



Avaliação da composição bioquímica de beterraba e acelga

Daiana Santos de Almeida

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para
obtenção do Grau de Mestre em Produtos Naturais e Bioaplicações*

Orientado por:

Ângela Fernandes

Lillian Barros

Bragança

2023

*“É fazendo que se aprende a fazer
aquilo que se deve aprender a fazer”*

- Aristóteles

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, **Carlos** e **Rosinéia**, e ao meu irmão **Augusto**, por todo o amor, suporte, incentivo e confiança. Não seria capaz de chegar onde estou sem tudo isso e sem vocês! Amo-vos incondicionalmente!

Ao **Alexandre** e a **Luna**, meus companheiros nessa jornada, que me aguentaram e não me deixaram cair nenhuma vez. Amo demais vocês também!

Um agradecimento especial aos amigos e todos os familiares que sempre apoiaram os meus sonhos e acreditaram em mim e no meu potencial.

Ao meu tio **Esmael** e minha avó **Maria**. Sei que estarão sempre olhando e torcendo por nós.

Agradeço também às minhas orientadoras, **Dra. Ângela Fernandes** e **Dra. Lillian Barros**, por acreditarem em mim e no meu trabalho. Não tenho palavras que possam expressar o quão grata sou pela oportunidade maravilhosa de estar aqui, além de toda a paciência e dedicação em me orientarem e compartilharem comigo tanto conhecimento, seja no laboratório ou em sala de aula.

Não posso deixar de agradecer também ao Centro de Investigação de Montanha (CIMO), pela estrutura sensacional que permitiu a realização desse trabalho, bem como aos meus colegas de laboratório e de curso, em especial à **Ângela Liberal**, **Rossana**, **Daniele**, **Tayse**, **Tiane**, **Bruna**, **Júnior**, **Elizandra**, **Alessandra**, **Diana** e **Carol**, por todo aprendizado, ajuda, conversas, risos e momentos bons.

RESUMO

A espécie *Beta vulgaris* L. é amplamente reconhecida pelo uso das suas raízes tuberosas, aplicadas tanto na culinária quanto na medicina popular. Vulgarmente conhecida como beterraba (*B. vulgaris* subsp. *vulgaris*), é muito nutritiva, e tem especial destaque como fonte de sacarose e betalaínas. Por outro lado, suas folhas são menos consumidas cruas ou cozidas em saladas. Esta espécie também contempla as diferentes variedades de acelga suíça (*Beta vulgaris* subsp. *cicla*), uma subespécie que não produz raiz tuberosa, sendo assim valorizada pelas suas folhas e talos.

No presente trabalho avaliou-se a composição proximal (lípidos, proteínas, cinzas, hidratos de carbono e valor energético), o perfil químico (ácidos gordos, tocoferóis, açúcares livres, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e betalaínas) e propriedades bioativas (atividade antioxidante e antimicrobiana) de folhas e raízes de 3 cultivares de beterrabas coloridas (cv. Albina Vereduna (branca), cv. Burpee's Golden e cv. Pablo F1 (vermelha)) e folhas de 1 variedade de acelga suíça avermelhada ("acelga ruibarbo" – *B. vulgaris* subsp. *cicla* var. *flavescens*) provenientes da Grécia.

Os hidratos de carbono foram os macronutrientes encontrados em maior quantidade nas amostras de raízes (68,3 a 70,6 g/100 g massa seca (ms)), seguido pelas fibras dietéticas (19,5 a 20,9 %), proteínas (5,46 a 7,32 g/100 g ms), cinzas (2,35 a 4,0 g/100 g ms) e, por fim, os lípidos, com os menores teores (0,48 a 1,12 g/100 g ms), apresentando também os maiores valores energéticos entre todas as amostras (347,0 a 354,4 kcal/100 g ms). Nas amostras de folhas, de maneira geral, as fibras foram os macronutrientes que se destacaram (33,9 a 37,3 %), seguido dos hidratos de carbono (25,5 a 42,9 g/100 g ms), cinzas (13,46 a 20,99 g/100 g ms), proteínas (11,84 a 12,23 g/100 g ms) e lípidos (3,28 a 4,01 g/100 g ms). Relativamente aos açúcares livres, nas raízes de beterraba, foram identificadas apenas a sacarose (3,94 a 40,79 g/100g ms) e a trealose (0,38 a 0,70 g/100g ms). Já nas folhas, foram identificadas a sacarose (3,24 a 6,21 g/100g ms) e a glucose (2,24 a 5,65 g/100g ms) como os açúcares mais abundantes, além da frutose (0,45 a 2,8 g/100g ms) e trealose (0,41 a 0,82 g/100g ms). Em todas as amostras foram identificados 6 ácidos orgânicos: succínico, oxálico, quínico, málico, cítrico e vestígios de fumárico. As folhas apresentaram teores elevados em ácidos orgânicos totais, incluindo o maior conteúdo em ácido oxálico (2,13 a 3,78 g/100 g ms).

Foram identificados 21 ácidos gordos, sendo os mais abundantes os ácidos linoleico, α -linolénico, palmítico e oleico. As folhas apresentaram o maior conteúdo em ácidos gordos polinsaturados (PUFAs), enquanto nas raízes os saturados (SFAs) foram

os mais abundantes. Também foi avaliado o perfil em tocoferóis, e verificou-se que as raízes apresentaram apenas a isoforma α -tocoferol, enquanto as amostras de folhas apresentaram as isoformas α , β e γ -tocoferol, sendo a isoforma α - a prevalente.

Nas folhas, após a obtenção de um extrato hidroetanólico, foram identificados 19 compostos fenólicos, que incluem derivados da vitexina, isoramnetina e quercetina, além de derivados do ácido ferúlico, sinápico e *p*-cumárico. O teor em compostos fenólicos totais nas folhas variou de 19,2 a 34,3 mg/g de extrato, sendo os mais abundantes a vitexina-2''-*O*-pentosídeo e a vitexina malonil-2''-*O*-pentosídeo. As raízes apresentaram menor conteúdo de compostos fenólicos (0,130 a 0,150 g/100 g de extrato), com um total de 8 compostos identificados, sendo todos derivados dos ácidos ferúlico, sinápico, *p*-cumárico e cafeico. O perfil de betalaínas também foi avaliado, sendo identificadas 7 betacianinas e 1 betaxantina nas amostras de folhas e raízes da beterraba vermelha (cv. Pablo F1), nas raízes da cv. Burpee's Golden e na acelga suíça, onde a cv. Pablo F1 se destacou, enquanto a variedade amarela (Burpee's Golden) apresentou apenas a betaxantina miraxantina-V (0.140 mg/g ms).

Em relação às propriedades bioativas, as amostras de folhas foram as que apresentaram melhor capacidade antioxidante comparativamente com as raízes, destacando-se novamente a cv. Pablo F1, e todas as amostras apresentaram uma bioatividade relevante contra a maioria das estirpes de bactérias avaliadas, enquanto a raiz da cv. Albina Vereduna foi a única a apresentar atividade antifúngica.

As folhas de beterraba destacaram-se relativamente ao conteúdo dos compostos analisados, quando comparadas com as suas respectivas raízes, e até mesmo com a acelga suíça, sendo consequentemente as amostras que apresentaram melhor atividade antioxidante e antimicrobiana. As raízes e, especialmente as folhas da variedade vermelha (cv. Pablo F1) destacaram-se pelo seu conteúdo em betalaínas. Em conclusão, apesar de a beterraba ser muito conhecida pelas suas aplicações culinárias e propriedades biológicas, as suas folhas, que normalmente são descartadas como resíduos, podem ser incluídas numa dieta equilibrada não só para enriquecer a variedade de nutrientes consumidos, mas também para oferecer benefícios à saúde e promover as práticas mais sustentáveis na alimentação.

Palavras-chave: *Beta vulgaris* L., beterraba, acelga suíça, composição química, propriedades bioativas

ABSTRACT

The species *Beta vulgaris* L. is widely recognized for its tuberous roots, used in both cooking and popular medicine. Commonly known as beetroot, it is a very nutritious vegetable, particularly notable as important source of sucrose and betalains. Their leaves are normally discarded as waste. On the other hand, beet leaves are less consumed raw or cooked in salads. This species also includes the different varieties of Swiss chard (*Beta vulgaris* subsp. *cicla*), a subspecies that does not produce a tuberous root, being therefore valued for its leaves and stems.

In the present work, the proximal composition (lipids, proteins, ash, carbohydrates, and energy value), the chemical profile (fatty acids, tocopherols, free sugars, organic acids, phenolic compounds and betalains) and bioactive properties (antioxidant and antimicrobial activity) from leaves and roots of 3 cultivars of colored beetroots (cv. Albina Vereduna (white), cv. Burpee's Golden and cv. Pablo F1 (red)) and leaves of 1 variety of reddish Swiss chard ("rhubarb chard" - *Beta vulgaris* subsp. *cicla* var. *flavescens*) from Greece were evaluated.

Carbohydrates were the macronutrients found in greatest amounts in root samples (68.3 to 70.6 g/100 g dry weight (dw)), followed by dietary fiber (19.5 to 20.9 %), proteins (5.46 to 7.32 g/100 g dw), ash (2.35 to 4.0 g/100 g dw) and, finally, lipids, with the lowest levels (0.48 to 1.12 g/100 g dw), also presenting the highest energy values among all samples (347.0 to 354.4 kcal/100 g dw). In leaf samples, in general, fibers were the macronutrients that stood out (33.9 to 37.3%), followed by carbohydrates (25.5 to 42.9 g/100 g dw), ash (13.46 to 20.99 g/100 g dw), proteins (11.84 to 12.23 g/100 g dw) and lipids (3.28 to 4.01 g/100 g dw). Regarding free sugars, in beetroots, only sucrose (3.94 to 40.79 g/100g dw) and trehalose (0.38 to 0.70 g/100g dw) were identified. In the leaves, sucrose (3.24 to 6.21 g/100g ms) and glucose (2.24 to 5.65 g/100g ms) were identified as the most abundant sugars, in addition to fructose (0.45 at 2.8 g/100g ms) and trehalose (0.41 to 0.82 g/100g ms). In all samples 6 organic acids were identified: succinic, oxalic, quinic, malic, citric, and traces of fumaric acid. The leaves had high levels of total organic acids, including the highest content of oxalic acid (2.13 to 3.78 g/100 g dw).

In total, 21 fatty acids were identified, being linoleic, α -linolenic, palmitic, and oleic acids the most abundant. Leaves had the highest content of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), while saturated fatty acids (SFAs) were the most abundant in roots. The

tocopherol profile was also evaluated, and it was found that the roots only presented the α -tocopherol isoform, while the leaf samples presented the α -, β - and γ -isoforms, being α - isoform the most prevalent.

Were identified 19 phenolic compounds in the hydroethanolic extract of the leaves, including derivatives of vitexin, isorhamnetin and quercetin, as well as derivatives of ferulic, sinapic and *p*-coumaric acids. The total phenolic compounds content in the leaves ranged from 19.2 to 34.3 mg/g of extract, and the most abundant compounds found were vitexin-2''-*O*-pentoside and vitexin malonyl-2''-*O*-pentoside. The roots had a lower content of phenolic compounds (0.130 to 0.150 g/100 g of extract), with a total of 8, which all were derived from ferulic, sinapic, *p*-coumaric and caffeic acids. The betalain profile was evaluated, and 7 betacyanins and 1 betaxanthin were identified in leaves and roots of the red beetroot (cv. Pablo F1), in the roots of cv. Burpee's Golden, and in Swiss chard, where cv. Pablo F1 stood out, while the yellow variety (Burpee's Golden) presented only the betaxanthin miraxanthin-V (0.140 mg/g dw).

In relation to bioactive properties, the leaf samples presented the best antioxidant capacity compared to the roots, highlighting again the cv. Pablo F1, and all samples showed relevant bioactivity against most of the bacterial strains evaluated, while only the root of cv. Albina Vereduna showed antifungal activity.

Beetroot leaves stood out in terms of the chemical compounds analyzed when compared to their respective roots, and even to Swiss chard. Consequently, were the samples that showed the best antioxidant and antimicrobial activity. The roots and especially the leaves of the red variety (cv. Pablo F1) stood out for their betalain content. In conclusion, although beetroot is well known for its culinary applications and biological properties, its leaves, which are normally discarded as waste, can be included in a balanced diet not only to enrich the variety of nutrients consumed, but also to offer health benefits and promote more sustainable ingestion practices.

Keywords: *Beta vulgaris* L., beetroot, Swiss chard, chemical composition, bioactive properties

ÍNDICE GERAL

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1. Importância da avaliação da composição proximal e bioquímica	1
1.2. A ordem Caryophyllales.....	2
1.3. <i>Beta vulgaris</i> L.....	3
1.3.1. <i>Classificação botânica, variedades e aplicações.....</i>	3
1.4. Composição proximal e química	6
1.4.1. <i>Hidratos de carbono</i>	6
1.4.2. <i>Lípidos e ácidos gordos</i>	9
1.4.3. <i>Proteínas</i>	11
1.4.4. <i>Valor energético.....</i>	13
1.4.5. <i>Tocoferóis.....</i>	14
1.4.6. <i>Minerais</i>	15
1.4.7. <i>Ácidos orgânicos.....</i>	16
1.4.8. <i>Compostos fenólicos.....</i>	17
1.4.9. <i>Betalainas.....</i>	19
1.5. Métodos de extração de compostos bioativos	21
1.6. Avaliação de propriedades biológicas	22
1.6.1. <i>Atividade antioxidante</i>	22
1.6.1.1. <i>Avaliação da peroxidação lipídica através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....</i>	24
1.6.1.2. <i>Ensaio de Inibição da Hemólise Oxidativa (OxHLIA)</i>	25
1.6.2. <i>Atividade antimicrobiana.....</i>	25
2. OBJETIVO	27
3. METODOLOGIA.....	28
3.1. Padrões e reagentes.....	28
3.2. Amostragem	29
3.3. Preparação dos extratos hidroetanólicos.....	29
3.4. Composição proximal	29
3.5. Determinação de compostos hidrofílicos	30
3.5.1. <i>Açúcares livres.....</i>	30
3.5.2. <i>Ácidos orgânicos.....</i>	31
3.5.3. <i>Betalainas.....</i>	31
3.5.4. <i>Compostos fenólicos.....</i>	32

