSD

Parâmetros	Amostra (A)	Amostra (B)	Diferença entre médias ($ \bar{A} - \bar{B} $)	Sig. (p)
Humidade	30	31	0,691850*	0,002
		32	0,292400*	0,023
	31	32	0,399450*	0,010
Proteína	30	31	0,137200*	0,005
		32	0,113624*	0,009
	31	32	0,023575	0,294
Cinza	30	31	4,532670*	0,000
		32	1,378873*	0,001
	31	32	3,153796*	0,000

*As diferenças entre as médias são significativamente diferentes $p < 0,05$.

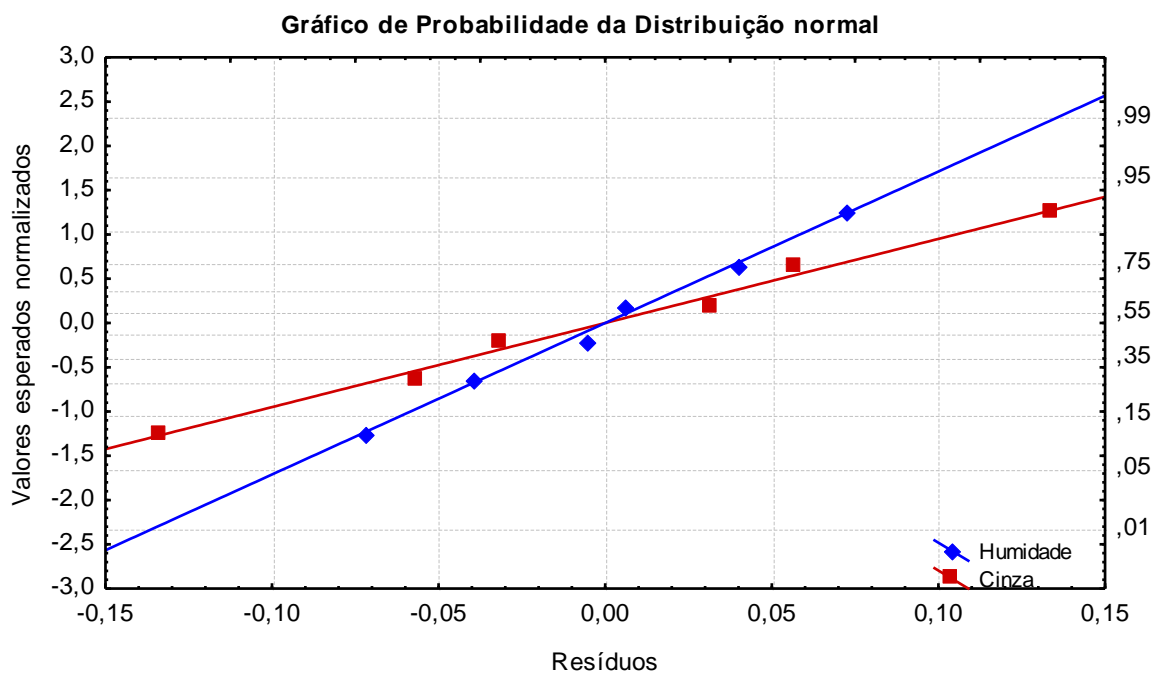


Figura F.10 – Verificação da normalidade na determinação do teor de humidade e cinza nas amostras de casca de arroz

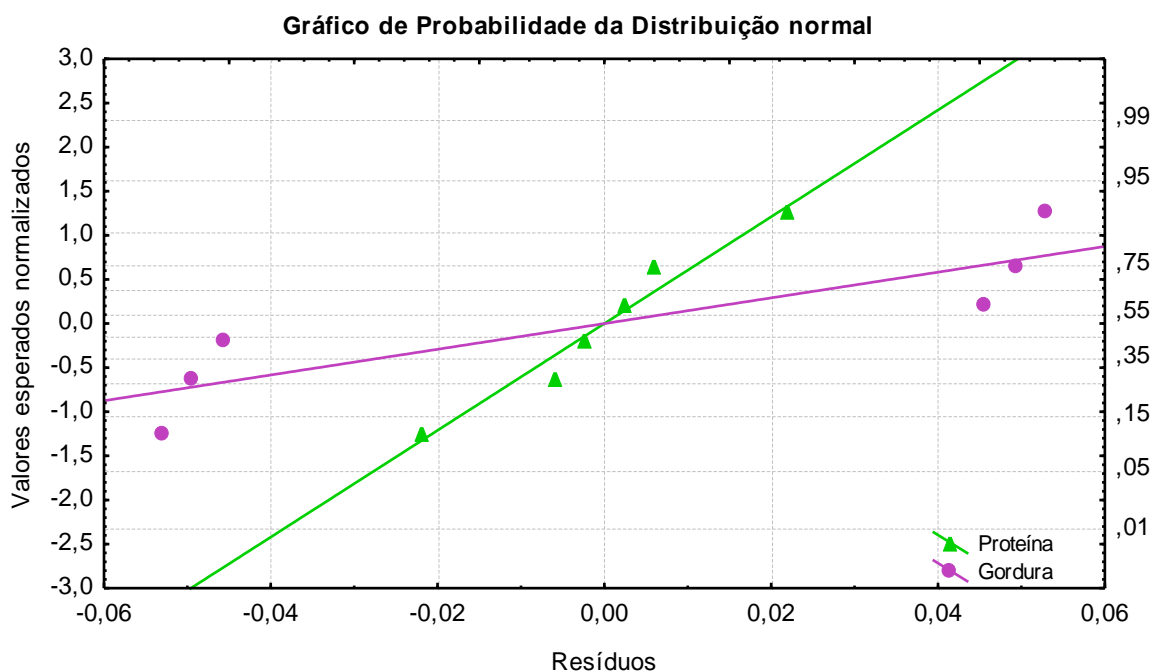


Figura F.11 – Verificação da normalidade na determinação do teor de proteína e gordura nas amostras de casca de arroz

Os gráficos anteriores (Figura F.10 e Figura F.11) indicam que o pressuposto da normalidade para as determinações de macronutrientes nas amostras de casca de arroz é satisfeito, uma vez que os resíduos se dispõem à volta da reta, não indicando uma violação dos pressupostos.

