



# **Determinação do perfil de compostos com capacidade antioxidante na bebida RedEspresso do sistema Delta Q**

**Catarina Gil Leitão Ferraz Carreira**

Dissertação para Obtenção do Grau de Mestre em

## **Engenharia Química**

Orientador: Doutora Maria Conceição Monteiro André Oliveira

Co-Orientador: Doutora Carla Rodrigues (Diverge, Centro de Inovação do Grupo Nabeiro)

### **Júri**

Presidente: Professora Doutora Benilde de Jesus Vieira Saramago

Vogais: Professora Doutora Maria Matilde Soares Duarte Marques

Doutora Maria Conceição Monteiro André Oliveira

**Dezembro de 2015**

Texto segundo o antigo acordo ortográfico.

## Agradecimentos

Em primeiro lugar, um especial agradecimento à minha orientadora, Doutora Conceição Oliveira que, apesar de todas as adversidades que este trabalho apresentou, sempre se mostrou totalmente disponível para me apoiar, motivar e ajudar. Acima de tudo, saliento a sua infinita paciência para lidar com “o temperamento das máquinas” e a imensa vontade de me transmitir novos e mais abrangentes conhecimentos.

À Doutora Carla Rodrigues, sem a qual a realização deste trabalho não seria possível e que, apesar da sua preenchida agenda, sempre se disponibilizou com grande entusiasmo para corrigir, orientar e apoiar este estudo.

À Ana Dias um grande obrigada por ter estado sempre disposta a me ajudar durante a realização deste trabalho, mesmo tendo o seu tempo muito preenchido.

A todos aos meus amigos que, ao longo destes 5 anos, me acompanharam nesta dura mas gratificante vida de estudante do IST, na firme convicção de que nos tornaríamos excelentes engenheiros. Em especial ao João, pela sua infindável paciência, carinho e dedicação.

À Zé que tornou os meus fins-de-semana dos últimos 5 anos, em momentos de família, carinho e boa disposição.

À minha inestimável família, os meus pais, o meu irmão e o meu avô, por serem os melhores dos melhores, sempre acreditando em mim e no meu trabalho, não me deixando “abater” pelas dificuldades e contribuindo sempre para o meu bem-estar.

À memória da minha avó Milú que me acompanha desde sempre e para sempre.

## Resumo

Rooibos, arbusto nativo de uma região montanhosa na África do Sul, tem sido utilizado por mais de 300 anos pelos indígenas como um chá medicinal. A sua rica composição fenólica confere-lhe vastos benefícios para a saúde humana, tornando-o num chá popular.

O produto comercializado pela Delta Cafés – RedEspresso – é um expresso feito a partir de rooibos. Assim como o café expresso é a essência do café, RedEspresso é uma bebida encorpada mais rica, com melhor sabor que uma simples chávena rooibos.

O objectivo deste trabalho passa por analisar e quantificar os principais fenólicos presentes numa cápsula RedEspresso e compará-la com infusões de Rooibos. Concretamente, demonstrar que a bebida da cápsula contém maior concentração de aspalatina do que a infusão. O facto da preparação do expresso envolver uma extração rápida, em ambiente controlado, deverá inibir o processo de oxidação da aspalatina, originando uma bebida mais rica nesta dihidrocalcona.

Recorreu-se à cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de matriz de díodos acoplada à espectrometria de massa sequencial com ionização por *electrospray*, para separar, caracterizar e quantificar os compostos principais presentes no expresso e nas infusões.

Para validar o método analítico apenas se estudou a influência da repetibilidade nos ensaios.

Os resultados obtidos não permitiram concluir de forma precisa se a cápsula apresenta maior capacidade antioxidante relativamente às infusões normais. A degradação das soluções padrão e/ou dos extractos à temperatura ambiente, bem como parâmetros instrumentais responsáveis pela baixa reprodutibilidade da resposta do sinal nos cromatogramas iónicos, poderão estar na origem destes resultados.

**Palavras-chave** : Rooibos, RedEspresso, RP-HPLC-DAD-ESI-MS/MS

## Abstract

Rooibos, a shrub native of a mountainous region in South Africa, has been used for more than three centuries as an herbal tea, by local natives. This popularity lays in the fact that it's phenolic composition grants it a wide variety of health benefits.

RedEspresso, the product commercialized by Delta Cafes, consists of an espresso made from rooibos plant. Through this espresso extraction, RedEspresso results in a full-bodied drink richer and better tasting than a simple cup of rooibos.

This work involves analyzing and quantifying the major phenolic present in a RedEspresso capsule and compare it with rooibos infusions. Mainly proving that the amount of aspalathin present in a single rooibos espresso is higher than in an infusion. Given that the preparation of the espresso occurs rapidly and it's not exposed to the environment, the aspalathin flavonoid should not be so oxidized. This way, a higher antioxidant capacity should be found in the RedEspresso.

The separation, characterization and quantification of the major compounds, both in espresso and in infusions, was obtained through high efficiency liquid chromatography with diode array detector, coupled to sequential mass spectrometry *electrospray* ionization.

The validation of the analytical method was only based on the influence of the samples repeatability.

The obtained results not allowed a precise conclusion about the capsule antioxidant capacity when compared with an infusion. The standards and/or the extracts deterioration at normal temperature, as well as instrumental parameters that could affect the ionic chromatogram reproducibility, might be the cause of such results.

**Keywords:** Rooibos, RedEspresso, RP-HPLC-DAD-ESI-MS/MS

## Abreviaturas

APCI – Ionização química a pressão atmosférica

API – Ionização a pressão atmosférica

CI – Ionização química

c.d.o – Comprimento de onda

CID – Dissociação induzida por colisão

CV – Coeficiente de variação

DAD – Detector de matriz de díodos

DP – Desvio padrão

DPR – Desvio padrão relativo

EI – Ionização electrónica

ESI – Ionização por *electrospray*

FTICR – Ressonância ciclométrica de iões com transformada de Fourier

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC-DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de matriz de díodos

HPLC-DAD-MS – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de matriz de díodos e espectrometria de massa

HPLC-ESI-MS/MS – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa sequencial de ionização por *electrospray*

ICR - Ressonância ciclométrica de iões

LIT - Armadilha de iões linear

LC – Cromatografia líquida

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa

LC/MS/MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa sequencial

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

MALDI – Ionização por desadsorção laser assistida por matriz

MS – Espectrometria de massa

MS/MS – Espectrometria de massa sequencial

Q - Quadrupolo

QIT – Armadilha de iões quadrupolar

QqQ - Triplo Quadrupolo

RDA - Reacções de retro-Diels-Alder

RF – Rádio frequência

RP-HPLC-DAD-ESI-MS/MS - cromatográfica líquida de alta eficiência de fase reversa com detector de matriz de díodos acoplada à espectrometria de massa sequencial com ionização por *electrospray*

TOF – Tempo de voo

Tr – Tempo de retenção

UV -Ultravioleta

UV-Vis – Ultravioleta visível

## Índice de figuras

Figura 1 - Cápsula RedEspresso. ....	10
Figura 2 - Quantidade de café consumido ao longo do dia. (fonte: Delta Q, Loop e Diverge, Centro de Inovação do Grupo Nabeiro) .....	10
Figura 3 - Localização da região do Cedarbeg. ....	11
Figura 4 - Plantação de rooibos. (Rooibos Lda).....	11
Figura 5 - Rooibos verde e vermelho. O chá de rooibos é uma bebida rica em componentes voláteis, polifenóis e minerais. Contrariamente ao chá de <i>Camellia sinensis</i> , o Rooibos é isento de cafeína e tem um baixo conteúdo de taninos. Graças a estas características o chá de rooibos ganhou popularidade como sendo uma bebida saudável.....	12
Figura 6 – Mecanismo de oxidação da Aspalatina. Adaptado de Krafcyk and Glomb, 2008. .	13
Figura 7 – Classificação estrutural dos compostos polifenólicos. ....	16
Figura 8 - Representação dos vários tipos de ácidos fenólicos. (Messias, 2009) .....	17
Figura 9 - Representação da estrutura base dos flavonóides. (Culebras & Tuñón, 2002) .....	17
Figura 10 - Estruturas base das principais classes de flavonóides. As setas indicam as posições mais comuns de O e C glicosilação (Adaptado de Vuckins and Guttam 2010).....	18
Figura 11 - Representação esquemática da separação de componentes na cromatografia. (W. Dong, 2006) .....	20
Figura 12 - Representação esquemática dos componentes básicos de um espectrómetro de massa. ....	21
Figura 13 - Representação esquemática da interface ESI. (McIndoe, J S; Henderson, 2005) 23	
Figura 14 - Representação esquemática da armadilha de iões quadrupolar (QIT) (McIndoe, J S; Henderson, 2005) .....	23
Figura 15 - Representação dos eléctrodos do QIT. ....	24
Figura 16 – Representação esquemática de uma experiencia de massa sequencial.....	25
Figura 17 - Representação esquemática de um sistema LC/MS. (McMaster, 2006) .....	26
Figura 18 – Nomenclatura normalmente usada para designar os fragmentos gerados a partir de a) O-glicósidos; b) C,O- e C-glicósidos. Adaptado de Vuckins and Guttam, 2010.....	33
Figura 19 - Histograma, cromatograma HPLC-DAD e cromatograma iónico total no modo (-)ESI para uma amostra de extracto de RedEspresso.....	36
Figura 20 - Gradiente da fase móvel usado na identificação e quantificação dos extractos... 36	
Figura 21 - Representação da estrutura molecular da Rutina. ....	37



Figura 22 – Espectro (-)ESI-MS <sup>2</sup> da molécula desprotonada da rutina <i>m/z</i> 609 .....	37
Figura 23 – Proposta de fragmentação para o ião <i>m/z</i> 609 da rutina.....	38
Figura 24 – Representação da estrutura molecular da Orientina. ....	39
Figura 25 – Representação da estrutura molecular da Iso-Orientina. ....	39
Figura 26 – Espectro (-) ESI-MS/MS da molécula desprotonada da orientina <i>m/z</i> 447. ....	39
Figura 27 – Proposta de fragmentação para a orientina.....	40
Figura 28 – Representação da estrutura molecular da aspalatina. ....	40
Figura 29 – Espectro de MS/MS da molécula desprotonada da aspaltina <i>m/z</i> 451. ....	41
Figura 30 – Análise HPLC-MS/MS de um extracto de RedEspresso. a) cromatograma iónico total traçado no modo ESI negativo. Cromatogramas iónicos extraídos para os percursores: b) <i>m/z</i> 353; c) <i>m/z</i> 611; d) <i>m/z</i> 593; e) <i>m/z</i> 593; f) <i>m/z</i> 449; g) <i>m/z</i> 325; h) <i>m/z</i> 447; j) <i>m/z</i> 451; l) <i>m/z</i> 609; m) <i>m/z</i> 431; n) <i>m/z</i> 463 e o) <i>m/z</i> 435.....	42
Figura 31 – Curvas de calibração obtidas para a rutina e orientina.....	50

## Índice de tabelas

Tabela 1 – Perdas características observadas nos flavonóides O e C-glicosídicos.....	34
Tabela 2 - Identificação por HPLC-ESI-MS/MS dos compostos fenólicos presentes nos extractos de RedEspresso e infusão de roibos.....	46
Tabela 3 – Parâmetros das rectas de calibração dos compostos.....	50
Tabela 4 – Parâmetros de precisão obtidos para a rotina. ....	51
Tabela 5 – Parâmetros de precisão obtidos para a orientina.....	52
Tabela 6 – Resumo das concentrações obtidas de rutina e orientina (e respectivos isómeros) na cápsula e nas infusões. ....	53
Tabela 7 – Resumo das concentrações obtidas para os compostos de aspalatina, notogafina e derivados de eriodictiol.....	53

# 1 Introdução

Tem-se observado uma crescente preocupação, junto da população geral, relativamente ao consumo de alimentos e bebidas que promovam uma vida mais saudável. O chá e as tisanas surgem por isso, actualmente, como uma das bebidas mais consumidas nos dias de hoje, devendo grande parte da sua popularidade aos inúmeros benefícios para a saúde.

## 1.1 Delta Cafés

Fundada por Manuel Rui Azinhais Nabeiro, em 1961, num pequeno armazém com cerca de 50 m<sup>2</sup> e com apenas duas bolas de torra com 30 kg de capacidade, é hoje classificada como uma das empresas no *Top 10* de casos com maior sucesso internacional.

Presente em 30 países, empregando mais de 3000 pessoas e líder de mercado em Portugal, Angola e Moçambique, a Delta Cafés apresenta como Missão satisfazer totalmente as expectativas dos seus consumidores, mantendo sempre um modelo de governo assente na partilha e no diálogo.

A Delta Cafés compromete-se a garantir os mais altos padrões de qualidade e segurança dos seus produtos, mantendo sempre uma relação amiga do ambiente (permitindo por exemplo a reciclagem das suas cápsulas), fomenta uma responsabilidade social activa, envergando diversos projectos, que promovem desta forma um desenvolvimento comunitário sustentável e aposta na inovação dos seus produtos, tendo sempre como motivação o desejo do cliente. (“Delta Cafés,” 2015)

Apesar do *core* do seu negócio ser o café, a Delta também comercializa chás e vinhos.

### 1.1.1 Sistema Delta Q

O sistema Delta Q, é um sistema de café em cápsulas, exclusivo e patenteado.

Acondicionado em atmosfera protectora o café contido em cada cápsula encerra um padrão de qualidade e de características organolépticas, que se mantêm constantes de dose para dose, desde o primeiro até ao último dia da sua validade.

As cápsulas são produzidas em Leiria - cerca de 4 milhões e meio de cápsulas feitas em plástico PBT, resistentes ao calor e à pressão - e são então transportadas até à fábrica da Delta, em Campo Maior, onde se procede ao enchimento das mesmas. As cápsulas são devidamente pesadas, para garantir um padrão de igualdade, fechadas, seladas e finalmente distribuídas. (Conceição, n.d.)

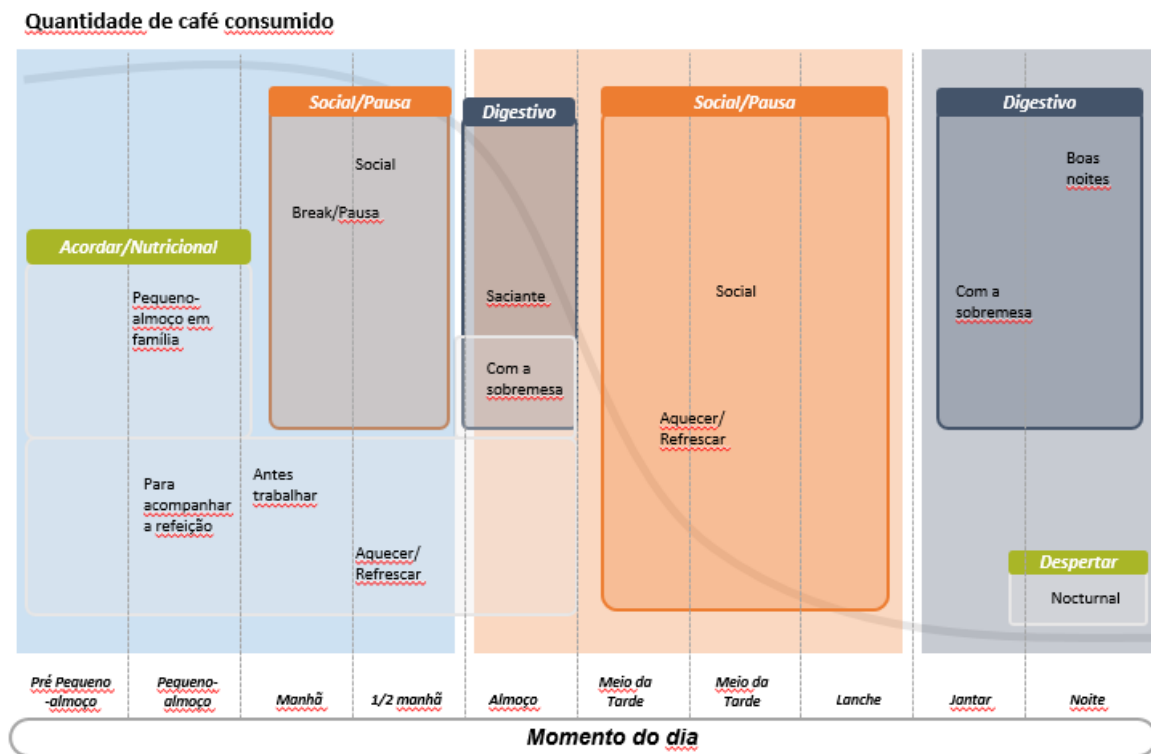
Por revelar o conteúdo de cada cápsula apenas no momento em que esta é aberta, já no interior da sua máquina, este sistema assegura eficácia e funcionalidade, mas, mais importante, a certeza de um expresso sempre perfeito.

Em 2009 a Delta Cafés apostou mais uma vez na inovação e lançou o primeiro expresso em cápsula do mundo, feito a partir de Rooibos. Uma bebida inovadora, 100% natural, que demonstrou ser um sucesso nomeadamente entre o público feminino, atendendo às propriedades que apresenta. (Gonçalves, 2009)



**Figura 1** - Cápsula RedEspresso.

De acordo com a informação apresentada na figura abaixo, verifica-se que o consumo mínimo de café é atingido à noite. Assim, o expresso de roibos apresenta-se como uma excelente alternativa, uma vez que é isento de cafeína e possui um sabor adocicado muito agradável.



**Figura 2** - Quantidade de café consumido ao longo do dia. (fonte: Delta Q, Loop e Diverge, Centro de Inovação do Grupo Nabeiro)

## 1.2 Rooibos

O Rooibos, de nome científico *Aspalathus linearis*, é um arbusto, da família das leguminosas, proveniente de uma pequena área no Cedarbeg, na província do Cabo Ocidental, na África do Sul.



**Figura 3** - Localização da região do Cedarbeg.

O Rooibos adapta-se bem às adversas condições da região do Cedarbeg, onde as temperaturas caem até aos 0 °C durante os meses de Inverno e sobem até 48 °C no Verão. Durante o Inverno a pluviosidade da região varia entre 180 e 500 mm por ano. Não é utilizada qualquer irrigação e a planta é regularmente sujeita a severas condições climatéricas. O mecanismo de sobrevivência deste arbusto consiste na capacidade que a sua raiz principal tem de penetrar até 3 metros ou mais, no solo bem drenado, fresco e arenoso que possui um elevado nível de acidez

Embora a planta requeira uma zona de produção com chuvas invernais, o seu crescimento activo ocorre na Primavera, aumentando até meio do Verão, período após o qual decresce o seu desenvolvimento. Durante o mês de Outubro o arbusto está repleto de flores amarelas. Cada flor apresenta um pequeno receptáculo contendo apenas uma única e pequena semente dicotiledonea, de cor amarela clara, e de revestimento muito duro.



