

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

Ana Catarina Jorge Semedo

*Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos
Alimentos*

2011/2012

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

Ana Catarina Jorge Semedo

Orientador: Professora Doutora Maria do Rosário Bronze
Co-orientadora: Doutora Ana Matias

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa para
obtenção do grau de Mestre em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos

2011/2012

Agradecimentos

A realização deste trabalho, foi possível graças à colaboração de várias pessoas, às quais gostaria de expressar os meus agradecimentos.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Professora Maria do Rosário Bronze, por me ter acompanhado de forma incansável, agradeço também a sua orientação, disponibilidade, apoio e a sua paciência.

À Doutora Ana Matias pelo apoio e disponibilidade apresentado durante todo o trabalho.

Ao Professor Luis Vilas Boas, pela sua infindável paciência, pelos seus conhecimentos, pelo encorajamento e pela sua boa disposição e vontade de ajudar.

À Ana Teresa Mata e ao João Ferreira, um ENORME obrigado, pela ajuda, apoio, pela amizade, pelos momentos bem passados e por todo o incentivo que sempre demonstraram.

À Professora Doutora Noélia Duarte pela ajuda prestada em algumas fases do trabalho.

A todas as pessoas do laboratório da Química Analítica um muito obrigado. À Joana Antunes, pela enorme ajuda e disponibilidade, pelas conversas e pelos momentos divertidos. À Elsa Mecha, um obrigado pela sua constante boa disposição e “áurea” limpa, pela sua ajuda e apoio. À Carla Graça, que teve um trabalho bastante importante e difícil, no contato inicial com o HPLC-DAD ☺. Ao professor Antero, um obrigado pelo apoio, pelas palavras amigas, pela boa disposição e pela partilha dos seus conhecimentos. Gostaria também de agradecer à Doutora Catarina Duarte, à Doutora Teresa Serra, às Mestres Joana Poejo e Sara Nunes, o apoio prestado em todas as fases do trabalho.

Gostaria de agradecer também à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pelo financiamento do projeto PTDC/AGR-AAM/099645/2008 (BioNIO- Ingredientes bioactivos extraídos de *Opuntia spp.* Valorização das plantas do Alentejo) com vista à valorização de *Opuntia* a partir da extracção de compostos bioactivos e financiamento do equipamento de LC-MS/MS no âmbito do projeto REDE/1518/REM2005.

Agradeço ao ITQB por me terem proporcionado as condições para que o trabalho apresentado fosse devidamente efetuado.

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

A toda a minha família, em especial à minha mãe, pelo apoio e incentivo sempre prestados. Por ser a mãe que sempre foi, e por “aturar” por vezes dias menos bons. Obrigado por tudo, espero um dia conseguir retribuir. Aos meus avós, tios e primos, em especial à Célia, Dulce e Rui, que sempre acreditaram em mim, e sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos.

Ao Zé, pelo seu apoio incondicional e compreensão. Por me ter ouvido quando precisei, e por me arrancar sorrisos e gargalhadas quando os dias corriam menos bem, muito obrigado por estares sempre lá.

À minha grande amiga Maria Belo, que fez estes 6 anos terem mais alegria, boa disposição, mais palavras amigas, mais felicidade, mais companheirismo e melhores momentos. Obrigado por seres quem és, e pela força que sempre me transmitiste em tudo “Leva-me contigo na palma da tua mão”.

À Sara Garcia, amiga de longa data, que esteve sempre presente, obrigado pela tua sempre boa disposição, pelo apoio e incentivo em todas as fazes da minha vida, obrigado pela nossa amizade. Um obrigado a todos os meus amigos, que de uma forma ou de outra foram muito importantes e sempre me apoiaram em tudo, um obrigado especial à Filipa Silva, Cláudia Garcia, Ana Cesteiro, Mara Marques e Cátia Balola.

Obrigado ao grupo dos 5 (Sofia Silva, André Monho, Inês Eduardo) que de uma maneira ou de outra estiveram sempre presentes, na minha vida e também neste percurso.

Por último, mas não menos importante, um obrigado à turma fantástica de mestrado da faculdade de farmácia, foram excepcionais, sem vocês teria sido tudo muito mais difícil.

Muito obrigado a todos :)

Resumo

A espécie *Opuntia*, da família *Cactaceae*, originária das altas montanhas vulcânicas do México (Centro e Sul), tem vindo a ser cada vez mais, alvo de estudos. Pensa-se que os compostos fenólicos já identificados nesta espécie podem ser responsáveis pela atividade antioxidante, anti-inflamatória, hipoglicemiante, anticancerígena e neuroprotetiva, entre outras, atribuídas a esta espécie.

O trabalho que se apresenta foi efetuado no âmbito do projeto BioNIO- Ingredientes bioactivos extraídos de *Opuntia spp.* Valorização das plantas do Alentejo (PTDC/AGR-AAM/099645/2008) com vista à valorização de *Opuntia*.

O principal objetivo deste trabalho consistiu na identificação e quantificação de alguns compostos (compostos fenólicos e betalaínas), presentes em sumos e extratos de *Opuntia* e a avaliação do efeito de digestão (simulação in vitro) na composição destas amostras. Paralelamente usaram-se ensaios químicos para correlacionar a atividade biológica de todas as amostras com a sua composição. Efectuaram-se também ensaios de optimização de condições de extracção (com solventes e com líquido pressurizado) a partir de resíduos de *Opuntia*.

Utilizaram-se diferentes metodologias de análise que permitiram a determinação do teor em fenóis totais e flavonóides totais, bem como a análise individual de alguns compostos por cromatografia líquida associada a diferentes modos de deteção. A atividade biológica dos sumos, nomeadamente a atividade antioxidante foi relacionada com a composição química das mesmas amostras.

No âmbito deste trabalho procedeu-se ainda ao tratamento dos extratos com resina Amberlite, com vista à sua concentração.

Foi possível identificar nas amostras compostos pertencentes a diferentes famílias, tendo em conta o seu espectro de absorção, ião molecular e padrão de fragmentação. Foram comparadas amostras provenientes de diferentes zonas do país (Beja, Marvão, Sines, Elvas, Tramagal, Sesimbra e Quarteira). Os resultados mostram que os sumos de *Opuntia spp.* são uma fonte importante de compostos fenólicos e betalaínas. Entre os compostos detetados salientam-se: ácido piscídico, eucómico e flavonóis de família de

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

isoramnetina e quercetina, bem foram identificadas várias betalaínas. A atividade antioxidante dos sumos parece estar relacionada com a composição em flavonóis e ácido piscídico.

Após o processo de digestão *in vitro* verificaram-se alterações na composição química dos sumos, nomeadamente nas amostras de Beja e Marvão. Os resultados obtidos nas diferentes amostras apresentaram alguma variabilidade o que poderá ser atribuído às características destas matrizes..

Paralelamente foram otimizadas as condições de extração a partir de resíduos de *Opuntia*, utilizando diferentes soluções extratantes (água, etanol, enzima e ácido ascórbico). Procedeu-se também à preparação de diferentes extratos utilizando o processo de extração com líquido pressurizado e diferentes soluções. Os resultados mostraram que foi a fração 5 (constituída por 30% CO₂, 40% EtOH e 30% H₂O) que possui o maior teor de fenóis totais e a fração 4 (constituído 30% CO₂ e 70% EtOH) a menor. Foi determinada a atividade antioxidante de cada um dos extratos. Os resultados permitiram concluir que o extracto 2 preparado com 60% CO₂ e 40% EtOH será o mais promissor para a obtenção de um extrato com bioatividade.

Palavras-chave: *Opuntia spp.*, Atividade antioxidante, polifenóis, stress oxidativo, HPLC, flavonóides, betalaínas.

Abstract

The species *Opuntia*, family Cactaceae, native of the high volcanic mountains of Mexico (Central and South), has been increasingly the focus of studies. It is believed that the phenolic compounds have been identified in this species can be responsible for antioxidant activity, antiinflammatory, hypoglycemic agents, anticancer and neuroprotective, among others, assigned to this species. The work presented was performed under the project BioNIO-bioactive ingredients extracted from *Opuntia spp.* Valuing plants in the Alentejo (PTDC/AGR-AAM/099645/2008) for recovery of *Opuntia*. The main objective of this study was the identification and quantification of compounds (phenolics and betalains), present in juices and extracts of *Opuntia* and evaluation of the effect of digestion (in vitro simulation) in the composition of these samples. Parallel chemical assays were used to correlate the biological activity of all samples with their composition. We also made trials to optimize the extraction conditions (solvent and pressurized liquid) from residues of *Opuntia*. We used analysis of different methods that allowed the determination of the content of flavonoids and phenolic compounds, as well as the individual analysis of some compounds by liquid chromatography combined with various modes of detection. The biological activity of juices, including the antioxidant activity was related to the chemical composition of the same samples.

In this work we proceeded to the treatment of the extracts with Amberlite with a view to its concentration. It was possible to identify compounds in the samples belong to different families, having regard to its absorption spectrum, and the molecular ion fragmentation pattern. We compared samples from different parts of the country (Beja, Marvão, Sines, Elvas, Tramagal, Sesimbra and Quarteira). The results show that the juice of *Opuntia spp.* is a major source of phenolic compounds and betalains. Among the compounds detected are emphasized: piscídico acid, eucomic acid and flavonols from the family of isorhamnetin and quercetin, were identified and various betalains. The antioxidant activity of juices seems to be related to the composition in piscídico acid and flavonols. After in vitro digestion process there have been changes in the chemical composition

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

of juices, especially in samples of Beja and Marvão. The results obtained in different samples showed some variability which may be attributed to the characteristics of these matrices.

At the same time the extraction conditions were optimized from waste of *Opuntia*, solutions using different extractants (water, ethanol, enzyme and ascorbic acid). The procedure was also different for the preparation of extracts using the extraction process with pressurized liquid and different solutions. The results showed that the fraction was 5 (consisting of 30% CO₂, 40% EtOH and 30% H₂O) which has the highest total phenolic content and fraction 4 (comprising 30% CO₂ and 70% EtOH) the lowest. We determined the antioxidant activity of each of the extracts. The results showed that the extract 2 prepared with 60% CO₂ and 40% EtOH is the most promising for obtaining an extract with bioactivity.

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

Keywords: *Opuntia spp.*, antioxidant activity, polyphenols, oxidative stress, HPLC, flavonoids, betalains.

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	vi
Índice geral	viii
Índice de figuras	xi
Índice de tabelas	xvi
Abreviaturas	xviii
1. Objetivos do trabalho desenvolvido	1
2. Introdução	3
2.1 Generalidades sobre <i>Opuntia ficus indica</i>	4
2.1.1 Descrição da planta <i>Opuntia ficus indica</i>	4
2.1.2 Características e composição química dos cládodos	5
2.1.3 Características e composição química dos frutos	7
2.1.4 Características e composição química das flores	7
2.2 Compostos fenólicos presentes em <i>Opuntia spp</i>	8
2.2.1 Flavonóides	10
2.2.2 Compostos fenólicos e Stress oxidativo	11
2.3 Betalaínas em <i>Opuntia spp</i>	13
2.4 Metodologias instrumentais para análise de compostos fenólicos e betalaínas	14
2.4.1 Determinação de teores de fenóis, flavonóis e betalaínas totais	
2.4.2 Análise por cromatografia líquida	17
2.4.3 Métodos de preparação de amostras	18
2.4.3.1 Resina Amberlite XAD16	18
2.4.3.2 Extração com líquido pressurizado (ELP)	18
2.4.3.3 Fracionamento em Sephadex LH-20	19
2.5 Simulação do processo de digestão, ensaios <i>in vitro</i>	20
3 Materiais e métodos	22
3.1 Reagentes	23

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

3.1.1	Análise cromatográfica	23
3.1.2	Atividade antioxidante	23
3.1.3	Digestão de amostras <i>in vitro</i>	23
3.1.4	Preparação de extratos de sumo rico em polifenóis (ERPs)	
3.1.5	Determinação do teor de fenóis totais	24
3.1.6	Determinação do teor em flavonóides totais	24
3.1.7	Cultura de células	24
3.1.7.1	Inibição da formação de ROS	24
3.1.7.2	Inibição da oxidação de glutatona e proteínas	24
3.2	Amostras	25
3.2.1	Preparação dos sumos	27
3.2.2	Ensaio de digestão <i>in vitro</i>	28
3.2.3	Preparação de extratos por método de adsorção (ERPs)	28
3.2.4	Fracionamento de sumos com Sephadex LH-20	28
3.2.5	Preparação de extratos	29
3.2.5.1	Extração sólido-líquido	29
3.2.5.2	Extração com líquido pressurizado (ELP)	29
3.3	Metodologias de análise	30
3.3.1	Determinação espectrofotométrica	30
3.3.1.1	Determinação do teor em fenóis totais pelo método de Folin	30
3.3.1.2	Determinação do teor em flavonóides totais pelo método espectrofotométrico	
3.3.1.3	Determinação do teor em betalainas	31
3.3.2	Cromatografia líquida de alta eficiência	31
3.3.2.1	HPLC-DAD-ED	31
3.3.2.2	HPLC-MS/MS	33
3.3.2.2.1	Otimização do método de MRM	34
3.3.3	Determinação da Atividade antioxidante (AA)	35
3.3.3.1	Método de ORAC	35

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

3.3.3.2	Método de HORAC	36
3.3.4	Cultura de células	36
3.3.4.1	Ensaio de toxicidade	36
3.3.4.2	Inibição da formação de ROS	37
3.3.4.3	Inibição da oxidação de glutatona	38
3.3.4.4	Inibição da oxidação de proteínas	39
4	Resultados e discussão	41
4.1	Caraterização química de sumos por HPLC-MS/MS	42
4.1.1	Análise quantitativa de MRM	59
4.1.2	Separação de frações em Sephadex LH-20	62
4.2	Comparação de sumos de <i>Opuntia spp</i> de diferentes origens	65
4.2.1	Determinação do teor em fenóis e flavonóides totais	68
4.2.2	Avaliação da AA pelo método de ORAC e HORAC	70
4.2.3	Correlação entre a composição química e resultados da actividade biológica	70
4.3	Ensaio de simulação da digestão <i>in vitro</i>	72
4.3.1	Determinação do teor em fenóis e flavonóides totais	77
4.3.2	Análise da atividade antioxidante (ORAC e HORAC)	79
4.4	Concentração de extratos por adsorção (ERPs)	80
4.4.1	Determinação de teor em fenóis totais	84
4.4.2	Avaliação da capacidade antioxidante pelos métodos químicos (ORAC e HORAC)	85
4.4.3	Determinação da atividade antioxidante intracelular	85
4.5	Comparação da composição química de extratos de resíduos	
	Preparados de diferentes modos	88
4.5.1	Extração sólido-líquido	88
4.5.2	Extração líquido pressurizado (ELP)	93
4.5.2.1	Determinação do teor em fenóis totais	93
4.5.2.2	Avaliação da capacidade antioxidante	98
5	Conclusões	100
6	Referências bibliográficas	104
	Anexos I	113

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

Anexos II	115
Anexos III	118

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

Índice de Figuras

Figura 1	Pág 5	Imagens de <i>Opuntia spp.</i> , cladado (A), fruto(B), flor(C) e cacto (D)
Figura 2	Pág 6	Estruturas químicas do ácido cítrico, málico, piscídico, eucómico, fórbico, n-butileucomato e metileucomato
Figura 3	Pág 8	Classificação de compostos fitoquímicos
Figura 4	Pág 9	Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóico(a) e hidroxicinâmicos (b)
Figura 5	Pág 10	Estrutura química dos flavonóides
Figura 6	Pág 11	Estrutura química de alguns flavonóis
Figura 7	Pág 12	Bioatividade de polifenóis
Figura 8	Pág 13	Esquema representativo de ativadores e inibidores na produção de ROS
Figura 9	Pág 14	Estrutura do ácido betalâmico
Figura 10	Pág15	Estruturas químicas das betaxantinas e betacianinas
Figura 11	Pág 18	Estrutura química da resina Amberlite XAD16
Figura 12	Pág 21	Diferenças de pH durante o processo de digestão
Figura 13	Pág 29	Esquema representativo do fracionamento com Sephadex
Figura 14	Pág 34	Equipamento de HPLC-MS/MS
Figura 15	Pág 43	Perfis cromatográficos do sumo de Marvão analisado a 280nm,360nm,480nm e 535nm (A) por HPLC-MS e HPLC-DAD (B) a diferentes comprimentos de onda (280 nm,360nm, 480nm e 535nm)
Figura 16	Pág 47	Comparação de perfis cromatográficos do ácido málico, cítrico e quínico
Figura 17	Pág 48	Espectro de MS/MS do ião molecular 133 identificado

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

		como ácido málico
Figura 18	Pág 49	Comparação de espectros de absorção do ácido piscídico e seus derivados
Figura 19	Pág 50	Espetro de MS/MS do ião molecular 255 identificado como ácido piscídico, em modo positivo (A) e negativo (B)
Figura 20	Pág 51	Espetro de MS/MS do ião molecular 239 identificado como ácido eucómico
Figura 21	Pág 52	Espetro de MS/MS do ião molecular 179 identificado como ácido cafeíco
Figura 22	Pág 53	Comparação de espectros de absorção de flavonóis presentes na amostra
Figura 23	Pág 54	Cromatograma de MS/MS do ião molecular 623 Identificado como isoramnetina rutinósido e padrão
Figura 24	Pág 55	Espetro de MS/MS do ião molecular 315 identificado como isoramnetina e seu padrão
Figura 25	Pág 56	Espetros MS/MS do composto identificado como (A) Isoramnetina 3-O-rutinósido, (B) isoramnetina 3-O-lix-glu, (C) isoramnetina-ram-lix-glu e (D) isoramnetina rut-ram
Figura 26	Pág 57	Estrutura de derivados da isoramnetina
Figura 27	Pág 58	Estrutura da indicaxantina e respetivo espetro de MS/MS do ião m/z 309
Figura 28	Pág 58	Espetro de MS/MS do ião m/z 551 correspondente à Betanina (A) e seu isómero (B)
Figura 29	Pág 62	Sobreposição de perfis cromatográficos referentes à fração F2 (fração de quarteira) a 280nm, 360, 480nm e 535nm
Figura 30	Pág 63	Sobreposição de perfis cromatográficos referentes à fração F3 (fração álcool) a 280nm e 360nm
Figura 31	Pág 64	Sobreposição de perfis cromatográficos referentes à

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

		fração F4 (fração de acetato de eitol) a 280nm e 360nm
Figura 32	Pág 66	Sobreposição de cromatogramas das diferentes amostras, Tramagal (1), Beja (2), Marvão (3), Sines (4) e Sesimbra (5) a 280nm
Figura 33	Pág 67	Espectro de absorção do ácido piscídico detetado na amostra de Beja
Figura 34	Pág 69	Deteção dos compostos obtidos por detetor Eletroquímico para os cinco sumos; Tramagal, Beja, Marvão, Sines e Sesimbra em sobreposição com cromatograma da amostra de sumo de Marvão a 280nm
Figura 35	Pág 71	Correlação entre teor em fenóis totais e atividade antioxidante determinada pelos métodos de ORAC e HORAC.
Figura 36	Pág 71	Correlações ácido succínico, ácido piscídico e composto 6 com ORAC e HORAC
Figura 37	Pág 73	Comparação das áreas totais dos cromatogramas a 280nm e 360nm dos sumos antes e após digestão <i>in vitro</i>
Figura 38	Pág 74	Perfis cromatográficos da amostra de Marvão antes e após a digestão a 280nm (A) e 360nm (B)
Figura 39	Pág 75	Perfis cromatográficos da amostra de Sines antes e após a digestão a 280nm (A) e 360nm (B)
Figura 40	Pág 77	Perfis cromatográficos da amostra de Marvão antes e após a digestão a 480nm (C) e 535nm (D)
Figura 41	Pág 79	Sobreposição de cromatogramas de sumo de Marvão antes do processo de digestão (A) a 280nm e 360nm e após processo de digestão(B) a 280nm e 360nm obtidos após análise por HPLC-MS/MS
Figura 42	Pág 82	Sobreposição de cromogramas de <i>Opuntia</i> Tramagal, Beja com e sem casca, Marvão com e sem casca, sujeitas a extração com resina e 280nm
Figura 43	Pág 83	Sobreposição de cromatogramas de <i>Opuntia</i> Sines com casca, Elvas sem casca, Quarteira sem casca e Sesimbra

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

		com casca, sujeitas a extração com resina, a 280nm
Figura 44	Pág 86	Efeito nos radicais peróxido e hidroxilo após ensaios de pré e co-incubação
Figura 45	Pág 87	Efeito do extrato de Beja na relação GSH e GSSG
Figura 46	Pág 88	Papel do extrato na oxidação de proteínas medida pela formação de proteínas carbonilo
Figura 47	Pág 90	Sobreposição dos cromatogramas referentes aos vários extratantes água, água:etanol, etanol, água:enzima e água:ác ascórbico (A); Sobreposição de cromatogramas referentes às soluções compostas por água, água:enzima e água:ác ascórbico (B)
Figura 48	Pág 92	Deteção de compostos obtidos por detetor eletroquímico das amostras de água, água:etanol, etanol, água:enzima e água:ác ascórbico
Figura 49	Pág 93	Polifenóis totais obtidos para o resíduo de Beja por ELP
Figura 50	Pág 94	Sobreposição de cromatogramas das várias frações (1,2, 3,4,5,6,7,8,9 e 10) a 280nm(A) e 360nm(B)
Figura 51	Pág 96	Sobreposição de cromatogramas referentes às frações 2 (60% CO ₂ e 40% EtOH) e fração 4 (30% CO ₂ e 70% EtOH)
Figura 52	Pág 96	Sobreposição de cromatogramas referentes às frações 5 (30% CO ₂ e 40% EtOH e 30%) e fração 6 (70% EtOH e 30% H ₂ O)
Figura 53	Pág 97	Sobreposição de cromatogramas referentes às frações 7 (10% CO ₂ e 80% EtOH e 10% H ₂ O) e fração 8 (50% EtOH, 40% CO ₂ e 10% H ₂ O)
Figura 54	Pág 97	Sobreposição de cromatogramas referentes às frações 9 (10% CO ₂ e 50% EtOH e 40% H ₂ O) e fração 10 (60% EtOH, 20% CO ₂ e 20% H ₂ O)
Figura 55	Pág 98	Capacidade antioxidante para as várias frações de resíduo de Beja

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

Índice de Tabelas

Tabela 1	Pág 26	Conjunto de amostras analisadas ao longo do trabalho
Tabela 2	Pág 30	Extratos obtidos a partir de resíduo de Beja utilizando ELP
Tabela 3	Pág 32	Gradiente de eluentes utilizado na análise por HPLC-DAD-ED
Tabela 4	Pág 33	Gradiente de eluentes utilizado na análise por HPLC-MS/MS
Tabela 5	Pág 34	Condições de análise do método de MRM
Tabela 6	Pág 35	Gradiente de eluentes utilizado na análise
Tabela 7	Pág 35	Curvas de calibração para os diferentes compostos em estudo
Tabela 8	Pág 46	Identificação de compostos nas amostras de sumo <i>Opuntia spp</i> por LC-MS/MS
Tabela 9	Pág 59	Condições de MRM dos compostos em ESI
Tabela 10	Pág 60	Quantificação da amostra de <i>Opuntia</i>
Tabela 11	Pág 65	Teores de betalainas obtidas para as três frações. F2 fração de amostra evaporada, F3 fração álcool, F4 fração de acetato de etilo
Tabela 12	Pág 68	Valores obtidos para as áreas (280 e 360nm), razão entre áreas, concentração de fenóis totais, expressos em ácido gálgico (mg GAE/L) e flavonóides expressos em catequina (mg CE/L) e por HPLC. Os flavonóides são quantificados por método colorimétrico (mg CE/L)
Tabela 13	Pág 70	Valores referentes ao método de ORAC e HORAC
Tabela 14	Pág 78	Área total (280nm e 360nm), respetiva razão, teor em fenóis totais, expressos em ácido gálgico (ppm)
Tabela 15	Pág 78	Respetivas razões obtidas para as amostras a 280nm e 360nm antes e após processo de digestão <i>in vitro</i>
Tabela 16	Pág 80	Atividade antioxidante (ORAC e HORAC) em amostras sujeitas a digestão

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

Tabela 17	Pág 84	Áreas totais (280nm e 360nm), razão das respetivas áreas e teor em fenóis totais, expressos em ácido gálgico(ppm)
Tabela 18	Pág 85	Valores referentes a atividade antioxidante pelo método de ORAC e HORAC
Tabela 19	Pág 91	Valores obtidos para as áreas totais a 280nm e 360nm, razão entre áreas e respetivas concentrações em fenóis totais expressos em ácido gálgico (ppm)

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

Abreviaturas

μM	micromole
AA	Actividade Antioxidante
AAPH	Dicloridrato de 2',2'-Azobis (2-amidinopropano)
AD	Doença de Alzheimer
ADN	Ácido desoxirribonucleico
c.d.o	Comprimento de Onda
Caco-2	Células de carcinoma do colorectal humano
CAEAC	Capacidade antioxidante por equivalentes de ácido cafeico
DAD	Detetor de Diodos
DCFH-DA	2',7'- diacetato diclorofluorescina
DNPH	2,4- dinitrofenilidrazina
ED	Detetor eletroquimico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ESI	Eletrospray
EtOH	Etanol
FBS	Soro fetal de bovino
FD	Fator de diluição
FDA	Food and Drug Administration
FF	Peso Fruto Fresco
FL	Fluoresceína dissódica
g	grama
GAE	Equivalentes de ácido gálico
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione
GSSG	Forma reduzida da Glutathione
HBSS	Solução salina tamponada Hank's
HORAC	Capacidade antioxidante do radical hidroxilo
HPLC	Cromatografia liquida de alta eficiência
M	Molar
<i>m/z</i>	Relação massa/carga de um ião

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
MPa	MegaPascal
MS	Espectometria de massa
n.i	não identificado
nm	nanómetro
°C	graus centigrados
OPA	Ortoftaldeído
ORAC	Capacidade Antioxidante do Radical Oxigénio
PA	Ácido Picolinico
PBS	Solução tampão fosfato
PLE	Extração líquida pressurizado
PREs	Extratos ricos em polifenóis
ROO [•]	Radicais peroxil
ROS	Espécies reativas de oxigénio (<i>Reactive oxygen species</i>)
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TEAC	Capacidade antioxidante em equivalentes de trolox
TEMED	N,N,N',N' - Tetrametiletilenodiamina
TMB	3,3',5,5' - Tetrametilbenzina
t _r	Tempo de retenção
Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-acido carboxilico
UV	ultravioleta

1. Objetivos do trabalho desenvolvido

Este trabalho está englobado no projeto PTDC/AGR-AAM/099645/2008 (BioNIO-Ingredientes bioactivos extraídos de *Opuntia ficus indica*. Valorização das plantas do Alentejo) e tem como objetivos principais: (i) a caracterização química (em compostos fenólicos e betalaínas) dos sumos de *Opuntia*; (ii) relacionar a composição com a atividade biológica detetada nesses mesmos sumos; (iii) prever alterações na sua composição química após a ingestão do sumo; (iv) determinar quais as melhores condições de extração de compostos bioativos a partir de resíduos.

Em face destes objetivos o trabalho foi delineado da seguinte forma:

1. Preparação de sumos de *Opuntia spp* e sua caracterização em compostos fenólicos e betalaínas;
2. Avaliação da atividade biológica de sumos de diferentes proveniências e correlação com a sua composição;
3. Simplificação do sumo por fracionamento numa coluna de Sephadex LH-20 e resinas de Amberlite XAD16;
4. Efeito das condições de digestão no estômago e intestino, na composição química e atividade biológica de sumos: simulação de digestão *in vitro*;
5. Análise de extratos de resíduos de *Opuntia spp* com diferentes metodologias (extração sólido-líquido e extração com líquido pressurizado);
6. Avaliação da atividade biológica dos extratos de resíduos preparados em diferentes condições.

Para a identificação e quantificação dos compostos, foram utilizados métodos espectrofotométricos e técnicas separativas como a cromatografia líquida com diferentes modos de deteção, nomeadamente detetor de díodos, eletroquímico e de espectrometria de massa. De forma a avaliar a atividade antioxidante recorreu-se ao método de ORAC e HORAC. As amostras foram sujeitas a um processo de preparação com resina e os resultados foram ainda comparados tendo em conta a formação de espécies reativas de oxigénio e inibição da oxidação de glutathiona e proteínas.

De salientar que alguns ensaios foram efectuados por outras equipas do projecto, nomeadamente a digestão das amostras *in vitro*, a extração com líquido pressurizado, o estudo da formação de espécies reativas, tendo no âmbito desta tese, sido feita a caracterização das amostras com as metodologias já referidas.

2. Introdução

2.1 Generalidades sobre *Opuntia ficus indica*

Opuntia é uma planta xerófila que compreende cerca de 200-300 espécies e cresce principalmente em zonas áridas e semi-áridas, no entanto apenas 10 a 12 espécies são utilizadas pelo Homem, para produção de alimentos e corantes (Stintzing, F.C, *et al.*, 2005; Sáenz, C *et al.*, 2006). Esta planta pertence ao Reino Plantae, Classe *Dicotyledonea*, Subclasse *Dialipetalas*, Ordem *Caryophylales*, Família *Cactaceae*, Género *Opuntia*. O seu nome científico foi atribuído por Tourneford em 1700, devido à sua semelhança com uma planta espinhosa que crescia numa cidade da Grécia, *Opus* (Sáenz, C *et al.*, 2006).

Em diferentes países são atribuídas denominações comuns diferentes a *Opuntia ficus indica*: em Espanha denomina-se *higo de Índicas*, em Portugal *Figo da Índia*, *Figueira da Índia*, *Piteira* ou *Figo do Diabo*, em Itália *Fico d'Índia*, França *Figue de Barbarie*, EUA e África do Sul *Prickly pear* ou *Cactus pear* e no Brasil *Palma* Forrageira.

Devido à sua variabilidade genética esta planta possui uma grande adaptabilidade podendo ser encontrada em locais com climas diferentes, como o continente de África, América e Austrália. Esta grande adaptabilidade ao clima é uma das suas principais características.

Opuntia ficus indica é conhecida por ser uma fonte importante de compostos bioativos, como betalaínas, polifenóis, carotenóides, vitamina C e sais minerais (Utkarsha, S *et al.*, 2010; Cayupan, Y *et al.*, 2011) e tem sido considerada como uma planta a usar na prevenção de algumas doenças. Esta planta é muito procurada devido às propriedades biológicas que apresenta nomeadamente: atividade antioxidante; anti-cancerígena; neuroprotetora; actividade antiproliferativa, além disso tem sido também utilizada no tratamento de gastrite, hiperglicemia, arteriosclerose e diabetes. Na China é utilizada muitas vezes para combater inflamações e dores (Stintzing, F.C, *et al.*, 2005; Sáenz, C *et al.*, 2006; Feugang, J *et al.*, 2006).

2.1.1 Descrição da planta *Opuntia ficus indica*

Os catos são plantas de porte arbustivo, rasteiras ou verticais que atingem cerca dos 3,5-5m de altura. Os ramos são clorofilados e achatados, de coloração verde-

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

acinzentada e o seu comprimento (30-60 cm) é maior do que a largura (6-15 cm). O sistema radicular é extenso, densamente ramificado, rico em raízes. O comprimento das raízes está relacionado com as condições da captação de água resultante de zonas de chuvas escassas, pelo que se compreende a adaptação a meios áridos (Feugang, J. *et al.*, 2006).

2.1.2 Caraterísticas e composição química dos cládodos

Os cládodos são um tipo de modificação caulinar, típica de plantas xerófilas, de clima árido ou semi-árido (Moussa-Ayoub, T *et al.*, 2011). Estes são formados por ramos de caule modificados, que contém clorofila e grande quantidade de água armazenada internamente e funcionam como folhas na sua função fotossintética (Feugang, J *et al.*, 2006). Os cládodos apresentam diferentes tonalidades de verde, no entanto alguns podem apresentar-se avermelhados ou roxos.

As caraterísticas dos cládodos diferem, uma vez que estas dependem da espécie, da área de cultivo e da idade da planta em questão (Feugang, J *et al.*, 2006). Os cládodos podem atingir até 18-25cm de comprimento e estão protegidos por uma cutícula grossa e espinhos. No exterior localiza-se o clorênquima, sendo este crucial na ação fotossintética. A parte interna é composta por parênquima medular branco (Feugang, J *et al.*, 2006).



Figura 1 - Imagens de *Opuntia spp.*, cládodo (A), fruto (B), flor (C), cato (D)

Como já se referiu, os cládodos são constituídos na sua maioria por água, entre 80-95 /100g de peso de fruto fresco (FF), no entanto são também uma importante fonte de hidratos de carbono (3-7/ 100g FF), vitaminas (1-2 /100g FF), aminoácidos (0,5-1/ 100g FF), fibras (1-2/ 100g FF), sais minerais: 50mg de potássio/100g FF e cerca de 11mg de

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

magnésio/ 100g FF (Feugang, J *et al.*, 2006; Ginesta, G *et al.*, 2009). Para além destes nutrientes também alguns ácidos orgânicos são já conhecidos como o ácido málico e cítrico, em teores de cerca de 36mg e 178mg/100 g de FF, respetivamente. Os ácidos tartárico e succínico foram encontrados apenas em quantidades vestigiais e outros ácidos como o ácido piscídico e fórbico foram detetados qualitativamente mas não foi possível a sua quantificação, no entanto observou-se que com o aumento da idade a quantidade de ácido piscídico quadruplica, enquanto para o ácido fórbico o valor é reduzido a metade do valor inicial (Stintzing, F.C., 2005). É de salientar que ambos os ácidos só se encontram em plantas que exibem o metabolismo MAC. Foi ainda detetado ácido eucómico, assim como dois ésteres n-butileucomato e metileucomato (Stintzing, F.C., 2005). Na figura 2 apresentam-se as estruturas químicas destes compostos.

Em estudos efetuados nos cládodos, foi também detetado a presença de compostos fenólicos, mais propriamente flavonóides como derivados de isoramnetina (isoramnetina-3-O-glucósido, isoramnetina 3-O-galactósido), quercetina 3-O-ramnósido, miricetina e vitexina (Stintzing, F.C., 2005; Ginestra *et al.*, 2009)

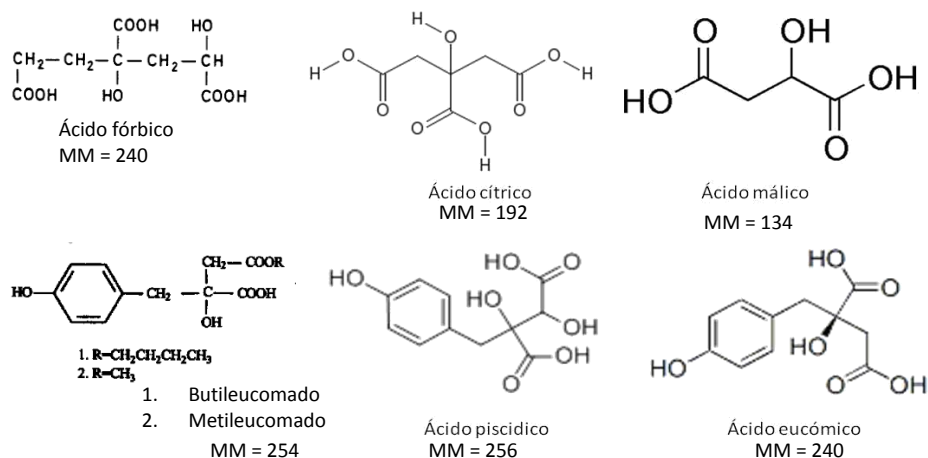


Figura 2 - Estruturas químicas do ácido fórbico, cítrico, málico, n- butileucomato e metileucomato, piscídico e eucómico

Tradicionalmente os cládodos são utilizados para reduzir os níveis de colesterol e pressão arterial, bem como dores reumáticas, no tratamento de úlceras, fadiga e condições de debilidade a nível do fígado (Valente, L *et al.*, 2010; Leo, M *et al.*, 2010).

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

Para além dos fins medicinais, os cládodos são usados em cosméticos e na alimentação de animais. Poucos estudos existem sobre o uso a nível industrial desta parte vegetativa da planta (Valente, L *et al.*, 2010; Leo, M *et al.*, 2010).

2.1.3 Caraterísticas e composição química dos frutos

O fruto é considerado uma baga falsa, com um ovário inferior, simples e carnudo. Tal como os cládodos, também a forma e o tamanho do fruto é variável, podendo ser ovóides, redondos, elípticos com as extremidades côncavas ou convexas. As cores também podem ser diversas, vermelho, laranja, amarelo, verde, roxo, variando consoante as regiões em que se encontram e a quantidade de betalaínas que possuem. A epiderme é bastante semelhante à dos cládodos apresentando auréolas abundantes e espinhos.

A casca do fruto também é um factor variante, podendo variar na espessura e também na quantidade de polpa (Sáenz, C *et al.*, 2006)

O fruto é constituído por água (84,2% expresso em FF), proteínas (0,99%), hidratos de carbono (0,24%), fibras (3,16%), vitamina C (22,56%). Foram também encontrados ácidos orgânicos como o ácido cítrico e o ácido málico. Normalmente o pH do fruto varia entre os 5,3 e 7,1. (Alves, M.A *et al.*, 2008). Os frutos são também uma fonte importante de fitoquímicos como os flavonóides (isoramnetina -3-O- rutinósido e isoramnetina-3-O-glucósido e derivados de quercetina) e betalaínas (Stintzing, F.C., 2005; Ginestra, G *et al.*, 2009).

Estes frutos têm uma vida curta, cerca de 3-4 semanas, o que limita muito o seu armazenamento e conseqüentemente a sua comercialização.

2.1.4 Caraterísticas e composição química das flores

As flores são sésseis, hermafroditas e isoladas, desenvolvendo-se normalmente na parte superior dos cládodos adultos. As suas cores são variadas: vermelho, amarelo e brancas muito brilhantes e vistosas. Na maioria dos países, esta planta floresce apenas uma vez por ano (Primavera), no entanto no Chile, devido a condições ambientais e abastecimento de água mais abundante, ocorre no verão a segunda floração, a que se dá o nome de "Invernal" (Sáenz, C *et al.*, 2006; Leo, M *et al.*, 2010).

Apesar dos estudos efetuados acerca desta planta, não existe muita informação sobre a flor, sabe-se que tem na sua composição derivados de isoramnetina, canferol,

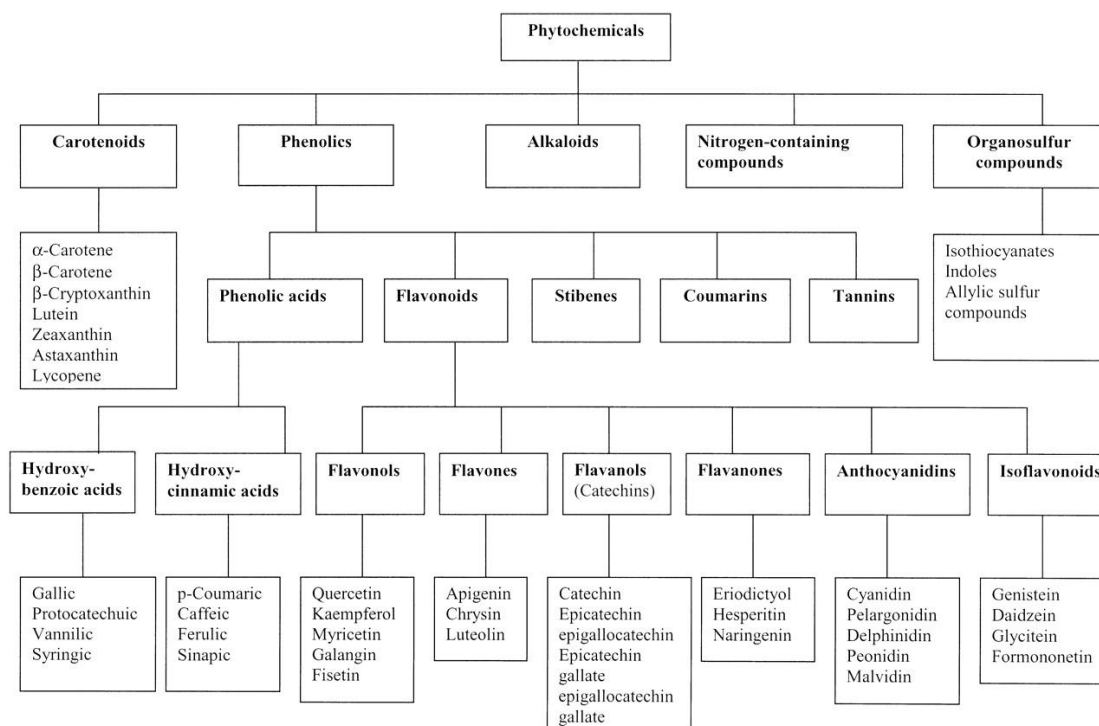
Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

luteolina e quercetina. Foram já também isolados β -sitosterol e ácidos gordos (Alimia, H *et al.*, 2011).

Sabe-se que na medicina tradicional italiana a infusão das flores é conhecida como agente diurético. Na bibliografia é referida uma correlação possível entre a atividade diurética da flor e o alto teor de potássio evidenciado (Alimia, H *et al.*, 2011).

2.2 Compostos fenólicos presentes em *Opuntia spp.*

Os compostos fenólicos são uma grande e diversificada classe de compostos que estão presentes nas plantas e são importantes na dieta humana. Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse nestes compostos devido ao papel que podem ter na prevenção de algumas doenças. Os compostos fenólicos são denominados por fitoquímicos, sendo metabolitos secundários das plantas e caracterizam-se por possuírem um ou mais anéis aromáticos e um ou mais grupo hidróxilo. Estes compostos estão divididos em classes consoante o número de anéis presentes na sua estrutura. (Ferguson, L *et al.*, 2001; Araújo, J.R *et al.*, 2011). Segundo a figura 3 os compostos fenólicos dividem-se em cinco famílias: ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos, coumarinas e taninos. Até à data os flavonóides são o grupo maior e melhor estudado de compostos fenólicos (Shen, Y *et al.*, 2009; Ferguson, L., 2001). Na figura 4 apresentam-se as estruturas correspondentes a ácidos fenólicos (derivados do ácido benzóico e cinâmico).



Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

Figura 3 – Classificação de compostos fitoquímicos (adaptado de Liu, R *et al.*, 2004)

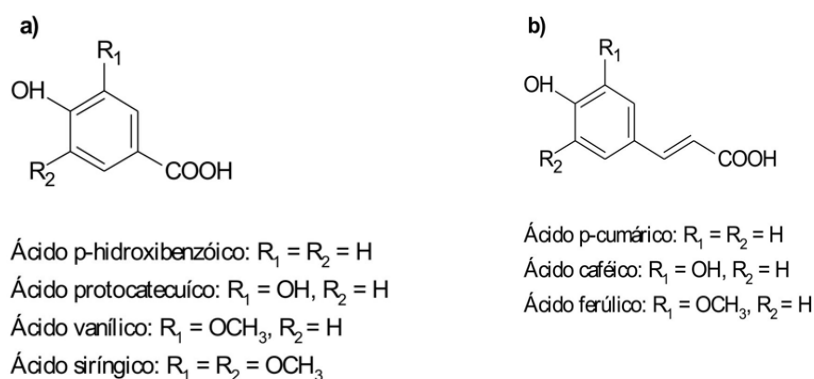


Figura 4 – Estrutura química de ácidos hidroxibenzoicos (a) e hidroxicinâmicos (b)

Para além de contribuírem como proteção contra a radiação UV, os compostos fenólicos nas plantas também são uma atração para polinizadores e possuem funções como: antimicrobiana, antifúngica, antioxidante contra radicais livres gerados durante os processos fotossintéticos, mas também são importantes no papel da reprodução e crescimento das plantas (Stevenson, D *et al.*, 2007; Faller, A *et al.*, 2010).

Embora não sejam considerados nutrientes, estes compostos apresentam propriedades muito interessantes nomeadamente apresentam uma intensa capacidade antioxidante, bem como capacidade anti-mutagénica, anti-cancerígena, anti-estabilidade do genoma (Ferguson, L *et al.*, 2001; Han, X *et al.*, 2007).

Os compostos fenólicos podem prevenir danos no ADN causados por agentes cancerígenos ou radicais livres através de mecanismos como o stress oxidativo relacionado com enzimas, como a glutathione peroxidase, glutathione reductase, lipoxigenase, xantina oxidase, etc (Alía, *et al.*, 2006). Estudos efetuados mostram que a maioria dos compostos fenólicos é absorvido no intestino superior e por essa mesma razão, esta zona tem sido apontada como um local de quimioprevenção (Manach, C *et al.*, 2004; Araújo, J *et al.*, 2011; Hervert-Hernández, D *et al.*, 2011).

Estes compostos estão presentes no *Opuntia* mas também em vegetais, frutas, chá, vinho, chocolate, cereais, fazendo assim parte de uma dieta normal, podendo ser usados ainda como medicamentos e suplementos alimentares (Faller, A *et al.*, 2010; Hervert-Hernández, D *et al.*, 2011).

2.2.1 Flavonóides

Os flavonóides são um grupo de cerca de 4000 compostos fenólicos presentes nas plantas (Gomes, A *et al.*, 2008).

Estes compostos quanto à sua estrutura são identificados como flavanonas, flavonas, flavonóis, antocianinas e isoflavonóides. A substituição dos grupos hidroxilo, metilo, glicosilo e acilo originam muitas estruturas diferentes (Repo-Carrasco-Valencia, R *et al.*, 2010). Os flavonóides são caracterizados por possuírem dois anéis aromáticos ligados a três átomos de carbono que se ligam a um átomo de oxigênio e dois átomos de carbono do anel aromático (figura 5).

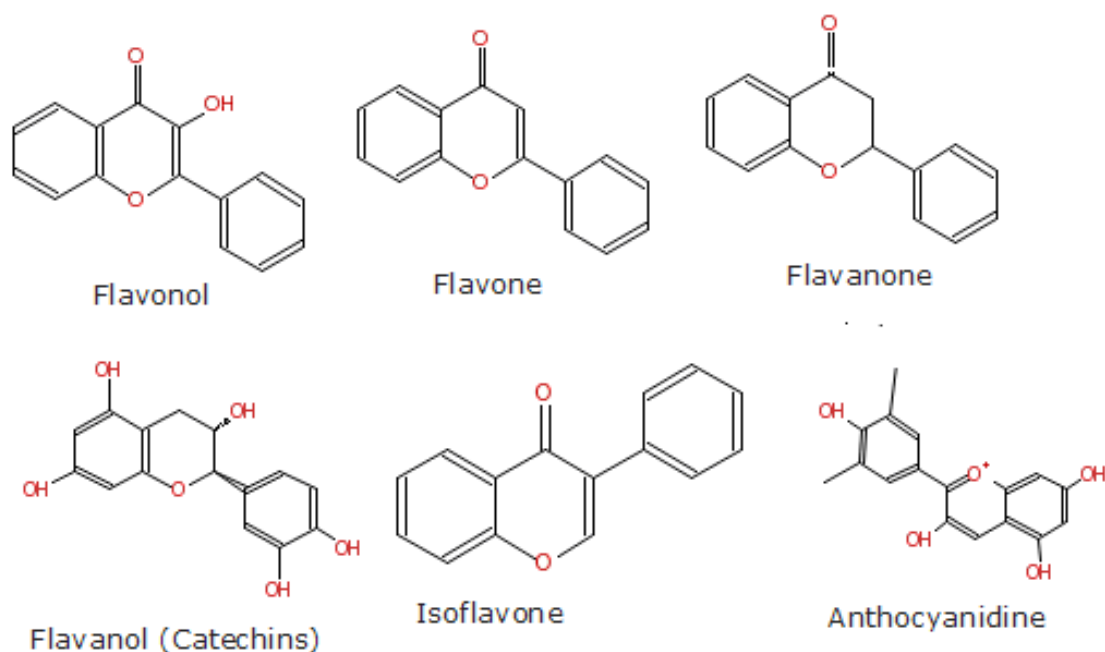


Figura 5 - Estrutura química dos flavonóides (adaptado de Lakhanpal, P *et al.*, 2007)

Nos alimentos estes compostos podem contribuir para uma maior sensação de sabor amargo, adstringência e cor.

Estes compostos são também muito conhecidos devido ao seu grande poder antioxidante conferindo estabilidade oxidativa aos produtos onde se encontram presentes. São compostos benéficos em determinadas doenças, como é o caso de doenças cardiovasculares, algumas formas de cancro, doenças neurodegenerativas, diabetes e osteoporose (Repo-Carrasco-Valencia, R *et al.*, 2010; Moussa-Ayoub, T *et al.*, 2011).

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

As propriedades antioxidantes destes compostos foram o primeiro mecanismo de ação a ser estudado, nomeadamente no que respeita ao seu poder protetor contra doenças cardiovasculares. Os flavonóides têm mostrado ser altamente eficazes contra a maioria das moléculas oxidantes, incluindo o oxigénio e os vários tipos de radicais livres que estão possivelmente envolvidos nos danos do DNA e promoção de tumores (Moussa-Ayoub, T *et al.*, 2011).

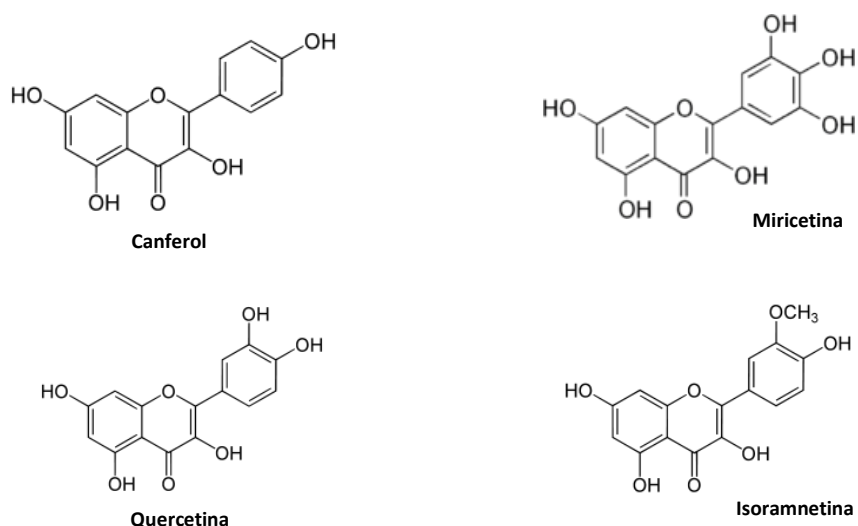


Figura 6 – Estruturas químicas de alguns flavonóis

A actividade antioxidante e os efeitos na saúde já foram amplamente estudados para a quercetina, canferol, miricetina e seus derivados, pelo contrário os estudos sobre a isoramnetina são ainda muito escassos (Figura 6) (Moussa-Ayoub, T *et al.*, 2011)

2.2.2 Compostos fenólicos e Stress oxidativo

O stress oxidativo tem um papel central na patogénese do envelhecimento e de inúmeras doenças degenerativas, a aterosclerose, doenças cardiovasculares, diabetes tipo II e cancro (figura 7).

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

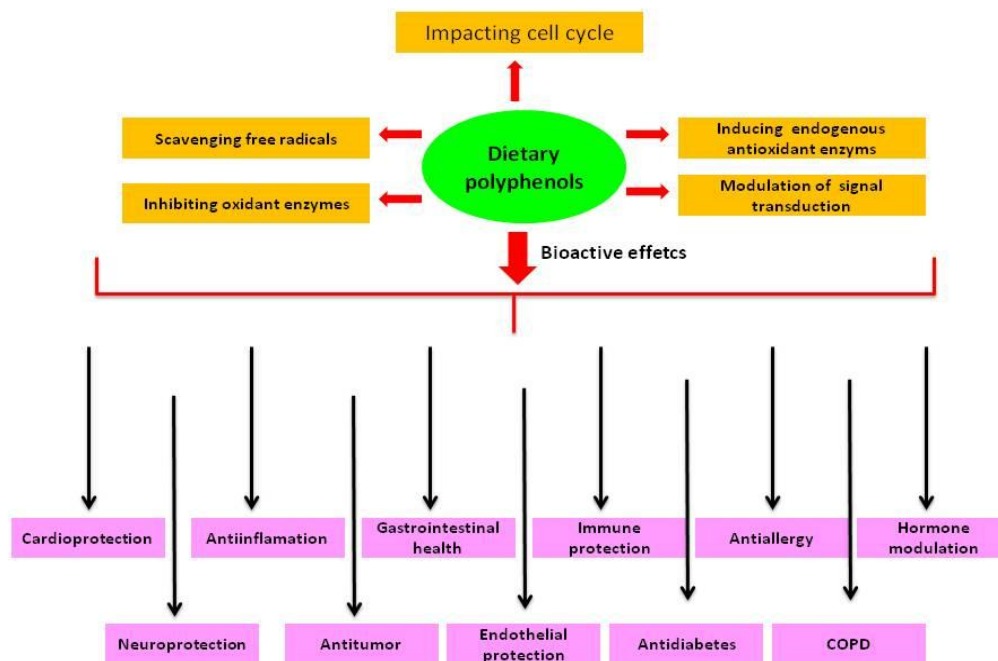


Figura 7 – Bioatividade dos polifenóis (adaptado de Fki, I *et al.*, 2007)

O stress oxidativo ocorre quando há um grande desequilíbrio entre a formação de ROS e a capacidade de defesa dos sistemas antioxidantes no organismo (Pepe, H *et al.*, 2009; Reuter, S *et al.*, 2010). O peróxido de hidrogénio (H₂O₂) é um exemplo de um ROS produzido por metabolismo aeróbio natural e dois processos patogénicos. Este desequilíbrio provoca danos sobre várias biomoléculas e células, com impacto em todo o organismo. (Zhi-you, C *et al.*, 2007; Reuter, S *et al.*, 2010). Estes danos podem levar à peroxidação lipídica da membrana e agressão às proteínas de tecidos e membranas, às enzimas, hidratos de carbono e ADN (Pi, J *et al.*, 2010; Cartea, M *et al.*, 2011). O excesso de ROS pode ser controlado por antioxidantes, originados no organismo ou através da dieta. No entanto o corpo humano possui mecanismos endógenos e exógenos para combater essa desregulação e de forma a manter a homeostase. Os mecanismos endógenos dizem respeito por exemplo à SOD, catalase, GPx, por outro lado os mecanismos exógenos são obtidos a partir da dieta, como a vitamina C, E, os minerais, polifenóis, β-caroteno. (figura 8) (Pi, J *et al.*, 2010; Finley *et al.*, 2011).

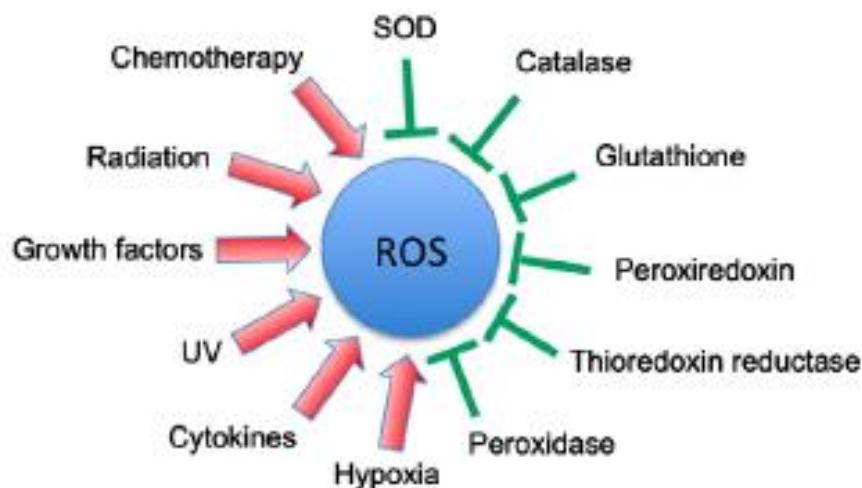


Figura 8 – Esquema representativo de ativadores e inibidores na produção de ROS (adaptado de Reuter, S *et al.*, 2010)

As espécies reativas de oxigênio são o produto de um metabolismo normal e desempenham um papel vital na estimulação de vias de sinalização em plantas e células animais, como resposta a mudanças de condições intra e extracelulares. A maioria dos ROS são gerados em células na cadeia respiratória mitocondrial (Reuter, S *et al.*, 2010).

Os antioxidantes atuam em três linhas contra os danos oxidativos: i) nas medidas preventivas, como antioxidantes e proteínas; ii) radicais de limpeza, vitamina C e E; iii) na reparação (lipases, proteases, enzimas de reparo de DNA) nos danos e na reconstituição de membranas.

Como já foi referido O stress oxidativo está na base de inúmeras doenças degenerativas como a doença de Alzheimer (AD).

Há evidências crescentes de que as primeiras alterações patológicas e neurológicas características da AD, se devem a processos oxidativos, indicando que o stress oxidativo é um contributo para a doença logo desde bastante cedo (Zhi-you, C *et al.*, 2007; Zhu, X *et al.*, 2004).

2.3 Betalaínas em *Opuntia spp.*

Nas plantas os carotenóides, as antocianinas e as betalaínas têm como finalidade atrair insetos, pássaros e animais, para a polinização e dispersão de sementes (Strack, D *et al.*, 2003; Valente, L *et al.*, 2010).

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

A cor é também um dos atributos mais importantes dos alimentos, sendo considerado como um indicador de qualidade e determinando frequentemente a aceitação do produto. No entanto os alimentos com cor sofrem muitas vezes alterações durante o processamento, obrigando ao uso de corantes para a restabelecer (Azeredo, M.C *et al.*, 2009; Alimia H, *et al* 2011).

Os frutos de *Opuntia* são caracterizados por possuírem várias cores devido à combinação de pigmentos designados por betalaínas. Estas dividem-se em 2 tipos: (i) betaxantinas de cor amarelo-laranja; (ii) betacianinas de cor vermelho-violeta. As mais conhecidas nestes dois grupos são a indicaxantina e a betanina, respetivamente (Azeredo, M *et al*, 2010). As betalaínas são solúveis em água e estão localizadas no vacúolo das plantas. O ácido betalâmico, apresentado na figura 9, é um composto cromóforo comum a todos os pigmentos de betalaínas.

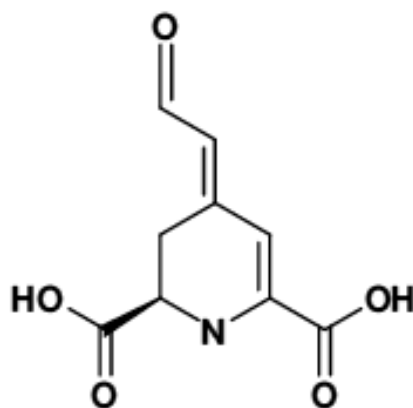
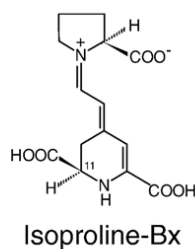
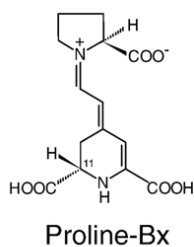
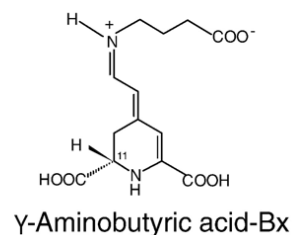
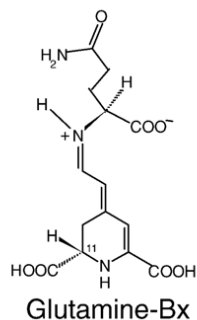
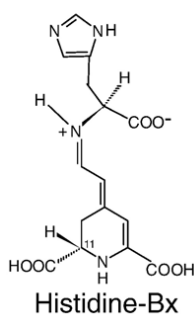


Figura 9 – Estrutura do ácido betalâmico

No caso das betacianinas, o ácido betalâmico liga-se a um ciclo-3-(3,4-diidroxifenil)-L-alanina que por sua vez é glicosilado, no caso das betaxantinas liga-se a diferentes aminoácidos (figura 10).

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

Betaxanthins



Betacyanins

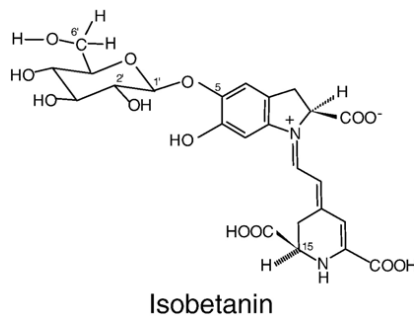
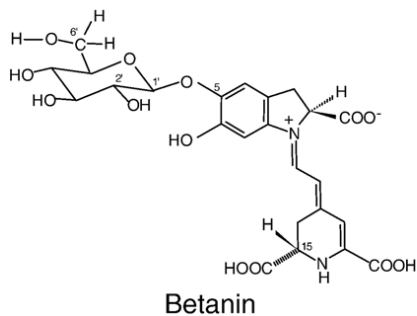


Figura 10 – Exemplos de estruturas químicas de betaxantinas e betacianinas

As betalaínas possuem estabilidade química e vários artigos mencionam também a sua potente actividade antioxidante que tem vindo a ser associada à protecção contra doenças degenerativas (Alimia, H *et al.*, 2011; Moussa-Ayoub, T *et al.*, 2011).

Hoje em dia os consumidores evitam cada vez mais alimentos com corantes sintéticos, pois estes são já conotados como indesejáveis e provocam por vezes reacções alérgicas e algumas intolerâncias, o que levou as indústrias de alimentos a substituí-los por pigmentos naturais, tais como os carotenóides, clorofilas, pigmentos de betalaínas e antocianinas. Apesar destes terem um custo mais elevado quando utilizados em menores quantidades e possuírem uma menor estabilidade, são considerados também inofensivos e mais saudáveis. As propriedades dos carotenóides e das clorofilas têm sido mais estudadas focando principalmente as suas propriedades antioxidantes, contrariamente às betalaínas que ainda são um assunto pouco estudado, no entanto

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

alguns trabalhos indicam o seu potencial como pigmentos antioxidantes motivando cada vez mais o uso das betalaínas como corante para alimentos.

2.4 Metodologias instrumentais para análise de compostos fenólicos e betalaínas

Na análise de compostos fenólicos e de betalaínas podem ser utilizadas diferentes metodologias que vão desde métodos espectrofotométricos a métodos separativos como a cromatografia líquida. Os métodos espectrofotométricos baseiam-se em reações de colorimetria indireta e muitas vezes carecem de especificidade, são no entanto ainda muito utilizados nos dias de hoje. A cromatografia líquida tem sido uma técnica separativa muito usada na deteção, identificação e quantificação dada a complexidade das amostras no que se refere aos diferentes tipos de compostos e teores em que se encontram presentes. Muitas vezes é também necessária a utilização de técnicas de preparação de amostras que permitam de alguma forma simplificar a amostra ou, por outro lado, concentrar alguns componentes habitualmente presentes em baixos teores e dessa forma facilita-se a sua deteção.

2.4.1 Determinação de teores de fenóis, flavonóis e betalaínas totais

O método de Folin Ciocalteu é um método colorimétrico que se baseia numa reacção de oxidação-redução entre o reagente de Folin e os compostos fenólicos, formando um complexo de molibdénio e tungsténio de cor azul com absorção a 765nm. Este método no entanto carece de especificidade para os compostos fenólicos e os açúcares bem como o ácido ascórbico são considerados compostos interferentes quando presentes nas amostras em teores mais elevados.

O teor em flavonóides é quantificado segundo um método baseado na complexação destes compostos com o $AlCl_3$, segundo o método descrito por Michalska utilizando uma solução padrão de catequina.

O teor de betalaínas pode ser determinado baseado numa equação de Nilson (Nilson, 1970). betacianinas (%) = $((a/1129) \times FD \times 100)$. Betaxantinas (%) = $((y/750) \times DF \times 100)$; onde $a = 1.095(A_{538}-A_{600})$, $y = A_{476}-(A_{538}-a)-(a/3.1)$ e FD = fator de diluição. As betacianinas e betaxantinas são reportadas por 100g.

2.4.2 Análise por cromatografia líquida

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é o método escolhido para análise destes compostos, devido à sua versatilidade, precisão e custos relativamente baixos. Nesta técnica e para o estudo deste tipo de compostos com alguma polaridade é comum o uso de colunas de fase reversa do tipo C₁₈, e um sistema binário de solventes, como o ácido fosfórico ou fórmico e um solvente orgânico como o acetonitrilo ou metanol. A deteção por UV-vis é uma ferramenta crucial e de confiança na análise destes compostos em plantas (Chirinos, R *et al.*, 2008), dependendo da família a que o composto pertence, o aspeto característico do espetro.

A deteção das betalaínas pode ser feita a comprimentos de onda que compreendem os 480nm (betaxantinas) e 535nm (betacianinas) (Valente, L *et al.*, 2010; Alimia, H *et al.*, 2011). No que se refere aos compostos fenólicos estes podem ser detetados a 280nm e os flavonóis a um comprimento de onda de 360nm (Valente, L *et al.*, 2010). A espectrometria de massa (MS) é uma técnica que permite a identificação e quantificação numa amostra complexa através da deteção do ião molecular e respetivos fragmentos. Esta técnica é muito usada associada à cromatografia líquida e revela-se uma técnica essencial para a caracterização de amostras. A espectrometria de massa associada a ionização por eletrospray (ESI) tem sido amplamente aplicada na identificação de compostos. A utilização de uma fonte ESI permite obter informação da massa molecular do composto e ao nível do analisador pode promover-se a fragmentação desse ião molecular de forma a obter-se informação sobre o seu padrão de fragmentação e proceder à sua identificação estrutural. Este processo que ocorre ao nível do analisador separa os iões de acordo com a sua razão massa/carga (m/z).

Diferentes analisadores podem ser usados neste tipo de equipamento, sendo um dos mais usados o do tipo triplo quadrupolo. Este analisador é robusto, de fácil construção e de elevada sensibilidade. Cada quadrupolo é constituído por quatro cilindros metálicos dispostos em paralelo. Os cilindros estão posicionados e encontram-se ligados a uma fonte de corrente eléctrica e a um gerador de radiofrequência, permitindo que os iões de uma determinada razão m/z adquiram uma determinada trajetória estável ao longo do quadrupolo, até atingir o detetor (Mendham, J *et al.*, 2002).

2.4.3 Metodologias de preparação de amostras

2.4.3.1 Resina Amberlite XAD16

Os procedimentos de preparação devem ser escolhidos de acordo com as características das amostras e compostos a extrair. Uma metodologia por vezes usada consiste na utilização de resinas que vão em face das suas características permitir o enriquecimento em determinados compostos. Uma resina que é muitas vezes escolhida é a Amberlite XAD 16 (figura 11). Esta é um adsorvente polimérico constituído por grânulos brancos insolúveis. É um material hidrófobo não iónico, em que as suas propriedades de adsorção (devido a forças de Van der Waals) derivam da sua estrutura macrorreticular, área de superfície elevada e da natureza aromática. Esta é capaz de adsorver moléculas hidrofóbicas de solventes polares e compostos orgânicos voláteis, podendo ser utilizado em coluna ou “batch”

Esta resina é utilizada como: recuperação e purificação de antibióticos, esteróides solúveis em água, enzimas, aminoácidos e proteínas; remoção de compostos não polares, tais como o fenol, a partir de solventes polares e tendo sido aplicada a matrizes como sumos de frutos.

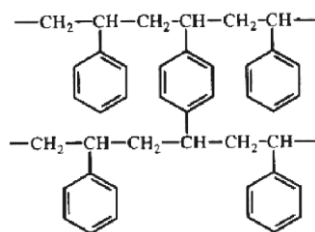


Figura 11 – Estrutura química da resina Amberlite XAD16

2.4.3.2 Extração com líquido pressurizado (ELP)

A extração com solvente é também um processo muitas vezes usado pela sua versatilidade. Mais recentemente a extração com líquido pressurizado foi reconhecida como um dos processos mais eficazes (Dawidowicz, A *et al.*, 2005) e tem sido muito utilizada, com o objetivo de reduzir o consumo de solventes e o tempo de preparação de amostras. A extração com líquido pressurizado utiliza líquidos convencionais a elevadas pressões (10.3 – 13.8MPa) e temperaturas (40 – 200 °C) (Antunes, P *et al.*, 2008). A eficiência do processo de extração e conseqüentemente o seu rendimento, dependem de vários fatores como o tipo de solvente, o tempo, temperatura e as características das amostras (Dai and Mumper, 2010). Outra vantagem desta

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

metodologia de extração relaciona-se com o fato das enzimas que degradam os compostos fenólicos, serem inibidas devido às altas pressões e à adição de CO₂ à amostra (Serra, A *et al.*, 2010).

Neste tipo de extração ocorre várias vezes a necessidade de recuperar um analito a partir de plantas, o que poderá levar a extrações múltiplas da mesma amostra. Nestes casos, o tempo de análise pode ser significativamente aumentada e determinada pelo procedimento da extração múltipla (Andrzej, L *et al.*, 2005).

2.4.3.3 Fracionamento em Sephadex LH-20

A filtração em gel tem vindo a ocupar cada vez mais uma posição-chave na purificação de biomoléculas sensíveis em laboratórios nos últimos 35 anos.

O Sephadex é um gel granulado formado por reticulação de dextrano com epícloridrina comercializado na forma seca. Este é especificamente concebido para a separação e purificação de produtos naturais que requerem a presença de solventes orgânicos para manter a sua solubilidade, incluindo moléculas tais como esteróides, terpenóides, lípidos e peptidos de baixo peso molecular. O Sephadex pode ter uma seletividade muito elevada para compostos aromáticos em certos solventes e pode ser usado em escala analítica ou industrial.

Na filtração em gel são separadas as moléculas de acordo com o seu tamanho relativo, na medida em que o grau de reticulação do dextrano determina a extensão em que as macromoléculas podem atravessar as esferas. Assim as moléculas de maior tamanho ficam excluídas, enquanto as menores passam entre as esferas. As moléculas grandes ficam assim “presas” no início da coluna, seguido das moléculas pequenas consoante a dimensão.

No gel as moléculas de água movem-se livremente para dentro e para fora dos poros e canais enquanto que as maiores ficam presas. Na ausência de uma pressão hidroestática, não há movimento líquido no sistema de gel (Magin, R *et al.*, 2011).

Na filtração em gel, o comprimento da coluna é importante para a resolução e diâmetro da coluna determinando a capacidade de carga desta. No trabalho de fracionamento as colunas longas (30-100cm) e volumes de amostras pequenos são escolhidos, pois proporcionam a melhor resolução, no entanto para grandes quantidades de amostra as colunas de 5-30cm, que são colunas mais largas, são as que possuem melhores resultados (Principles and Methods., 2002).

2.5 Efeito do processo de digestão

Os modelos de digestão *in vitro* são amplamente utilizados para estudar as mudanças estruturais, de digestibilidade e libertação dos componentes dos alimentos sob condições simuladas. No entanto, os resultados destes modelos são muitas vezes diferentes dos encontrados para modelos *in vivo*, devido às dificuldades em simular as alterações físico-químicas e fisiológicas que ocorrem em animais e humanos (Hur, S *et al.*, 2009).

Até à data as amostras de alimentos mais estudadas foram plantas, carnes, peixes, laticínios entre outros. As moléculas biológicas mais utilizadas foram enzimas digestivas (pancreatina, pepsina, tripsina, peptinase, α -amilase e lipase), sais biliares e mucina (Hur, S *et al.*, 2009). Os tipos de enzimas envolvidas num modelo *in vitro* estão relacionadas com o tipo de alimento em que vai ser simulado o processo de digestão. Assim por exemplo para a digestão de lípidos adicionam-se as lipases, proteases para a digestão de proteínas e amilases para a digestão de amido (Hur, S *et al.*, 2009).

As enzimas para simulação do processo de digestão, são geralmente adicionadas sequencialmente de modo a simular as diferentes etapas do processo digestivo. Assim nos modelos *in vitro* efectuam-se incubações com pepsina para simular o estômago e em seguida a pancreatina para simular o intestino (Boisen, B *et al.*, 1991; Hur, S *et al.*, 2009).

Os métodos *in vivo* utilizando animais ou seres humanos proporcionam em geral resultados mais precisos, no entanto são demorados e caros, daí estarem cada vez mais voltadas as atenções para o desenvolvimento de procedimentos *in vitro* (Coles, T *et al.*, 2005). Para todos os modelos *in vitro* pesquisados foi utilizada a temperatura de digestão de 37°C. Os tempos de incubação relacionam-se com os tempos de digestão nos seres humanos.

Um fator importante é a natureza da amostra, pois sabe-se que as partículas maiores movem-se no estômago mais lentamente (precisando de um tempo mais longo de incubação) em relação às mais pequenas, o que influencia a passagem na válvula píloro que separa o estômago do intestino delgado.

Sabe-se que os modelos de culturas de células mais utilizados na digestão *in vitro* são os das células Caco-2, desenvolvido por Glahn, P *et al.*, 1998.

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

Existem vários fatores tais como as características da amostra, atividade enzimática, composição iônica e tensões mecânicas que ocorrem na digestão e que têm influência nos resultados e que não podem ser completamente simuladas *in vitro*.

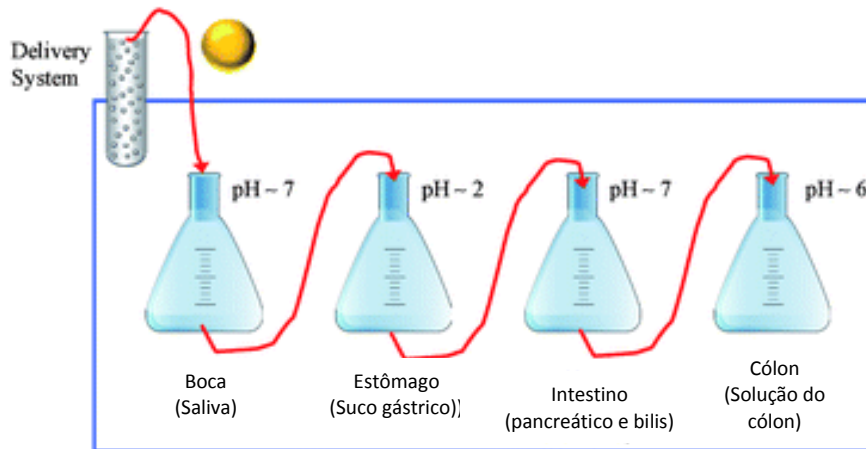


Figura 12 – Diferenças de pH durante o processo de digestão (Torres-Escribano, S *et al.*, 2011)

Os fatores mais importantes na digestão *in vitro* são as características relacionadas com a atividade enzimática, como a concentração, temperatura, pH (figura 12), estabilidade, ativadores, inibidores e tempo de incubação (Torres-Escribano, S *et al.*, 2011).

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

3.1 Reagentes

3.1.1 Análise cromatográfica

Foi utilizado ácido fórmico (98% *p.a*), ácido ascórbico e málico (Merck, Portugal), acetonitrilo (99.9% LC-MS) e metanol (99.8% LC-MS) adquirido (Fisher Scientific, Waltham/USA), ácido fosfórico adquirido de (Panreac, Espanha), Foram utilizados padrões de quercetina, quercetina 3-O-glucósido, isoramnetina, isoramnetina 3-O-glucósido, isoramnetina 3-O-rutinósido, canferol, canferol 3-O-rutinósido, e ácido quínico todos da Extrasynthese (França) e ainda ácido cítrico, hidroxibenzóico, succínico, eucóico, ferúlico e cafeíco (Sigma – Aldrich, Portugal).

Foi utilizada água ultra pura (18.2 MΩ.cm) produzida no equipamento Millipore-Direct Q3 UV system (Millipore, USA)

Todos os padrões foram preparados a 10mg/mL em etanol e guardados a -20°C.

3.1.2 Atividade antioxidante

Para os métodos de ORAC e HORAC foram utilizadas as soluções de 2',2'-Azobis (2-amidinopropano) dicloridrato (AAPH), 6-hidroxi-2,5,7,8 tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), o ácido cafeico, o cobalto tetrahidratado, peróxido de hidrogénio adquirido de Sigma-Aldrich (St Louis, USA). A solução de dissódico de fluoresceína (FL) foi adquirida a partir de TCL (Antuérpia, Bélgica). Solução de tampão fosfato de Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha). Tetra-floretocobalto (CoF₂) adquirido de Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, França)

3.1.3 Digestão de amostras *in vitro*

Foi utilizada solução HBSS, pancreatina obtida de pâncreas de suíno, sais biliares de suínos e pepsina obtida mucosa gástrica de suíno de Sigma-Aldrich (Portugal). O bicarbonato de sódio (97%) e o nitrito de sódio (99%) adquirido de Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha). Ácido clorídrico (35%) adquirido de Panreac (Espanha).

3.1.4 Preparação de extrato de sumo rico em polifenóis (ERPs)

Foi utilizada resina XAD-16 adquirida de Sigma-Aldrich (St Louis, USA) e etanol 96% foi adquirido de AGA (Lisboa, Portugal).

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

3.1.5 Determinação do teor de fenóis totais

Foi utilizado reagente Folin adquirido de Panreac (Barcelona, Espanha) e ácido gálico de Fluka (Alemanha). O carbonato de sódio foi adquirido de Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, França).

3.1.6 Determinação do teor em flavonóides totais

Para a determinação de flavonóides foram utilizados cloreto de alumínio e hidróxido de sódio adquiridos de Sigma-Aldrich (Alemanha). Nitrito de sódio da Riedel-de-Haën (Seelze, Alemanha). A catequina hidratada foi adquirida da Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, França).

3.1.7 Cultura de células

Para todos os meios de cultura de células e suplementos foi utilizado soro fetal bovino (FBS), glutamina, RPMI 1640, Trypsin-EDTA e penicilina-estreptomicina (PenStrep) foram obtidos a partir de Invitrogen (Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, UK). Composto tetrazólio (MTS), (3-(4,5 dimetiliazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) adquirido de Promega Corporation (Madison, USA)

3.1.7.1 Inibição da formação de ROS

Foi utilizado 2',2'-Azobis (2-amidinopropano) dicloridrato (AAPH), peróxido de hidrogénio, 2',7'-diclorofluoresceína diacetado (DCFH-DA), adquiridos de Sigma-Aldrich (St Louis, USA). Tampão fosfato adquirido de Riedel-de-Haën (Seelze, Alemanha).

3.1.7.2 Inibição da oxidação da glutatona e proteínas

Foi utilizado soro fetal bovino (FBS), glutamina, RPMI 1640, Trypsin-EDTA e penicilina-estreptomicina (PenStrep) obtidos a partir de Invitrogen (Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, UK). Peróxido de hidrogénio de Sigma-Aldrich (St Louis, USA). CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit adquiridos de Invitrogen (Carlsbad, California, USA). Cell Lytic™ M, os padrões GSH e GSSG, o inibidor de proteases, o anti DNPH coelho, o ortoftaldeido (OPA) adquiridos de Sigma-Aldrich (St Louis, USA). O metanol da Fisher Scientific.

3.2 Amostras

Procedeu-se à recolha dos frutos em diferentes regiões do País. Os frutos foram colhidos manualmente durante o mês de Outubro de 2010. As regiões escolhidas foram o Tramagal (T), Beja (B), Marvão (M), Sines (S), Sesimbra (Ss), Quarteira (Q) e Elvas (E).

Posteriormente procedeu-se à preparação de sumo com ou sem a utilização da casca, procedeu-se à concentração do sumo com resinas e foi ainda simulado o processo de digestão *in vitro*. Prepararam-se extratos de resíduos utilizando a técnica de extração com solvente e extração com líquido pressurizado.

Na tabela 1 descrevem-se as amostras utilizadas no decurso deste trabalho.

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

		Origem
Sumos	Com casca	Tramagal
		Beja
		Marvão
		Sines
		Sesimbra
		Quarteira
	Sem casca	Elvas
Extrato sumo rico polifenóis (ERPs)	Com casca	Tramagal
		Beja
		Marvão
		Sines
		Sesimbra
	Sem casca	Beja
		Marvão
		Elvas
		Quarteira
Extrato de resíduo		Beja
Sumos digeridos	Com casca	Tramagal
		Beja
		Marvão
		Sines
		Sesimbra

Tabela 1 – Conjunto de amostras analisadas ao longo do trabalho experimental

3.2.1 Preparação de sumos

Para a preparação dos sumos, os frutos foram lavados, retirados os picos e processados num processador de alimentos (UFESA, LC5005, China). Recolheu-se o sumo e os resíduos (sementes e parte da casca). Os sumos foram centrifugados (Avanti J26 XPI, Beckman Coulter®, California, USA, a 9000rpm, durante 10min) e o sobrenadante foi recolhido e filtrado num filtro de 0,2µm (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Os sumos e os resíduos foram conservados congelados a -20 °C, até serem analisados ou processados.

3.2.2 Ensaios de digestão *in vitro*

Para os ensaios de digestão as amostras de sumos foram processadas com casca (Tramagal, Beja, Marvão, Sines e Sesimbra) de acordo com o apresentado na tabela 2. As amostras foram digeridas segundo o método adaptado de Ryan L. & Prescott S.L., 2010. Resumidamente, foram transferidos 10 mL de sumo de fruta para erlenmeyers e homogeneizados com 10 mL de HBSS (Vf = 20mL). As amostras foram acidificadas para pH 2,0 com uma solução de HCl 0,5M e foi adicionado 1mL de solução de pepsina (0,04g em 1mL de água). As amostras foram incubadas a 37°C durante 1H, com agitação de 100rpm (Innova 5000 Gyrotory Tier Shaker, New Brunswick Scientific, Alemanha). Após a simulação da digestão gástrica, o pH foi elevado para 5,3, com solução 0,9M de bicarbonato de sódio, seguido da adição de 600µL de sais biliares (105mg/mL de HBSS) e 100µL de pancreatina (80mg em 1mL de HBSS), para a simulação de digestão intestinal. De seguida o pH foi elevado para 7,4 com solução 1M de NaOH. As amostras foram novamente incubadas a 37°C durante 2,5 horas a 100rpm para completar o processo. Em seguida as amostras foram arrefecidas em geloe posteriormente aquecidas a 100 °C durante 4min para inativar a atividade enzimática. Finalmente as amostras foram centrifugadas a 3890g durante 60min. No final do processo de digestão a amostra estava diluída aproximadamente 1:2 em HBSS.

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

3.2.3 Preparação de extrato por método de adsorção com resina (ERPs)

Para a preparação das amostras de sumo mais concentradas, foi utilizada uma resina XAD-16 (fornecida por Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, França)). Resumidamente, foi feito um pré-condicionamento do adsorvente com uma lavagem com água destilada em abundância, para remover sais e impurezas. Posteriormente foi seco a 70°C durante 24h. A resina seca foi imersa em etanol durante 12h. O etanol foi substituído por água destilada por um processo de lavagem. A preparação de ERPs foi descrita por Silva *et al*, 2007. Procedeu-se à modificação de algumas fases do processo. Em resumo, os sumos de *Opuntia* foram postos em contato com a resina, cerca de 30mg de polifenóis/g de resina, dentro de frascos protegidos da luz. Estes frascos foram submetidos a uma agitação de 200rpm durante 4h. Posteriormente o sobrenadante foi retirado e as resinas foram lavadas com água destilada, a fim de remover os constituintes solúveis em água, como os açúcares. Os polifenóis foram então extraídos com etanol (96%). As frações foram concentradas por evaporação (Buchi, Switzerland; Rotavapor R-210; Heating Bath B-491; Vacuum Controller V-850; Vacuum Pump V-700), dissolvidos em água e liofilizadas (Modulyo freeze dried, Edwards, Sussex, UK), a -20 °C, na ausência de luz, durante 48h. Os ERPs resultantes (tabela 1) foram mantidos em local seco e protegido da luz.

Os extratos concentrados obtidos foram submetidos a processos de stress oxidativo, como a inibição da formação de ROS, inibição da oxidação glutaciona e inibição da oxidação de proteínas.

3.2.4. Fracionamento de sumo com Sephadex LH-20

A amostra de *Opuntia* Quarteira (cerca de 200mL) foi aplicada numa coluna com dimensão de 4cm com enchimento de Sephadex LH-20. Procedeu-se à eluição de frações com fases móveis diferentes utilizando água. No entanto, a amostra apresentava uma elevada viscosidade o que fez com que o processo de eluição com água fosse muito demorado.

Na figura 13 apresenta-se um esquema correspondente ao tratamento efetuado à amostra.