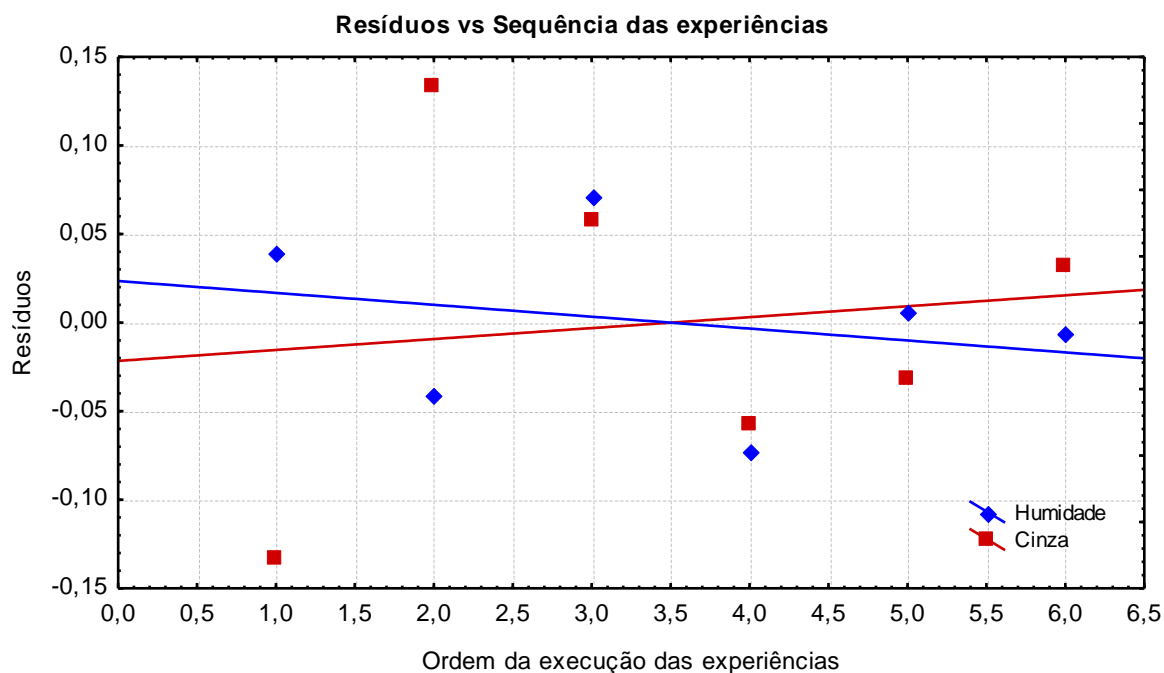


Figura F.12 – Verificação da independência nas determinações do teor de humidade e cinza nas amostras de casca de arroz

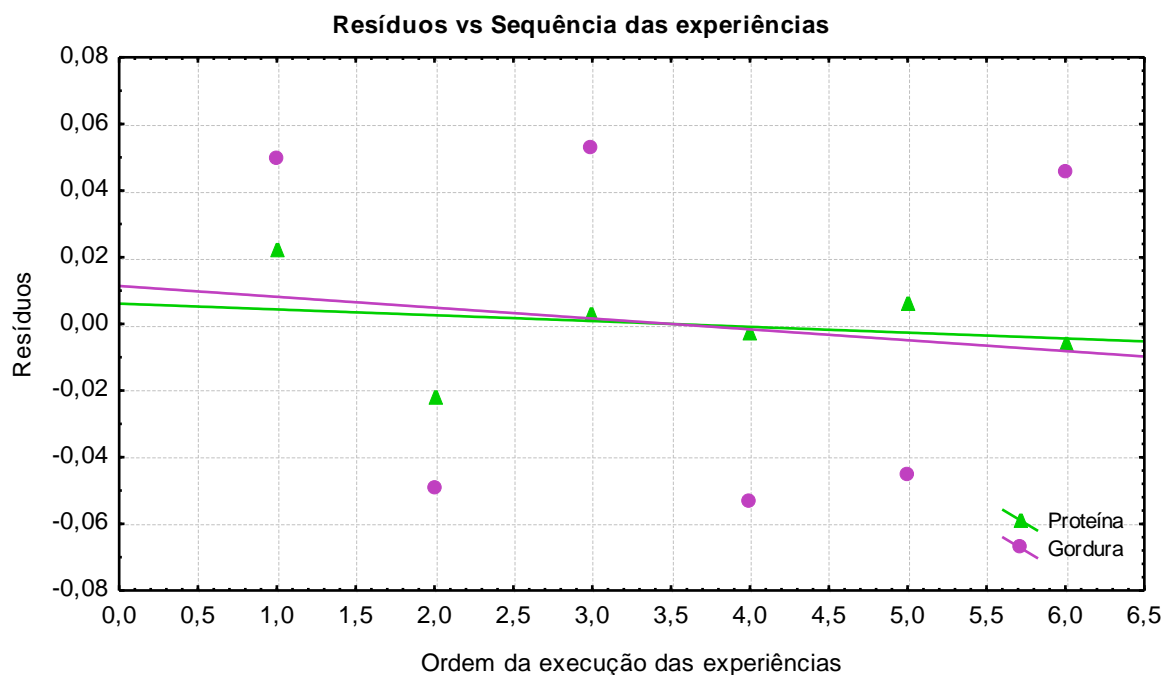


Figura F.13 – Verificação da independência nas determinações do teor de proteína e gordura nas amostras de casca de arroz

Os gráficos dos resíduos em função da ordem aleatória de execução das experiências (Figura F.12 e Figura F.13) não parecem mostrar qualquer violação aos pressupostos, uma vez que não se verifica qualquer tendência especial na disposição dos resíduos.