3.6. Determinação de compostos lipofílicos	33
3.6.1. <i>Ácidos gordos</i>	33
3.6.2. <i>Tocoferóis</i>	34
3.7. Propriedades biológicas.....	35
3.7.1. <i>Avaliação da atividade antioxidante</i>	35
3.7.1.1. Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	35
3.7.1.2. Ensaio de Inibição da Hemólise Oxidativa (OxHLIA)	36
3.7.2. <i>Citotoxicidade</i>	37
3.7.3. <i>Atividade antimicrobiana</i>	37
3.8. Análise estatística.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1. Composição proximal.....	40
4.2. Composição Química Relativa aos Compostos Hidrofílicos.....	41
4.2.1. <i>Açúcares livres</i>	41
4.2.2. <i>Ácidos orgânicos</i>	42
4.3. Composição Química Relativa aos Compostos Lipofílicos	45
4.3.1. <i>Ácidos gordos</i>	45
4.3.2. <i>Tocoferóis</i>	48
4.4. Compostos fenólicos.....	49
4.5. Betalaínas.....	58
4.6. Avaliação de propriedades biológicas.....	63
4.6.1. <i>Atividade antioxidante</i>	63
4.6.2. <i>Citotoxicidade</i>	63
4.6.3. <i>Atividade antimicrobiana</i>	65
5. CONCLUSÃO.....	68
6. REFERÊNCIAS	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Variedades cultivadas de <i>B. vulgaris</i>	4
Figura 2. Exemplos de monossacáridos e dissacáridos.	7
Figura 3. Exemplos de oligossacáridos e polissacáridos.	8
Figura 4. Exemplo ilustrativo da estrutura de um triglicérido.	9
Figura 5. Exemplos de ácidos gordos.	10
Figura 6. Esquema simplificado da derivatização de ácidos gordos.	11
Figura 7. Níveis estruturais das proteínas.	12
Figura 8. Aminoácidos essenciais e não essenciais.	13
Figura 9. Exemplos de vitaminas.	14
Figura 10. Exemplos de ácidos orgânicos.	16
Figura 11. Estruturas gerais de algumas classes de flavonoides.	18
Figura 12. Exemplos de ácidos fenólicos.	19
Figura 13. Exemplos de betalaínas.	20
Figura 14. Representação ilustrativa da neutralização de radicais livres por um agente antioxidante.	23
Figura 15. Reação do ácido tiobarbitúrico com o malondialdeído.	24
Figura 16. Exemplo de cromatograma de compostos fenólicos – folhas da cv. Albina Vereduna.	55
Figura 17. Exemplo de cromatograma de compostos fenólicos – raízes da cv. Albina Vereduna.	57
Figura 18. Exemplo de cromatograma de betalaínas – folhas da acelga suíça (<i>B. vulgaris</i> subsp. <i>cicla</i> var. <i>flavescens</i>)	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição proximal, valor energético e compostos hidrofílicos encontrados nas amostras de <i>B. vulgaris</i> L.....	44
Tabela 2. Composição química em relação aos compostos lipofílicos encontrados nas amostras de <i>B. vulgaris</i> L.	46
Tabela 3. Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima ($\lambda_{máx}$), dados espectrais de massa, abundâncias relativas de iões fragmentos, tentativa de identificação e quantificação dos compostos fenólicos encontrados nos extratos hidroetanólicos das folhas de <i>B. vulgaris</i> L.....	53
Tabela 4. Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima ($\lambda_{máx}$), dados espectrais de massa, abundâncias relativas de iões fragmentos, tentativa de identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos hidroetanólicos das raízes de <i>B. vulgaris</i> L.	56
Tabela 5. Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima ($\lambda_{máx}$), dados espectrais de massa, abundância relativa de iões fragmentos, tentativa de identificação e quantificação das betalaínas encontradas nas folhas e raízes das variedades de <i>B. vulgaris</i> L. estudadas.....	60
Tabela 6. Atividade antioxidante e citotóxica dos extratos hidroetanólicos das amostras de <i>B. vulgaris</i> L. estudadas.....	64
Tabela 7. Atividade antimicrobiana (concentração mínima inibitória (CMI), concentração mínima bactericida (CMB) e concentração mínima fungicida (CMF), mg/mL) dos extratos hidroetanólicos das amostras de <i>B. vulgaris</i> L. estudadas	67

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Δt	Diferença de tempo
AAPH	2,2'-azobis (2-metilpropionamida) di-hidrocloreto
ANOVA	Análise de Variância
AOAC	Association of Official Analytical Chemist – Associação Oficial de Químicos Analistas
APG	Angiosperm Phylogeny Group – Grupo de Filogenia das Angiopérmicas
BHT	Butylated Hydroxytoluene – Hidroxitolueno Butilado
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMF	Concentração Mínima Fungicida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
cv.	Cultivar
DAD	Detetor de díodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic Acid - Ácido Desoxirribonucleico
Dw	Dry weight
EC₅₀	Concentração de extrato correspondente a 50% da atividade antioxidante
ESI	Electrospray Ionization – Ionização por electrospray
FAME	Fatty Acids Methyl Esthers – Ésteres Metílicos de Ácidos Gordos
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FDT	Fibra Dietética Total
FID	Flame Ionization Detector – Detetor de Ionização de Chama
FL	Fluorescence Detector – Detetor de Fluorescência
GC	Gas Chromatography – Cromatografia gasosa

GI₅₀	Concentração responsável por 50% de inibição de crescimento celular
h	Hora(s)
HDL	High Density Lipoprotein – Lipoproteína de Alta Densidade
HPLC	High Performance Liquid Chromatography – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC/MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas
INT	Cloreto de <i>p</i> -iodonitrotetrazólio
IPB	Instituto Politécnico de Bragança
LC	Liquid Chromatography - Cromatografia Líquida
LDL	Low Density Lipoprotein – Lipoproteína de baixa densidade
m/v	Relação massa/volume
MDA	Malondialdeído
MEB	Malt Extract Broth - Caldo Extrato de Malte
mf	Massa fresca
MS	Espectrometria de massa
ms	Massa seca
MUFA	Monounsaturated Fatty Acids - Ácidos Gordos Monoinsaturados
n^o	Número
n.d.	Não detetado
n.t.	Não testado
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde/World Health Organization
OxHLIA	Inibição da hemólise oxidativa
pH	Potencial hidrogeniónico
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PI	Padrão interno

PUFA	Polyunsaturated Fatty Acids - Ácidos Gordos Polinsaturados
RI	Refractive Index – Índice de Refração
RNA	Ribonucleic Acid – Ácido Ribonucleico
rpm	Rotação Por Minuto
SFA	Saturated Fatty Acids - Ácidos Gordos Saturados
SPSS	Pacote estatístico para as ciências sociais
subsp.	Subespécie
t	Tempo
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Inibição da formação de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
Tr	Tempo de retenção
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
TSB	Tryptone Soy Broth – Caldo Triptona de Soja
UFC	Unidade formadora de colónias
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
V	Vestígios
var.	Variedade
v/v	Relação volume/volume
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda de absorção máxima

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Importância da avaliação da composição proximal e bioquímica

Os alimentos podem ser classificados como produtos naturais, frescos ou processados, que são consumidos pelo ser humano com o objetivo de obter energia e nutrientes essenciais para o funcionamento ideal do organismo. Portanto, a avaliação da composição química e das propriedades nutricionais pode fornecer informações valiosas sobre a qualidade e segurança dos alimentos, sendo fundamental para compreendermos os seus impactos na saúde e bem-estar (Cheung e Mehta, 2015).

Os alimentos são compostos majoritariamente por macronutrientes (hidratos de carbono, lípidos e proteínas) e micronutrientes (vitaminas e minerais), sendo denominados como “essenciais”, pois o organismo pode não ter a capacidade de produzi-los, ou os produz em quantidades insuficientes para suprir as necessidades do organismo, tendo de ser adquiridos através da dieta (Elmadfa e Meyer, 2010; Mehta e Cheung, 2015; Raymond *et al.*, 2013).

Atualmente, a tendência nutricional sugere a adoção de um estilo de vida e alimentação saudáveis, o que implica a ingestão equilibrada de fibras, proteínas, vitaminas e minerais, e a redução dos teores de lípidos, principalmente os saturados e trans, e açúcares. Além do fornecimento de nutrientes, determinados tipos de alimentos contêm compostos bioativos que, cada vez mais, têm a atenção de investigadores e consumidores devido às interessantes propriedades biológicas que desempenham, sendo associados a uma série de benefícios para a saúde (Cunha *et al.*, 2016; Raymond *et al.*, 2013). Nesse sentido, a avaliação da composição nutricional de um alimento pode fornecer informações valiosas sobre a sua capacidade de prover não apenas os nutrientes essenciais, mas também os compostos não essenciais bioativos que são capazes de atuar na manutenção do funcionamento adequado do organismo (Cunha *et al.*, 2016; Elmadfa e Meyer, 2010; Mehta e Cheung, 2015).

Os compostos bioativos são substâncias químicas encontradas em determinadas espécies de origem animal, como por exemplo em peixes e mel, e de origem vegetal, tais como frutas, legumes, verduras, cereais, oleaginosas e sementes, entre outros organismos, e que possuem propriedades que vão além das capacidades nutricionais básicas. Pertencem a diversas classes de compostos químicos, como, por exemplo, as vitaminas e alguns ácidos gordos, compostos fenólicos, ácidos orgânicos, carotenóides e

antocianinas, entre outros componentes bioativos de alimentos que conferem propriedades potencialmente benéficas para a saúde. Podem atuar contra o stresse oxidativo e os processos de envelhecimento, na promoção da apoptose de células cancerígenas, no metabolismo hormonal, no aumento da resposta imune e comunicação celular, ajudando assim na prevenção de diversas patologias incluindo o cancro, inflamações crónicas, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, diabetes, entre outras (Banwo *et al.*, 2021; Cunha *et al.*, 2016; Elmadfa e Meyer, 2010; Raymond *et al.*, 2013).

Nesta linha, e associados a hábitos alimentares mais saudáveis, exaltam-se os conceitos de ingredientes, alimentos funcionais e nutracêuticos, caracterizados por possuírem propriedades que, além de nutrir, apresentam potenciais fisiologicamente benéficos para o organismo, aumentando a sua aceitação e interesse de utilização em contextos culinários e industriais. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS; WHO – sigla do inglês para World Health Organization), as doenças crónicas não transmissíveis como neoplasias, doenças cardiovasculares, doenças respiratórias e diabetes *mellitus* estão entre as maiores causas de morte no mundo, e os fatores de risco incluem uma dieta não saudável e inatividade física (WHO, 2023). Nesse sentido, ressalta-se a importância de uma dieta equilibrada e diversificada, onde a presença de alimentos como cereais, frutas, legumes e vegetais, representa a disponibilidade de uma ampla gama de nutrientes essenciais e moléculas com propriedades biológicas (Banwo *et al.*, 2021; Figueiredo *et al.*, 2008; Kowalski *et al.*, 2020). Assim, a investigação nesse campo tem extrema relevância pois permite estudar e prover informações sobre a composição e potencial tanto de espécies vegetais que já fazem parte da nossa alimentação no dia-a-dia, mas que não são tão valorizadas, como de novas variedades e culturas que ainda não foram tão exploradas, permitindo assim a promoção e valorização do consumo das mesmas (Elmadfa e Meyer, 2010; Kowalski *et al.*, 2020).

1.2. A ordem Caryophyllales

Como exemplo de grande diversidade e riqueza nutricional, a ordem Caryophyllales é um grupo diversificado de plantas angiospérmicas que compreende 29 famílias botânicas, sendo a Amaranthaceae, a Cactaceae, a Caryophyllaceae e a Portulacaceae algumas das mais conhecidas. Das espécies de plantas representadas por essas famílias, muitas são conhecidas por serem bem adaptadas à deficiência hídrica, frio

e salinidade, e englobam suculentas, cactos e plantas carnívoras, bem como várias plantas herbáceas e arbustivas. São exemplos a beterraba e acelga (*Beta vulgaris* L.), pitaya vermelha (*Hylocereus costaricensis*), o espinafre (*Spinacia oleracea*), a quinoa (*Chenopodium quinoa*) e o cravo (*Dianthus caryophyllus*). Esta ordem também é caracterizada por possuir um número limitado de espécies que apresenta na sua composição uma classe distinta de pigmentos conhecidos como betalaínas, que são responsáveis pelas cores vibrantes e algumas das propriedades biológicas que essas espécies apresentam. É o caso da *Beta vulgaris* L., muito popular por apresentar sabor peculiar, elevado valor nutricional e funcional, além da versatilidade de formas de consumo. Esta distinta ordem botânica é notável não apenas pela sua diversidade e ampla distribuição ecológica e geográfica, mas também pelas suas adaptações morfológicas e ecofisiológicas únicas que fazem dela uma importante chave para a compreensão da evolução das angiospermas (Timoneda *et al.*, 2019; J. F. Walker *et al.*, 2018).

1.3. *Beta vulgaris* L.

1.3.1. Classificação botânica, variedades e aplicações

B. vulgaris é uma espécie de planta herbácea biennial classificada taxonomicamente como pertencente à família Amaranthaceae segundo o sistema APG (sigla do inglês para Angiosperm Phylogeny Group) ou à família Chenopodiaceae segundo o sistema Cronquist, e à ordem Caryophyllales. Está dividida em subespécies, compostas por dois grupos: variedades cultivadas e silvestres. O primeiro grupo inclui os principais representantes das espécies, das quais as raízes carnudas comestíveis, e menos popularmente as folhas, são utilizadas para diversos fins. Os exemplos incluem variedades de beterraba sacarina (por exemplo, *B. vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *saccharifera*), destinadas à produção de açúcar; variedades de beterraba forrageira (por exemplo, *B. vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *crassa*), utilizadas para a alimentação animal; e as diferentes variedades de beterraba, também conhecidas como beterraba de jardim ou beterraba de mesa, que são popularmente cultivadas para o consumo da sua raiz tuberosa (por exemplo, *B. vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *rubra* (beterraba vermelha), *B. vulgaris* subsp. *vulgaris* cv. Albina Vereduna (beterraba branca) e *B. vulgaris* subsp. *vulgaris* cv. Burpee's Golden (beterraba amarela)) (Babarykin *et al.*, 2019). A acelga suíça (*B. vulgaris* subsp. *cicla*) também faz parte da família da beterraba e é uma variedade cultivada.

Distingue-se da beterraba pelo grande desenvolvimento das folhas e do caule, que são as partes comestíveis valorizadas nesta variedade, não apresentando desenvolvimento de raízes tuberosas (**Figura 1**). O segundo grupo é composto pela beterraba marítima silvestre, representada apenas pela beterraba marinha (*B. vulgaris* subsp. *maritima*), que é a forma ancestral de todas as variedades (Babarykin *et al.*, 2019; Ninfali e Angelino, 2013).



Figura 1. Variedades cultivadas de *B. vulgaris*. A – Variedades de beterraba (*B. vulgaris* subsp. *vulgaris*); B e C – Variedades de acelga suíça (*B. vulgaris* subsp. *cicla*). (Fonte: adaptado de Thompson e Morgan (2023), Infoescola (2023) e NTNU2023)).

A espécie *B. vulgaris* é muito diversa e versátil, provavelmente originária entre o norte de África e o sul da Europa, e que se difundiu ao longo das costas dos mares Mediterrâneo e Atlântico. Desde então, a beterraba e os seus parentes têm sido cultivados em todo o mundo para consumo humano e animal, bem como para fins medicinais. Registos antigos das civilizações da Grécia, Roma e Egito descrevem o uso da beterraba (tanto a raiz quanto as folhas) como ingrediente na preparação de pratos culinários e

medicamentos (Babarykin *et al.*, 2019; Goldman e Janick, 2021). No século XIX, a beterraba sacarina tornou-se uma cultura comercialmente importante na Europa devido aos embargos comerciais às importações de cana-de-açúcar durante a era napoleônica. Isso levou ao rápido desenvolvimento da indústria açucareira à base de beterraba. Segundo estimativas fornecidas pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO – sigla do inglês para Food and Agriculture Organization of the United Nations), em 2021, a Rússia foi o principal produtor de beterraba sacarina (41.201.669 toneladas), seguida pela França (34.365.390 toneladas), pelos Estados Unidos da América (33.339.950 toneladas), pela Alemanha (31.945.400 toneladas), Turquia (18.250.000 toneladas) e Polónia (15.273.850 toneladas) (FAOSTAT, 2023; Ninfali e Angelino, 2013).

Como parte integrante das tradições culinárias, a beterraba ainda ocupa um lugar de destaque numa infinidade de pratos e preparações. As suas raízes podem ser consumidas cruas, assadas, cozidas ou em conserva, e são utilizadas na preparação de sumos, saladas, pães e sopas, entre outros pratos. Além disso, as suas folhas têm ganho popularidade como folhas verdes imaturas para o uso em saladas (microverdes). A acelga, por outro lado, é altamente valorizada pelas suas folhas vistosas (Di Gioia *et al.*, 2017; Goldman e Janick, 2021; Mzoughi *et al.*, 2019).

