



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO EM NUTRIÇÃO CLÍNICA

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE SUMOS VERDES
COMERCIAIS E OS SEUS EQUIVALENTES MANUFATURADOS, AO
LONGO DO TEMPO.**

Trabalho submetido por
Joana Kouprianoff Damas Cavaco
para a obtenção do grau de Mestre em Nutrição Clínica

Janeiro 2017



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO EM NUTRIÇÃO CLÍNICA

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE SUMOS VERDES
COMERCIAIS E OS SEUS EQUIVALENTES MANUFATURADOS, AO
LONGO DO TEMPO.**

Trabalho submetido por
Joana Kouprianoff Damas Cavaco
para a obtenção do grau de Mestre em Nutrição Clínica

Trabalho orientado por
Professora Doutora Alexandra Bernardo

Janeiro 2017

Dedicatória

Aos mestres iluminados que me têm inspirado durante a minha
vida.

*The path to happiness and a sense of
well being in this very life lies not in
avoiding suffering but in using the conscious,
embodied, direct experience of it as a vehicle
to gain deep insight into the true nature of
life and your own existence.*

The Budha

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Alexandra Bernardo, por todo o seu apoio insubstituível, pelo seu profissionalismo e pela sua disponibilidade nos últimos meses e por se ter revelado uma pessoa excepcional com elevados valores e ética, trabalhando comigo mesmo fora de horas e ultrapassando contratempos de forma incomparável.

A todos os professores do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, com quem me cruzei nos últimos anos e que de alguma forma me ajudaram a melhorar o meu olhar crítico e científico no mundo e em especial à Professora Doutora Fernanda Mesquita, por toda a sabedoria transmitida ao longo destes dois anos de Mestrado; à Professora Doutora Margarida Moncada, pelo seu indispensável apoio durante a fase laboratorial; à Professora Doutora Leonor pela sua ajuda na fase final de publicação científica; e ao Professor Doutor José Brito, pelo seu contributo admirável na análise estatística dos resultados.

Aos meus colegas de mestrado do ISCEM, Rita, Mariana, Diogo, por terem contribuído para a minha evolução no início do mestrado e à Filipa e Ana Paula, pela preciosa ajuda durante a fase laboratorial.

Aos meus pais e irmã, Eduardo, Maria Helena e Mariana, por me apoiarem nas minhas decisões de estudos e carreira e por me darem força motriz para continuar a perseguir os meus sonhos, podendo ambicionar tornar-me numa pessoa cada vez mais completa.

Aos meus queridos amigos, que estiveram sempre por perto durante este meu percurso e mesmo apesar da minha ausência forçada em diversas situações.

Ao Pedro Mar da Slowjuicers Portugal e à Carla Jesus pela confiança e por me cederem uma máquina de sumos *slow juicer*, sem isso, a experiência em laboratório não teria sido tão completa.

À Lillian Barros, por ter sido uma peça fundamental para conseguir ultrapassar burocracias e poder desenvolver a experiência laboratorial ambicionada. À GO Natural por ter cedido os sumos e a receita dos mesmos, o que permitiu que a experiência fosse possível.

RESUMO

Enquadramento: As preocupações com a saúde e a procura de novos produtos têm crescido por parte de um consumidor mais exigente e informado. No entanto, a informação quantitativa nos rótulos das embalagens, respeitante à capacidade antioxidante, é frequentemente insuficiente.

Objectivos: Caracterizar e comparar o efeito do tempo na capacidade antioxidante de um sumo verde comercial e o seu equivalente manufacturado.

Métodos: 7 amostras independentes de um sumo comercial (C) e 7 amostras independentes do sumo verde equivalente manufacturado (M) foram sujeitas a uma extração hidro-metanólica (1:2). As amostras foram sujeitas a análise para determinar o teor de Fenóis Totais (FT) e a atividade antioxidante através do teste FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Potential*) e do teste de DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate). Os testes foram realizados em triplicado, em 3 momentos: após abertura/confecção (t_0), após 24h (t_1) e após 72h (t_2). Foi aplicado ANOVA de medições repetidas e avaliada a interação entre os fatores independentes e os fatores de medições repetidas.

Resultados: Para os valores de FT e DPPH foi obtida uma interação significativa entre o fator independente do sumo e o de repetição no tempo ($p < 0.001$), logo as comparações devem ser feitas com cuidado. Mesmo assim a potência observada (superior a 80%) sugere que os efeitos observados não se devem ao acaso. Assim o tratamento estatístico sugere, para FT que os valores de sumo comercial são significativamente superiores e para o DPPH, os são valores significativamente superiores no sumo comercial apenas para (t_1). Sugere ainda que tanto para FT como para DPPH existe um comportamento significativamente diferente entre os dois sumos ao longo do tempo. Em relação ao FRAP, a ausência de interação entre os fatores legitima a comparação entre os sumos e entre os momentos, de forma independente. Neste caso foram observadas diferenças entre os sumos, com valores de FRAP superiores para o sumo comercial ($p < 0.001$).

Conclusão: Os parâmetros analisados para os sumos comerciais e manuais revelaram diferenças para os 3 momentos estudados e sugerem vantagens nas propriedades antioxidantes do sumo verde comercial.

Palavras chave: Sumo Verde, Vegetais, Antioxidantes, Fenóis Totais, FRAP, DPPH.

ABSTRACT

Background: The health concerns are growing along with the demands of a more informed and exigent consumer. Nonetheless, quantitative information in the products labels, mentioning the effective antioxidant capacity, is frequently insufficient.

Objective: To characterize and compare the time effect on the antioxidant activity of commercial green juice and its manufactured equivalent.

Methods: 7 independent samples of a commercial green juice and 7 independent samples of the equivalent manufactured green juice were subjected to a hydro-methanolic extract (1:2). The homogeneous samples were subjected to chemical analysis to determine the total phenolic concentration (TPC) and the antioxidant activity using the Ferric Reducing Antioxidant Potential assay (FRAP) and 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate free radical assay (DPPH). The tests were done in triplicated on 3 moments: immediately after opening/preparing (t_0), after 24h (t_1) and after 72h (t_2). A repeated measures ANOVA of mixed type was applied. Interaction between independent factor and repeated measure factors was also evaluated.

Results: For TPC values, the statistical treatment suggests significantly higher values in commercial juice than in manufactured juice and a significantly different behaviour. However, a significant interaction between the independent juice factor and the time-repeated factor for FPC ($p < 0.001$) was obtained, so comparisons should be made with caution. Nevertheless the observed power (higher than 80%) shows that the observed effects are not due to chance.

For DPPH, comparisons also should be made with caution. In this assumption, the statistical treatment suggests significantly higher values in commercial juice only for (t_1), and a significantly different behaviour of the 2 juices over time.

Regarding the FRAP parameter, the lack of interaction between the factors included in the model legitimates the comparison between juices and between moments of evaluation, independently. In this case differences between juices were observed, with higher FRAP values for commercial juice ($p < 0.001$).

Conclusion: The parameters analysed for commercial and manufactured juices, revealed differences for the 3 moments studied and suggested advantage in the studied antioxidant properties for the commercial green juice.

Keywords: Green Juice, Vegetables, Antioxidants, Total Phenols, FRAP, DPPH.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJECTIVOS	31
2.1. Objectivo geral do estudo	31
2.2. Objectivos específicos do estudo	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Reagentes e equipamentos	33
3.2. Sumos Verdes	35
3.2.1. Sumo Verde Comercial	35
3.2.2. Preparação do Sumo Verde Manufaturado	36
3.3. Preparação dos extratos	37
3.4. Quantificação de Fenóis Totais.....	37
3.5. Quantificação da Capacidade Antioxidante.....	38
3.5.1. Método FRAP	38
3.5.2. Método DPPH	38
3.6. Tratamento dos dados	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. Quantificação de fenóis totais.....	41
4.1.1. Análise descritiva	41
4.1.2. Análise Estatística	43

4.2. Atividade Antioxidante – Teste FRAP	45
4.2.1. Análise descritiva	45
4.2.2. Análise Estatística	47
4.3. Atividade Antioxidante – Teste DPPH.....	48
4.3.1. Análise descritiva	48
4.3.2. Análise Estatística	49
4.4. Limitações e melhorias do trabalho	53
5. CONCLUSÃO.....	55
6. Bibliografia.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma de trabalho laboratorial: foram analisados 7 sumos comerciais e 7 sumos manufacturados, em triplicado para os 3 testes (FT, FRAP e DPPH) em 3 momentos diferentes (T_0 , T_1 e T_2).....	34
Figura 2 – Reta de calibração de Ácido Gálico para determinação do teor em fenóis totais presentes nas amostras dos sumos estudados.	41
Figura 3 – Conteúdo médio de Fenóis Totais (FT) das 7 amostras de cada sumo, nos 3 tempos T_0 , T_1 , T_2	42
Figura 4 – Comparação das médias marginais estimadas em função do tempo para o teste FT.....	44
Figura 5 – Reta de calibração de Trolox para determinação da atividade antioxidante através do teste FRAP das amostras dos sumos estudados	45
Figura 6 – Atividade antioxidante média resultante do teste FRAP das 7 amostras de cada sumo, nos 3 tempos T_0 , T_1 , T_2	46
Figura 7 – Comparação das médias marginais estimadas em função do tempo para o teste FRAP.....	47
Figura 8 – Reta de calibração de Trolox para determinação da atividade antioxidante através do teste DPPH das amostras dos sumos estudados.....	48
Figura 9 – Atividade antioxidante média resultante do teste DPPH das 7 amostras de cada sumo, nos 3 tempos T_0 , T_1 , T_2	49
Figura 10 – Comparação das médias marginais estimadas em função do tempo para o teste DPPH.	50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Dados das propriedades antioxidantes de diferentes alimentos sujeitos a diferentes condições de processamento e armazenamento.	22
Tabela 2 – Ensaio clínico e experimentais que estudaram o efeito de sumos verdes em vários parâmetros clínicos.....	26
Tabela 3 – Resumos de métodos mais utilizados por medição de absorvância para aferição da atividade antioxidante adaptado de (Gupta, 2015).	33
Tabela 4 – Lista de ingredientes tal como encontrado no rótulo do sumo comercial. ...	36
Tabela 5 – Teor médio em Fenóis Totais (FT) das amostras de sumo comercial e de sumo manufaturado, expresso em valores médios e erro padrão da média (SEM). 41	
Tabela 6 – Valores médios do teste FRAP das amostras de sumo comercial e de sumo manufaturado, expresso em valores médios e erro padrão da média (SEM).	45
Tabela 7 – Valores médios do teste DPPH das amostras de sumo comercial e de sumo manufaturado, expresso em valores médios e erro padrão da média (SEM).	48

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – ácido ascórbico

ABTS – ácido 2,2-azino-bis(3etilbenzotiazoline-6-sulfónico)

ACW – *water soluble antioxidant capacity*

AG – ácido gálico

C_i – amostra de sumo comercial

CA – capacidade antioxidante

CUPRAC – *cupric reducing antioxidant capacity*

DPPH – radical livre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

FRAP – *ferric reducing antioxidant power*

FT – fenóis totais

Flav. – flavonóides

HPP – método de processamento de sumos por alta pressão

LDL's – *Low-density lipoprotein* ou lipoproteínas de baixa densidade

M_i – amostra de sumo manufaturado

NBT- *nitroblue tetrazolium reducing capacity*

OMS – organização mundial de saúde

ORAC – capacidade de absorção do radical oxigénio

SEM – *standard error* - erro padrão da média

T₀ – momento de medição dos testes aplicados no dia da extração

T₁ – momento de medição dos testes aplicados 24h após a extração

T₂ – momento de medição dos testes aplicados 72h após a extração

TE – equivalente *trolox*

TOSC – *total oxidant scavenging capacity*

Trolox – 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic ácido

WHO – *world health organization*

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem havido uma crescente preocupação com a alimentação (Klein & Kiat, 2015) suportada, em parte, pela sensibilização para comportamentos saudáveis e pelas recomendações da organização mundial de saúde que aconselham o aumento da ingestão de vegetais e produtos naturais em detrimento da carne e produtos processados (Lassale et al., 2016; Norat et al., 2015). Estas indicações tem despertado a população, para uma alteração dos hábitos alimentares bem como um maior interesse e procura de produtos naturais e vegetais (Kaur & Kapoor, 2001).