**Figura 4** - Plantação de rooibos. (Rooibos Lda)

As sementes são recolhidas através de peneiração da areia em redor das plantas. São esfregadas com escovões mecânicos para aumentar o seu potencial de germinação de 30% para 95%. (“Rooibos Ltd,” 2015)

O arbusto de porte médio, que não ultrapassa 1,5 m de altura, é caracterizado pelas suas folhas verdes, brilhantes, em forma de pequenas agulhas de 1 a 4 cm. As folhas e os caules finos da planta são utilizados para a produção do chá de rooibos. As plantas são processadas de duas maneiras distintas, originando dois tipos diferentes de chás. As folhas verdes e os caules são cortados em comprimentos de 3-4 mm, fermentados por enzimas das folhas e secos ao sol (Bramati e col., 2002), ou imediatamente secos ao sol em finas camadas, de forma a prevenir a sua oxidação e preservar a cor verde. O tradicional chá fermentado é processado hoje da mesma forma realizada pelos indígenas há centenas de anos atrás. (Kit, 2015)

O tipo de chá fermentado é chamado de chá vermelho porque a fermentação faz com que ocorra uma mudança de cor de verde para uma cor avermelhada, uma vez que se oxidam os polifenóis presentes nas folhas. O tipo não fermentado, também chamado de rooibos verde, contém níveis mais elevados de polifenóis antioxidantes, pois o processo de fermentação faz com que se percam alguns destes constituintes. Este último tipo foi desenvolvido para maximizar o nível de antioxidantes, como uma resposta ao crescente interesse em benefícios para a saúde encontrados nos chás. (McKay L. & Blumberg B., 2006)

O rooibos é classificado de acordo com a sua cor, sabor e comprimento de corte. Tem um sabor suave e não amargo. O chá não fermentado com elevado teor de aspalatina, que lhe confere o tom verde, tem um sabor semelhante ao chá verde contrariamente ao tipo fermentado, que possui um sabor mais adocicado e frutado, dispensando assim a adição de açúcar, tornando-se uma ótima opção para quem deseja controlar a ingestão de açúcar e calorias. A infusão de Rooibos é uma bebida saudável, rica em antioxidantes, tornando-a muito interessante do ponto de vista nutricional.



**Figura 5** - Rooibos verde e vermelho. O chá de rooibos é uma bebida rica em componentes voláteis, polifenóis e minerais. Contrariamente ao chá de *Camellia sinensis*, o Rooibos é isento de cafeína e tem um baixo conteúdo de taninos. Graças a estas características o chá de rooibos ganhou popularidade como sendo uma bebida saudável.

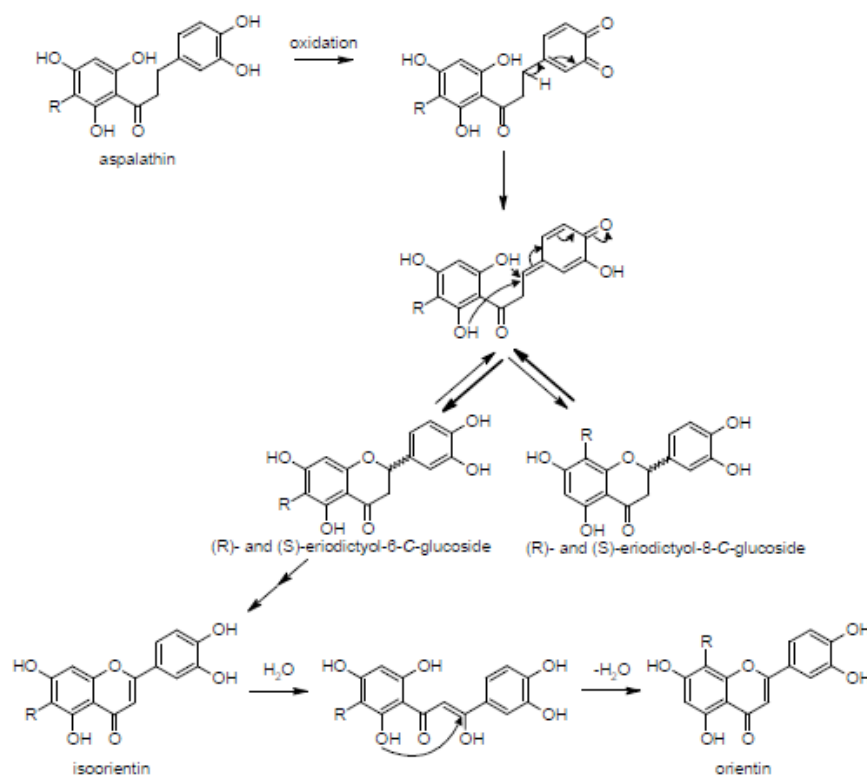
### 1.2.1 Composição química do chá e do Rooibos

Originalmente os chás provêm de um arbusto proveniente da China, cujas flores são semelhantes às camélias, denominado *Camellia Sinensis* que em latim significa camélia da China.

Sabe-se que de acordo com o tipo de processamento a que é sujeita a planta, podem surgir quatro variedades diferentes de chás (quanto mais escuro mais oxidado) – o chá branco que não é sujeito a qualquer oxidação, o chá verde levemente oxidado, o chá *oolong* com oxidação mediana e finalmente o chá preto, sujeito a maior oxidação e, por isso, mais forte. Existem também as infusões que são feitas a partir de plantas, flores e frutos, que possuem sabor e propriedades distintas desta erva oriunda da China. Como o processo de obtenção das bebidas é igual - ferver as plantas em água - qualquer tipo de infusão em água quente passou a ser popularmente denominada como 'chá'.

De uma forma geral fazem parte da composição química do chá vários compostos, sendo os mais relevantes os polifenóis, cafeína, proteínas e aminoácidos, carboidratos, ácidos orgânicos, vitaminas e minerais. (Pereira, V.P; Knor, F.J; Velloso, J.C.R, Beltrame, F.L, 2014)

Estudos realizados até ao momento indicam que os constituintes principais e maioritários do roibos fermentado, detectados a partir de métodos analíticos, são dihidrocalconas (aspatatina e notofagina), C-flavanonas (misturas diastereoméricas (*R*)- e -(*S*) de 6 e 8-eriodictiol-*C*- $\beta$ -D-glucopiranosose), C-flavonas (orientina e iso-orientina, vitexina e isovitexina) e flavonóis (rutina e quercetina glicosídica). Foi também reportado uma diminuição do teor de aspatatina e notofagina do roibos verde para o roibos vermelho, pois estes compostos são oxidados durante a fermentação dando origem, no caso da aspatatina à iso-orientina (Iswaldi e col., 2011)(Bramati e col., 2002). Foi ainda demonstrado que as C-flavanonas são formadas como intermediários durante o processo de oxidação da aspatatina (Figura 6). (Krafczyk and Glomb, 2008).



**Figura 6** – Mecanismo de oxidação da Aspatatina (Krafczyk and Glomb, 2008).

## 1.2.2 Benefícios do Rooibos

Estudos observacionais demonstram que dietas ricas em alimentos e bebidas, provenientes de plantas, estão associadas a um menor risco de desenvolvimento de doenças crônicas não só cardiovasculares, como também de alguns tipos de cancro. Esta atribuição parece estar relacionada com a existência de constituintes fitoquímicos e com os macro e micro nutrientes existentes nestas plantas.

O chá rooibos tem uma composição fenólica única, dado que é a única fonte natural de aspalatina conhecida. Para além disso, é uma fonte de flavonas C-glicosídicas, não encontrada normalmente na dieta diária. Sendo um produto natural, isento de quaisquer aditivos, conservantes e corantes, sem qualquer teor de cafeína e contendo antioxidantes que combatem o enfraquecimento natural do organismo, vários estudos indicam que a ingestão de Rooibos contribui com inúmeros benefícios para a saúde.

As tisanas de rooibos têm sido popularmente utilizadas, na medicina tradicional, para tratar asma, cólicas, eczemas, dores de cabeça, náuseas e depressões no estado intermédio. Também têm sido utilizadas como um anti-hipertensivo, estimulante imunológico, laxativo, sedativo e relaxante muscular, bem como para o tratamento de aterosclerose e diabetes. (McKay L. & Blumberg B., 2006)

Vários estudos têm sido desenvolvidos, quer *in vitro* quer em modelos animais, de modo a comprovar a eficiência do rooibos nestas aplicações, afirmando que os extractos de rooibos possuem de facto propriedades antioxidantes, graças à sua rica composição em compostos polifenólicos, e um relevante potencial quimiopreventivo e efeitos imunológicos. (McKay L. & Blumberg B., 2006) (Merwe e col., 2010)

Apesar do número de ensaios em humanos não permitir ainda dados conclusivos, Shinko and Kato (1991) comprovaram que um consumo semanal de 1500 ml de rooibos apresenta benefícios para pacientes com problemas dermatológicos, tais como herpes, acne e o vírus do papiloma humano. (Joubert, Gelderblom, Louw, & de Beer, 2008)

Considerado por muitos como uma excelente bebida, o Rooibos também tem a capacidade de tirar a sede e manter o corpo hidratado, tal como a água. ("Good Health Benefits," 2015)

## 1.3 Antioxidantes

A necessidade de oxigénio molecular, para produção de energia, é comum a todos os organismos aeróbios. No entanto, o oxigénio é um forte oxidante que pode ter consequências graves no metabolismo fisiológico, se os seus produtos não forem neutralizados por um sistema antioxidante eficiente. Para além do oxigénio, existem várias outras espécies oxidantes tais como os poluentes do ar, o tabaco e o fumo, as radiações UV, etc. Os radicais livres, moléculas instáveis que perderam um electrão, podem danificar o DNA das células, podendo desenvolver cancros e levando à oxidação do colesterol obstruindo os vasos sanguíneos. Em casos extremos poderão originar ataques cardíacos ou derrames. (Messias, 2009)



As células dos organismos vivos estão prevenidas com dois sistemas de defesa contra os danos dos radicais livres, um sistema de defesa enzimática e um sistema de defesa não enzimática, constituído por algumas vitaminas e por antioxidantes dietéticos. No entanto, muitas vezes estes sistemas não são suficientes e podem originar reacções indesejáveis que danificam tecidos.

Denominam-se como antioxidantes um conjunto heterogéneo de substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais, compostos vegetais e também enzimas que bloqueiam o efeito negativo dos radicais livres. Estes compostos retardam as reacções de degradação oxidativa, isto é, reduzem a velocidade de oxidação dos alimentos que levam a alterações na cor, sabor, textura e valor nutricional, por um ou mais mecanismos, podendo ser classificados como antioxidantes primários ou secundários.

Os antioxidantes primários são, por exemplo, compostos fenólicos que promovem a remoção ou inactivação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reacção, através da doação de átomos de hidrogénio ou electrões a estas moléculas, interrompendo a reacção em cadeia, e convertendo os radicais em substâncias estáveis. (Maria & Luzia, 2009)

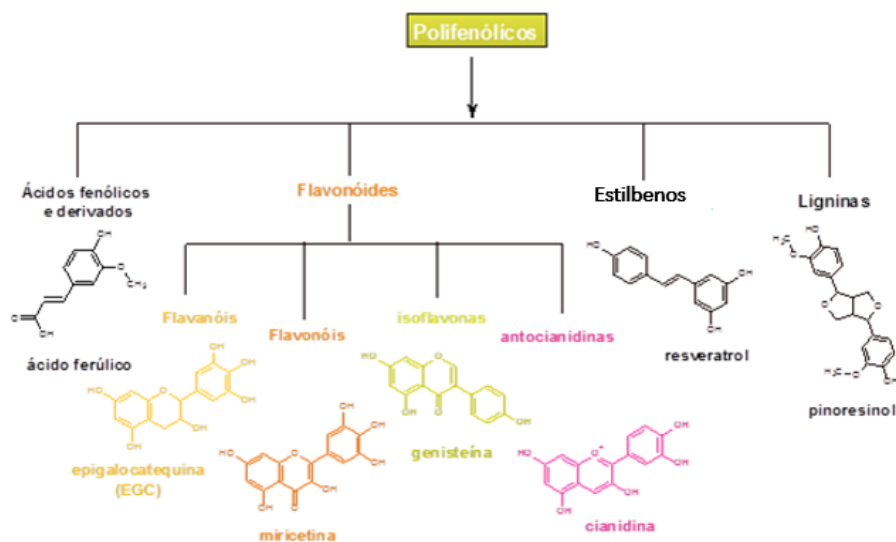
Os antioxidantes secundários retardam a reacção de autooxidação por diferentes mecanismos, sendo considerados como substâncias decompositoras de hidroperóxidos. Estes são transformados em produtos estáveis e, por isso, não reactivos. (J.L. Caetano, n.d.)

## **1.4 Compostos Polifenólicos**

Ao longo da última década, o interesse em estudar os compostos polifenólicos tornou-se cada vez maior. A principal razão para este crescente interesse reside no reconhecimento das propriedades antioxidantes associadas a estes compostos, a sua abundância na nossa alimentação e o seu possível papel na prevenção de inúmeras doenças, já referidas anteriormente. (Manach e col., 2004)

Quimicamente, caracterizam-se por terem na sua estrutura vários grupos hidroxilos em anéis aromáticos. Estas moléculas são metabolitos secundários das plantas, actuando como pigmentos e protector solar, como repelentes para insectos, como antimicrobianos e como antioxidantes. (Messias, 2009)

Estes compostos podem ser classificados em diversos grupos, em função do número de anéis fenólicos que contêm e dos elementos estruturais que ligam estes anéis a outros. Assim, pertencem ao grupo dos polifenóis os ácidos fenólicos, os flavonóides, os estilbenos e ligninas.



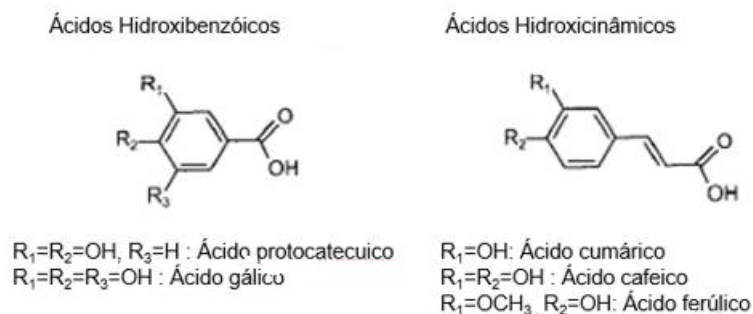
**Figura 7** – Classificação estrutural dos compostos polifenólicos.

### 1.4.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são metabolitos secundários amplamente dispersos no reino vegetal. Dividem-se em derivados do ácido benzoico e derivados do ácido cinâmico. Os ácidos hidrobenczóicos são componentes de estruturas complexas, como taninos hidrolisáveis, encontrando-se presentes em algumas frutas vermelhas. (M. Akram, 2011)

Fazem parte destes ácidos o ácido hidroxibenzzóico, gálico e elágico. Os ácidos hidroxicinâmicos são mais comuns do que os hidroxibenzzóicos e consistem maioritariamente no ácido p-coumárico, cafeico, ferúlico e sinápico.

Estes ácidos raramente se encontram em forma livre, excepto em alimentos processados que sofreram congelação, esterilização ou fermentação. As formas ligadas são derivados de glicosados ou de ésteres de ácido quínico, ácido chiquímico e ácido tartárico. O ácido cafeico e o ácido quínico combinam-se originando o ácido clorogénico, constituinte de muitos tipos de fruta e presente em altas concentrações no café. (Manach e col., 2004)

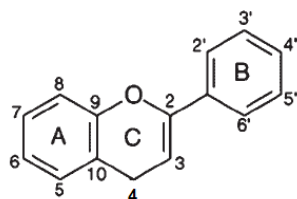


**Figura 8** - Representação dos vários tipos de ácidos fenólicos. (Messias, 2009)

### 1.4.2. Flavonóides

Os flavonóides são um grupo de polifenóis, de baixo peso molecular, que podem ser encontrados em quase todas as plantas superiores. Como referido, são produtos resultantes do metabolismo secundário das plantas e, como tal, encontram-se sempre presentes em quantidades muito pequenas. Actualmente, já foram identificadas mais de quatro mil substâncias pertencentes ao grupo dos flavonóides. Muitas das suas classes conferem cores – amarelo, laranja, vermelho, violeta e azul - a muitas flores, folhas e frutos. (Martinez, 2005) (Lopes, Oliveira, Nagem, & Pinto, 2000)

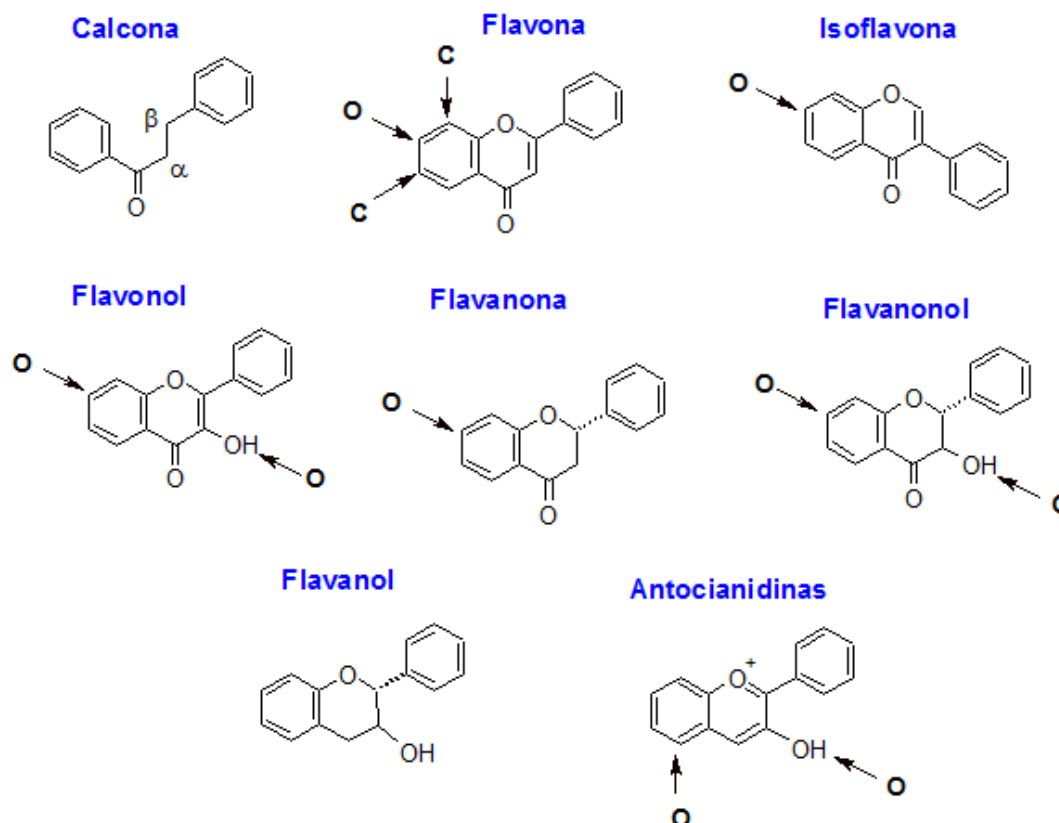
Os flavonóides possuem um núcleo base constituído por 15 átomos de carbono que adquire uma configuração C6-C3-C6, ou seja possuem dois anéis aromáticos (**A** e **B**) ligados por uma unidade de três carbonos, que pode ou não formar um terceiro anel (**C**), Figura 9.