Além do seu apelo culinário, a beterraba e a acelga têm destaque por serem ricas e nutritivas fontes de proteínas, fibras alimentares, além de vitaminas como tocoferóis (vitamina E) e ácido ascórbico (vitamina C), aminoácidos essenciais e não essenciais, carotenóides, nitratos inorgânicos (NO_3^-), minerais essenciais como potássio, sódio, fósforo, cálcio, magnésio, cobre, ferro, zinco e manganês (Abdo *et al.*, 2020; Chhikara *et al.*, 2019; Ninfali e Angelino, 2013). Sendo ambas vegetais, são conhecidas pelo seu teor em hidratos de carbono, entre outros nutrientes. As beterrabas são fonte de fibras dietéticas, fornecendo as formas solúveis e insolúveis, são especialmente ricas em açúcares naturais tais como a sacarose, o que lhes confere o sabor caracteristicamente adocicado, sendo uma das razões pelo seu elevado valor comercial. A acelga, por outro lado, possui menos açúcares em comparação com a beterraba, mas apresenta maiores teores em fibras dietéticas, contribuindo para o seu *status* de vegetal folhoso saudável e de baixo teor calórico (Babarykin *et al.*, 2019; Mzoughi *et al.*, 2019; Ninfali e Angelino, 2013).

Além disso, a notável presença de fitoquímicos biologicamente ativos na composição de ambas as culturas tem despertado o interesse da comunidade científica que investiga as promissoras propriedades biológicas relacionadas com os seus compostos. Nomeadamente, é descrita a presença de compostos fenólicos, incluindo ácidos fenólicos, como os ácidos gálico, siríngico e cafeico, bem como importantes derivados de flavonoides chamados apigeninas (vitexina). Além disso, existem ácidos gordos poli-insaturados, como os ácidos linoleico e α -linolénico, juntamente com importantes pigmentos heterocíclicos à base de nitrogénio e solúveis em água, conhecidos como betacianinas (que conferem uma cor vermelho-violeta) e betaxantinas (produzem uma tonalidade amarelo-laranja). Estes pigmentos fazem parte da família das betalainas e são reconhecidos como excelentes agentes antioxidantes e anti-inflamatórios, entre outras propriedades (Fu *et al.*, 2020; Gengatharan *et al.*, 2015; Nikan e Manayi, 2019). Estudos científicos evidenciam que o consumo de folhas e raízes de beterraba, bem como de folhas de acelga, podem proporcionar efeitos fisiológicos benéficos na promoção da saúde de quem as consome. É descrito que esses vegetais possuem várias propriedades biológicas, incluindo atividades antioxidantes, anti-hipertensivas e antitumorais. Além disso, exibiram potenciais hipoglicémicos, hepatoprotetores e hipotensores significativos (Gawlik-Dziki *et al.*, 2020; Mirmiran *et al.*, 2020; Ninfali e Angelino, 2013).

1.4. Composição proximal e química

1.4.1. Hidratos de carbono

Os hidratos de carbono, também conhecidos como carboidratos, representam a classe de biomoléculas mais abundante na natureza, e a fonte de energia mais importante da nossa alimentação. Juntamente com as proteínas e os lípidos, são um dos três principais macronutrientes presentes nos alimentos, e desempenham papéis vitais no funcionamento do organismo. São compostos orgânicos definidos como poli-hidroxi aldeídos ou poli-hidroxicetonas e seus derivados, e são produzidos por organismos autotróficos como plantas, algas e algumas bactérias, através da fotossíntese. Possuem diversas formas e tamanhos, desde pequenas moléculas de açúcar simples a polímeros complexos formados por várias unidades de açúcar ligadas entre si por diferentes tipos de ligações glicosídicas, sendo classificados de acordo com suas estruturas e funções biológicas (Banwo *et al.*, 2021; Mehta e Cheung, 2015).

As unidades de açúcar (monossacáridos) são a base dos hidratos de carbono, e cada unidade é formada por uma estrutura que pode conter de 3 a 7 carbonos (oses). Os açúcares simples podem apresentar-se sob a forma de monossacáridos ou dissacáridos (2 monossacáridos ligados). Os monossacáridos mais conhecidos são as pentoses e hexoses, podendo ser citadas como exemplos a ribose e a desoxirribose, pentoses muito importantes que fazem parte da estrutura dos nucleotídeos do DNA e RNA, respetivamente, e como hexoses, a glucose e a frutose (**Figura 2**). Já como dissacáridos, são exemplos a sacarose (frutose + glucose), a lactose (glucose + galactose) e a trealose (glucose + glucose). Estes açúcares simples são conhecidos principalmente por suas propriedades adoçantes, e são de digestão e absorção mais rápida no organismo. Também são empregues como conservantes alimentares, devido à capacidade de prevenir o crescimento microbiano, além influenciar na viscosidade dos alimentos (Banwo *et al.*, 2021; Cheung e Mehta, 2015; Cust *et al.*, 2009; Voragen, 1998).

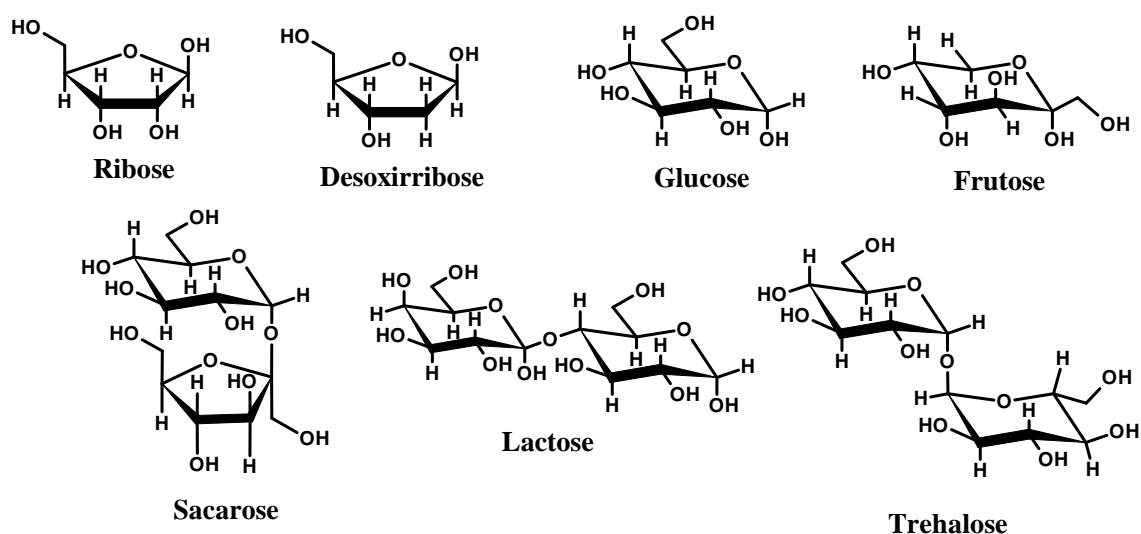


Figura 2. Exemplos de monossacáridos e dissacáridos. (Fonte: Elaboração própria através do programa ChemSketch Freeware 14.0)

Açúcares que contenham de 3 a 10 monossacáridos são classificados como oligossacáridos, e contemplam, como por exemplo, trissacáridos como a rafinose, formada por unidades de galactose, frutose e glucose (**Figura 2**). Hidratos de carbono mais complexos (mais de 10 monossacáridos) são classificados como polissacáridos

(**Figura 3**), e estes desempenham importantes funções a nível estrutural nas plantas, e fisiológico no ser humano. Pertencem a esse grupo o amido, o glicogénio e os polissacáridos não amiláceos, como a celulose, hemicelulose, pectina, gomas, mucilagens e lenhinas, sendo estes exemplos considerados como importantes fontes de fibras dietéticas. As fibras consistem basicamente nas partes não digeríveis do alimento vegetal, que resistem à digestão e absorção intestinal, porém são fermentáveis (fibras solúveis) ou não fermentáveis (fibras insolúveis) no intestino grosso. Um maior consumo de fibras pode auxiliar na saúde digestiva e ajudar a manter níveis adequados de açúcar no sangue, para além de promover a sensação de saciedade e ajudar no controlo de massa corporal (Mehta e Cheung, 2015; Mello e Laaksonen, 2009; Voragen, 1998).

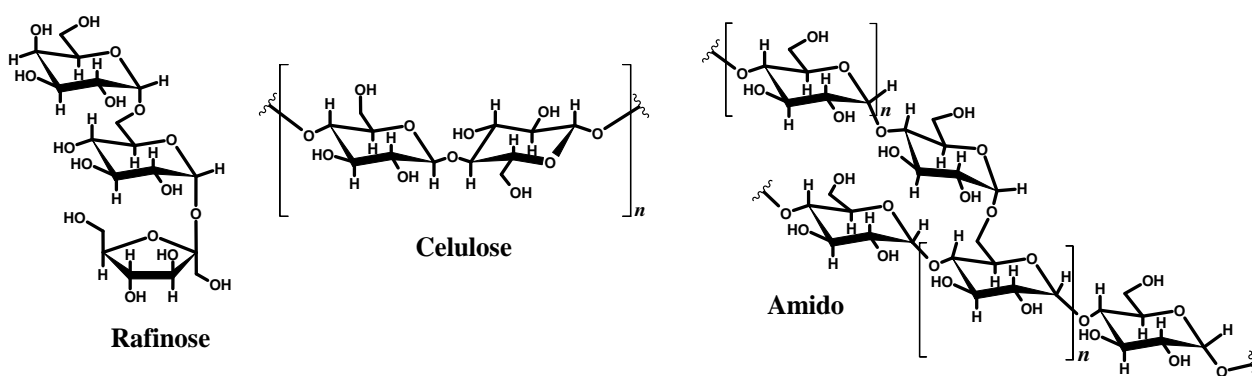


Figura 3. Exemplos de oligossacáridos e polissacáridos. (Fonte: Elaboração própria através do programa ChemSketch Freeware 14.0)

Os açúcares também podem ser encontrados ligados a outros compostos (proteínas, lípidos, entre outras classes de compostos ligados covalentemente), e são denominados glicoconjugados. Estes, desempenham um importante papel em diversos processos biológicos, como na interação e sinalização celular, e também são capazes de proteger ou alterar propriedades físico-químicas (estabilidade, solubilidade) de compostos bioativos aos quais estejam ligados, como no caso de diversos compostos fenólicos, por exemplo (Nelson e Cox, 2014; Voragen, 1998).

1.4.2. Lípidos e ácidos gordos

As gorduras são constituídas por várias famílias de lípidos (monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, fosfolípidos, cerebrosídeos, esteróis, terpenos, álcoois gordos e ácidos gordos), sendo os triglicéridos os seus principais componentes. Os triglicéridos, por sua vez, são formados a partir da esterificação entre uma molécula de glicerol e três ácidos gordos (**Figura 4**). Nas três possíveis posições, podem estar ligados três ácidos gordos iguais (simples), mas a maioria dos triglicéridos de ocorrência natural apresentam dois ou três ácidos gordos diferentes (misto) (Nelson e Cox, 2014; Raymond *et al.*, 2013).



Figura 4. Exemplo ilustrativo da estrutura de um triglicérido. A azul – Ácido palmítico (C16:0); A vermelho – Ácido oléico (C18:1n9). (Fonte: Elaboração própria através do programa ChemSketch Freeware 14.0).

Os ácidos gordos são compostos orgânicos formados por carbono, hidrogénio e oxigénio, que se apresentam sob a forma de uma cadeia linear de carbono de comprimento variável e com um grupo carboxila em uma extremidade (**Figura 5**). Podem ser saturados (SFAs – sigla do inglês para Saturated Fatty Acids; sem ligação dupla), monoinsaturados (MUFAs – sigla do inglês para Monounsaturated Fatty Acids; uma ligação dupla) ou poli-insaturados (PUFAs – sigla do inglês para Polyunsaturated Fatty Acids; duas ou mais ligações duplas), e desempenham funções energéticas, metabólicas e estruturais no organismo, sendo essenciais para a formação da estrutura das membranas celulares, de tecidos como cerebral e nervoso, produção de hormonas, e transporte de nutrientes e fitoquímicos lipossolúveis (ex.: carotenoides e licopenos), por exemplo (Mehta e Cheung, 2015; Nelson e Cox, 2014; Raymond *et al.*, 2013).

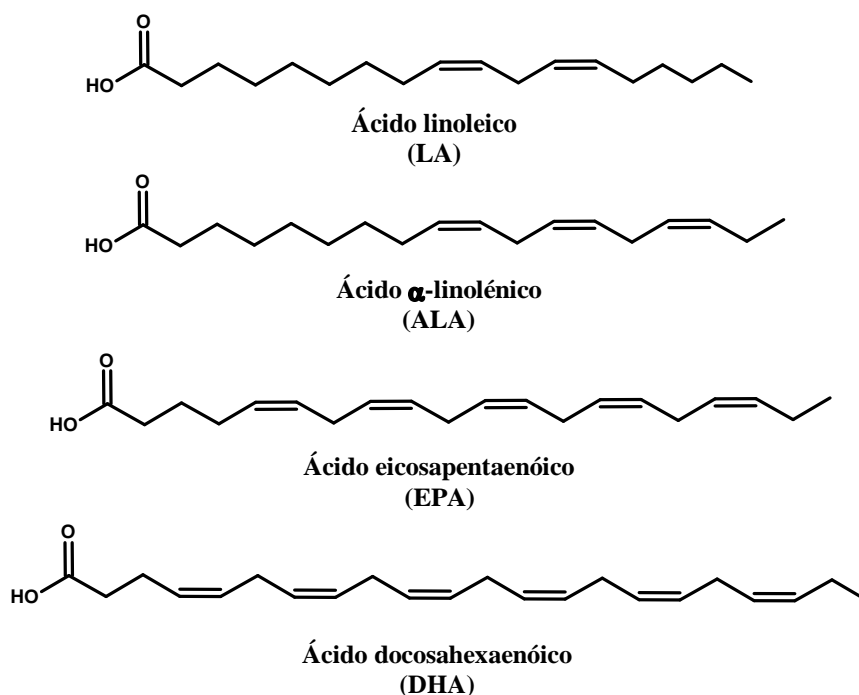


Figura 5. Exemplos de ácidos gordos. (Fonte: Elaboração própria através do programa ChemSketch Freeware 14.0).

Os ácidos gordos saturados, mais comuns em gorduras animais (com exceção dos peixes), tendem a ser sólidos à temperatura ambiente. Apesar da presença de lípidos na dieta ser altamente valorizada, o consumo excessivo de gorduras saturadas tem sido intimamente associado à hipercolesterolemia, uma vez que no fígado são oxidadas e utilizadas na produção do colesterol, e nesse caso, aumenta a produção do colesterol LDL (Low Density Lipoprotein), também conhecido como “colesterol mau”. Este, por sua vez, pode acumular-se nas paredes das artérias, levando ao desenvolvimento de placas de aterosclerose, o que é um fator de risco em doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus*, cancro e outras doenças crónicas (Chow, 2007; Kowalski *et al.*, 2020; Nelson e Cox, 2014).