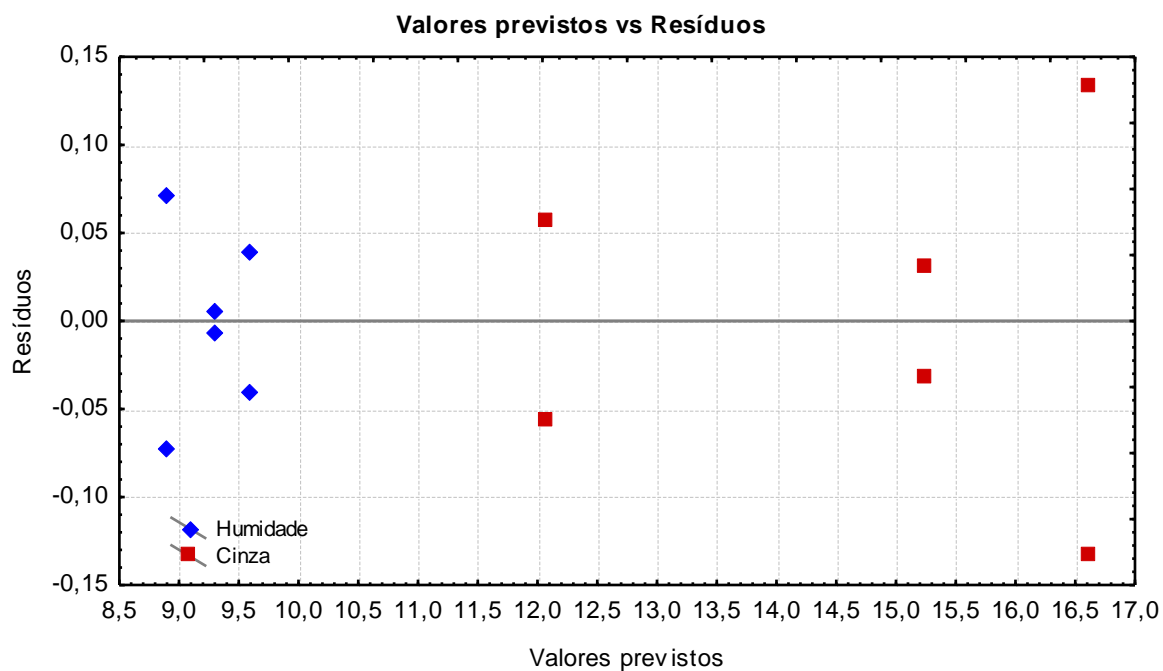


Figura F.14 – Verificação da homogeneidade da variância nas determinações do teor de humidade e cinza nas amostras de casca de arroz

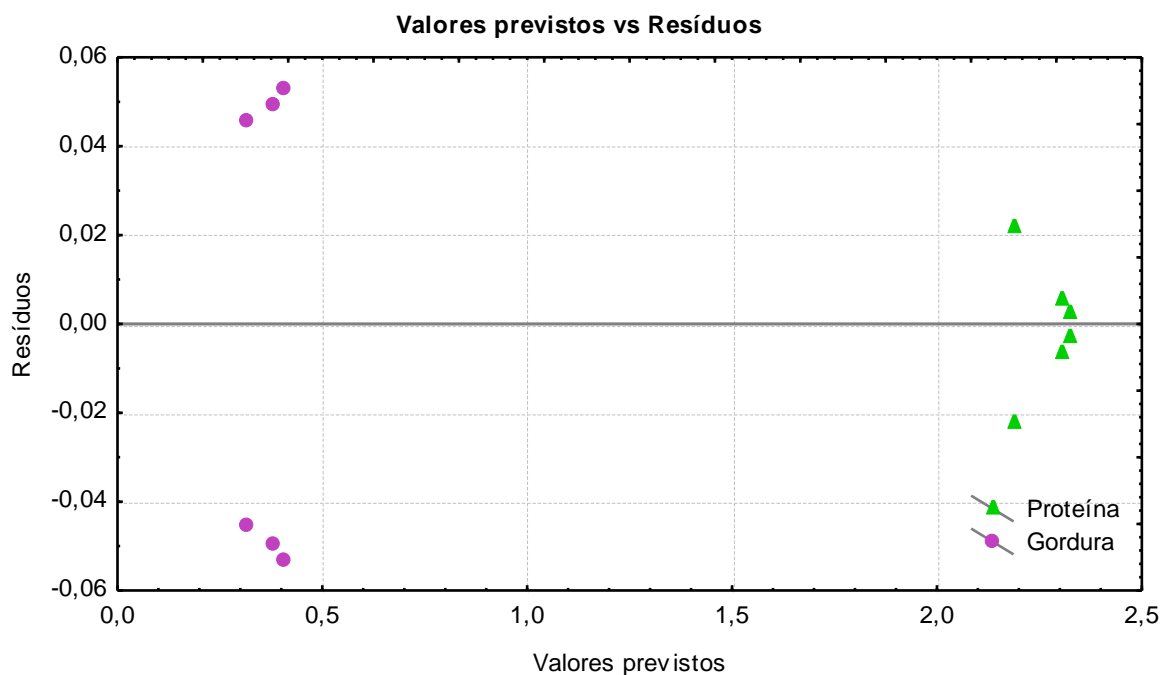


Figura F.15 – Verificação da homogeneidade da variância nas determinações do teor de proteína e gordura nas amostras de casca de arroz

Mais uma vez, os gráficos anteriores (Figura F.14 e Figura F.15) parecem indicar uma violação do pressuposto da homogeneidade da variância em todas as determinações realizadas. Com o teste de Levene, obtiveram-se resultados concordantes com o parecer anterior.

Anexo G – Análise de variância ao teste do DPPH*

Tabela G.1 – ANOVA para o teste do DPPH* realizadas às amostras de grão, farelo e casca de arroz

Fonte de variação		SS	g.l.	MS	F ₀	Sig. (p)
Grão	Entre variedades	0,030	2	0,014	193,440	0,000
	Erro (interior)	0,000	6	0,000		
	Total	0,029	8			
Farelo	Entre variedades	0,000	2	0,000	4,792	0,057
	Erro (interior)	0,000	6	0,000		
	Total	0,001	8			
Casca	Entre variedades	0,001	2	0,000	105,889	0,000
	Erro (interior)	0,000	6	0,000		
	Total	0,001	8			

Pela análise da ANOVA (Tabela G.1) pode-se concluir que existem diferenças significativas para $p < 0,05$ entre as diferentes variedades de grão e casca. Como tal, recorreu-se ao teste da menor diferença significativa (LSD) de modo a se determinar quais as variedades que apresentavam diferenças significativas entre si, Tabela G.2.