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

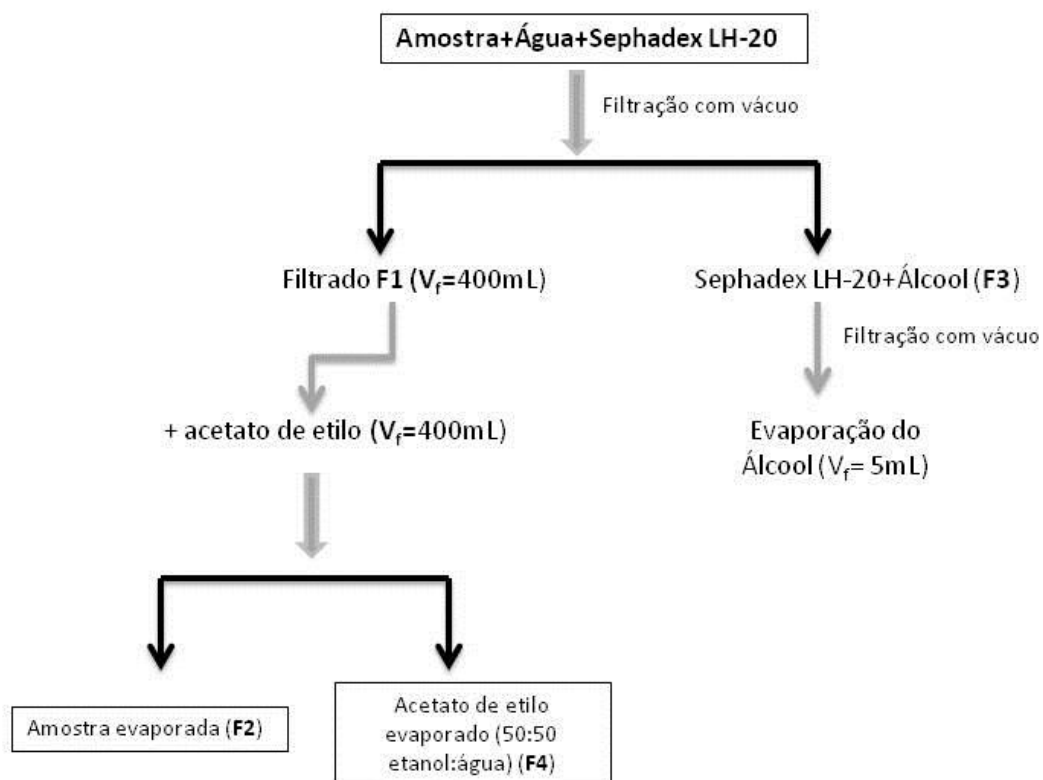


Figura 13 – Esquema representativo do fracionamento com Sephadex

3.2.5 Preparação de extratos

3.2.5.1 Extração sólido-líquido

Foram preparados extratos de resíduos de frutos *Opuntia*, extraídos com diferentes solventes: água, água: etanol (1:1), etanol, sempre na proporção 1:20 m/v. Foram ainda efetuadas extrações com água após a adição de 0,9 μ L de enzima de extração peptinase e por fim foi feita uma extração com água após adição de ácido ascórbico.

3.2.5.2 Extração com líquido pressurizado (ELP)

Os extratos dos resíduos da amostra proveniente de Beja foram preparados no Laboratório de Processamento de Polímeros e Tecnologia Supercrítico da Universidade de Coimbra, Portugal. Foram preparados dez extratos que foram

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

obtidos a 313K e 20MPa utilizando diferentes misturas de solventes CO₂/EtOH/H₂O (tabela 2).

Tabela 2 – Extratos obtidos a partir do resíduo de Beja utilizando ELP

Amostras	Frações Molares		
	EtOH	CO ₂	H ₂ O
1	1	0	0
2	0.4	0.6	0
3	0.4	0	0.6
4	0.7	0.3	0
5	0.4	0.3	0.3
6	0.7	0	0.3
7	0.8	0.1	0.1
8	0.5	0.4	0.1
9	0.5	0.1	0.4
10	0.6	0.2	0.2

3.3 Metodologias de análise

3.3.1 Determinação espectralométrica

O teor em polifenóis foi determinado por HPLC e para tal procedeu-se ao traçado de uma recta de calibração de ácido gálico. Inicialmente foi preparada uma solução stock de ácido gálico (1000ppm), para tal pesou-se 10mg de ácido gálico, para um balão de 10mL, perfazendo o volume com metanol. Foram preparadas soluções a diferentes concentrações a partir de uma solução stock (1000ppm), (5,20,40,60,80,100 ppm) para balões de 5mL, perfazendo o volume com água. As várias soluções padrão foram analisadas pelo método de HPLC e os resultados estão apresentados no anexo

3.3.1.1 Determinação do teor em fenóis totais pelo método de Folin

O teor em polifenóis foi também determinado de acordo com o método de Folin Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965) como já descrito por Serra (2010). Resumidamente 20μL de amostra *Opuntia* foram adicionadas a 1580μL de água destilada e oxidado com 100 de reagente Folin. A reação foi neutralizada com 300μL de solução de carbonato de sódio e incubadas a 40°C durante 30minutos. A absorvância das amostras foi medida a 765nm num espectrómetro (Genesys10uv, Thermo Spectronic, New York, USA), e foi utilizado ácido gálico como padrão para a

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

reta de calibração (0-800 mg/L). Os resultados foram expressos como médias de triplicados (mg de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato – mgGAE/g).

3.3.1.2 Determinação do teor em flavonóis totais pelo método espetofotométrico

O teor em flavonóides foi determinado pelo método de complexação com AlCl_3 (Zhishen, *et al.*, 1999) modificado para o leitor de microplacas (Powerwave XS Microplate Spectrophotometer, Biotek Instruments, Winooski, USA) de acordo como (Tavares, *et al.*, 2010). A cada poço de uma microplaca de 96 poços foram adicionados 125 μL de água destilada, 25 μL de sumo de fruta *Opuntia spp*, 7,5 μL de NaNO 5% (w/v). A mistura foi deixada a permanecer à temperatura ambiente e após 6 minutos foram adicionados 15 μL de AlCl 10% (w/v). Após 5 min de incubação foram adicionados 100 μL de NaOH (1M). A absorvância foi medida a 510nm. Foi utilizada catequina hidratada como padrão e os resultados são expressos como equivalentes mg catequina por L de sumo (mg CE/L).

3.3.1.3 Determinação do teor em betalainas

Para a determinação das betalaínas, as amostras foram diluídas 20 vezes (100 μL de amostra para um volume total de 2mL em metanol). Para a determinação do teor das betalainas foi utilizada a equação de Nilson (Nilson, 1970). betacianinas (%) = $((a/1129) \times \text{FD} \times 100)$. Betaxantinas (%) = $((y/750) \times \text{DF} \times 100)$; onde $a = 1.095(A_{538}-A_{600})$, $y = A_{476} - (A_{538}-a) \cdot (a/3.1)$ e FD = fator de diluição. As betacianinas e betaxantinas são reportadas por 100g.

3.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência

3.3.2.1 HPLC-DAD-ED

As análises foram efectuadas com o equipamento HPLC de marca Thermo Finnigan (modelo Surveyor) equipado com amostrador automático, bomba e detetor de fotodíodos (DAD) (Thermo Finnigan— Surveyor, San Jose, CA, USA).

Foi ainda utilizado um detetor electroquímico (ED) da Dionex ligado à saída do detector de fotodíodos.

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

Nas análises foi utilizada uma coluna RP-18 (5 μm) 250 \times 4 – Lichrocart[®] e uma pré-coluna RP-18 (5 μm) (Merck) num forno termostaticado a 35°C. O volume de injeção utilizado foi de 20 μL . Os eluentes utilizados foram: Solução de ácido fosfórico (A) (0,1%): 1mL ácido fosfórico *p.a* + 999mL água ultra pura e – Solução de ácido fosfórico (B) (0,1%) + 40% ACN + 59,9% H₂O: 1mL de ácido fosfórico *p.a.* + 400mL de acetonitrilo HPLC gradient grade + 599mL de água ultra pura. O fluxo da fase móvel era de 0,7 mL/min e o gradiente de eluentes utilizado foi o descrito na tabela 3.

A detecção foi feita para comprimentos de onda entre 200-800nm e na aquisição de dados foi utilizado o software Chromquest versão 4.0. Procedeu-se à medição das áreas dos picos dos cromatogramas e na comparação dos espectros de absorção dos compostos.

Tabela 3 – Gradiente de eluentes utilizado na análise por HPLC-DAD-ED

Tempo (min)	Eluente A	Eluente B
0,10	100,0	0,0
15,0	80,0	20,0
25,0	80,0	20,0
70,0	30,0	70,0
75,0	30,0	70,0
85,0	0,00	100,0
100,0	0,00	100,0
101,0	100,0	0,00
110,0	100,0	0,00

O detetor de díodos utilizado possui uma velocidade de 1Hz e uma largura de banda de 5nm, 3 canais individuais (254nm, 280nm e 360nm) e uma velocidade de 10Hz com uma largura de banda de 11nm.

O detetor electroquímico tinha na sua constituição um eléctrodo de carbono vítreo e efectuava medições de sinal por voltametria integrada em gamas de potenciais entre 1.0 V a 1.0V com um varrimento no tempo de 1.00s (deteção por voltametria integrada usando uma variação cíclica do potencial) As medições foram feitas com uma frequência de 50Hz com um conversor analógico/digital, utilizando o software 4880 da Unicam para aquisição de dados.

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

3.3.2.2 Análise por HPLC-MS/MS

As análises foram efectuadas num equipamento Waters® Alliance 2695 (Waters), equipado com amostrador automático, uma bomba quaternária, acoplado a um detetor de fotodiodo Waters 996 PDA (Waters). A deteção foi feita para comprimentos de onda entre 210-600nm.

Nas análises foi utilizada uma coluna RP-18, Synergy, 2.5 µm (100 × 2.00 mm) Max-RP (Phenomenex, USA). A coluna estava a 35°C. O volume de injeção utilizado foi de 5 µL e os eluentes utilizados foram: A: solução de ácido fórmico *p.a* (0,5%) em água ultra pura e B: acetonitrilo grau para LC-MS. O fluxo da fase móvel era de 0,3 mL/min e o gradiente de eluentes utilizado foi o descrito na Tabela 4.

Foi utilizado um espectrómetro de massa Micromass® Quattro micro (Micromass, Waters) com triplo quadrupolo equipado com uma fonte de ionização electrospray (ESI), temperatura de 120°, tensão capilar de 3,0kV e cone de 30V. Os compostos foram analisados tanto em iões negativos e positivos. O azoto de elevada pureza (N₂) foi utilizado como gás de secagem e como gás de nebulização. Para a colisão foi utilizado o árgon (Ar). Para as diferentes experiências de MS/MS foram utilizadas diferentes energias de colisão dependendo dos compostos em estudo. Os dados obtidos foram analisados e tratados com o software Masslynx.

Tabela 4 - Gradiente de eluentes utilizado na análise por HPLC-DAD-MS/MS

Tempo (min)	Eluente A	Eluente B
0.00	99.0	1.0
10.00	98.0	2.0
15.00	98.0	2.0
60.00	80.0	20.0
80.00	72.0	28.0
82.00	70.0	30.0
87.00	70.0	30.0
87.10	99.0	1.0
100.00	99.0	1.0

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

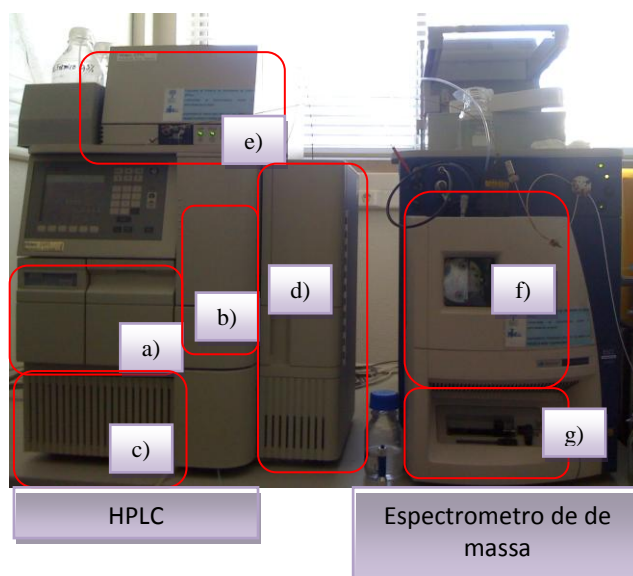


Figura 14 – Equipamento de HPLC-MS/MS. a) Amostrador automático; b) injetor; c) bomba quaternária; d) forno da coluna; e) detetor de diodos; f) fonte de ionização por eletrospray; g) seringa para infusão directa das amostras.

3.3.2.2.1 Otimização do método de MRM

Foram quantificados alguns compostos por MRM (Monitorização de reação múltipla) utilizando-se um programa de análise mais curto (30 minutos). As condições são as descritas na tabela 5 e 6.

Tabela 5 - Condições de análise por HPLC

Eluente A	95,0 % HCOOH 0.5% v/v
Eluente B	5,0 % ACN
Fluxo (mL/min)	0,300
Tempo (min)	30,0
Temperatura da coluna (°C)	35,0

As condições de análise no espectrometro de massa eram as seguintes: potencial do capilar de 3,00kV e o potencial do cone era 35V. A temperatura da fonte era de 120°C e a de dessolvatação era de 350°C. Foi aplicada uma energia de colisão de 30eV.

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

Tabela 6 - Gradiente de eluentes utilizado na análise

Tempo (min)	A%	B%
0.00	95.0	5.0
10.00	60.0	40.0
12.00	10.0	90.0
14.00	10.0	90.0
18.00	95.0	5.0
30.00	95.0	5.0

Na tabela seguinte apresentam-se as gamas de concentração e os dados correspondentes às curvas de calibração obtidas para os compostos ensaiados.

Tabela 7 - Curvas de calibração para os diferentes compostos em estudo

Compostos	Concentrações (ppm)	Curva de calibração ($y=mx+b$)	
		m	b
Ácido Hidroxibenzóico	0,1-5	3433.92	176.49
Ácido clorogénico	0,5-10	6934.88	628.77
Ácido cítrico	0,1-10	3037.58	4321.58
Ácido málico	0,1-5	11728.7	-798.53
Ácido succínico	0,1-5	3919.76	1040.13
Ácido cafeíco	0,1-10	15759.4	1559.37
Ácido ascórbico	0,1-10	1205.8	-187.25
Ácido ferúlico	0,5-10	1352.42	160.18
Vanilina	5-50	106.88	-32.35
Quercetina	0,1-25	9517.53	-2051.25
Rutina	0,1-10	6358.76	-48733
Ácido ascórbico	0,5-10	1205.8	-187.25
Ácido p-cumárico	0,1-10	10558	1541.44
Quercetina 3-O-glucósido	5-50	106.28	-61.96
Isoramnetina	0,5-10	1313.7	546.81
Isoramnetina 3-O-glucósido	0,5-50	52.39	168.81
Isoramnetina 3-O-rutinósido	1-50	98.12	133.07

3.3.3 Determinação da atividade antioxidante (AA)

3.3.3.1 Método ORAC

O teste ORAC foi realizado segundo o método realizado por (Huang.,2002) modificado para leitores de microplacas fluorescentes FL800 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA), como descrito por Feliciano et al (2009).

A composição da mistura de reacção é de 1.5×10^{-7} mM FL, 1.9×10^{-1} mM AAPH, em 75 mM de tampão fosfato (pH=7,4) e amostras diluídas de 1:2000 ou 1:1000 em água, com um volume final de 200mL. Essa mistura foi colocada nos 96poços da microplaca,

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

a 37 °C, e a reacção foi iniciada pela adição de AAPH. A Fluorescência emitida pela forma reduzida de FL foi medida numa microplaca FL800 (Bio-tek Instruments Winooski, VT, USA) e registada a cada um minuto a um comprimento de onda de 530±25 nm de emissão e de 485±20nm para c.d.o de excitação durante 30 minutos. O tampão fostato (75mM, pH = 7,4) foi utilizado para preparar soluções de AAPH e FL e utilizado como branco. Foram utilizadas soluções de 10, 20,30, 40 e 50mmol/L de Trolox como padrões de controlo.

Os valores finais foram expressos como equivalentes Trolox por litro de sumo *Opuntia* (mM TEAC).

3.3.3.2 Método HORAC

O ensaio de HORAC foi baseado num método já relatado anteriormente (Ou, B *et al.*, 2002) modificado para um leitor de microplacas (FL800), descrito por Serra *et al.*, 2010. Foram utilizados 10µL de amostras, adicionadas a 180µL de FL ($4 \times 10^{-3} \mu\text{M}$), e 10µL de CoF₂ (0,79 mg/ mL). A reacção foi iniciada com a adição de 5µL H₂O₂ (1.1 M) numa microplaca de 96poços, colocada a 37°C. A fluorescência emitida pela forma reduzida FI foi medida e registada a cada min durante aproximadamente 35min. A microplaca foi lida utilizando filtros de fluorescência para comprimentos de onda de excitação de 485±20 nm e de emissão de 530±25 nm. O leitor de placas foi controlado pelo software Gen5. O ácido cafeíco foi usado como padrão, pois proporciona uma gama mais linear em relação ao ácido gálico. Os dados foram expressos em µmoles equivalentes de ácido cafeíco (CAE) por litro de sumo.

3.3.4 Cultura de células

As células Caco-2 foram adquiridas da Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany), e foram rotineiramente cultivadas em RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS, 2mM de glutamina e 5000U de PenStrep. As células foram mantidas em monocamadas em 175 cm² de frascos de cultura e incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂.

3.3.4.1 Ensaio de toxicidade

Os ensaios de toxicidade foram realizados com células Caco-2. Resumidamente, as células foram semeadas com uma densidade de 2×10^4 /poço em placas de 96 poços e o

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

meio foi trocado a cada 48 horas. Os ensaios foram realizados com células totalmente diferenciadas (após atingir confluência, ± 96 hours). As células Caco-2 foram incubadas com 50mgGAE/L de cada PRE diluído com o meio de cultura (RPMI 1640, em média de 0,5% FBS e glutamina 2mM) durante 48 horas (foi ainda efetuado um controlo onde as células foram incubadas com meio de cultura celular). Após 48h de incubação, o meio foi removido e adicionado reagente MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay) a cada poço para 4 horas. O MTS é reduzido por células viáveis a um produto formazan e foi quantificada pela medida da abs a 570nm em BioTek™ Power Wave XS. Os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados expressos em percentuais, para o controlo com meio de cultura. Os controlos foram realizados incubando as células com meio de cultura com PBS substituindo o ERPs.

3.3.4.2 Inibição da formação de ROS

Para avaliar a capacidade antioxidante intracelular de *Opuntia ficus-indica*, foram utilizadas células Caco-2 semeadas com uma densidade de 2×10^4 /poço em placas de 96 poços e o meio foi trocado a cada 48 horas. Os experimentos foram realizados com células totalmente diferenciadas (após atingir confluência, ± 96 hours) que são um bom modelo de barreira intestinal. A atividade antioxidante celular do ERPs foi avaliada após a formação de espécies reativas de oxigénio em células Caco-2 e após tratamento com dois stressores químicos: AAPH e H_2O_2 . A formação de ROS intracelular foi monitorizada utilizando uma sonda fluorescente, DCFH-DA. Em resumo, para o ensaio de pré-incubação as células Caco-2 diferenciadas foram lavadas com PBS e incubadas com PREs (50mg GAE/L) e 100mM de DCFH-DA cerca de 1h. Após remoção de ERP-DA com DCFH e lavadas, 600 μ M ou 10mM de H_2O_2 foram adicionados às células por 60min. Para o ensaio co-incubação, à PREs foram adicionadas as células Caco-2, ao mesmo tempo que os stressores químicos, e após uma hora de incubação com DCFH-DA. Para ambos os ensaios, a fluorescência (F) foi medido para cada amostra em 0 e 60 min num leitor de microplacas (FL800 Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). A atividade antioxidante celular do PREs foi expresso como a percentagem de inibição da ROS intracelular causada pela exposição ao stress oxidativo e foi calculado $(1 - (F_{60min} - F_{0min}) / F_{0min}) \times 100$ contra um controlo (células ERPs). Os ensaios foram feitos em

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

triplicado e os resultados foram expressos como uma percentagem da absorvância em relação às células controlo.

3.3.4.3 Inibição da oxidação de glutathiona (GSH)

As células Caco-2 foram semeadas em seis placas com uma densidade de 1×10^5 células/poço e cultivadas em meio (RPMI – 1640 suplementadas com 2mM de glutamina, FBS 10% e 1% Penstrep) durante 21 dias para obter células totalmente diferenciadas. As células foram lavadas com PBS e incubadas com ERPs (50mg GAE/L) em PBS durante 1hora, excepto os poços de controlo que apenas foram incubadas com PBS. Os ERPs foram removidos e foram adicionados 10 mM de H_2O_2 (indutor de stress) em todos os poços, excepto para o poço controlo (sem ERP e sem indutor de stress), durante 1hora. Os meios de comunicação extracelular foram removidos e foi adicionado um suplemento LyticTM com proteases durante 5 min. As células foram removidas por demolição e centrifugados de 14000g, durante 10 min a 4°C (Hettich Zentrifugen MIKRO 220R). Os sobrenadantes foram congelados a -80 °C para a determinação de proteínas carbonilo.

As células foram ressuspendidas em PBS e centrifugadas a 14000g, durante 10min a 4°C. Para quantificar GSH e GSSG, foi adicionado ácido metafosfórico frio 10% (v/v) às amostras. Após incubação e centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para tubos de 1,5 ml de propileno (50µL para determinação de GSH e 200µL para a determinação de GSSG). A derivatização foi feita de acordo com Kand'ar et al, 2007 adaptado de from HISSIN & HILF, 1976. Em resumo para a análise de GSH foi utilizado 1mL de EDTA (0,1% w/v) em 50µL, 0,1M de fosfato hidrogénio de sódio, pH 0,8. A uma porção de 20 µL da mistura, foram adicionados 300 µL de EDTA (0,1% w/v) em 0.1M PBS, e 20 µL de 0.1% (w/v) ortoftalaldeido (OPA) em metanol. Os tubos foram incubados a 25 °C durante 15min no escuro. A mistura foi então armazenada a 4 °C até a análise. Para a análise de GSSG, 200 µL do sobrenadante foi incubado a 25 °C com 200 µL de 40mM de N-etilmaleimida (NEM) durante 25 min no escuro. A esta mistura, foram adicionados 750 µL de NaOH 0.1M. Uma porção de 20 µL foi misturada com 300 µL de NaOH 0.1M e 20 µL de OPA de 0,1%. Os tubos foram incubados a 25 °C durante 15min no escuro e armazenados a 4 °C até a análise.

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

A análise cromatográfica foi realizada utilizando uma eluição isocrática em coluna analítica C18 (Supelcosil™ ABZ+Plus HPLC Column 15cm x 4.6mm, 3µm (Supelco) a 40 °C em (Acquity™ UltraPerformance LC system (Waters)). A fase móvel consistiu em 15 % (v/v) de metanol em 25mM (v/v) de PBS, pH 6.0. O fluxo foi mantido constante a 0.7mL min⁻¹. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram fixados entre 350 e 420nm, respetivamente. A quantidade de GSH e GSSG foi quantificado a partir da área do pico correspondente usando o software Empower® Pro 2.0. A concentração de GSH e GSSG nas amostras foi determinada a partir de curvas padrão com intervalos entre 0-100 µM GSH e 0-5 µM para GSSG. Os valores foram normalizados para o teor de proteína total determinado com o reagente Bradford usando BSA como padrão.

3.3.4.4 Inibição da oxidação de proteínas

As células Caco-2 foram semeadas em seis placas com uma densidade de 1x10⁵ células/poço e cultivadas em meio (RPMI – 1640 suplementadas com 2mM de glutamina, FBS 10% e 1% Penstrep) durante 21 dias para obter células totalmente diferenciadas. As células foram lavadas com PBS e incubadas com ERPs (50mg GAE/L) em PBS durante 1 hora, excepto os poços de controlo que apenas foram incubadas com PBS. Os ERPs foram removidos e foram adicionados 10mM de H₂O₂ (indutor de stress) em todos os poços, excepto para o poço controlo (sem ERP e sem indutor de stress), durante 1 hora. Os meios de comunicação extracelular foram removidos e as células foram destacadas através da adição de tripsina seguindo-se a inativação, com meio de células e uma centrifugação de 14000g, durante 10 min a 4°C (Hettich Zentrifugen MIKRO 220R).

As proteínas carboniladas foram determinadas de acordo com Ramful, D *et al*, 2010 com algumas modificações. Em resumo, 40 µL de lisados celulares (0,6 mg/mL de proteína) foram desnaturadas por 5 µL de sulfato de sódio dodecil (SDS) durante 10 min em temperatura ambiente. Os carbonilos de proteínas presentes nas amostras foram derivatizados usando 80 µL de 5mM DNPH em 2M HCl, durante 20min à temperatura ambiente. As amostras foram diluídas e neutralizadas adicionando 5 µL a 1mL de PBS seguido pela adição de 100 µL de cada amostra na placa de ELISA (NUNC Maxisorp) durante 3 h a 37 °C, bloqueadas com 200 µL de tampão de bloqueio durante a noite a 4 °C, e foi sondado um coelho com anticorpos anti-DNPH durante 3h em

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

temperatura ambiente. O substrato tetrametilbenzina foi adicionado para permitir a oxidação, durante 15min a temperatura ambiente, havendo a formação de um complexo azul safira. A reação foi interrompida pela adição de HCL 2M e a abs foi medida a 450nm em BioTek™ Power Wave XS microplate reader. Os ensaios são expressos como uma percentagem de abs em relação às células controlo.

4. Resultados e discussão

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

4.1 Caracterização química de sumos por HPLC-MS/MS

Numa fase inicial do trabalho pretendeu-se identificar os compostos presentes nas amostras de sumos. Escolheu-se a amostra de sumo de Marvão e procedeu-se à sua análise por HPLC-MS/MS. A escolha da amostra de Marvão deveu-se ao fato desta apresentar cor avermelhada o que permitia prever a presença de betalaínas em teores mais elevados, logo uma maior diversidade de compostos a analisar. Considerou-se por isso esta amostra como mais representativa do conjunto de amostras em estudo.

A cromatografia líquida em fase reversa com eluição por gradiente tem sido amplamente utilizada para a separação e caracterização de compostos, nomeadamente compostos fenólicos e betalaínas (Del Caro, A *et al.*, 2004; Feugang J., 2006). As condições de HPLC utilizadas permitiram uma boa separação dos componentes da amostra. Os compostos foram caracterizados tendo como base os seus tempos de retenção, espectro de UV, massa molecular (m/z) e respetivas fragmentações. Alguns dos picos foram identificados comparando espectros de massa dos compostos presentes no sumo de *Opuntia*, com espectros de massa de padrões disponíveis no mercado e analisados nas mesmas condições.

É sabido que os espectros UV dos compostos fenólicos possuem bandas características, devido aos sistemas de anéis aromáticos conjugados. Os flavonóis e flavonas exibem duas bandas de absorção, a primeira entre os 300-390nm, e a segunda entre os 250-280nm.

Na figura 15, estão comparados os cromatogramas referentes à amostra do sumo de Marvão a diferentes comprimentos de onda, analisados no sistema de HPLC-MS/MS e no sistema HPLC-DAD-ED. Pretendeu-se deste modo comparar os resultados obtidos por equipamentos diferentes com colunas diferentes e sistema de eluentes diferentes. O cromatograma a 280nm é o mais complexo, apresentando um maior número de compostos em comparação com o cromatograma a 360nm. Os compostos que apresentam absorção superior a 360 nm surgem no cromatograma em tempos de retenção superiores a 45 minutos.

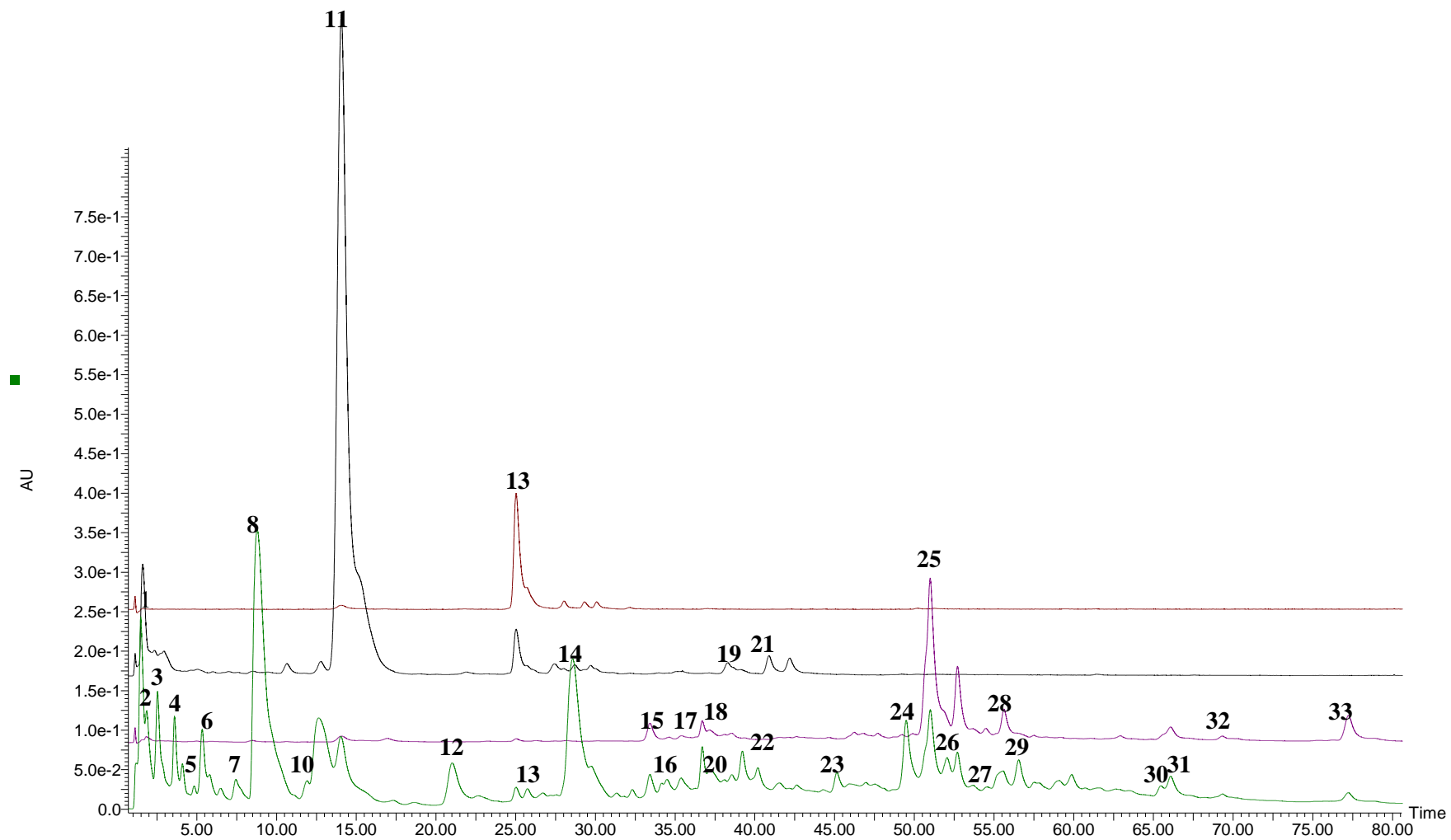
Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

05-Apr-2011 20:18:40 Opuntia 3 (conc. 10x)

Cafe_28Mar2011_62

2: Diode Array
280
Range: 3.535e-1

A



Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

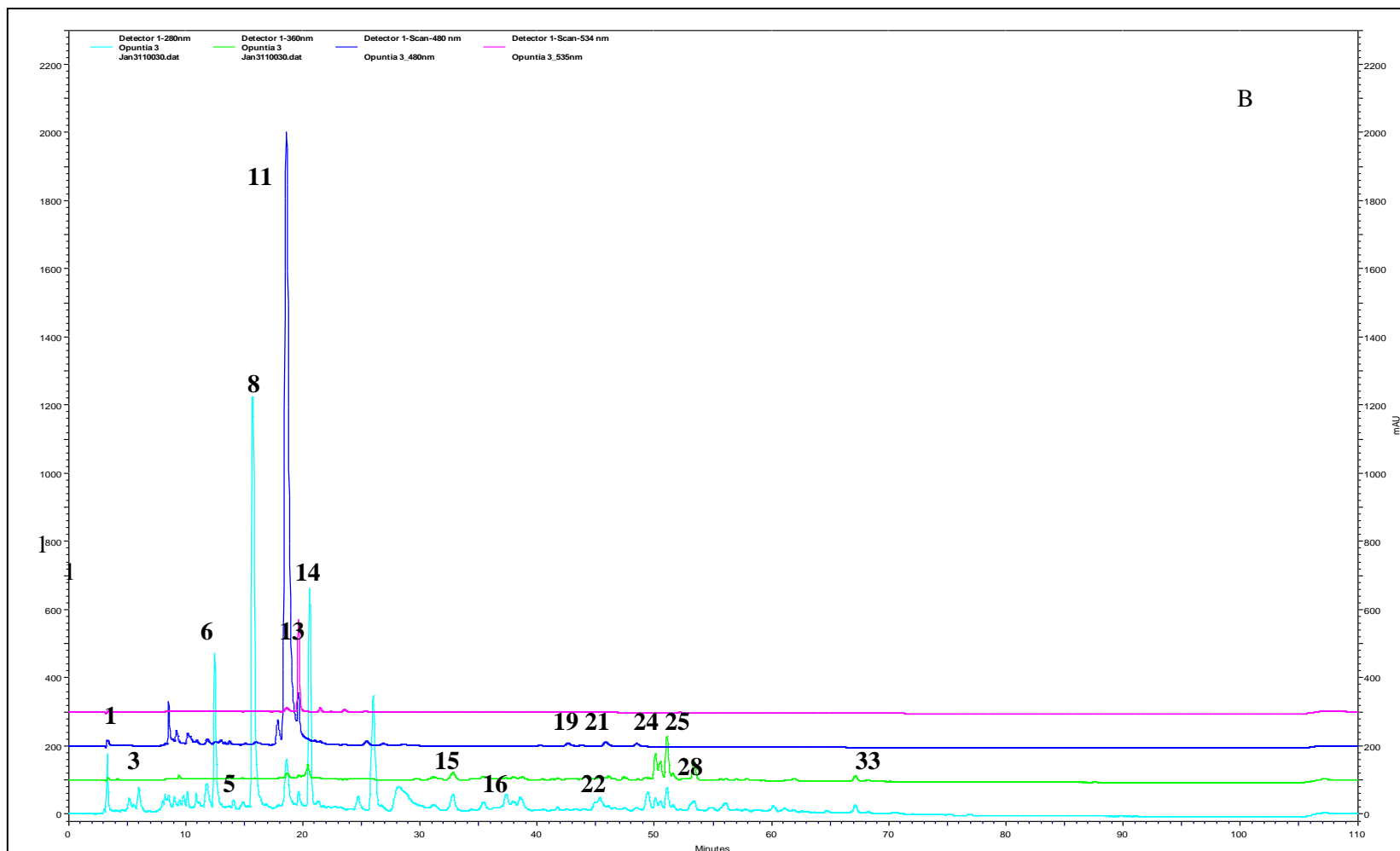


Figura 15 – Perfis cromatográficos do sumo de Marvão, analisado por HPLC-MS a 280nm,360nm, 480 e 535nm (A) e HPLC-DAD (B), a diferentes comprimentos de onda (280nm, 360nm, 480nm, 535nm).

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

Na comparação dos perfis cromatográficos foram escolhidos quatro comprimentos de onda diferentes. Estes comprimentos de onda têm em conta as famílias de compostos que nos pareceu interessante pesquisar e que já foram anteriormente detetadas em amostras deste tipo. Assim para o comprimento de onda de 280nm são visíveis preferencialmente todos os compostos fenólicos, a 360nm os flavonóis e a 480nm e 535nm, as betalainas, respetivamente as betaxantinas e betacianinas. No entanto estes c.d.o. não são específicos dado que por exemplo as betalainas podem também apresentar absorção a 280nm.

Os perfis cromatográficos apresentados na figura 15, mostram que apesar das diferenças no equipamento e nas colunas, os perfis cromatográficos são semelhantes.

Na tabela 8 são apresentadas pela ordem de eluição dos compostos, as possíveis identificações dos compostos detetados nos cromatogramas. Estes são identificados com o respetivo nome, tempo de retenção, fragmentação e comprimento de onda de absorção máxima. A identificação foi feita fundamentalmente com base nos dados obtidos por espetrometria de massa, tendo sido identificado o ião molecular desprotonado $[M-H]^-$ dos picos correspondentes aos compostos nos cromatogramas. As condições de análise por MS foram otimizadas a fim de detetar o pico mais intenso nos espetros de MS, correspondente ao ião molecular $[M-H]^-$. Para a maioria dos compostos detetados o ião molecular $[M-H]^-$ foi submetido a fragmentação MS^2 , para ser mais fácil a identificação estrutural do composto a partir do seu padrão de fragmentação.

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

Tabela 8 – Identificação de compostos nas amostras de sumo *Opuntia spp.* por LC-MS/MS

Pico	Tr(min)	UV λmax	[M-H] ⁻ m/z	MS/MS m/z	Identificação	Famílias
1	1.61	250	133	MS ² [133]: 71(100%),115(50,91%), 73(25,61%)	Ácido málico	Ácido
2(I)	2.04	230	191	MS ² [191]: 85(21%)	Ácido quinico	Ácido
2(II)	2.19	230, 260	191	MS ² [191]: 111(100%), 87(99,37%)	Ácido cítrico	Ácido
3	2.73	230, 260	117	MS ² [117]: 73(11), 57(54%)	Ácido succínico	Ácido
4	3.60	255, 280(sh)	282	MS ² [282]: 215 (100%)	n.i.	
5	4.21	255, 280(sh)	329	MS ² [329]: 329 (23%), 122(72%)	n.i.	
6	5.42	280	271	MS ² [271]: 181(100%), 123(85%),109(63%), 73(41%)	n.i.	
7	6.9	260	417	MS ² [417]: 165(178%)	Derivado de ácido piscídico	Ácido
8	8.8	274	255	MS ² [255]: 193(14%), 179(34%),165(100%),149(19%),73(33%)	Ácido piscídico	Ácido
9	9.0	274	269	MS ² [269]: 109(100%), 103(69%)	n.i.	
10	13.1	280	203	-	n.i.	
11	14.4	477, 263	309	MS ² [309]: 309(100%), 263(8,66%), 217(4,49%)	Indicaxantina	Betalaina
12(I)	21.1	280	255	MS ² [255]: 193(17%), 179(0.49%), 165(19%), 149(56%),123(100%), 87(19%)	n.i.	
12(II)	21.1	280	253	-	n-metileucomato	
13(I)	25.3	535	551	MS ² [551]: 389(100%)	Betanina	Betalaina
13(II)	25.8	535	551	MS ² [551]: 389(100%)	Isobetanina	Betalaina
13(III)	26	280	343	MS ² [343]: 290(57%), 139(100%)	n.i.	
14(I)	28	274	137	Confirmado com padrão	Ácido hidroxibenzoico	Ácido
14(II)	28	274	239	MS ² [239]: 179(63%), 149(41%), 133(39%), 107(100%)	Ácido eucómico	Ácido
15	33	333(sh), 325	355	MS ² [355]: 175(100%),193(8%),160(37%)	n.i.	Ácido
16	35	280(sh), 321	431	MS ² [431]: 385(100%), 267(64%)	n.i.	
17	36	300(sh), 325	179	MS ² [179]: 107(100%) 89(97%)	Ácido cafeíco	Ácido
18	37	300(sh), 325	959	-	n.i.	
19	37.33	480	325	MS ² [325]: 191(69,29%), 279(28,59%), 235(23,66%), 281(8,98%),	Betaxantina-leucina	Betalaina
20	37.7	280(sh), 323	371	MS ² [371]: 249(100%), 121(24%)	n.i.	
21	40	480	359	MS ² [359]: 223(22,07%), 131(27,20%), 269(15,06%), 315(18,75%)	Betaxantina-fenilalanina	Betalaina
22	41	250, 320(sh), 471	223	MS ² [223]: 163(100%), 161(42%), 133(36%), 91(28%)	n.i.	
23	45	270	613	MS ² [613]: 286(100%)	n.i.	
24	49	274	565	-	n.i.	
25(I)	51	255, 353	769	MS ² [769]: 315(100%)	Isoramnetina 3-O-rutinósido-ramnósido	
25(II)	51	255, 353	755	MS ² [755]: 315 (100%)	Isoramnetina 3-O-ramnósido-lixose-glucose	Flavonol
26(I)	52.7	255, 353	609	MS ² [609]: 314 (100%), 315(29%)	Isoramnetina 3-O-lixose-glucose	Flavonol
26(II)	52.9	260, 325	193	MS ² [193]: 175(100%)	n.i.	Ácido
27	54	255, 353	609	MS ² [609]: 300(31%), 301(53%)	Rutina	Flavonol
28(I)	55	255, 353	623	MS ² [623]: 315 (100%)	Isoramnetina 3-O-rutinósido	Flavonol
28(II)	55	255, 353	593	MS ² [593]: 314 (100%)	n.i.	
29	56.5	255, 353	463	Confirmado com padrão	Quercetina 3-O-glucósido	Flavonol
30	65.6	247, 320	301	Confirmado com padrão	Quercetina	Flavonol
31	66	280, 325	431	237(75%), 209(26%), 193(44%), 165(27%)	2-feruloil Ácido piscídico	Ácido
32	70	280, 325	461	MS ² [431]: 252(55%), 237(41%), 223(75%), 209(100%), 193(63%), 165(56%)	Derivado ácido piscídico	Ácido
33	77	255, 360	315	Confirmado com padrão	Isoramnetina	Flavonol

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

Os compostos identificados podem ser divididos em várias famílias: os ácidos carboxílicos que eluem no início do cromatograma dada a sua polaridade e são difíceis de detetar por DAD dado que absorvem a baixos c.d.o.; os flavonóis que eluem acima dos 45 min de análise e apresentam maior absorção a 360nm do que a 280nm e as betalaínas que eluem ao longo de todo o cromatograma e possuem máximos de absorção que se localizam na zona do visível. Os compostos serão apresentados consoante a família a que pertencem. No início da tabela estão presentes os ácidos (figura 16) málico, cítrico e quínico.