Já as gorduras vegetais (exceto os óleos de coco e de palma) apresentam-se líquidas à temperatura ambiente, por conterem alto teor em MUFAs e PUFAs. Estes, podem ser sintetizados pelo organismo humano, bem como pelo dos restantes mamíferos. Entretanto, essa capacidade é limitada no que diz respeito aos poli-insaturados, sendo estes considerados nutrientes essenciais. Dentro da classe dos PUFAs, encontra-se a importante família de ácidos gordos ómega-3 (ω -3) e ómega-6 (ω -6), descritos por possuírem promissoras propriedades anti-inflamatória e antioxidante, além de

contribuírem para o bom funcionamento cerebral. São exemplos os ácidos α -linolénico (ALA; C18:3, ω -3) e linoleico (LA; C18:2, ω -6), que são precursores de moléculas reguladoras no corpo, desempenhando um papel crucial em processos como na resposta inflamatória, imunológica, coagulação e pressão sanguínea (**Figura 5**). Também podem ser citados os ácidos eicosapentaenóico (EPA; C20:5, ω -3) e ácido docosahexaenóico (DHA; C22:6 ω -3) (**Figura 5**), que são encontrados em óleos de muitas espécies de peixes marinhos gordurosos como salmão e sardinha, e são descritos por auxiliarem na saúde cardiovascular, cerebral e ocular (Arbex *et al.*, 2015; Nelson e Cox, 2014; Raymond *et al.*, 2013).

Para que seja possível a análise cromatográfica dos ácidos gordos, os mesmos precisam ser convertidos em ésteres de ácidos gordos (FAMEs – sigla do inglês para Fatty Acid Methyl Esters) através de derivatização química por reação de transesterificação. Esse processo consiste na transformação de um éster em outro através da troca do grupo alcoxila, pela reação do triglicérido com um álcool na presença de uma base ou ácido forte, produzindo uma mistura de FAMEs e glicerol (**Figura 6**) (Geris *et al.*, 2007).

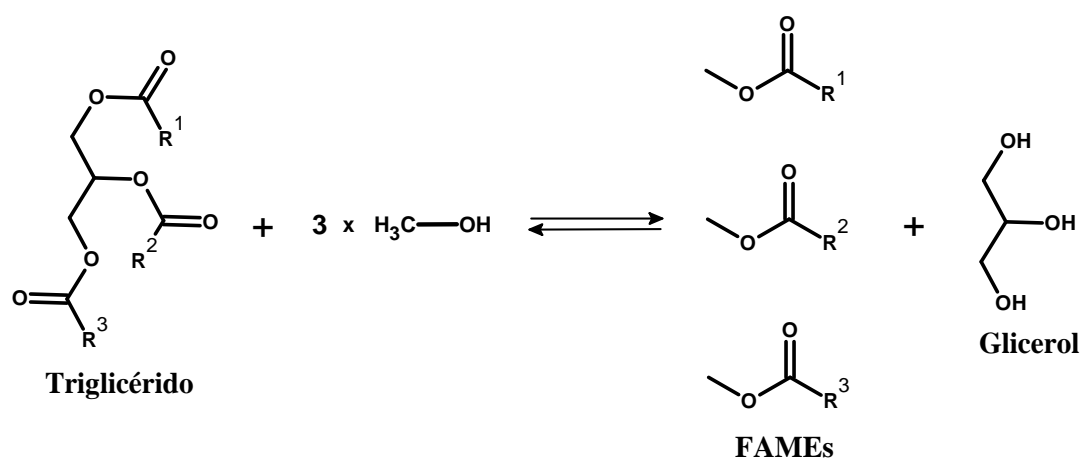


Figura 6. Esquema simplificado da derivatização de ácidos gordos. (Fonte: Elaboração própria através do programa ChemSketch Freeware 14.0)

1.4.3. Proteínas

As proteínas são macromoléculas complexas que controlam praticamente todos os processos que ocorrem na célula, possuem um papel de destaque numa vasta gama de processos biológicos. São indispensáveis para a síntese e reparo de músculos, órgãos e outros tecidos, transporte de moléculas e resposta imunológica, por exemplo. Além disso,

há proteínas específicas que atuam como enzimas, desempenhando um papel fundamental na catálise de reações bioquímicas e na regulação de processos fisiológicos essenciais. Quando a ingestão de hidratos de carbono e gorduras é insuficiente, as proteínas também podem servir como fonte de energia, embora esta não seja a sua função principal (Mehta e Cheung, 2015; Nelson e Cox, 2014; Raymond *et al.*, 2013).

No seu nível fundamental, as proteínas são compostas pela combinação de um conjunto comum de 20 aminoácidos (proteicos), que são conectados por ligações peptídicas e podem formar 4 tipos de estruturas: primária, secundária, terciária e quaternária (**Figura 7**) (Nelson e Cox, 2014; Raymond *et al.*, 2013).

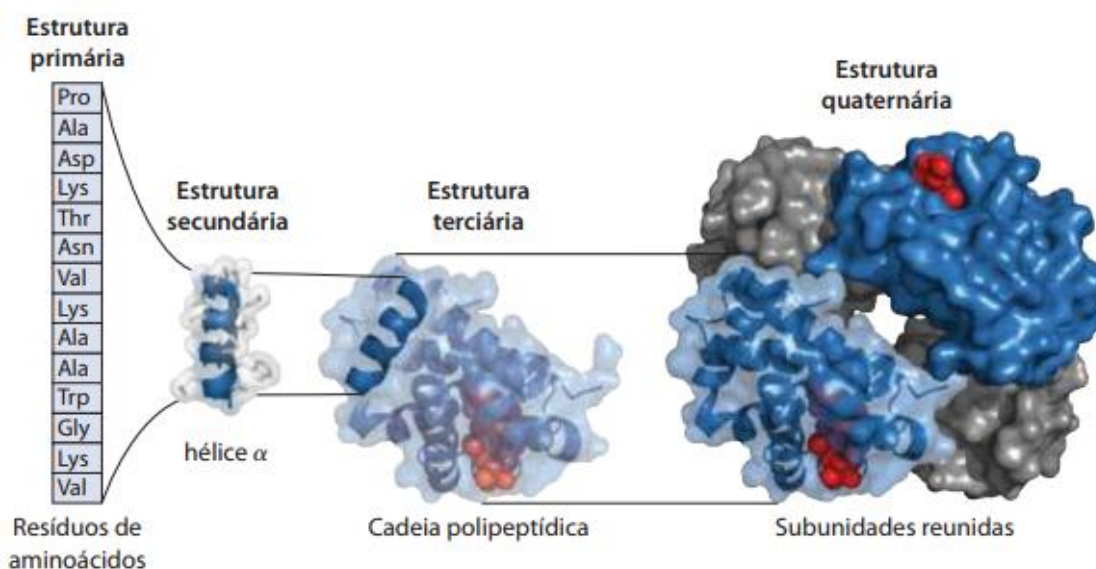


Figura 7. Níveis estruturais das proteínas. (Fonte: Nelson e Cox (2014)).

Esses aminoácidos enquadram-se em duas categorias: essenciais e não essenciais, o que dependerá da capacidade do organismo de sintetizá-los ou se devem ser obtidos por meio da dieta (**Figura 8**). Este grupo de moléculas precursoras pode ser considerado o alfabeto através do qual a linguagem da estrutura das proteínas é articulada, permitindo a notável diversidade das mesmas em todos os organismos vivos, além de serem cruciais para a síntese de metabolitos secundários em plantas (Mehta e Cheung, 2015; Nelson e Cox, 2014).

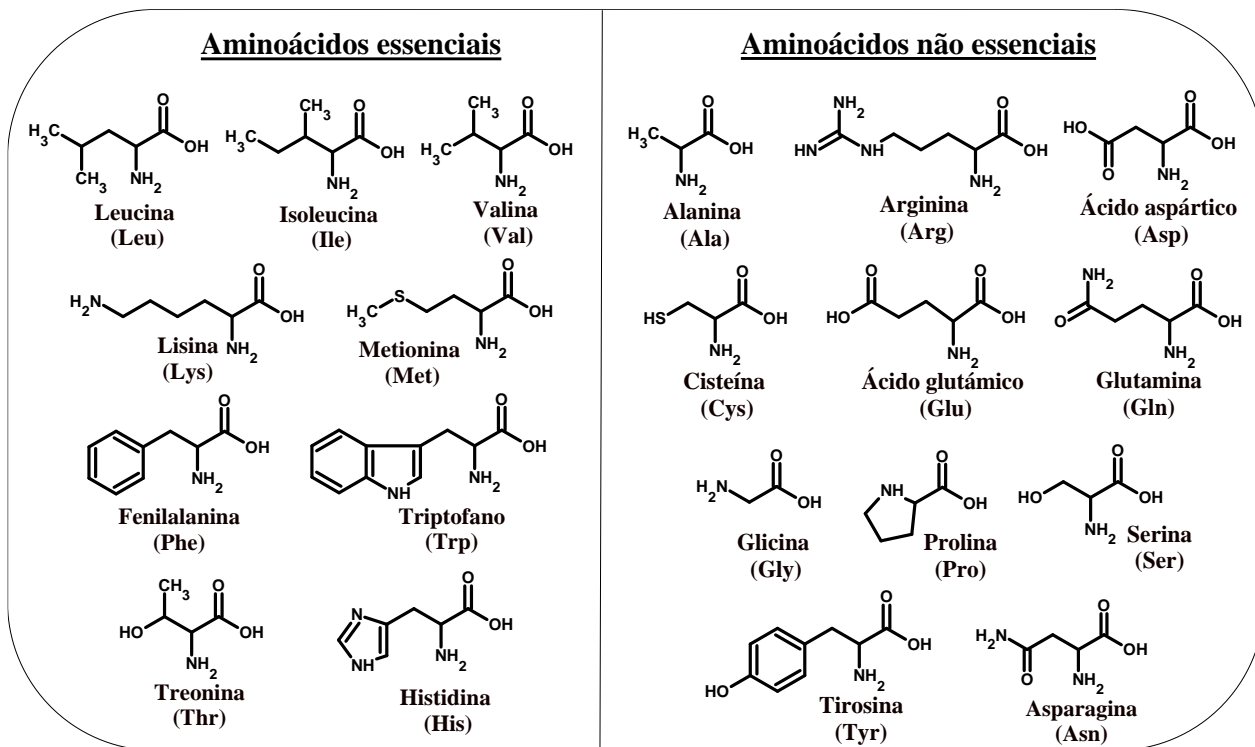


Figura 8. Aminoácidos essenciais e não essenciais. (Fonte: Elaboração própria através do programa ChemSketch Freeware 14.0)

1.4.4. Valor energético

No ser humano, bem como nos restantes organismos aeróbios, a glucose e outros açúcares, os ácidos gordos e a maioria dos aminoácidos disponibilizados pelos alimentos são oxidados a CO_2 e H_2O através do processo de respiração celular (glicólise, ciclo de Krebs), resultando na produção de energia. Portanto, o valor energético é estimado baseando-se na capacidade energética de cada um desses macronutrientes, sendo os lípidos as principais fontes e reservas de energia (9 kcal/g). Já os hidratos de carbono e proteínas são capazes de fornecer 4kcal/g. Como a maior parte das fibras é resistente à digestão e à absorção, o seu valor calórico é baixo (2kcal/g) (Cheung e Mehta, 2015; Raymond *et al.*, 2013).

1.4.5. Tocoferóis

Embora necessárias em quantidades relativamente pequenas, as vitaminas são fundamentais em vários aspetos da saúde humana, pois atuam em processos vitais como na resposta imunológica, no crescimento ósseo e na visão, por exemplo, além de atuar como estabilizadores de membrana, dadores e recetores de hidrogénio (H^+) e de eletrões, hormonas e coenzimas. Esses compostos orgânicos pertencem ao grupo dos micronutrientes essenciais ao metabolismo humano, e abrangem uma grande variedade de moléculas que são categorizadas em dois grupos principais: vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis. Como exemplo de vitaminas lipossolúveis estão o retinol (A) e o tocoferol (E) (**Figura 9**). Estas são transportadas e absorvidas com o auxílio dos lípidos dietéticos, podem ser armazenadas nos tecidos adiposos para uso posterior, de acordo com as necessidades fisiológicas. Por outro lado, as vitaminas solúveis em água englobam o ácido ascórbico (C) e as vitaminas do complexo B (B9, por exemplo) (**Figura 9**), e necessitam de consumo diário, pois não são armazenadas de forma significativa no corpo (Azzi, 2019; Cheung e Mehta, 2015; Raymond *et al.*, 2013).

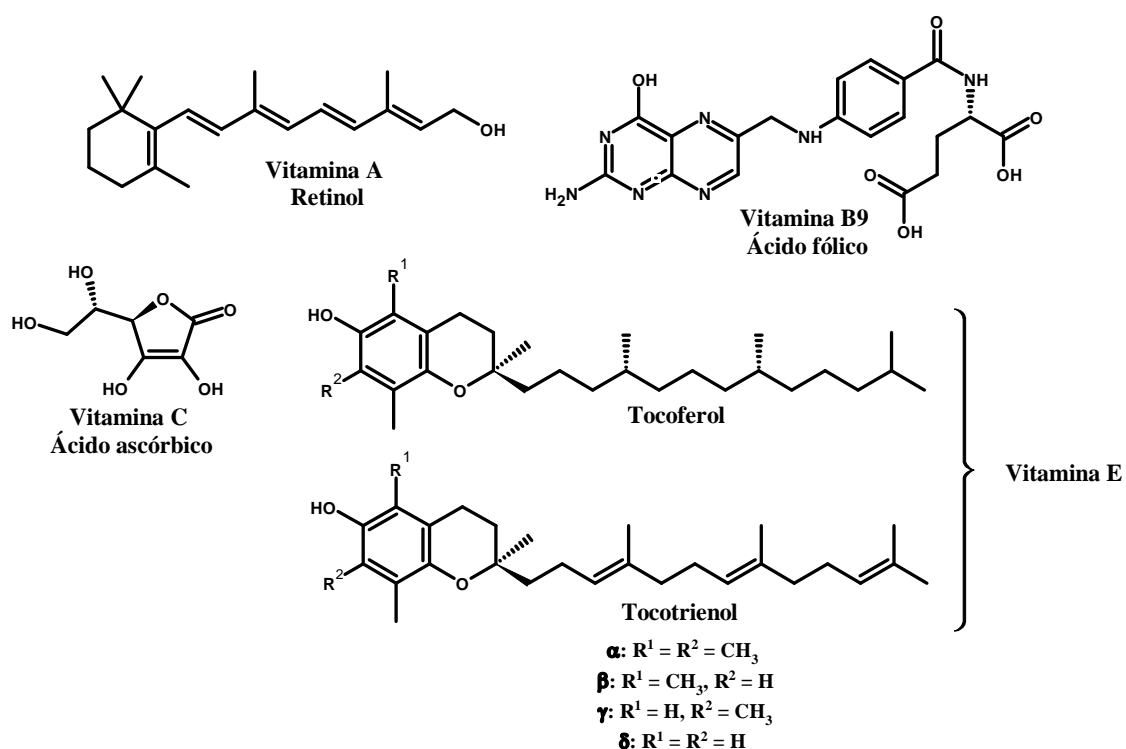


Figura 9. Exemplos de vitaminas. (Fonte: Elaboração própria através do programa ChemSketch Freeware 14.0).

De entre as vitaminas, a vitamina E destaca-se por ser considerada um dos principais agentes oxidantes do corpo, capaz de proteger o organismo contra os efeitos prejudiciais das Espécies Reativas de Oxigênio (ROS - *Reactive Oxygen Species*) que são formadas metabolicamente ou encontradas no ambiente. A vitamina E representa uma forma genérica das diferentes isoformas (α -, β -, γ - e δ -) dos compostos lipossolúveis chamados tocoferóis e tocotrienóis (**Figura 9**), sendo o α - e γ -tocoferol as formas mais encontradas nos alimentos. A vitamina E pode ser encontrada em vários alimentos de origem vegetal como nozes, sementes, verduras de folhas verdes e cereais integrais, e é identificada e quantificada em termos de equivalentes de α -tocoferol, pois essa é a forma que possui efeito oxidante mais efetivo (Angelo e Jorge, 2006; Raymond *et al.*, 2013).