Tabela G.2 – Identificação das diferenças significativas pelo teste LSD

Parâmetros	Amostra (A)	Amostra (B)	Diferença entre médias ($ \bar{A} - \bar{B} $)	Sig. (p)
Grão	24	25	0,008	0,319
		26	0,116*	0,000
	25	26	0,124*	0,000
Casca	30	31	0,020*	0,000
		32	0,008*	0,002
	31	32	0,012*	0,000

*As diferenças entre as médias são significativamente diferentes para $p < 0,05$.

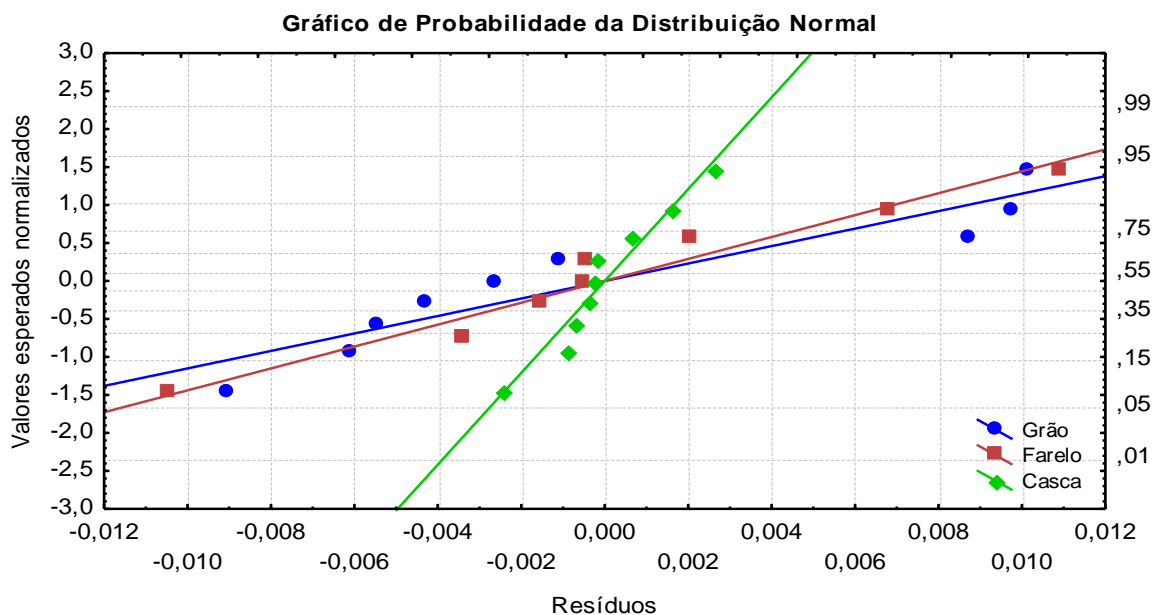


Figura G.1 – Verificação da normalidade para o teste do DPPH nas amostras de grão, farelo e casca de arroz

O gráfico anterior (Figura G.1) indica que o pressuposto da normalidade para o teste do DPPH nas amostras de grão, farelo e casca de arroz é satisfeito, uma vez que os resíduos se dispõem à volta da reta, não indicando uma violação dos pressupostos.

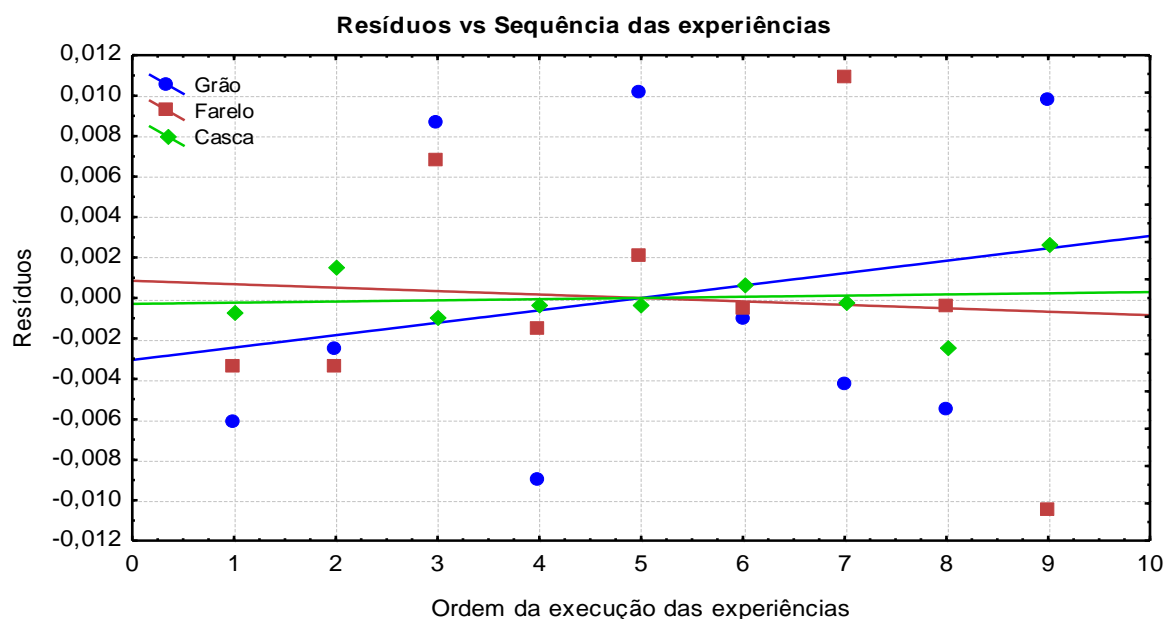


Figura G.2 – Verificação da independência para o teste de DPPH nas amostras de grão, farelo e casca de arroz

O gráfico dos resíduos em função da ordem aleatória de execução das experiências (Figura G.2) não parece mostrar qualquer violação aos pressupostos, uma vez que não se verifica qualquer tendência especial na disposição dos resíduos.