Neste contexto a dieta mediterrânica tem ganho relevância pois encontra-se associada a estilos de vida saudáveis onde se incluem alimentos frescos com elevado conteúdo em antioxidantes (Bonaccio et al., 2013). O crescente protagonismo desta dieta, conjugado com a globalização, tem conduzido a uma maior diversidade de alimentos frescos assistindo-se atualmente à introdução de “novos” alimentos nos hábitos alimentares da população, nomeadamente das categorias de vegetais e fruta (Katalinic, Milos, Kulisic, & Jukic, 2006). A introdução destes alimentos é fundamentada pela atribuição de propriedades antioxidantes e a associação a efeitos benéficos para a saúde como a redução do risco de doenças crónicas (Borges, Mullen, & Crozier, 2010), a diminuição do risco de doenças degenerativas e certos tipos de cancro (Tian et al., 2016), redução de estados inflamatórios (Prior, 2005) e de doença coronária (Kafatos, Verhagen, Moschandreas, Apostolaki, & Westerop, 2016), e à prevenção de diversas patologias como o cancro do pulmão (Packer, Hiramatsu, & Yoshikawa, 1999), doenças cardiovasculares (Oliveira et al., 2009) e doenças neurodegenerativas (Knekt, 1999; Traber, Serbinova, & Packer, 1999).

A lista de antioxidantes conhecidos pelos seus efeitos protetores incorporados na dieta alimentar sob a forma de frutas e vegetais é bastante vasta. No entanto, podem ser sistematizados em três grupos: vitaminas (vitamina E, e o seu maior constituinte o alfa-tocopherol, e a vitamina C), fenóis e carotenóides (Halliwell, 1996). Os seus locais de atuação distinguem-se pela sua diferente solubilidade em meios aquosos ou orgânicos, assim o ácido ascórbico e os compostos fenólicos são conhecidos como antioxidantes hidrofílicos atuando essencialmente no compartimento celular, enquanto os carotenóides são conhecidos como antioxidantes lipofílicos atuando essencialmente a

nível membranar (Halliwell, 1996; Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, & Hawkins Byrne, 2006).

O interesse no conteúdo em compostos antioxidantes e nas suas propriedades antioxidantes dos alimentos tem vindo a aumentar e diversos testes *in vitro* têm sido desenvolvidos com esse objectivo. O teste mais comum para caracterização do conteúdo baseia-se numa avaliação dos fenóis totais (FT) da amostra através do teste de Folin-Ciocalteu onde este reagente é reduzido pelos compostos fenólicos passando a exibir uma cor azul (Lallianrawna, Muthukumar, Ralte, Gurusubramanian, & Kumar, 2013).

Quanto à caracterização das propriedades antioxidantes, presentemente, não existe ainda um método abrangente e de referência pelo que se recomenda que esta avaliação seja feita com diferentes métodos e condições oxidativas (Pisoschi & Negulescu, 2012). Atualmente existe uma grande diversidade de testes, sendo os mais usuais o teste ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico), o teste DPPH (radical livre 2,2-difenil-1-picrihidrazil), o teste FRAP ("*Ferric Reducing Antioxidant Power*") e o teste ORAC ("*Oxygen Radical Absorption Capacity*"), que têm revelado elevada reprodutibilidade e correlação entre si (Monica H Carlsen et al., 2010; Katalinic et al., 2006; Thaipong et al., 2006).

De acordo com o seu mecanismo de ação, os testes podem ser classificados em 2 grupos: métodos baseados na transferência de protão (TP) e métodos baseados na transferência de electrão (TE) (Zulueta, Esteve, & Frígola, 2009).

Dentro dos testes TE destacam-se o ABTS (quantifica a redução do catião radicalar $ABTS^{•+}$ na presença de antioxidantes), FRAP (quantifica a redução do complexo férrico na presença de antioxidantes) (Pisoschi & Negulescu, 2012).

Dentro dos testes TP destacam-se o DPPH, que é um radical livre estável aceitador de protão e que quantifica a capacidade de uma substância antioxidante sequestrar radicais livres (Kedare & Singh, 2011).

Apesar de estes testes serem considerados adequados para a determinação da atividade antioxidante em vários produtos alimentares, e em particular em extratos de plantas, Tirzitis e col., defendem que deverá distinguir-se a diferença entre atividade antirradical e antioxidante pois estas podem corresponder a diferentes processos (Tirzitis & Bartosz,

2010). A atividade antirradical caracteriza-se pela capacidade de reagir com radicais livres (uma única reação) enquanto que a atividade antioxidante corresponde à capacidade de inibir um processo de oxidação (a qual pode corresponder a uma cascata de reações, como no caso dos lípidos). Assim todos os testes que baseados num radical livre estável dão informação sobre atividade antirradicalar, a qual pode não corresponder a uma atividade antioxidante. Segundo os mesmos autores para se obter informação sobre a atividade antioxidante de lípidos ou de estabilização dos alimentos é necessário efetuar estudos no nos alimentos originais (Tirzitis & Bartosz, 2010).

Apesar da controvérsia o conteúdo em compostos antioxidantes e respectivas atividades antioxidantes, nos diversos alimentos, têm sido exaustivamente estudados nos últimos anos, destacando-se na tabela 1, os resultados da análise química de alguns dos sumos, chás, frutas e vegetais presentes nos hábitos alimentares atuais.

Na tabela 1 destaca-se o rico conteúdo e capacidade antioxidante dos sumos à base de legumes verdes o que suporta a recomendação de muitos profissionais de saúde para a ingestão de sumos “verdes” (Kaur & Kapoor, 2001) pois constituem uma forma conveniente de atingir as recomendações diárias de consumo de vegetais e fruta > 5 peças por dia (Nantz, Rowe, Nieves Carmelo, & Percival, 2006).

Tabela 1 – Dados das propriedades antioxidantes de diferentes alimentos sujeitos a diferentes condições de processamento e armazenamento.

	Referência/Ano	Vegetais/Fruta	Processamento	Temperatura armazenamento/ Tempo	Resultados	Conclusões
Alimentos /suplementos	M H Carlsen, Halvorsen, Willett, & Phillips, 2010	3100 alimentos, bebidas, especiarias e suplementos	Picados, preparados em liquido ou desidratados e transformados em pó.	4°C/3 dias ou -20°C / 4 semanas	FRAP ¹ mmol TE/100g Aipo – 0,810 Espinafres – 0,89 Gengibre – 3,93 Limão – 1,02 Pepino – 0,04 Mix Maçãs – 0,31	As especiarias, ervas e suplementos são as categorias que incluem os alimentos mais ricos em antioxidantes. As plantas introduzem significativamente mais antioxidantes na dieta alimentar que qualquer outra categoria.
	Nekvapil et al., 2012	Chá verde, preto e branco	Bebidas comerciais	4°C e 22°C / 0, 4 e 7 dias	ACW ² – quantidade AA 9,793 mmol/L	Decréscimo da atividade antioxidante ao longo do tempo, com dependência significativa (P>0,05) entre o tempo de armazenamento e a temperatura.
Fruta	Bernardo et al., 2015	Chá de canela <i>C. Burmannii</i>	6g canela/100mL	22°C/0	FT ³ – 2286,3 mg/L AG FRAP ¹ – 11853,4 µmol Trolox/L	A canela tem efeitos hipoglicemiantes e é bastante rica em antioxidantes.
	Piga, Del Caro, Pinna, & Agabbio, 2003	Figo do cato <i>opuctia ficus</i>	Fruta descascada e embalada	4°C/ 3, 6 e 9 dias	AA_i ⁴ – 1,82 mg/g <i>dry mass</i> AA_r ⁴ – 1.85 mg/g <i>dry mass</i> DPPH_i ⁵ – 2,26 TE/g <i>dry mass</i> DPPH_r ⁵ – 2,30 TE/g <i>dry mass</i>	Fenóis totais decresceram significativamente passados 6 dias. Ácido ascórbico é a principal fonte de antioxidantes.
	Del Caro, Piga, Vacca, & Agabbio, 2004	Toranja <i>red blush</i> , Mandarina <i>palazzelli</i> , tangelo? <i>Minneola</i> e laranjas <i>salustiana</i> e <i>shamouti</i>	Sumos preparados com máquina de sumos cítricos	4°C / até 12 ou 15 dias	AA ⁴ _{orange} – 5,1 _i – 5,02 _f mg/g <i>dry mass</i> Flav ⁶ _{orange} – 1,54 _i – 3,12 _f mg/g <i>dry mass</i>	A capacidade antioxidante estava claramente mais correlacionada com r=0.97 e r=0.89 o ácido ascórbico do que com a presença de flavonoides.
	Alvarez, Pastoriza, Alonso-Olalla, Delgado-Andrade, 2014	34 Sumos cítricos 23 de Laranja, 5 de toranja, 4 de mandarinas e 2 de limão.	Bebidas comerciais e sumos preparados com máquina de sumos cítricos	4°C e 22°C / 3 dias ou -50°C	FT ² – 372 e 224 mgGA/L ABTS ⁵ – 2,31 e 9,11 mmol TE/L FRAP ⁴ – 8,6 e 32,3 mmol TE/L	Atividade antioxidante presente em sumo de laranja manual é superior ao comercial. Os sumos representam 12% do total de antioxidantes ingeridos na dieta espanhola.

¹ FRAP – Ferric reducing antioxidant power, ²ACW– water soluble antioxidant capacity, ³FT – Fenóis totais, ⁴AA – ácido ascórbico, ⁵DPPH – radical livre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, ⁶Flav.– Flavonoides, ⁷TOSC – total oxidant scavenging capacity.

Tabela 1 (cont.) – Dados das propriedades antioxidantes de diferentes alimentos sujeitos a diferentes condições de processamento e armazenamento.

	Referência/Ano	Vegetais/Fruta	Processamento	Temperatura armazenamento/ Tempo	Resultados	Conclusões
Fruta	Klimczak, Małecka, Szlachta, & Gliszczyńska-Świątło, 2007	Sumos de laranja	Bebidas comerciais	18, 28 e 38°C/ 6 meses	AA ¹ – 409, 337, 266 mg/L FT ² – 684, 619, 582 mg/L DPPH ³ – 49, 53, 43 % FRAP ⁴ – 7,5; 6,5; 5,5 mM	A Vitamina C foi a mais afectada durante o armazenamento, com o maior decréscimo. O decréscimo de quantidade de FT e AA refletiram-se na diminuição da CA. Flavonoides apresentam elevada estabilidade.
	Thaipong et al., 2006	Goiaba (<i>Psidium guajava L.</i>)	Fruta congelada e picada.	-20°C / 0	FT ² – 36,3 mg EAG/100g <i>fresh mass</i> . ABTS ⁵ – 31,11 mM TE/g <i>fresh mass</i> DPPH ³ – 25,2 μM TE/g <i>fresh mass</i> FRAP ⁴ – 26,1 μM TE/g <i>fresh mass</i> ORAC ⁶ – 21,3 mM TE/g	Os testes ABTS, DPPH, FRAP e ORAC com resultados comparáveis com forte correlação com conteúdo de AA 0,61 <r<0,92
Vegetais	Biologica et al., 2003	Bróculos, rama da beterraba, cebola, aipo, cenouras, espinafres.	Picados, desidratados e transformados em pó.	-20°C/3 dias	FT ² _{espinafres} – 107 _F 72 _C mgGA/L FT ² _{aipo} – 13 _F 15 _C mgGA/L ORAC ⁶ _{espinafres} – 735 _F 420 _C mmol TE/L ORAC ⁶ _{aipo} – 180 _F 100 _C mmol TE/L	Mesmo quando congelados depois de serem "selados" os vegetais conservam um valor inferior de CA do que nos vegetais apenas conservados a 4°C.
	Kim, 2015	<i>Angelica utilis makino</i> e couve tipo Kale (<i>Brassica oleraceae L. var. Acephala</i>)	Picados, adicionada água e filtrado.	4°C / 0, 1,2,4,7,14,21,28 dias	FT ² – 218.49 _i 187.29 _f , μg/mL ABTS ⁵ – 38.51 _i 42.18 _f , % DPPH ³ – 84.83 _i 15.36 _f %	Decréscimo da atividade antioxidante ao longo do tempo a partir do 4º dia.