1.4.6. Minerais

Os minerais são substâncias inorgânicas que também são essenciais para o bom funcionamento do nosso organismo, e ao contrário de muitos compostos, não podem ser sintetizados internamente, sendo obtidos unicamente através de fonte externa (principalmente da dieta). Apesar de exigidos em quantidades relativamente pequenas, os minerais desempenham diversas funções essenciais, como de eletrólitos nos fluídos corporais, formadores de componentes de enzimas e hormonas, e até mesmo no suporte estrutural de órgãos como ossos e dentes (Cheung e Mehta, 2015; Raymond *et al.*, 2013).

Os minerais essenciais incluem cálcio (Ca), sódio (Na), magnésio (Mg), fósforo (P), potássio (K), zinco (Zn), selênio (Se), manganês (Mn), cobre (Cu), molibdênio (Mo), cromo (Cr), iodo (I), flúor (F) e cloreto (Cl⁻), e podem existir em diversas formas, como em sais inorgânicos ou orgânicos, ou combinados com a matéria orgânica. Para uma compreensão inicial sobre a composição mineral dos alimentos, é indicada a análise de cinzas. O resíduo inorgânico após a incineração completa dos componentes orgânicos representa assim o conteúdo em minerais, podendo orientar futuras análises mais detalhadas sobre o perfil mineral (por espectrometria de absorção atômica, por exemplo) (Cheung e Mehta, 2015; Raymond *et al.*, 2013).

1.4.7. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos compreendem um grupo de compostos muito diversos que estão presentes em frutas, verduras, vegetais e nos seus produtos derivados, e desempenham um papel significativo no valor nutricional e nas propriedades sensoriais dos alimentos. Estes ácidos têm como precursores compostos como aminoácidos, lípidos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos e esteroides, e participam de uma ampla gama de processos metabólicos (muitas vezes não relacionados), sendo de extrema importância como intermediários na produção de energia (ciclo de Krebs) e produtos de processos de fermentação, por exemplo (Blau *et al.*, 2008; Maurino *et al.*, 2016; R. P. Walker e Famiani, 2018).

A presença de ácidos orgânicos pode variar entre diferentes espécies de frutas, verduras, legumes, cultivares e estágios de desenvolvimento, e como exemplos podem ser citados os ácidos oxálico, málico, succínico, e cítrico, entre outros (**Figura 10**). Estes ácidos contribuem para o sabor e paladar dos alimentos, uma vez que influenciam na acidez e textura dos mesmos, além de serem considerados excelentes agentes conservantes, sendo muito valorizados na indústria alimentar (Blau *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2014; R. P. Walker e Famiani, 2018).

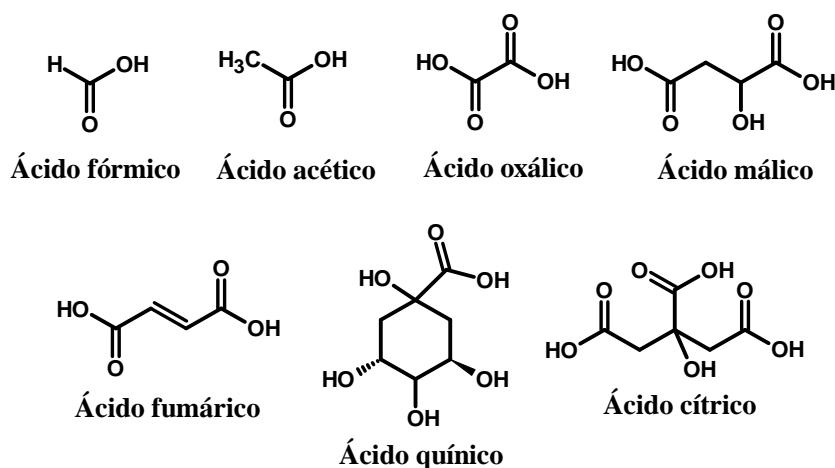


Figura 10. Exemplos de ácidos orgânicos. (Fonte: Elaboração própria através do programa ChemSketch Freeware 14.0)

1.4.8. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos constituem um conjunto importante de fitoquímicos que desempenham papel fundamental tanto na biologia das plantas quanto na saúde humana. São produtos do metabolismo secundário das plantas (vias do xiquimato e do acetato/malonato), e encontram-se amplamente distribuídos em vegetais como frutas, legumes e cereais, desempenhando importantes funções como a proteção contra stresses ambientais, interações com polinizadores e defesa. Também influenciam na cor, sabor e aroma, e estabilidade oxidativa desses alimentos, sendo relevantes para as suas propriedades sensoriais (Angelo e Jorge, 2006; Banwo *et al.*, 2021; Nelson e Cox, 2014).

Apesar de não serem essenciais à nutrição humana, estes compostos são conhecidos e valorizados por possuírem propriedades biológicas interessantes, como por exemplo a atividade antioxidante, que lhes confere a capacidade de combater os radicais livres que causam danos oxidativos às células. O stresse oxidativo está associado ao desenvolvimento de processos fisiopatológicos como envelhecimento, cancro, aterosclerose e inflamação, e por esse motivo, a capacidade protetiva desses agentes antioxidantes tem sido muito estudada, uma vez que podem promover potenciais benefícios para a saúde. São vários os estudos que têm sido dedicados a explorar as implicações desses compostos para a saúde, demonstrando evidências de propriedades bioativas promissoras, como antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antineoplásica, o que pode indicar a promoção de efeitos benéficos para a saúde (Angelo e Jorge, 2006; Banwo *et al.*, 2021; Ferreira e Matsubara, 1997; Raymond *et al.*, 2013).

Esses compostos incluem uma grande variedade de substâncias, e podem ser classificados em diferentes subgrupos de acordo com suas estruturas químicas, entre os quais encontram-se os fenóis simples, ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos e ácidos hidroxicinâmicos), flavonoides, carotenóides, taninos, lignanas, além de outros compostos cujas estruturas variam de simples moléculas fenólicas a polímeros complexos de alta massa molecular (Angelo e Jorge, 2006; Banwo *et al.*, 2021).

Os flavonoides formam a mais popular e maior classe de polifenóis vegetais, e são conhecidos principalmente por atuarem na atração de polinizadores e na proteção contra os danos causados pela radiação UV, além de auxiliarem na defesa contra patógenos e herbívoros (Angelo e Jorge, 2006; Banwo *et al.*, 2021). Possuem uma estrutura composta por um esqueleto de carbono C6-C3-C6, e podem ser encontrados ligados a açúcares

(glicosídeos) ou livres (agliconas), e são divididos em subclasses dependendo das características das agliconas. As principais incluem as antocianidinas e os seus glicosídeos denominados antocianinas (ex.: cianidina, malvidina e peonidina), flavanonas (ex.: hesperetina, eriodictiol e naringenina), flavonas (ex.: luteolina e apigenina), isoflavonas (ex.: daidzeína, genisteína e gliciteína), flavan-3-óis (ex.: epicatequina, catequina e teaflavina) e flavonóis (ex.: quercetina, kaempferol e isorhamnetina) (**Figura 11**) (Angelo e Jorge, 2006; Banwo *et al.*, 2021; Raymond *et al.*, 2013).

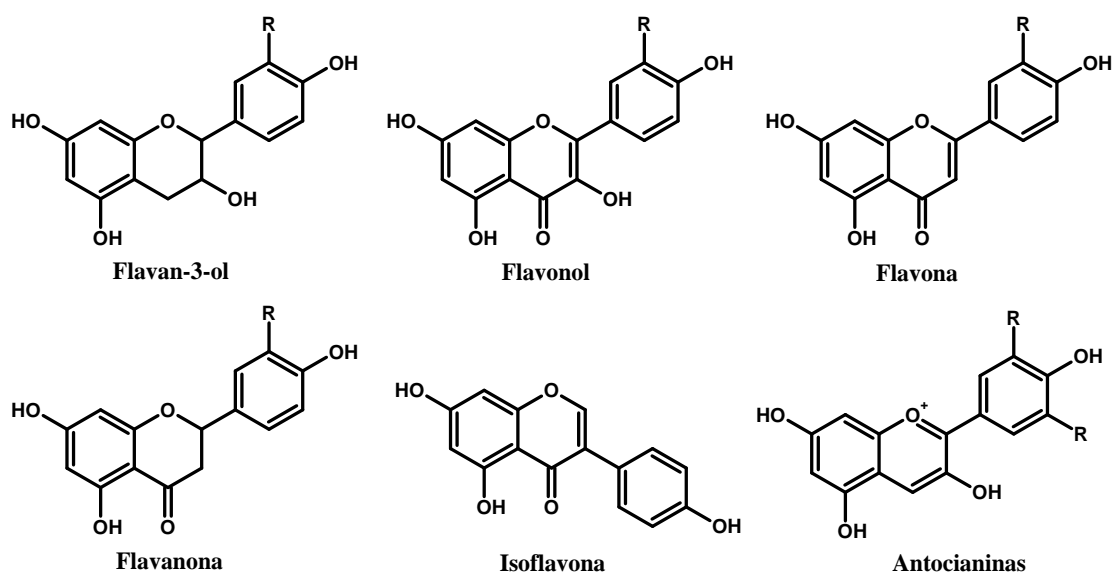


Figura 11. Estruturas gerais de algumas classes de flavonoides. (Fonte: Elaboração própria através do programa ChemSketch Freeware 14.0)

Os ácidos fenólicos compõem outra classe de fitoquímicos, que podem ser encontrados sob a forma livre solúvel ou conjugados com outros compostos, e possuem na sua estrutura um ácido carboxílico funcional. Os ácidos fenólicos naturais apresentam estruturas baseadas em dois distintos núcleos gerais, podendo ser classificados como ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos. Os ácidos hidroxibenzóicos têm a estrutura comum de C6-C1, enquanto os ácidos hidroxicinâmicos têm a estrutura C6-C3. Entre os ácidos hidroxibenzóicos encontram-se os ácidos gálico, protocatecuico, *p*-hidroxibenzóico, vanílico e salicílico, enquanto como ácidos hidroxicinâmicos, podem ser citados os ácidos *p*-cumárico, ferúlico, sinápico e cafeico (**Figura 12**) (Angelo e Jorge, 2006; Banwo *et al.*, 2021).

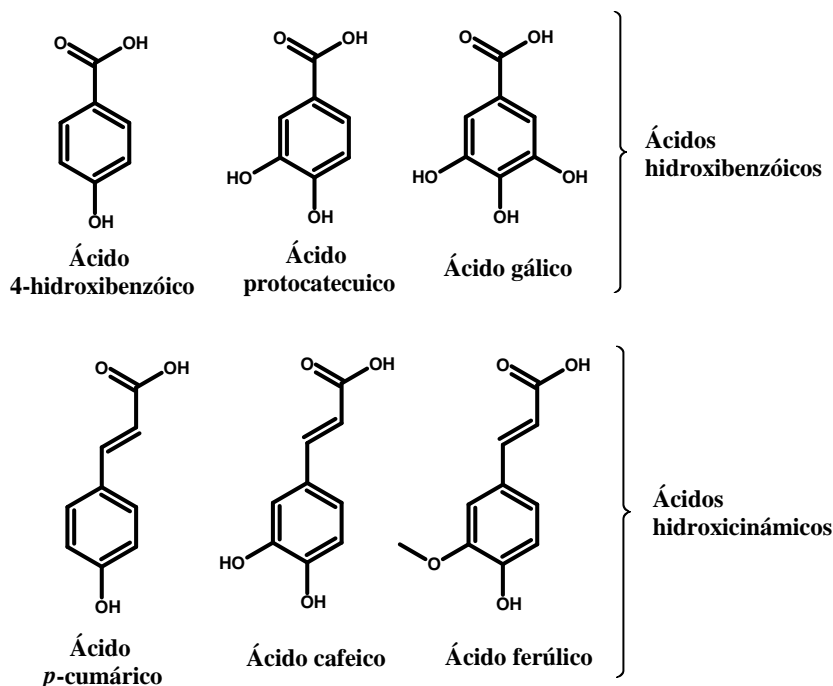


Figura 12. Exemplos de ácidos fenólicos. (Fonte: Elaboração própria através do programa ChemSketch Freeware 14.0)

1.4.9. Betalaínas

As betalaínas são pigmentos vegetais nitrogenados e hidrossolúveis encontrados em plantas das famílias da ordem Caryophyllales, como Amaranthaceae, Basellaceae, Cactaceae, Portulacaceae, entre outras, além de algumas espécies de fungos (e.x.: *Amanita muscaria*). Além da beterraba e acelga, outras fontes de betalaína incluem pitaya (*Hylocereus andatus* L.), quinoa (*Chenopodium quinoa* L.) e algumas espécies dos gêneros *Opuntia* e *Amaranthus*, por exemplo (Carreón-Hidalgo *et al.*, 2022; Fu *et al.*, 2020; Timoneda *et al.*, 2019).

Esses pigmentos dividem-se em duas classes principais: betacianinas (vermelho-violeta) e betaxantinas (amarelo-laranja), e possuem estruturas derivadas do ácido betalâmico (cromóforo). As betacianinas apresentam absorção máxima em 538 nm, e incluem as betanina, isobetanina e neobetanina, enquanto as betaxantinas possuem absorção máxima a 480 nm, como a miraxantina V e a vulgaxantina I, diferenciando-se entre si pela ligação do cromóforo com aminoácidos, gliconas e compostos imino. A sua presença em espécies vegetais representa a exclusão mútua das antocianinas, pigmentos outrora considerados dominantes na natureza, e por isso a sua biossíntese e os motivos

dessa exclusão têm sido alvos de diversos estudos (Azeredo, 2009; Chhikara *et al.*, 2019; Timoneda *et al.*, 2019).

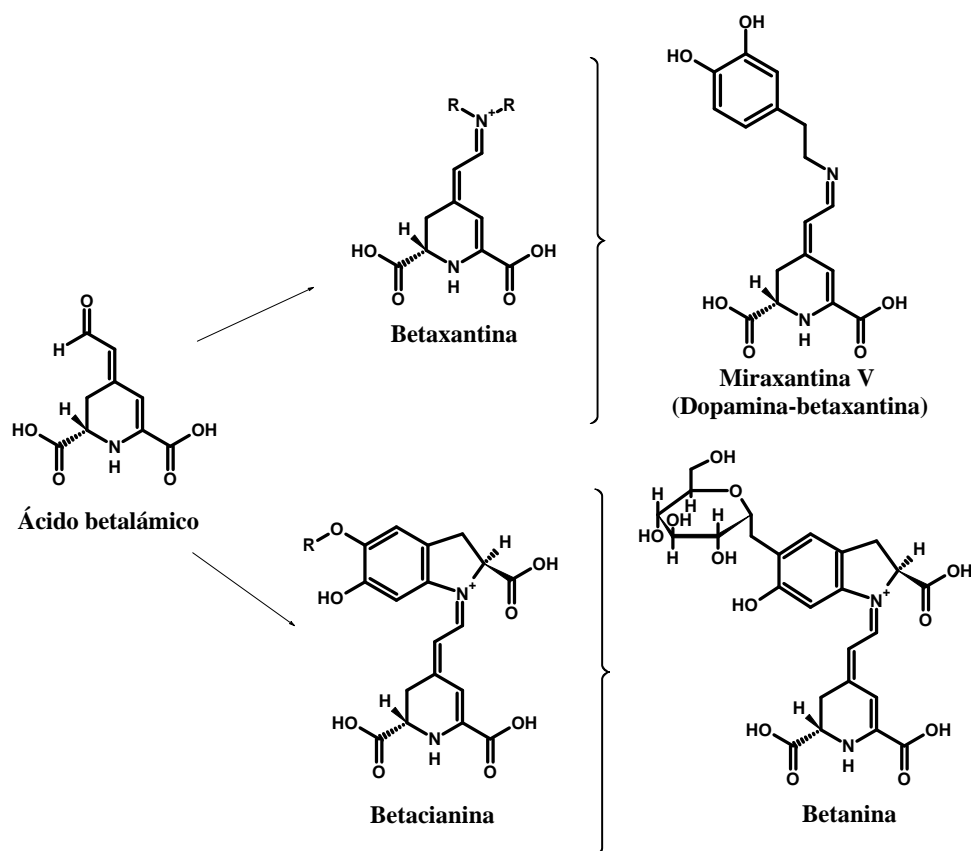


Figura 13. Exemplos de betaláinas. (Fonte: Elaboração própria através do programa ChemSketch Freeware 14.0).