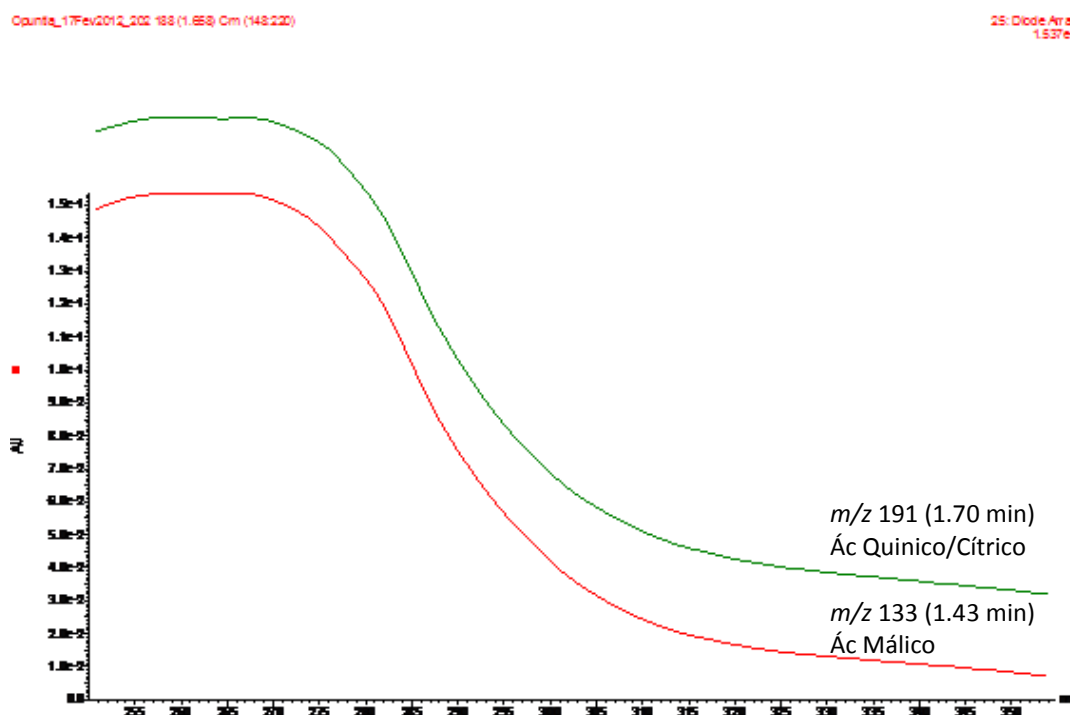


Figura 16 – Comparação de espectros de absorção do ácido málico, cítrico, quínico.

Pelo perfil traçado no cromatograma pode-se inferir que estes ácidos são bastante parecidos, para além do fato de eluírem todos com tempos de retenção muito próximos.

O composto 1 com tempo de retenção de 1,61min, apresentou $[M-H]^-$ de m/z 133 e foi identificado como ácido málico, pertencente ao grupo dos ácidos carboxílicos que está presente em muitas frutas e vegetais. Este ácido já foi descrito anteriormente em amostras de *Opuntia* (Stintzing, F *et al.*, 2005; Fernández-Fernández, R *et al.*, 2010), e apresentou um fragmento importante m/z 115, que deverá corresponder à perda de uma molécula de água $[M-H-H_2O]^-$ (figura 17) (Fernández-Fernández, R *et al.*, 2010).

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

Estes fragmentos foram confirmados com as fragmentações apresentadas no padrão que foi analisado.

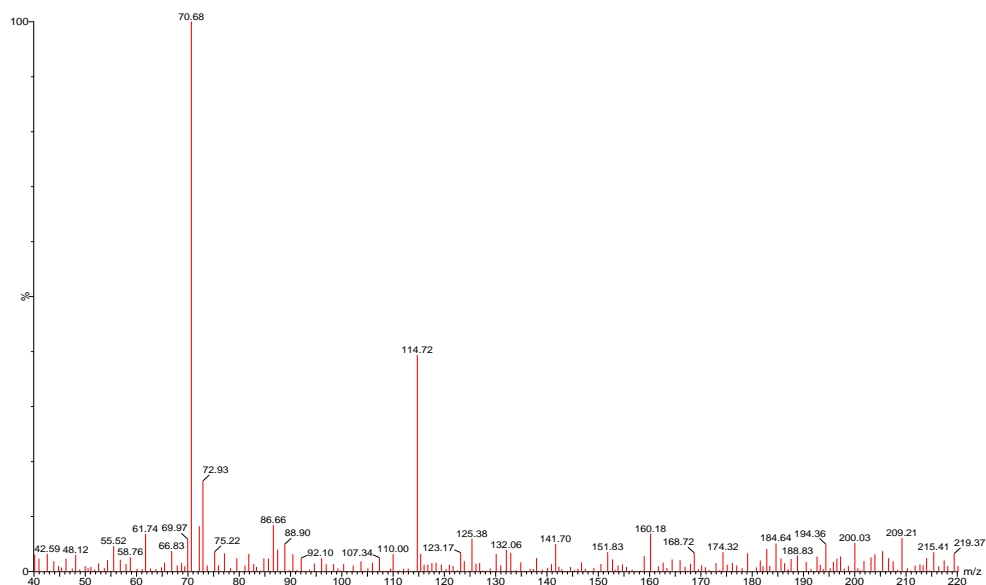


Figura 17 - Espectro de MS/MS do ião molecular 133 identificado como ácido málico

O composto 2(I) apresenta um ião $[M-H]^-$ m/z 191 e foi identificado como ácido quínico, apresentando um tempo de retenção e um padrão de fragmentação semelhante ao do padrão analisado nas mesmas condições.

Os compostos 2(I) e 2 (II) apresentam tempos de retenção muito próximos. A análise de soluções padrão de ácido cítrico e ácido quínico permitiu identificar os dois compostos, a partir do seu espectro de fragmentação. Assim o m/z 191 ($t_r= 2.04$) foi identificado na amostra como ácido quínico e apresentou um fragmento a m/z 85 que foi comparado com a sua solução padrão. O composto 2(II) ($t_r=2.19$ min) apresentou um ião molecular $[M-H]^-$ m/z 191 e o mesmo tempo de retenção e padrão de fragmentação de uma solução padrão de ácido cítrico. Este padrão de fragmentação já foi anteriormente descrito (Fernández-Fernández, R *et al.*, 2010), mostrando um fragmento de m/z 111 que poderá corresponder a $[M-H-CO_2-2H_2O]$, que foi também identificado na amostra.

O composto 3, com um tempo de retenção de 2.73min, mostrou um $[MH]^-$ m/z 117 que foi identificado como ácido succínico. Este composto foi já anteriormente descrito em amostras de *Opuntia*, no entanto apenas foi encontrado nos cladodos, em concentrações vestígias (Stintzing, F *et al.*, 2005). As fragmentações MS² apresentaram m/z 73 e 57 que também aparecem quando se fragmentou o padrão.

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

Outros compostos identificados nestas amostras foram o ácido piscídico e seus derivados.

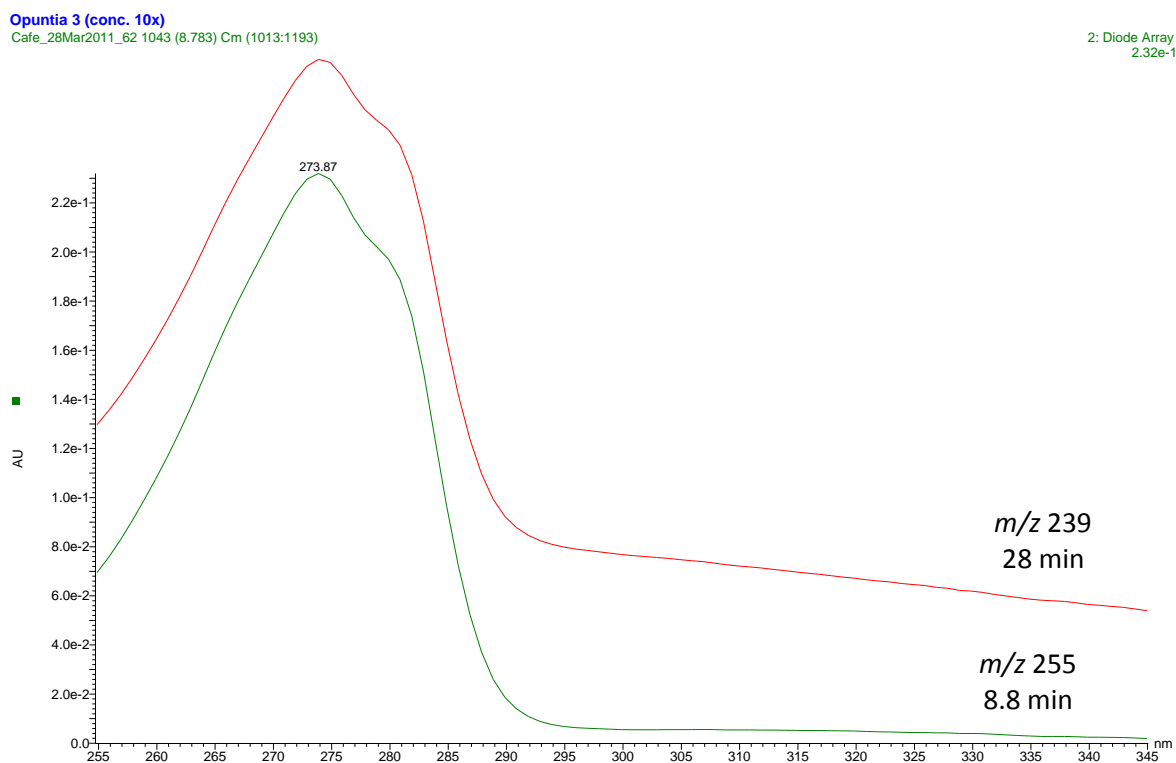


Figura 18 – Comparação de espectros de absorção do ácido piscídico e seus derivados

A figura 18 mostra 2 espectros de absorção correspondentes a compostos com tempos de retenção diferentes no cromatograma no entanto apresentam perfis cromatográficos bastante semelhantes entre si, o que poderá querer dizer que os dois compostos pertencem à família do ácido piscídico (m/z 255, t_r = 8.8min).

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

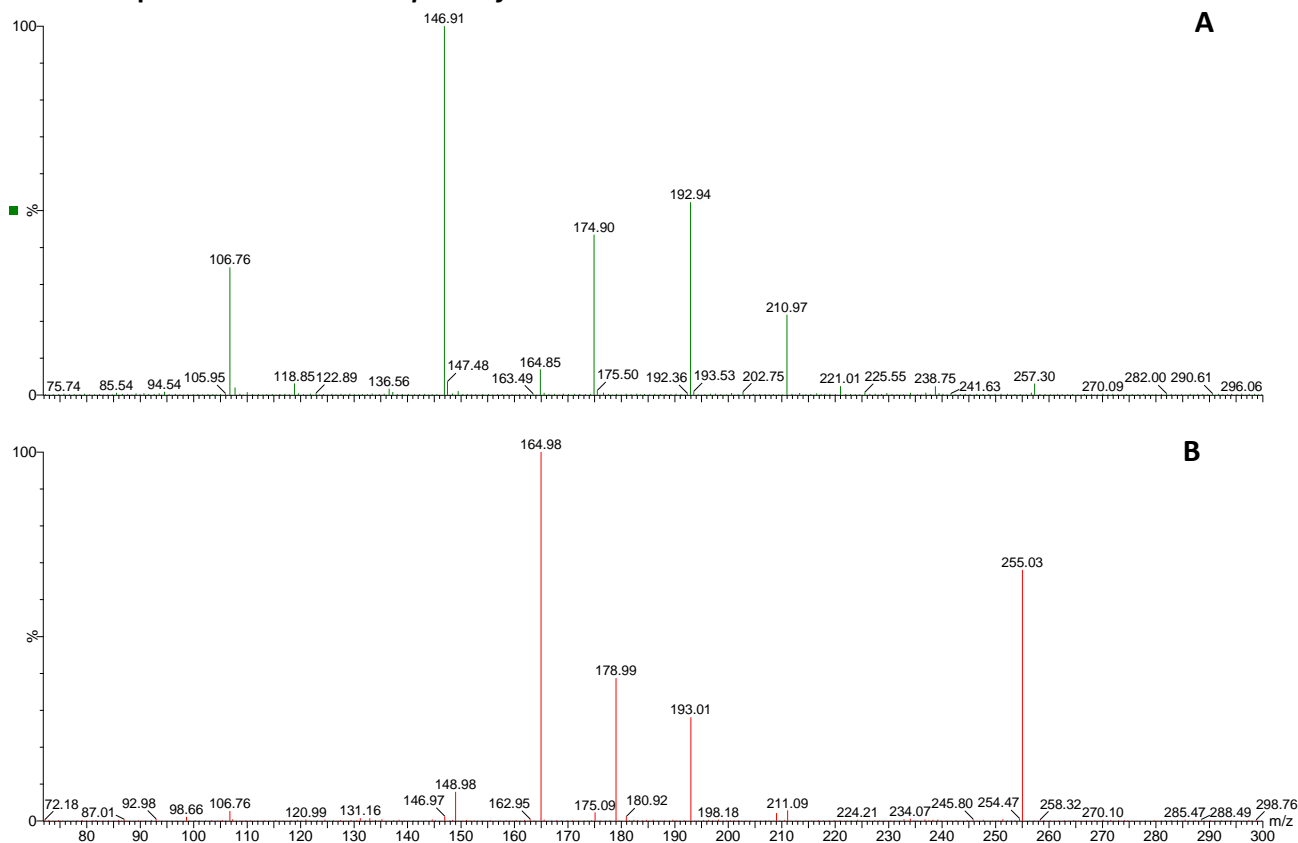


Figura 19 - Espectro de MS/MS do íon molecular 255 identificado como ácido piscídico, em modo positivo (A) e negativo (B).

O ácido piscídico identificado como composto 8, apresenta um tempo de retenção de 8.8min e $[MH]^-$ m/z de 255 e apresentou fragmentos de m/z 165, 193 e 179. Este composto foi também analisado em modo positivo (ESI^+), apresentando m/z 257 (figura 19 (A)). Esta análise em modo positivo apresentou as mesmas fragmentações com um novo fragmento m/z 237. OS íões m/z 239, m/z 257 (ESI^+) e m/z 255 (ESI^-) são íões típicos do ácido piscídico. O íon m/z 193 forma-se provavelmente devido à perda de dióxido de carbono do íon m/z 237. Estes fragmentos detetados são caraterísticos do ácido piscídico, como já foi anteriormente descrito na literatura (Takahira, M *et al.*, 1998). O ácido piscídico foi já encontrado em cládodos e sabe-se que a quantidade deste composto tem tendência a aumentar com a idade, no entanto a sua presença na natureza é bastante restrita (Stintzing, F., 2005).

O espetro de massa MS^2 para o composto 7 $[M-H]^-$ m/z 417 ($t_r = 6.93$ min) apresentou dois íões padrão de fragmentação m/z 193 e m/z 165, que são bastante semelhantes à $[M-H]^-$ íon m/z 255 (menos 162 Da), o que sugere que este composto poderá ser um derivado do ácido piscídico.

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

O composto 31 (I) com $[M-H]^-$ m/z 431 ($t_r=66\text{min}$) apresentou fragmentos de m/z 193 e m/z 165, um padrão muito semelhante ao do ácido piscídico. O íão m/z 193 poderá ocorrer devido à perda de uma unidade de ferouil (193Da). Menos abundante mas também detetado foi m/z 209 que poderá ocorrer devido à perda de água ou dióxido de carbono de m/z 237 (Wenkui, Li *et al.*, 2003). Com base nestes dados este composto foi identificado como um éster de ácido piscídico de ácido ferúlico.

O composto 32 com $[M-H]^-$ m/z 461 ($t_r=70\text{min}$) apresentou também padrões de fragmentação semelhantes aos do ácido piscídico mais dois fragmentos m/z 223 e m/z 252 provando que este poderá ser também um composto derivado do ácido piscídico. Apesar de não estarem disponíveis os padrões deste ácido para a confirmação, este composto tem sido descrito bem como os seus derivados (Wenkui, Li *et al.*, 2003).

O composto 14 (II) que apresenta $[M-H]^-$ m/z 239 ($t_r=28\text{min}$) e padrões de fragmentação de m/z 179, m/z 149, m/z 133 e m/z 107, possui um $\lambda_{\text{max}} = 274 \text{ nm}$ e foi identificado como ácido eucómico (figura 20), já foi reportado também em *Opuntia* (Jianqin, J *et al.*, 2006).

O composto 12 (II), derivado do ácido eucómico foi também identificado com m/z 253 ($t_r=21 \text{ min}$) e $\lambda_{\text{max}} = 280$ e tem o nome de n-metileucomato, também já relatado em *Opuntia* (Schliemann, W *et al.*, 2001).

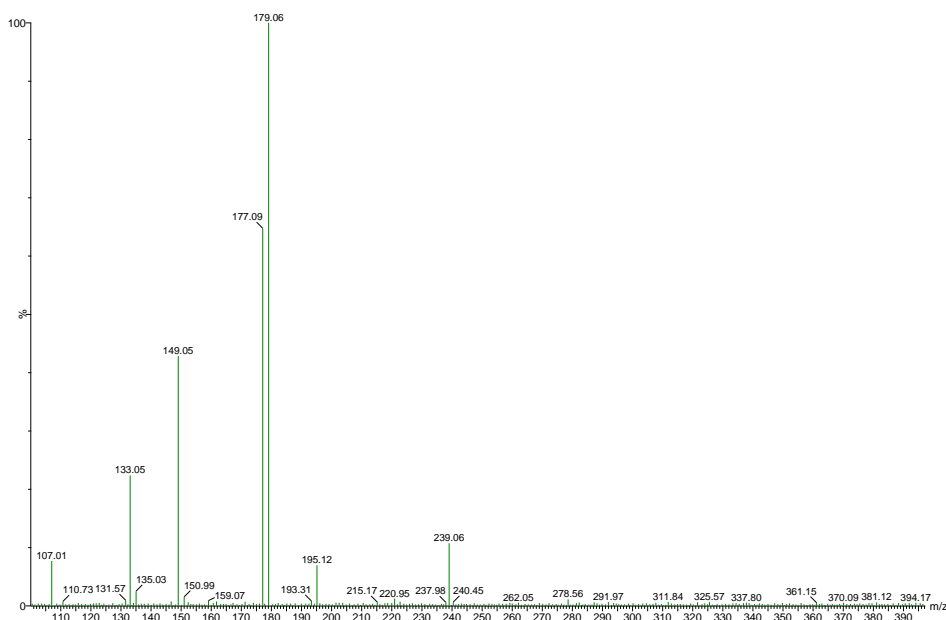


Figura 20 - Espectro de MS/MS do íão molecular 239 identificado como ácido eucómico

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

O composto 17 [M-H]⁻ m/z 179 foi identificado como ácido cafeíco e o seu espectro de MS/MS originou iões m/z 89 e m/z 109. Esta fragmentação foi confirmada com a solução padrão de ácido cafeíco (figura 21).

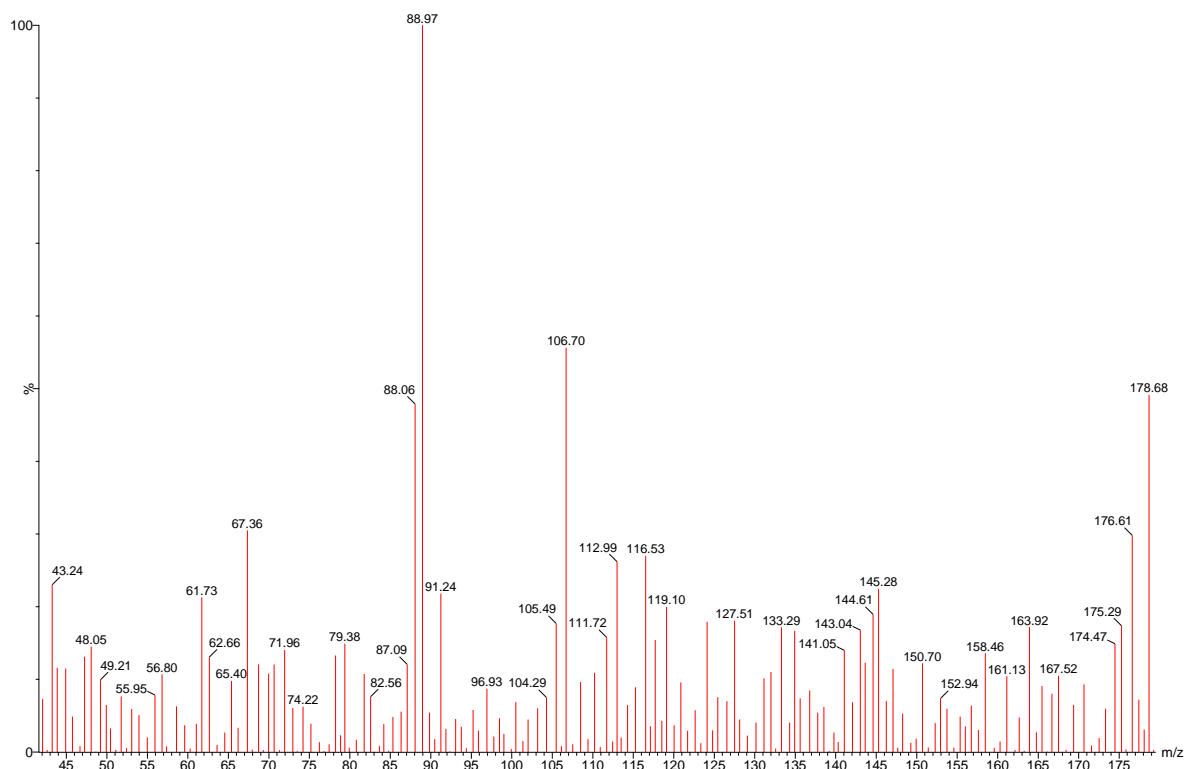


Figura 21 - Espectro de MS/MS do ião molecular 179 identificado como ácido cafeíco

Outra família de compostos presente nesta amostra são os flavonóis, mais propriamente derivados de isoramnetina e quercetina.

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

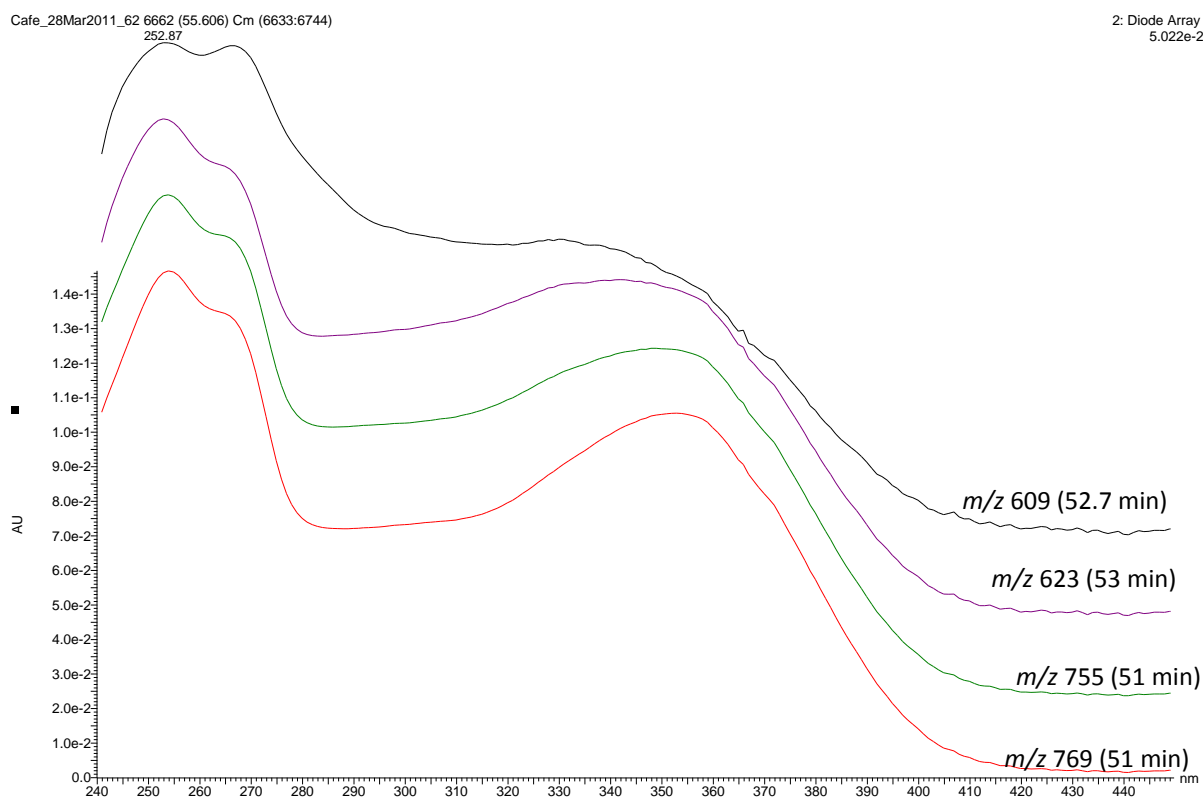


Figura 22 – Comparação de espectros de absorção de flavonóis presentes na amostra

Os flavonóis caracterizam-se por apresentar absorção a 350-360nm.

O composto 25 (I) identificado com um $t_r=51$ min apresenta um m/z de 769. Este composto foi identificado como isoramnetina-3-*O*-rutinósido-ramnósido por comparação do seu espectro de fragmentação com dados da bibliografia (figura 25 (D)) (Hyun, S *et al.*, 2006) em que um dos fragmentos corresponde ao m/z 315, a aglicona da isoramnetina, revelando a perda de 454Da, possivelmente duas unidades ramnoside (2x146 Da) e um hexoside (162).

Da mesma maneira o composto 25 (II) apresentou $[M-H]^-$ m/z de 755 e a sua fragmentação MS^2 tal como no composto anterior, originou o íon m/z 315 característico da isoramnetina, podendo dever-se à perda de três unidades de açúcar, um ramnósido (146 Da), um lixósido (132 Da) e um hexóxido (162 Da). O composto foi identificado como isoramnetina 3-*O*-ramnose-lixose-glucose (figura 25 (C)) como foi descrito por Hyun, S *et al.*, 2006.

O composto 26 (I), identificado como isoramnetina 3-*O*-lixose-glucose apresentou (figura 35 (B)) $[M-H]^-$ m/z de 609 ($t_r=52.9$ min) e tal como os anteriores apresentou um fragmento m/z 315, correspondente à aglicona da isoramnetina. Os açúcares ligados à

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

isoramnetina foram identificados como unidades de hexósido e lixósido (162 Da + 132 Da) (Hyun, S *et al.*, 2006).

O composto 28 (I) apresentou um íão $[M-H]^-$ de m/z 623. O espectro MS^2 originou mais uma vez o íão correspondente à aglicona de m/z 315 (figura 25 (A), revelando a perda de uma unidade de ramnósido e unidades hexósido. De acordo com dados já reportados (Hyun, S *et al.*, 2006) este composto foi identificado como isoramnetina-3-O-rutinósido (figura 23). Este composto já foi anteriormente encontrado em frutos *Opuntia spp* (Stintzing, F *et al.*, 2005; Ginestra, G *et al.*, 2009).

Opuntia 3 (conc. 10x)
Cafe_28Mar2011_62

1: Scan ES-
623
5.18e5

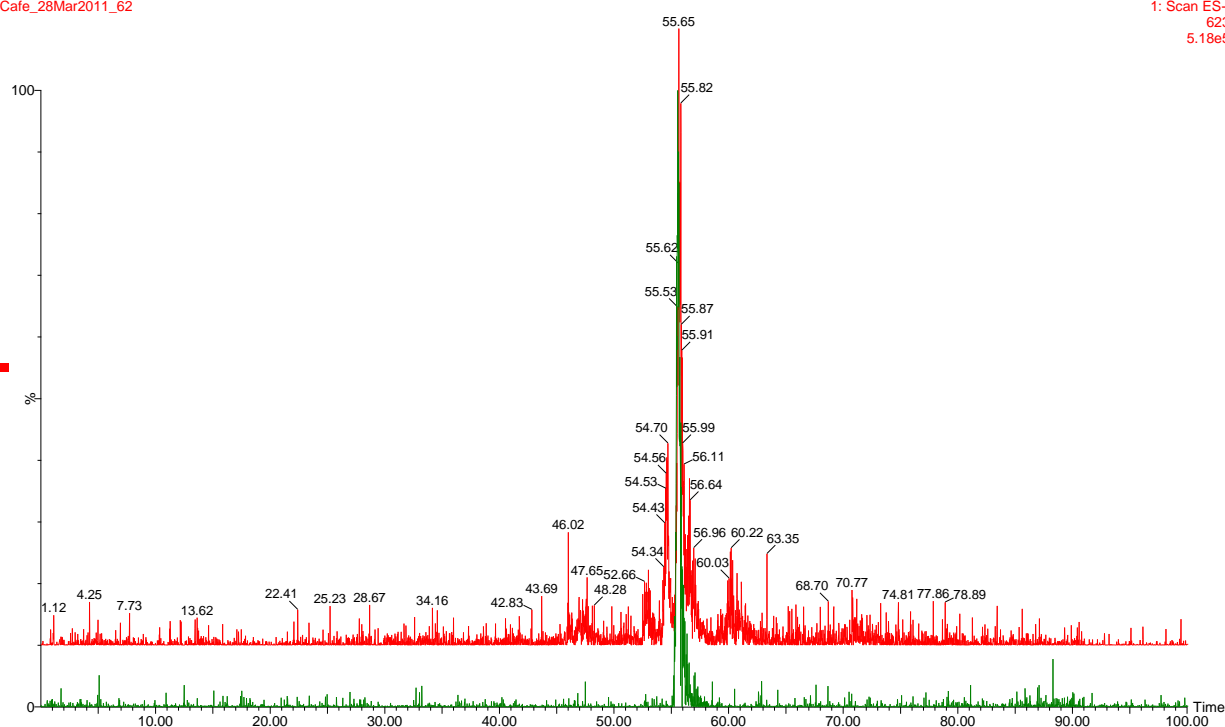


Figura 23 - Cromatograma de MS/MS do íão molecular 623 identificado como **isoramnetina rutinósido** e **padrão**

Por último o composto 33, com um t_r de 77 min apresentou um m/z de 315. Este composto possui um $\lambda_{\text{máx}}=360\text{nm}$ e um tempo de retenção característico da isoramnetina. Procedeu-se à fragmentação e os resultados foram comparados com uma solução padrão (figura 24). A presença deste composto neste tipo de amostras já foi anteriormente reportado (Stintzing, F *et al.*, 2005). Pensa-se que poderá ser um dos flavonóides predominantes em extratos de frutos de casca vermelha, em cerca de 18,8% (Férrnández-López, J *et al.*, 2010), no entanto e contrariamente a outros flavonóis também já foi encontrado nas flores de *Opuntia spp* (Knishinsky, R *et al.*, 2004; Kuti, J., 2004).

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

Na amostra em estudo foi ainda identificada na família dos flavonóis a presença de quercetina 3 – O – glucósido (composto 29) e rutina (composto 27). A quercetina 3-O-glucósido apresentou um íão $[M-H]^-$ de m/z 463 e foi detetada a um tempo de retenção de 51 min quando comparada com a solução padrão, por outro lado a rutina, também denominada por quercetina 3-O-rutinósido, apresenta um íão $[M-H]^-$ de m/z 609 e o seu espectro de fragmentação MS^2 originou os iões m/z 300 e m/z 301, ião aglicona da quercetina formado pela perda de duas unidades, ramnose (146 Da) e um hexósido (162 Da). Para este composto foi também comparado o seu t_r e fragmentação com a respetiva solução padrão.

Por último o composto 30, identificado como quercetina, apresentou um íão $[M-H]^-$ de m/z 463 e apesar das sucessivas experiências de fragmentação não terem sido bem-sucedidas, o composto apresentou um espectro de UV e tempo de retenção semelhante a um padrão de referência. Estes flavonóis derivados da quercetina foram todos confirmados por comparação dos t_r e espectros de fragmentação com soluções padrão correspondentes existentes no laboratório.

Opuntia 3 (conc. 10x)
Cafe_28Mar2011_62

1: Scan ES-
315
1.03e6

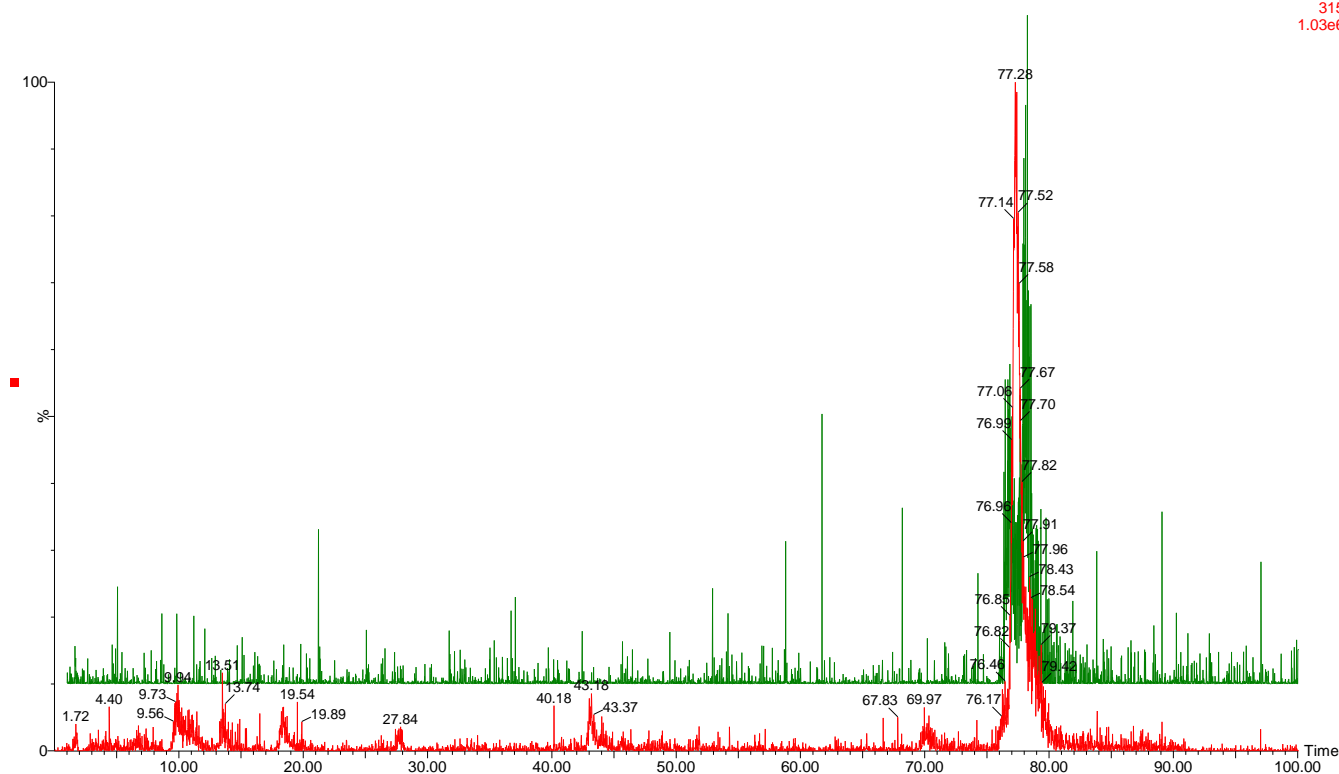


Figura 24 - Cromatograma de MS/MS do íão molecular 315 identificado como **isoramnetina** e **padrão**

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

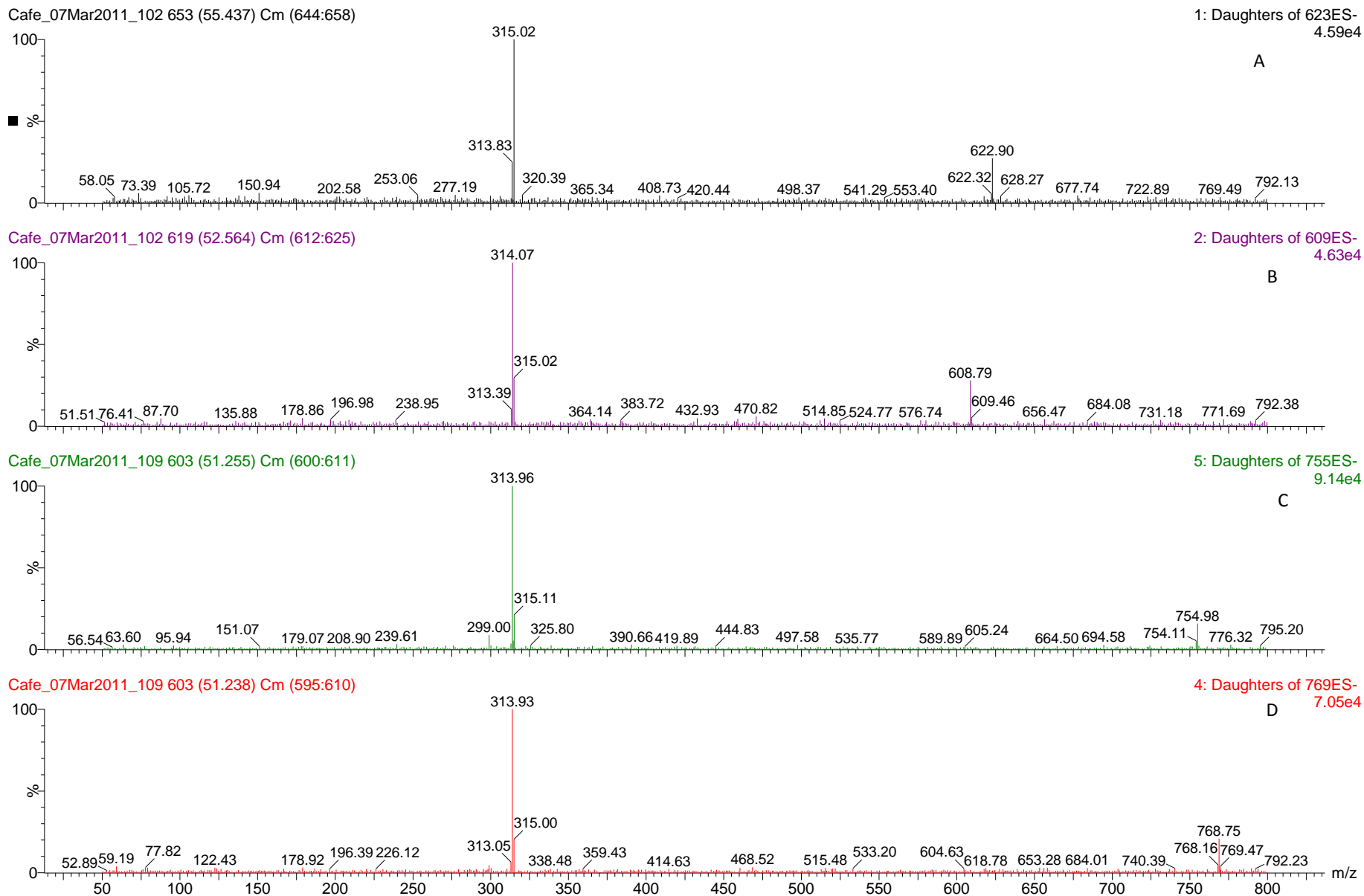


Figura 25 - Espetros MS/MS do composto identificado como (A) Isoramnetina 3-O-rutinósido, (B) isoramnetina 3-O-lix-glu, (C) isoramnetina-ram-lix-glu e (D) isoramnetina – rut-7-ram.

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

Na figura 26 estão representadas as estruturas referentes aos derivados da isoramnetina identificados na amostra.

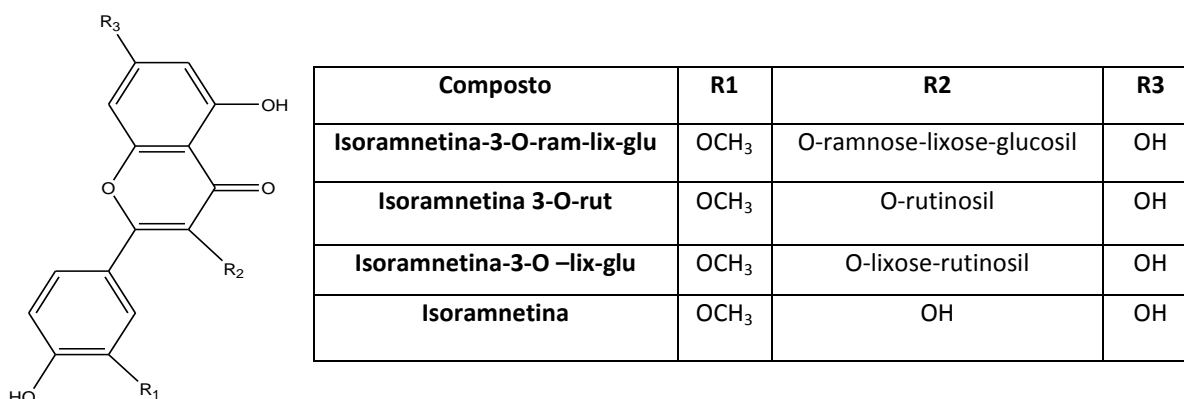


Figura 26 – Estrutura de derivados da isoramnetina

No que se refere à identificação de compostos da família das betalaínas e como já referido anteriormente são os compostos responsáveis pela cor dos frutos (amarelo, vermelho, roxo) e já foram referenciadas na literatura (Li, W *et al.*, 2003). Estes pigmentos são analisados a comprimentos de onda 480nm e 535nm para betaxantinas e betalaínas, respetivamente (Kugler, F *et al.*, 2004).

Na análise por LC-MS/MS as betalaínas devido à sua estrutura são mais facilmente ionizadas em modo positivo (ESI⁺).

O composto 11, que apresenta um tempo de retenção de 14,4 min e um ião molecular [M+H]⁺ de *m/z* 309, foi identificado como indicaxantina (figura 27), uma vez que apresenta um espectro de massa muito semelhante a espectros publicados na literatura (Castellanos-Santiago, E *et al.*, 2008; Fernández-Fernández, R *et al.*, 2010) para amostras de *Opuntia spp.* Este composto é o composto principal das betaxantinas, atribuindo a cor amarela, laranja, vermelha e roxa ao *Opuntia*.