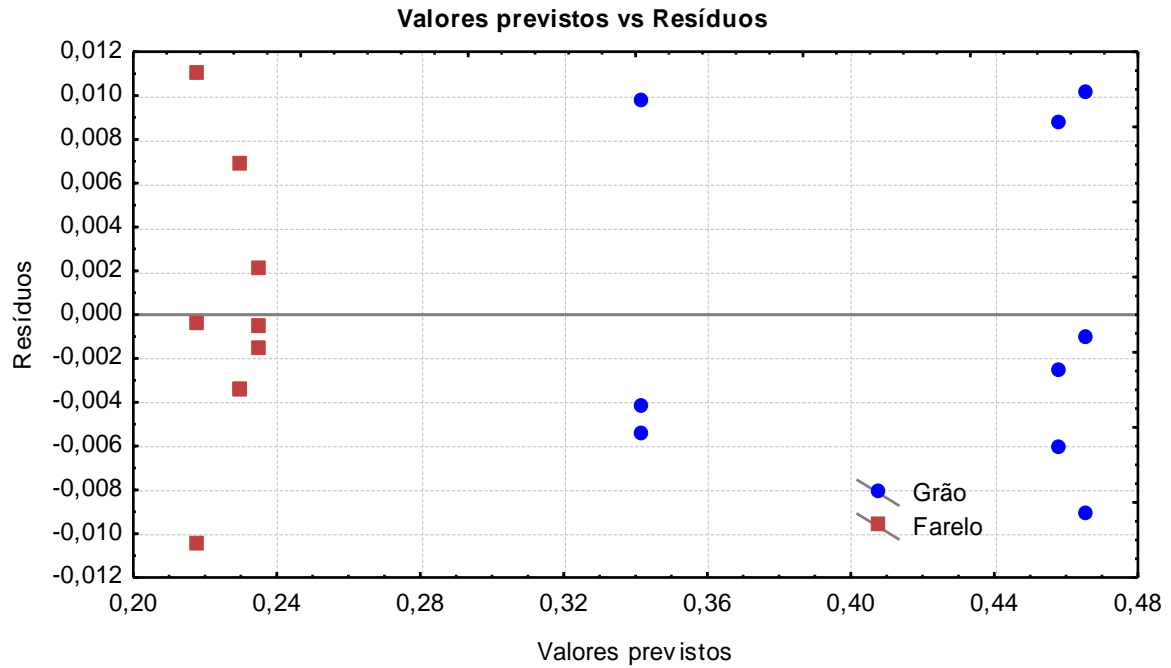


Figura G.3 – Verificação da homogeneidade da variância na determinação da capacidade antioxidante nas amostras de grão e farelo de arroz

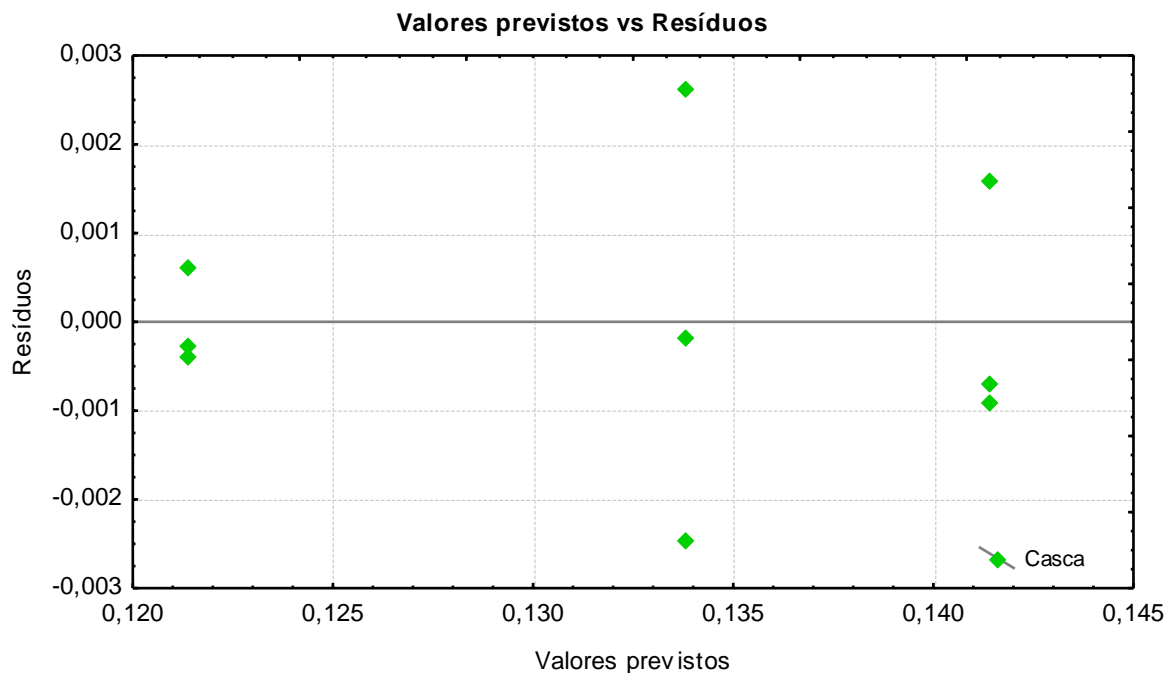


Figura G.4 – Verificação da homogeneidade da variância na determinação da capacidade antioxidante nas amostras de casca de arroz

Os gráficos anteriores (Figura G.3 e Figura G.4) não parecem indicar uma violação do pressuposto da homogeneidade da variância, uma vez que não se verifica uma estrutura especial. Pelo teste de Levene, o parecer anterior é verificado.

Anexo H – Análise de variância ao teste do TPC

Tabela H.1 – ANOVA para o teste do TPC realizadas às amostras de grão, farelo e casca de arroz

Fonte de variação		SS	g.l.	MS	F ₀	Sig. (p)
Grão	Entre variedades	0,002	2	0,001	83,995	0,000
	Erro (interior)	0,000	6	0,000		
	Total	0,002	8			
Farelo	Entre variedades	0,432	2	0,216	9,570	0,014
	Erro (interior)	0,135	6	0,023		
	Total	0,568	8			
Casca	Entre variedades	0,815	2	0,407	175,605	0,000
	Erro (interior)	0,014	6	0,002		
	Total	0,829	8			

Pela análise da ANOVA (Tabela H.1) pode-se concluir que existem diferenças significativas para $p < 0,05$ entre as diferentes variedades de grão, farelo e casca. Como tal, recorreu-se ao teste da menor diferença significativa (LSD) de modo a se determinar quais as variedades que apresentavam diferenças significativas entre si, Tabela H.2.