**Figura 9** - Representação da estrutura base dos flavonóides. (Culebras & Tuñón, 2002)

Na Figura 10 estão representadas as estruturas bases das classes de flavonóides conhecidos. As calconas e as desidrocalconas (que contêm uma dupla ligação na ligação  $\alpha$  e  $\beta$ ) representam as duas classes de flavonóides nas quais o anel **C** se encontra aberto. As restantes classes são classificadas de acordo com o perfil de substituições no hereociclo, bem como pelo seu estado de oxidação, podendo ser chamados flavonas, flavonóis, flavonona, flavanóis, isoflavonas entre outros. Ainda dentro do grupo dos flavonóides pode encontrar-se a classe das antocianidinas, caracterizada por apresentar uma carga positiva na unidade básica da molécula, e a classe dos flavanóis

caracterizada pela ausência do grupo carbonilo em C<sub>4</sub> e pela presença de um grupo hidroxilo em C<sub>3</sub> (Cartaya, O; Reynaldo, 2001) (Manach et al., 2004) .



**Figura 10** - Estruturas base das principais classes de flavonóides. As setas indicam as posições mais comuns de O e C glicosilação (Adaptado de Vuckins and Guttam 2010)

Conforme dito anteriormente, a estrutura base dos flavonóides pode sofrer várias modificações, pela adição/redução de grupos hidroxilos, a metilação desses mesmos grupos em diversas posições, dimerizações, formação de bissulfatos e a formação de flavonóides O-glicosídeos ou C-glicosídeos. Nos O-glicosídeos, mais comuns nas plantas, a ligação do carboidrato à aglicona é feita através de uma ligação O-C, enquanto nos C-glicosídeos essa ligação estabelece-se através de uma ligação C-C. De uma forma geral, os açucares que se encontram ligados são maioritariamente glucose ou ramnose. (Vukics, Viktoria; Guttman, 2010)

#### 1.4.2 Actividade antioxidante dos flavonóides

A estrutura dos flavonóides influencia as diversas actividades biológicas que estes desempenham. Relativamente à actividade antioxidante característica deste grupo, a presença do grupo catecol no anel **B** confere uma maior estabilidade à forma radicalar, uma vez que contribui para uma maior deslocalização electrónica. Também a ligação dupla entre os carbonos 2 e 3, juntamente com a função 4-oxo do anel **C**, promove a deslocalização electrónica a partir do anel **B**. Finalmente, a disposição de grupos hidroxilos em posição meta nos carbonos 3 e 5, permite uma maior deslocalização do grupo 4-oxo para estes substituintes. (Culebras & Tuñón, 2002) (Martinez, 2005)

## 1.5 Métodos de Identificação de compostos fenólicos

A identificação e caracterização de compostos fenólicos tem sido realizada por HPLC-DAD-MS, com base nos tempos de retenção combinados com dados espectroscópicos e espectrofotométricos. O HPLC tem sido a técnica mais utilizada para separar, detectar e quantificar os antioxidantes de extractos de plantas. Várias combinações de colunas e fases móveis têm sido utilizadas para análises de várias classes de compostos, como os ácidos fenólicos, flavonóides, antocianinas, entre outros. A maioria dos trabalhos é feita recorrendo a uma coluna de fase reversa C18, com sistemas de solventes binários, um eluente aquoso acidificado e um eluente polar, normalmente acetonitrilo ou metanol. Quando se trabalha nestas condições os compostos mais polares presentes na amostra eluem primeiro seguidos de compostos com polaridade inferior. Pode referir-se, como exemplo, que o ácido benzóico e compostos derivados eluem antes dos correspondentes ácidos cinâmicos e seus derivados. A substituição dos grupos OH no anel benzénico por grupos metoxi, diminui a polaridade do composto e o tempo de retenção aumenta. A ordem de eluição cromatográfica para a família dos flavonóides é por isso: glicósidos de flavanonas seguido de glicósidos de flavonóis, depois glicósidos de flavonas e por fim as agliconas na mesma ordem de eluição. (Rijke e col., 2006)

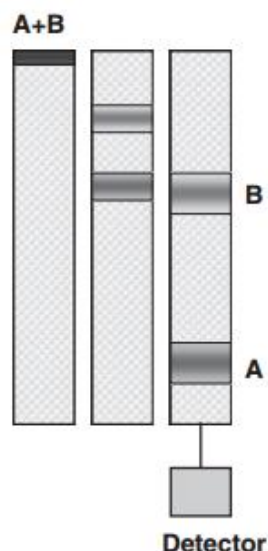
No presente trabalho, foram optimizadas metodologias analíticas para a caracterização e quantificação dos compostos fenólicos dos extractos aquosos de roibos, recorrendo à cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa sequencial com ionização por *electrospray* (HPLC-ESI-QIT/MS<sup>n</sup>).

Em seguida, apresenta-se um breve resumo dos métodos utilizados para este efeito.

### 1.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida é uma técnica de separação física conduzida na fase líquida, a alta pressão, muito utilizada para a análise qualitativa e quantitativa de misturas. A amostra é separada nos seus constituintes, ou analitos, através da sua distribuição entre uma fase móvel e uma fase estacionária.

Os principais componentes de um sistema de HPLC são a bomba, o injector, a coluna, o detector e o computador. Estes elementos compõem um circuito através do qual a fase móvel, constituída pela mistura em estudo, viaja pela fase estacionária, onde o enchimento da coluna interage com os componentes da fase móvel, fazendo com que eluam a diferentes tempos. Existem vários tipos de cromatografia líquida sendo que, neste trabalho em específico, se utilizou a cromatografia líquida de fase reversa, onde a fase estacionária é apolar e a fase móvel é constituída por água e um solvente orgânico. Os componentes com maior afinidade pela fase estacionária vão ficar retidos na coluna e, por isso, têm um maior tempo de retenção, enquanto os componentes com maior afinidade pela fase móvel possuem tempos de retenção menores, sendo então eluídos mais rapidamente.



**Figura 11** - Representação esquemática da separação de componentes na cromatografia. (W. Dong, 2006)

A bomba pode alcançar pressões entre os 6000 e 9000 psi ao bombear a fase móvel através da fase estacionária com um caudal específico, normalmente  $0.2-1 \text{ mLmin}^{-1}$ . Se a bomba passar uma composição de fase móvel constante, denomina-se eluição isocrática. Caso varie a sua composição, trata-se de uma eluição por gradiente. Esta última é a mais adequada para misturas complexas e desconhecidas. É também importante garantir que os solventes estão desgaseificados antes de serem utilizados, uma vez que as bolhas de ar podem causar variações na pressão do sistema, perturbando desta forma o sinal do detector. Esta desgaseificação pode ser feita por ultra-sons, através de micro filtros de vidro e por pulverização do solvente com um gás inerte, por exemplo o hélio. (McMaster, 2006)

Os volumes típicos de injeção da amostra na corrente da fase móvel variam entre os 5 e 20  $\mu\text{L}$ . Este sistema deve ser capaz de suportar as altas pressões do sistema líquido.

A coluna, fase estacionária, considerada como o coração do sistema, é quem separa os componentes através de parâmetros físicos e químicos. É importante manter um controlo da temperatura na coluna, pois oscilações na mesma podem alterar a reproductibilidade do sistema, bem como a solubilidade e estabilidade de alguns compostos. Nestes sistemas, as colunas mais utilizadas, geralmente de aço inoxidável, possuem como empacotamento partículas porosas de sílica quimicamente ligada. Dependendo do tipo de grupos R ligados, assim as fases estacionárias apresentam características de polaridade/interacções diferentes.

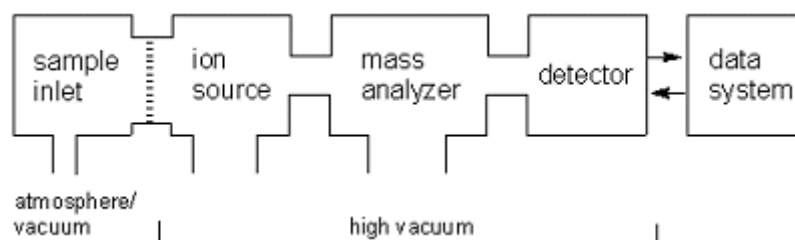
Existem vários tipos de detectores que podem ser incorporados neste sistema, sendo que os mais comuns são os de absorção de radiação ultra violeta e visível, UV-Vis, índice de refração, RI, fluorescência, electroquímico e espectrometria de massa. Este mede a quantidade das moléculas para que, posteriormente, estas se possam quantificar. O detector está ligado a um computador que fornece então o cromatograma final, onde estão determinados os tempos de retenção dos compostos, bem

como as áreas de cada pico. Para além disso, o computador também controla todos os módulos do sistema de HPLC. (Agilent Technologies Incorporated, 2012) (W. Dong, 2006)

### 1.5.2 Espectrometria de Massa

A espectrometria de massa é uma poderosa técnica analítica utilizada para quantificar os materiais conhecidos, para identificar compostos desconhecidos dentro de uma amostra e para elucidar a estrutura e propriedades químicas de moléculas diferentes. Qualquer que seja o espectrómetro de massa utilizado, o processo envolve a conversão completa da amostra em iões gasosos, com ou sem fragmentação, que são então caracterizados pelas duas razões,  $m/z$ , e abundância relativa. ("Mass Spectrometry," n.d.)

Os componentes básicos de um espectrómetro de massa incluem o sistema de introdução da amostra, a fonte de ionização onde os analitos são vaporizados e produzidos os iões, o analisador onde os iões são separados de acordo com a sua razão  $m/z$  e, o detector onde a corrente iónica é transformada em sinal eléctrico e a intensidade do sinal de cada valor de  $m/z$  separado é determinada e transmitida a um sistema de controlo, aquisição e tratamento de dados. Ao processar os dados, o computador devolve um gráfico em que o eixo das ordenadas apresenta a intensidade relativa do sinal (%) e no eixo das abcissas a razão  $m/z$ . Todo o processo, desde a fonte de ionização até ao detector, é realizado sob alto vácuo, de modo a evitar colisões entre os iões e o gás de fundo durante o percurso e evitar a ocorrência de reacções ião-molécula o sistema de alto vácuo.



**Figura 12** - Representação esquemática dos componentes básicos de um espectrómetro de massa.

O método de ionização, bem como o tipo de analisador, determinam o alcance e utilidade do método. De entre as várias técnicas de ionização existentes, as mais comuns são a ionização electrónica, EI e a ionização química, CI, as de ionização à pressão atmosférica, que incluem a ionização por *electrospray*, ESI, e a ionização química à pressão atmosférica, APCI. Finalmente a ionização por desadsorção laser assistida por matriz, MALDI.

Existem também uma variedade de analisadores que são, tal como a coluna no HPLC, o coração do sistema. A escolha do analisador influencia directamente a resolução e a precisão dos resultados obtidos. Salientam-se como analisadores mais comuns, de baixa resolução, o quadrupolo, Q, o triplo quadrupolo QqQ e a armadilha de iões (quadrupolar, QIT ou linear, LIT). Hoje em dia os analisadores de alta resolução mais usados incluem os tempos de voo (TOF), o orbitrap, e o de ressonância ciclotrónica de iões com transformada de Fourier (FTICR). Há também a possibilidade de

acoplar analisadores de modo a obter informações mais completas dos compostos do que quando utilizados individualmente. (Greaves, John; Roboz, 2008)

Neste trabalho em específico, a fonte de ionização utilizada foi a de *electrospray* e o analisador uma armadilha de iões quadrupolar, para identificação dos compostos.

#### **1.5.2.1 Ionização por *Electrospray* (ESI)**

Este método é baseado na aplicação de uma corrente de alta voltagem (2-5 kV) a um solvente condutor, onde se encontra o analito dissolvido, fazendo com que a solução seja bombeada, a um caudal baixo, através da agulha de *electrospray*. A solução elui do capilar para uma câmara à pressão atmosférica, produzindo um *spray* de gotas altamente carregadas devido à presença de um campo eléctrico. Este processo é denominado nebulização. Uma combinação de meios térmicos e pneumáticos é usada para dessolvatar (evaporação do solvente) os iões à medida que estes entram na fonte. O solvente que contém as gotas é evaporado por uma contra corrente de um gás de secagem inerte, azoto por exemplo, fazendo com que a densidade da carga aumente até ao ponto em que as forças de repulsão são da mesma ordem que a tensão superficial da gota. Assim, atinge-se a chamada explosão de Coulomb, onde uma gota se fragmenta em inúmeras gotas mais pequenas que passam novamente por este processo, culminando na forma de iões. Uma alternativa é a evaporação dos iões através da superfície da gota. Qualquer que seja o mecanismo, o *electrospray* é um método de ionização suave, que não causa praticamente nenhuma fragmentação da amostra.

A fonte de ionização de *electrospray* está a uma pressão atmosférica muito elevada, em comparação com pressão muito baixa requerida para a separação dos iões no analisador de massa. Assim, a interface entre as duas envolve uma série de cones *skimmer*, entre as diferentes regiões bombeadas, a que é aplicada uma voltagem, chamada voltagem de cone, que vai acelerar a passagem dos iões.

A ionização por *electrospray* é compatível com compostos polares e requer um solvente condutor, fazendo com que esta técnica seja compatível com a cromatografia líquida de alta resolução e, conseqüentemente, com uma larga gama de compostos que são tipicamente analisados por cromatografia. Uma das desvantagens desta técnica é que, em misturas, favorece os componentes mais polares, mesmo quando esses componentes se encontram em menores quantidades. (Greaves, John; Roboz, 2008) (McIndoe, J S; Henderson, 2005)



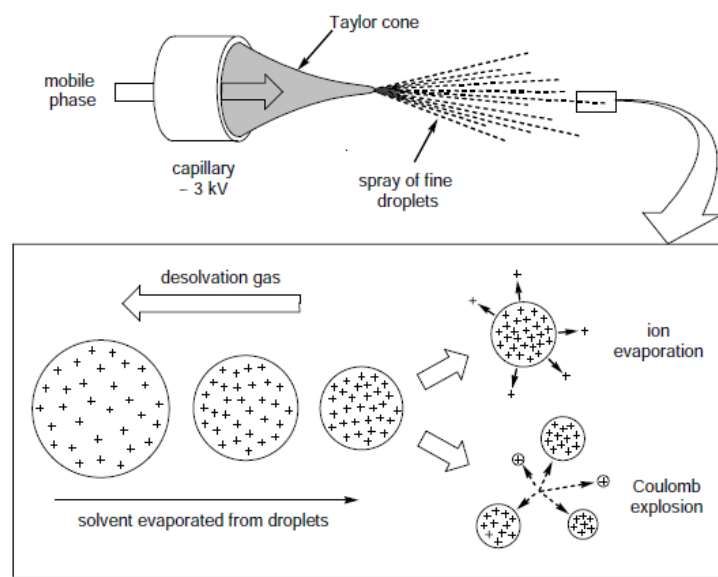


Figura 13 - Representação esquemática da interface ESI. (McIndoe, J S; Henderson, 2005)

### 1.5.2.2 Analisador armadilha de iões quadrupolar (QIT)

A armadilha de iões quadrupolar consiste em três eléctrodos hiperbólicos, um em forma de anel e dois eléctrodos “*endcap*” que, quando sujeitos à acção de um campo de radiofrequências tridimensional, confina os iões no analisador. O campo eléctrico hiperbólico cria trajectórias estáveis para os iões com um determinado intervalo de  $m/z$  que, para uma maior eficiência devem estar focalizados perto do centro, onde os campos de armadilha estão mais perto e o menos distorcido possível, maximizando assim a resolução e a sensibilidade. A introdução de um gás de amortecimento (hélio geralmente), ao colidir com os iões aprisionados, amortece as oscilações dos mesmos até estes estabilizarem. Aumentando o potencial RF ou, aplicando mais potenciais aos eléctrodos *endcap*, é possível destabilizar os iões e ejectá-los progressivamente da armadilha em direcção ao detector, ou armazenar apenas um ião de um determinado  $m/z$ , fragmentá-lo por dissociações induzidas por colisões e observar os fragmentos. Esta última técnica é denominada por espectrometria de massa sequencial (MS/MS).

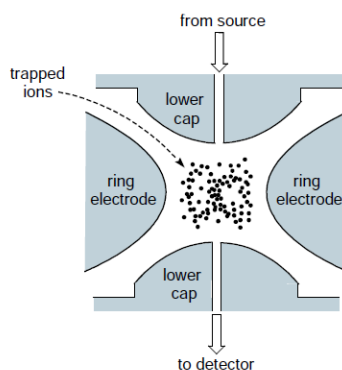


Figura 14 - Representação esquemática da armadilha de iões quadrupolar (QIT) (McIndoe, J S; Henderson, 2005)

A resolução e a performance de uma armadilha de iões depende da densidade da carga dos iões. Se muitos iões estiverem presentes ao mesmo tempo, os campos eléctricos ficam distorcidos. Também podem ocorrer colisões de iões, levando à dissociação dos mesmos ou a reacções químicas inesperadas, que acabam por afectar o espectro e a consequente a quantificação da amostra. Estes analisadores são mecanicamente simples tendo um bom desempenho, elevada sensibilidade e permitem a realização de experiências de espectrometria de massa sequencial, através de medições sequenciais de massa, no tempo. (March, 2000) (McIndoe, J S; Henderson, 2005)



**Figura 15** - Representação dos eléctrodos do QIT.

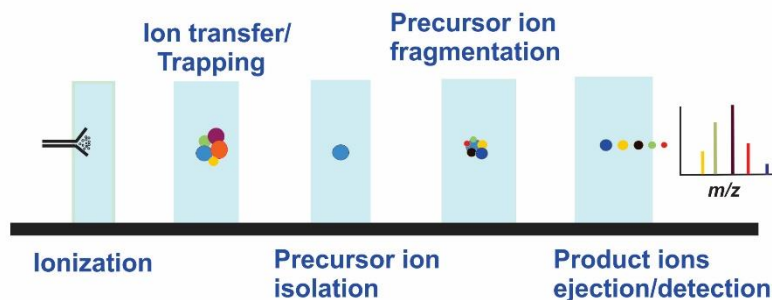
#### **1.5.2.4 Detector**

O papel do detector é converter a energia das partículas num sinal de corrente, que é registado por aparelhos electrónicos, e transferido para o computador de aquisição de dados do sistema. O detector determina a abundância dos iões de diferentes  $m/z$ , depois de estes terem sido separados no analisador. Também são denominados como multiplicadores, porque amplificam a baixa corrente produzida pelos iões que chegam até à superfície do detector. A trajectória dos iões desde a fonte ao analisador e por fim ao detector, constitui uma corrente iónica. (Greaves, John; Roboz, 2008)

#### **1.5.2.5 Espectrometria de Massa Sequencial (MS/MS)**

A necessidade de investigar não só a massa, mas também a estrutura dos iões, foi um factor importante no desenvolvimento da espectrometria de massa com múltiplos analisadores. A espectrometria de massa sequencial (MS/MS) engloba, pelo menos, duas fases de análise de massa. Na prática, um primeiro analisador é utilizado para isolar o ião precursor, o qual, ao sofrer fragmentação por colisão com um gás inerte, produz iões produto e fragmentos neutros, sendo os iões produto então analisados pelo analisador de massa seguinte. A espectrometria de massa MS/MS pode ser realizada no espaço por acoplamento de dois espectrómetros de massa como um quadrupólo e um TOF, ou no

tempo através de uma sequência de eventos num dispositivo de armazenamento de iões (QIT, LT e ICR). De uma forma geral, a análise de massa sequencial MS/M envolve a selecção, fragmentação e análise de massa dos iões produtos (Figura 16). O método mais usado para fragmentar os iões é a dissociação induzida por colisão, CID. Neste método o ião precursor, após ser isolado, é fragmentado por colisões energéticas com um gás inerte, hélio ou árgon, uma vez que a energia cinética do ião vai aumentar, sendo transformada em energia vibracional, e, conseqüentemente, ocorrendo uma quebra das ligações químicas. Desta forma, analisam-se e separam-se os iões produtos, de acordo com a sua razão  $m/z$ .