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

Opuntia 3 (conc.10x) DS ESI+

Opuntia_20Abr2011_1 47 (11.969) Cm (46:49)

14: Daughters of 309ES+
1.90e6

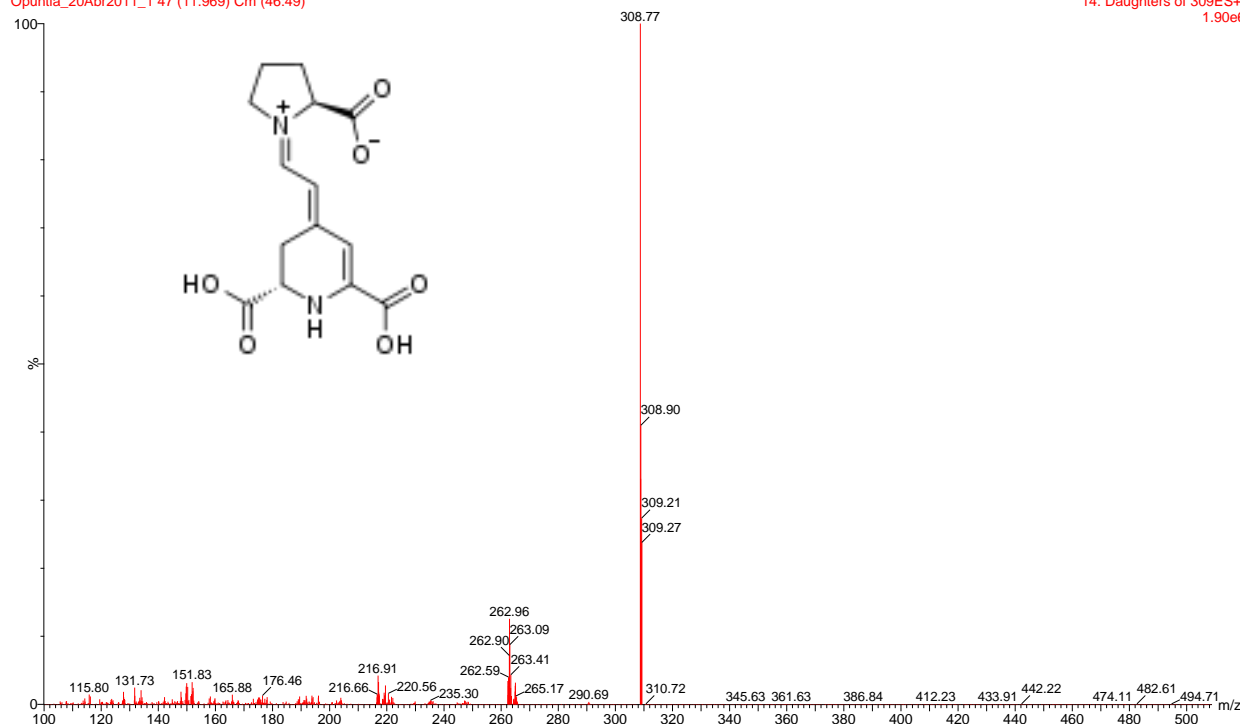


Figura 27 – Estrutura da indicaxantina e respectivo espectro de MS/MS do ião m/z 309

Os compostos 13 (I) e 13 (II) foram identificados como betanina e isobetanina, pelas suas propriedades espectrais, $\lambda_{\text{máx}} = 535 \text{ nm}$ e a presença dos seus iões protonados moleculares $[M + H]^+$ m/z 551 e ião secundário m/z 389 (figura 28). Estes compostos foram já reportados para *Opuntia spp.* (Castellanos-Santiago, E *et al.*, 2008).

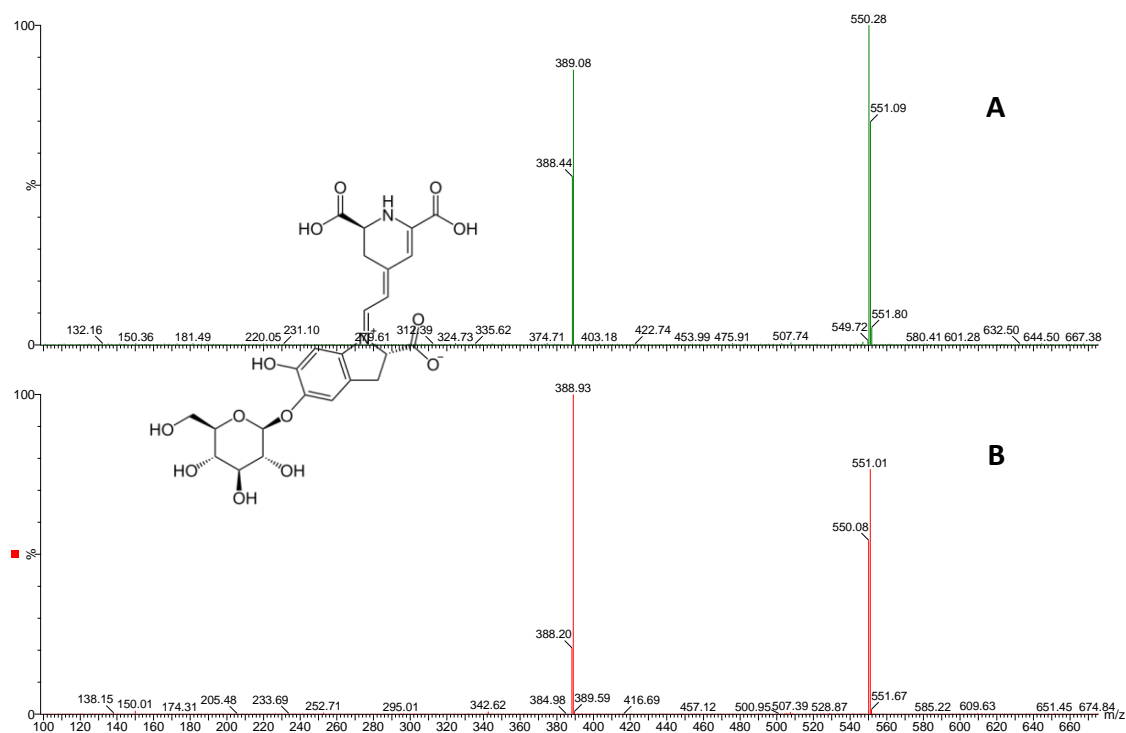


Figura 28 - Espectro de MS/MS do ião m/z 551 correspondente à betanina (A) ($t_r=25.3$) e seu isómero (B) ($t_r=25.8$).

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

O composto 19 foi identificado como betaxantina-leucina pela presença do ião $[M+H]^+$ de m/z 325 que corresponde ao aduto do ácido betalâmico com o aminoácido leucina. Da fragmentação deste ião resulta um ião fragmento de m/z 281 devido provavelmente à perda de um grupo carboxilo e todos os iões moleculares detetados m/z 279, 235, 191, são perdas sucessivas de grupos carboxilo (Schliemann, W *et al.*, 2001).

O composto 21 identificado como betaxantina-fenilalanina, apresentou um ião molecular protonado com um m/z de 359 e na fragmentação MS^2 deteta-se o ião m/z 131 devido à perda de ácido betalâmico, uma molécula de água e grupo carboxilo (Schliemann, W *et al.*, 2001).

4.1.1 Análise quantitativa por MRM

Foi otimizado um método de análise que permitisse a quantificação por MRM de diferentes compostos para os quais se dispunha de soluções de padrão comercial. O MRM tem como base a deteção de fragmentos frequentemente designados por, iões filho. Estes resultam da fragmentação do ião molecular dos diferentes compostos. A transição do ião molecular para o ião filho permite uma diminuição do ruído levando assim a uma maior sensibilidade.

As condições fragmentação, potencial da fonte e energia de colisão usadas estão descritas na tabela 9.

Tabela 9 - Condições MRM dos compostos em ESI

Compostos	Mw (g mol ⁻¹)	Ião precursores (m/z)	Iões produto (m/z)	Fonte potencial (V)	Energia de colisão (eV)	MRM1	MRM2
Ácido Hidroxibenzóico	138	137	93;65	20	20	137>93	137>65
Ácido tartárico	150	149	87;73	25	15	149>87	149>73
Ácido clorogénico	354	353	191;161	20	15	353>191	353>161
Ácido cítrico	192	191	111;87	20	15	191>111	191>87
Ácido málico	134	133	115;71	20	15	133>115	133>71
Ácido succínico	118	117	73;99	20	15	117>73	117>99
Ácido cafeico	180	179	135;107	25	15	179>135	179>107
Ácido ascórbico	176	175	115;87	20	15	175>115	175>87
Ácido ferúlico	194	195	134;178	25	15	193>134	193>178
Vanilina	152	151	136;92	20	15	151>136	151>92
Quercetina	302	301	151;179	35	20	301>151	301>179
Rutina	610	609	300;301	35	35	609>300	609>301
Isoramnetina	316	315	300;151	35	30	315>300	315>151
Isoramnetina 3-O- rutinosido	624	624	315	30	40	624>315	-

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

Isoramnetina 3-O-glucósido	478	477	315;285	40	35	477>315	477>285
Ácido <i>p</i> -cumárico	164	163	119;93	25	15	163>119	163>93
Canferol-3-glucósido	448	447	284;255	30	30	447>284	447>255
Quercetina 3-O-glucósido	464	463	301	40	20	463>301	-

Na tabela 9 são consideradas duas transições (MRM1 e MRM2), a de quantificação e a de confirmação, respetivamente. São consideradas nestas transições os fragmentos de maior intensidade.

Na tabela 10 apresentam-se os resultados referentes às concentrações, tempos de retenção e área dos compostos presentes nas amostras.

Tabela 10 – Quantificação da amostra de *Opuntia spp*

Compostos	Opuntia Tramagal			Opuntia Beja		Opuntia Marvão		Opuntia Sines		Opuntia Sesimbra	
	LQ	RT	Conc.(ppm)	RT	Conc.(ppm)	RT	Conc.(ppm)	RT	Conc.(ppm)	RT	Conc.(ppm)
Ácido Hidroxibenzoico	1	5,84	0,16			6,47	-	6,6	0,05	-	-
	1	5,77	0,11	5,84	<LQ	6,66	-	6,66	0,06	-	-
Ác Protocatechuico	0.5	-	-			4,64	<LQ	4,39	<LQ	-	-
	0.5	-	-	3,69	0,12	4,51	<LQ	4,39	<LQ	-	-
Ác Clorogénico	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	7,43	<LQ
	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	7,43	<LQ
Ác Cítrico	1	1,62	276,27			1,74	240,2	1,74	157,78	1,81	860,61
	1	1,62	255,98	1,68	184,04	1,74	266,78	1,74	133,97	1,81	904,04
Ác Málico	0.1	1,5	2,68			1,5	7,67	1,5	5,64	1,43	6,03
	0.1	1,5	2,45	1,5	14,87	1,5	9,36	1,5	5,23	1,43	3,06
Ác Succínico	0.5	1,95	3,13			2,08	0,99	2,08	5,15	-	-
	0.5	1,95	2,67	1,95	0,61	2,08	1,17	2,08	4,51	-	-
Ác Cafeico	0.5	6,83	<LQ			7,78	<LQ	7,91	0,04	-	-
	0.5	6,83	0,01	6,83	0,02	7,91	<LQ	7,91	0,03	-	-
Ác Ascórbico	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	1,39	3,83
	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	1,39	3,76
Ác <i>m</i> -Cumárico	0.1	-	-	8,7	0,19	-	-	8,67	0,13	-	-
	0.1	-	-	8,7	0,18	-	-	8,67	0,09	-	-
Ác <i>p</i> -Cumárico	0.5	-	-	-	-	-	-	9,69	0,13	-	-
	0.5	-	-	-	-	-	-	9,69	0,09	-	-
Ác Ferulico	0.5	-	-	-	-	10,33	1,15	10,39	6,69	-	-
	0.5	-	-	-	-	10,39	1,28	10,39	6,03	-	-
Ac Quínico	0.1	1,66	82,742434	1,69	56,806655	1,69	70,371915	1,69	42,713679	1,66	30,771528
	0.1	1,66	73,468815	1,69	52,398923	1,69	50,26116	1,69	51,290074	1,66	33,613779

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

Vanilina	5	-	-	10,72	16,54	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	10,72	16,32	-	-	-	-	-	-
Q 3-O-glucósido	5	-	-	10,97	8,4	10,97	10,02	-	-	-	-
	5	-	-	10,97	10,49	10,97	9,83	-	-	-	-
Quercetina	0.1	-	-	14,07	0,29	-	-	-	-	-	-
	0.1	-	-	14,07	16,32	-	-	-	-	-	-
Rutina (Q 3-O-rutinósido)	0.1	-	-	10,74	1,63	11,12	0,46	-	-	-	-
	0.1	-	-	10,74	1,89	11,12	0,43	-	-	-	-
Isoramnetina	0.5	-	-	14,61	0,183	-	-	-	-	-	-
	0.5	-	-	14,69	0,087	-	-	-	-	-	-
	0.5	-	-	14,69	0,002	-	-	-	-	-	-
Isoramnetina 3-O-rutinósido	0.1	-	-	10,92	5,874	-	-	-	-	-	-
	0.1	-	-	11	5,168	-	-	-	-	-	-
	0.1	-	-	11	6,547	-	-	-	-	-	-
Isoramnetina 3-O-rut-ram	*	9,89	0,4972928	9,89	0,7189713	9,89	0,2223921	-	-	-	-
	*	9,89	0,5223429	9,89	1,8221793	9,89	0,1399944	-	-	-	-
	*	9,89	1,0386203	9,89	0,6454378	9,89	0,0082398	-	-	-	-
Isoramnetina 3-O-ram-lyx-glu	*	-	-	9,97	<LQ	9,97	<LQ	-	-	-	-
	*	-	-	9,89	<LQ	9,97	0,3080168	-	-	-	-
	*	-	-	9,81	<LQ	9,89	0,3318446	-	-	-	-
Isoramnetina 3-O-lix-glu	*	-	-	10,39	0,1698514	10,31	0,2895129	-	-	-	-
	*	-	-	10,39	0,014752	10,39	0,2346932	-	-	-	-
	*	-	-	10,39	0,2401236	10,48	0,5613745	-	-	-	-

* LQ = teor calculado em função de Isoramnetina de acordo com o método descrito em: Chandra *et al*, J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 3515-3521

O composto que apresenta uma maior concentração em todas as amostras é o ácido cítrico, seguido do ácido quínico. De uma maneira geral é a amostra de Beja e Marvão que possuem o maior número de compostos.

4.1.2 Separação de frações em Sephadex LH-20

Como já foi referido anteriormente estas amostras são muito complexas e por isso será vantajoso a preparação de fracções que tenham uma composição mais simples. Esta simplificação poderá permitir o fracionamento das amostras por famílias o que poderá para trabalhos futuros, permitir tirar mais facilmente conclusões acerca da atividade biológica dessas famílias. Assim procedeu-se ao tratamento de uma amostra com resina Sephadex LH-20 de acordo com o discutido em 3.2.4. Na figura 29,30 e 31 apresentam-se os perfis obtidos para a fração F2, F3 e F4. Nos cromatogramas apenas

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

é considerado para o eixo dos x os 20min, na medida em que não existem mais picos para além deste tempo.

25-Feb-2012 17:14:25 Opuntia Quarteira

Opuntia_24Fev2012_43

9: Diode Array
280
Range: 2.287e-1

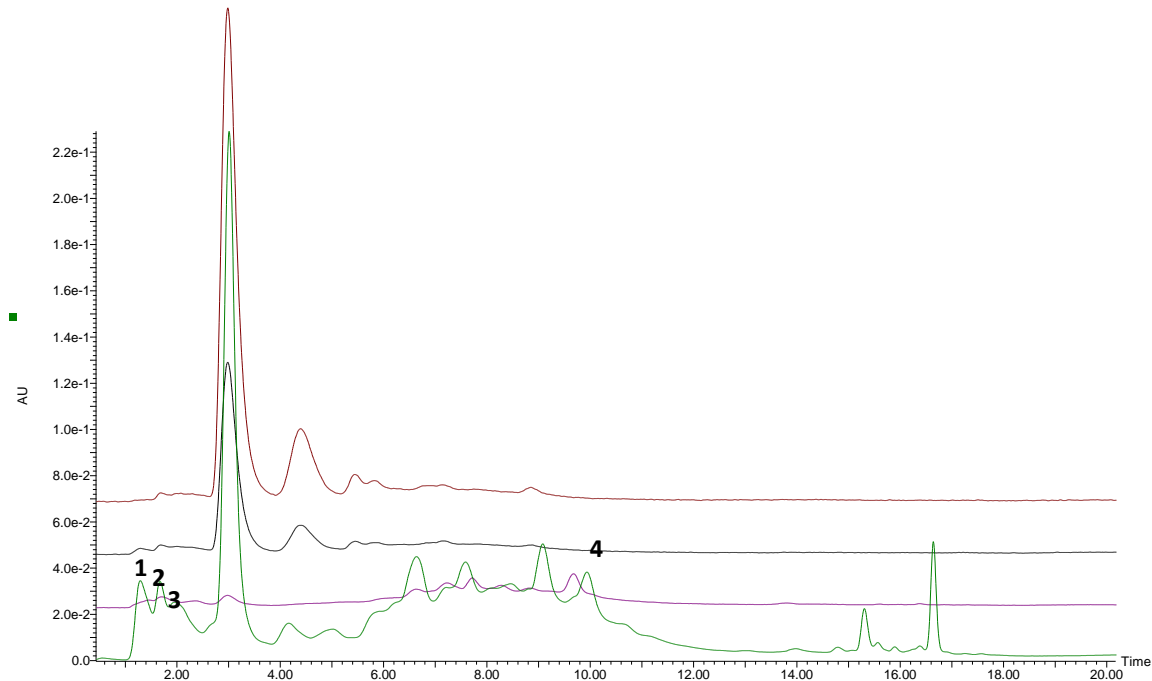
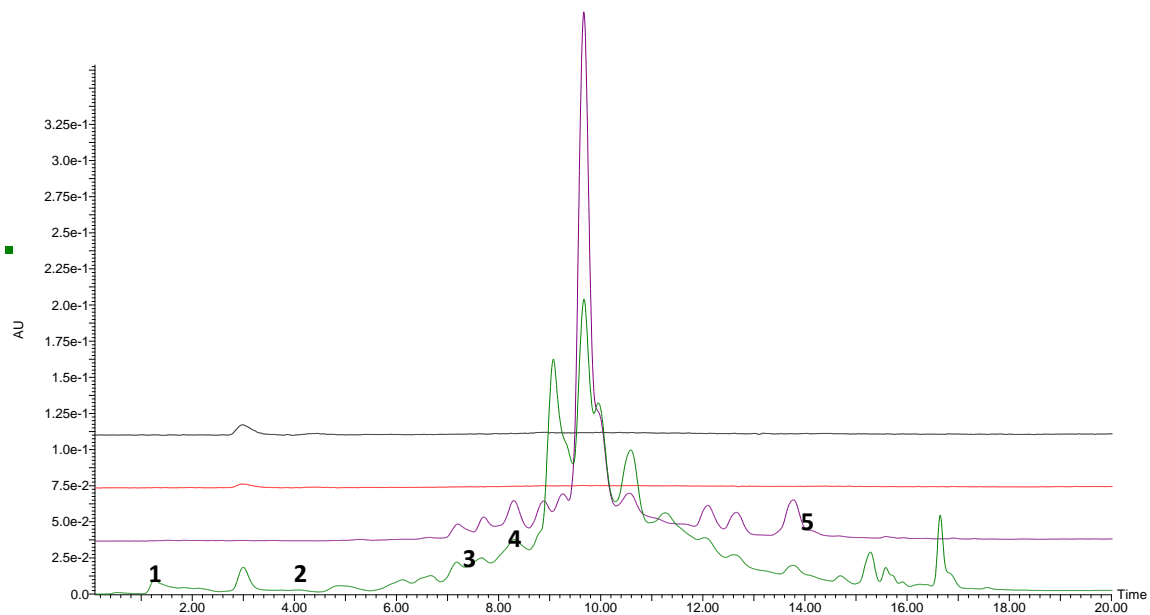


Figura 29 - Sobreposição dos perfis cromatográficos referentes à fração F2 (fração de amostra evaporada), a 280nm, 360nm, 480nm e 535nm. Legenda: 1 ácido málico, 2 ácido cítrico, 3 ácido succínico, 4 Rutina

25-Feb-2012 19:18:31 Opuntia Alcool

Opuntia_24Fev2012_47

9: Diode Array
280
Range: 2.041e-1



Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

Figura 30 - Sobreposição dos perfis cromatográficos referentes à fração F3 (fração de álcool) a 280nm e 360nm. Legenda: 1 ácido málico, 2 ácido clorogénico, 3 ácido cafeico, 4 ácido m-Cumárico, 5 Quercetina

Para este cromatograma apenas foram considerados os comprimentos de onda de 280nm e 360nm, uma vez que para os outros dois comprimentos de onda não foram encontrados picos.

25-Feb-2012 18:16:25 Opuntia Acetato de etilo

Opuntia_24Fev2012_45

9: Diode Array
280
Range: 5.747e-2

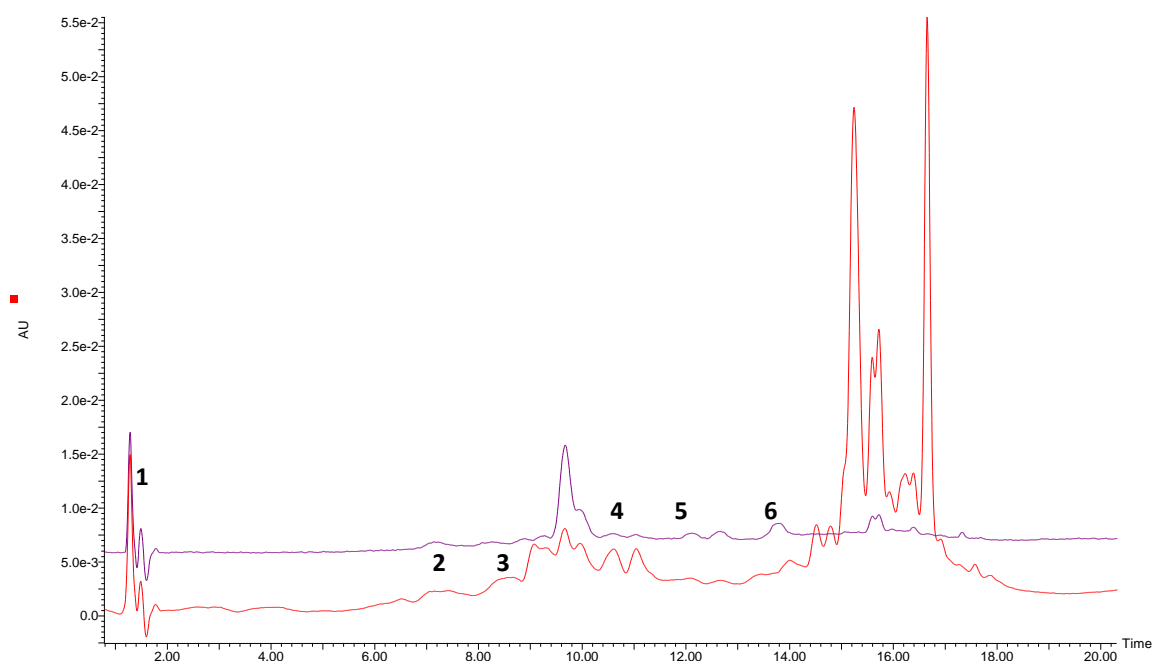


Figura 31 - Sobreposição dos perfis cromatográficos referentes à fração F4 (fração de acetato de etilo) a 280nm e 360nm. Legenda: 1 ácido cítrico, 2 ácido cafeico, 3 ácido m-cumárico, 4 Rutina, 5 canferol glucósido, 6 Quercetina,

Observando as figuras 29,30 e 31 verifica-se que os perfis das três frações são bastante diferentes, uma vez que cada composto tem uma maior afinidade para determinado solvente. A fração denominada por F2 é a que possui a maior quantidade de picos para o comprimento de onda de 280nm (compostos fenólicos), por outro lado é a fração F3 que possui um maior número de compostos a um comprimento de onda de 360nm

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

É de verificar no entanto que as três frações também possuem compostos em comum, como o caso do ácido málico, cítrico e succínico, no caso dos flavonóis não ocorre nenhum composto em simultâneo nas três frações.

A tabela com as respetivas concentrações, áreas e tempos de retenção das três frações estão contempladas no Anexo I.

Na tabela seguinte estão representados os teores de Betalainas obtidos para as três frações.

Tabela 11 - Teores de Betalainas obtidos para as três frações, F2 fração de amostra evaporada, F3 fração álcool, F4 fração acetato de etilo.

Amostras	$\lambda=600\text{nm}$	$\lambda=538\text{nm}$	$\lambda=476\text{nm}$	FD	a	y	%Betac.	%Betax.
F2	0,148	0,336	0,199	20	0,206	0,002	0,365	0,007
F3	0,128	0,141	0,122	20	0,014	-0,009	0,025	0,000
F4	0,108	0,114	0,094	20	0,007	-0,016	0,012	0,000

Observa-se através da tabela 11 que a fração F2 obtida a partir da separação na ampola de decantação e depois evaporada, possui a maior percentagem de Betacianinas e Betaxantinas.

Após as análises em HPLC-MS/S, as amostras foram analisadas por HPLC-DAD para ajudar a complementar a informação acima referida.

4.2 Comparação de sumos de *Opuntia spp.* de diferentes origens

Procedeu-se ao estudo de caracterização de amostras de sumo preparadas a partir de *Opuntia* de diferentes proveniências. A caracterização consistiu em fazer a análise do teor em fenóis totais, flavonóides e betalaínas, bem como o estudo do perfil cromatográfico por HPLC-DAD-ED. Paralelamente foi feita a determinação da actividade antioxidante do sumo e os resultados obtidos foram comparados com a composição química.

As amostras de sumos obtidas de acordo com o descrito anteriormente (secção 3.2.1), foram diluídas 1:10 com água e analisadas. Recorde-se que estas amostras foram preparadas com casca. Na figura 32 apresentam-se os cromatogramas obtidos a diferentes comprimentos de onda.

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

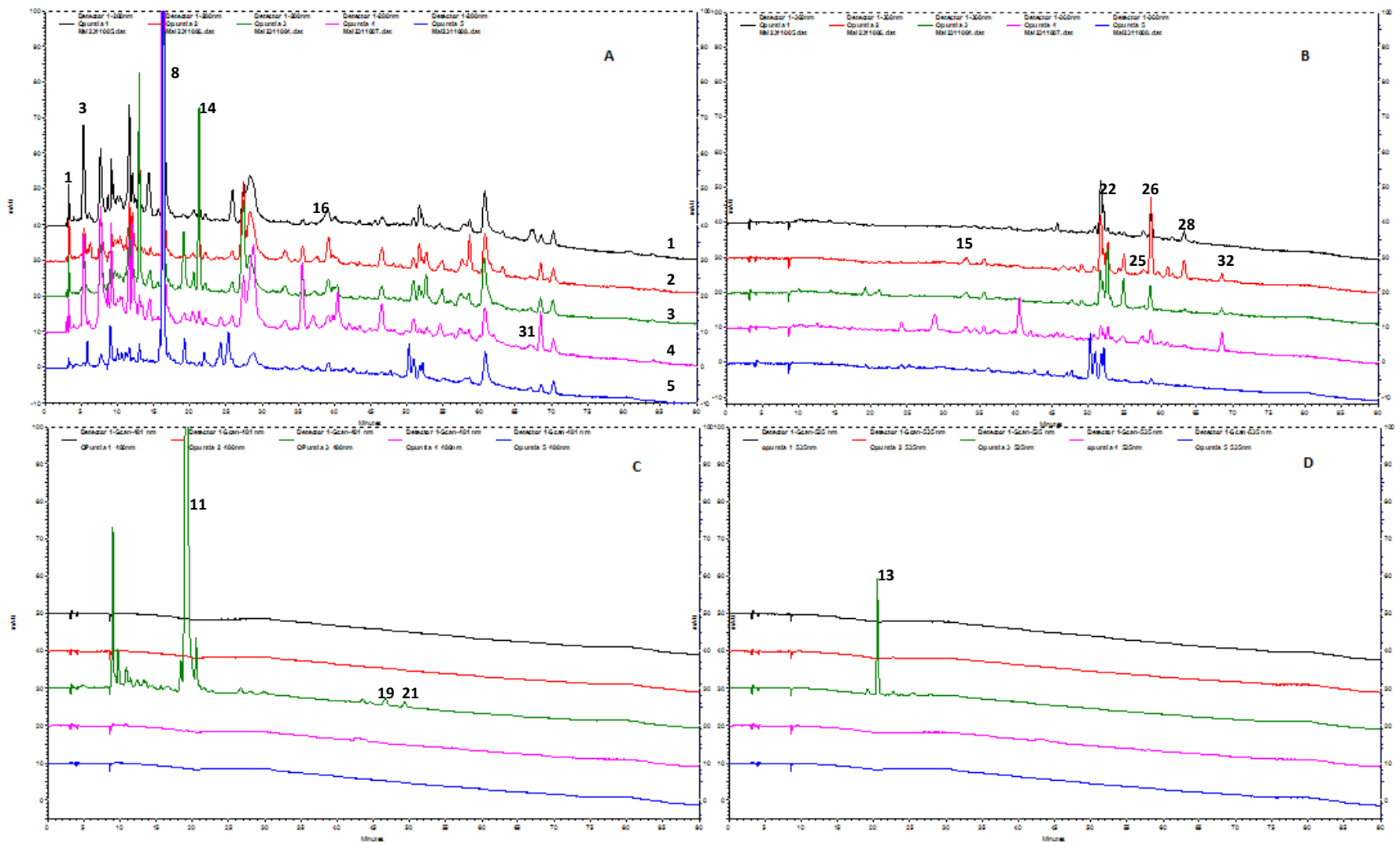


Figura 32 - Sobreposição de cromatogramas das diferentes amostras, Tramagal (1), Beja (2), Marvão (3), Sines (4) e Sesimbra (5), a 280 (A), 360 (B), 480 (C) e 535 nm (D).

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

De uma maneira geral verifica-se que ao comprimento de onda de 280nm (caraterístico dos compostos fenólicos) (Malheiro, R *et al.*, 2011) se deteta um maior número de picos no início do cromatograma. O pico 8 correspondente ao ácido piscídico (identificado por LC-MS/MS), t_r aproximado de 16 min, é o mais intenso para todas as amostras. Na figura 33 apresenta-se o espectro de absorção caratertístico deste composto e que coincide com o espectro previamente apresentado quando foram efetuados os ensaios por HPLC-MS/MS. Este ácido já foi encontrado anteriormente nos cládodos (Stintzing, F *et al.*, 2005). Por outro lado a um comprimento de onda de 360nm (caraterístico dos flavonóis) os picos mais intensos aparecem no cromatograma para tempos de retenção entre os 50 e os 70min. Alguns destes flavonóis foram identificados como isoramnetina (33) ou seus derivados (isoramnetina-3-*O*-ramnóse-lixose-glucose (25 (II)), isoramnetina 3-*O*-rutinósido (28(I)) e isoramnetina-3-*O*-lixose-glucose 26 (I) que já foram identificados em frutos *Opuntia* (Kuti, J *et al.*, 2004; Feugang, J *et al.*, 2006). Na figura 32 estão igualmente representados os comprimentos de onda a 480nm e 535nm que dizem respeito ao comprimento de onda das betalaínas, respetivamente betaxantinas (pigmento amarelo) e betacianinas (pigmento avermelhado).

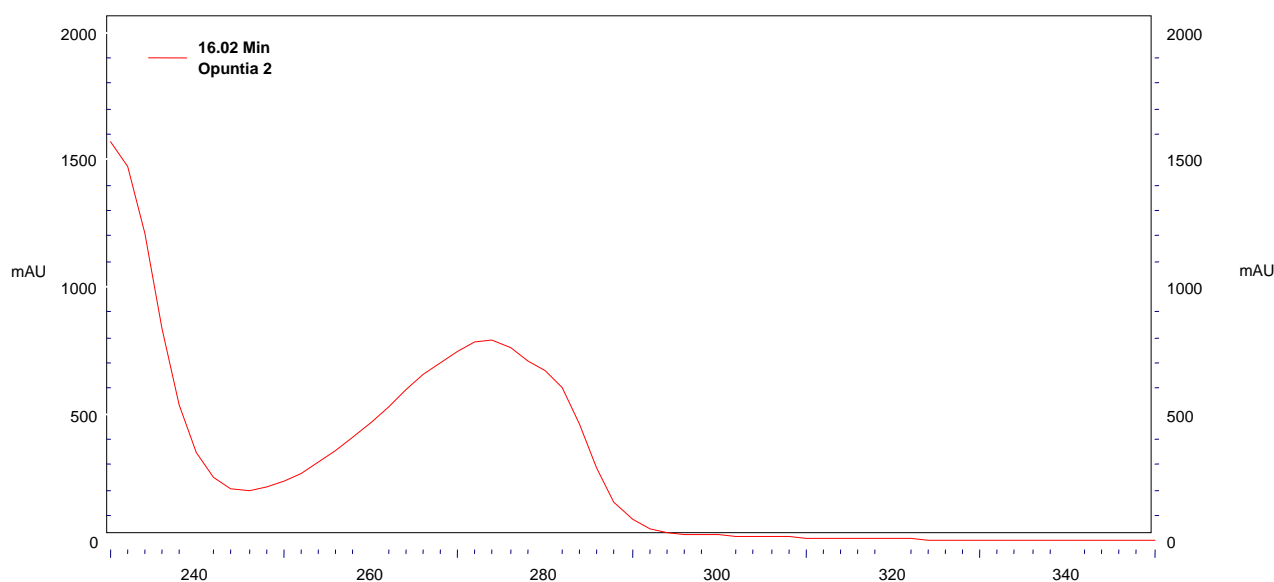


Figura 33 – Espectro de absorção do ácido piscídico detetado na amostra de Beja

Os cromatogramas mostram que estas amostras, à semelhança do que acontece com outras amostras naturais, são muito complexas por apresentarem um elevado número de picos, que pertencem certamente a famílias diferentes dado que apresentam

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

máximos de absorção no UV diferentes e além disso os teores em que os compostos estão presentes diferem muito.

Comparando as amostras entre si (figura 32), pode dizer-se que os perfis cromatográficos são semelhantes mas os teores em que os compostos aparecem são diferentes. Como era de esperar as diferenças mais acentuadas verificam-se para os perfis correspondentes à deteção das betalaínas.

4.2.1 Determinação do teor em fenóis e flavonóides totais

As áreas dos cromatogramas foram medidas para cada uma das amostras de sumo e os resultados são apresentados na tabela 12. Foi calculada a razão entre áreas a 280nm e 360nm, o que nos dá uma ideia se a amostra apresenta uma maior ou menor proporção de flavonóides relativamente a outros compostos. Os fenóis totais foram calculados a partir de uma reta de calibração do ácido gálgico (ver anexo II). E os flavonóides quantificados através de um método colorimétrico descrito em 3.3.1.2.

Tabela 12 - Valores obtidos para as áreas (280 e 360nm), razão entre áreas, concentração de fenóis totais obtidos através de reta ácido gálgico ($\mu\text{g/g}$), e flavonóides, expressos em catequina (mg CE/L). Flavonóides quantificados através de um método colorimétrico (mg CE/L)

Amostras	Áreas (280nm)	Áreas (360nm)	Área (280/360)	Fenóis totais ($\mu\text{g/g}$)	Flavonóides (mg CE/L)
Tramagal com casca	12400000	1140000	10,9	40,936	86.2
Beja com casca	10500000	1890000	5,6	33,714	220.2
Marvão com casca	11800000	1470000	8,0	38,453	158.4
Sines com casca	14500000	1730000	8,4	49,434	79.6
Sesimbra com casca	7630000	1190000	6,4	23,791	*

* - Não foi determinado nesta amostra

Os resultados obtidos mostram que a amostra de Sines é a que apresenta o teor mais elevado em fenóis totais e teores mais baixos em flavonóides. Os valores apresentados para os fenóis totais na tabela 12 situam-se entre 49,4-23,79 $\mu\text{g/g}$ e são concordantes com os apresentados na literatura (22- 226 μg ácido gálgico/g) (Stintzing, F *et al.*, 2005). Os teores de flavonóides situam-se entre os 86-220 mg CE/L e estão de acordo com o já descrito na literatura (Stintzing, F *et al.*, 2005; Chavez-Santoscoy, R *et al.*, 2009), e a amostra de Beja é a que apresenta os teores mais elevados.

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

As diferenças entre os valores obtidos neste trabalho e os já descritos na literatura podem ocorrer devido ao modo de preparação dos sumos ter sido feito com casca contrariamente a outros autores, em que os frutos foram processados sem elas (Bermúdez-Soto, M *et al.*, 2001), à origem dos frutos, e às condições climáticas de cada local.

Um dos sistemas de HPLC usado inclui um detetor eletroquímico, o qual permite detetar compostos que sejam possíveis candidatos a apresentar atividade antioxidante. Na figura 34 comparam-se os cromatogramas obtidos para as diferentes amostras analisadas.

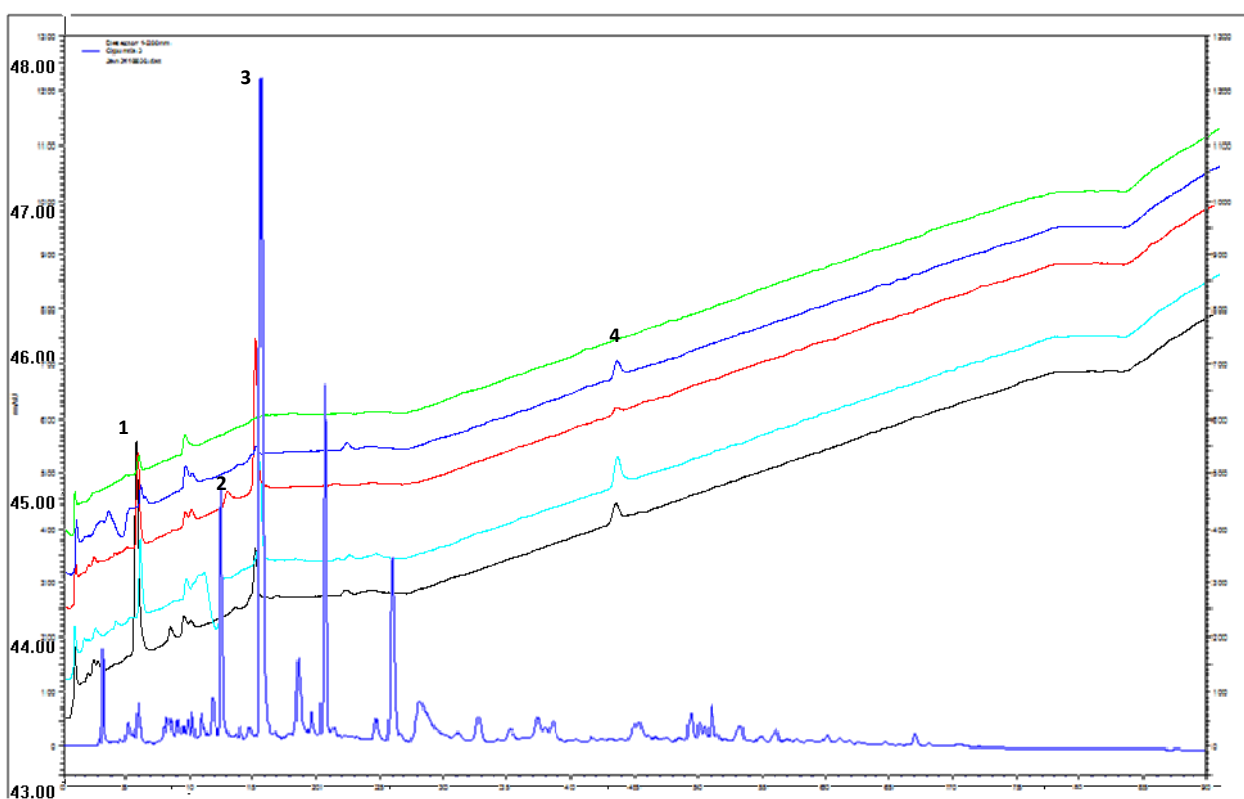


Figura 34 - Detecção de compostos obtidos por detetor eletroquímico para os cinco sumos; Tramagal, Beja, Marvão, Sines e Sesimbra em sobreposição com cromatograma da amostra do sumo de Marvão, a 280nm.

A figura 34 mostra que é a amostra de Marvão que apresenta os picos maiores. Os picos identificados com os números 1,2,3 e 4 dizem respeito a compostos que poderão ser responsáveis por parte da atividade antioxidantes. Desta forma o composto 3 diz

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

respeito ao ácido piscídico e os compostos 1,2 e 4 pensa-se que poderam ser seus derivados, no entanto ainda não foram devidamente identificados.

4.2.2. Avaliação da AA pelo método ORAC e HORAC

Para a avaliação da atividade antioxidante fizeram-se dois testes químicos e os resultados apresentam-se na tabela 13. No método ORAC é analisado o potencial de remover o oxigénio de espécies reativas, peroxilo, por outro lado o HORAC mede a eficácia da amostra para evitar a formação de radicais hidroxilo. Os valores obtidos situam-se entre os 26687-33448 $\mu\text{mol TEAC/L}$ sumo, e 12749-18284, para o ORAC E HORAC, respetivamente.

Tabela 13 – Valores referentes ao método de ORAC e HORAC

Amostras	ORAC (mM TEAC/L sumo)	HORAC (mM CAEAC/L sumo)
Tramagal	33448	13860
Beja	27755	11470
Marvão	26687	12749
Sines	33059	18284
Sesimbra	14610	6818

A amostra do Tramagal e de Sines, foram as que apresentaram os valores mais elevados, relativamente aos valores de Beja, que foram os mais baixos. Tendo em conta os valores já reportados na literatura (Chavez-Santoscoy, R *et al.*, 2009), os valores de ORAC obtidos são mais elevados, podendo este fato explicar-se pelos frutos serem processados com casca. Quanto aos valores de HORAC, é a primeira vez que estes são descritos para o *Opuntia ficus-indica* e observou-se que os valores são maiores para a amostra de Sines tal como observado para os valores de ORAC. A amostra de Sines é a que apresenta um maior teor em fenóis totais e menor em flavonóides.

4.2.3 Correlação entre a composição química e resultados de atividade biológica

Dado que a atividade antioxidante é normalmente atribuída à presença de compostos fenólicos nas amostras, foram comparados os valores obtidos para os testes de ORAC e HORAC com os teores de fenóis totais (figura 35). A figura 35 mostra que existe uma

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

correlação entre os valores de HORAC e fenóis totais determinados por HPLC ($R^2=0,977$). Contrariamente ao que foi descrito em trabalhos anteriores (Stintzing, F et al., 2005) a correlação entre fenóis totais e ORAC apresenta um valor de R^2 baixo ($R^2=0,539$).

Os resultados obtidos mostram que os compostos fenólicos presentes no *Opuntia* possuem capacidade de evitar a formação de radicais hidroxilo.