¹AA – ácido ascórbico, ²FT – Fenóis totais, ³DPPH - radical livre 2,2-difenyl-1-picrylhydrazyl, ⁴FRAP - Ferric reducing antioxidant power, ⁵ABTS - 2,2- azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid), ⁶ORAC – Capacidade de absorção do radical oxigénio, ⁷TOSC - total oxidant scavenging capacity.

Tabela 1 (cont.) – Dados das propriedades antioxidantes de diferentes alimentos sujeitos a diferentes condições de processamento e armazenamento.

Referência/Ano	Vegetais/Fruta	Processamento	Temperatura armazenamento /Tempo	Resultados	Conclusões
Tiwari et al., 2011	<i>Luffa acutângula</i> , <i>Lagenaria siceraria</i> , <i>Cucumis melo var. utilissimus</i> , <i>Solanum melongena L</i> , <i>Benincasa hispida</i> , <i>Cucurbita maxima</i> , <i>Trichosanthes cucumerina</i> e <i>Sechium edule</i> .	Bebidas comerciais e preparadas com liquidificadora.	22°C temperatura ambiente / 0	FT ¹ – 0,31, mg GAE/mL ABTS ² – 6,71 µM TE/mL DPPH ³ – 33,67 µM AAE/mL Flavonoides – 0,03 mg rutina/mL NBT ⁵ – 14,06 µM AAE/mL	Todos os sumos se mostraram mais potentes que os valores de referencia dos testes realizados. Os valores apresentados correspondem ao pepino.
Wootton-Beard & Ryan, 2012	Beterraba, tomate, cenoura, maçã e misturas de vegetais	Bebidas comerciais	4°C / 0 a 7 dias	FT ¹ – 840, 826, 627 µgFAE/mL ABTS ² – 2,4 1,1 1,1 mM TE DPPH ³ – 0,9 0,9 0,9 mM TE FRAP ⁴ – 0,2 0,2 0,2 mM TE CUPRAC ⁶ – 0,59 0,44 0,46 mM TE	O sumo de beterraba apresentou FT superior independentemente do teste. Há uma significância positiva entre os resultados dos testes 0,68<r<0,96; p<0,01.
Kim, 2012	<i>Angelica utilis makino</i> e couve tipo Kale (<i>Brassica oleraceae L. var. Acephala</i>)	Picados, adicionada água e filtrado.	22°C temperatura ambiente / 0	FT ¹ – 423,14µg/mL ABTS ² – 66,09% DPPH ³ – 84,83%	Folhas com maior valor de FT do que restantes partes em ambas as plantas.
Wojdyło, Teleszko, & Oszmiański, 2014	<i>Cydonia oblonga Miller</i>	Picados, filtrado, aquecido.	4°C e 30°C / 6 meses	FT ¹ _i – 1878 mg/100mL FT ¹ _f – 1427 mg/100mL	Observou-se uma alteração significativa no conteúdo de FT e atividade antioxidante (diminuiu) após 6 meses.
Uddin et al., 2015	<i>Vanda Roxburghii Rbn root</i>	Picados, desidratados e transformados em pó. Extração de 7 dias.	22°C temperatura ambiente / 0	Flavonoides – 112,1 CE/g DPPH ³ – 24,86 µg/mL FRAP ⁴ – 0,333 100µg/mL	Tem propriedades antioxidantes que suportam a utilização em tratamento de Alzheimer's.
Guldiken et al., 2016	Beterraba fresca e em sumo	Picados, adicionada água e filtrado.	22°C temperatura ambiente / 0	FT ¹ – 255 mgAGE/100g DPPH ³ – 137 mgTE/100g FRAP ⁴ – 190 mgTE/100g CUPRAC ⁶ – 3889 mgTE/100g	A beterraba fresca apresenta valores superiores em relação ao sumo de beterraba.

¹FT – Fenóis totais, ²ABTS - 2,2- azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid), ³DPPH - radical livre 2 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, ⁴FRAP - Ferric reducing antioxidant power, ⁵NBT- Nitroblue tetrazolium reducing capacity, ⁶CUPRAC – cupric reducing antioxidant capacity.

A crescente informação disponível sobre as propriedades benéficas de diversos alimentos e suplementos, tabela 1, conjugado com a procura de alternativas saudáveis facilmente adotadas na rotina diária, tem conduzido ao surgimento de novos produtos constituídos essencialmente por ingredientes vegetais. Apesar de não existir evidência clínica dos efeitos destes novos produtos (Klein & Kiat, 2015), estes são muitas vezes indicados por profissionais de saúde, com base nas propriedades estudadas para os seus ingredientes individuais, com o objetivo de enriquecer a alimentação com alimentos potencialmente benéficos e que habitualmente os indivíduos não incluem na sua dieta.

Para além desta informação, a recomendação de sumos de frutas e vegetais, onde se destacam os sumos verdes, é também suportada pelos resultados de alguns ensaios clínicos, onde se estuda o efeito de vegetais e frutas em alguns parâmetros sanguíneos, tabela 2, e que sugerem que os fitonutrientes de frutas e vegetais poderão ter um papel protetor em relação às espécies reativas de oxigénio. (Hollman & Katan, 1997; Özer, Taha, Stocker, & Azzi, 1999).

Tabela 2 – Ensaio clínico e experimentais que estudaram o efeito de sumos verdes em vários parâmetros clínicos.

Referência/ Ano	Amostra	Desenho	Tipo de vegetais fruta usados	Processamento	Resultados
Kiefer et al., 2004	Homens e Mulheres saudáveis (40 aos 60 anos) N=59	Estudo cross-over duplamente mascarado, controlado por placebo (7+7semanas)	Maçã, laranja, ananás, papaia, arandos, pêsego, cenoura, salsa, beterraba, bróculos, couve <i>kale</i> , couve, espinafres e tomate.	Cápsulas de pó concentrado de vegetais e de fruta.	Betacaroteno – 562 _i – 2476 _f µg/L Vit. C – 3,1 _i – 8,3 _f µ g/mL Vit. E – 14,8 _i – 19,6 _f µg/L Selénio – 93 _i – 95,5 _f e µg/L Folato – 8,7 _i – 15 _f µg/mL Observou-se um aumento efetivo nos níveis plasmáticos de antioxidantes.
Nantz, Rowe, Nieves Car melo, & Percival, 2006	Homens e Mulheres saudáveis (21 aos 53 anos) N=59	Ensaio clínico randomizado duplamente mascarado controlado por placebo (11 semanas)	Acerola, maçã, laranja, ananás, papaia, arandos, pêsego, cenoura, salsa, beterraba, bróculos, couve <i>kale</i> , couve, espinafres e tomate.	Cápsulas de pó concentrado de vegetais e fruta.	Betacaroteno – 55,8 _i - 56,9 _f nmol/L Vit. C – 54 _i - 49 _f µmol/L dano DNA – 2,61 _i – 1,62 _f % Status antioxidante – 1,55 _i – 2,33 _f % Observou-se um aumento efetivo nos níveis plasmáticos de antioxidantes e uma tendência para reduzir o número de sintomas e doenças.
Tiwari et al., 2011	Ratos <i>Wistar</i> (180 –220 g) G1 (N=6) G2 (N=6)	Ensaio clínico randomizado controlado por placebo	<i>Luffa acutângula</i> , <i>Lagenaria siceraria</i> , <i>Cucumis melo var. utilissimus</i> , <i>Solanum melongena L</i> , <i>Benincasa hispida</i> , <i>Cucurbita maxima</i> , <i>Trichosanthes cucumerina</i> e <i>Sechium edule</i> .	Bebidas comerciais e preparadas com liquidificadora.	Observou-se uma redução significativa nos valores da glicémica pós-prandial após a administração dos sumos em ratos.

Os sumos verdes têm ganho protagonismo podendo já ser encontrados disponíveis no mercado. Estes sumos são maioritariamente constituídos por vegetais de folha verde, especiarias ou ervas aromáticas e, por vezes, algumas frutas e podem ser normalmente consumidos ao pequeno-almoço. São considerados semelhantes a sopas, com a diferença de não terem sido cozinhados e de serem ingeridos, na maior parte dos casos, após a sua preparação, o que poderá ser uma vantagem do ponto de vista do conteúdo em antioxidantes (Vanhanen & Savage, 2015). Também estão disponíveis no mercado sumos verdes comerciais, com diferentes formas de preparação, o que suscita a preocupação com a manutenção da capacidade antioxidante dos sumos ao longo do tempo e com a busca do método de preparação mais adequado à conservação ou à não destruição da capacidade antioxidante por um período mais prolongado (Tiwari et al., 2014).

Esta oferta pré-confeccionada juntamente com a maior consciencialização e disponibilidade de informação relativa ao valor nutricional e segurança dos alimentos, tem conduzido o consumidor informado à preferência por alimentos naturais e ingredientes alimentares mais seguros e saudáveis em contraste com uma menor procura dos seus equivalentes sintéticos (Agrocluster Ribatejo, 2015; Kim, 2012), coloca ao consumidor perante uma escolha que poderá ser complexa.

O processamento dos sumos verdes é também alvo de controvérsia no que diz respeito à manutenção das propriedades antioxidantes. Tem-se sugerido que os diferentes processos e equipamentos usados para a execução dos sumos verdes poderão alterar estas propriedades. Assim, os processos mais utilizados atualmente são: *slow juicers*, método que por ser mais lento, não promove o aquecimento das hélices ao quebrar as fibras do sumo; máquinas de sumo que separam a polpa do sumo; misturadoras, centrifugadoras, pasteurização e o processamento por alta pressão HPP (*High Pressure Processing*). Sabe-se, à partida, que a pasteurização tem como consequência a perda de muitos nutrientes, e estudos indicam que HPP tem melhores resultados que o tratamento termal em níveis de ácido ascórbico, fenóis totais e atividade antioxidante total (Chen et al., 2015).

O HPP é uma nova tecnologia não termal, que tem sido analisada, pois tem a capacidade de destruir o microbiota indesejável e inativar enzimas, enquanto reduz os

efeitos adversos ao adicionar calor produzido sobre a qualidade dos alimentos. Foram conduzidos muitos estudos para avaliar os benefícios de HPP e tem-se mostrado efetivo em manter os níveis de compostos bioativos e a atividade antioxidante em alguns sumos de frutas e de vegetais (Del Socorro Cruz-Cansino et al., 2015; Keenan, Derek F., Gormley, Butler, & Brunton, 2012). Outros mostram que os efeitos do processamento na cor, sabor e textura devem ser analisados futuramente, pois dependem do HPP mas também do método de armazenamento utilizado (Barba, Esteve, & Frigola, 2012; Chen et al., 2015; Oey, Lille, Van Loey, & Hendrickx, 2008; Patras, Brunton, Da Pieve, & Butler, 2009; Sila et al., 2008).

No entanto a utilização de vegetais sem serem cozinhados pode conduzir a efeitos adversos já que não permite a redução de anti-nutrientes potencialmente tóxicos, tais como oxalatos, que podem ser encontrados em muitos tipos de plantas comestíveis em concentrações variáveis e, se consumidos em grandes quantidades, podem ser prejudiciais para a saúde humana (Ayogu, Nnam, & Mbah, 2015) ingestão de grandes quantidades de oxalatos pode aumentar o risco de pedras nos rins (Vanhanen & Savage, 2015) ou, tal como sugerido no estudo de Getting, estar associado a nefropatia após ingestão de sumos de espinafre durante seis semanas (Getting, Gregoire, Phul, & Kasten, 2013). Estes resultados estão na base da recomendação da utilização de vegetais de folha verde não muito ricos em oxalatos ou da sua cozedura prévia e individual, antes da preparação dos sumos.

Os efeitos mencionados estão na origem de investigação que permita elucidar, para além do efeito do processamento no conteúdo dos alimentos, o efeito e metabolização dos constituintes durante o processo de digestivo, determinando biodisponibilidade e sua ação durante todo o metabolismo (Guldiken et al., 2016).