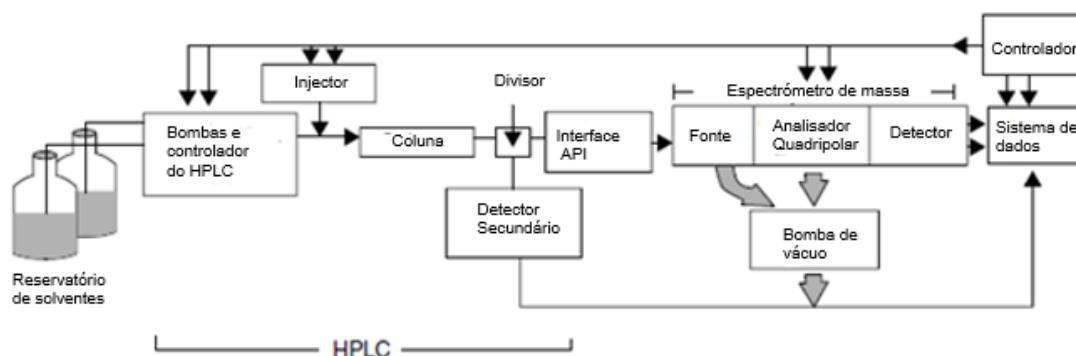
**Figura 16** – Representação esquemática de uma experiência de massa sequencial.

As armadilhas de iões têm a capacidade de repetir ciclos de MS/MS, denominados como  $MS^n$ , em que  $n$  representa o número de operações MS realizadas e  $n-1$  representa as vezes que o ciclo de isolamento e fragmentação foi realizado. Os aparelhos mais modernos já são capazes de fragmentar progressivamente até 10 ciclos, apesar da perda de iões em cada estado de MS indicar que a utilidade efectiva desta metodologia raramente se estende muito além do  $MS^3$  ou  $MS^4$ . (Greaves, John; Roboz, 2008) (McIndoe, J S; Henderson, 2005)

### 1.5.3 LC-MS

A cromatografia líquida, LC, combinada com a espectrometria de massa, MS, forma uma poderosa ferramenta analítica de laboratório. A cromatografia líquida de alta resolução, HPLC, tem sido desde 1970 a técnica laboratorial mais utilizada para separação, análise e purificação de misturas orgânicas. Uma coluna de HPLC consegue separar quase qualquer mistura que possa ser dissolvida. O espectrómetro de massa consegue ionizar o pico separado da solução e providenciar a massa

molecular para cada componente pico. Um sistema LC/MS/MS consegue fragmentar o ião precursor em diferentes fragmentos e consegue separar os iões produtos para identificação e quantificação.



**Figura 17** - Representação esquemática de um sistema LC/MS. (McMaster, 2006)

O acoplamento destas duas técnicas acarreta algumas dificuldades. Por exemplo, 1 mL da maioria dos solventes orgânicos produz cerca de 1000 mL de vapor na evaporação, a temperatura e pressão normal. Estes elevados volumes de vapor são incompatíveis com o vácuo necessário para o sistema de massa. A velocidade de separação dos compostos, resolução do pico, tamanho do sistema e o custo em determinadas situações, pode ser também considerado como uma limitação a esta técnica.

Contudo, o desenvolvimento de técnicas de ionização à pressão atmosférica, API, faz com que o solvente seja removido e a ionização ocorra fora da câmara de vácuo. Estas técnicas também permitiram eliminar, ou pelo menos reduzir, o problema de vaporizar compostos polares sem os destruir. (McMaster, 2006) No entanto, alguns parâmetros do solvente afectam a estabilidade do spray, apesar de este possuir estabilidade numa variada gama de solventes, mesmo com misturas complexas e com velocidades de caudal baixas. Se o caudal for alto a amostra não consegue ser toda vaporizada e acaba por condensar na fonte. Daí o sistema LC-MS usar caudais baixos e colunas pequenas, garantindo uma determinada pressão no sistema e uma total ionização na fonte.

Apesar da performance e fiabilidade desta técnica estar a aumentar, é requerida uma maior atenção e manutenção do que um sistema individual de LC. Com inúmeras aplicações em áreas distintas, esta técnica é a mais utilizada para análise de qualquer mistura de compostos complexos, em que o HPLC é a técnica escolhida para separação e o espectrómetro de massa para fornecer informações qualitativas e estruturais da amostra. (Pitt, 2009)

## 1.6 Quantificação e Identificação

O método de separação utilizando HPLC acoplado à espectrometria de massa sequencial é presentemente o mais utilizado para a detecção e quantificação de flavonóides em extractos naturais. A monitorização de reacções múltiplas (MRM) garantem a sensibilidade e selectividade necessárias para a detecção e quantificação dos principais compostos, que conferem ao roibos maior capacidade

antioxidante. A quantificação vai ser feita através da construção de uma curva de calibração, numa gama linear de concentrações de padrão do flavonóide a analisar. Os resultados a interpretar são os cromatogramas iónicos e as grandezas analíticas medidas em relação ao flavonóide e respectivo padrão são o tempo de retenção, a intensidade dos picos e amplitude do ruído. O limite de quantificação (LQ) é determinado pela concentração de flavonóide à qual a razão de sinal/ruído (S/N) é igual a 10 e o limite de detecção (LD) é determinado pela concentração de à qual a razão de sinal/ruído (S/N) é igual a 3.

### **1.6.1 Parâmetros a analisar**

Os requisitos mínimos para a validação de procedimentos analíticos dependem do método em causa e compreendem o estudo e conhecimento de alguns parâmetros. Em análises quantitativas incluem a gama de trabalho, os limiares analíticos, sensibilidade, precisão e exactidão. (Castro, 2000)

#### **1.6.1.2 Especificidade e Selectividade**

A selectividade é a capacidade de um método identificar e distinguir um analito, geralmente numa mistura complexa e sem interferência de outros componentes.

A especificidade permite garantir que a grandeza medida provém apenas do analito, analisando a possível interferência de outras substâncias eventualmente presentes na amostra.

Um método analítico pode ser considerado aplicável, logo específico e selectivo, quando na prática e após a realização de testes de recuperação, se verificar que as taxas de recuperação são próximas de 100%. (Expert, 2005)

#### **1.6.1.3 Gama de trabalho e linearidade**

Em análises quantitativas, a calibração indica um processo pelo qual a resposta de um sistema de medida se relaciona com uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida.

A linearidade de um procedimento analítico é a capacidade de obter resultados que sejam directamente proporcionais à concentração do analito na amostra. Esta deve ser inspeccionada visualmente, de modo a verificar se há uma relação linear entre o sinal medido (área ou altura do pico cromatográfico) e a massa ou concentração do analito a ser quantificado. Esta correlação pode ser expressa matematicamente como uma equação da recta do tipo  $y = a + bx$ . Também é possível calcular o coeficiente de correlação,  $r$ , que permite avaliar a qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1 menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. (Expert, 2005)

A gama de trabalho é o intervalo entre o limite superior e inferior de concentração do analito na amostra, em que tenha sido demonstrado que o procedimento analítico apresenta um nível adequado de precisão, exactidão e linearidade. (Ludwig Huber, 2010)

#### **1.6.1.4 Sensibilidade e Limiares Analíticos**

A sensibilidade avalia a capacidade de um método, ou equipamento, para distinguir pequenas concentrações de um analito. É definida como sendo a derivada de primeira ordem da curva de

calibração, nessa zona de concentração. Caso a curva seja definida por um modelo linear, a sensibilidade é constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive da recta de calibração. (Castro, 2000) Embora relacionadas entre si, a sensibilidade não deve ser confundida com o limite de detecção nem com o limite de quantificação, que estão relacionados com a capacidade de o método detectar concentrações baixas.

### **Limite de Detecção**

O limite de detecção (LD) de um método representa o teor mínimo medido, a partir do qual é possível detectar a presença do analito com uma certeza estatística razoável. Corresponde à mais pequena quantidade de substância a analisar que pode ser detectada numa amostra, mas não necessariamente quantificada como valor exacto. (Ludwig Huber, 2010)

Em termos quantitativos, o caso geral, pode ser dado por:

$$L. D. = X_0 + K\sigma_0 \quad (\text{Equação 1})$$

Em que,  $X_0$  representa a média aritmética do teor medido de uma serie de brancos ou padrões vestígio e  $\sigma_0$  representa o desvio padrão associado a  $X_0$ . Assumindo que a probabilidade de  $X_0$  é gaussiana, então K assume o valor de 3,3 para um nível de confiança de 99,7%.

Caso o método envolva a utilização de uma calibração linear, passa a representar-se por:

$$L. D. = \frac{\left[3,3 \frac{S_y}{\bar{x}}\right]}{b} \quad (\text{Equação 2})$$

Em que  $\frac{S_y}{\bar{x}}$  é o desvio padrão residual da curva de calibração e  $b$  é o declive da mesma.

### **Limite de Quantificação**

Este limite (LQ) corresponde à menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exactidão e precisão. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração, excluindo o branco. (Ludwig Huber, 2010)

No caso geral é dado por:

$$L. Q. = X_0 + 10 \sigma_0 \quad (\text{Equação 3})$$

No caso do método envolver uma calibração linear:

$$L. Q. = \frac{\left[10 \frac{S_y}{\bar{x}}\right]}{b} \quad (\text{Equação 4})$$

#### **1.6.1.5 Precisão**

A precisão de um método é uma medida de dispersão que caracteriza os valores analíticos em redor de uma média. É definida como o grau de concordância entre uma series de medições obtidas de múltiplos ensaios da mesma amostra, em condições definidas. (Ludwig Huber, 2010)

Usualmente é avaliada pela estimativa do desvio padrão absoluto ( $s$ ) e através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV). (M. Cassiano, C. Barreiro, R.R Martins, Q.B. & Cass, 2009)

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{Equação 5})$$

Em que  $\bar{x}$  é a média aritmética de um pequeno número de medições,  $x_i$  é o valor individual de uma medição e  $n$  representa o número de medições.

$$RSD (\%) \text{ ou } CV (\%) = \left(\frac{s}{\bar{x}}\right) \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

A precisão pode ser definida a três níveis:

#### **Repetibilidade (precisão intradia)**

Expressa a precisão nas mesmas condições de operação, durante um curto intervalo de tempo, tais como o mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento e mesmo tipo de reagentes. Pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição ao branco de várias concentrações da gama de trabalho.

Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade,  $r$ , é avaliado segundo

$$r = t \times \sqrt{2} \times S_{ri} = 1,96 \times \sqrt{2} \times \sqrt{S_{ri}^2} \quad (\text{Equação 7})$$

Sendo que :

$S_{ri}$  é o desvio padrão de repetibilidade associado aos resultados considerados.

#### **Precisão Intermédia (precisão interdia)**

Refere-se a variações sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, relativas à diferença de analistas, equipamentos, épocas e calibração, mas definindo exactamente quais as condições a variar. O objectivo é verificar que, no mesmo laboratório, o método providencia os mesmos resultados, uma vez terminada a fase de desenvolvimento.

#### **Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial)**

Expressa a precisão entre laboratórios. O objectivo passa por verificar que o método vai providenciar o mesmo resultado em diferentes laboratórios.

#### **1.6.1.6 Exactidão**

A exactidão dos métodos de ensaio é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro. Quando aplicado a um serie de resultados de ensaio, implica uma combinação de componentes de erros aleatórios e de erros sistemáticos.

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exactidão de uma metodologia são geralmente os materiais de referência certificados, ensaios interlaboratoriais, testes comparativos e ensaios de recuperação. (Castro, 2000)



## 2 Parte Experimental

### 2.1 Reagentes

Na preparação dos extractos e das fases móveis foram utilizados metanol e acetonitrilo da gama LC-MS da *Fisher Scientific* (Loughborough, Leicestershire, UK), ácido fórmico da Agros Organics (Geel, Belgium) e água desionizada (Millipore Simplicity® Simpak 2, R=18.2 MΩ.cm, USA). Os padrões rutina, orientina e aspalatina foram adquiridos à *Sigma–Aldrich* (Steinheim, Germany). O padrão aspalatina foi armazenado à temperatura de -20 °C, enquanto os outros dois padrões foram mantidos a 5 °C. As embalagens comerciais contendo cápsulas de RedEspresso e amostras de roibos fermentado usado no encapsulamento foram disponibilizadas pela Delta Cafés.

### 2.2 Material

- Balança analítica – Mettler AT 201 ( $\pm 0.00001$ g).
- Banho de ultra-sons – Bandelin Sonorex.
- Aparelho de filtração de solventes – Millipore equipado com filtros de membrana de acetato de celulose de 0.20  $\mu$ m.
- Aparelho de purificação de água – Millipore de Simplicity Simpak 2, R=18MΩ, USA.
- Material volumétrico de classe A.
- Material de vidro diverso.
- Máquina de café Qool Manual da Delta Q.

### 2.3. Preparação das soluções

O expresso de chá roibos da cápsula RedEspresso foi obtido por extracção na máquina Qool Manual da Delta Q. Antes de cada extracção a máquina foi purgada com água millipore, até se garantir que não havia resíduos de chá no sistema. De acordo com o descritivo na embalagem RedEspresso, cada cápsula contém 4,5 g de roibos que foi extraído com 50 mL de água, durante cerca de 30 segundos. Uma solução de trabalho foi preparada retirando uma alíquota de 20  $\mu$ L do extracto e diluída em 200  $\mu$ L de água, a  $t = 30$  s (logo após a extracção) e  $t = 5$ h. A solução a analisar foi preparada retirando uma alíquota de 100  $\mu$ L de solução de trabalho e diluída em 200  $\mu$ L de água.

A infusão de roibos foi preparada a partir de 1,5 g de roibos fermentado e colocadas de infusão em 150 mL de água millipore à temperatura de cerca de 100 °C durante cerca de 5 min. Foram retiradas alíquotas de 100  $\mu$ L de infusão que foram diluídas em 200  $\mu$ L de água, a  $t = 0$  min,  $t = 5$ min e  $t = 5$  horas. Destas soluções foram preparadas as soluções a analisar, retirando alíquotas de 100  $\mu$ L que foram diluídas em 100  $\mu$ L de água.

A solução padrão da rutina foi preparada pesando 1 mg de rutina e diluindo em 5mL de metanol, obtendo uma concentração da solução mãe de  $3,28 \times 10^{-4}$  M. A partir desta solução foram preparadas as soluções para a curva de concentração numa gama de valores entre 0,12 e 0,84 ppm.

A solução padrão da orientina foi preparada pesando 1 mg de orientina e diluindo em 5 ml de metanol, obtendo uma concentração de  $4,5 \times 10^{-4}$  M. A solução mãe foi armazenada e a partir desta solução foram preparadas as soluções para a curva de concentração numa gama de valores entre 0,26 e 0,09 ppm.

A solução padrão da aspalatina foi preparada 0,25 mg diluída em 5mL de metanol, obtendo uma concentração de  $1,1 \times 10^{-4}$  M e armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , como recomendada pelo fabricante.

## 2.2 Condições de análise

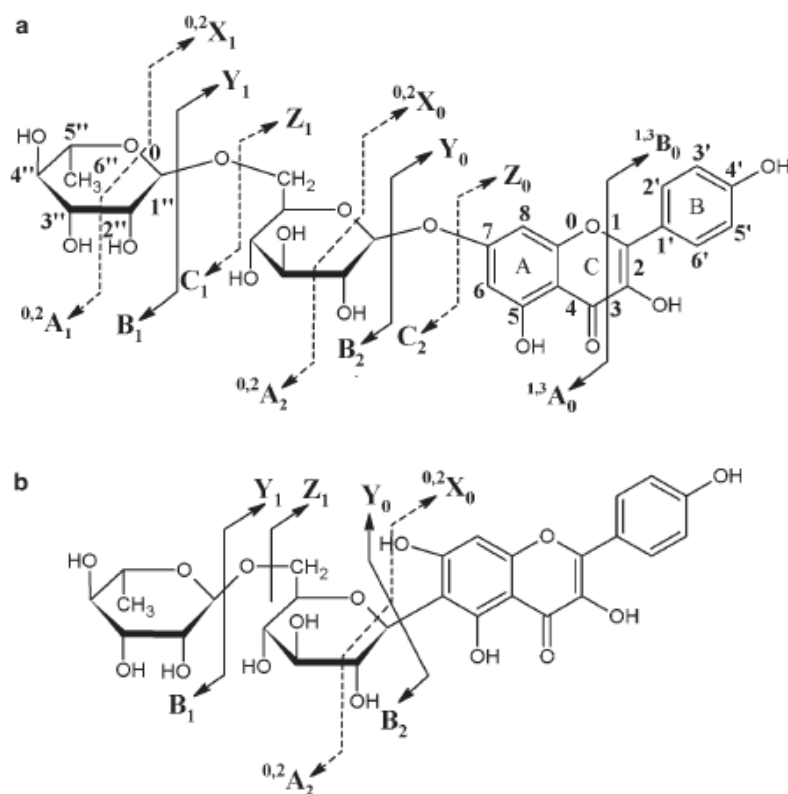
Os extractos de rooibos foram inicialmente analisados num sistema HPLC-DAD-MS constituído por um amostrador automático ProStar 410, duas bombas cromatográficas 210-LC, num detector de matriz de díodos ProStar335 (Varian, Inc.), acoplado a um espectrómetro de massa com armadilha de iões 500-MS LCQ *Fleet*, equipado com uma fonte de iões ESI (*Thermo Scientific*). Uma amostra (20  $\mu\text{L}$ ) foi injectada na coluna através de um injetor Rheodyne com um loop de 100  $\mu\text{L}$ , no modo de injeção *pickup*. As separações foram realizadas a temperatura controlada de  $30^{\circ}\text{C}$ , com um caudal de  $0,800 \text{ mLmin}^{-1}$ , usando uma coluna Kinetex C18 100 A (150mm x 4,60mm,  $5\mu\text{m}$ , Phenomenex). A fase móvel é constituída por água acidulada, com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (A) e por acetonitrilo (B), sendo o gradiente utilizado o seguinte: 0 – 20min gradiente linear de 20% a 40% B, 25-30min gradiente linear de 40% a 5% B e de 30-35 min gradiente isocrático de 5% B. A detecção dos constituintes da amostra foi monitorizada aos c.d.o. 280 e 350 nm. Antes de entrar no espectrómetro de massa o caudal do eluente foi diminuído para cerca de  $0,260 \text{ mLmin}^{-1}$  colocando um divisor de caudal pós-coluna. A análise dos cromatogramas de DAD foi realizada com o *software* Varian MS Control 6.9.3 Workstation.