Tabela H.2 – Identificação das diferenças significativas pelo teste LSD

Parâmetros	Amostra (A)	Amostra (B)	Diferença entre médias ($ \bar{A} - \bar{B} $)	Sig. (p)
Grão	24	25	0,017*	0,001
		26	0,032*	0,000
	25	26	0,016*	0,001
Farelo	27	28	0,070	0,588
		29	0,436*	0,013
	28	29	0,496*	0,007
Casca	30	31	0,732*	0,000
		32	0,289*	0,000
	31	32	0,443*	0,000

*As diferenças entre as médias são significativamente diferentes para $p < 0,05$.

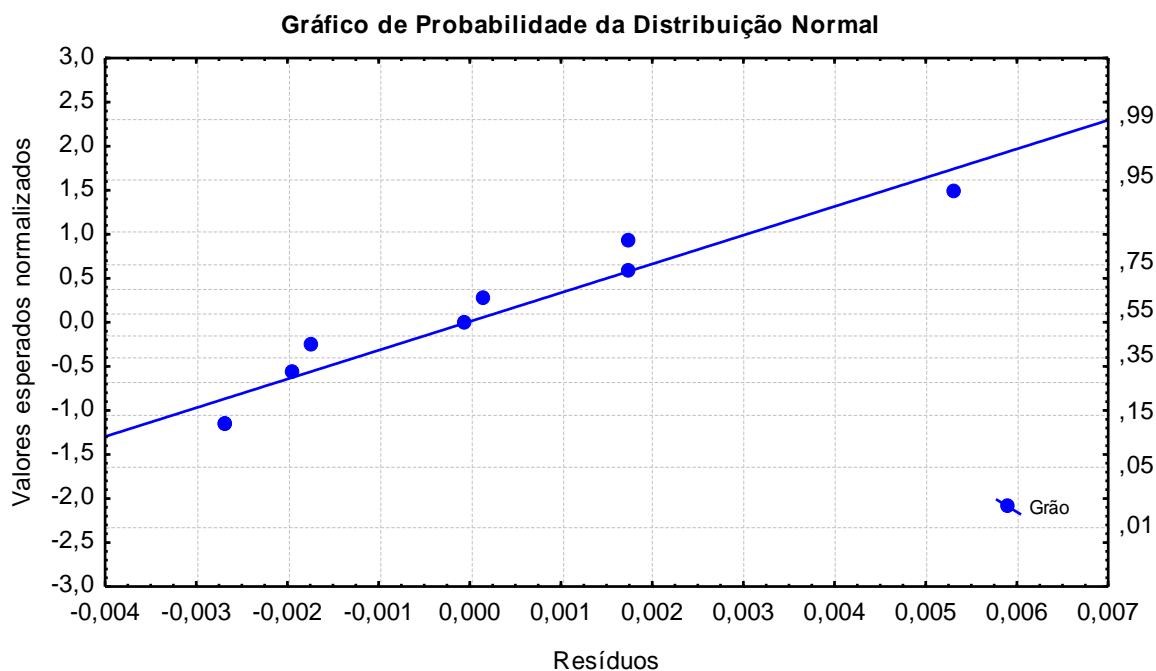


Figura H.1 – Verificação da normalidade para o teste do TPC nas amostras de grão de arroz

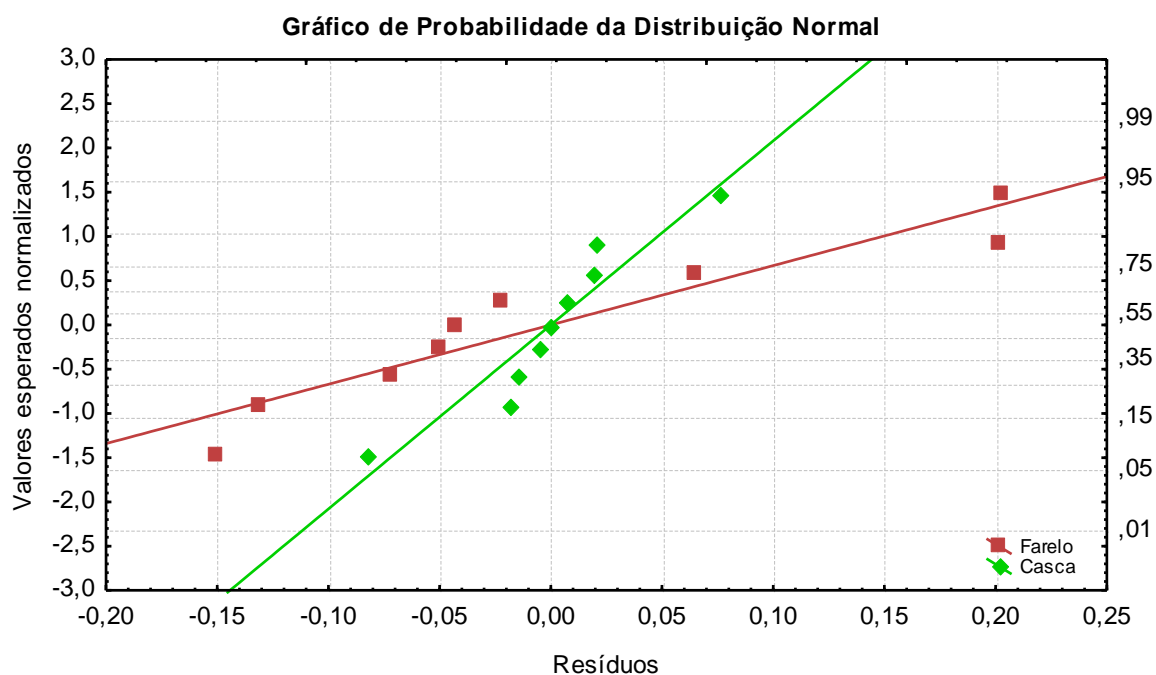


Figura H.2 – Verificação da normalidade para o teste do TPC nas amostras de farelo e casca de arroz

Os gráficos anteriores (Figura H.1 e Figura H.2) indicam que o pressuposto da normalidade para o teste do TPC nas amostras de grão, farelo e casca de arroz é satisfeito, uma vez que os resíduos se dispõem à volta da reta, não indicando uma violação dos pressupostos.