Nas plantas, as betaláinas desempenham um papel fundamental na atração de animais polinizadores, na fotoproteção e na tolerância à seca e salinidade, mas também têm sido alvo de estudos significativos devido à sua natureza única e aos possíveis efeitos na promoção da saúde, por serem naturais. Esses pigmentos vêm sendo valorizados na indústria alimentar como ingredientes funcionais que podem oferecer benefícios à saúde devido às suas diversas propriedades bioativas, como antioxidante, hepatoprotetora, anti-câncer e anti-inflamatória. O sumo de beterraba, por exemplo, é rico em betaláinas, e por isso frequentemente utilizado como corante natural em alimentos e bebidas (Chhikara *et al.*, 2019; Mirmiran *et al.*, 2020; Punia Bangar *et al.*, 2022).

1.5. Métodos de extração de compostos bioativos

Como mencionado anteriormente, os produtos naturais e os seus extratos representam fontes valiosas das mais variadas classes de compostos bioativos, conhecidos por oferecerem diversos benefícios para a saúde humana. Para que se aproveite o potencial destes compostos, é necessário recorrer a processos de extração, separação, identificação e caracterização através de técnicas adequadas. Geralmente, a aplicação dessas técnicas depende de diversos parâmetros, como por exemplo a polaridade do solvente e a natureza das moléculas a serem extraídas, temperatura, pressão, a matriz da amostra e os objetivos da análise, e a combinação de diferentes técnicas é necessária muitas vezes para obter uma melhor compreensão dos compostos presentes e das suas propriedades (Azmir *et al.*, 2013; Joana Gil-Chávez *et al.*, 2013).

A extração é a etapa inicial crucial neste processo, e a escolha do método ideal influencia significativamente as análises qualitativa e quantitativa de compostos a analisar, podendo permitir o isolamento de compostos específicos presentes em amostras complexas. Uma vez identificadas as metodologias de extração ideais, é possível otimizar diferentes parâmetros envolvidos a fim de aumentar a seletividade dos métodos analíticos, elevar a concentração dos compostos de interesse, aumentar a sensibilidade de bioensaios, transformar esses compostos a fim de serem melhor analisados e estabelecer métodos robustos e reprodutíveis (Azmir *et al.*, 2013; Ebrahimi *et al.*, 2022; Sasidharan *et al.*, 2010; Wijngaard *et al.*, 2012).

De entre as metodologias existentes, as mais convencionais incluem infusão, maceração, decocção, extrações líquido-líquido e sólido-líquido (e.x.: extração por *Soxhlet*), e ainda são amplamente empregadas. Mas nas últimas décadas, métodos não convencionais têm ganho atenção, pois têm como objetivo aumentar a eficiência geral da extração, além de oferecem diversas vantagens no que diz respeito a aspetos ecológicos (tais como o uso de quantidades menores de solventes e solventes verdes). São exemplo dessas técnicas inovadoras as extrações assistidas por ultrassom e micro-ondas, digestão enzimática e fluidos supercríticos (Azmir *et al.*, 2013; Borjan *et al.*, 2022; Joana Gil-Chávez *et al.*, 2013; Sasidharan *et al.*, 2010)

Para a identificação, caracterização e quantificação dos compostos bioativos presentes nos extratos, podem ser aplicadas diferentes técnicas como a Cromatografia Líquida (HPLC) e Cromatografia Gasosa (GC), Espectrometria de Massa (MS),

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrofotometria, que também podem ser combinados para que se obtenha resultados mais amplos e informativos. Embora essas tecnologias modernas tenham facilitado a análise de compostos bioativos, o sucesso delas permanece dependente da escolha do método de extração, dos parâmetros de análise e das características específicas das moléculas alvo (Joana Gil-Chávez *et al.*, 2013; Sasidharan *et al.*, 2010).

1.6. Avaliação de propriedades biológicas

1.6.1. Atividade antioxidante

Diversas etapas do metabolismo oxidativo têm o potencial natural de produzir radicais livres altamente reativos, mas essas espécies também podem ser geradas a partir de fatores externos, como a poluição, toxinas, metais pesados, radiação e tabagismo, entre outros. Os radicais livres são definidos por moléculas orgânicas/inorgânicas e átomos que contêm um ou mais elétrons desemparelhados nas suas camadas eletrônicas mais externas, o que lhes confere alta instabilidade e reatividade. Estas moléculas reativas representam uma ameaça significativa à saúde celular, e podem danificar estruturas celulares vitais como membranas, ácidos nucleicos e enzimas, tendo como alvos principais o oxigênio, ácidos gordos poli-insaturados, fosfolipídios, colesterol e DNA, por exemplo. Os principais radicais livres são as espécies reativas de oxigênio (ROS), como o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxilo (HO^{\cdot}), e espécies reativas de azoto (RNS - *Reactive Nitrogen Species*), que incluem o óxido nítrico (NO^{\cdot}), nitrito ($NO_2^{\cdot-}$) e peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (Antolovich *et al.*, 2002; Çalişkan e Çalişkan, 2021; Vasconcelos *et al.*, 2007).

Em situações onde existe um desequilíbrio bioquímico entre os níveis de antioxidantes e pró-oxidantes, com predomínio do último, ocorre o denominado stresse oxidativo, processo que está associado ao desenvolvimento de doenças degenerativas, incluindo cancro, aterosclerose, Parkinson e Alzheimer. Para combater o stresse oxidativo, o corpo depende de agentes antioxidantes, que são moléculas capazes de neutralizar o potencial destrutivo dos radicais livres e manter a integridade das estruturas celulares, contribuindo para o bem-estar geral e a longevidade. O próprio organismo é capaz de produzir alguns agentes antioxidantes, como as enzimas glutatona, superóxido dismutase e catalase, constituindo assim um sistema natural de proteção contra os radicais

livres. Entretanto, essa produção não é suficiente para neutralizar todos os radicais livres produzidos pelo organismo, sendo assim necessário adquirir agentes oxidantes exógenos, através da dieta. Como por exemplo, muitos compostos bioativos derivados de plantas, como algumas vitaminas, carotenóides, ácidos fenólicos, antocianinas e betalaínas, são considerados excelentes agentes antioxidantes naturais, podendo ser aliados importantes contra o stresse oxidativo e as suas consequências fisiológicas (Çalışkan e Çalışkan, 2021; Florin Danet, 2021; Fu et al., 2020).

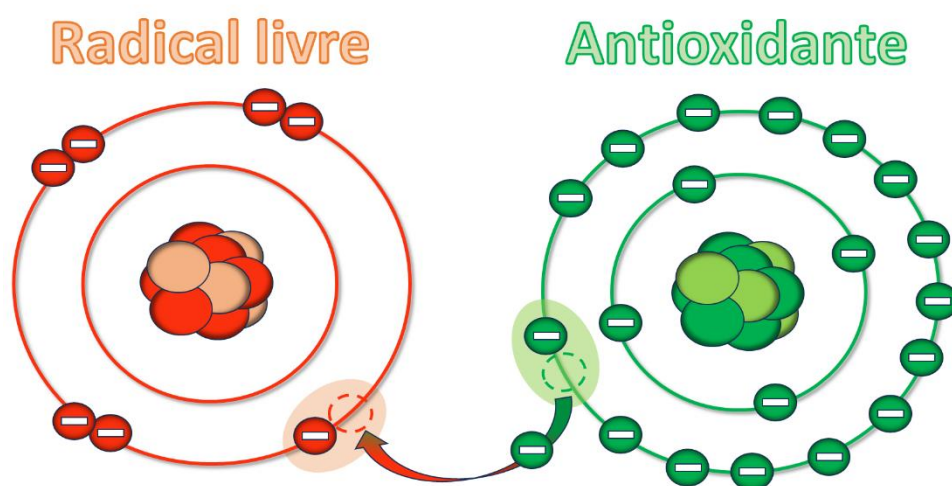


Figura 14. Representação ilustrativa da neutralização de radicais livres por um agente antioxidante. (Fonte: Elaboração própria através do programa Microsoft PowerPoint Versão 2309).

Muitos métodos *in vitro* são utilizados para avaliar a atividade antioxidante de compostos bioativos puros e de extratos, como por exemplo ensaio de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), ORAC (Capacidade de Absorção do Radical de Oxigênio), TEAC/ABTS (Ensaio de Capacidade Antioxidante Equivalente a Trolox), poder redutor e *Folin Ciocalteu*. Para além destes ensaios essencialmente químicos, existem bioensaios (e.x: TBARS e OxHLIA) que utilizam modelos celulares como substrato na avaliação da oxidação, pois estes são capazes de replicar as condições reais do organismo, podendo refletir em resultados mais representativos sobre os efeitos dos antioxidantes em condições biológicas reais, e fornecer uma compreensão mais abrangente sobre os seus impactos fisiológicos, tornando-os uma escolha preferível em relação às metodologias químicas isoladas (Antolovich et al., 2002; Çalışkan e Çalışkan, 2021).

1.6.1.1. Avaliação da peroxidação lipídica através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Uma das metodologias utilizadas para avaliar a peroxidação lipídica é o ensaio TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico), que se baseia na reação do malondialdeído (MDA), uma das substâncias aldeídicas formadas através da quebra de ácidos gordos insaturados após oxidação de um substrato lipídico, com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Quando o TBA reage com esses produtos, forma-se um complexo de coloração rosa ([MDA-(TBA)₂] (**Figura 15**). Esse complexo pode ser detetado através de espectrofotometria, geralmente no intervalo de comprimento de onda entre a cor rosa ou amarela, e máximo de absorção a 532 nm (Florin Danet, 2021; Ghani *et al.*, 2017).

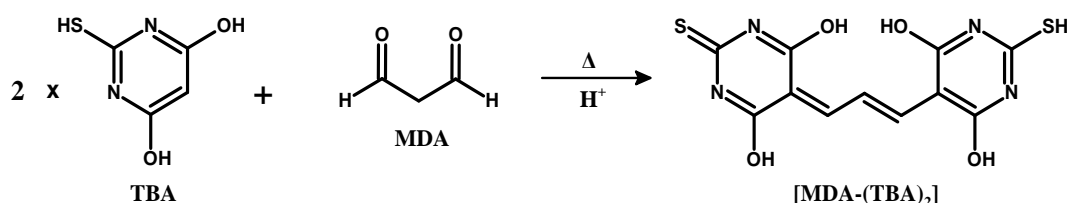


Figura 15. Reação do ácido tiobarbitúrico com o malondialdeído. (Fonte: Elaboração própria através do programa ChemSketch Freeware 14.0).

Quando há a presença de um agente antioxidante na amostra, ele tem a capacidade de neutralizar os radicais livres e outros oxidantes, reduzindo assim a formação dos produtos de oxidação lipídica. Como resultado, a quantidade de produtos aldeídicos disponíveis para reagir com o ácido tiobarbitúrico é reduzida. Isso leva a uma diminuição na intensidade da cor do complexo ([MDA-(TBA)₂], que se pode manifestar como uma mudança de cor-de-rosa para amarelo (Antolovich *et al.*, 2002; Florin Danet, 2021; Ghani *et al.*, 2017).

1.6.1.2. Ensaio de Inibição da Hemólise Oxidativa (OxHLIA)

Outro bioensaio utilizado na avaliação de atividade antioxidante é o ensaio de inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA). Este consiste na análise da capacidade dos agentes antioxidantes de inibirem os danos causados na membrana de eritrócitos ovinos, induzidos por radicais livres. Esses danos são provocados pelos radicais peroxil gerados a partir da decomposição térmica do dicloridrato de AAPH (2,2'-azobis (2-metilpropionamida) di-hidrocloreto), que atacam as biomembranas dos eritrócitos, eventualmente causando hemólise (Lockowandt *et al.*, 2019; Prieto e Vázquez, 2014; Takebayashi *et al.*, 2010).

1.6.2. Atividade antimicrobiana

Os microrganismos estão presentes em todo o lado, e algumas espécies de fungos e bactérias até compõem a microbiota do ser humano, desempenhando papéis vitais para a saúde. Entretanto, algumas espécies são consideradas patogênicas, podendo representar grandes problemas de saúde pública. Por estarem disponíveis naturalmente no ambiente, podem chegar facilmente aos alimentos durante a colheita, abate de animais, processamento e embalagem. Bactérias, leveduras e bolores são os tipos comuns de microrganismos responsáveis pela deterioração de um número considerável de alimentos e produtos alimentares, resultando em desperdício de alimentos, mesmo nos países desenvolvidos. Para além disso, o consumo de produtos alimentares contaminados representa um grande risco para a segurança alimentar, uma vez que alguns desses microrganismos podem causar doenças, como intoxicações alimentares. São exemplos as bactérias *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, e fungos do género *Aspergillus*, conhecidos pela produção de toxinas chamadas aflatoxinas (Amerikova *et al.*, 2019; Khameneh *et al.*, 2019; Ozogul *et al.*, 2018).

Atualmente, a resistência aos agentes antimicrobianos (antibióticos e antifúngicos) têm sido os maiores desafios que ameaçam a saúde, pois os tornam menos eficazes ou ineficazes contra as infeções. Por exemplo, as infeções por bactérias resistentes a antibióticos foram responsáveis por milhões de mortes no mundo em 2019 (WHO, 2022). Por esse motivo, várias estratégias têm sido sugeridas para superar a resistência aos agentes antimicrobianos. Uma delas envolve o uso dos compostos bioativos naturais (principalmente fenólicos), que pode criar oportunidades para diferentes aplicações e

abordagens inovadoras (Nguyen e Bhattacharya, 2022; Yan et al., 2021; Yuan et al., 2021). Esses agentes podem atuar sozinhos ou em combinação com antibióticos e antifúngicos existentes, com o objetivo de aumentar os seus potenciais. A ação antimicrobiana geralmente ocorre por mecanismos que incluem a interferência na biossíntese de proteínas e parede celular, destruição da membrana celular e inibição de vias metabólicas (Amerikova *et al.*, 2019; Khameneh *et al.*, 2019; Ozogul *et al.*, 2018).

2. OBJETIVO

A beterraba e a acelga desempenham um papel significativo na nutrição humana. A investigação das propriedades bioquímicas pode fornecer dados que contribuam para a promoção de dietas mais saudáveis e diversificadas, escolhas alimentares mais informadas, bem como para o desenvolvimento de alimentos enriquecidos e suplementos nutricionais.

O presente trabalho tem como OBJETIVO GERAL avaliar a composição proximal, química e bioativa de folhas e raízes de cultivares de beterraba, bem como as folhas de acelga suíça, ambas pertencentes à espécie *Beta vulgaris* L.

Para alcançar o objetivo geral do trabalho, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- Determinar a composição proximal (lípidos, proteínas, cinzas, hidratos de carbono e energia);
- Avaliar composição química (ácidos gordos, açúcares livres, ácidos orgânicos, tocoferóis, compostos fenólicos e betalaínas);
- Avaliar as propriedades bioativas (atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana) de extratos hidroetanólicos obtidos através de maceração.