Atualmente, tornou-se cada vez mais comum encontrar informações sobre propriedades antioxidantes nos rótulos dos novos produtos. A recente recomendação de sumos de vegetais verdes, por profissionais de saúde (Vanhanen & Savage, 2015) é parcialmente responsável pelo surgimento de novas marcas de sumos verdes, que afirmam ter uma grande biodisponibilidade de antioxidantes (de Boer, Vos, & Bast, 2014; Gilsenan, 2011). O uso de sumos verdes permite a ingestão de vegetais crus e não apenas a ingestão de fruta, que é a sua vantagem sobre os outros sumos de fruta conhecidos (Chen et al., 2015), pois a carga em frutose é inferior no caso dos sumos de vegetais,

forma esta que é conhecida por ter maior biodisponibilidade de antioxidantes (Chen et al., 2015). No entanto, a informação qualitativa e quantitativa sobre antioxidantes presentes nos sumos é frequentemente insuficiente.

Por outro lado a estabilidade destes compostos é reduzida (Wojdyło et al., 2014) o que conduz a alterações do conteúdo antioxidante destes sumos. Assim o consumidor em geral deverá também ter acesso a essa informação já que o conteúdo antioxidante varia com fatores como o tempo de exposição ao ar e alterações de temperaturas (Nekvapil et al., 2012). Torna-se assim pertinente caracterizar, para além das propriedades antioxidantes dos diferentes sumos sujeitos a diferentes processamentos, a sua variação em função do processamento e do tempo de armazenamento.

Neste contexto, o presente trabalho, pretendeu analisar, não só a atividade antioxidante dos sumos verdes ao longo do tempo, como também fazer uma comparação entre os sumos manufaturados e os industrializados.

Este trabalho visa, assim, responder à seguinte questão de investigação: Existe diferença entre a atividade antioxidante de sumos verdes comerciais e os seus equivalentes manufaturados ao longo do tempo?

Caracterização da atividade antioxidante de sumos verdes comerciais e os seus equivalentes manufacturados, ao longo do tempo.

2. OBJECTIVOS

2.1. Objectivo geral do estudo

Comparar o teor em fenóis totais (FT) e a atividade antioxidante (teste FRAP e teste DPPH) entre um sumo verde comercial e o seu equivalente manufacturado, ao longo do tempo nos momentos: inicial (T₀); após 24h (T₁) e após 72h (T₂).

2.2. Objectivos específicos do estudo

- 2.2.1. Comparação dos 2 sumos no que respeita aos valores de FT, FRAP e DPPH.
- 2.2.2. Comparação dos valores obtidos dos sumos imediatamente após execução manufacturado/abertura do pacote (T₀), após armazenamento de 24h (T₁) a 4°C e após armazenamento de 72h (T₂) a 4°C dos parâmetros FT, FRAP e DPPH.

Caracterização da atividade antioxidante de sumos verdes comerciais e os seus equivalentes manufacturados, ao longo do tempo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisados 7 sumos comerciais (de uma marca do mercado) e 7 sumos manufacturados (executados com a receita fornecida pela marca), Figura 1. Cada teste foi realizado em triplicado em cada amostra de sumo comercial e de sumo manufacturado. Foi realizada a caracterização laboratorial dos sumos verdes com objectivo de se quantificar o teor em Fenóis Totais (Rama Prabha & Vasantha, 2011) e a atividade antioxidante pelos métodos de sequestro do radical (teste DPPH) e de transferência de electrão (teste FRAP), ambos adaptados de Thaipong (Thaipong et al., 2006). Na tabela 3 encontra-se identificado o radical livre interveniente na reacção analisada em cada um dos testes, respectivos comprimentos de onda de leitura e pH.

Tabela 3 – Resumos de métodos mais utilizados por medição de absorvância para aferição da atividade antioxidante adaptado de (Gupta, 2015).

TESTE	RADICAL/CROMÓFORO	C.D.O. (nm)	pH
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazil	515 nm	7.0-7.4
FRAP	Iões de Fe ³⁺ quelado	595 nm	3.6
FT	Mo ⁶⁺ (amarelo) → Mo ⁵⁺ (azul)	765 nm	10

Nas análises ao longo do tempo, as amostras após 24h (t₁) e 72h (t₂), foram armazenados à temperatura de 4°C no dia da extração (t₀), dado que de acordo com Nekvapil a capacidade antioxidante diminuí significativamente durante o armazenamento sem refrigeração (temperatura ambiente) (Nekvapil et al., 2012).

3.1. Reagentes e equipamentos

3.1.1. Reagentes e Soluções

O reagente de *folin-ciocalteu* (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácidosulfónico) foi adquirido à *Applichem Pancreac ITW Companies*. Os reagentes TPTZ 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina C₁₈H₁₂N₆, Cloreto de Ferro (III) hexahidratado (FeCl₃.6H₂O), Metanol (CH₃OH), Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) e

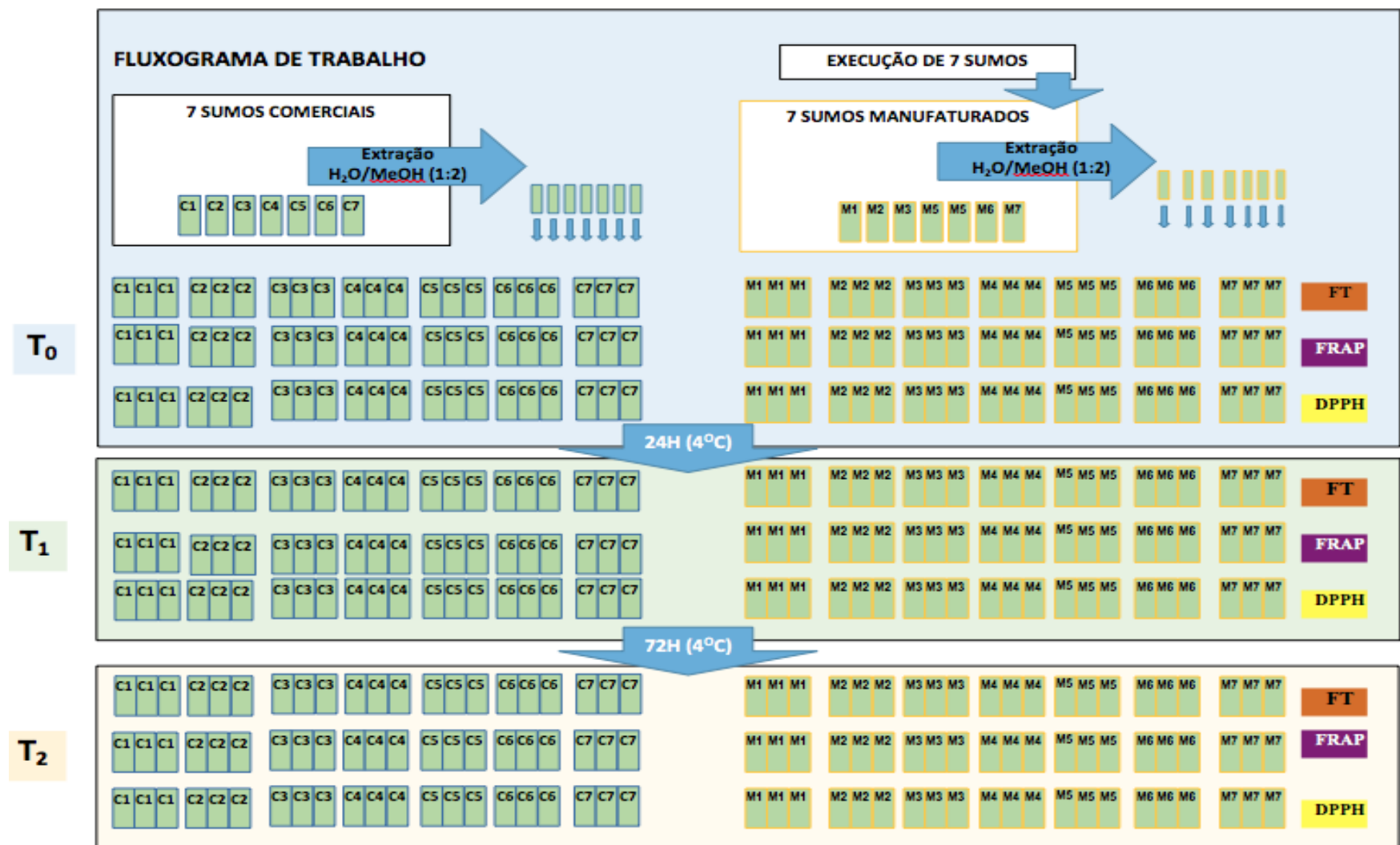


Figura 1 – Fluxograma de trabalho laboratorial: foram analisados 7 sumos comerciais e 7 sumos manufacturados, em triplicado para os 3 testes (FT, FRAP e DPPH) em 3 momentos diferentes (T_0 , T_1 e T_2).

DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl) foram adquiridos à *Sigma-Aldrich*. O ácido gálico-1-hidratado ($C_6H_2(OH)_3COOH.H_2O$) foi adquirido à *PA-ACS-Pancreac Química S.A.* A solução aquosa de carbonato de cálcio (Na_2CO_3) foi adquirida à *ICS Science Group*.

Foram efetuadas as soluções de tampão acetato 300mM pH=3,6 ($NaCH_3COO.3H_2O$ e CH_3COOH) e de ácido clorídrico 40mM HCl 37% adquiridos à *AnalaR Normapur*.

3.1.2. Equipamentos

Foram utilizados:

- Agitador magnético *Agimatic-N P selecta 50Hz*;
- Válvula de filtragem *Heldolph Instruments D91126 Schwaback PUOTAVAC VALV*;
- Banho-maria *Memmert. Vortex VELP Scientifica 20 Htz*;
- Espectrofotómetro UV-visível *Perkin-Elmer Lambda 25*;
- Balanças analíticas *Sartorius CPA 225D ($\pm 0,000001g$)* e *Sartorius Cubis ($\pm 0,0001g$)*.

Para a realização do sumo manufacturado foi utilizado um espremedor de vegetais e frutas *slow juicer SANA Juicer OMEGA EUJ-707*.

3.2. Sumos Verdes

3.2.1. Sumo Verde Comercial

Os sumos comerciais foram recolhidos numa loja da marca selecionada, em Lisboa, no dia da extração. Cada amostra foi feita a partir de um frasco de 250 ml, tendo sido usados 7 frascos diferentes (mas do mesmo lote). Este sumo é processado através do método de processamento de sumos por alta pressão (HPP), que permite um período de armazenamento mais longo, sem acrescentar quaisquer conservantes. Segundo Patras, o

HPP, a temperaturas moderadas, é apropriado para produzir sumos e purés de fruta fresca (Patras et al 2008).

A lista de ingredientes, tal como comunicado no rótulo comercial, e como tal não sujeita a sigilo, encontra-se na tabela 4.

Tabela 4 – Lista de ingredientes tal como encontrado no rótulo do sumo comercial.

Ingredientes	Percentagem
Maçã	43%
Pepino	29%
Aipo	11%
Infusão de gengibre (Água, gengibre 0,3%)	8%
Espinafres	5%
Limão	4%
Ácido ascórbico	n.a.

3.2.2. Preparação do Sumo Verde Manufacturado

Os sumos manufacturados equivalentes ao sumo comercial foram reproduzidos com a máquina de sumos *slow juicer*, procedimento que permite a extração de sumo dos alimentos, sem aquecimento e conseqüente destruição dos nutrientes. Este método foi escolhido de modo a reproduzir o que poderia ter sido utilizado para preparar sumos caseiros, usando um espremedor onde não só a fração de celulose é descartada no processo como os legumes e frutas não sofrem de aquecimento como o que acontece em processos mais habituais como liquidificadoras ou varinhas mágicas (Vanhanen & Savage, 2015).

Os legumes e frutas foram comprados num mercado biológico local em Lisboa, no dia da extração. Os ingredientes foram lavados, preparados e pesados, com uma balança analítica Sartorius Cubis ($\pm 0,0001g$) à temperatura ambiente. Cada ingrediente foi espremido separadamente pela *slow juicer* para um *gobelet* de 500mL e, em seguida, misturados de acordo com a receita confidencial fornecida pelo fabricante num *gobelet*

de 1000mL. O sumo manufacturado foi colocado no frigorífico a 4°C até à preparação do extracto protegido por película durante 60 minutos.