Os ensaios de LC-MS foram realizados com um HPLC *Dionex Ultimate 3000*, composto por uma bomba binária HPG3200, um amostrador automático WPS300 e um forno de coluna TCC3000 acoplado em linha com um espectrómetro de massa de armadilha de iões LCQ *Fleet*, equipado com uma fonte de iões ESI (*Thermo Scientific*). Uma amostra (10  $\mu\text{L}$ ) foi injectada na coluna através de um injetor Rheodyne com um loop de 25  $\mu\text{L}$ . As separações foram realizadas a temperatura controlada de  $30^{\circ}\text{C}$ , com um caudal de  $0,350 \text{ mLmin}^{-1}$ , através de uma coluna Kinetex C18 100 A (150mm x 4,60mm,  $5\mu\text{m}$ , Phenomenex), usando o seguinte gradiente de eluição: 0-20 min gradiente linear de 5% a 15% B, 20-25 min linear de 15% a 50% de B, 25-30 min linear de 50 a 100% B, 30-35 min isocrático 100% B e de 35-40 min de 100% a 5% de B. A coluna foi reequilibrada durante 10 minutos.

A ionização ESI foi efectuada em modo negativo, e os parâmetros instrumentais foram optimizados para o padrão rutina: voltagem do spray de ionização, -4,5 kV; voltagem do capilar de transferência, -18 V; tensão das lentes de focagem, 58 V; gás de nebulização ( $\text{N}_2$ ), 80 unidades arbitrárias; gás de secagem, 10 unidades arbitrárias, temperatura do capilar de transferência,  $270^{\circ}\text{C}$ . Os espectros correspondem à média de 20-35 digitalizações e foram adquiridos num intervalo de 100-1500 Da. Os espectros de espectrometria de massa sequencial  $\text{MS}^n$  ( $n=2,3$ ) (ensaios de colisões

induzidas por dissociações) foram traçadas usando uma janela de isolamento de 2 Da, uma % energia de colisão entre 20 - 30 V, e um tempo de activação de 30 ms. A aquisição e processamento de dados foi realizada utilizando o *software* Xcalibur 2.2 SP1.48.

A nomenclatura dos iões observados nos espectros de MS/MS segue a proposta por Claeys e colaboradores (Ma *et al.*, 1977) para flavonóides, e por Domon e Costello, 1988 para glicoconjugados e subsequentemente adaptada por Li e Claeys (1994) para flavonóides glicosídeos. A identificação das subclasses de flavonóides é feita através das fragmentações das respectivas agliconas. As fragmentações mais úteis na identificação de agliconas são as que requerem quebra de duas ligações C-C no anel C e resultam em iões estruturalmente informativos,  $^{i,j}A^-$  e  $^{i,j}B^-$ . Estes iões resultam de reacções de retro-Diels-Alder (RDA) e são os melhores fragmentos de diagnóstico para a identificação de flavonóides, uma vez que proporcionam informação sobre o número e o tipo de substituintes nos anéis A e B. As designações  $^{i,j}A^-$  e  $^{i,j}B^-$  referem-se aos fragmentos que contêm intactos os anéis A e B, respectivamente, enquanto o subscrito i e j indicam as ligações do anel C que foram quebradas. Na Tabela 1 apresentam-se as perdas características observadas nos O- e C- glicosídicos.



**Figura 18** – Nomenclatura normalmente usada para designar os fragmentos gerados a partir de a) O-glicosídeos; b) C,O- e C-glicosídeos. Adaptado de Vuckins and Guttam, 2010.

Tabela 1 – Perdas características observadas nos flavonóides O e C-glicosídicos.

Fragmentos	Hexoses	Deoxihexoses	Pentoses
	Massas (Da)		
- <sup>0,1</sup> X	150	134	120
- <sup>0,2</sup> X	120	104	90
- <sup>0,3</sup> X	90	74	60
- <sup>1,5</sup> X	134	120	104
- <sup>2,3</sup> X-2H <sub>2</sub> O	66	66	
- <sup>0,4</sup> X-2H <sub>2</sub> O	96	80	66
- <sup>0,2</sup> X-H <sub>2</sub> O	138	122	108
- <sup>0,2</sup> X-2H <sub>2</sub> O	156	140	126
- <sup>2,3</sup> X-3H <sub>2</sub> O	84	84	
-Y <sub>i</sub>	162	146	132
-Z <sub>i</sub>	180	164	150

Adaptado de Vukics and Guttman, *Mass Spectrom. Rev.* 2010, 29, 1

### 3 Resultados e Discussão

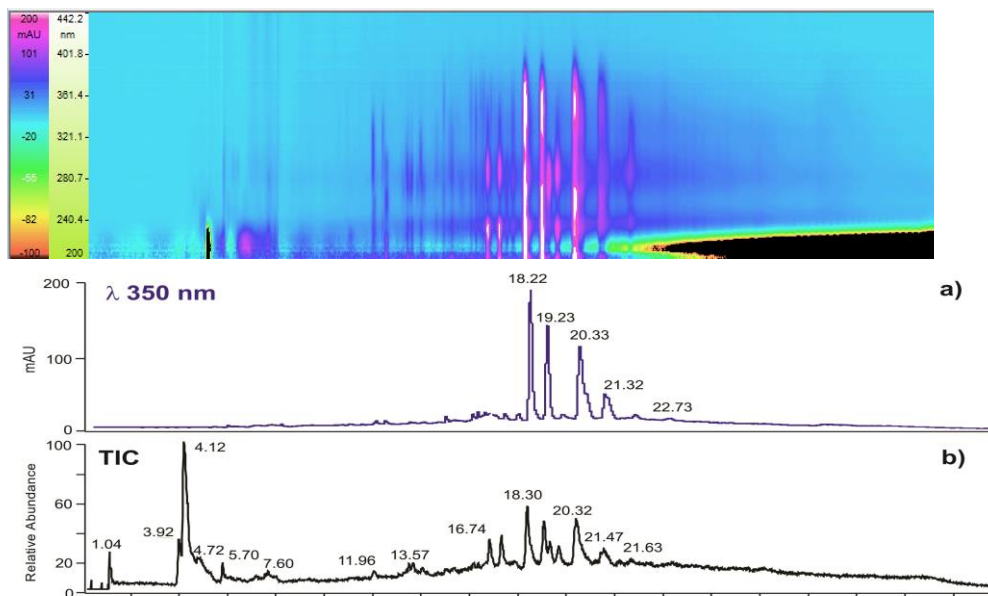
Neste trabalho usou-se a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa acoplada com detector de matriz de díodos, acoplada à espectrometria de massa sequencial de ionização por *electrospray* (RP-HPLC-DAD-ESI-MS/MS) para separar e identificar os compostos fenólicos presentes nos extractos de RedEspresso e na infusão de rooibos. Posteriormente, procedeu-se à quantificação dos principais flavonóides da *Aspalathus linearis* que lhe conferem características únicas, nomeadamente a aspalatina e os seus produtos de oxidação (Bramati e col., 2002) (McKay L. & Blumberg B., 2006), bem como o O-di-glicósido maioritário, a rutina.

Os compostos fenólicos absorvem na gama de ultra violeta (UV) no entanto, não existe um único comprimento de onda, que detecte todos as classes de compostos. Os espectros de UV-VIS típicos de flavonóides incluem duas bandas de absorção, uma banda I (310-385 nm) representando a absorção do anel **B** e banda II (250-285 nm) corresponde à absorção do anel **A**. Por exemplo, para as flavonas e flavonóis a banda I situa-se entre 240-285 nm, nas flavanonas aparece deslocada para valores superiores, 270-295 nm. A banda II encontra-se no intervalo de 310 a 350 nm para flavonas, enquanto para os flavonóis aparece entre 350 a 385 nm. (Rijke e col., 2006) (Pinheiro & Justino, 2012)

Para avaliar o perfil fenólico do extracto de RedEspresso começou por se analisar uma amostra por HPLC-DAD-MS, usando um método cromatográfico previamente desenvolvido no Laboratório de Espectrometria de Massa para análise de fenólicos. Na Figura 19 apresenta-se o histograma, o perfil HPLC-DAD traçado ao c.d.o. de 350 nm e o cromatograma iónico total no modo (-) ESI para uma amostra de RedEspresso com a concentração de 4500 ppm.

Verificou-se que alguns compostos estavam presentes em concentrações relativamente elevadas, originando picos cromatográficos bem definidos, mas outros estavam presentes em baixas concentrações, ou apresentavam baixa absorvidade, originando picos pequenos e difíceis de diferenciar da linha de base. Neste último caso, os compostos foram identificados através de ensaios de espectrometria massa sequencial (MS/MS).

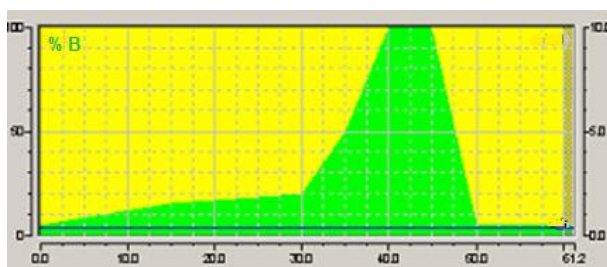
Além disso, a separação de alguns dos compostos não era eficiente pelo que se procedeu à optimização da metodologia analítica.



**Figura 19** - Histograma, cromatograma HPLC-DAD e cromatograma iónico total no modo (-)ESI para uma amostra de extracto de RedEspresso.

### 3.1 Optimização das condições experimentais

Na optimização das condições cromatográficas para a separação dos flavonóides efectuou-se a escolha de solventes mais adequados, gradientes de eluição, temperatura da coluna e caudal do eluente. O caudal do eluente tornou-se num parâmetro decisivo uma vez que, dado o divisor de fluxo não fazer uma partição rigorosa do caudal, o caudal que passa a entrar na fonte ESI pode não ser sempre o mesmo e a resposta da ionização pode variar, o que se reflecte na reprodutibilidade do pico cromatográfico e, conseqüentemente, no valor da área medida. A melhor separação foi obtida com um caudal da fase móvel de  $0,350 \text{ mLmin}^{-1}$  (cromatograma apresentado na Figura 19) que originou picos bem separados e estreitos, e demonstrou estabilidade ao longo de toda a corrida. A melhor composição da fase móvel, para estes compostos, foi obtida com um eluente (A) solução aquosa acidulada com ácido fórmico  $0,1\%$  ( $v v^{-1}$ ) e como eluente orgânico (B) acetonitrilo. O gradiente utilizado é apresentado na Figura 20.



**Figura 20** - Gradiente da fase móvel usado na identificação e quantificação dos extractos.

Os parâmetros experimentais para os ensaios de MS e MS/MS foram optimizados com os padrões rotina, orientina e aspalatina. Realizaram-se experiências em modo ESI negativo e positivo,

mas os melhores resultados foram obtidos no modo de ESI negativo para a família dos compostos fenólicos identificados, que se mostrou mais selectivo e mais sensível.

### 3.1.1 Padrão Rutina

A rutina de massa molecular 610,52 g/mol é um O-di-glicosídeo, pois a união do flavonóide ao açúcar é feita através de uma ligação O-C, e apresenta no espectro de massa um pico a  $m/z$  609, atribuído à molécula desprotonada  $[M-H]^-$ , uma vez que o ensaio foi feito no modo ESI negativo.

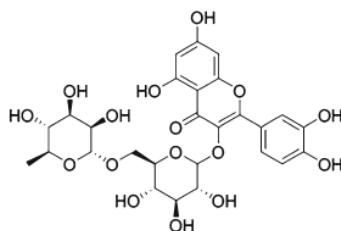


Figura 21 - Representação da estrutura molecular da Rutina.

O ião  $m/z$  609 foi isolado na armadilha de iões e dissociado por colisões induzidas por hélio. O espectro  $MS^2$  (Figura 22) apresenta um pico a  $m/z$  463 formado por perda de um resíduo da ramnose (-146 Da). A perda de 308 Da, correspondente à saída da rutinose (ramnose + glucose), leva à formação do pico base do espectro a  $m/z$  301, correspondente à aglicona quercetina. O espectro apresenta um ião a  $m/z$  300 correspondente à perda de um radical  $H^\bullet$  pelo ião aglicona  $Y_0^-$ , que confirma a presença de um O-di-glicósido (Vukics, Viktoria; Guttman, 2010). A dissociação do ião  $m/z$  301 por cisão do anel C leva à formação do fragmento  $m/z$  179 ( $^{1,4}A_0^-$ ), que é diagnóstico da classe dos flavonóis. Uma proposta de fragmentação para a rutina é apresentada na Figura 23.

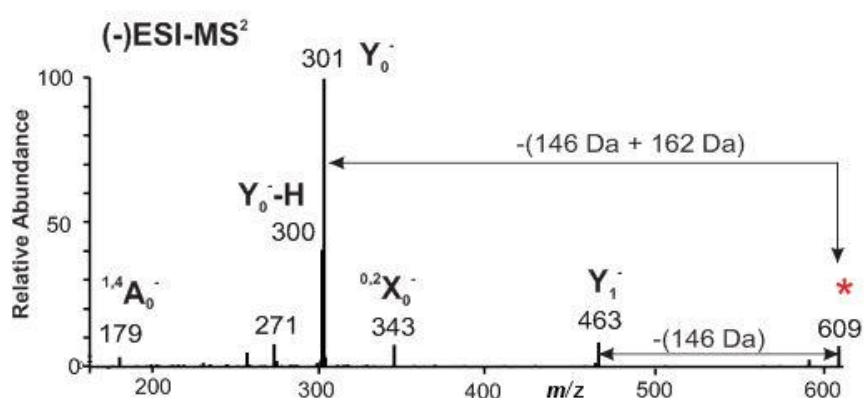
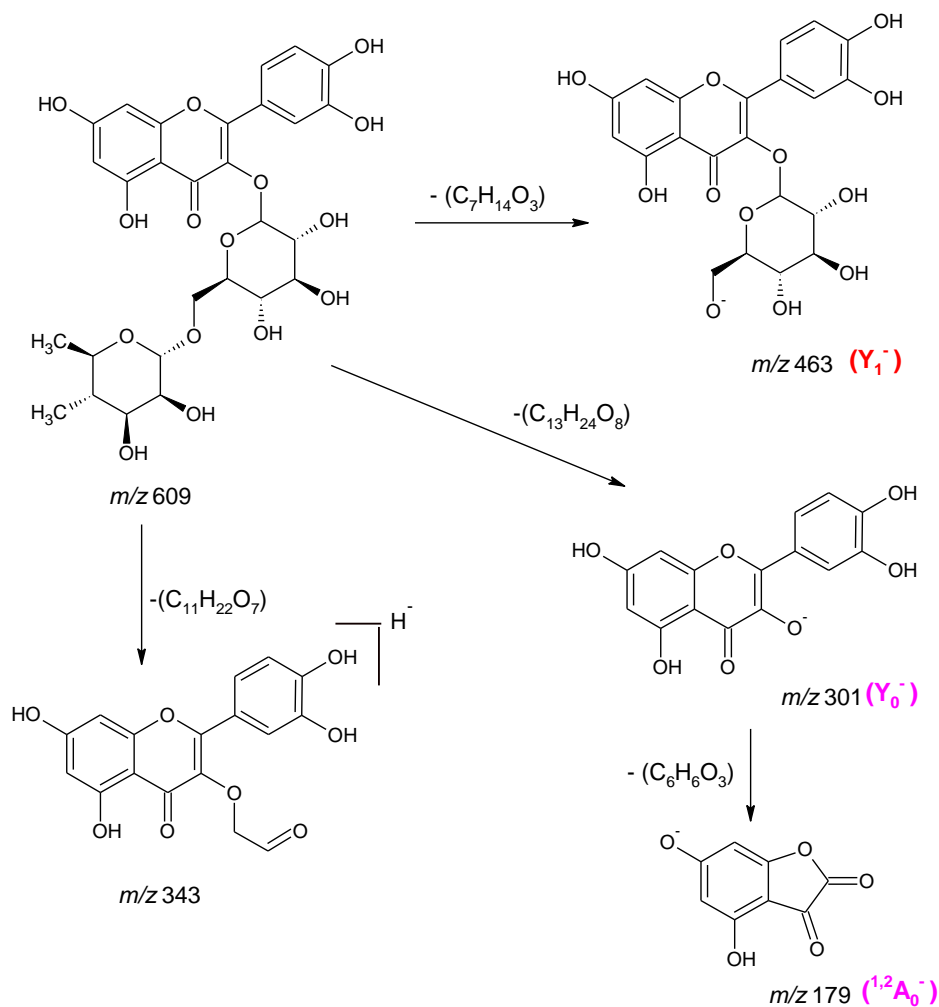


Figura 22 – Espectro (-)ESI- $MS^2$  da molécula desprotonada da rutina  $m/z$  609



**Figura 23** – Proposta de fragmentação para o ião  $m/z\ 609$  da rutina.

Após optimização dos parâmetros experimentais por infusão directa, traçou-se o cromatograma iónico usando as condições de separação acima descritas. O padrão rutina aparece a um valor  $Tr = 33,1$  min e o seu espectro de UV-Vis apresenta duas bandas a  $\lambda\ max\ 256$  e  $353$  características dos C-O-flavonóis. (Rijke e col., 2006).

### 3.1.2 Padrão Orientina

A orientina de massa molecular  $448,38\ g/mol$  é um C-glicosídeo, uma vez que a união do flavonóide ao açúcar é feita através de uma ligação C-C. Consoante o número do carbono a que se encontra ligado a hexose, a molécula classifica-se como sendo orientina ou iso-orientina.