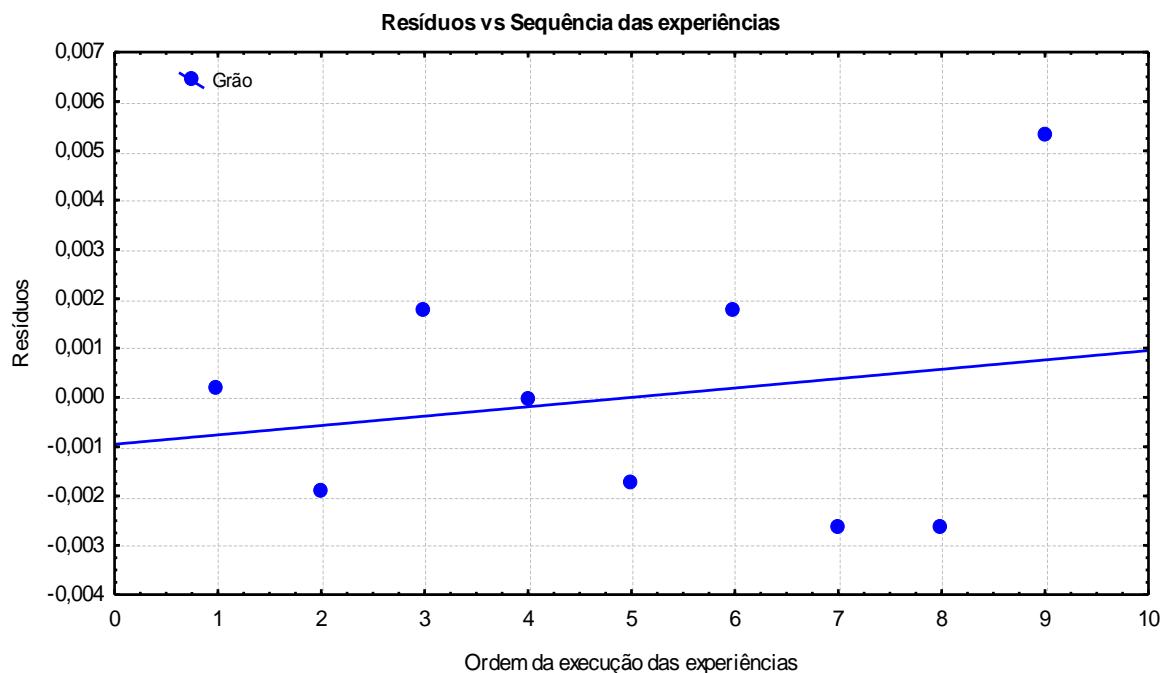


Figura H.3 – Verificação da independência para o teste de TPC nas amostras de grão de arroz

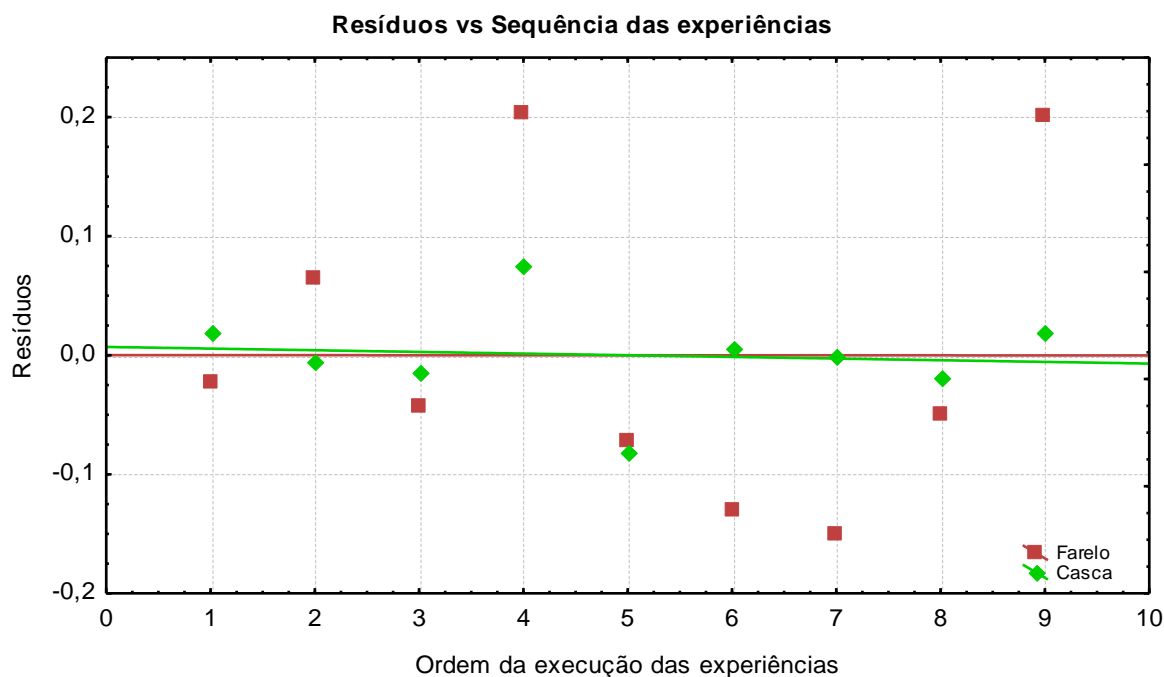


Figura H.4 – Verificação da independência para o teste de TPC nas amostras de farelo e casca de arroz

Os gráficos dos resíduos em função da ordem aleatória de execução das experiências (Figura H.3 e Figura H.4) não parecem mostrar qualquer violação aos pressupostos, uma vez que não se verifica qualquer tendência especial na disposição dos resíduos.