3.3. Preparação dos extratos

Para a análise química, os sumos foram sujeitos a tratamento prévio de forma a poderem ser obtidas amostras homogéneas e sem precipitados. Os extratos para o ensaio de compostos fenólicos, ensaio de DPPH e de FRAP foram obtidos através de uma extração dupla por homogeneização de 10 mL de sumo (de cada uma das amostras) e 20 mL de metanol com agitação durante 30 minutos. Em seguida, cada mistura foi filtrada individualmente a pressão reduzida utilizando papel de filtro S 150mm da *Filtres RS* e da bomba de válvula *Heldolph Instruments*. Os homogeneizados apresentam uma proporção (1:2) água:metanol e foram armazenados no frigorífico a 4°C.

3.4. Quantificação de Fenóis Totais

O conteúdo em FT nos extratos foi determinado por adaptação do método de Prabha e Vasantha (Rama Prabha & Vasantha, 2011). Os fenóis sofrem uma reação complexa com o ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico do reagente *folin ciocalteau* em meio alcalino resultando um complexo azul de molibdénio-tungsténio.

As amostras foram analisadas em triplicado e diluídas em solvente metanol:água com a proporção (2:1). Pipetaram-se, para tubos de ensaio rolhados, 50µL de amostra em metanol:água (2:1) ao qual se adicionou 200µL de solvente, 2,5mL da solução reagente de Folin-Ciocalteu (1:10 diluído com água) e 2mL da solução aquosa Na₂CO₃ 1M. O branco foi realizado substituindo a amostra pelo solvente. Agitaram-se os tubos de ensaio no *Vortex* e aguardaram-se 15 minutos, após os quais se leu a absorvância a 765nm.

Com o mesmo procedimento foi realizada uma curva padrão usando o ácido gálico com concentrações conhecidas e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/L.

3.5. Quantificação da Capacidade Antioxidante

3.5.1. Método FRAP

A quantificação da capacidade antioxidante pelo método FRAP foi adaptado de Thaipong e col. baseando-se na capacidade dos compostos antioxidantes de reduzirem em meio ácido o Fe^{3+} em Fe^{2+} na presença de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) formando um intenso complexo azul Fe^{2+} (TPTZ) (Thaipong et al., 2006).

Foi preparada previamente uma solução para o FRAP, adicionando 25ml de tampão acetato 300 mM pH=3,6 a 2,5 ml de TPTZ 10 mM em HCL 40 mM e a 2,5mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM. Foi necessário aquecer esta solução a 37°C antes de ser usada. As amostras foram analisadas em triplicado e diluídas em solvente metanol:água com a proporção (2:1). Pipetaram-se para tubos de ensaio rolhados 15 μL da amostra e 135 μL de solvente aos quais se adicionaram 2850 μL da solução FRAP. Agitaram-se os tubos de ensaio no *Vortex*. Para que a reação ocorresse, os tubos foram conservados no escuro, durante 30 minutos. O branco foi realizado substituindo a amostra pelo solvente. Leu-se a absorvância a 593nm. Para a determinação da curva padrão foi utilizado o Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico) com concentrações conhecidas e os resultados expressos em $\mu\text{M TE/g}$ de massa fresca.

3.5.2. Método DPPH

A quantificação da capacidade antioxidante pelo método DPPH foi adaptado de Thaipong e col. e pode de ser determinada pelo sequestro do radical DPPH (Thaipong et al., 2006). A presença de antioxidantes causa a diminuição da sua absorvância a 517nm devido à neutralização deste radical pela captação de prótons e electrões cedidos pelo antioxidante.

Foi preparada anteriormente uma solução stock, adicionando 240mg de DPPH (2,2-difenil-1 picrilhidrazil) em 1000mL de metanol e conservada a -20°C até à sua utilização. A solução de DPPH utilizada foi obtida a partir de 100mL da solução stock e 450mL de metanol, obtendo uma absorvância de 1,1 a 515nm. As amostras foram analisadas em triplicado e diluídas em solvente metanol:água com a proporção (2:1).

Pipetaram-se para tubos de ensaio rolhados 15 μ L da amostra e 135 μ L de solvente aos quais se adicionaram 2850 μ L da solução DPPH. Agitaram-se os tubos de ensaio no *Vortex*. Para que a reação ocorresse, os tubos foram conservados no escuro, durante 24 horas. O branco foi realizado substituindo a amostra pelo solvente. Leu-se a absorvância a 515nm. Para a determinação da curva padrão foi utilizado o *Trolox* (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico) com concentrações de 25 μ M a 800 μ M e os resultados expressos em μ M TE/g de massa fresca.

3.6. Tratamento dos dados

Todos os dados obtidos das amostras de sumos analisados foram inseridos e organizados no software Microsoft Excel para Mac 2011 e posteriormente transferidos para o programa informático IBM SPSS (*Statistical Package do Social Sciences*) versão 20.0 para Mac.

Foi construída uma tabela onde constavam o código de identificação do sumo, FT t₀, FT t₁, FT t₂, FRAP t₀, FRAP t₁, FRAP t₂, DPPH t₀, DPPH t₁ e DPPH t₂.

3.6.1. Análise Descritiva

Procedeu-se à análise das variáveis de atributo quanto a medidas de tendência central, utilizando a Média, e medidas de precisão, como o erro padrão da média (SEM).

3.6.2. Análise Estatística

Aplicou-se a ANOVA de medições repetidas de tipo misto e avaliou-se a interação entre o fator independente e o fator de medições repetidas em cada um dos objectivos do estudo e para cada parâmetro analisado.

Caracterização da atividade antioxidante de sumos verdes comerciais e os seus equivalentes manufacturados, ao longo do tempo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Quantificação de fenóis totais

4.1.1. Análise descritiva

Para a quantificação do teor em fenóis totais (FT) foi determinada a reta de calibração a partir de soluções padrão de ácido gálico, Figura 2.

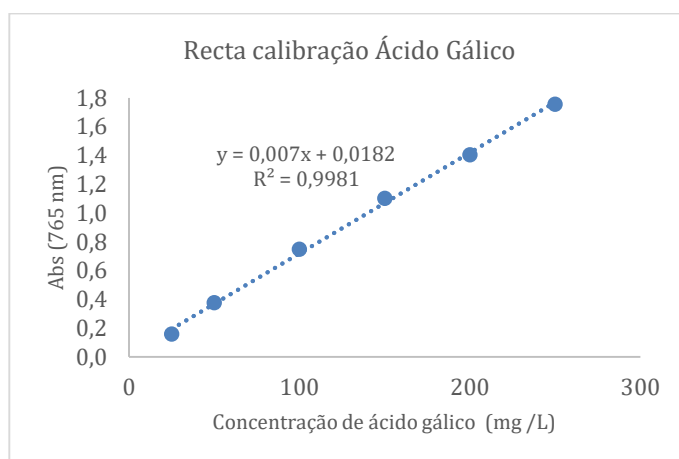


Figura 2 – Reta de calibração de Ácido Gálico para determinação do teor em fenóis totais presentes nas amostras dos sumos estudados.

Esta reta permitiu relacionar os valores das absorvâncias das amostras estudadas, com os valores de teor em fenóis totais, nos diferentes tempos de armazenamento, tabela 5.

Tabela 5 – Teor médio em Fenóis Totais (FT) das amostras de sumo comercial e de sumo manufacturado, expresso em valores médios e erro padrão da média (SEM).

Fenóis totais (equivalente ácido gálico mg /L) ± SEM (y=0,007x + 0,0182; R²=0,9981)							
Sumo verde comercial				Sumo verde manufacturado			
Amostra	T ₀	T ₁	T ₂	Amostra	T ₀	T ₁	T ₂
C ₁	297,2 ± 63,5	423,9 ± 47,9	342,5 ± 20,2	M ₁	152,7 ± 13,3	163,4 ± 16,5	221,5 ± 54,1
C ₂	268,9 ± 26,7	375,1 ± 10,3	371,8 ± 27,6	M ₂	181,0 ± 17,1	146,0 ± 2,7	184,9 ± 27,9
C ₃	298,2 ± 14,1	360,3 ± 36,9	425,3 ± 49,2	M ₃	182,5 ± 14,5	132,2 ± 2,2	208,4 ± 49,4
C ₄	318,2 ± 29,3	409,4 ± 18,6	452,7 ± 28,7	M ₄	182,7 ± 1,0	126,0 ± 1,2	204,6 ± 30,4
C ₅	300,1 ± 10,6	438,9 ± 6,3	405,1 ± 20,0	M ₅	156,5 ± 11,2	126,3 ± 2,5	124,9 ± 8,3
C ₆	337,7 ± 6,7	505,8 ± 119,8	343,1 ± 63,0	M ₆	192,0 ± 7,5	129,4 ± 5,3	221,3 ± 11,5
C ₇	339,0 ± 10,2	398,4 ± 63,0	447,5 ± 28,7	M ₇	164,4 ± 6,8	134,2 ± 0	251,0 ± 15,5
C _{médio}	308.47±9.5*	415.97±18.1*	398.29±17.6*	M _{médio}	173.11±5.7	136.79±5.1	202.37±15.0

* valores com diferença significativa

Globalmente podemos observar que o sumo manufacturado apresenta um teor mais baixo em fenóis totais do que o sumo comercial. Ao longo do tempo de armazenamento observa-se que para ambos os sumos, o teor em fenóis totais, aumenta quando se compara os valores finais T₂ com os valores iniciais T₀, tabela 5 e Figura 3.

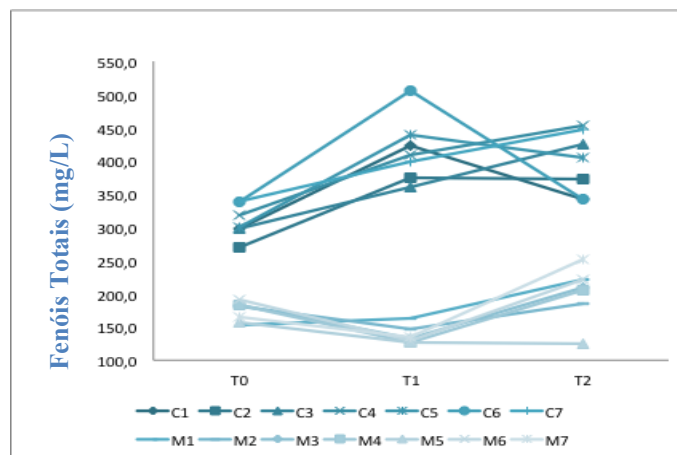


Figura 3 – Conteúdo médio de Fenóis Totais (FT) das 7 amostras de cada sumo, nos 3 tempos T₀, T₁, T₂.

Os resultados referentes ao conteúdo médio de FT obtidos para o sumo comercial estudado estão de acordo com os resultados encontrados em vários estudos. O sumo comercial apresenta um valor, no tempo T₀, de 0.308mg GAE/mL tal como o encontrado para o pepino (0.31 ± 0.01 mg GAE/mL) no estudo de Tiwari e col (Tiwari et al., 2011), e um valor de de 308 μ g/mL que se aproxima dos valores encontrados no trabalho de Kim e col., 423 μ g/mL e 218 μ g/mL para as folhas de couve *Shinseoncho* e de couve *Kale*, respectivamente (Kim, 2015). O sumo manufacturado apresenta globalmente valores inferiores aos da literatura.

Os resultados obtidos neste trabalho, referentes à variação do conteúdo médio de FT no sumo comercial ao longo do tempo, estão de acordo com os resultados encontrados no trabalho equivalente de Kim e col., onde também se verifica um aumento de Fenóis Totais após 2 dias de armazenamento (Kim, 2015). Os resultados referentes ao comportamento do conteúdo médio de FT no sumo manufacturado aparentam ser contraditórios, no entanto, esta situação também é descrita no mesmo estudo de Kim onde se observam flutuações do conteúdo de FT (Kim, 2015).

Este decréscimo é também observado por Wojdylo e col, para janelas temporais longas, que ao estudar sumos manufacturados de várias espécies de couve regista um decréscimo na quantidade de FT após 6 meses em congelação ($T_0=1878$ mg/100 mL e $T_1=1427$ mg/100 mL).

4.1.2. Análise Estatística

Os dados foram tratados estatisticamente com o objectivo de comparar:

- a) Os 2 sumos no que respeita aos valores de FT definindo “sumo” como fator independente: sumo: 0 – comercial; 1 – manufacturado;
- b) Os valores iniciais, intermédio e final de FT definindo “tempo” como fator de medições repetidas: 0 – inicial; 1 – intermédio; 2 – final.