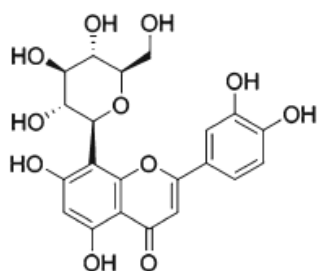


Figura 24 – Representação da estrutura molecular da Orientina.

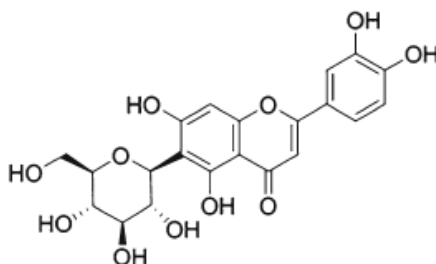


Figura 25 – Representação da estrutura molecular da Iso-Orientina.

O padrão adquirido foi a orientina, um C-8-glucósido da luteolina, que quando analisado por (-)ESI-MS origina no espectro de full scan um pico a  $m/z$  477. Tal como para o padrão rutina, traçou-se o espectro MS/MS do ião precursor  $m/z$  447. Sendo um C-glicosídeo, os fragmentos mais intensos observados no espectro MS<sup>2</sup> estão associados a perdas de 120 e 90 unidades, confirmando a presença de uma hexose (Figura 26). Picos pouco intensos a  $m/z$  411 e 369 são formados por perda de moléculas de H<sub>2</sub>O ou perdas conjugadas de H<sub>2</sub>O e fragmentações na unidade de glucose. O ião muito pouco abundante a  $m/z$  285 correspondente à perda de 162 Da (resíduo da glucose) leva à formação da aglicona desprotonada da luteolina a  $m/z$  285 (Y<sub>0</sub><sup>-</sup>). Na Figura 27 apresenta-se a proposta de fragmentação para a molécula desprotonada da orientina.

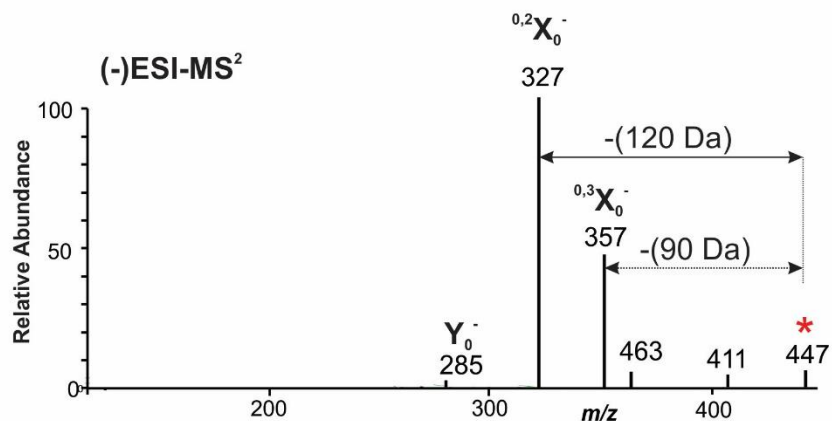
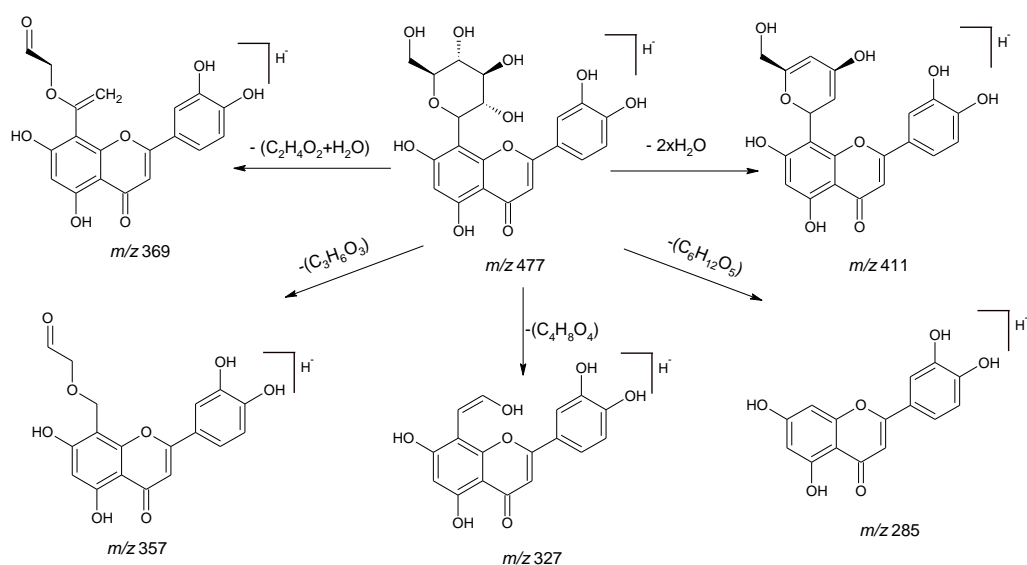


Figura 26 – Espectro (-) ESI-MS/MS da molécula desprotonada da orientina  $m/z$  447.

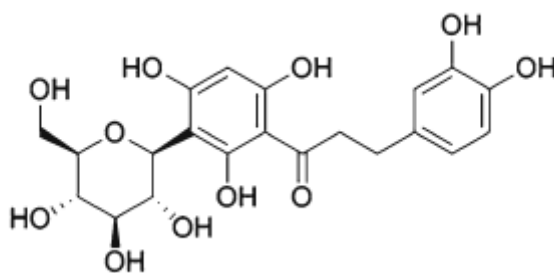


**Figura 27** – Proposta de fragmentação para a orientina.

Os ensaios de LC-MS/MS do padrão orientina originaram um pico a  $T_r = 28,3$  min e no espectro de UV-Vis duas bandas ao c.d.o. 267 e 348, confirmando respectivamente a presença de um C-glicósido e a de uma flavona (Pinheiro & Justino, 2012).

### 3.1.3. Padrão Aspalatina

De acordo com a bibliografia disponível, este é o composto que confere à infusão de rooibos uma elevada capacidade antioxidante, sendo apenas esta a sua fonte. Daí também o nome científico do Rooibos ser *Aspalatus Linearis*.



**Figura 28** – Representação da estrutura molecular da aspalatina.

Com uma massa molecular de 452,41 g/mol, a aspalatina é uma dihidrocalcona que, em modo ESI negativo, apresenta no espectro de massa um  $m/z$  451. Este ião precursor quando sujeito a CID, apresenta um padrão de fragmentação idêntico à orientina, dado pertencer à classe dos C-glicósidos. O espectro  $MS^2$  apresenta perdas de  $H_2O$  ( $m/z$  433 e 397), e cisões no anel glicósido com as

características perdas de 90 e 120 Da, formando os iões  $m/z$  361 e 331, respectivamente. Um pico muito pouco intenso a  $m/z$  313 corresponde à perda de uma molécula de  $H_2O$  pelo fragmento  $^{0,2}X_0^-$ . O espectro (-)ESI-MS<sup>2</sup> da aspalatina é apresentado na Figura 29.

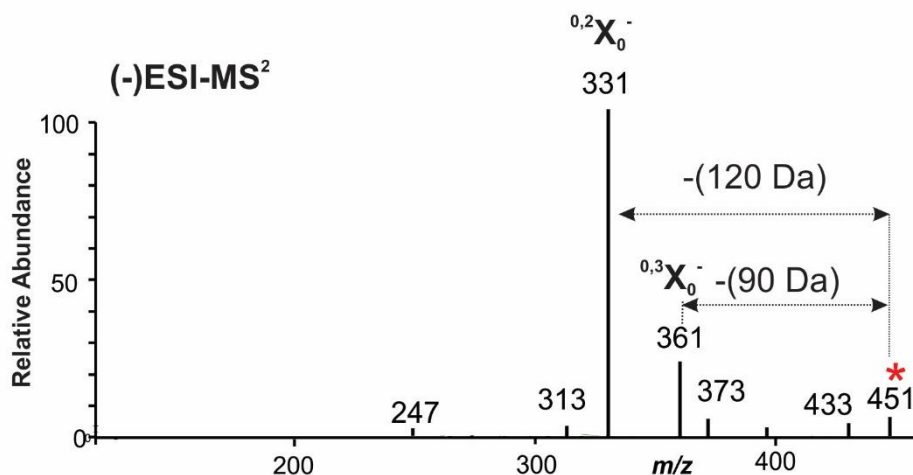


Figura 29 – Espectro de MS/MS da molécula desprotonada da aspalatina  $m/z$  451.

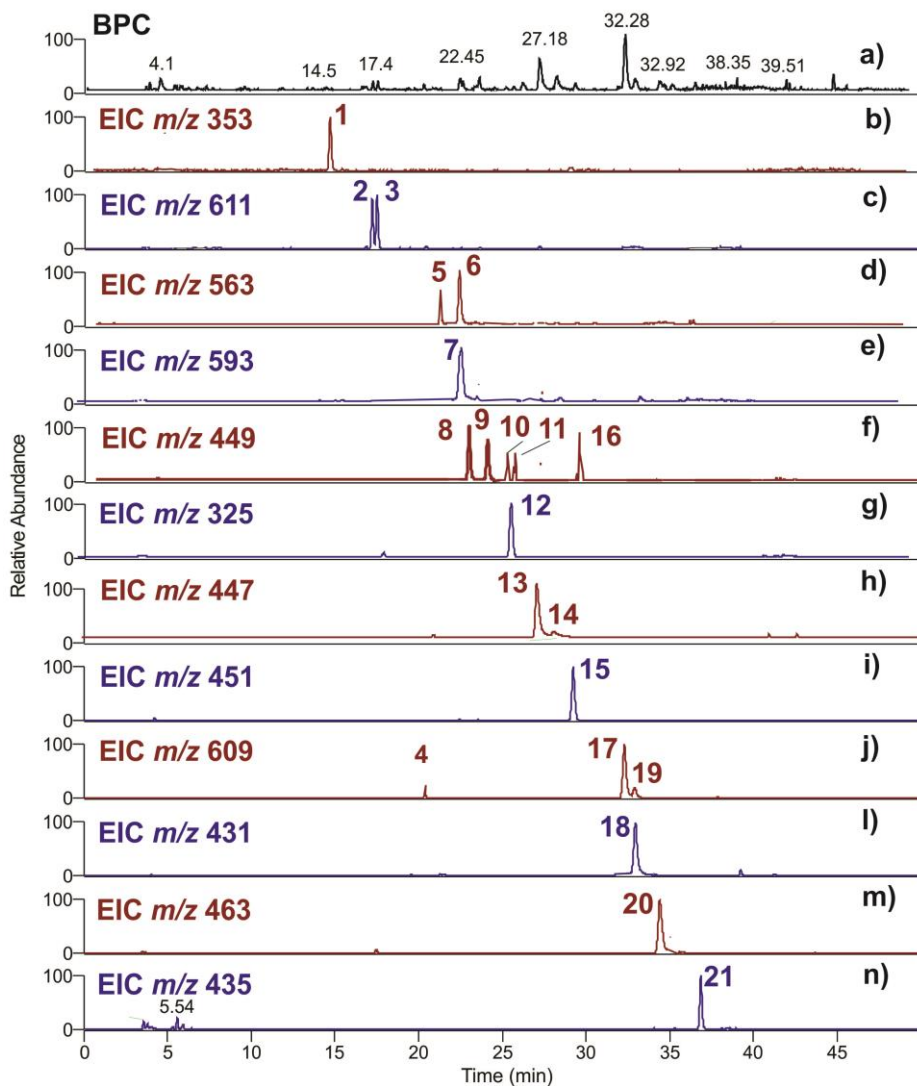
A aspalatina aparece a um  $T_r = 29,2$  min e o seu espectro de UV-Vis apresenta uma banda com  $\lambda_{max}$  286 nm característica das calconas.

Conforme foi referido na parte experimental, as soluções padrão da aspalatina foram preparadas em metanol e armazenadas a  $-20$  °C. Concluiu-se que à temperatura ambiente ( $21$  °C) as soluções não são estáveis, ocorrendo a sua degradação com formação dos derivados piranosídicos do eriodictiol.

### 3.2 Identificação dos extractos de RedEspresso e de infusão de roibos

As amostras de extractos de RedEspresso e de infusão de roibos foram analisadas por HPLC-ESI-MS/MS para identificação dos constituintes fenólicos.

Na Figura 30 apresenta-se o cromatograma iónico total traçado em modo negativo e os cromatogramas iónicos extraídos para os fenólicos separados nos extractos. Os compostos foram identificados com base nos tempos de retenção, nos espectros de absorvância ( $\lambda_{max}$ ) acima referidos (histograma da Figura 19), nos espectros MS e no padrão de fragmentação por comparação com os dados publicados e, por comparação com os padrões disponíveis.



**Figura 30** – Análise HPLC-MS/MS de um extracto de RedEspresso. a) cromatograma iónico total traçado no modo ESI negativo. Cromatogramas iónicos extraídos para os precursores: b)  $m/z$  353; c)  $m/z$  611; d)  $m/z$  563; e)  $m/z$  593; f)  $m/z$  449; g)  $m/z$  325; h)  $m/z$  447; i)  $m/z$  451; j)  $m/z$  609; l)  $m/z$  431; m)  $m/z$  463 e n)  $m/z$  435

Pico 1 ( $T_r=14,5$  min) corresponde a um ião  $m/z$  353 atribuído à molécula desprotonada do ácido cafeoilquinico com base no espectro  $MS^2$  que apresentou fragmentos a  $m/z$  191 179 e 135 característicos deste ácido. A atribuição foi feita por comparação com dados da literatura (Markowicz, Deborah H Bastos e col., 2007).

Picos 2 e 3 respectivamente aos  $T_r = 17,4$  e  $17,7$  min, originaram no espectro de massa iões a  $m/z$  611, que no espectro de UV apresentam uma banda II a 277 nm, indicativa de um composto da família das calconas. Os espectros  $MS^2$  gerados a partir de cada ião precursor apresentaram idêntica fragmentação, variando apenas a intensidade relativa dos fragmentos, o que indica estruturas similares, logo a presença de isómeros. Os fragmentos mais abundantes a  $m/z$  521, 491, 401 e 371 foram atribuídos à perda de  $[M-H-90]$ ,  $[M-H-120]$ ,  $[M-H-120-90]$  e  $[M-H-120-120]$ , respectivamente. As perdas de 90 e 120 Da, correspondem a quebras de ligações na unidade açúcar, e são características

de flavonóides do tipo C-glicósidos. O par de picos foi atribuído à saflomina A por comparação com dados da literatura (Shijun Yue, Yuping Tang, 2013) tendo já sido identificada em extractos de rooibos (Iswaldi e col., 2011)

Pico **4** ( $T_r = 20,5$  min) apresentou no espectro MS um ião a  $m/z$  609 que ao ser fragmentado gerou no espectro MS<sup>2</sup> fragmentos a  $m/z$  519 [M-H-90]<sup>-</sup>, 489 [M-H-120]<sup>-</sup>, 471 [M-H-120-18]<sup>-</sup>, 447 [M-H-162]<sup>-</sup>, 429 [M-H-180]<sup>-</sup>, 399 [M-H- (120+90)]<sup>-</sup> e 369 [M-H-2x120]<sup>-</sup>, característicos de C-glicósidos. Perdas de 120 e 90 Da estão normalmente associadas à presença de hexoses, o que é confirmado pelo aparecimento do ião a  $m/z$  447 atribuído a uma perda de 162 Da (o resíduo da glucose). O ião a  $m/z$  429 resulta de uma perda de 180 Da podendo ser atribuído a um fragmento do tipo Zi. (Figura 18 – Capítulo 2, secção 2.2). O espectro de UV apresentou bandas ao c.d.o. 273 e 346 nm que indica a presença de um flavona. Com base no padrão de fragmentação e no c.d.o. observado atribuiu-se o pico **4** a um di-C-glicósido da luteolina. Embora Iswaldi e col., 2011, reportem em extractos de rooibos um composto com  $m/z$  609 e iões fragmentos  $m/z$  519 e 489 atribuído à quercetina-3-O-robinobiosídica, pomos a hipótese que seja um composto diferente, dado o espectro de MS<sup>2</sup> do composto de peso molecular 610 identificado nos extracto de rooibos estudados apresentar um perfil de fragmentação que não é característico de O-glicósidos, mas sim de C-glicósidos.

Pico **5** ( $T_r = 21,5$  min) apresentou uma molécula desprotonada a  $m/z$  563. Nos espectros UV observou-se bandas II e I, respectivamente a 278 e 330 nm, características da classe das flavonas C-glicosídicas. Experiências MS<sup>2</sup> comprovaram a presença de fragmentos por quebra das ligações nos resíduos de açúcares ligados ao esqueleto flavílio. Foram identificados iões fragmento a  $m/z$  503, 473, 443, 383 e 353 atribuídos à apigenina di-C- $\alpha$ -L-arabinopiranosil- $\beta$ -D-glucopiranosil. A identificação foi feita por comparação com dados da literatura (Simirgiotis e col., 2013).

Picos **6 e 7** ao  $T_r = 22,9$  min coeluem dois compostos que no espectro de massa apresentam picos a  $m/z$  563 e 593. O precursor  $m/z$  563 apresentou no espectro de MS<sup>2</sup> fragmentos idênticos aos reportados para o composto **5**, sendo atribuído a um isómero da apigenina-di-C-glicosídica. O composto que no espectro (-)ESI mostrou um pico a  $m/z$  593 e ao ser dissociado gerou fragmentos a  $m/z$  503, 473, 413 e 383 típicos de uma apigenina-6,8-di-C- $\beta$ -D-glucopiranosídica, foi identificado como vicenina II (Simirgiotis e col., 2013). O espectro de UV apresentou bandas ao c.d.o. 273 e 331 nm, que confirmam a presença de uma flavona C-glicosídica. A vicenina II foi identificada no rooibos por Iswaldi e col., 2011.

Picos **8, 9, 10, 11** ( $T_r = 22,7, 23,7, 25,3$  e  $26,4$  min) originaram no espectro de massa iões a  $m/z$  449, que foram atribuídos a isómeros C-di-glicósidos do eriodictiol com base nos espectros de fragmentação e de UV. Estes últimos apresentaram uma banda I ao c.d.o. de 287 nm indicativa de flavononas. Nos espectros MS/MS foram identificados fragmentos a  $m/z$  359, 329 característicos dos C-glicósidos do eriodictiol. Os picos **9 e 10** mais intensos foram atribuídos aos isómeros (S)-e R-eriodictiol-6-C- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, e os compostos **11 e 12** pouco abundantes aos isómeros (S)-e R-eriodictiol-8-C- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, com base em dados reportados para o rooibos (Iswaldi e col., 2011). Estes compostos resultam da fermentação do flavonóide característico do *aspalathus linearis*, a aspalatina.