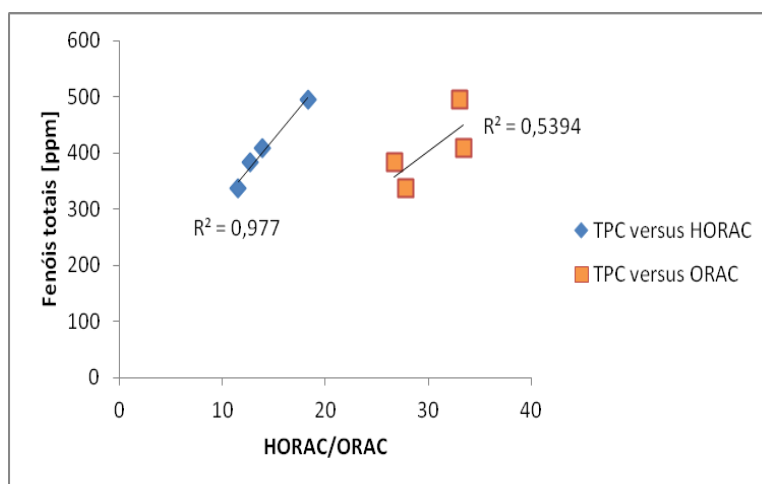
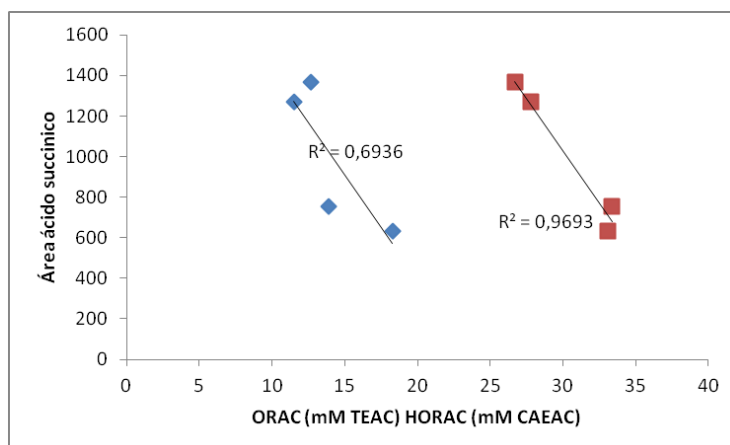


Figura 35 – Correlação entre teor em fenóis totais e atividade antioxidante determinada pelos métodos ORAC e HORAC

Tentou-se avaliar se alguns dos compostos detetados nos cromatogramas poderiam ter uma melhor correlação com os resultados obtidos para a atividade antioxidante e para tal mediram-se as áreas de picos detetados no cromatograma a 280 nm. Do conjunto de compostos detectados nos cromatogramas escolheram-se os picos que obtinham uma melhor correlação com os testes de ORAC e HORAC ($R^2 > 0,5$).



Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

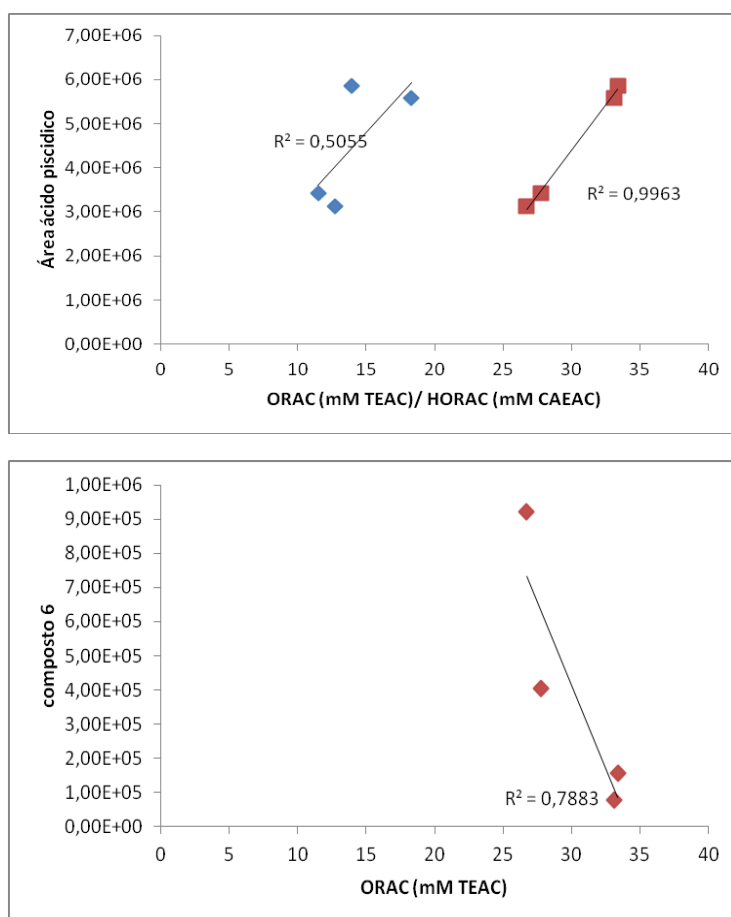


Figura 36 – Correlações Ácido succínico, piscídico e composto 6 (m/z 271 $t_r=$ 12,5min)) com ORAC e HORAC.

Relativamente aos gráficos apresentados observa-se que se obtém valores de R^2 superiores para a correlação com o teste de ORAC. O composto 6 (ainda não foi identificado) apresenta apenas correlações com ORAC, na medida em que as correlações com o outro método eram bastante baixas. Todos estes compostos parecem ter uma contribuição importante para a atividade antioxidante.

4.3 Ensaios de simulação da digestão *in vitro*

Os sumos de *Opuntia* foram sujeitos a um processo de simulação de digestão *in vitro* nas condições descritas em 3.2.2. Pretendeu-se avaliar as alterações que ocorrem na composição química das amostras após a digestão dos sumos e possíveis alterações da sua composição química e atividade antioxidante.

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

Dado que estes sumos poderão ter uma aplicação como bebidas funcionais, é de interesse saber se após o processo de digestão estes produtos mantêm ou alteram, de forma positiva ou negativa as suas propriedades.

Assim, após o processo de digestão, as amostras foram sujeitas ao mesmo conjunto de análises que tinham sido efetuadas para os sumos iniciais e os resultados são comparados na figura 37.

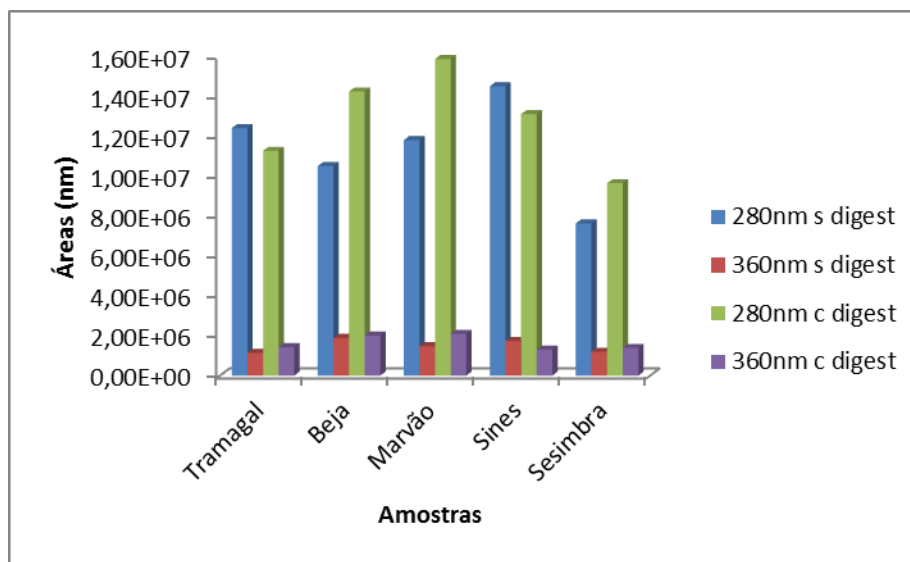


Figura 37 - Comparação de áreas totais dos cromatogramas a 280nm e 360nm dos sumos antes e após processo de digestão *in vitro*

A figura 37 mostra os valores das áreas dos picos detetados a 280nm e 360nm obtidos para os cinco sumos. O que se observa é que o processo de digestão parece afetar as amostras de maneira diferente, uma vez que por exemplo para as amostras do Tramagal e Sines as áreas do cromatograma a 280nm são maiores no processo antes da digestão e para as amostras de Beja, Marvão e Sesimbra ocorre exatamente o contrário. Observando as áreas a 360nm verifica-se que todas as amostras excepto a de Sines, possuem maiores áreas após o processo de digestão. Pode inferir-se assim que existem compostos diferentes em cada uma das amostras que são ou não afetados pelo processo. Pode dizer-se também que os flavonóis são afetados com este processo de uma maneira positiva, uma vez que ocorre o aumento das áreas dos cromatogramas. Na figura 38 e 39 comparam-se os cromatogramas referentes à amostra de Beja e Marvão antes e após o processo de digestão.

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

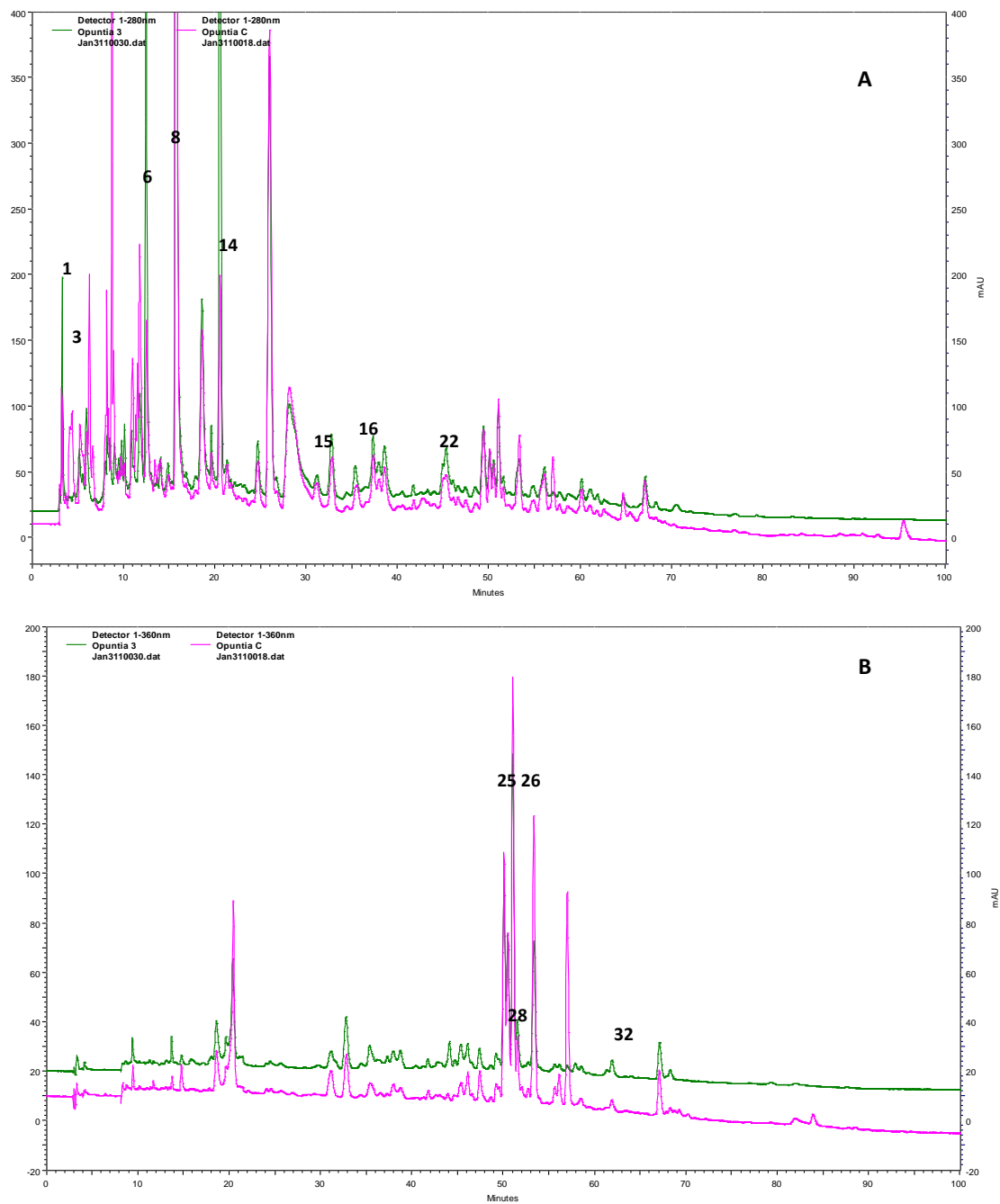


Figura 38 - Perfis cromatográficos da amostra de Marvão antes e após a digestão, a 280 (A) e 360 (B). Legenda: 1 Ácido málico, 3 Ácido cítrico, 6 n.i, 8 Ácido piscídico, 14 Ácido eucómico, 15 n.i, 16 n.i, 22 n.i, 25,26,28 derivados isoramnetina, 32n.i

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

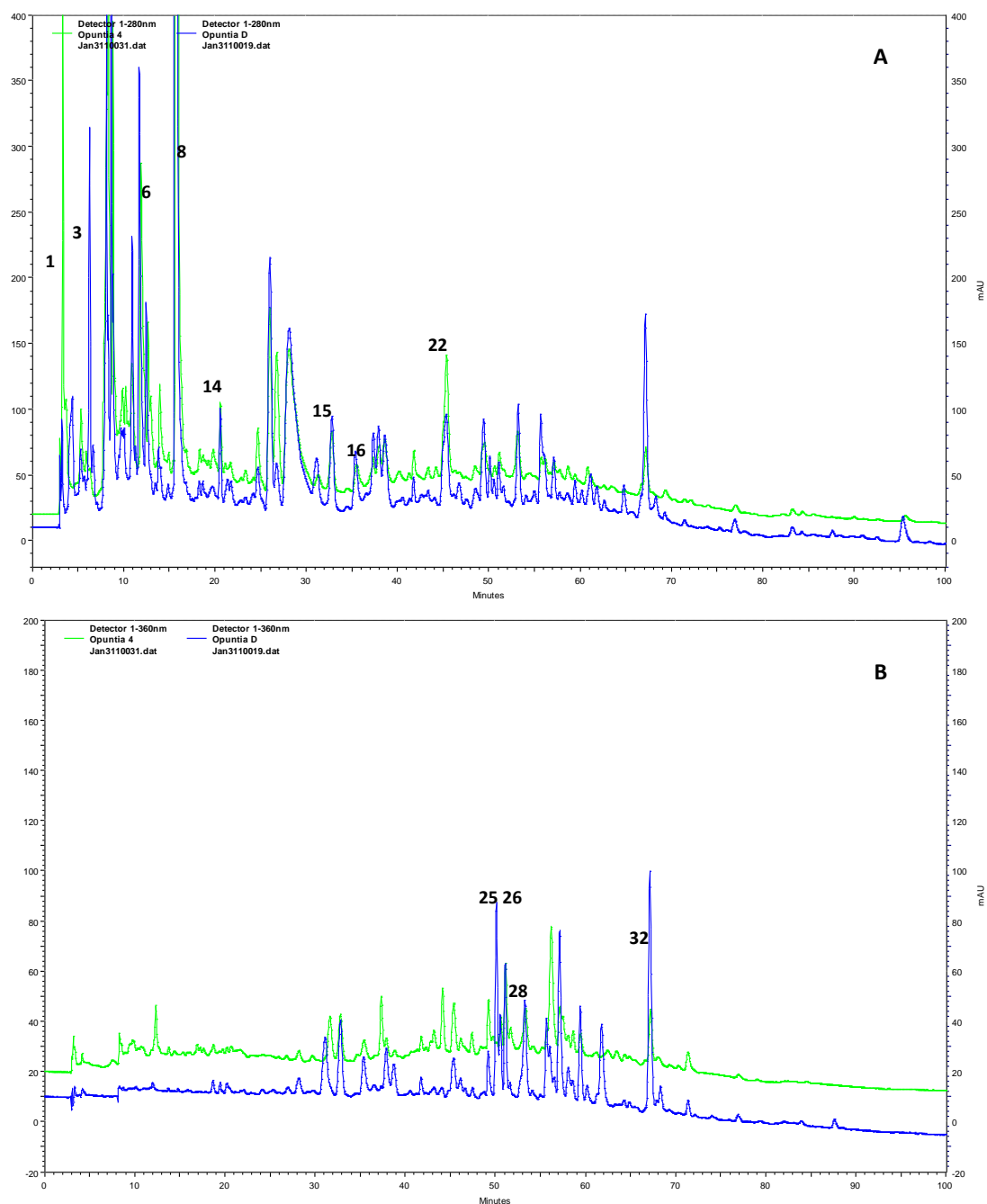


Figura 39 - Perfis cromatográficos da amostra de Sines *antes* e *após* a digestão, a 280 (A) e 360 (B). Legenda: 1 Ácido málico, 3 Ácido cítrico, 6 n.i, 8 Ácido piscídico, 14 Ácido eucómico, 15 n.i, 16 n.i, 22 n.i, 25,26,28 isoramnetina derivados, 32 n.i

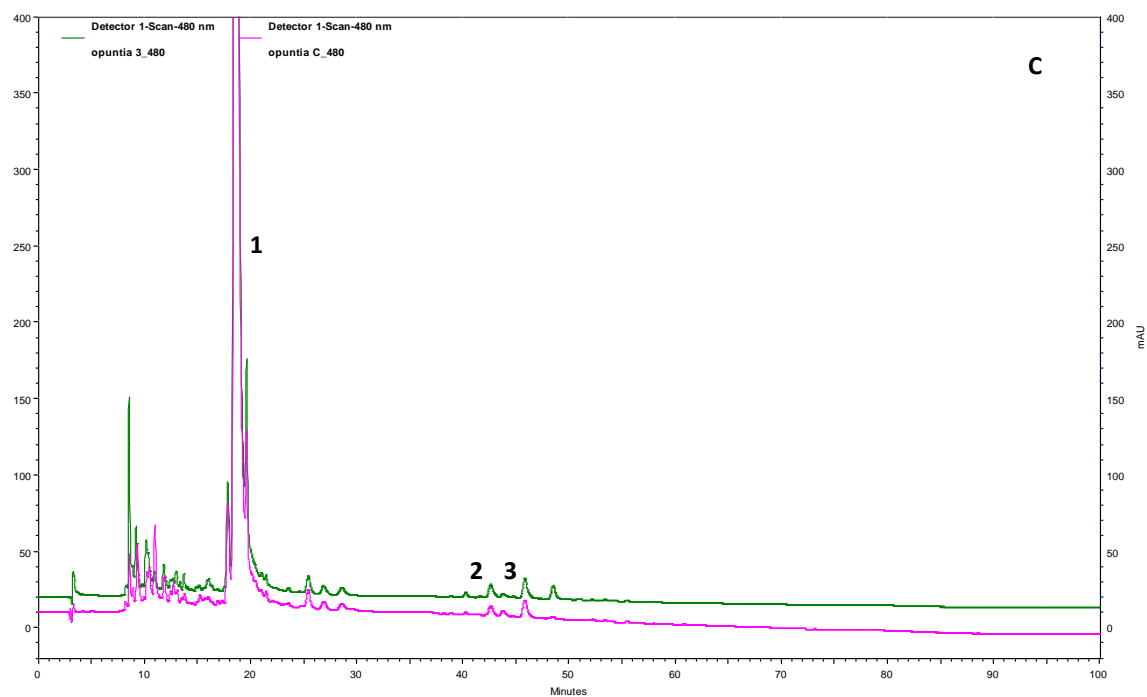
Após o processo de digestão observa-se que na amostra de marvão os picos tem tendência a aumentar, contrariamente à amostra de Sines. No entanto observa-se também que apesar de algumas diferenças nas proporções dos picos, os cromatogramas seguem um perfil muito semelhante. Por exemplo na amostra de Marvão o pico que ocorre aos 21 minutos é maior depois do processo de digestão

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

comparando com a amostra de Sines. Por outro lado em ambas as amostras se observa que o ácido piscídico possui uma área maior depois do processo de digestão.

Quanto às figuras 38 (B) e 39 (B), estas apresentam maiores diferenças nomeadamente no tamanho dos picos. Observa-se que de uma maneira geral no cromatograma a 360nm os picos são maiores para a amostra de Marvão. Observa-se ainda que existem alguns picos a decrescer como os picos aos 35 e 43 minutos, no entanto não se observa o desaparecimento total de nenhum. Pode-se inferir que o processo de digestão afeta os flavonóis de uma maneira positiva, uma vez que na sua maioria estes têm tendência a aumentar.

Relativamente às betalaínas, a digestão foi avaliada na amostra de Marvão (figura 40) que se constatou ser a mais rica nestes compostos.



Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

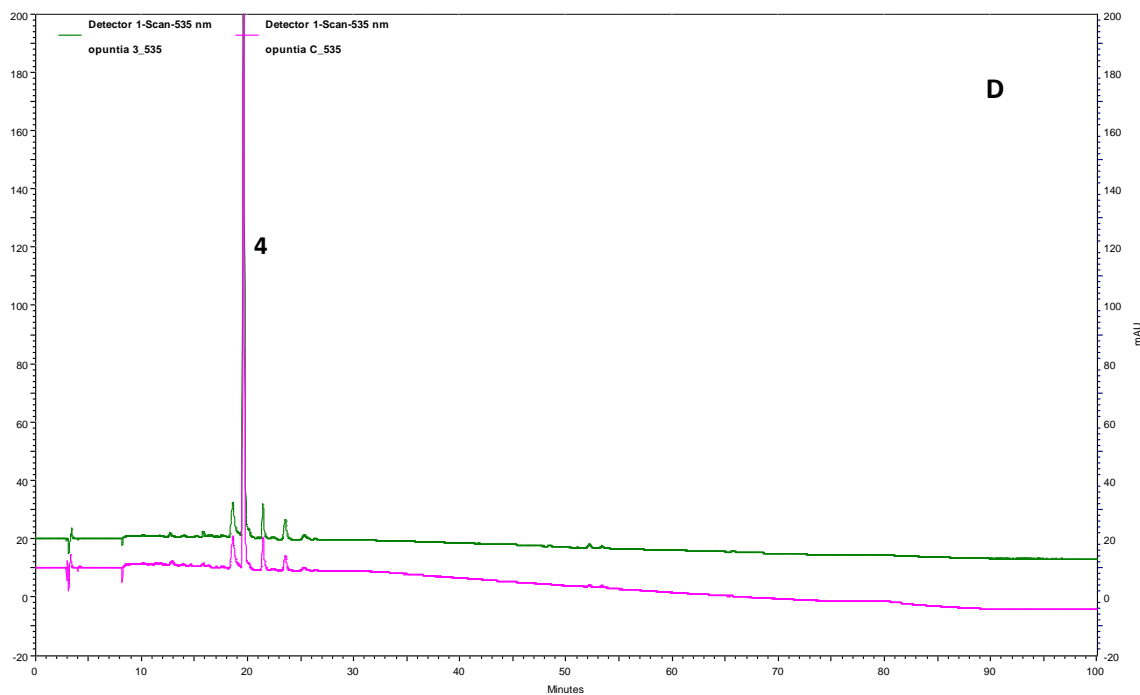


Figura 40 – Perfil cromatográfico da amostra de Marvão **antes** e **após** a digestão, a 480nm (C) e 535nm (D). Legenda: 1 Indicaxantina, 2 Betaxantina-leucina, 3 Betaxantina-fenilalanina, 4 Betanina, 5

Relativamente aos comprimentos de onda de 480nm (figura 40 (C)) e 535nm (figura 40 (D)), característicos das betalaínas, parece não ocorrer grandes variações. No entanto no cromatograma a 480nm ocorre um pequeno aumento do pico correspondente à Indicaxantina. Quanto ao comprimento de onda a 535nm parece não haver grandes alterações, apenas o pico relativo à betanina parece aumentar após o processo de digestão.

4.3.1 Determinação do teor em fenóis e flavonóides totais

Na tabela 14 apresentam-se os resultados correspondentes às áreas totais dos picos do cromatograma das amostras sujeitas ao processo de digestão, a 280nm e 360nm, a respectiva razão, fenóis e flavonós totais. O teor em fenóis foi calculado pela reta de calibração do ácido gálgico (ver anexo II, figura a) e os flavonóides através de uma reta de calibração da isoramnetina (ver anexo II, figura b). Relativamente aos resultados de fenóis totais obtidos 704.80-500.21 ppm, encontram-se diferentes dos já reportados na literatura para outras amostras (Ryan, L *et al.*, 2011), este fato poderá ser explicado devido não só a fatores como a diferença no local de cultivo e condições climáticas

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

(Feugang, J *et al.*, 2006), mas também devido ao fato dos sumos neste trabalho terem sido processados com a casca em relação a outros, só processados com a polpa. A amostra de Sines foi a que apresentou o maior teor em fenóis totais, quanto aos flavonóides é a amostra de Marvão que apresenta os teores mais elevados.

Tabela 14 – Área Total a 280nm e 360nm, respetiva razão, teor em fenóis totais expressas em ácido gálico (ppm) e flavonóides totais em amostras de sumo sujeitas ao processo de digestão *in vitro*

Amostras	Área total (280nm)	Área total (360nm)	Área 280/360nm	Fenóis totais (µg/g)	Flavonóides totais (µg/g)
Tramagal	11262266	1423736	7,9	37.14	55.05
Beja	14237360	2001452	7,1	46.96	79.48
Marvão	15868442	2090852	7,5	52.34	83.26
Sines	13100000	1305708	10,0	43.21	50.06
Sesimbra	9640000	1388000	6,9	31.79	53.54

Comparando a tabela 12 (sumos antes do processo de digestão) e tabela 14, observa-se que para as amostras de Beja, Marvão e Sesimbra ocorre um aumento de fenóis e de flavonóides após o processo de digestão. De uma maneira geral ocorre um aumento dos flavonóides para todas as amostras (excepto a de Sesimbra) após o processo de digestão.

Na tabela 15 comparam-se as razões das áreas obtidas para as amostras antes e após a digestão.

Tabela 15 – Respetivas razões obtidas para as amostras a 280nm e 360nm antes e após processo de digestão *in vitro*

Amostras	Área total sumos/ Área total sumos digeridos (280nm)	Área total sumos/ Área total sumos digeridos (360nm)
Tramagal	1.10	0.80
Beja	0.73	0.94
Marvão	0.74	0.70
Sines	1.10	1.32
Sesimbra	0.79	0.85

A tabela 15 mostra que as diferenças que ocorrem antes e após o processo de digestão são de uma forma geral muito semelhantes (0.73-1.10) para as áreas a 280nm, no caso das áreas a 360nm ocorre um ligeiro aumento na amostra de Sines em relação às restantes áreas (0.70-0.94). Já se tinha observado anteriormente no cromatograma da

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

figura 38 um grande aumento dos picos dos flavonóis na amostra após a digestão, o que justifica esta grande diferença entre os valores da tabela apresentada.

O sumo de Marvão sujeito ao processo de digestão foi analisado por HPLC-MS/MS, com vista à detecção de compostos de novos compostos.

A figura 41 mostra o cromatograma do sumo de Marvão antes e após processo de digestão nos vários comprimentos de ondas característicos analisado por HPLC-MS/MS

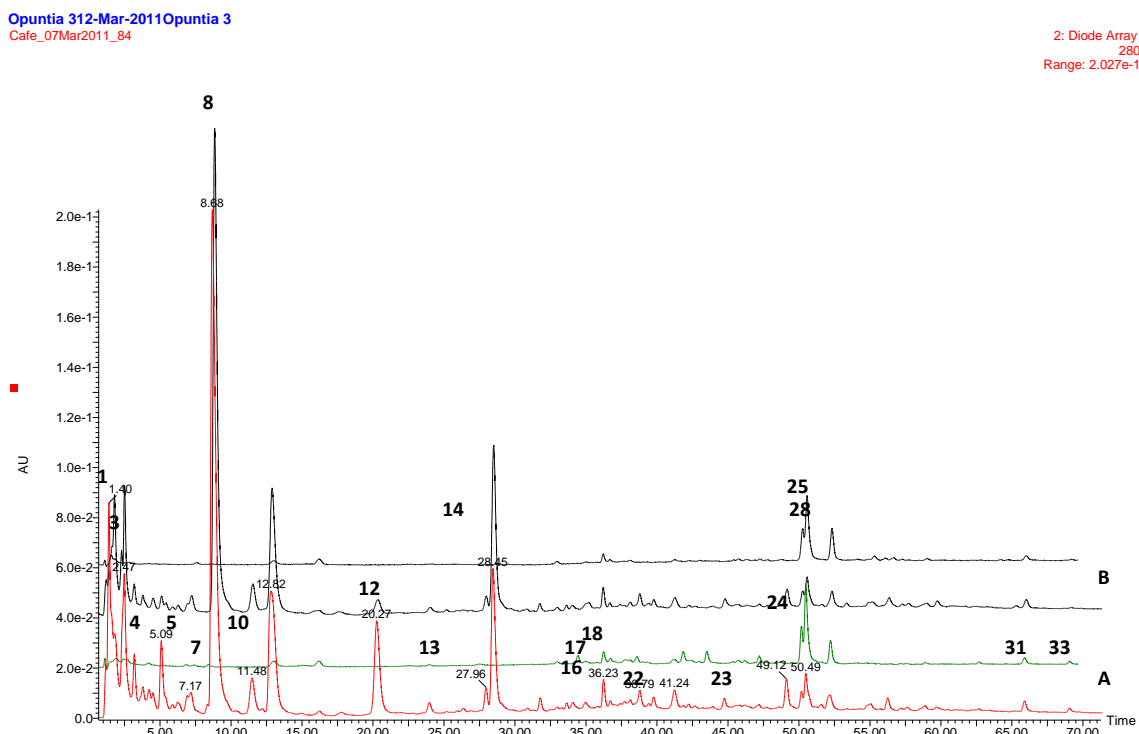


Figura 41 – Sobreposição de cromatogramas do sumo de Marvão antes do processo de digestão (A) a 280nm e 360nm e após processo de digestão (B) a 280nm e 360nm obtidos após a análise por HPLC-MS/MS

Observa-se que após o processo de digestão os picos se mantêm, não ocorrendo o desaparecimento de nenhum composto. No entanto observa-se também que compostos como o 5 (m/z 329) e o 12 (n-metileucomato) se destacam por serem maiores na amostra antes de ocorrer o processo de digestão.

4.3.2 – Avaliação da atividade antioxidante (ORAC e HORAC)

Após o processo de digestão foi determinado novamente a atividade antioxidante das amostras.

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

Tabela 16 - Atividade antioxidante (ORAC e HORAC) em amostra sujeitas a digestão

Amostras	ORAC ($\mu\text{mol TEAC/L}$ sumo)	HORAC ($\mu\text{mol CAEAC/L}$ sumo)	ORAC antes/ ORAC depois digestão	HORAC antes/HORAC depois digestão
Tramagal	25741	9199	1,3	1,5
Beja	34702	10071	0,8	1,1
Marvão	28183	9900	0,95	1,3
Sines	38102	11312	0,87	1,6
Sesimbra	20601	6640	0,7	1

Os resultados mostram que o efeito da digestão sobre a atividade antioxidante não foi igual para todas as amostras (tabela 16). A atividade antioxidante avaliada pelo método de ORAC aumenta nas amostras digeridas excepto para a amostra do Tramagal, em que decresce cerca de 23%. Observando o cromatograma desta amostra (Anexo III, figura c)) comparativamente às restantes verifica-se que as únicas diferenças existentes são o fato do pico do ácido piscídico ser maior antes da digestão (relativamente por exemplo à amostra de Beja), e o pico situado por volta dos 36min ser maior antes do processo de digestão quando comparado às restantes amostras.

Os resultados obtidos pelo método de HORAC mostram um decréscimo na atividade antioxidante avaliada por este método para todas as amostras variando entre 12-38% sendo maior para as amostras do Tramagal e Sines.

O aumento dos valores de ORAC na maioria das amostras sujeitas a processo de digestão, já foi reportada anteriormente (Cilla, A *et al.*, 2011), relativamente a outros frutos, como as laranjas. Outros autores já relataram também que após a digestão *in vitro*, a capacidade antioxidante aumenta bastante (Ryan, L *et al.*, 2010). Até à data não foram publicados dados sobre a capacidade antioxidante em amostras *Opuntia spp.* após o processo de digestão.

4.4 Concentração de extratos por adsorção (ERPs)

Numa tentativa de obter extratos mais concentrados, as amostras de sumos foram tratadas com uma resina XAD-16 Amberlite e posteriormente o extrato foi analisado. Estes ensaios tiveram como objectivo a obtenção de amostras ricas em compostos fenólicos e foi utilizada esta resina pois é apropriada para a utilização neste tipo de produtos (Scordino, M *et al.*, 2003; Serra, T., 2010).

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

Deste modo as amostras serão comparadas entre si (figura 42 e 43).

Na figura 42 e 43, estão representados todos os perfis cromatográficos de todas as amostras após passagem na resina.

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

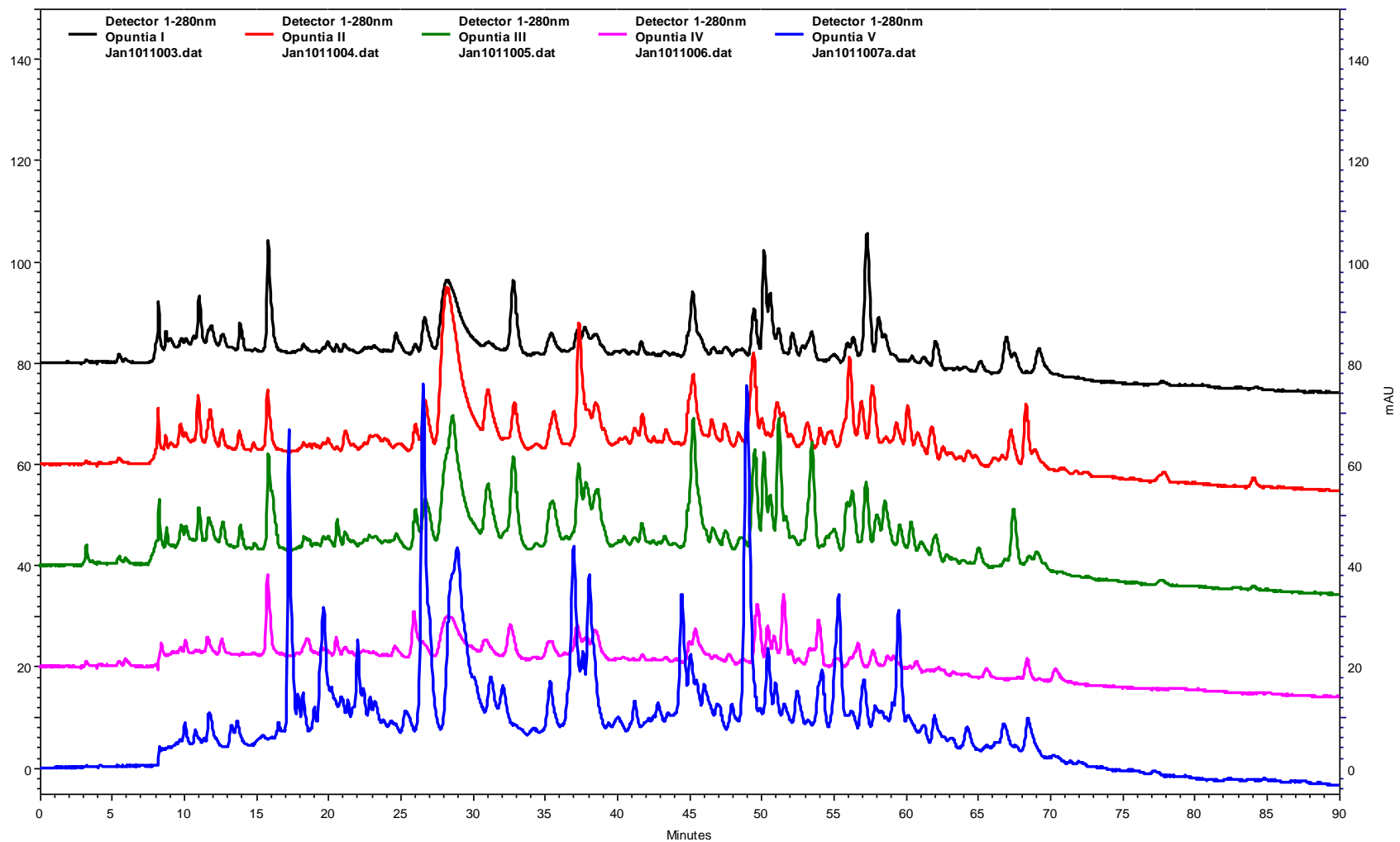


Figura 42 - Sobreposição de cromatogramas de *Opuntia* Tramagal, Beja **com** e **sem** casca, Marvão **com** e **sem** casca, sujeitas a extração com resina, a 280nm

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

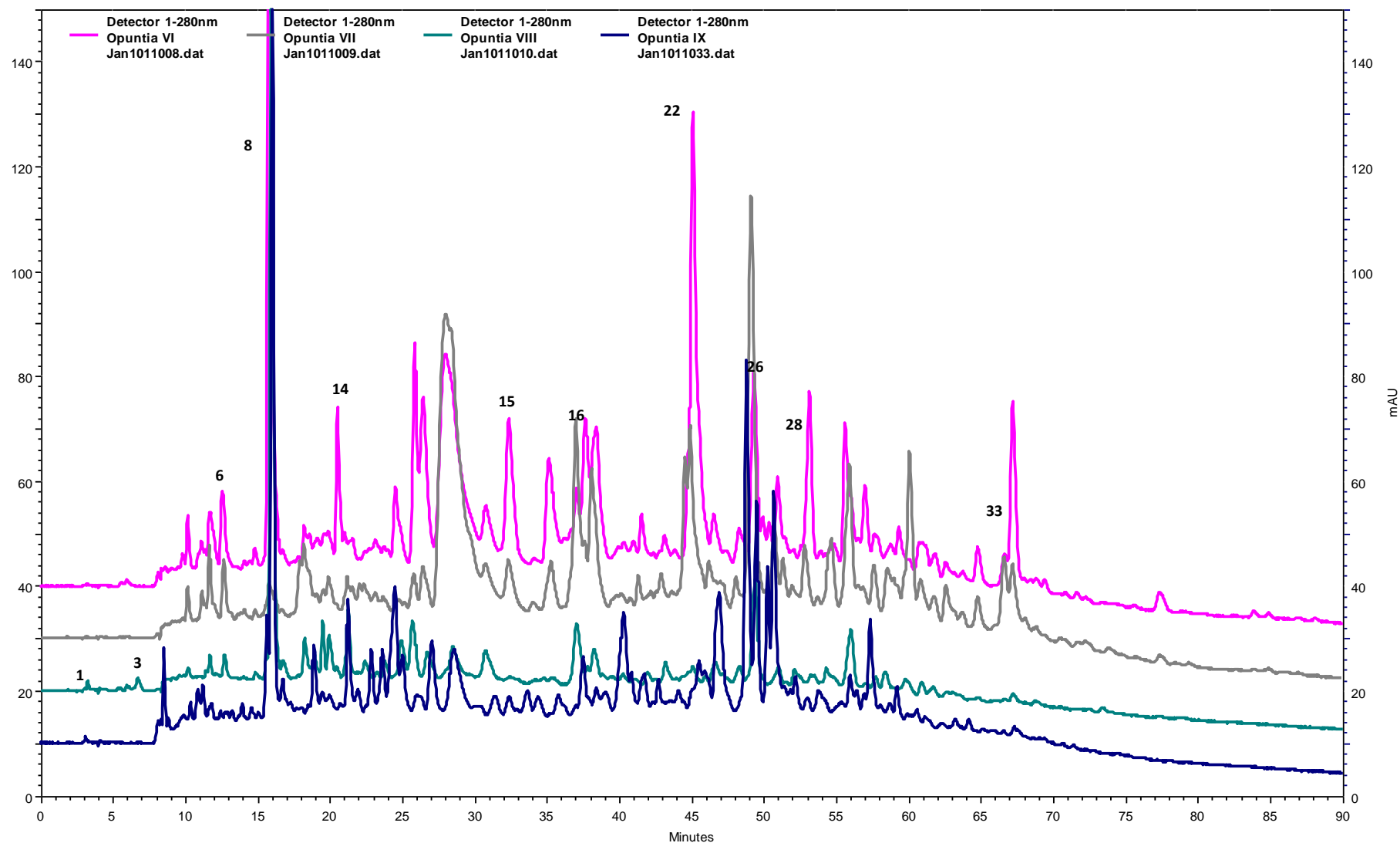


Figura 43 - Sobreposição de cromatogramas de *Opuntia Sines* com casca, *Elvas* sem casca, *Quarteira* sem casca e *Sesimbra* com casca, sujeitas a extração com resina, a 280nm. Legenda: 1 ácido málico, 3 ácido cítrico, 8 ácido piscídico, 14 ácido eucómico, 15 ácido ferúlico hexósico, 22 n.i, 26 ácido ferúlico, 28 isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo, 33 isoramnetina

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

O perfil cromatográfico das amostras é bastante semelhante entre si, no entanto a amostra de Sines é a que mais se destaca por possuir os picos maiores em relação às restantes amostras.

As figuras 42 e 43 mostram também que contrariamente aos cromatogramas dos sumos, após a passagem na resina, alguns compostos iniciais como o ácido málico e quínico podem estar a ficar retidos uma vez que saem muito pequenos no cromatograma. Os cromatogramas mostram também que o pico do ácido piscídico continua presente e que continua a ser o maior do perfil. De uma maneira geral verifica-se que todos os picos continuam presentes após a passagem na resina.

4.4.1 Determinação de teor em fenóis totais

Na tabela 17 apresentam-se os resultados correspondentes as áreas totais do cromatograma de todas as amostras a 280nm e 360nm, bem como a sua razão e teor em fenóis totais

Tabela 17 - Áreas totais dos cromatogramas a 280nm, 360nm, razão das respetivas áreas e teor em fenóis totais, expressos em ácido gálgico (ppm)

Amostras	Área total (280nm)	Área total (360nm)	Área total (280nm/360nm)	Fenóis totais (µg/g)
Tramagal com casca	7430000	4380000	1,70	23,14
Beja sem casca	10400000	2680000	3,88	33,33
Beja com casca	11200000	5220000	2,15	36,31
Marvão com casca	4850000	2580000	1,88	15,00
Marvão sem casca	16400000	2590000	6,34	58,36
Sines com casca	22000000	4700000	4,68	95,12
Elvas sem casca	17000000	1840000	9,24	61,32
Quarteira sem casca	8110000	947000	8,57	25,40
Sesimbra com casca	14100000	6250000	2,25	47,81

Em face dos resultados obtidos na tabela 17 e comparando com os obtidos anteriormente para os sumos na tabela 12, observa-se que após a passagem na resina ocorre um aumento das áreas dos compostos a 360nm, o que mostra que esta resina possui uma grande seletividade para compostos como os flavonóis. Após o tratamento com a resina, foi determinada a actividade antioxidante (ORAC e HORAC).