Foi aplicada uma ANOVA de medições repetidas de tipo misto que revelou uma interação significativa entre o fator independente “sumo” e o fator de medições repetidas “tempo”, para FT ($p < 0.001$). No entanto, a potência observada foi superior a 80%, o que demonstra que os efeitos observados não se devem ao acaso.

Salienta-se, por outro lado, que a existência de interação no modelo de ANOVA de medições repetidas para FT domina o modelo analítico, pelo que as comparações entre sumos e entre momentos ignorando essa interação devem ser feitas com cautela.

Nestas condições, procedeu-se aos contrastes planeados na comparação desse parâmetro entre sumos, em cada um dos momentos definidos por “tempo”, e na comparação dos valores iniciais, intermédios e finais desse parâmetro para cada um dos sumos, gráfico da figura 4.

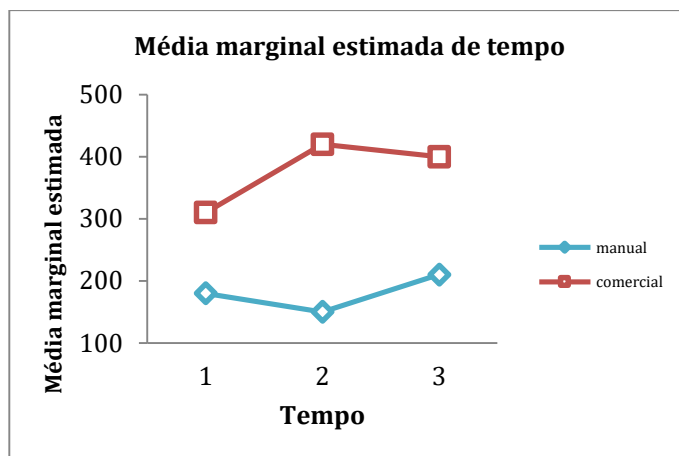


Figura 4 – Comparação das médias marginais estimadas em função do tempo para o teste FT.

Desta análise foram obtidos os seguintes resultados:

Os valores médios de FT são significativamente mais elevados no sumo comercial do que no manufacturado, com $p < 0.001$ nos 3 momentos (T0, T1 e T2).

No sumo comercial, os valores médios de FT aumentam significativamente de T0 para T1 ($p < 0.001$), diminuindo não significativamente de T1 para T2 ($p = 0.481$), mantendo-se no entanto mais elevados em T2 comparativamente a T0 ($p < 0.001$).

No sumo manufacturado, os valores médios de FT diminuem significativamente de T0 para T1 ($p = 0.014$), aumentando significativamente de T1 para T2 ($p = 0.019$), revelando um aumento sem significado estatístico de T2 comparativamente a T0 ($p = 0.097$).

O tratamento estatístico sugere, assim, valores significativamente mais elevados no sumo comercial do que no sumo manufacturado e também um comportamento significativamente diferente, no que respeita ao teor em fenóis totais, dos 2 sumos ao longo do tempo.

4.2. Atividade Antioxidante – Teste FRAP

4.2.1. Análise descritiva

Para a quantificação da capacidade antioxidante através do teste FRAP foi determinada a reta de calibração a partir de soluções padrão de Trolox, Figura 5.

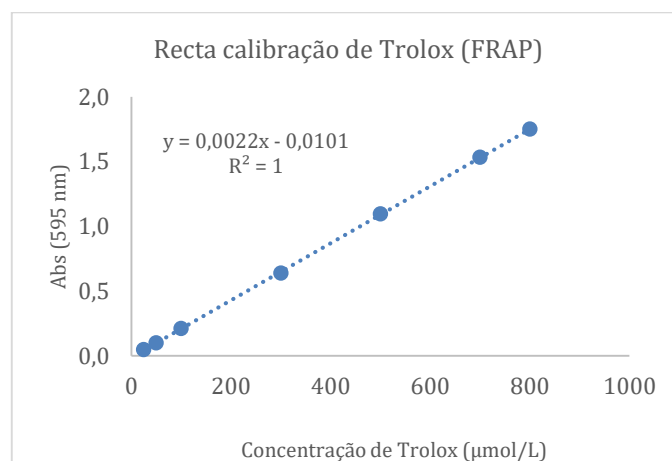


Figura 5 – Reta de calibração de Trolox para determinação da atividade antioxidante através do teste FRAP das amostras dos sumos estudados

Esta reta permitiu relacionar os valores das absorvâncias das amostras estudadas, com os valores equivalentes a Trolox, nos diferentes tempos de armazenamento, tabela 6.

Tabela 6 – Valores médios do teste FRAP das amostras de sumo comercial e de sumo manufacturado, expresso em valores médios e erro padrão da média (SEM).

FRAP (equivalente Trolox $\mu\text{mol/L}$) \pm SEM ($y = 0,0022x - 0,0101$; $R^2 = 1$)							
Sumo verde comercial				Sumo verde manufacturado			
Amostra	T ₀	T ₁	T ₂	Amostra	T ₀	T ₁	T ₂
C ₁	2,26 \pm 0,11	2,52 \pm 0,14	1,94 \pm 0,08	M ₁	1,19 \pm 0,35	0,58 \pm 0,01	1,18 \pm 0,06
C ₂	2,34 \pm 0,57	2,41 \pm 0,36	1,80 \pm 0,14	M ₂	1,04 \pm 0,28	0,70 \pm 0,06	1,13 \pm 0,04
C ₃	1,94 \pm 1,35	2,28 \pm 0,47	2,31 \pm 0,11	M ₃	1,10 \pm 0,31	0,75 \pm 0,10	1,06 \pm 0,03
C ₄	1,91 \pm 0,12	2,27 \pm 0,50	3,40 \pm 0,27	M ₄	1,08 \pm 0,18	1,23 \pm 0,28	1,15 \pm 0,06
C ₅	1,88 \pm 0,17	1,88 \pm 0,15	2,04 \pm 0,22	M ₅	1,19 \pm 0,22	0,63 \pm 0,10	1,05 \pm 0,02
C ₆	2,55 \pm 0,08	2,47 \pm 0,49	2,52 \pm 0,24	M ₆	0,87 \pm 0,04	0,59 \pm 0,06	1,11 \pm 0,01
C ₇	1,84 \pm 0,07	1,86 \pm 0,48	2,66 \pm 0,24	M ₇	1,06 \pm 0,09	1,00 \pm 0,10	1,29 \pm 0,10
C _{médio}	2.10 \pm 0.11*	2.24 \pm 0.10*	2.38 \pm 0.21*	M _{médio}	1.08 \pm 0.04	0.78 \pm 0.09	1.14 \pm 0.03

* valores com diferença significativa

Globalmente, podemos observar que o teste FRAP para o sumo manufacturado revela uma atividade antioxidante mais baixa do que o sumo comercial. Ao longo do tempo de armazenamento observa-se que para ambos os sumos, a atividade antioxidante não apresenta valores muito diferentes, Figura 6.

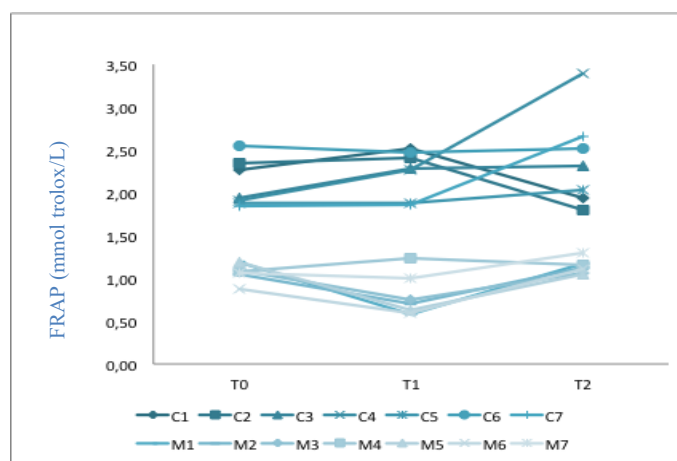


Figura 6 – Atividade antioxidante média resultante do teste FRAP das 7 amostras de cada sumo, nos 3 tempos T₀, T₁, T₂.

Os resultados relativos à atividade antioxidante avaliada pelo teste FRAP para o sumo comercial no T₀ (0,62 mmol TE/100g de sumo) estão de acordo com o encontrado no estudo equivalente de Carlsen e col. onde é reportado o valor de 0,31 mmol TE/100g para *mix* de maçãs semelhante ao sumo analisado no presente estudo e para os seus constituintes individuais os valores de 0,810 mmol TE/100g para aipo, 0,89 mmol TE/100g para espinafres, 3,93 mmol TE/100g para gengibre, 1,02 mmol TE/100g para limão e de 0,04 mmol TE/100g para pepino (Monica H Carlsen et al., 2010).

No entanto os valores de FRAP obtidos neste estudo (6,3 mM TE /g) são inferiores aos reportados para a goiaba 26,1 mM TE/g (Thaipong et al., 2006).

No presente estudo o tempo de armazenamento parece não ter tido influência nos valores médios de FRAP obtidos, ao contrário do observado para uma janela temporal mais longa nos trabalhos de Wojdylo e col. onde se reporta um decréscimo na atividade antioxidante passados 6 meses em congelação em sumos de várias espécies de couve

(T_0 - 1,00 mM Trolox/100 mL e $T_{6\text{meses}}$ - 0,75 mM Trolox/100 mL) (Wojdyło et al., 2014).

4.2.2. Análise Estatística

Os dados foram tratados estatisticamente com os mesmos objectivos de comparar:

- Os 2 sumos no que respeita aos valores de FRAP definindo “sumo” como fator independente: sumo: 0 – comercial; 1 – manufacturado;
- Os valores iniciais, intermédio e final de FRAP definindo “tempo” como fator de medições repetidas: 0 – inicial; 1 – intermédio; 2 – final.

No que se refere ao parâmetro FRAP, a inexistência de interação entre os fatores, incluídos no modelo legitima a comparação entre sumos e entre momentos de avaliação, de forma independente. Em todo o caso, apenas se registam diferenças significativas entre sumos, com valores de FRAP mais elevados no sumo comercial ($p < 0.001$), com uma potência observada superior a 80%, não se observando diferenças significativas entre os momentos estudados, Figura 7.

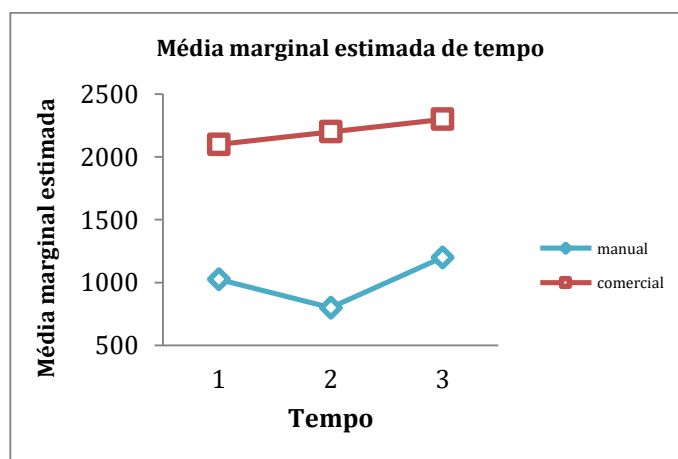


Figura 7 – Comparação das médias marginais estimadas em função do tempo para o teste FRAP.

O tratamento estatístico sugere assim valores significativamente mais elevados no sumo comercial do que no sumo manufacturado.

4.3. Atividade Antioxidante – Teste DPPH

4.3.1. Análise descritiva

Para a quantificação da atividade antioxidante através do teste DPPH foi determinada a reta de calibração a partir de soluções padrão de Trolox, Figura 8.