3. METODOLOGIA

3.1. Padrões e reagentes

Foram utilizados os solventes acetonitrilo 99,9%, *n*-hexano 95% e acetato de etilo 99,8% de grau adequado para a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – sigla do inglês para High Performance Liquid Chromatography), obtidos da Lab-Scan (Lisboa, Portugal). O etanol 99,8%, metanol 99,9%, hexano, éter de petróleo, ácido sulfúrico e ácido clorídrico de grau analítico foram adquiridos da Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos da América (EUA)). O clorofórmio, 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) di-hidrocloro (AAPH – sigla do inglês para 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride), ácido tricloroacético (TCA – sigla do inglês, para trichloroacetic acid), tris e os padrões de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico trolox), açúcares (>98% pureza HPLC), ácidos orgânicos (≥99% pureza HPLC), e a mistura de ésteres metílicos de ácidos gordos (FAMES) (padrão 47885-U) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co (St. Louis, Missouri, EUA). Os padrões de tocoferóis (>98% pureza HPLC), tocol (50 mg/mL, 98% pureza HPLC), foram adquiridos na Matreya (Pleasant Gap, Pensilvânia, EUA), os padrões de compostos fenólicos e betalaínas foram adquiridos da Extrasynthèse (S.A., Genay, França) e Polyphenols Laboratories AS (*Sandnes*, Noruega), respetivamente. Na análise de fibras, as enzimas α -amilase, protease e amiloglucosidade, e o reagente Celatom[®] foram adquiridos pela Sigma-Aldrich Co (St. Louis, Missouri, EUA).

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, as bactérias contaminantes de alimentos, os fungos e os controlos positivos são provenientes da Frilabo (Porto, Portugal). O ágar Mueller-Hinton e ágar malte foram obtidos do Instituto de Imunologia e Virology, Torlak (Belgrado, Sérvia). Dimetilsulfóxido (DMSO – sigla do inglês para Dimethyl sulfoxide) foi adquirido na Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha). O corante cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT) foi adquirido da Panreac Applichem (Barcelona, Espanha). Outros reagentes e solventes de grau analítico foram adquiridos de fontes comuns.

O tratamento da água foi realizado usando um sistema de purificação de água Milli-Q (TGI Pure Water Systems, Greenville, Carolina do Sul, EUA).

3.2. Amostragem

As folhas e as respectivas raízes de três cultivares de beterraba (*B. vulgaris* subsp. *vulgaris* cv. Albina Vereduna, *B. vulgaris* subsp. *vulgaris* cv. Burpee's golden e *B. vulgaris* subsp. *vulgaris* cv. Pablo F1) e folhas de uma variedade de acelga suíça (“acelga ruibarbo”; *B. vulgaris* subsp. *cicla* var. *flavescens*), provenientes da Grécia, foram cultivadas numa mistura de turfa e perlita (1:1; v/v) com fertirrigação de solução nutritiva para (200 ppm de N-P-K; três aplicações de 300 mL), e colhidas em Maio de 2022. Após a colheita, as folhas e as raízes foram pesadas, liofilizadas (FreeZone 4.5, Labconco, MO, USA), trituradas e armazenadas ao abrigo da luz até posterior análise.

3.3. Preparação dos extratos hidroetanólicos

As amostras liofilizadas foram utilizadas para preparar extratos hidroetanólicos por maceração, mediante a adição de 90 mL de solução etanol:água (80:20, v/v) a 3 g de cada amostra. As misturas foram agitadas magneticamente durante 1 hora à temperatura ambiente e, posteriormente, filtradas através de filtro de papel Whatman n.º. 4. Os resíduos foram extraídos mais uma vez, nas mesmas condições, e posteriormente o etanol foi evaporado a 40°C sob pressão reduzida. As fases aquosas obtidas foram congeladas e liofilizadas para obtenção de extratos secos utilizados para realizar a avaliação das propriedades biológicas e composição de compostos fenólicos.

3.4. Composição proximal

A composição proximal das amostras foi avaliada de acordo com os Métodos Oficiais de Análise da Associação Oficial de Químicos Analistas (AOAC – sigla do inglês para Association of Official Analytical Chemists) (AOAC, 2016), que permitem a determinação dos teores de proteínas, lípidos, cinzas, fibras alimentares, hidratos de carbono e energia total. A proteína bruta foi estimada pelo método macro-*Kjeldahl* (N x 6,25), através de uma unidade automática de destilação e titulação (modelo Pro-Nitro-A, JP Selecta, Barcelona). A extração da gordura bruta foi realizada em extrator *Soxhlet*, com éter de petróleo durante 7 horas. O teor de cinzas foi determinado por incineração a 550 ± 10 °C em mufla.

A Fibra Dietética Total (FDT) foi determinada pelo método enzimático-gravimétrico (Kit TDF-100A; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), realizado em quadruplicado. Resumidamente, o procedimento consistiu na digestão enzimática do amido e da proteína presentes nas amostras (4 x 250 mg) pela ação das enzimas α -amilase (estável ao calor), protease e amiloglucosidase, seguido da precipitação da fibra alimentar solúvel com solução de etanol a 95%. Os resíduos obtidos foram filtrados e lavados com soluções de etanol (78% e 95%) e acetona. Após a secagem, os resíduos foram pesados e metade das amostras foi analisada quanto ao teor em proteína, pelo método macro-*Kjeldahl*, e a outra metade foi incinerada em mufla. A fibra alimentar total foi calculada pela seguinte fórmula e expressa em percentual (%):

$$\text{Fibras Dietéticas Totais} = ((\text{reíduos} - \text{proteínas} - \text{cinzas}) / 250 \text{ mg}) \times 100$$

Os hidratos de Carbono Totais foram calculados por diferença:

$$\begin{aligned} \text{Hidratos de Carbono Totais (g/100 g de massa seca (ms))} = \\ 100 - (\text{gorduras} + \text{cinzas} + \text{proteínas} + \text{FDT}) \end{aligned}$$

O Valor Energético Total foi calculado de acordo com a equação:

$$\begin{aligned} \text{Energia (kcal/100 g ms)} = 4 \times (\text{proteínas} + \text{hidratos de carbono}) + \\ 9 \times (\text{gorduras}) + 2 \times (\text{FDT}) \end{aligned}$$

3.5. Determinação de compostos hidrofílicos

3.5.1. Açúcares livres

Para a extração dos açúcares livres, foram adicionados 40 mL de solução etanol:água (80:20) e 1 mL de Padrão Interno (IS, melezitose, 25 mg/mL) a 1 g das amostras liofilizadas e, em seguida, procedeu-se a extração em banho-maria a 80 °C durante 1 hora e 30 minutos, conforme a metodologia descrita por Spréa *et al.* (2020). Em seguida, procedeu-se à filtração e evaporação do etanol e o sobrenadante obtido foi lavado três vezes sucessivas com 10 mL de éter etílico (deslipidificação da fase aquosa). Após concentração a 40 °C, o resíduo sólido foi redissolvido em água destilada para um volume final de 5 mL. Após filtração com filtros de *nylon* de 0,2 μm (Millipore) para

vials procedeu-se à análise no sistema HPLC (Knauer, sistema Smartline) equipado com um detetor de índice de refração (RI) (Knauer Smartline 2300) e uma coluna Eurospher 100-5 NH2 (4,6 × 250 mm, 5 mm, Knauer), a 35 °C. A fase móvel utilizada foi acetonitrilo/água desionizada, 70:30 (v/v) com um caudal de 1 mL/min. A identificação dos açúcares foi realizada pelo método do Padrão Interno (IS) e pela comparação cromatográfica com padrões comerciais. Os resultados foram obtidos mediante o software Clarity (Data Apex, Praga, República Tcheca) e expressos em g por 100 g de ms.

3.5.2. Ácidos orgânicos

Para avaliação dos ácidos orgânicos, 1,0 g de cada amostra foi extraída com 25 mL de ácido metafosfórico durante 25 minutos com agitação magnética à temperatura ambiente, e posteriormente filtradas através papel de filtro Whatman n.º. 4, seguindo o procedimento previamente descrito e otimizado pelos autores (Barros *et al.*, 2013). As soluções foram então filtradas através de filtros de *nylon* de 0,2 µm (Millipore) para *vials*. Os ácidos orgânicos foram analisados utilizando um sistema de Cromatografia Líquida Ultrarrápida equipado com coluna de fase reversa C18 SphereClone (Phenomenex, 5 µm, 250 × 4,6 mm), termostaticado a 35 °C e acoplado a um detetor de díodos (UFLC-DAD; Shimadzu Cooperation, Kyoto, Japão). A eluição foi realizada com solução de ácido sulfúrico 3,6 mM, utilizando um caudal de 0,8 mL/min. A detecção foi realizada utilizando um comprimento de onda de 215 nm. Os ácidos orgânicos identificados foram quantificados por comparação da área dos picos com as curvas de calibração obtidas a partir de padrões comerciais de cada composto. Os resultados foram expressos em g por 100 g de ms.

3.5.3. Betalaínas

Cada amostra liofilizada (500 mg) foi extraída com 5 mL de solução etanol:água (50:50, v/v) acidificada com 1,5% de ácido cítrico, sob agitação magnética constante a 50 °C por 40 min. As misturas foram filtradas através de filtros de papel Whatman n.º. 4, e os resíduos extraídos mais uma vez, nas mesmas condições, seguindo o procedimento descrito por Lazăr *et al.* (2021), com algumas modificações. Posteriormente, o etanol foi

evaporado a 40 °C, e as fases aquosas obtidas foram perfeitas até um volume final de 5 mL e finalmente filtradas com filtros de *nylon* de 0,2 µm (Millipore) para serem analisadas cromatograficamente utilizando um Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA) acoplado a um DAD.

A separação cromatográfica foi realizada mediante uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18 (3 µm, 4,6 mm 150 mm; Waters, Milford, MA, EUA), termostatada a 35 °C. Os solventes utilizados foram: (A) ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% em água, (B) acetonitrilo, e o volume de injeção da amostra foi de 50 µL. O gradiente de eluição aplicado foi: 100% A por 15 min, 100 a 90% B por 5 min, 85% B por 5 min, 85 a 82% B por 5 min, 50% B por 7 min, e de 50 a 100% B por 13 min, usando um fluxo de 0,5 mL/min. A detecção de MS foi realizada através de espectrômetro de massa Ion Trap Linear LTQ XL (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA), com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI). O sistema operou com tensão de pulverização de 4,8 V a 325 °C e com tensão capilar de 39 V. A energia de colisão utilizada foi de 35 (unidades arbitrárias), e os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa Xcalibur® (Thermo Fisher Scientific, San José, Califórnia, EUA).

Para a identificação, os extratos de betalaínas de cada amostra foram medidos na faixa espectral de absorvâncias máximas de betaxantinas e betacianinas, a $\lambda = 480$ nm e $\lambda = 530$ nm, respectivamente, e caracterizados de acordo com os espectros de UV e de Massas, e os tempos de retenção. Para o resultado quantitativo, uma curva de calibração foi obtida após leitura da absorvância de concentrações conhecidas de compostos, e os compostos quantificados utilizando o sinal UV-Vis e absorvância máxima dos padrões comerciais e, quando não disponíveis, mediante compostos similares. Os resultados foram expressos em mg por g de ms.

3.5.4. Compostos fenólicos

Os extratos foram submetidos a análise cromatográfica de acordo com o procedimento descrito pelos autores Bessada *et al.* (2016), em HPLC Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) utilizando um sistema composto por bomba quaternária e dupla detecção *on-line*: detetor de díodos (DAD), usando o λ de 280 nm (derivados dos ácido hidroxibenzoico), 330 nm (derivados dos ácido hidroxicinâmico) e 370 nm (flavonoides), e um detetor de espectrometria de massas (MS).

Para a separação utilizou-se uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18 (3 μm , 150 \times 4,6 mm, Waters Milford, MA, USA), operando a 35 °C. A fase móvel foi 0,1% de ácido fórmico em água (A) e acetonitrilo (B). O gradiente de eluição foi de 15% B (5 min), 15% B a 20% B (5 min), 20-25% B (10 min), 25-35% B (10 min), 35-50% B (10 min), e a coluna foi reequilibrada (10 min) utilizando um fluxo de 0,5 mL/min.

A detecção MS foi realizada por um espectrómetro de massa Ion Trap Linear LTQ XL (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA), com uma fonte de ionização electrospray ESI. O azoto foi utilizado como gás de nebulização a 50 *psi*. O sistema operou com uma voltagem de spray a 5 kV a 325 °C com tensão capilar de -20 V. Foi mantida a voltagem de -66 V no tubo *lens offset*. Os espectros foram gravados em modo ião negativo entre 100 e 1500 *m/z*. A energia de colisão utilizada foi de 35 (unidades arbitrárias), e os resultados foram recolhidos e analisados por intermédio no programa Xcalibur® (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA). Identificaram-se os compostos fenólicos através de comparações dos tempos de retenção, espectros de massa e de UV-Vis com os obtidos pelos padrões quando disponíveis, e/ou comparando com a informação disponível na literatura. Realizou-se a análise quantitativa de acordo com as retas de calibração (ácido cafeico ($y = 90492x - 29265$; $R^2 = 0,9998$), ácido ferúlico ($y = 85718x + 68543$; $R^2 = 0,9969$), ácido *p*-cumárico ($y = 76029x + 102258$; $R^2 = 0,9852$), ácido sinápico ($y = 65114x + 21123$; $R^2 = 0,9969$), quercetina-3-*O*-glicosídeo ($y = 28555x + 3032,3$; $R^2 = 0,9996$) e apigenina-7-glicosídeo ($y = 30262x - 32276$; $R^2 = 0,9981$)), usando como base o sinal UV-Vis dos padrões comerciais no seu λ máximo e, quando não disponíveis, a partir de outros compostos com o mesmo grupo fenólico. Os resultados foram expressos em mg por g de extrato.

3.6. Determinação de compostos lipofílicos

3.6.1. Ácidos gordos

Os Ésteres Metílicos de Ácidos Gordos (FAMES) foram determinados a partir da fração lipídica previamente obtida na extração por *Soxhlet*. A porção lipídica de cada amostra foi derivatizada mediante a reação de transesterificação, conforme metodologia previamente descrita por Obodai *et al.* (2017). O procedimento consistiu em adicionar 5 mL de solução de metanol:ácido sulfúrico:tolueno (2:1:1, v/v/v) e incubou durante 12 horas a 50 °C e 160 rpm. Após a incubação, 3 mL de água destilada e 3 mL de éter dietílico foram adicionados a cada amostra e agitados vigorosamente usando um vórtex.

A fase orgânica contendo os FAMES foi removida, desidratada com sulfato de sódio anidro e filtrada com filtros de *nylon* 0,2 µm (Millipore) para análise cromatográfica.

O perfil de ácidos gordos foi determinado por Cromatografia Gasosa (GC) com Detecção de Ionização de Chama (FID), utilizando um instrumento YOUNG IN Chromass 6500 GC System equipado com injetor *split/splitless* a 250°C e injeção *split* a 1:80, FID a 260°C e coluna Zebron-Fame (20 m × 0,18 mm × 0,15 µm df). A programação de temperatura do forno obedeceu à seguinte configuração: a temperatura inicial da coluna foi de 80 °C, durante 1,5 min; em seguida, a temperatura foi aumentada a 40°C/min até 160°C, 5°C/min até 185°C, 30°C/min até 260°C durante 4 min. O hidrogénio (gás transportador) tinha um fluxo de 0,6 mL/min (0,61 bar), medido a 250°C. Para cada análise foi injetado 1 µL da amostra. A identificação e quantificação foram realizadas comparando os tempos de retenção relativos dos picos de FAMES das amostras com padrões e os resultados foram registados e processados usando o software Clarity 4.0.1.7 (DataApex, Praga, República Tcheca) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.