4.4.2 Avaliação da capacidade atividade antioxidante pelos métodos químicos (ORAC e HORAC)

Para o estudo da atividade antioxidante nas amostras concentradas em resina, foram também utilizados testes químicos como o ORAC, e HORAC, que se apresentam na tabela 18.

Tabela 18 – Valores referentes a atividade antioxidante para o método de ORAC e HORAC

Amostras	ORAC ($\mu\text{mol TEAC/g}$)	HORAC ($\mu\text{mol CAEAC/g}$)
Tramagal com casca	1049,88	251,5
Beja com casca	1058,02	352,9
Beja sem casca	1057,09	858,7
Marvão com casca	618,89	245,1
Marvão sem casca	1868,71	868,6
Sines com casca	1885,36	872,5
Elvas sem casca	1954,67	500,5
Quarteira sem casca	1148,02	571,2
Sesimbra com casca	2013,67	563,1

Analisando os resultados, é a amostra de Sines que apresenta, tal como anteriormente nos fenóis, valores mais elevados de HORAC. No entanto para o ORAC as coisas são um pouco diferentes, uma vez que é a amostra de Sesimbra que apresenta os valores mais elevados. Resultado surpreendente, uma vez que esta amostra foi sempre a que possuiu resultados mais baixos. Tal resultado poderá ser explicado devido ao fato de no cromatograma referente à amostra de Sesimbra a 280nm, esta apresentar por volta dos 40min e dos 47min picos maiores em relação às restantes amostras.

4.4.3. Determinação da atividade antioxidante intracelular

A avaliação da atividade antioxidante intracelular foi efetuada com células Caco-2 realizando três ensaios diferentes: i) inibição da formação de ROS em células, em dois tipos de ROS (radicais hidroxilo e radicais peroxilo), em pré (incubação com ERPs antes da indução de stress) e co-incubação (incubação com ERP e indutores de stress), nomeadamente AAPH e H_2O_2 (Serra et al,2011)); ii) contribuição para a homeostase da glutatona; iii) proteção na oxidação de proteínas, calculando o teor de grupos

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

carbonilo nas proteínas. O extrato escolhido para os ensaios foi o de Beja com casca e foi avaliada a sua capacidade de inibir a formação de ROS em duas condições distintas. Na figura 44 observa-se a atividade antioxidante intracelular, bem como o efeito do ERPs nos radicais peróxido e hidroxilo, em duas condições distintas.

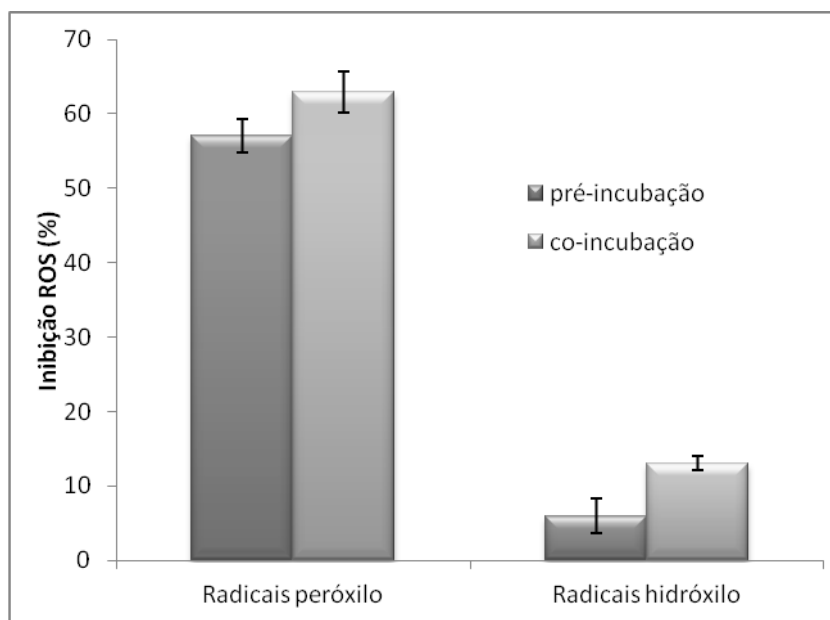


Figura 44 – Efeito nos radicais peróxido e hidroxilo após ensaios de pré e co-incubação

Quanto à produção de radicais peróxido, estes apresentam valores similares em relação ao pré e co-incubação, estando de acordo com os valores de ORAC. Esta semelhança pode ser explicada devido ao fato de os compostos fenólicos com maior permeabilidade em células Caco-2 podem ser agentes responsáveis pela resposta antioxidante celular. Após indução da produção de radicais hidroxila, o ERPs foi mais eficiente para o ensaio da co-incubação, que poderá ser explicado pelo fato dos compostos não estarem a ser captados pelas células Caco-2, no entanto poderão agir contra as lesões extracelular dos radicais livres (Serra, T *et al.*, 2011). Estes ensaios estão de acordo com os resultados obtidos para ORAC e HORAC, uma vez que os valores de peróxido são também mais elevados que os apresentados para o hidroxilo.

O estudo do papel da Glutathione é igualmente importante na medida em que esta pode ser fundamental na regeneração de antioxidantes e outros compostos. A Glutathione (GSH) é facilmente oxidada a dissulfeto (GSSG), esta relação é importante na caracterização do stress oxidativo das células (Kand'ar *et al.*, 2007). A figura 45

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

apresenta os resultados da capacidade do ERPs de Beja prevenir H_2O_2 induzido pela oxidação da glutathiona em células Caco-2.

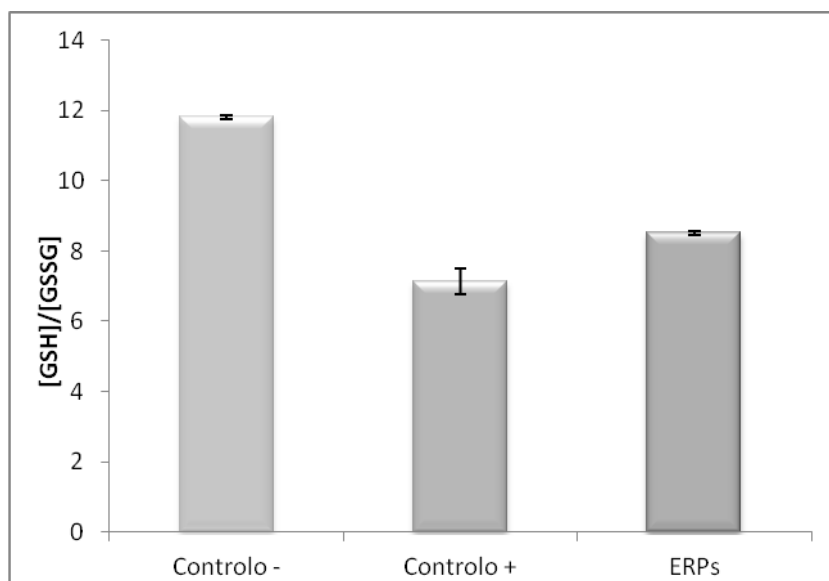


Figura 45 – Efeito extrato de Beja na relação GSH e GSSG

A diminuição da relação $[GSH] / [GSSG]$, é umas das consequências causadas pelo stress oxidativo gerado por H_2O_2 nas células caco-2, e que se encontra de acordo com os resultados obtidos, onde se nota esta diminuição após a exposição a este indutor de stress, no controlo -. Relativamente aos resultados obtidos verifica-se que o ERP de Beja possui capacidades na prevenção contra a oxidação da Glutathiona. No entanto ainda não existem até à data dados na literatura sobre este ensaio em *Opuntia spp.*

Para além da oxidação de proteínas, também a oxidação de proteínas é um marcador importante no stress oxidativo, podendo ser medido através da formação de proteínas carbonilo (Ramful, D *et al.*, 2010), assim foi avaliada a capacidade do ERPs na formação de ROS, induzido pela oxidação de proteínas, utilizando células Caco-2 (figura 46).

O controlo positivo é constituído por células incubadas com o indutor de stress, e o controlo negativo pelas células sem contacto com o indutor de stress.

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

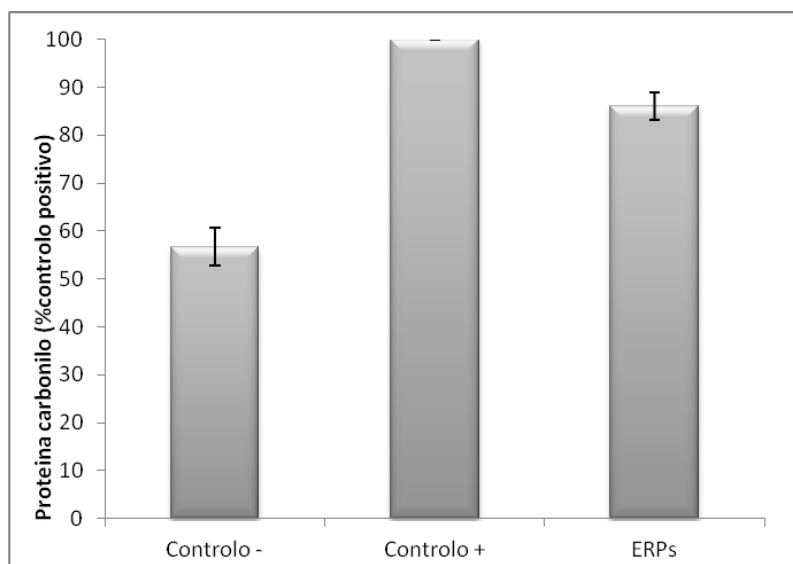


Figura 46 – Papel do extrato na oxidação de proteínas, medida pela formação da proteína carbonilo

Os resultados obtidos mostram um aumento do ERPs em relação ao controlo negativo, que está de acordo com os resultados obtidos anteriormente, na medida em que o peróxido aumenta a oxidação das proteínas nas células. Observa-se que o controlo positivo foi maior em relação ao ERPs, este fato pode ter ocorrido devido à capacidade de inibir os ROS.

4.5 Comparação da composição química de extratos de resíduos preparados de diferentes modos

4.5.1 Extração sólido-líquido

Esta fase do trabalho teve como finalidade avaliar qual o tipo de extratante que permitia a obtenção de extratos de resíduos com teor mais elevado em compostos fenólicos que apresentassem bioatividade. Os resultados obtidos quando se utilizaram diferentes soluções extratantes: água, água+etanol (50:50), etanol com água e 0.9uL de enzima de extração (peptinase) e água e 2,625mg de ácido ascórbico foram comparados e na figura 47 apresentam-se os respetivos cromatogramas a um c.d.o de 280nm.

A enzima peptinase foi utilizada com a finalidade de promover a eficiência na extração de fenóis, por outro lado o ácido ascórbico é um antioxidante que foi utilizado em excesso para evitar a degradação dos polifenóis durante o processo de estabilização.

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

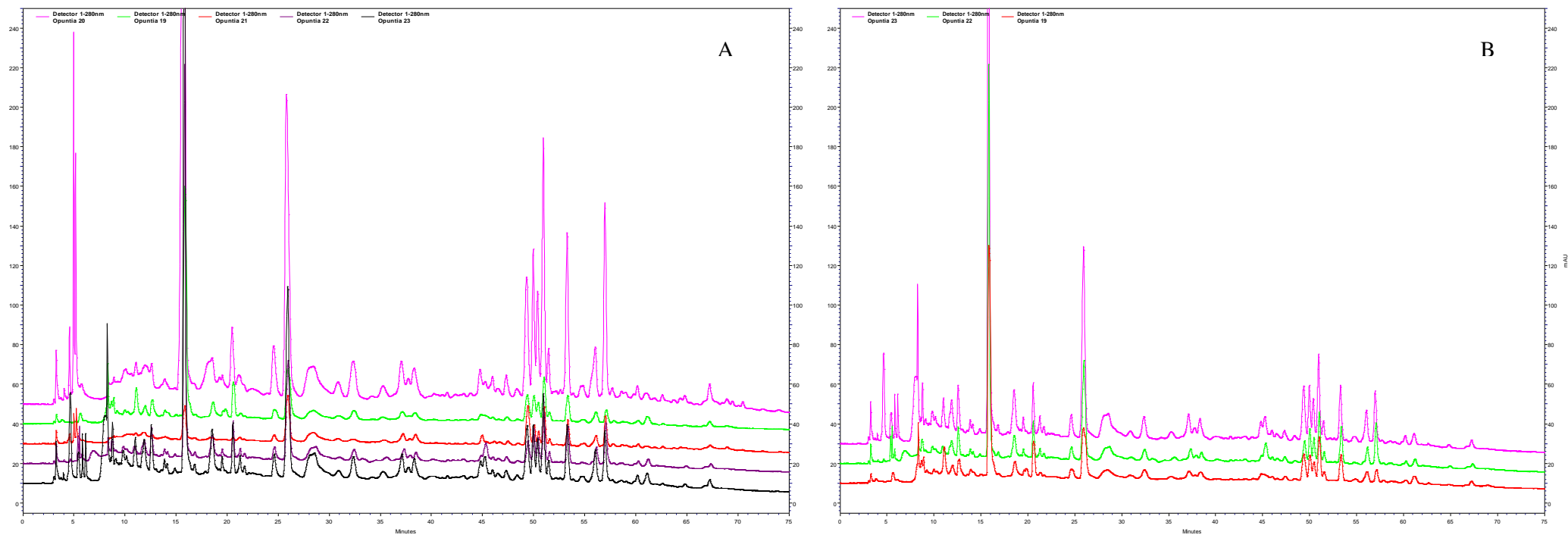


Figura 47 - Sobreposição dos cromatogramas referentes aos vários extratantes, água, água: etanol, etanol, água: enzima e água: ác ascórbico (A); sobreposição de cromatogramas referentes às soluções compostas por água, água: enzima, água: ác ascórbico (B)

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

Após a análise, distinguem-se 2 compostos nos cromatogramas, que são detetados em teores mais elevados no extrato água: etanol, no entanto também já apareciam na amostra extraída só com etanol, embora o teor fosse inferior. Um deles, o maior, que se deteta cerca dos 16 minutos é o ácido piscídico. Outro pico detetado desta vez no extrato água: ácido ascórbico é o pico do ácido ascórbico por volta dos 5min. Na figura 52 (B) o cromatograma do ácido ascórbico é o que possui os maiores picos, no entanto os perfis são bastante semelhantes entre si. Quanto à figura 47 (A) os perfis água:etanol e água:ácido ascórbico são os mais semelhantes.

Os cromatogramas apresentados na figura 47 permitem concluir que a solução constituída por etanol: água (50:50) é a que permite extrair uma maior quantidade de compostos fenólicos.

Após a análise dos cromatogramas, foram também analisados os extratos quanto aos seus teores em fenóis totais.

Na tabela 19 apresentam-se os valores obtidos para as áreas totais do cromatograma a 280nm e 360nm, a respectiva razão das áreas e o teor em fenóis totais.

Tabela 19 - Valores obtidos para as áreas a 280nm e 360nm, razão entre as áreas e respectivas concentrações de fenóis totais expresso em ácido gálgico (ppm)

Amostras	Área total (280nm)	Área total (360nm)	Área Total (280nm/ Área Total 360nm)	Fenóis Totais (µg/g)
Água	8940000	3140000	2,85	28,20
Água+etanol	33300000	17200000	1,94	147,90
Etanol	5500000	4550000	1,21	16,98
Enzima de extração	10200000	4270000	2,39	32,64
Ácido ascórbico	19000000	64400000	2,95	72,41

Os resultados apresentados na tabela 19 mostram que é a amostra extraída com a solução água: etanol, que possui a maior área no cromatograma a 280 e 360nm e, conseqüentemente, o maior teor em fenóis totais.

A extração com água favorece a obtenção de extratos mais ricos em compostos com absorção a 280nm enquanto que a introdução de etanol favorece a extração de compostos com absorção a 360nm. Estes resultados eram espectáveis.

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

Por sua vez os resultados obtidos com o ácido ascórbico não são muito diferentes em termos de razão de áreas mas são muito diferentes em termos absolutos.

Observa-se também pela tabela que são os extratos em água e água:ác ascórbico que possuem o maior valor entre as razões das áreas. Estas duas amostras possuem maiores valores para as áreas a 360nm em relação à de 280nm o que não acontece nas outras amostras, podendo estas ter possivelmente um papel benéfico na extração de flavonóis.

As soluções extratantes foram analisadas por HPLC-ED, para avaliar quais os compostos que possivelmente contribuiriam para a atividade antioxidante (figura 48).

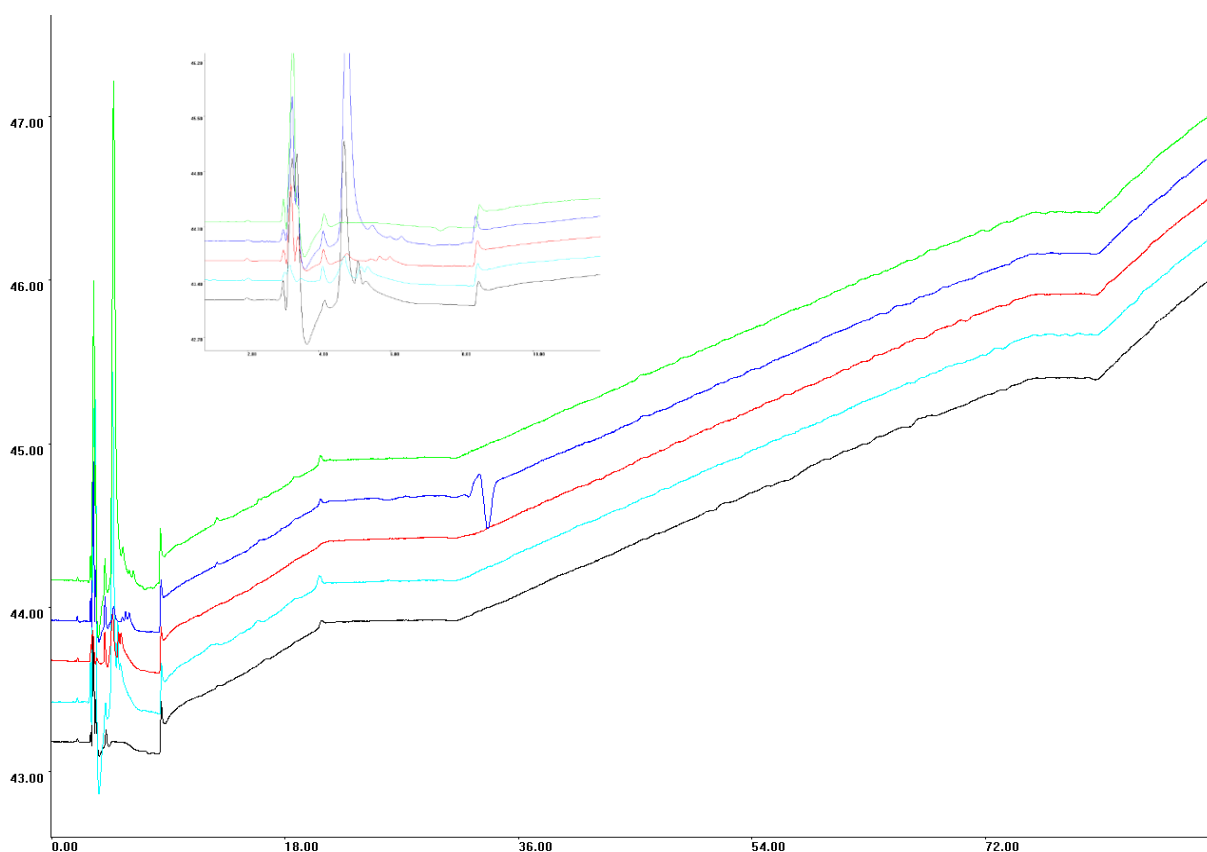


Figura 48 - Detecção de compostos obtidos por detector eletroquímico das amostras de água, água:etanol, etanol, água:enzima e água: ácido ascórbico

O cromatograma obtido após análise no detetor eletroquimico, mostra um aglomerado de picos no inicio do cromatograma, sendo que o pico apresentado por volta dos 5 minutos (com a cor verde), é o ácido ascórbico. A variação observada no

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

cromatograma, por volta dos 30 minutos durante a análise da amostra amostra água: extrato de enzima, deve-se a variações de pressão durante a análise.

4.5.2 Extração com líquido pressurizado (ELP)

Na extração com líquido pressurizado o dióxido de carbono é utilizado combinado com a água e/ou etanol em altas pressões (formando um líquido-gás expandido). Nesta última parte do trabalho foi escolhido o resíduo de Beja para o ensaio e foram obtidos dez extratos que foram sujeitos a ELP. Foram avaliadas consequentemente algumas atividades (fenóis, ORAC e HORAC).

4.5.2.1 Determinação do teor em fenóis totais

Na figura 49, está representado o teor em fenóis totais determinado pelo método de Folin, presentes nos vários extratos após ELP. Observa-se que é a fração cinco que apresenta o maior teor em fenóis totais e a fração quatro o teor mais baixo.

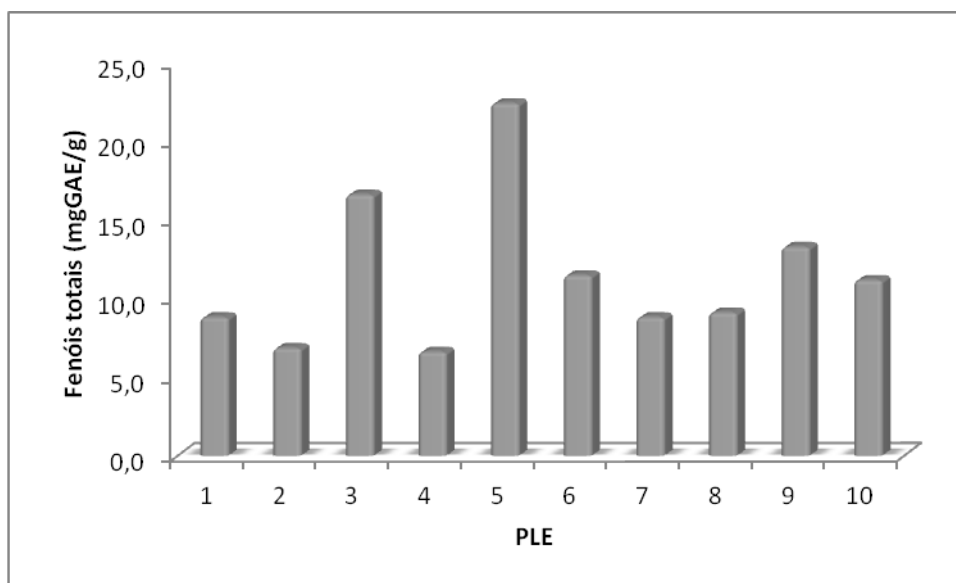
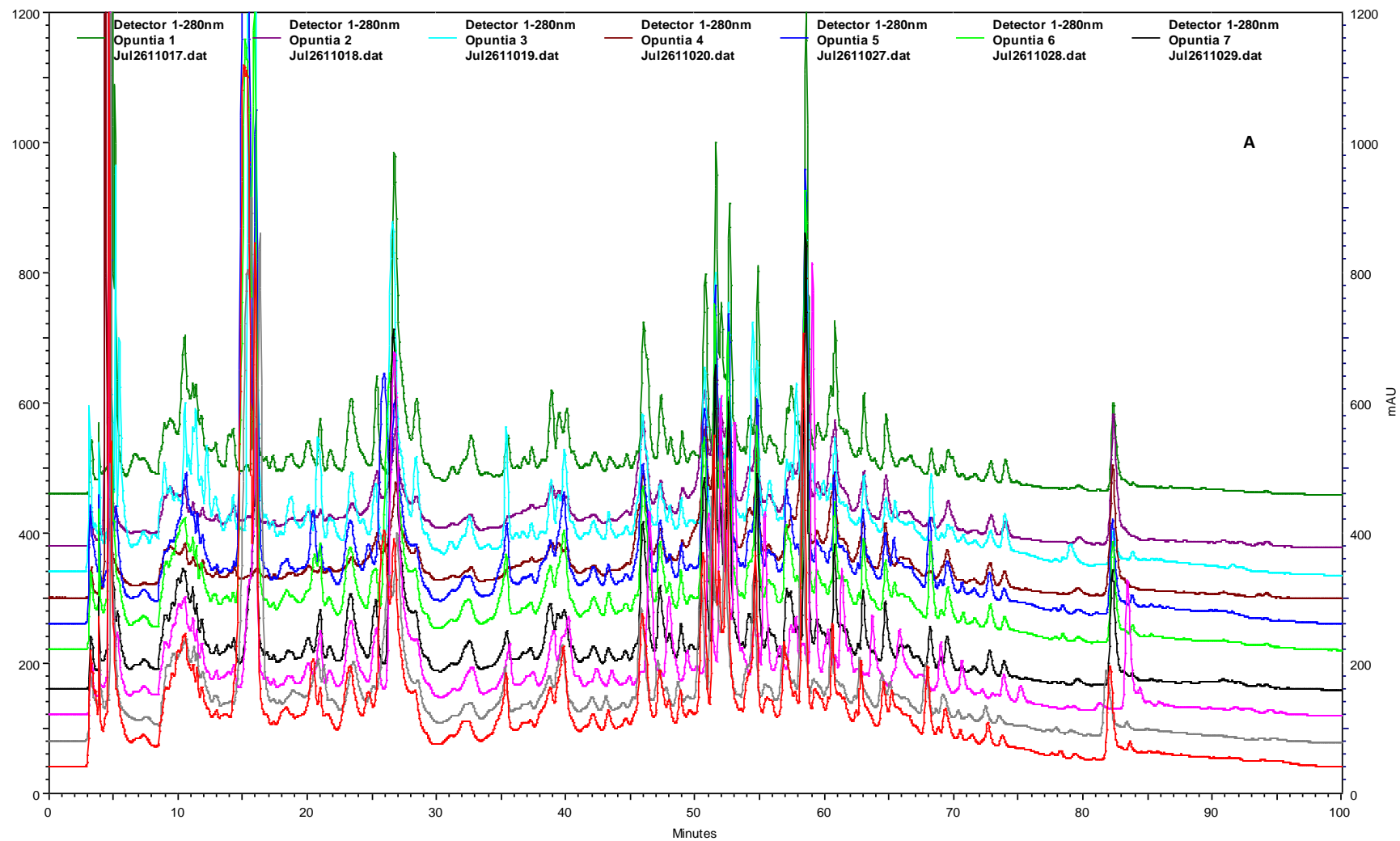


Figura 49 - Fenóis totais obtidos para o resíduo de Beja, por ELP

Comparando os vários perfis verificam-se algumas diferenças entre eles, por outro lado também existem perfis muito semelhantes entre as dez amostras. Como se observa na figura 50. Os cromatogramas 2 e 4 são bastante semelhantes (figura 51), apresentam uma menor quantidade de picos e são também estas frações que apresentam o menor teor em fenóis totais.

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*



Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

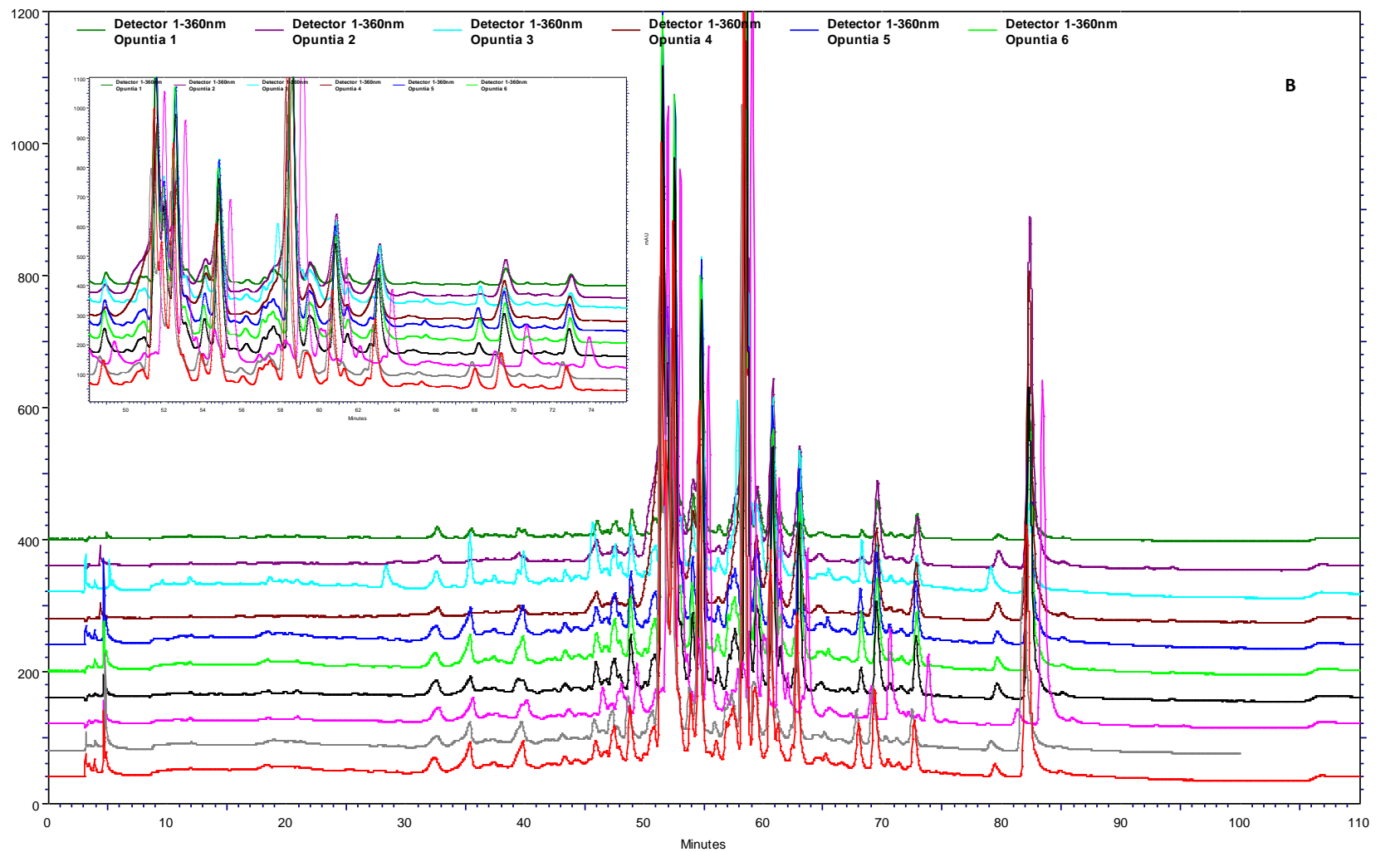


Figura 50- Sobreposição de cromatogramas das várias frações (1,2,3,4,5,6,7,8,9 e 10) a 280nm (A) e 360nm (B).Legenda: 1- 100% EtOH, 2- 40% EtOH e 60% CO₂, 3- 40% EtOH e 60% H₂O₂, 4- 70% EtOH e 30% CO₂, 5- 40% EtOH, 30% CO₂ e 30% H₂O₂, 6- 70% EtOH e 30% H₂O₂, 7- 80% EtOH, 10% CO₂, 10% H₂O₂, 8- 50% EtOH, 40% CO₂ e 10% H₂O₂, 9- 50% EtOH, 10% CO₂, 40% H₂O₂, 10- 60% EtOH, 20% CO₂, 20% H₂O₂.

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

Nas figuras seguintes estão representados os cromatogramas dos perfis semelhantes dois a dois, de modo a compreender as semelhanças dos resultados obtidos.

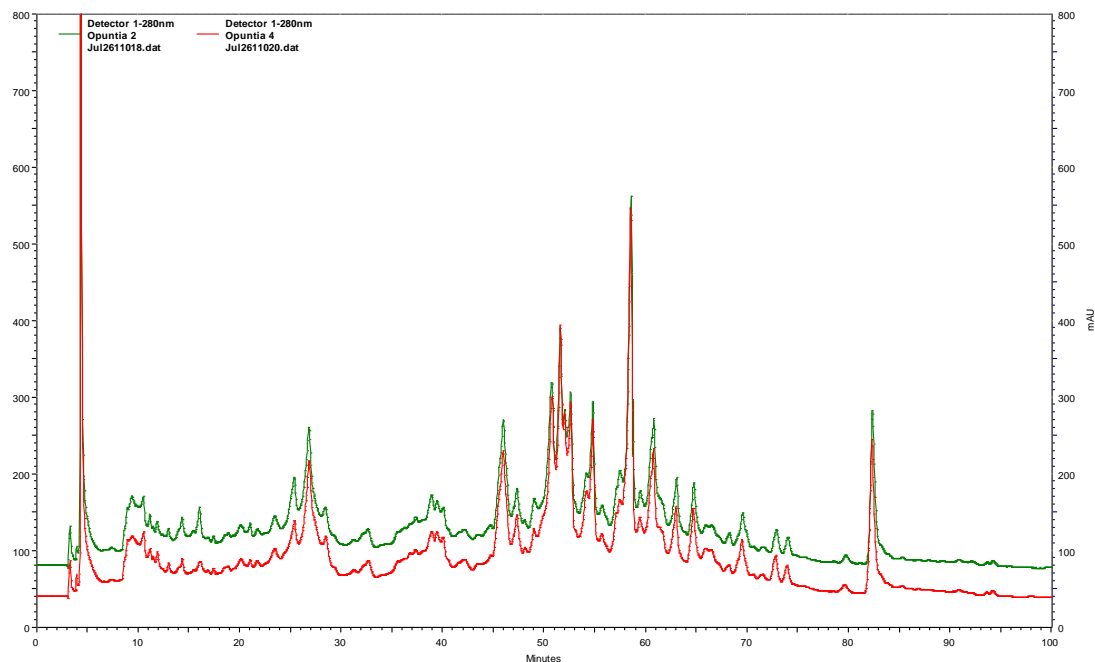


Figura 51 - Sobreposição dos cromatogramas referentes às frações 2 (60% CO₂ e 40% EtOH) e fração 4 (30% CO₂ e 70% EtOH)

A utilização destes extratos com estas condições parece diminuir o teor em fenóis para estas amostras.

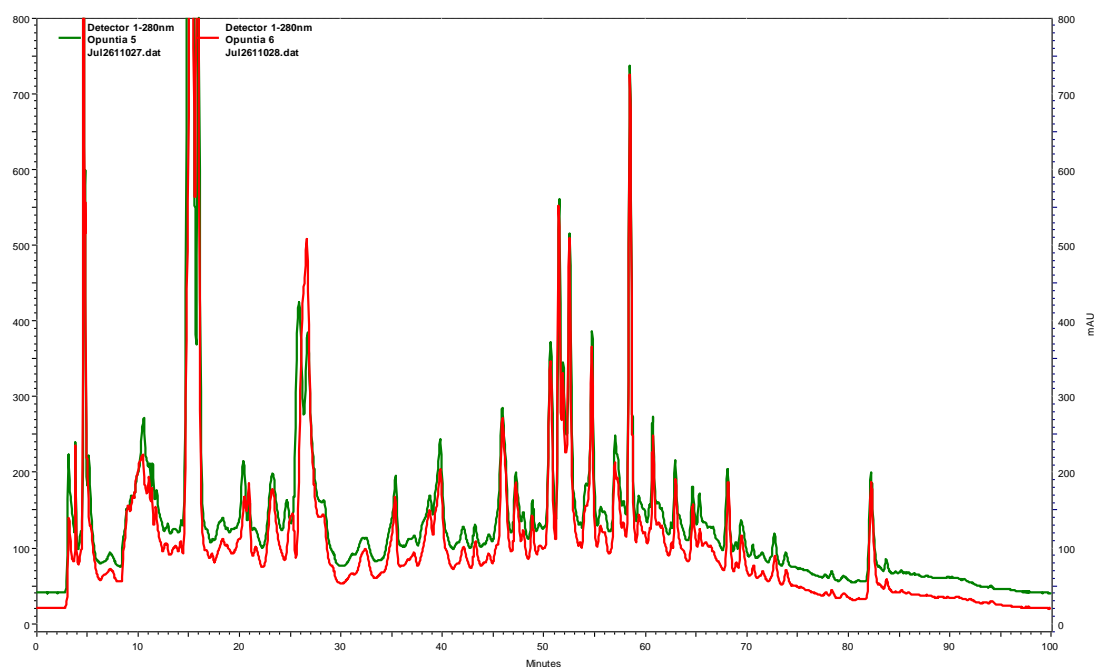


Figura 52 - Sobreposição dos cromatogramas referentes às frações 5 (30% CO₂, 40% EtOH e 30% H₂O) e fração 6 (70% EtOH e 30% de H₂O)

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

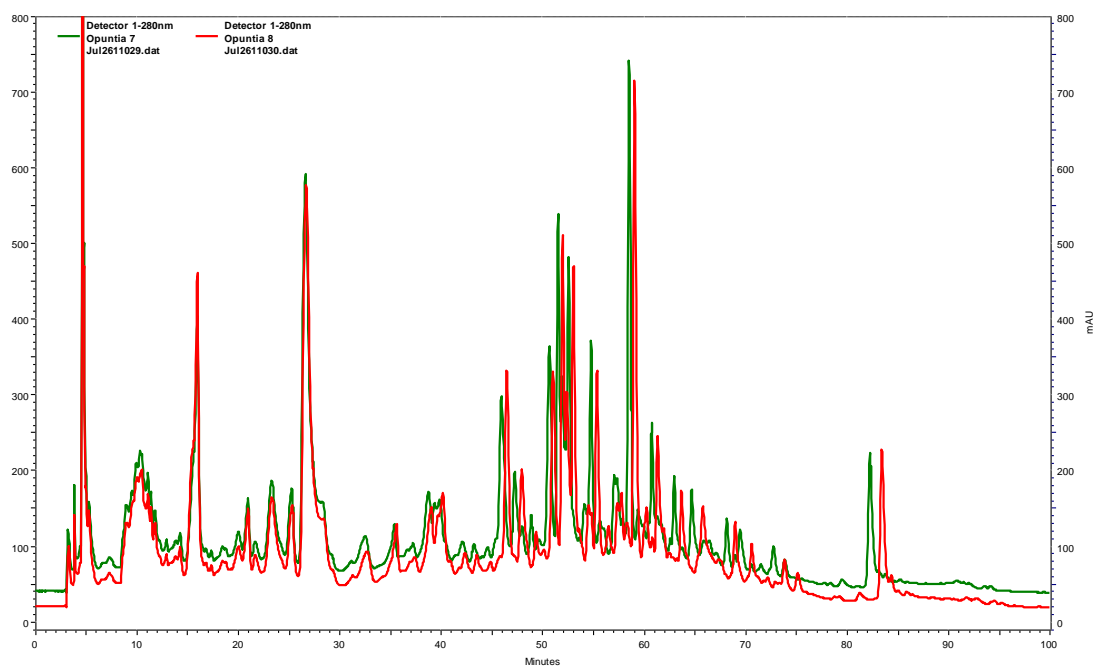


Figura 53 - Sobreposição dos cromatogramas referentes às frações 7 (10% CO₂, 80% EtOH e 10% H₂O) e fração 8 (50% EtOH, 40% CO₂ e 10% de H₂O)

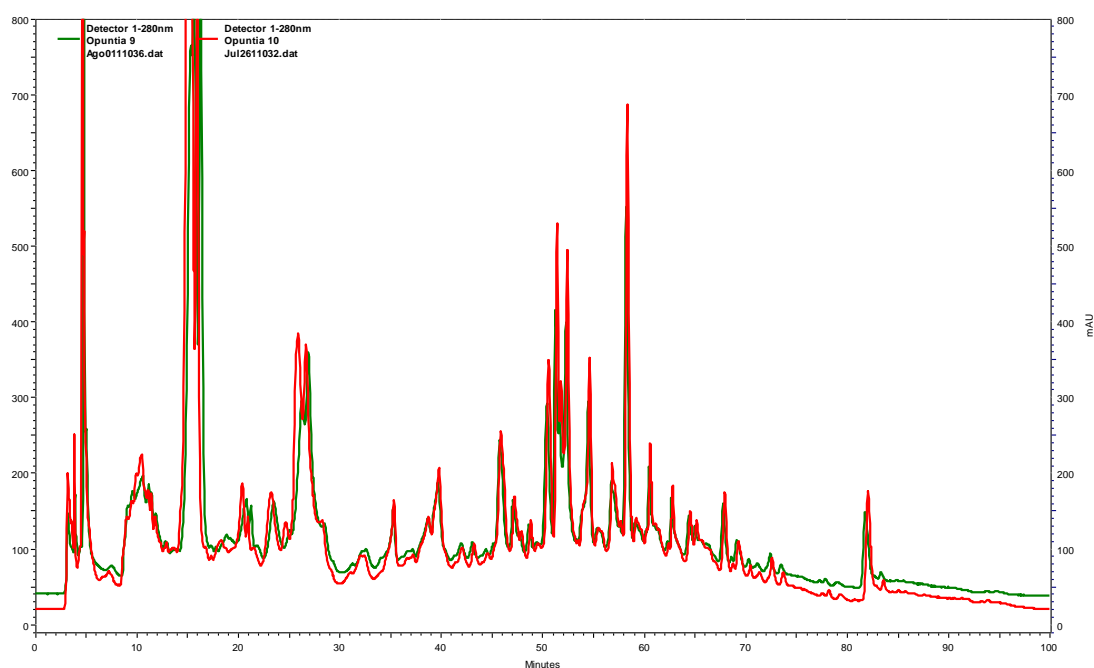


Figura 54- Sobreposição dos cromatogramas referentes às frações 9 (10% CO₂, 50% EtOH e 40% H₂O) e fração 10 (60% EtOH, 20% CO₂ e 20% de H₂O)

Como se observa na figura 54 os perfis são bastante semelhantes entre si, apesar das amostras não terem sido preparadas com as mesmas proporções de CO₂ e EtOH.

No entanto quanto à atividade antioxidante os resultados são diferentes (figura 55).

4.5.2.2 Avaliação da capacidade antioxidante

Estas frações foram por último avaliadas quanto à sua capacidade antioxidante (ORAC e HORAC), como estão representadas na figura 55.