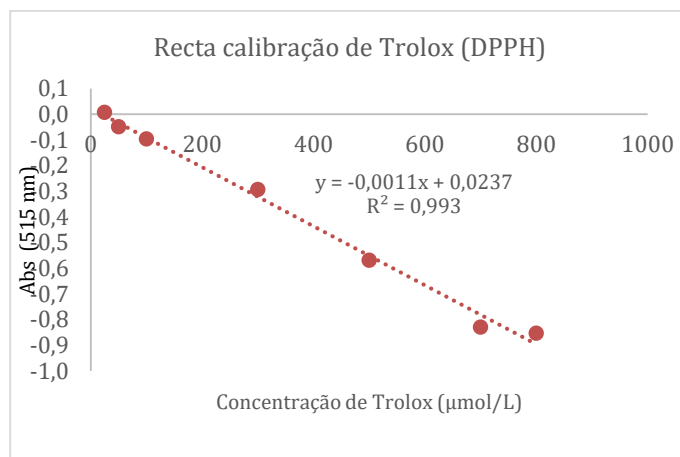


Figura 8 – Reta de calibração de Trolox para determinação da atividade antioxidante através do teste DPPH das amostras dos sumos estudados.

Esta reta permitiu relacionar os valores das absorvâncias das amostras estudadas, com os valores equivalentes a Trolox, nos diferentes tempos de armazenamento, tabela 7.

Tabela 7 – Valores médios do teste DPPH das amostras de sumo comercial e de sumo manufacturado, expresso em valores médios e erro padrão da média (SEM).

DPPH (equivalente Trolox $\mu\text{M TE /L}$) \pm SEM ($y = -0,0011x + 0,0237$; $R^2 = 0,993$)							
Sumo verde comercial				Sumo verde manufacturado			
Amostra	T ₀	T ₁	T ₂	Amostra	T ₀	T ₁	T ₂
C ₁	8,64 \pm 0,23	10,13 \pm 0,30	8,75 \pm 0,09	M ₁	9,07 \pm 0,28	8,36 \pm 0,09	9,39 \pm 0,11
C ₂	8,32 \pm 0,38	9,70 \pm 0,11	8,86 \pm 0,14	M ₂	9,14 \pm 0,08	8,65 \pm 0,08	9,31 \pm 0,12
C ₃	8,35 \pm 0,12	10,32 \pm 0,24	9,01 \pm 0,02	M ₃	9,27 \pm 0,12	8,73 \pm 0,09	9,21 \pm 0,09
C ₄	8,47 \pm 0,25	9,70 \pm 0,16	9,19 \pm 0,09	M ₄	9,05 \pm 0,10	8,45 \pm 0,13	9,25 \pm 0,03
C ₅	8,04 \pm 0,30	9,76 \pm 0,18	9,24 \pm 0,31	M ₅	9,22 \pm 0,22	8,42 \pm 0,12	9,33 \pm 0,17
C ₆	8,23 \pm 0,03	8,15 \pm 0,01	8,02 \pm 0,01	M ₆	8,53 \pm 0,00	8,54 \pm 0,00	8,53 \pm 0,00
C ₇	8,20 \pm 0,01	8,13 \pm 0,01	7,99 \pm 0,01	M ₇	8,53 \pm 0,00	8,53 \pm 0,00	8,53 \pm 0,00
C _{médio}	8.32 \pm 0.07	9.41 \pm 0.34*	8.72 \pm 0,20	M _{médio}	8.97 \pm 0.12	8.53 \pm 0.05	9.03 \pm 0.15

* valores com diferença significativa

Globalmente podemos observar que os valores médios obtidos do teste DPPH para os sumos (manufaturado e comercial) variam de forma inversa ao longo do tempo e que os valores iniciais e finais não parecem ser diferentes, Figura 9.

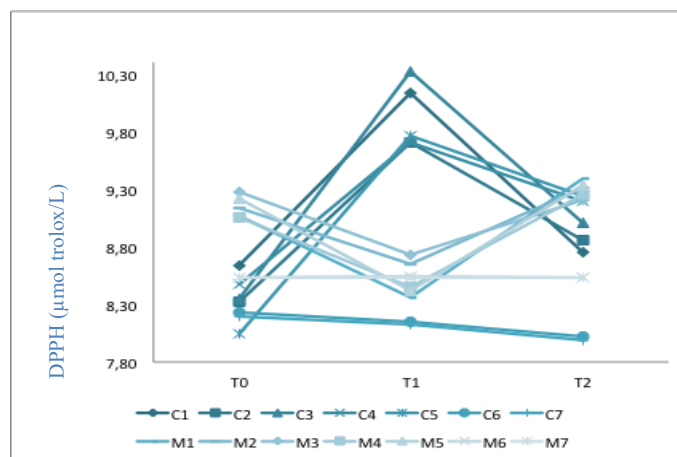


Figura 9 – Atividade antioxidante média resultante do teste DPPH das 7 amostras de cada sumo, nos 3 tempos T₀, T₁, T₂.

Os resultados do presente estudo apresentam de uma forma geral valores médios de DPPH (24,7 mM TE /g) são comparáveis aos reportados para a goiaba 25,2 mM TE/g (Thaipong et al., 2006). No entanto estes resultados diferem dos reportados noutros estudos onde se observaram valores mais baixos que no caso do pepino 33,67 mM AAE/mL, (Tiwari et al., 2011) e mais elevados que os valores observados para sumos verdes comerciais 0,95 mM TE (Wootton-Beard & Ryan, 2012).

Estes resultados devem no entanto ser comparados com cautela dado que de acordo com G. Marinova e col. os valores de DPPH obtidos em diferentes estudos variam substancialmente com os solventes usados, com as concentrações das soluções de trabalho para o teste e com a razão de volumes amostra/reagente DPPH (G. & V., 2011).

4.3.2. Análise Estatística

Os dados foram tratados estatisticamente com os mesmos objectivos de comparar:

- a) Os 2 sumos no que respeita aos valores de DPPH definindo “sumo” como fator independente: sumo: 0 – comercial; 1 – manufacturado;
- b) Os valores iniciais, intermédio e final de DPPH definindo “tempo” como fator de medições repetidas: 0 – inicial; 1 – intermédio; 2 – final.

Tal como no caso dos FT verificou-se para o DPPH a existência de interação no modelo de ANOVA de medições repetidas, pelo que as comparações entre sumos e entre momentos ignorando essa interação devem ser feitas com cautela. Nesse pressuposto, após aplicação do modelo ANOVA, os dados revelam uma interação significativa entre o fator independente “sumo” e o fator de medições repetidas “tempo”, DPPH ($p = 0.009$). Saliente-se que, também neste caso, a potência observada foi superior a 80% o que mostra que os efeitos observados não se devem ao acaso.

Salienta-se, no entanto, que a existência de interação no modelo de ANOVA de medições repetidas para FT domina o modelo analítico, pelo que as comparações entre sumos e entre momentos ignorando essa interação devem ser feitas com cautela.

Nestas condições, procedeu-se aos contrastes planeados na comparação desse parâmetro entre sumos, em cada um dos momentos definidos por “tempo”, e na comparação dos valores iniciais, intermédios e finais desse parâmetro para cada um dos sumos, gráfico na Figura 10.

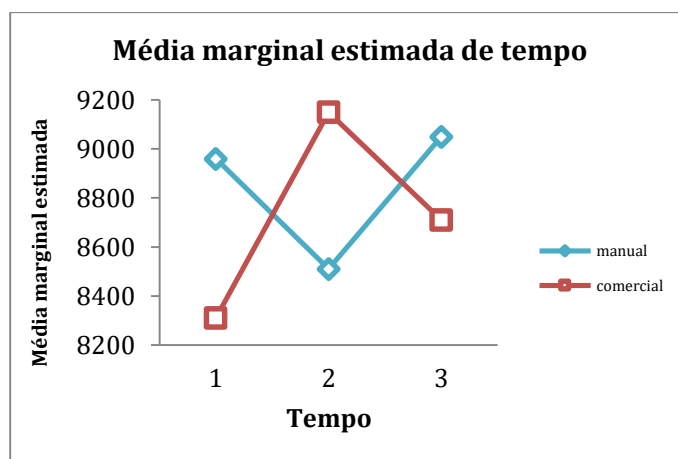


Figura 10 – Comparação das médias marginais estimadas em função do tempo para o teste DPPH.

Verifica-se que em T₀, os valores médios de DPPH no sumo manufacturado são significativamente mais elevados do que no sumo comercial ($p < 0.001$), não se registando diferenças significativas entre sumos nos restantes momentos de avaliação.

No sumo comercial, os valores de DPPH aumentam significativamente de T₀ para T₁ ($p = 0.004$), diminuem não significativamente de T₁ para T₂ ($p = 0.094$), mas mantém-se mais elevados em T₂ do que em T₀ ($p = 0.017$).

No sumo manufacturado verifica-se apenas aumento significativo de DPPH de T₁ para T₂ ($p = 0.050$).

O tratamento estatístico sugere assim valores significativamente mais elevados no sumo manufacturado do que no sumo comercial apenas no início, e também um comportamento significativamente diferente, dos 2 sumos ao longo do tempo.

Caracterização da atividade antioxidante de sumos verdes comerciais e os seus equivalentes manufacturados, ao longo do tempo.

4.4. Limitações e melhorias do trabalho

Existem poucos estudos que analisem sumos verdes ao longo do tempo, existindo assim poucos dados de comparação para o efeito do tempo observado neste estudo.

A falta de uniformidade nas condições e nas variáveis estudadas nos estudos analisados podem justificar a existência de resultados contraditórios em alguns casos. Na maioria dos estudos analisados apenas se analisou cada legume/vegetal separadamente e não qual o efeito do sumo, usando também várias unidades de medida diferentes.

Alguns estudos apresentam resultados contraditórios, apresentando apenas decréscimo da capacidade antioxidante ao longo do tempo, como acontece no estudo de Nekvapil sobre bebidas feitas à base de chá (Nekvapil et al., 2012).

De uma forma geral fatores como a espécie dos ingredientes utilizados, e o facto de os sumos verdes comerciais terem ácido ascórbico adicionado, podem ser fatores de confundimento responsáveis pelas diferenças de comportamento dos resultados de fenóis totais e capacidade antioxidante entre os sumos verdes comerciais e os sumos verdes manufacturados.

Para se obter uma caracterização correspondente à totalidade das propriedades antioxidantes seria desejável a realização de mais testes de análise da atividade antioxidante, análise dos extratos lipofílicos e hidrofílicos e de análise de mais métodos de preparação de sumos.

Numa fase posterior sugere-se o esclarecimento do efeito da ingestão destes sumos em parâmetros fisiológicos afim de avaliar a existência ou inexistência de benefício para saúde, uma vez que a quantidade de alimentos antioxidantes ingerida não é determinante do efeito benéfico expectável (Tirzitis & Bartosz, 2010).

Caracterização da atividade antioxidante de sumos verdes comerciais e os seus equivalentes manufacturados, ao longo do tempo.

5. CONCLUSÃO

Globalmente este estudo revelou que os sumos analisados, especialmente o comercial, contem uma quantidade de fenóis totais e atividade antioxidante e apreciáveis.

O tratamento estatístico sugere valores significativamente mais elevados no sumo comercial do que no sumo manufacturado e também um comportamento significativamente diferente, no que respeita ao teor em fenóis totais, dos 2 sumos ao longo do tempo.

Os valores obtidos dos sumos comerciais e manuais, **imediatamente após execução manufacturado/abertura do pacote**, apresentam diferenças significativas no conteúdo em fenóis totais e nos valores de FRAP, tendo o sumo comercial valores superiores. No teste de DPPH o sumo manufacturado apresenta valores significativamente mais elevados.

Os valores obtidos **após 24h de armazenamento a 4°C** revelam valores superiores para o sumo comercial no que diz respeito ao conteúdo em fenóis totais, teste FRAP e DPPH. No teste de DPPH os sumos apresentam comportamentos diferentes (sumo manufacturado com decréscimo e sumo comercial com aumento).

Os valores obtidos **após 72h de armazenamento a 4°C**, revelam que mais uma vez o conteúdo em fenóis totais e teste FRAP do sumo comercial são significativamente superiores ao sumo manufacturado. No teste de DPPH o sumo manufacturado apresenta valores significativamente mais elevados.

Os resultados obtidos permitem assim sugerir que, globalmente, a quantidade de fenóis totais e a atividade antioxidante dos sumos comerciais elaborados através do método HPP e refrigerados a 4° C, é superior à dos sumos elaborados por manufactura.