Pico **12** ( $T_r = 26,4$  min) foi atribuído a um derivado glucósido do ácido coumárico. No espectro de full scan foi identificado um íão a  $m/z$  325 que, por perda de 162 Da, formou um produto a  $m/z$  163 indicativo da presença do ácido coumárico. Os íões produto a  $m/z$  119, 113 e 101 correspondem ao perfil de fragmentação do ácido coumárico. A identificação foi feita por comparação com dados da literatura (D.H.M. Bastos e col., 2007). Este composto não foi reportado nos perfis fenólicos de rooibos encontrados na literatura (Iswaldi et al., 2011) (Krafczyk & A. Glomb, 2008) (Bramati e col., 2002)

Picos **13** e **14** ( $T_r = 27,4$  e  $28,4$  min) correspondem a moléculas desprotonadas da iso-orientina e orientina com  $m/z$  447, que apresentam fragmentos característicos a  $m/z$  429, 411, 357 e 327 atribuídos a perdas de  $H_2O$ , e 90 e 120 Da. De acordo com a literatura (Dias e col., **2012**), a diferenciação entre 6-C e 8-C-glicosidos pode ser feita com base na intensidade dos íões fragmento resultantes da perda de moléculas de  $H_2O$ . O fragmento a  $m/z$  429 gerado a partir da molécula desprotonada 13 é muito mais intenso do que o corresponde íão formado a partir de 14. Este resultado indica que 13 corresponde à luteolina-6-C-glucósido (iso-orientina) e 14 à orientina, resultados confirmados por comparação com o  $T_r$  do padrão orientina. Estes compostos são formados no passo final da oxidação da aspalatina e são reportados por Iswaldi e col., 2011; Krafczyk e Glomb, 2008; Bramati e col., 2002.

Picos **15** e **16** ao  $T_r = 29,5$  min coeluem dois compostos que foram identificados como os flavonóides específicos do *aspalathus linearis*, comumente designado de rooibos. No espectro (-)ESI foram detectados 2 picos a  $m/z$  451 e 449, sendo o primeiro o pico maioritário de espectro. O espectro de UV apresentou uma banda a 287 nm indicativa da hidrocalcona, aspalatina. O pico a  $m/z$  451 deu íões fragmento a  $m/z$  433 [M-H-18]<sup>-</sup>, 361 [M-H-90]<sup>-</sup> e 331 [M-H-120]<sup>-</sup>, sendo este último o pico base do espectro MS<sup>2</sup>. O precursor  $m/z$  449 muito pouco abundante foi isolado e estudado por CID, tendo o espectro apresentado fragmentos a  $m/z$  359 [M-H-90]<sup>-</sup>, 329 [M-H-120]<sup>-</sup> e 285 [M-H-120-44]<sup>-</sup>. Este composto foi identificado como aspalatinina por comparação com dados da literatura (Iswaldi e col., 2011), sendo também um composto específico do rooibos.

Pico **17** ( $T_r = 32,5$  min) observou um íão a  $m/z$  609 que foi atribuído à quercetina-O-di-glucósido, a rutina. O íão precursor ao ser isolado apresentou um espectro MS<sup>2</sup> com um perfil de fragmentação completamente diferente dos então obtidos para os anteriores compostos. O pico base a  $m/z$  301 correspondente á perda de 308 Da (perda do resíduo de uma hexose e de uma pentose), sendo atribuído à aglicona quercetina. O composto **17** foi identificado como rutina por comparação com o padrão, sendo um dos principais constituintes do rooibos (Iswaldi e col., 2011; Krafczyk e Glomb, 2008; Bramati e col., 2002).

Picos **18** e **19** ao  $T_r = 33,2$  min coeluem dois compostos que deram no espectro de massa dois picos a  $m/z$  431 e 609. O íão  $m/z$  609 originou no espectro MS<sup>2</sup> um padrão de fragmentação idêntico ao da rutina, pelo que **18** deverá ser isómero da rutina, não referenciado nos extractos de rooibos. Na rutina, o grupo ramnose-glucosilico está ligado à quercetina via grupo hidroxilo C3, mas esta ligação pode ocorrer através de outros grupos hidroxilos presentes na estrutura da quercetina-O-glicosilada. (Bohm, 1999). O íão a  $m/z$  431 apresentou no espectro de fragmentação um perfil de C-glicósido, com íões a  $m/z$  413, 341 e 311 característicos de uma luteolina C-glucose. Dado observar-se o íão  $m/z$  413

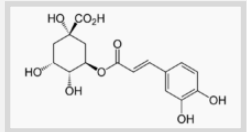
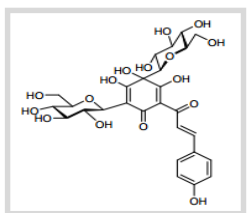
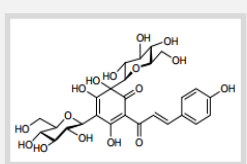
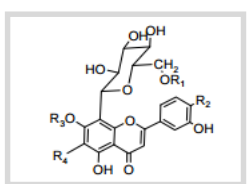
com cerca de 7% de abundância, atribuiu-se o composto **19** à iso-vitexina, o que está de acordo com dados da literatura (Iswaldi e col., 2011).

Pico **20** ( $T_r = 34,6$  min) deu um pico a  $m/z$  463 atribuído à quercetina-3-O-glucósido. No espectro  $MS^2$ , o pico base  $m/z$  301 é devido à aglicona da quercetina por perda do resíduo de uma hexose. Fragmentos menos intensos a  $m/z$  271 e 255 correspondem à perda de pequenas moléculas neutras pelo íon aglicona, respectivamente  $CH_2O$  (30 Da) e perdas conjugadas de  $H_2O$  e  $CO$  (46 Da), enquanto os fragmentos a  $m/z$  179 e 151 atribuídos respectivamente aos íões  $^{1,2}A^-$  e  $^{1,2}A^- -CO$ , são diagnósticos do flavonol quercetina.

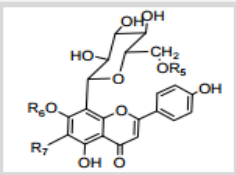
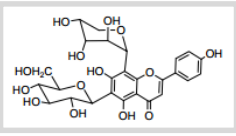
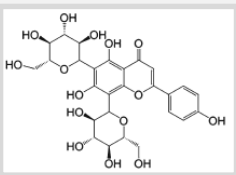
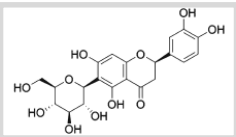
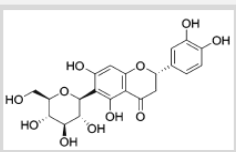
Pico **21** ( $T_r = 36,9$  min) produziu no espectro de massa um pico a  $m/z$  435 que no espectro de  $MS^2$  apresentou padrão característico de C-glicósidos com produtos a  $m/z$  345 e 315. O composto 21 foi atribuído a notofagina, hidrocalcona identificada em roibos (I. Iswaldi e col., **2011**).

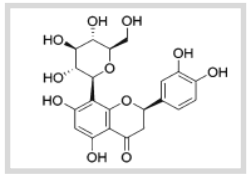
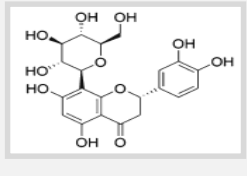
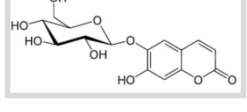
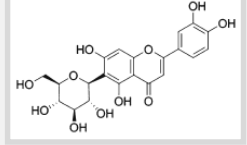
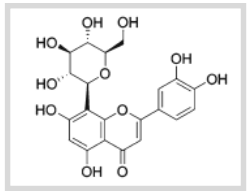
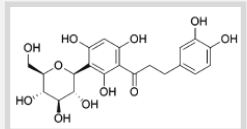
Dado o RedEspresso e a infusão de roibos serem extractos do mesmo roibos, os cromatogramas iónicos de ambos os são idênticos, com apenas pequenas alterações nas intensidades relativas dos picos identificados. Na tabela 2 sumarizam-se os compostos identificados nos extractos de roibos analisados.

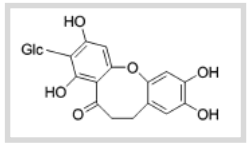
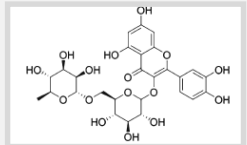
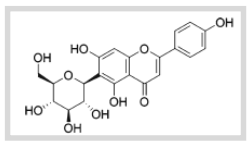
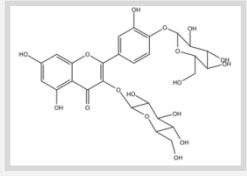
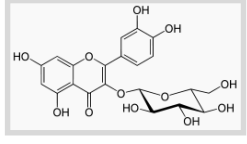
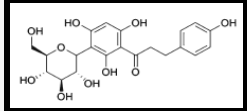
**Tabela 2** - Identificação por HPLC-ESI-MS/MS dos compostos fenólicos presentes nos extractos de RedEspresso e infusão de rooibos.

Pico	Tr (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Estrutura	[M-H] (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z, %, atribuição dos iões)	Composto provável
1	14.5	293		353	MS <sup>2</sup> [353]: 191(90) [M-H-152] <sup>-</sup> ; 179 (100) [M-H-146] <sup>-</sup> ; 123 (80) [M-H-202] <sup>-</sup> ;	Ácido cafeoilquínico
2	17.4	277		611	MS <sup>2</sup> [611]: 593 (10) [M-H-18] <sup>-</sup> ; 521 (20) [M-H-90] <sup>-</sup> ; 491 (100) [M-H-120] <sup>-</sup> ; 401 (60) [M-H- (90+120)] <sup>-</sup> ; 371 (80) [M-H-2x 120] <sup>-</sup>	Saflomina A
3	17.7	277		611	MS <sup>2</sup> [611]: 521 (20) [M-H-90] <sup>-</sup> ; 491 (100) [M-H-120] <sup>-</sup> ; 401 (60) [M-H- (90+120)] <sup>-</sup> ; 371 (80) [M-H-2x 120] <sup>-</sup>	Isómero da saflomina A
4	20.5	273, 346	 R <sub>1</sub> =H; R <sub>2</sub> =OH; R <sub>3</sub> =H; R <sub>4</sub> =glucose	609	MS <sup>2</sup> [609]: 519 (30) [M-H-90] <sup>-</sup> ; 489 (100) [M-H-120] <sup>-</sup> ; 447 (20) [M-H-162] <sup>-</sup> ; 399 (20) [M-H- (90+120)] <sup>-</sup> ; 369 (20) [M-H- (2x 120)] <sup>-</sup> ;	Luteonina-C-di-glucósido



5	21.5	278,330	 <p>R<sub>5</sub>=H; R<sub>6</sub>=H;R<sub>7</sub>=arabinose</p>	563	MS <sup>2</sup> [563]: 545 (10) [M-H-18] <sup>-</sup> , 503 (60) [M-H-60] <sup>-</sup> , 473 (100) [M-H-90] <sup>-</sup> , 443 (40) [M-H-120] <sup>-</sup> , 383 (80) [M-H- (60+ 120)] <sup>-</sup> , 353 (70) [M-H- (90+ 120)] <sup>-</sup> ;	Apigenina-di-C- $\alpha$ -arabinopiranosil- $\beta$ -D-glucopiranosica.
6	22.9	278,330		563	MS <sup>2</sup> [563]: 503 (30) [M-H-60] <sup>-</sup> , 473 (100) [M-H-90] <sup>-</sup> , 443 (90) [M-H-120] <sup>-</sup> , 383 (70) [M-H- (60+ 120)] <sup>-</sup> , 353 (90) [M-H- (90+ 120)] <sup>-</sup> ;	Isómero da Apigenina-di-C-glicosídica
7	22.9	273, 332		593	MS <sup>2</sup> [593]: 503 (20) [M-H-90] <sup>-</sup> , 473 (100) [M-H-120] <sup>-</sup> , 383 (50) [M-H- (90+ 120)] <sup>-</sup> , 353 (60) [M-H- (2x 120)] <sup>-</sup> ;	Vicenina II
8	22.7	280		449	MS <sup>2</sup> [449]: 413 (2) [M-H-18] <sup>-</sup> , 359 (10) [M-H-90] <sup>-</sup> , 329 (100) [M-H-120] <sup>-</sup> ;	S-eriodictiol-6-C- $\beta$ -D-glucopiranosídeo,
9	23.7	280		449	MS <sup>2</sup> [449]: 413 (3) [M-H-18] <sup>-</sup> , 359 (5) [M-H-90] <sup>-</sup> , 329 (100) [M-H-120] <sup>-</sup> ;	R-eriodictiol-6-C- $\beta$ -D-glucopiranosídeo

10	25.3	280		449	MS <sup>2</sup> [449]: 359 (8) [M-H-90] <sup>-</sup> ; 329 (100) [M-H-120] <sup>-</sup> ;	S-eriodictiol-8-C-β-D-glucopiranosido
11	26.4	280		449	MS <sup>2</sup> [449]: 359 (5) [M-H-90] <sup>-</sup> ; 329 (100) [M-H-120] <sup>-</sup> ;	R-eriodictiol-8-C-β-D-glucopiranosido
12	26.2	280		325	MS <sup>2</sup> [325]: 163(90) [M-H-162] <sup>-</sup> ; 119 (100) [M-H-162-44] <sup>-</sup> ; 102 (25) [M-H-162-(44+18)] <sup>-</sup> ;	Coumarilglucósido
13	27.4	270,349		447	MS <sup>2</sup> [447]: 429 (20) [M-H-18] <sup>-</sup> ; 357 (80) [M-H-90] <sup>-</sup> ; 327 (100) [M-H-120] <sup>-</sup> ;	Iso-orientina
14	27.4	270,349		447	MS <sup>2</sup> [447]: 357 (40) [M-H-90] <sup>-</sup> ; 327 (100) [M-H-120] <sup>-</sup> ;	Orientina
15	29.5	287		451	MS <sup>2</sup> [451]: 433 (4) [M-H-18] <sup>-</sup> ; 361 (15) [M-H-90] <sup>-</sup> ; 331 (100) [M-H-120] <sup>-</sup> ;	Aspalatina

16	29.5	287		449	MS <sup>2</sup> [449]: 359 (20) [M-H-90] <sup>-</sup> ; 329 (100) [M-H-120] <sup>-</sup> ; 285 (20) [M-H-120-44] <sup>-</sup>	Aspalatinina
17	32.5	256,352		609	MS <sup>2</sup> [609]: 463 (2) [M-H-162] <sup>-</sup> ( <b>Y<sub>1</sub><sup>-</sup></b> ); 343 (20) [M-H-162-120] <sup>-</sup> ( <b><sup>0,2</sup>X<sub>0</sub><sup>-</sup></b> ), 301 (100) [M-H-308] <sup>-</sup> ( <b>Y<sub>0</sub><sup>-</sup></b> ) <b>300</b> (80) ( <b>Y<sub>0</sub>-H<sup>+</sup></b> )	Rutina
18	33.2	270,331		431	MS <sup>2</sup> [431]: 413 (7) [M-H-18] <sup>-</sup> ; 341 (20) [M-H-90] <sup>-</sup> ; 311 (100) [M-H-120] <sup>-</sup>	Iso-vitexina
19	33.2	-		609	MS <sup>2</sup> [609]: 343 (5) [M-H-162-120] <sup>-</sup> ( <b><sup>0,2</sup>X<sub>0</sub><sup>-</sup></b> ), 301 (100) [M-H-308] <sup>-</sup> ( <b>Y<sub>0</sub><sup>-</sup></b> ), 300 (40) ( <b>Y<sub>0</sub>-H<sup>+</sup></b> )	Quercetina di-O-glicósido
20	34.6	254,346		463	MS <sup>2</sup> [463]: 301 (100) [M-H-308] <sup>-</sup> ( <b>Y<sub>0</sub><sup>-</sup></b> ), 300 (50) ( <b>Y<sub>0</sub>-H<sup>+</sup></b> ), 179 (7) <b>1<sup>2</sup>A<sup>-</sup></b> , 151 (5) <b>1,2A<sup>-</sup>-CO</b>	Quercetina-3-O-glucósido
21	36.9	287		435	MS <sup>2</sup> [435]: 345 (30) [M-H-90] <sup>-</sup> ; 315 (100) [M-H-120] <sup>-</sup>	Notofagina
Tr - tempo de retenção; [M-H] <sup>-</sup> molécula desprotonada, m/z - massa/carga; ESI-MS/MS - espectrometria de massa sequencial com ionização por <i>electrospray</i>						

### 3.3 Quantificação dos compostos

De todos os compostos identificados na cápsula e apresentados na Tabela 2, o objectivo do trabalho passava por proceder à quantificação dos fenólicos que estão descritos como sendo responsáveis pelas propriedades antioxidantes do rooibos, a aspalatina e os seus derivados de degradação (eriodictiois e os isómeros da orientina), e a rutina. Contudo, só foi possível fazer as curvas de calibração da rutina e orientina, pois a aspalatina dissolvida em solventes orgânicos apresentou-se como sendo instável, uma vez que se degrada à temperatura ambiente, não sendo possível validar a sua curva da calibração. Também os padrões dos C-glicósidos do eriodictiol não se encontravam disponíveis no mercado.

A metodologia de quantificação desenvolvida recorreu ao método do padrão externo. Para tal, prepararam-se as soluções mães de cada um dos padrões, referidas no capítulo 2, e foram feitas sucessivas diluições dando origem às soluções padrão, cujas concentrações variam, no caso da rutina, entre 0,12 e 0,84 ppm e, no caso da orientina, entre 0,26 e 0,09 ppm. Estas soluções foram analisadas por LC-MS/MS, nas mesmas condições das amostras a analisar.

Em seguida apresentam-se as curvas obtidas para ambos os compostos, bem como os limites de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) calculados pelas equações 2 e 4, respectivamente.

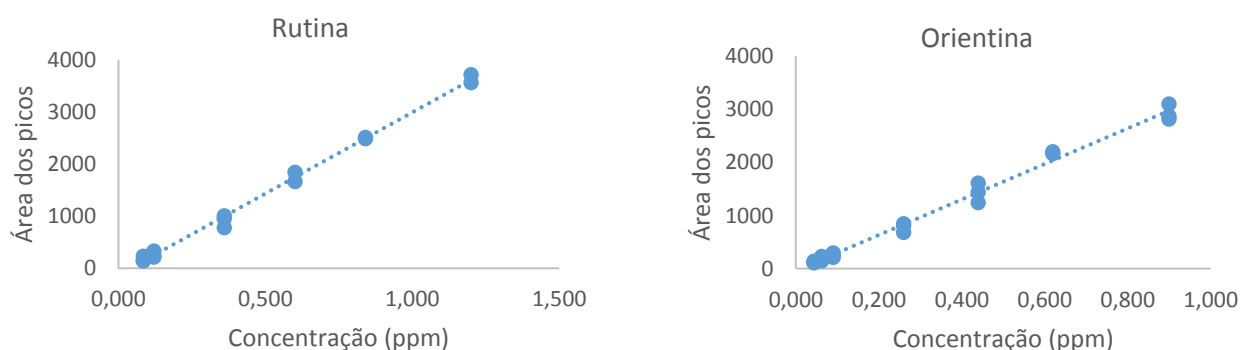


Figura 31 – Curvas de calibração obtidas para a rutina e orientina.