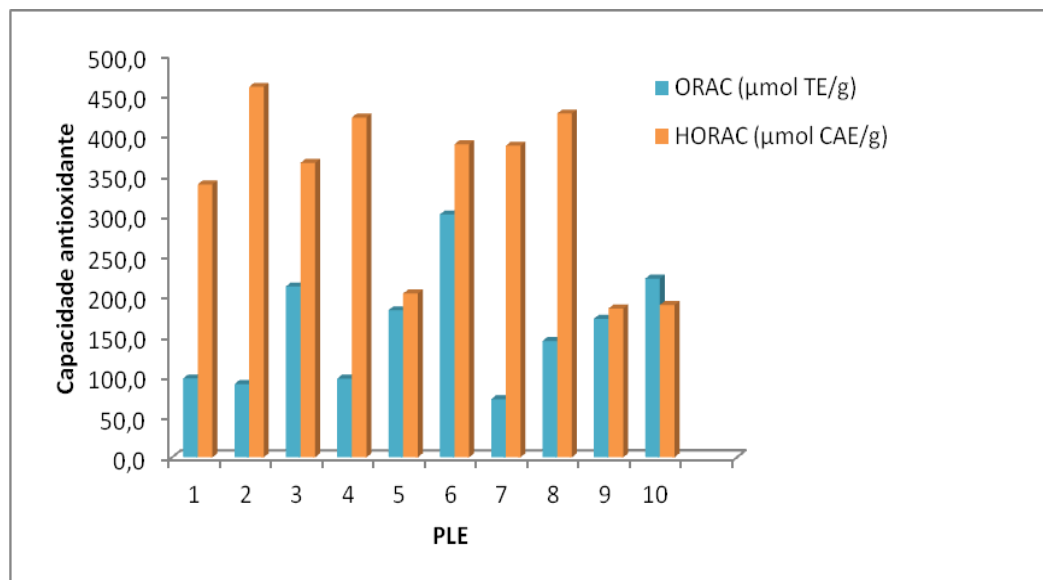


Figura 55 - Capacidade antioxidante para as várias frações do resíduo de Beja

Os resultados obtidos a partir dos ensaios da atividade antioxidante nas frações, mostram que contrariamente ao que foi observado ao longo de todo este trabalho, os valores de HORAC são superiores aos de ORAC, excepto para o extrato dez em que o ORAC é ligeiramente superior. Observa-se ainda que o extrato dois e quatro (que apresentavam menor teor em fenóis) são os que apresentam os valores mais elevados para o método de HORAC, sendo o extrato seis o que apresenta o valor mais alto para o ORAC.

Observa-se também que as amostras 2,4; 5,6;7,8; (figuras 51,52 e 53) tem um comportamento semelhante nos valores de ORAC e HORAC o que já não acontece entre as amostras 9 e 10, no entanto não ocorre nenhum pico “estranho” no cromatograma que explique este fato. Observando a figura 54 verifica-se que a amostra 10 constituída por 60% EtOH, 20% CO₂ e 20% de H₂O é a única que possui um comportamento diferente das restantes, apresentando um teor de ORAC maior que o de HORAC.

Olhando ainda para a composição das frações e para os resultados da atividade antioxidante verifica-se que as frações que não são compostas por água ou que tem

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

uma baixa percentagem (10%) desta apresentam os valores de ORAC menores que as restantes frações. Estes resultados podem querer dizer que com este tipo de extração os compostos extraídos são diferentes dos obtidos através dos outros processos utilizados.

5. Conclusões

No presente trabalho foram identificados nas amostras de *Opuntia* cerca de 30 compostos, entre eles o ácido cítrico, málico, quínico, succínico, ácido piscídico, ácido eucómico, ácido cafeico, quercetina e derivador e isoramnetina e alguns derivados. Compostos como ácido piscídico, succínico e isoramnetinas apresentaram uma maior correlação com os resultados da capacidade antioxidante (ORAC e HORAC) das memsas amostras. Os valores obtidos indicam que estes compostos contribuem para a atividade antioxidante registada no *Opuntia ficus indica*. Por outro lado, foram detetadas betalaínas, pigmentos caraterísticos e já descritos neste fruto. A Indicaxantina (com uma absorção a 480nm) e a betanina (absorção a 535nm), foram as betalainas encontradas em maior concentração nos sumos analisados.

O sumo da amostra de *Opuntia* proveniente de Sines apresentou os teores mais elevados de fenóis totais e atividade antioxidante, para ambos os métodos químicos (ORAC e HORAC), por outro lado o teor em flavonóis foi mais elevado para o sumo de Beja. No geral, os valores obtidos situam-se entre os valores já reportados, no entanto existem algumas oscilações, que poderão ser explicadas pelo fato dos sumos terem sido processados com casca e serem de localizações e de climas diferentes dos reportados na literatura.

Tanto quan to é do nosso conhecimento o processo de simulação de digestão *in vitro*, neste tipo de amostras foi efetuado pela primeira vez. As análises efectuadas permitiram concluir que o processo de digestão afeta de maneira diferente as amostras, uma vez que para no sumo de Beja e Marvão ocorre um aumento dos picos detectados após o processo, contrariamente às restantes amostras. Quanto às betalaínas, o processo de digestão *in vitro*, parece não causar grandes alterações. Após a digestão é o sumo de Marvão que possui o maior teor em fenóis e flavonóis, mas o sumo de Sines é o que apresenta a maior atividade antioxidante (ORAC e HORAC). Observa-se também que o sumo de Tramagal foi o que sofreu maior alteração relativamente à atividade antioxidante antes e após a digestão. Os valores finais de HORAC neste processo são muito semelhantes para todas as amostras.

O extrato do resíduo de Beja (ERPs), sujeito a concentração por resina Amberlite XAD16 foi analisado relativamente à capacidade antioxidante intracelular

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

(marcadores: i) inibição da formação de ROS, em duas condições: pré e co-incubação; ii) inibição da oxidação de glutathione; iii) inibição da oxidação de proteínas). Os resultados obtidos para a produção de radicais peróxido, apresentaram valores similares em ambas as condições de pré e co-incubação querendo dizer que o extrato provoca a mesma reação nas células. Quanto aos radicais hidroxilo, este parece ter sido mais eficiente no ensaio de co-incubação, explicado possivelmente pelo fato dos compostos serem captados nas células Caco-2, agindo contra lesões extracelulares de radicais livres. No ensaio da inibição da oxidação de glutathione, apresentou-se uma diminuição da relação [GSH/GSSG], causada pelo stress oxidativo. O extrato de Beja apresentou uma capacidade de prevenção contra a oxidação da glutathione. No ensaio de oxidação das proteínas, observou-se um aumento no ERPs em relação ao controlo negativo, concluindo que o peróxido aumenta a oxidação das proteínas na célula. Ocorreu também um aumento do controlo+ em relação ao extrato, levando a crer que este possui capacidades de inibição contra os ROS.

Por último foi selecionado o resíduo de Beja, para uma extração com líquido pressurizado. Foram obtidas dez frações com diferentes combinações água/EtOH/CO₂, e foram analisadas as suas capacidades antioxidantes. A fração composta por 40%EtOH 60% revelou os valores mais elevados para o método de HORAC, no entanto para o método de ORAC o valor mais elevado foi da fração composta por 70%EtOH e 30% de H₂O. Contrariamente a todas as outras análises de atividade antioxidante efetuadas neste trabalho, os valores de HORAC foram mais elevados que os de ORAC, podendo ser explicado pelo fato desta extração, extrair compostos diferentes de outros processos. Observa-se ainda que as frações obtidas com uma menor percentagem de água possuem também valores menores de ORAC.

Os resultados obtidos no trabalho mostram que a composição química das amostras é diferente dependendo da sua origem. Por outro lado após a digestão os sumos sofrem alterações químicas nomeadamente ao nível dos flavonóis.

Os resíduos tratados com resina *XAD16* deverão ser mais adequados para produzir amostras para serem usadas como suplementos alimentares ou nutracêuticos.

6. Referências bibliográficas

Alía, M; Mateos, R; Ramos, S; Lecumberri, E; Bravo, L; Goya, L. Influence of Quercetin and Rutin on Growth and Antioxidant Defense System of a Human Hepatoma Cell Line (Hepg2)., *Eur J Nutr* 2006. 45:19-28, 2006.

Alimia, H; Hfaiedhc, N; Zouhour, Bouonia Z; Saklyb, M. Evaluation of antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indica* f. *inermis* flowers extract in rats. 2011. 32:406–416.

Alves, M.A; Souza, A.C.M; Gamarra-Rojas, G; Guerra, N.B. Fruto de Palma [*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller, *Cactaceae*]: morfologia, composição química, fisiologia, índices de colheita e fisiologia pós-colheita. *Rev Iber Tecnologia Postcosecha*. 2008. 9:16-25.

Antunes, P; Viana, P; Vinhas, T; Capelo, J.L; Rivera, J; Gaspar, E.M.S.M. Optimization of pressurized liquid extraction (PLE) of dioxin-furans and dioxin-like PCBs from environmental samples. *Talanta* 2008. 75:916– 925.

Araújo, J; Gonçalves, P; Martel, F. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutrition Research* 2011. 31: 77–87.

Azeredo, M.C. Original article Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. 2009. 44: 2365–2376.

Boisen, S; Eggum, B. Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutrition Research Reviews*. 1991. 4: 141–162.

Bermúdez-Soto, M; Tomás-Barberán, F; García-Conesa M. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in Vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*. 2007. 102: 865-874.

Cartea, M. E; Francisco, M; Soengas, P; Velasco, P. Phenolic Compounds in Brassica Vegetables. *Molecules* Vol. 2011.16:251-80.

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

Castellanos-Santiago, E; Yahia, E.A. Identification and Quantification of Betalains from the Fruits of 10 Mexican Prickly Pear Cultivars by High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2008. 56: 5758–5764.

Cayupan, Y; Ochoa, M; Nazareno, M. Health-promoting substances and antioxidant properties of *Opuntia* sp. fruits. Changes in bioactive-compound contents during ripening process. *Food Chemistry* 2011. 126: 514-519.

Chavez-Santoscoy, R; Gutierrez-Uribe, J.A; Serna-Saldívar, S.O. Phenolic composition, antioxidant capacity and in vitro cancer cell cytotoxicity of nine prickly pear (*Opuntia* spp.) juices. *Plant Foods Hum Nutr* 2009. 64: 146-152.

Chirinos, R; Campos, D; Costa, N; Arbizu, C; Pedreschi, R; Larondelle, Y. Phenolic profiles of andean mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers: Identification by HPLC-DAD and evaluation of their antioxidant activity. *Food Chemistry* 2008 106:1285–1298.

Cilla, A; Laparra, J; Alegria, A; Barbera, R; Farre R. Antioxidant effect derived from bioaccessible fractions of fruit beverages against H₂O₂-induced oxidative stress in Caco-2 cells. *Food Chemistry* 2009. 106: 1180-1187.

Coles, T; Moughan, J; Darragh, A. (2005). In vitro digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. *Animal Food Science and Technology*. 2005. 123: 421–444.

Dai, J; Mumper, R.J; Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 2010. 15: 7313-7352.

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

Dawidowicz, A; Wianowska, D. PLE in the analysis of plant compounds Part I. The application of PLE for HPLC analysis of caffeine in green tea leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005. 37:1155–1159.

Del Caro, A; Piga, A; Vacca, V; Agabbio, M. Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chemistry*. 2004. 84: 99–105

Faller, A; Fialho, E. Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2010. 23:561–568.

Ferguson, L. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*. 2001 475:89–111.

Fernández-Fernández, R; López-Martínez, J.C; Romero-González, R; Martínez-Vidal J.L; Flores, M.I; Frenich, A.G. Simple LC–MS Determination of Citric and Malic Acids in Fruits and Vegetables. *Chromatographia*. 2010. 72:55-62.

Feugang , J; Konarski, P; Zou, D; Stintzing, F.C; Zou, C. Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Frontiers in Bioscience* 2006.11: 2574-89.

Finley, J; Kong, A; Hintze, K; Jeffery, E; Ji, L. Antioxidants in Foods: State of the Science Important to the Food Industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011. 59:6837-6846.

Ginestra, G; Parker, M.L; Bennett, R.N; Robertson, J; Mandalari, G. Anatomical, Chemical, and Biochemical Characterization of Cladodes from Prickly Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009. 57:10323–10330.

Glahn,P; Lai, C; Hsu, J; Thompson, F; Guo, M;Van Campen, R. Decreased citrate improves iron availability from infant formula: Application of an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *Journal of Nutrition*. 1998. 128:257–264.

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

Gomes, A; Fernandes, E; Lima, J; Mira, L; Corvo, M. Molecular Mechanisms of Anti-Inflammatory Activity Mediated by Flavonoids. *Current Medicinal Chemistry* . 2008. 15:1586-1605.

Han, X; Shen, T; Lou, H. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *Int. J. Mol. Sci.* 2007. 8:950-988.

Herrera-Hernández, M; Guevara-Lara, F; Reynoso-Camacho, R; Guzmán-Maldonado, S. Effects of maturity stage and storage on cactus berry (*Myrtillocactus geometrizans*) phenolics, vitamin C, betalains and their antioxidant properties. *Food Chemistry*. 2011. 129:1744-1750

Hervert-Hernández, D; García, O.P; Rosado, J.L; Goñi, I. The contribution of fruits and vegetables to dietary intake of polyphenols and antioxidant capacity in a Mexican rural diet: Importance of fruit and vegetable variety. *Food Research International* 2011. 44:1182–1189.

Huang, D; Ou, B; Hampsch-Woodill, B; Flanagan, J.A; Prior, R.L. High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (Orac) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *J Agric Food Chem.* 2002. 16: 4437-44.

Hur, S; Lim, B; Decker, E; McClements, J. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*. 2001. 125: 1–12.

Hyun, S.K; Jung, Y; Chung, H.Y; Jung, H.A; Choi, J.S. Isorhamnetin Glycosides with Free Radical and ONOO⁻ Scavenging Activities from the Stamens of *Nelumbo nucifera*. *Arch Pharm Res.* 2006. 29:287-292.

Jiang, J; Yanfang, L; Chen, Z; Min, Z; Lou, F. Two novel C₂₉-5 β -sterols from the stems of *Opuntia dillenii*. *Elsevier steroids* 2006. 1: 1073–1077.

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

Kand'ar, R; Zakova, P; Lotkova, H; Kucera, O; Cervinkova, Z. Determination of reduced and oxidized glutathione in biological samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007. 43: 1382-1387.

Knishinsky, R. Cactus Medicine: Prickly Pear Cactus Medicine: Treatments for Diabetes, Cholesterol, and the Immune System. 2004.1-13.

Kugler, F; Stintzing, F.C; Carle, J. Identification of Betalains from Petioles of Differently Colored Swiss Chard (*Beta vulgaris* L. ssp. *cicla* [L.] Alef. Cv. Bright Lights) by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Agric. Food Chem*. 2004. 52: 2975-2981.

Kuti, J. Antioxidant compounds from four *Opuntia* cactus pear fruit varieties. *Food Chemistry*. 2004. 85:527-33.

Lakhanpal, P; Rai, D. Quercetin: A versatile Flavonoid. *Internet Journal of Medical Update*. 2007. 2:22-37.

Leo, M; Abreu, M.B; Pawlowska, A.M; Cioni, P.L; Barac, A. Profiling the chemical content of *Opuntia ficus-indica* flowers by HPLC-PDA-ESI-MS and GC/EIMS analyses. *Elsevier Phytochemistry letters*. 2010. 3:48-52.

Li, W; Sun, Y; Liang, W; Fitzloff, J.F; Breemen, R. Identification of caffeic acid derivatives in *Actea racemosa* (*Cimicifuga racemosa*, black cohosh) by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2003. 17: 978-982.

Liu, R.H. Supplement: International Research Conference on Food, Nutrition, and Cancer Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *The American Society for Nutritional Sciences J. Nutr*. 2004. 134:3479S-3485S.

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

Liu, R; Ye, M; Guo, H; Bi, K. Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of twenty-three flavonoids in the extract of *Dalbergia odorifera*. *Mass Spectrom.* 2005. 19: 1557–1565.

Malheiro, R; Sousa, A; Casal, S; Bento, A; Pereira, J.A. Cultivar effect on the phenolic composition and antioxidant potential of stoned table olives. *Food and Chemical Toxicology.* 2011. 49:450–457.

Manach, C; Scalbert, A; Morand, C; Rémésy, C; Jiménez, L. Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004. 5:727-47.

Mendham, J; Denney, R. C; Barnes, J. D; Thomas, M. Análise Química Quantitativa. *LTC.* 2002. 8:410-411.

Mohammer, M; Stintzing, F; Carle, R. Evaluation of different methods for the production of juice concentrates and fruit powders from cactus pear. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 2006. 7:275-287.

Moussa-Ayoub T, El-Samahy S, Kroh L, Rohn S. Identification and quantification of flavonol aglycons in cactus pear (*Opuntia ficus indica*) fruit using a commercial pectinase and cellulose preparation. *Food Chemistry.* 2011: 1177-1184.

Nunes, Sara Alexandra Luis; “Modulation of inflammatory mediators by *Opuntia ficus-indica* and *Prunus avium* bioproducts using *in vitro* cell-based model of intestinal inflammation” dissertação para a obtenção do grau de Mestre, na Faculdade de Ciência e tecnologia, da Universidade de Lisboa, 2011”.

Ou, B; Hampsch-Woodill, M; Flanagan, j; Deemer, E.K; Prior, R.L; Huang. D. Novel Fluorometric Assay for Hydroxyl Radical Prevention Capacity Using Fluorescein as the Probe. *J. Agric. Food Chem.* 2002. 50: 2772-2777.

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

Pepe, H; Balci, S.S;Revan, S;Akalin,P.P; Kurtoglu,F. Comparison of Oxidative Stress and Antioxidant Capacity Before and After Running Exercises in Both Sexes. *Gender Medicine*. 2009.6: 587-95.

Pi, J; Zhang, Q; Fu, J; Woods, C.G; Hou, Y; Corkey, B.E; Collins, S; Andresen, M.E. ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2010. 244:77–83.

Principles and Methods – Gel Filtration. *Handbooks Amersham Biosciences*.2002. 18:1022-18.

Ramful D; Tarnus E; Rondeau P; Silva C; Bahorun T; Bourdon E. Citrus Fruit Extracts Reduce Advanced Glycation End Products (AGEs)- and H₂O₂-Induced Oxidative Stress in Human Adipocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010. 58: 11119-11129.

Repo-Carrasco-Valencia, R; Hellstrom, J.K; Pihlava, J.K; Pihlava, J.M. Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kaniwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Food chemistry*. 2010. 120: 128–133.

Reuter, S; Gupta, S.C; Chaturvedi, M.M; Aggarwal, B.B.Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology & Medicine* 2010. 49:1603–1616.

Ryan L; Prescott S.L. Stability of the antioxidant capacity of twenty-five commercially available fruit juices subjected to an in vitro digestion. *International Journal of Food Science and Technology*. 2010. 45:1191-1197.

Sáenz C; Berger H; Garcia J.C; Galletti L; Cortázar, V.G; Higuera, I. Utilización agroindustrial del nopal. Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO, 162. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2006.

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

Schliemann, W; Cai, Y; Degenkolb, T; Schmidt, J; Corke, H. Betalains of *Celosia argentea*. *Phytochemistry*. 2011. 58:159–165.

Scordino, M; Mauro, A; Passerini, A; Maccarone, E. Adsorption of Flavonoids on Resins: Hesperidin. *J Agric Food Chem* 2003. 51:6998-7004.

Serra, A.T. Valorization of Traditional Portuguese Apples and Cherries. Biochemical Characterization and Development of Functional Ingredients, ITQB-UNL/IBET *Nutraceuticals and Controlled Delivery Laboratory*. 2010.

Serra A; Seabra I; Braga M; Bronze M; de Sousa H; Duarte C. Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 1: Recovery of extract fractions rich in bioactive compounds. *Journal of Supercritical Fluids*. 2010. 55:184-191.

Singleton, V.L., and J. A. Jr Rossi. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents., *Amer. J. Enol. Viticult.* 1965. 16: 144-58.

Stevenson D.E, Hurst R.D. Polyphenolic phytochemicals-just antioxidants or much more? *Cell Mol Life Sci*. 2007. 64: 2900-2916.

Stintzing, F.C; Carle, R. Cactus stems (*Opuntia spp.*): A review on their chemistry, technology, and uses. *Mol. Nutr. Food Res*. 2005. 49: 175 – 194.

Strack, D; Vogt, T; Schliemann, W. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*. 2003.62:247– 269.

Takahira, M; Kusano,A; Shibano, M; Kusano, G; Miyase, T. Piscidic Acid and Fukiic acid esters from *Cimicifuga Simplex*. *Phytochemistry*. 1998. 49:2115-2119.

Torres-Escribano, S; Denis Sylvain; Calatayud,M; Alric Monique; Montoro, R. Comparison of a static and a dynamic in vitro model to estimate the bioaccessibility of As, Cd, Pb and Hg from food reference materials *Fucus sp.* (IAEA-140/TM) and Lobster hepatopancreas (TORT-2). *Science of the Total Environment*. 2011. 409:604–611.

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

Utkarsha, U; Shedbalkar, S; Adki, V; Jadhav, P ; Vishwas, A.B. *Opuntia* and Other Cacti: Applications and Biotechnological Insights. *Tropical Plant Biol.* 2010. 3:136-150.

Valente, L; Paixão D; Nascimento, A.C; Santos, P. Antiradical activity, nutritional potential and flavonoids of the cladodes of *Opuntia monacantha* (Cactaceae). 2010.123: 1127–1131.

Wenkui, Li; Yongkai, Sun; Wenhong, Liang; John, F; Fitzloff, Richard B; Van Breemen. Identification of caffeic acid derivatives in *Actea racemosa* (*Cimicifuga racemosa*, black cohosh) by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 2003. 17: 978-982.

Zhi-you, C; Young, Y. Pathway and mechanism of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Journal of Medical Colleges of PLA.* 2007.22:320-324.

Zhishen, Jia, Tang Mengcheng, and Wu Jianming. The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and Their Scavenging Effects on Superoxide Radicals. *Food Chemistry.* 1999. 64: 555-559.

Zhu, X; Raina, A.K; Lee, H; Casadesus, G; Smith, M.A; Perry, G. Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. *Brain Research.* 2004. 1000: 32–39.

Compostos bioactivos de *Opuntia ficus indica*

1. Separação de frações em Sephadex LH-20

Tabela a) - Identificação de compostos, respetivas concentrações e tempos de retenção nas diferentes frações

	ppm		Opuntia Quarteira			Opuntia Acetato de etilo			Opuntia Alcool		
			RT	Area	Conc.	RT	Area	Conc.	RT	Area	Conc.
Ác Clorogénico	LQ=0.5	Rep1	-	-	-	-	-	-	4,51	584,56	0,01
	LD=0.2	Rep2	-	-	-	-	-	-	4,45	880,27	0,07
		Rep3	-	-	-	-	-	-	4,51	919,77	0,08
Ác Cítrico	LQ=1	Rep1	1,85	1246832,63	177,58	1,72	10208,81	0,99	1,78	155379,92	21,72
	LD= 0.3	Rep2	1,78	1405560,00	200,24	1,72	8265,02	0,72	1,78	170123,67	23,83
		Rep3	1,78	1276185,25	181,77	1,72	8040,97	0,68	1,78	175200,08	24,55
Ác Málico	LQ=0.1	Rep1	1,52	97915,52	8,42	1,52	8698,67	0,81	1,52	5846,65	0,57
	LD=0.03	Rep2	1,52	97284,37	8,36	1,52	8231,71	0,77	1,52	7177,83	0,68
		Rep3	1,52	85461,45	7,36	1,52	8259,82	0,77	1,52	6463,70	0,62
Ác Succínico	LQ=0.5	Rep1	2,13	651,95	<LQ	1,93	1202,63	0,04	-	-	-
	LD=0.2	Rep2	2,13	846,60	<LQ	1,93	1412,90	0,10	-	-	-
		Rep3	2,13	832,77	<LQ	1,93	1363,14	0,08	-	-	-
Ác Cafeico	LQ=0.5	Rep1	-	-	-	-	-	-	7,97	791,21	<LQ
	LD=0.2	Rep2	-	-	-	-	-	-	7,91	921,23	<LQ
		Rep3	-	-	-	-	-	-	7,97	929,76	<LQ
Ác m-Cumárico	LQ=0.1	Rep1	-	-	-	9,68	508,33	0,20	8,67	452,76	0,19
	LD=0.03	Rep2	-	-	-	9,62	666,11	0,22	8,73	688,84	0,22
		Rep1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Rep2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ac Quínico	LQ=0.1	Rep1	1,72	227137,13	94,90	1,4	4545,63	1,65	1,69	27887,96	11,43
	LD=0.03	Rep2	1,72	206800,13	86,38	1,4	6056,4	2,29	1,69	28028,66	11,49
Canferol glucósido	LQ=0.1	Rep1	-	-	-	-	-	-	12,11	3008,34	0,65
	LD=0.03	Rep2	-	-	-	-	-	-	12,11	3164,13	0,69
		Rep3	-	-	-	-	-	-	12,11	3554,43	0,77
Espiracosido	LQ=5	Rep1	-	-	-	-	-	-	11,07	6956,93	66,04
	LD=1.7	Rep2	-	-	-	-	-	-	11,07	6789,94	64,47
		Rep3	-	-	-	-	-	-	11,07	6875,68	65,28
Quercetina	LQ=0.1	Rep1	-	-	-	14,12	842,28	0,30	14,22	11777,65	1,45
	LD=0.03	Rep2	-	-	-	14,12	998,00	0,32	14,22	12417,26	1,52
		Rep3	-	-	-	14,03	940,47	0,31	14,22	12282,52	1,51
Quercitrina		Rep1	-	-	-	10,0	704,2		-	-	-
		Rep2	-	-	-	10,0	753,0		-	-	-
Rutina (Q 3-O-rutinósido)	LQ=0.1	Rep1	10,88	658,28	0,18	-	-	-	10,88	14455,99	2,35
	LD=0.03	Rep2	10,88	797,73	0,20	-	-	-	10,88	16576,75	2,68
		Rep3	10,84	595,50	0,17	-	-	-	10,88	16555,73	2,68
Isoramnetina	LQ=0.5	Rep1	-	-	-	-	-	-	14,69	5273,97	3,60
	LD=0.2	Rep2	-	-	-	-	-	-	14,69	4385,52	2,92
		Rep3	-	-	-	-	-	-	14,69	8590,96	6,12
Isoramnetina 3-O-glucósido	LQ=0.5	Rep1	-	-	-	-	-	-	11,25	794,92	11,95
	LD=0.2	Rep2	-	-	-	-	-	-	11,25	881,99	13,61
		Rep3	-	-	-	-	-	-	11,25	680,48	9,76
Isoramnetina 3-O-rutinósido	LQ=1	Rep1	-	-	-	-	-	-	11,00	4397,45	43,46
	LD=0.3	Rep2	-	-	-	-	-	-	10,92	5130,27	50,93
		Rep3	-	-	-	-	-	-	10,92	3187,07	31,12

2. Recta calibração Ácido gálico

Tabela b) - Áreas (280nm) e gama de concentração (ppm) do Ácido Gálico

[] (µg/g)	Área (280nm)
0	0
5	1,35E+06
10	3,00E+06
20	5,92E+06
40	1,26E+07
60	1,67E+07
80	2,02E+07
100	2,24E+07

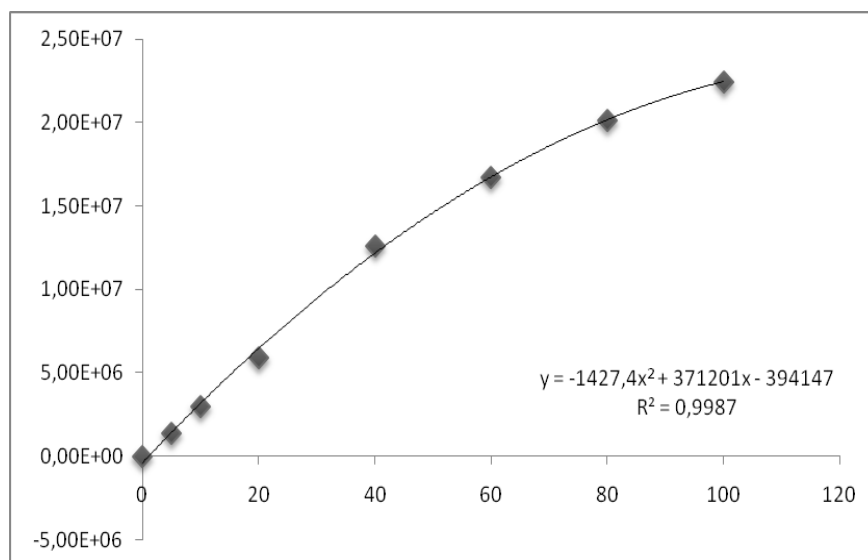
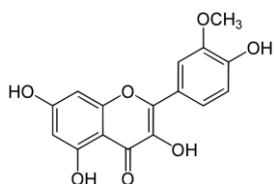


Figura a) - Reto Polinomial do Ácido gálico

3. Reta Calibração Isoramnetina

Tabela c) - Áreas (360nm) e gama de concentração (ppm) de Isoramnetina



[] (µg/g)	Áreas (360nm)
20	3,28E+05
40	8,28E+05
80	1,85E+06
100	2,18E+06

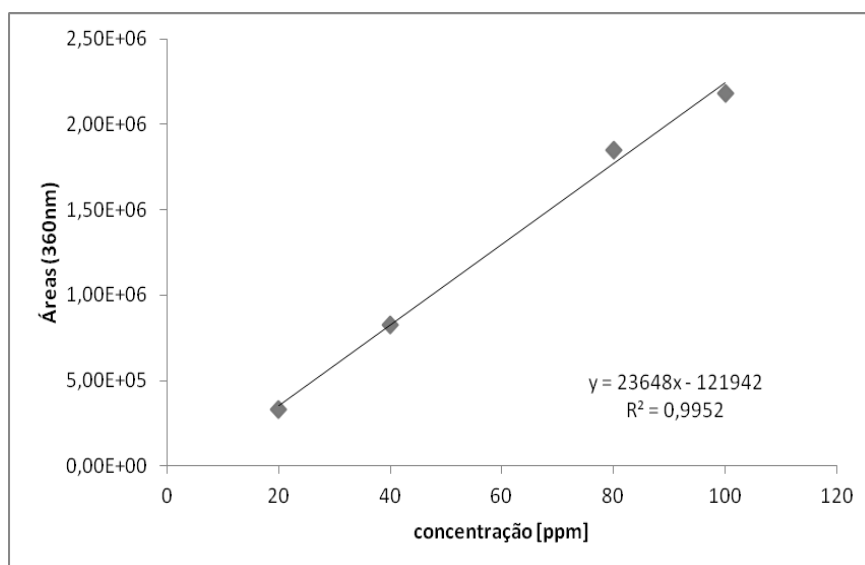


Figura b) – Reta calibração da Isoramnetina

4. Amostras sujeitas a processo de digestão

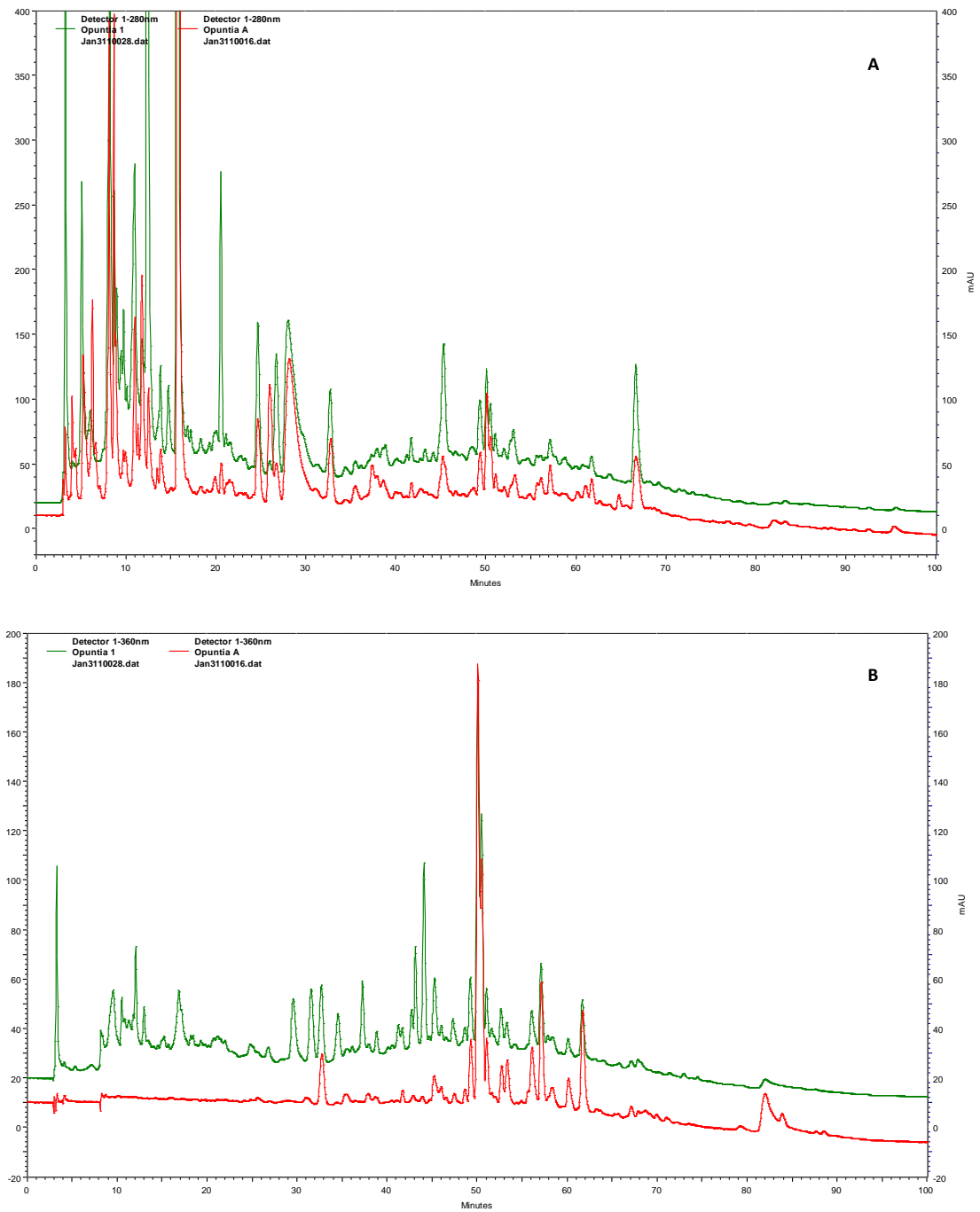


Figura c) – Sobreposição de cromatogramas referentes à amostra de Tramagal **antes** e **após** o processo de digestão, a 280nm (A) e 360nm (B)

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

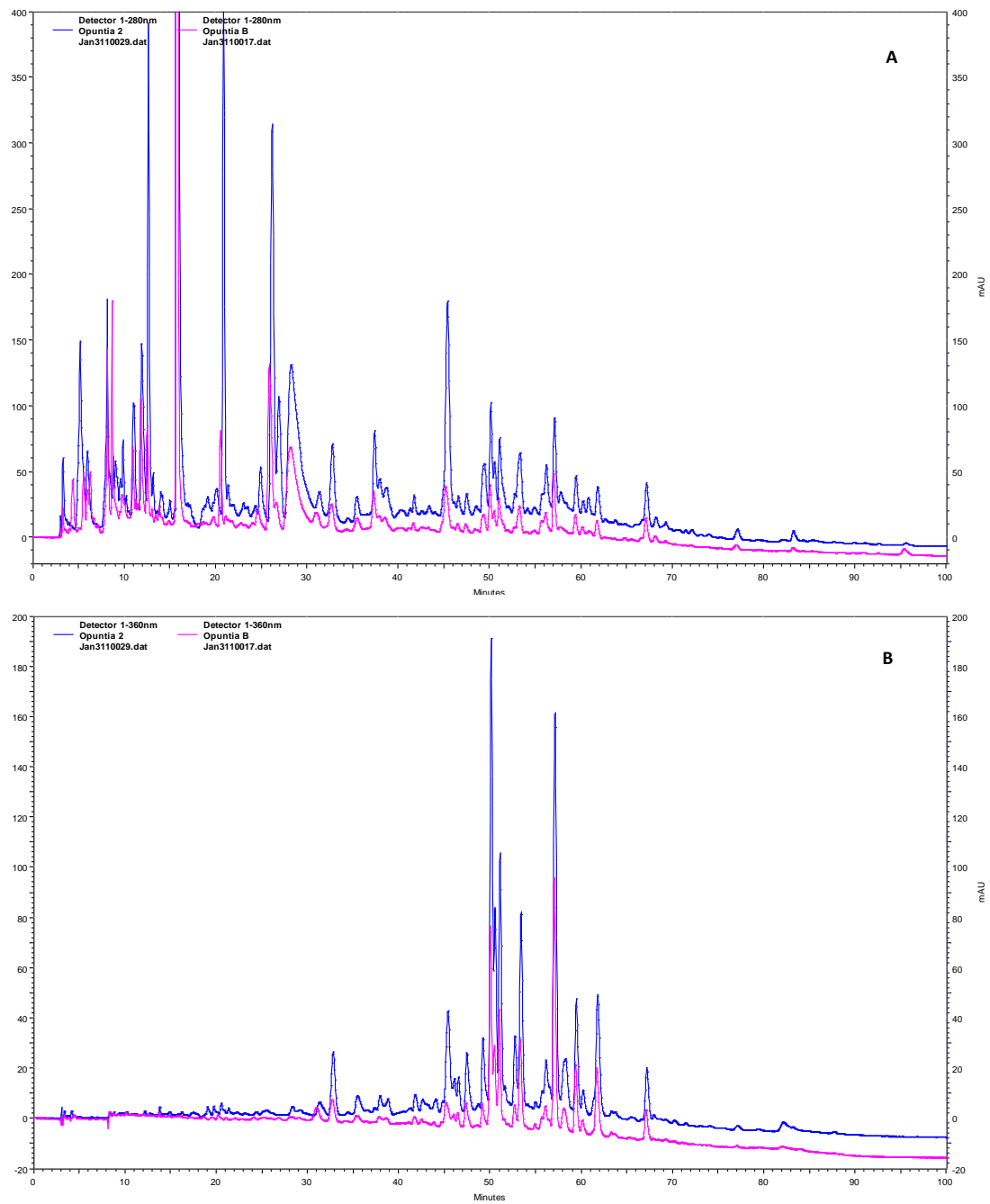


Figura d) - Sobreposição de cromatogramas referentes à amostra de Beja antes e após o processo de digestão, a 280nm (A) e 360nm (B)

Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*

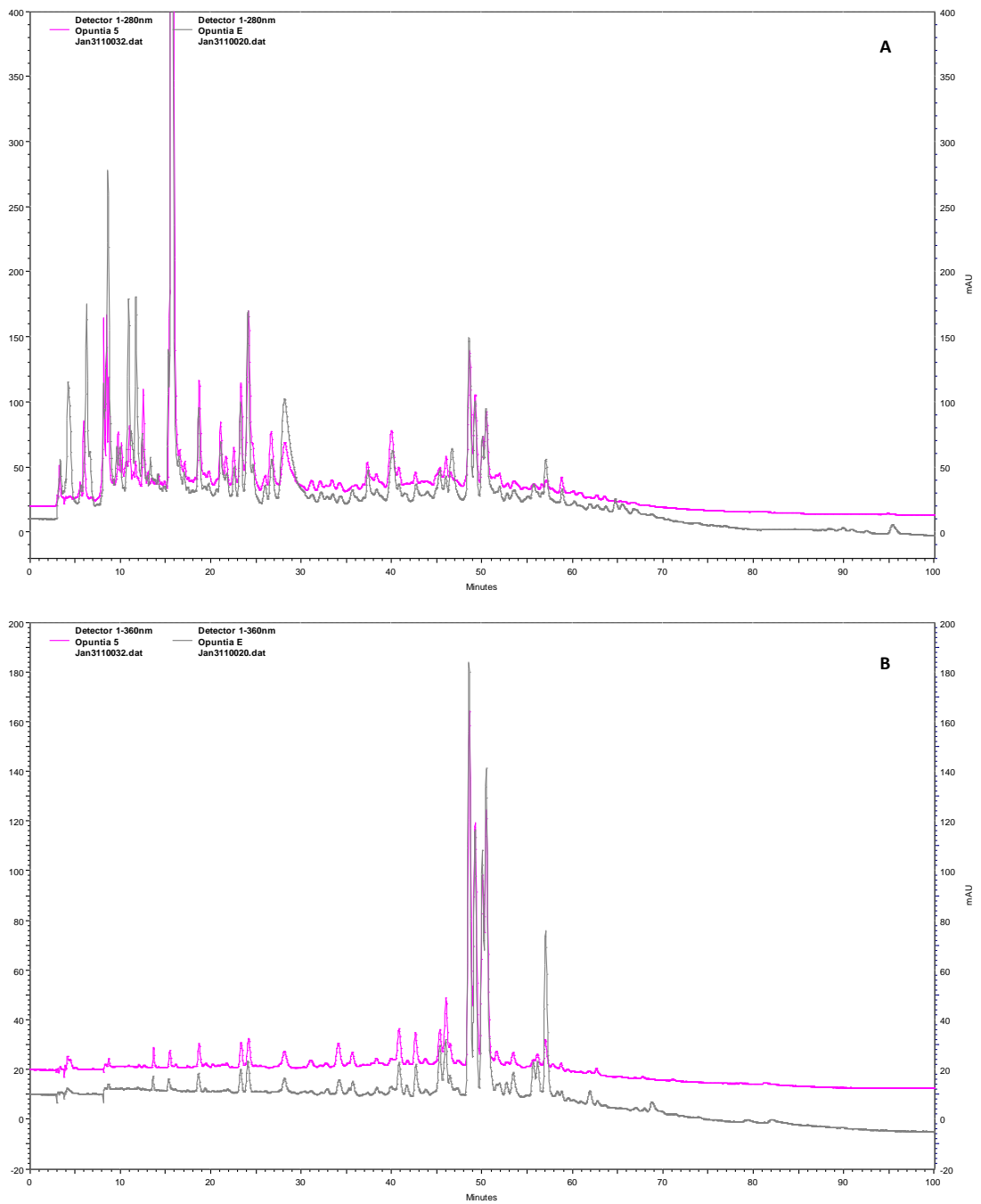


Figura e) - Sobreposição de cromatogramas referentes à amostra de Sesimbra **antes** e após o processo de digestão, a 280nm (A) e 360nm (B)