6. Bibliografia

- Agrocluster Ribatejo. (2015). Tendências do Mercado Alimentar da União Europeia, 67.
- Alvarez, J., Pastoriza, S., Alonso-Olalla, R., Delgado-Andrade, C., & Rufinn-Henares, J. A. (2014). Nutritional and physicochemical characteristic of commercial Spanish citrus juices. *Food Chemistry*, 164, 396–405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.047>
- Ayogu, R., Nnam, N., & Mbah, M. (2015). Food & Nutrition. *Food and Nutrition Research*, 1(7), 1–12.
- Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frigola, A. (2012). Impact of high-pressure processing on vitamin E (Tocopherol), vitamin D (Cholecalciferol and Ergocalciferol), and fatty acid profiles in liquid foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(14), 3763–3768. <https://doi.org/10.1021/jf205355h>
- Bernardo, M. A; Silva, M. L; Santos, E; Moncada, M; Brito, J; Proença, L; Singh, J; Mesquita, M. F. (2015). Effect of Cinnamon Tea on Postprandial Glucose Concentration. *Journal of diabetes research*, 564(21).
- Biologica, C., Universita, G. F., Pu, U., Biotecnologie, C., Campanella, T., & Pu, F. (2003). Polyphenols and Antioxidant Capacity of Vegetables under, 2222–2226.
- Bonaccio, M., Castelnovo, A. Di, Bonanni, A., Costanzo, S., De Lucia, F., Pounis, G., Iacoviello, L. (2013). Adherence to a Mediterranean diet is associated with a better health-related quality of life: a possible role of high dietary antioxidant content. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-003003>
- Borges, G., Mullen, W., & Crozier, A. (2010). Comparison of the polyphenolic composition and antioxidant activity of European commercial fruit juices. *Food & function*, 1(1), 73–83. <https://doi.org/10.1039/c0fo00008f>
- Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., Holte, K., Bøhn, S. K., Dragland, S., Sampson, L., ... Blomhoff, R. (2010). The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition journal*, 9, 3.

<https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-3>

- Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., Willett, W. C., & Phillips, K. M. (2010). Additional file 1: The Antioxidant Food Table. *Nutrition Journal*, 9, 3. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-3>
- Chen, X., Qin, W., Ma, L., Xu, F., Jin, P., & Zheng, Y. (2015). Effect of high pressure processing and thermal treatment on physicochemical parameters, antioxidant activity and volatile compounds of green asparagus juice. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 927–933. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.068>
- de Boer, A., Vos, E., & Bast, A. (2014). Implementation of the nutrition and health claim regulation – The case of antioxidants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 68(3), 475–487. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.01.014>
- Del Caro, A., Piga, A., Vacca, V., & Agabbio, M. (2004). Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chemistry*, 84(1), 99–105. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00180-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00180-8)
- Del Socorro Cruz-Cansino, N., Ramírez-Moreno, E., León-Rivera, J. E., Delgado-Olivares, L., Alanís-García, E., Ariza-Ortega, J. A., ... Jaramillo-Bustos, D. P. (2015). Shelf life, physicochemical, microbiological and antioxidant properties of purple cactus pear (*Opuntia ficus indica*) juice after thermoultrasound treatment. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27(1), 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.05.040>
- G., M., & V., B. (2011). Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulg. J. of Agric. Sci*, 17(1), 11–24. Obtido de www.agrojournal.org/17/01-02-11.pdf
- Getting, J. E., Gregoire, J. R., Phul, A., & Kasten, M. J. (2013). Oxalate Nephropathy Due to ‘Juicing’: Case Report and Review. *The American Journal of Medicine*, 126(9), 768–772. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2013.03.019>
- Gilsenan, M. B. (2011). Nutrition & health claims in the European Union: A

- regulatory overview. *Trends in Food Science & Technology*, 22(10), 536–542. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.03.004>
- Guldiken, B., Toydemir, G., Nur Memis, K., Okur, S., Boyacioglu, D., & Capanoglu, E. (2016). Home-Processed Red Beetroot (*Beta vulgaris* L.) Products: Changes in Antioxidant Properties and Bioaccessibility. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 858. <https://doi.org/10.3390/ijms17060858>
- Gupta, D. (2015). Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(2), 546–566. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(2\).546-66](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(2).546-66)
- Halliwel, B. (1996). Antioxidants in Human Health and Disease, 33–50.
- Hollman, P., & Katan, M. (1997). Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 51(8), 305–310. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(97\)88045-6](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(97)88045-6)
- Kafatos, A., Verhagen, H., Moschandreas, J., Apostolaki, I., & Westerop, J. J. M. V. (2016). Mediterranean Diet Of Crete. *Journal Of The American Dietetic Association*, 100(12), 1487–1493. [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(00\)00416-8](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(00)00416-8)
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., & Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94(4), 550–557. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.004>
- Kaur, C., & Kapoor, H. C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables - The millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36(7), 703–725. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2001.00513.x>
- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>
- Keenan, Derek F., C., Gormley, R., Butler, F., & Brunton, N. P. (2012). Effect of high hydrostatic pressure and thermal processing on the nutritional quality and enzyme activity of fruit smoothies. *LWT - Food Science and Technology*, 45(1), 50–57.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.07.006>

Kiefer, I., Prock, P., Lawrence, C., Wise, J., Bieger, W., Bayer, P., ... Rieder, A. (2004). Supplementation with mixed fruit and vegetable juice concentrates increased serum antioxidants and folate in healthy adults. *Journal of the American College of Nutrition*, 23(3), 205–211. <https://doi.org/10.1080/07315724.2004.10719362>

Kim, S. Y. (2012). Comparison of nutritional compositions and antioxidant activities of building blocks in shinseoncho and kale green vegetable juices. *Preventive Nutrition and Food Science*, 17(4), 269–273. <https://doi.org/10.3746/pnf.2012.17.4.269>

Kim, S. Y. (2015). Fluctuations in Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Green Vegetable Juices during Refrigerated Storage, 20(September), 169–175.

Klein, A. V., & Kiat, H. (2015). Detox diets for toxin elimination and weight management: A critical review of the evidence. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 28(6), 675–686. <https://doi.org/10.1111/jhn.12286>

Klimczak, I., Małecka, M., Szlachta, M., & Gliszczyńska-Świgło, A. (2007). Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3–4), 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.02.012>

Knekt, P. (1999). 1 - Vitamin E and Lung Cancer Prevention A2 - Packer, Lester. Em M. Hiramatsu & T. B. T.-A. F. S. in H. H. Yoshikawa (Eds.) (pp. 3–33). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-012543590-1/50002-0>

Lallianrawna, S., Muthukumar, R., Ralte, V., Gurusubramanian, G., & Kumar, N. S. (2013). Determination of total phenolic content, total flavonoid content and total antioxidant capacity of *Ageratina adenophora* (Spreng.) King & H. Rob. *Science Vision*, 13(4), 149–156.

Lassale, C., Gunter, M. J., Romaguera, D., Peelen, L. M., Van Der Schouw, Y. T.,

- Beulens, J. W. J., ... Tzoulaki, I. (2016). Diet quality scores and prediction of all-cause, cardiovascular and cancer mortality in a pan-european cohort study. *PLoS ONE*, *11*(7), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159025>
- Nantz, M. P., Rowe, C. A., Nieves Carmelo, J., & Percival, S. S. (2006). Immunity and Antioxidant Capacity in Humans Is Enhanced by Consumption of a Dried, Encapsulated Fruit and Vegetable Juice Concentrate. *Journal of Nutrition*, *136*(10), 2606–2610. Obtido de <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=22644756&site=eds-live&scope=site>
- Nekvapil, T., Kopriva, V., Boudny, V., Hostovsky, M., Dvorak, P., & Malota, L. (2012). Decrease in the antioxidant capacity in beverages containing tea extracts during storage. *TheScientificWorldJournal*, *2012*(SEPTEMBER), 361698. <https://doi.org/10.1100/2012/361698>
- Norat, T., Scoccianti, C., Boutron-Ruault, M. ., Anderson, A., Berrino, F., Cecchini, M., Wiseman, M. (2015). European Code Against Cancer 4th edition: diet and cancer. No Title. *Cancer epidemiology*, *39*, s56–s66. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2014.12.016>
- Oey, I., Lille, M., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2008). Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit- and vegetable-based food products: a review. *Trends in Food Science and Technology*, *19*(6), 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.04.001>
- Oliveira, A. C. De, Valentim, I. B., Goulart, M. O. F., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., & Trevisan, M. T. S. (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, *32*(3), 689–702. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300013>
- Özer, N. K., Taha, S., Stocker, A., & Azzi, A. (1999). 5 - Effects of High Cholesterol, Vitamin E, and Probucol on Protein Kinase C Activity and Proliferation of Smooth Muscle Cells A2 - Packer, Lester. Em M. Hiramatsu & T. B. T.-A. F. S. in H. H. Yoshikawa (Eds.) (pp. 73–86). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-012543590-1/50006-8>

- Packer, L., Hiramatsu, M., & Yoshikawa, T. (1999). *Antioxidant food supplements in human health*. Academic Press.
- Patras, A., Brunton, N. P., Da Pieve, S., & Butler, F. (2009). Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(3), 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.12.004>
- Piga, A., Del Caro, A., Pinna, I., & Agabbio, M. (2003). Changes in ascorbic acid, polyphenol content and antioxidant activity in minimally processed cactus pear fruits. *LWT - Food Science and Technology*, 36(2), 257–262. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(02\)00227-X](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(02)00227-X)
- Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. P. (2012). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 1(1), 1–10. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000106>
- Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, (APRIL). <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Rama Prabha, M., & Vasantha, K. (2011). Antioxidant, cytotoxicity and polyphenolic content of calotropis procera (ait.) r. br. flowers. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(7), 136–140.
- Sila, D. N., Duvetter, T., De Roeck, A., Verlent, I., Smout, C., Moates, G. K., ... Van Loey, A. (2008). Texture changes of processed fruits and vegetables: potential use of high-pressure processing. *Trends in Food Science and Technology*, 19(6), 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.12.007>
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7), 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
- Tian, J., Chen, J., Lv, F., Chen, S., Chen, J., Liu, D., & Ye, X. (2016). Domestic

- cooking methods affect the phytochemical composition and antioxidant activity of purple-fleshed potatoes. *Food Chemistry*, 197, 1264–1270. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.049>
- Tirzitis, G., & Bartosz, G. (2010). Determination of antiradical and antioxidant activity: Basic principles and new insights. *Acta Biochimica Polonica*, 57(2), 139–142.
- Tiwari, A. K., Kumar, D. A., Sweeya, P. S., Chauhan, H. A., Lavanya, V., Sireesha, K., ... Zehra, A. (2014). Vegetables' juice influences polyol pathway by multiple mechanisms in favour of reducing development of oxidative stress and resultant diabetic complications. *Pharmacognosy magazine*, 10(Suppl 2), S383-91. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.133290>
- Tiwari, A. K., Reddy, K. S., Radhakrishnan, J., Kumar, D. A., Zehra, A., Agawane, S. B., & Madhusudana, K. (2011). Influence of antioxidant rich fresh vegetable juices on starch induced postprandial hyperglycemia in rats. *Food & Function*, 2(9), 521. <https://doi.org/10.1039/c1fo10093a>
- Traber, M. G., Serbinova, E. A., & Packer, L. (1999). 4 - Biological Activities of Tocotrienols and Tocopherols BT - Antioxidant Food Supplements in Human Health (pp. 55–71). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-012543590-1/50005-6>
- Uddin, M. N., Afrin, R., Uddin, M. J., Uddin, M. J., Alam, A. H. M. K., Rahman, A. A., & Sadik, G. (2015). Vanda roxburghii chloroform extract as a potential source of polyphenols with antioxidant and cholinesterase inhibitory activities: identification of a strong phenolic antioxidant. *BMC complementary and alternative medicine*, 15, 195. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0728-y>
- Vanhanen, L., & Savage, G. (2015). Comparison of oxalate contents and recovery from two green juices prepared using a masticating juicer or a high speed blender. *NFS Journal*, 1, 20–23. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2015.07.002>
- Wojdyło, A., Teleszko, M., & Oszmiański, J. (2014). Antioxidant property and storage stability of quince juice phenolic compounds. *Food Chemistry*, 152, 261–270. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.124>

- Wootton-Beard, P. C., & Ryan, L. (2012). Combined use of Multiple Methodologies for the Measurement of Total Antioxidant Capacity in UK Commercially Available Vegetable Juices. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67(2), 142–147. <https://doi.org/10.1007/s11130-012-0287-z>
- Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.033>