Tabela 3 – Parâmetros das rectas de calibração dos compostos.

Recta calibração Rutina	R <sup>2</sup>	LQ (ppm)	LD (ppm)
$y = 3117,3 x - 124,89$	0,9956	0,276	0,091
Recta calibração Orientina	R <sup>2</sup>	LQ (ppm)	LD (ppm)
$y = 3347,1 x - 36,026$	0,9905	0,312	0,103

Para validar o método analítico apenas se estudou a influência da repetibilidade nos ensaios. Dado o estudo envolver a análise de um extracto que está fechado numa cápsula, não foi possível

proceder ao cálculo da recuperação que dá a medida da eficácia do método analítico. A repetibilidade do método foi avaliada calculando-se a precisão dos ensaios interdias e intradias. A precisão intradias foi avaliada com diferentes valores de concentração padrão, através da análise de três réplicas para cada concentração realizadas no mesmo dia. No caso da orientina foram escolhidas as concentrações de 0,06, 0,44 e 0,90 ppm e para a rutina de 0,08, 0,60 e 1,20 ppm. Calculou-se o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV), (Equações 5 e 6), bem como o desvio padrão ponderado e a repetibilidade para cada composto (Equação 7).

Em métodos de análise, os coeficientes de variação podem variar sendo que o limite superior máximo é de 20%, dependendo da complexidade da amostra. (Beatriz, Bottoli, Collins, Sales, & Jardim, 2004)

A precisão interdias foi realizada em diferentes dias, nas mesmas condições.

As tabelas seguintes resumem o estudo da repetibilidade para cada um dos compostos.

**Tabela 4 –** Parâmetros de precisão obtidos para a rutina.

<b>Rutina Interdias com n = 9</b>					
<b>Concentração (ppm)</b>	<b>Média das concentrações (ppm)</b>	<b>DP</b>	<b>CV(%)</b>	<b>Desvio Padrão Ponderado</b>	<b>Repetibilidade</b>
0,08	0,10	0,0055	5,7	0,0246	0,069
0,60	0,58	0,0263	4,6		
1,20	1,21	0,0332	2,7		
<b>Rutina Intradias</b>					
<b>Concentração (ppm)</b>	<b>Média das concentrações (ppm)</b>	<b>DP</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Desvio Padrão Ponderado</b>	<b>Repetibilidade</b>
1,200	1,127	0,0347	3,1	0,0280	0,078
0,840	0,762	0,0051	0,7		
0,600	0,522	0,0410	7,9		
0,360	0,253	0,0381	15,0		
0,120	0,046	0,0196	42,9		
0,084	0,017	0,0161	96,0		

**Tabela 5 –** Parâmetros de precisão obtidos para a orientina.

<b>Orientina Interdias com n = 9</b>					
<b>Concentração (ppm)</b>	<b>Média das concentrações (ppm)</b>	<b>DP</b>	<b>CV(%)</b>	<b>Desvio Padrão Ponderado</b>	<b>Repetibilidade</b>
0,062	0,020	0,0058	29,8	0,0435	0,122
0,440	0,335	0,0179	5,3		
0,900	0,646	0,0529	8,2		
<b>Orientina Intradias</b>					
<b>Concentração (ppm)</b>	<b>Média das concentrações (ppm)</b>	<b>DP</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Desvio Padrão Ponderado</b>	<b>Repetibilidade</b>
0,260	0,222	0,0256	11,5	0,0305	0,085
<b>0,440</b>	0,417	0,0551	13,2		
<b>0,044</b>	0,026	0,0049	18,8		
<b>0,620</b>	0,642	0,0068	1,1		
<b>0,062</b>	0,043	0,0133	30,9		
<b>0,900</b>	0,864	0,0452	5,2		
<b>0,090</b>	0,066	0,0121	18,4		

Os desvios calculados demonstram que o método analítico necessita de ser melhorado. Embora durante o decurso deste trabalho se tenha alterado e reoptimizado vários parâmetros instrumentais, não se obtiveram dados de intradias e interdias com desvios ponderados que permitissem considerar o método validado.

A quantificação dos compostos foi realizada quer na cápsula de chá, directamente extraída da máquina, quer em infusões devidamente preparadas a partir de extracto de roibos. Foram recolhidas amostras a diferentes tempos, 0 min, 5 min e 5 h, de modo a analisar a sua influência na concentração dos compostos

Relativamente às amostras analisadas, chá da cápsula e infusões, e considerando que a cápsula tem 4,5 g de roibos e as infusões 1,5 g, as concentrações de seguida apresentadas já têm em conta os cálculos relativos às diluições a que foram sujeitas.

**Tabela 6** – Resumo das concentrações obtidas de rutina e orientina (e respectivos isómeros) na cápsula e nas infusões.

Ensaio	Rutina	Isómero Rutina	Iso-Orientina	Orientina
	Tr=32,5	Tr=33,2	Tr=27,4	Tr=28,4
<b>Cápsula</b>	<b>C (mg/4,5g rooibos)</b>			
t=0min	0,137	0,038	0,105	0,098
t=5h	0,136	0,035	0,130	0,099
<b>Infusões</b>	<b>C (mg/1,5g rooibos)</b>			
t=0min	0,195	0,055	0,197	0,156
t=5min	0,184	0,058	0,223	0,201
t=5h	0,283	0,085	0,216	0,243

Uma vez que, estruturalmente, a aspalatina, a notofagina e o eriodictiol são semelhantes ao orientina, isto é, são C-glicósidos, utilizou-se a curva de calibração da orientina para ter uma noção aproximada da concentração destes compostos no chá e nas infusões. A tabela seguinte resume os resultados obtidos para estes compostos, aos seus tempos de retenção.

**Tabela 7** – Resumo das concentrações obtidas para os compostos de aspalatina, notofagina e derivados de eriodictiol.

Ensaio	Aspalatina	Notofagina	Derivados de Eriodictiol				
	Tr=29,5	Tr=36,9	Tr=22,7	Tr=23,7	Tr=25,3	Tr=25,9	Tr=29,6
<b>Cápsula</b>	<b>C (mg/4,5g rooibos)</b>						
t=0min	0,063	0,008	0,032	0,028	0,013	0,005	0,010
t=5h	0,031	0,006	0,024	0,022	0,013	0,004	0,008
<b>Infusões</b>	<b>C (mg/1,5g rooibos)</b>						
t=0min	0,054	0,010	0,033	0,024	0,019	0,007	0,012
t=5min	0,044	0,012	0,036	0,033	0,023	0,008	0,011
t=5h	0,060	0,011	0,043	0,025	0,017	0,009	0,014

É de notar que os 5 tempos de retenções atribuídos aos derivados de eriodictiol correspondem, respectivamente, aos isómeros (R-) e (S) 6-C-β-glucopirosídicos Tr = 22,7 e 23,7 min) e (R-) e (S-) 8-C-β-glucopirosídicos (Tr 25,3 e 25,9 min), e ao composto aspalatina (Tr= 29,6 min).

## 4 Conclusão

Vários estudos têm demonstrado que o chá rooibos conhecido como “rooibos vermelho”, preparado a partir dos caules e folhas fermentadas da *Aspalathus linearis*, apresenta potenciais propriedades fitofarmacêuticas. Para além de não conter cafeína e ser uma fonte natural de C-glicósidos, apresenta um paladar adocicado, evitando a adição de açúcar. Estas características tornaram o chá rooibos num produto comercialmente interessante, tendo sido desenvolvido um encapsulado denominado RedEspresso que, quando preparado através do sistema Delta Q, produz uma bebida com propriedades organolépticas semelhantes ao café.

A elaboração deste trabalho tinha como objectivo demonstrar que o chá rooibos, preparado através do sistema Delta Q, tem concentrações mais elevadas de compostos fenólicos do que a respectiva infusão. Concretamente, o objectivo principal era demonstrar que a bebida da cápsula contém maior concentração de aspalatina do que a infusão. O facto da preparação do expresso envolver uma extração rápida e em ambiente não exposto ao ar, deverá inibir o processo de oxidação da aspalatina, originando uma bebida mais rica nesta dihidrocalcona.

Com esse propósito, foi otimizada uma metodologia HPLC-ESI-MS/MS, para identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes nos extractos RedEspresso e de infusão.

Verificou-se que a composição fenólica identificada nos extractos de rooibos vai de encontro à mencionada na literatura, comprovando que a metodologia analítica se revelou adequada para a separação e caracterização dos compostos. Nos extractos de Redespresso e de infusão foram quantificados os compostos maioritários característicos de diferentes subclasses de flavonóides, que incluem as dihidrocalconas C-glicósidos, aspalatina e notofagina, as flavanonas C-di-glicósidas do eriodictiol, as flavonas orientina e iso orientina, e o flavonol rutina.

Com o objectivo de avaliar qual a variação nas concentrações destes fenólicos quando as infusões de chá são mantidas ao ar, analisaram-se amostras logo após a extração e ao fim de 5 horas. No caso da infusão foi analisada uma amostra ao fim de 5 min, que é o tempo recomendado para a obtenção do chá por infusão de saquetas em água quente.

Os dados obtidos mostram claramente que quer no extracto da cápsula, quer na infusão, os flavonóides maioritários são a rutina e a iso-orientina. De uma forma geral, as infusões mostraram ter uma concentração mais elevada de flavonóides, relativamente à extração por cápsula. Em relação à concentração de aspalatina os dados não são esclarecedores, já que parecem indicar que tanto o expresso como a infusão analisada, imediatamente após a adição do chá, têm concentrações idênticas deste componente.

O deixar a saqueta de chá na infusão e ao ar durante várias horas parece não ter grande influência na variação da maioria dos compostos, uma vez que só para a rutina e orientina se observa um claro aumento da concentração.

Quando o expresso foi deixado ao ar cerca de 5 horas, observa-se uma diminuição da concentração de aspalatina e um aumento na concentração de iso-orientina. Estes dados podem



indicar que quando a infusão de roibos está exposta ao ar tempos longos, ocorre a degradação da aspalatina.

Dado que o método analítico não foi validado, uma vez que se verificou uma falta de reprodutibilidade da resposta do sinal nos cromatogramas iónicos, os resultados obtidos são apenas indicativos e não permitem uma análise precisa da quantidade de constituintes fenólicos extraídos quer no expresso quer na infusão. Neste contexto, o objectivo de inferir acerca da maior ou menor capacidade antioxidante da cápsula relativamente a uma infusão normal não foi atingido.

Como trabalho futuro sugere-se um estudo das condições de estabilidade das soluções padrão de aspalatina, de forma a se validar uma metodologia analítica que possibilite a quantificação precisa deste composto nos extractos da cápsula e da infusão. Complementarmente, uma reoptimização das condições experimentais é necessária, pois a dispersão de dados parece resultar da falta de reprodutibilidade da resposta do espectrómetro de massa. A variação do sinal iónico pode estar relacionada com o facto do caudal de eluente usado no método analítico ( $0,350 \text{ mLmin}^{-1}$ ) ser demasiado elevado, inibido as condições óptimas de nebulização das amostras.

## 5 Referências Bibliográficas

- Agilent Technologies Incorporated. (2012). HPLC Basics Fundamentals of Liquid Fundamentals of High Performance Liquid Chromatography ( HPLC ). *HPLC Basics*, 1–37.
- Akram, M. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(32), 6697–6703. <http://doi.org/10.5897/JMPR11.363>
- Beatriz, C., Bottoli, G., Collins, C.H., Sales, C., Jardim, F. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, 27(5), 771–780.
- Bramati, L., Minoggio, M., Gardana, C., Simonetti, P., Mauri, P., Pietta, P. (2002). Quantitative Characterization of Flavonoid Compounds in Rooibos Tea ( *Aspalathus linearis* ) by LC – UV / DAD. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5513–5519. <http://doi.org/10.1021/jf025697h>
- Cartaya, O; Reynaldo, I. (2001). Flavonóides: Características químicas e aplicações. *Cultivos Tropicales*, 22, 5–14.
- Cassiano, N. M., Barreiro, J. C., Martins, L.R.R., Oliveira, R.V, Cass, Q.R.. (2009). Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Quim. Nova*, 32(4), 1021–1030.
- Castro, A. (2000). *Guia RELACRE 13 Validação de métodos internos de ensaio em análise química*. (Relacre, Ed.).
- Conceição, M. (n.d.). Como se faz uma cápsula Delta Q. Retrieved August 22, 2015, from <https://www.youtube.com/watch?v=dYhrDQNKdSg>
- Delta Cafés. (2015). Retrieved April 5, 2015, from <http://www.delta-cafes.pt/>
- Dong, M. W. (2006). *Modern HPLC for Practicing Scientists*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Expert, I. (2005). *Validation of a analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*. *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration os Pharmaceuticals for Human Use* (Vol. 1994).
- Gonçalves, R. (2009). Delta lança primeiro expresso vermelho em cápsula. Retrieved from <http://www.hipersuper.pt/2009/03/04/delta-lanca-primeiro-expresso-vermelho-em-capsula/>
- Good Health Benefits. (2015). Retrieved January 1, 2015, from <http://www.rooibosltd.co.za/rooibos-benefits.php>
- Greaves, J.; Roboz, J. (2008). *Mass Spectrometry for the Novice*. (C. Press, Ed.)*Science*. Taylor & Francis Group. <http://doi.org/10.1126/science.opms.p0800022>
- Huber, Ludwig (2010). *Validation of Analytical Methods* (Vol. 2).
- Iswaldi, I., Arráez-Román, D., Rodríguez-Medina, I., Beltrán-Debón, R., Joven, J., Segura-Carretero, A.,Fernández-Gutiérrez, A. (2011). *Identification of phenolic compounds in aqueous and ethanolic rooibos extracts (Aspalathus linearis) by HPLC-ESI-MS (TOF/IT)*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Vol. 400).
- J.L. Caetano, M. (n.d.). Agentes Antioxidantes. Retrieved from [http://ctborracha.com/?page\\_id=3469](http://ctborracha.com/?page_id=3469)
- Joubert, E., Gelderblom, W. C., Louw, de Beer, D. (2008). South African herbal teas: *Aspalathus linearis*, *Cyclopia* spp. and *Athrixia phylicoides*-A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(3), 376–412. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.014>
- Kit, P. (2015). *HerbalGram*, 1–12.
- Krafczyk, N., Glomb, M. A. (2008). Characterization of Phenolic Compounds in Rooibos. *Tea J. Agric. Food Chem*, 56, 3368–3376.
- Lopes, R. M., Oliveira, T.T., Nagem, T. J., Pinto, A.S. (2000). Farmacologia de flavonóides no controle

- hiperlipidêmico em animais experimentais. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, (3), 18–22.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747.
- March, R. E. (2000). Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer. In *Encyclopedia of analytical chemistry* (pp. 11848–11872). <http://doi.org/10.1002/9780470027318.a6015>
- Maria, D., Luzia, M. (2009). Atividade antioxidante do extracto de sementes de limão (Citrus limon) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. *Quim. Nova*, 32(4), 946–949.
- Markowicz, Deborah H Bastos, Luciane A Saldanha, Rodrigo R. Catharino, Alexandra C. H. F. Sawaya, I. B. S., Cunha, P. O. C., Eberlin, M. N. (2007). Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules*, 12, 423–432.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J. Culebras, J. M., Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* XVII (6) 3338, 271–278.
- Martinez, A. (Universidad D. A. (2005). Flavonóides. *Universidad De Antioquia*.
- Mass Spectrometry. (n.d.). Retrieved April 6, 2015, from [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/mass-spectrometry.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/mass-spectrometry.html)
- McIndoe, J S; Henderson, W. (2005). *Mass Spectrometry of Inorganic , Coordination and Organometallic Compounds. Inorganic Chemistry* (Vol. 9). John Wiley & Sons. <http://doi.org/10.1002/0470014318>
- McKay L., D., Blumberg B., J. (2006). Review of the bioactivity of South African Herbal Teas: Rooibos (*Aspalathus linearis*) and Honeybusg (*Cyclopia intermedia*). *Phytoterapy Research*, 21(21), 2695–2700. <http://doi.org/10.1002/ptr>
- McMaster, M. C. (2006). *LC/MS: A Practical User's Guide. Journal of the American Society for Mass Spectrometry* (Vol. 17). New Jersey: John Wiley & Sons. <http://doi.org/10.1016/j.jasms.2006.05.001>
- Merwe, J. D. Van Der, Joubert, E., Manley, M., Beer, D. De, Malherbe, C. J., Gelderblom, W. C. A. (2010). In Vitro Hepatic Biotransformation of Aspalathin and Nothofagin, Dihydrochalcones of Rooibos (*Aspalathus linearis*), and Assessment of Metabolite Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem*, 58, 2214–2220.
- Messias, K. L. D. S. (2009). Dossiê Antioxidantes. *Food Ingredients Brasil*, 6, 16–31.
- Pereira, V.P; Knor, F.J; Velloso, J.C.R, Beltrame, F.L. (2014). *Determination of phenolic compounds and antioxidant activity of green , black and white teas of Camellia sinensis ( L .) Kuntze , Theaceae.*
- Pinheiro, P., Justino, G. (2012). Structural analysis of flavonoids and related compounds—a review of spectroscopic applications. *Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, 33–56. <http://doi.org/10.5772/29152>
- Pitt, J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical Biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*, 30(1), 19–34.
- Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F. Gooijer, C., Brinkman, U.,A. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J. Chromatogr. A.*, 1112, 31–63.
- Rooibos Ltd. (2015). Retrieved May 5, 2015, from <http://www.rooibosLtd.co.za/rooibos-background-production-process.php>
- Yue, Shijun, Tang Yuping, Li Shujiao and Duan Jin-Ao. (2013). Chemical and Biological Properties of Quinochalcone C-Glycosides from the Florets of *Carthamus tinctorius*. *Molecules*, 18, 15220–15254.
- Simirgiotis, M. J., Schmeda-Hirschmann, G., Bórquez, J., Kennelly, E. J.. (2013). The *Passiflora tripartita*

(Banana Passion) Fruit: A Source of Bioactive Flavonoid C-Glycosides Isolated by HSCCC and Characterized by HPLC–DAD–ESI/MS/MSI. *Molecules*, 18, 1672–1692.

Vukics, Viktoria; Guttman, A. (2010). Structural Characterization of Flavonoid Glycosides by Multi-Stage Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 29, 1–16 <http://doi.org/10.1002/mas>