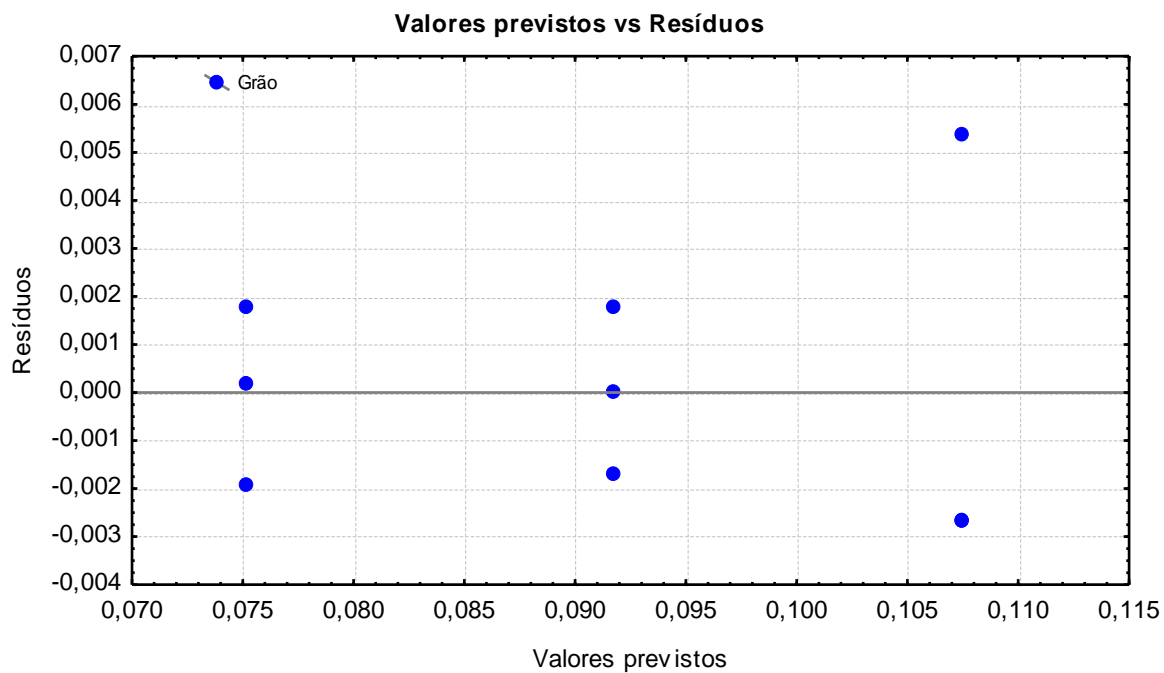


Figura H.5 – Verificação da homogeneidade da variância na determinação do TPC nas amostras de grão de arroz

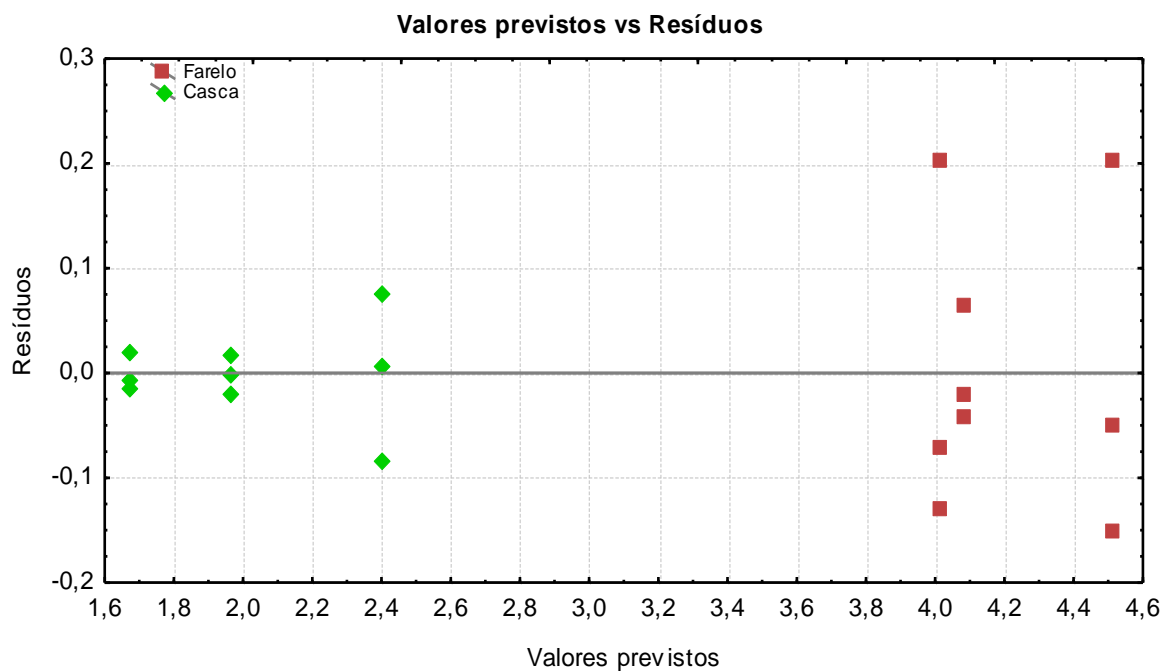


Figura H.6 – Verificação da homogeneidade da variância na determinação do TPC nas amostras de farelo e casca de arroz

Os gráficos anteriores (Figura H.5 e Figura H.6) não parecem indicar uma violação do pressuposto da homogeneidade da variância, uma vez que não se verifica uma estrutura especial. Pelo teste de Levene, o parecer anterior é verificado.

Anexo I – Preparação das soluções para o cálculo do IC₅₀ (outras amostras estudadas)

Cereais e Pseudocereais:

Tabela I.1 – Preparação das soluções de cereais e pseudocereais para o cálculo do IC₅₀

Solução de extrato (µL)		Metanol (µL)		Solução-mãe de DPPH' (mL)
MR, TS, PQ	A	MR, TS, PQ	A	
0	0	1000	1000	4
25	100	975	900	
50	250	950	750	
100	500	900	500	
175	750	825	250	
250	1000	750	0	

Mel:

Tabela I.2 – Preparação das soluções de mel para o cálculo do IC₅₀

Solução de extrato (µL)	Metanol (µL)	Solução-mãe de DPPH' (mL)	
0	1000		4
100	900		
250	750		
500	500		
750	250		
1000	0		

Oca:

Tabela I.3 – Preparação das soluções de oca para o cálculo do IC₅₀

Solução de extrato (µL)				Metanol (µL)				Solução-mãe de DPPH' (mL)
OB, OO	OA, OM	OR	OC	OB, OO	OA, OM	OR	OC	
0	0	0	0	1000	1000	0	1000	4
50	25	50	50	950	975	50	950	
100	50	100	100	900	950	100	900	
150	75	150	150	850	925	150	850	
200	100	200	175	800	900	200	825	
250	150	300	200	750	850	300	800	
300	200	400	250	700	800	400	750	