3.6.2. Tocoferóis

Os tocoferóis foram determinados seguindo o procedimento previamente descrito por Spréa *et al.* (2020). Antes da extração, foram adicionados a 500 mg de cada amostra liofilizada, 100 µL de solução de hidroxitolueno butilado (BHT) em hexano (10 mg/mL) e 400 µL do Padrão Interno (IS) (tocol em hexano, 50 µg/mL). Em seguida, foram adicionados 4 mL de metanol e homogeneizados em vórtex por 1 min. Em seguida, foram adicionados 4 mL de hexano e homogeneizados novamente em vórtex (1 min). Por fim, foram adicionados 2 mL de solução aquosa saturada de NaCl, homogeneizados no vórtex (1 min), centrifugados por 5 minutos a 4000 rpm (centrífuga refrigerada Multifuge X1R, Thermo Fisher Scientific) e o sobrenadante cuidadosamente transferido para um frasco âmbar. A amostra foi re-extraída mais duas vezes com hexano e desidratada com sulfato de sódio anidro. O extrato foi seco usando uma corrente de nitrogénio. Foi posteriormente redissolvido em 2 mL de hexano, filtrado com filtros de *nylon* de 0,2 µm (Millipore) para frascos âmbar e analisado por HPLC.

Para a análise cromatográfica foi utilizado um sistema integrado de bomba quaternária (Knauer, sistema Smartline 1000 system), um desgaseificador (Smartline

5000), um amostrador automático (AS-2057 2500) e um detetor de fluorescência (FL; Jasco) programado para excitação a 290 nm e emissão em 330 nm foram utilizados. A separação dos compostos foi realizada utilizando uma coluna de fase normal de poliamida II (5 µm, 250 × 4,6 mm, WMC Waters, Japão), operando a 30 ° C (forno 7971 R Grace). A fase móvel utilizada foi uma mistura de hexano/acetato de etilo (70:30, v/v) com fluxo de 1 mL/min.

Os dados foram analisados utilizando o software Clarity 2.4 (DataApex, Praga, República Checa). A quantificação foi baseada na resposta do sinal de fluorescência utilizando o método PI e por comparação cromatográfica com padrões. Os resultados foram expressos em mg por 100 g de ms.

3.7. Propriedades biológicas

3.7.1. Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação do potencial antioxidante foi realizada *in vitro* nos extratos hidroetanólicos previamente preparados e foram realizados dois ensaios celulares: inibição da peroxidação lipídica (TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico) e potencial anti-hemolítico (OxHLIA – Ensaio de Inibição da Hemólise Oxidativa).

3.7.1.1. Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Neste ensaio, os extratos hidroetanólicos de cada amostra foram redissolvidos em etanol/água (80:20, v/v) e submetidos a diluições de 80 mg/mL a 0,078 mg/mL. Tecido cerebral de porco (*Sus scrofa*) foi utilizado como substrato, conforme descrito anteriormente pelos autores (Sarmiento *et al.*, 2015). O tecido cerebral foi homogeneizado em solução tampão Tris-HCl (20 mM e pH 7,4) para obter uma fração homogeneizada de cérebro 1:2 (m/v) após centrifugação a 4000 rpm (Multifuge X1R, Thermo Fisher Scientific) durante 10 min. Às diluições preparadas (200 µL), foram adicionados 100 µL do sobrenadante, 100 µL de FeSO₄ (10 mM) e 100 µL de ácido ascórbico (0,1 mM). Após incubação a 37°C durante 1 hora, a reação foi interrompida pela adição de 500 µL de ácido tricloroacético (28%, p/v), seguido de ácido tiobarbitúrico (TBA, 2%, p/v, 380 µL). A mistura foi então aquecida a 80°C durante 20 minutos e centrifugada a 3000 rpm

durante 10 minutos para remover o precipitado proteico. A intensidade da cor do complexo malondialdeído-ácido tiobarbitúrico ([MDA-(TBA)₂]) no sobrenadante foi medida a 532 nm, e a inibição da peroxidação lipídica (%) foi calculada de acordo com a equação:

$$\text{Inibição da peroxidação lipídica (\%)} = [(A - B)/A] \times 100$$

onde A é a absorbância do controlo e B é a absorbância da amostra. Os resultados foram expressos em valores de EC₅₀ (mg/mL), que representa a concentração de extrato necessária para prevenir 50% da peroxidação lipídica.

3.7.1.2. Ensaio de Inibição da Hemólise Oxidativa (OxHLIA)

O potencial anti-hemolítico dos extratos hidroetanólicos foi avaliado através do ensaio OxHLIA, conforme metodologia descrita por Lockowandt *et al.* (2019). Para a realização deste ensaio celular, foi efetuada uma colheita de sangue de ovelha do qual foram obtidos apenas os eritrócitos por centrifugação (Multifuge X1R, Thermo Fisher Scientific) a 2900 rpm, durante 5 min a 10 °C. Após eliminação do sobrenadante, a amostra centrifugada foi submetida a uma lavagem com NaCl (150 mM) seguida de três lavagens com tampão fosfato-salino (PBS; pH 7,4), procedendo-se a centrifugação e remoção do sobrenadante a cada lavagem. Em seguida preparou-se uma solução de eritrócitos a 2,8% (v/v) tendo como diluente o PBS. Posteriormente, 200 µL da solução de eritrócitos foram adicionados a 400 µL de PBS (controlo), bem como às diferentes concentrações de extrato dissolvido em PBS (20 a 0,625 mg/mL). A solução de eritrócitos também foi adicionada à água (para promover hemólise completa), atuando como controlo negativo.

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços, que foram incubadas a 37°C durante 10 min com agitação. Após o período de incubação, foram adicionados 200 µL de 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) di-hidrocloreto (AAPH, 160 mM) e a densidade ótica foi medida a 690 nm. As microplacas foram então incubadas nas mesmas condições até completa hemólise, com medições a cada 10 minutos. Trolox (3,91–125 µg/mL) foi utilizado como controlo positivo, e os resultados foram expressos como valores de EC₅₀ para Δt de 60 minutos (concentração de extrato necessária para manter 50% da população eritrocitária intacta no tempo mencionado, µg/mL).

3.7.2. Citotoxicidade

Preparou-se uma cultura de células primárias a partir de fígado fresco de porco, obtido num matadouro local, designada por PLP2. O procedimento foi descrito anteriormente pelo grupo de investigação em que se insere este trabalho (Abreu *et al.*, 2011). Os tecidos foram lavados em solução salina de Hank contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e dividido em explantes de 1x1 mm³. Os explantes foram colocados em caixas de cultura com meio DMEM suplementado com SFB (Soro Bovino Fetal; 10%), 2 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, e colocou-se na incubadora. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias, monitorizando-se utilizando um microscópio de invertido (Icon Eclipse Ts 100). As células foram transferidas para uma placa de 96 poços com uma densidade de 1x10⁴ células/poço, e cultivadas em meio DMEM com 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células foram tratadas com diferentes concentrações de amostra e efetuou-se o ensaio da SRB (Sulforrodamina B) como descrito ao pormenor pelos autores. Utilizou-se elipticina como padrão. Os resultados foram expressos em valores de GI₅₀ (concentração responsável por 50% de inibição de crescimento celular).

3.7.3. Atividade antimicrobiana

A atividade antibacteriana dos extratos obtidos por maceração foi determinada pelo método colorimétrico rápido por microdiluição e utilizando o corante cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT), descrito por Pires *et al.* (2018). Foram avaliadas 3 bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*, e 5 bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Salmonella enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica* e *Enterobacter cloacae*, todas isoladas de alimentos.

As amostras foram primeiramente dissolvidas em 5% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) e 95% de água destilada autoclavada até uma concentração final de 20 mg/mL. Em seguida, 100 µL desta concentração foram adicionados em duplicado ao primeiro poço de uma placa de microtitulação de 96 poços. 90 µL de caldo triptona de soja (TSB) também foram adicionados a todos os poços e as amostras foram diluídas em série para obter concentrações de 10 a 0,03125 mg/mL. Em seguida, 10 µL de inóculo (normalizado para 1,5 x 10⁶ unidades formadoras de colónias (UFC/mL) foram adicionadas a todos os poços, para garantir a presença de 1,5 x 10⁵ UFC.

Foram preparados dois controlos negativos, um com TSB e outro com o extrato, e dois controlos positivos, um com TSB e cada inóculo e outro controlo com meio, antibiótico e bactéria, respetivamente. Ampicilina e estreptomicina foram utilizadas para todas as bactérias analisadas e meticilina foi utilizada para o *Staphylococcus aureus*. As microplacas foram incubadas durante 24 horas a 37°C. A concentração mínima inibitória (CMI) das amostras foi determinada após adição de 40 µL de INT (0,2 mg/mL) e incubação a 37 °C durante 30 min. A CMI é definida como a concentração mínima que inibe o crescimento bacteriano visível e é identificada quando a cor muda de amarelo para rosa quando os microrganismos são viáveis.

Para determinar a concentração mínima bactericida (CMB), 10 µL de líquido de cada poço que não apresentou alteração de cor foram plaqueados em ágar sangue sólido (7% sangue de ovelha) e incubados a 37°C durante 24 horas. A menor concentração que não produziu crescimento determina o CMB, que é definido como a menor concentração necessária para eliminar as bactérias.

A atividade antifúngica foi avaliada usando o método descrito por Heleno *et al.* (2013), e os fungos utilizados foram *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus brasiliensis*. Os fungos macroscópicos foram cultivados em ágar extrato de malte e armazenados a 4°C, depois foram transferidos para meio fresco e incubados a 25°C durante 12 horas. Para determinar a atividade antifúngica, os esporos dos fungos foram lavados da superfície das placas de ágar com solução salina estéril a 0,85% contendo Tween 80 a 0,1% (v/v). Uma suspensão de esporos foi preparada com solução salina estéril até uma concentração de aproximadamente $1,0 \times 10^5$ em um volume final de 100 µL por poço. As amostras foram dissolvidas em DMSO a 5% (v/v) e água destilada autoclavada a 95% até uma concentração final de 10 mg/mL. Posteriormente, 90 µL desta concentração foram adicionados ao primeiro poço (microplaca de 96 poços) em duplicado com 100 µL de 100 µL de Caldo Extrato de Malte (MEB). Nos poços restantes foram adicionados 90 µL de MEB, e as amostras diluídas em série (10 a 0,03125 mg/mL).

As determinações da concentração mínima inibitória (CMI) foram realizadas utilizando a técnica de diluição em série utilizando uma microplaca de 96 poços. As concentrações mais baixas sem crescimento visível (observadas com microscópio binocular) foram definidas como CMIs. Uma concentração mínima fungicida (CMF) foi determinada por subcultivo de 2 µL dos compostos testados dissolvidos em meio de cultura e incubados durante 72 horas em microplacas, contendo 100 µL de MEB por poço. Após esta etapa, as microplacas foram incubadas durante mais 72 horas a 26°C. A menor

concentração sem crescimento visível foi definida como CMFs, indicando uma redução de 99,5% do inóculo original. O fungicida comercial cetoconazol (Frilabo, Porto, Portugal) foi utilizado como controlo positivo.

3.8. Análise estatística

O desenho experimental foi realizado com 4 variedades de *B. vulgaris* L., sendo as amostras de folhas e raízes de *B. vulgaris* cv. Albina Vereduna, *B. vulgaris* cv. Burpee's Golden e *B. vulgaris* cv. Pablo F1, e folhas de acelga (*B. vulgaris* subsp. *cicla* var. *flavescens*).

Todas as análises foram realizadas em triplicado e os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP) (exceto atividade antimicrobiana). A média e o desvio padrão foram determinados a partir dos dados processados e obtidos no Microsoft Excel. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software SPSS Statistics (IBM SPSS Statistics for Windows, Versão 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.). Os resultados foram analisados mediante análise de variância (ANOVA) unidirecional seguida de teste de diferença honestamente significativa (HSD) de Tukey, com $\alpha = 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Composição proximal

Os resultados apresentados na **Tabela 1** evidenciam a composição proximal das amostras de folhas e raízes das três variedades de beterraba e da variedade de acelga suíça estudadas, determinada pelo conteúdo em lípidos, proteínas, cinzas, fibras, hidratos de carbono e valor energético.

Nas raízes, os hidratos de carbono foram os principais macronutrientes encontrados (68,3 a 70,6 g/100 g ms), seguidos pelas fibras dietéticas (19,5 a 20,9 %), proteínas (5,46 a 7,32 g/100 g ms), cinzas (2,35 a 4,0 g/100 g ms) e, por fim, os lípidos, foram os macronutrientes encontrados em menores quantidades (0,48 a 1,12 g/100 g ms). Entre todas as amostras estudadas, as raízes apresentaram valores energéticos elevados (347,0 a 354,4 Kcal/100 g ms). Este resultado está intimamente relacionado com os teores elevados em hidratos de carbono, que foram mais elevados do que nas respectivas folhas e na acelga suíça. A raiz da variedade Pablo F1 (vermelha) destacou-se pelo seu elevado teor em proteínas e fibras dietéticas (7,32 g/100 g ms e 4,0 %, respetivamente), e baixos teores em hidratos de carbono e gorduras (68,3 e 19,9 g/100 g ms, respetivamente), tendo assim menor valor energético.

Lucky *et al.* (2020), avaliaram a composição proximal do pó da beterraba a ser aplicado na produção de bolos, e os resultados obtidos foram semelhantes ao do presente estudo relativamente ao teor em cinzas (3,57 g/100 g ms), lípidos (1,58 g/100 g ms) e proteínas (13,01 g/100 g ms), embora tenha apresentado maior teor de fibras dietéticas totais (55,18 %). Kohajdová *et al.* (2018) também analisaram a composição em cinzas, proteínas e fibras dietéticas totais do pó de raízes de uma variedade de beterraba vermelha (*B. vulgaris* cv. Betina) a ser introduzido em produtos de panificação. Os resultados obtidos demonstraram que a variedade de beterraba apresentou teores de proteínas (10,71 g/100 g ms) e cinzas (4,12 g/100 g ms) semelhantes aos das variedades abordadas no presente estudo. Entretanto, o seu conteúdo em fibras também foi superior (65,71 %).

Já nas folhas de beterraba, de maneira geral, as fibras foram os macronutrientes que sobressaíram (33,9 a 37,3 %), exceto na variedade branca (cv. Albina Vereduna), cujo teor de hidratos de carbono foi superior em comparação com as restantes (25,5 a 37,18 g/100 g ms). Em seguida, os macronutrientes encontrados em maior quantidade nas folhas de beterraba foram as cinzas (13,46 a 20,99 g/100 g ms), as proteínas (11,84 a

12,23 g/100 g ms) e, por fim, os lípidos (3,28 a 4,01 g/100 g ms). Comparativamente às restantes amostras de folhas, a acelga suíça apresentou o teor hidratos de carbono mais elevado (42,9 g/100 g ms), seguido pelo menor teor em fibras dietéticas (33,1 g/100 g ms), cinzas (11,91 g/100 g ms), proteínas (9,94 g/100 g ms) e lípidos (2,18 g/100 g ms), apresentando consequentemente maior valor energético (297,1 Kcal/100 g ms) do que as folhas de beterrabas (261,5 a 294,24 Kcal/100 g ms). Estes resultados sugerem que, embora o consumo das folhas de beterraba não seja tão popularizado quanto o da acelga suíça, podem ser uma opção a ter em atenção e serem mais valorizadas devido à suas excelentes propriedades nutricionais.

Zeinab *et al.* (2021), avaliaram a composição proximal do pó preparado a partir de folhas de beterraba secas a serem incorporados em *cookies*, e encontraram resultados semelhantes ao presente estudo relativamente ao teor de fibras (35,99 %), hidratos de carbono (46,43 g/100 g ms), lípidos (2,23 g/100 g ms), cinzas (22,29 g/100 g ms) e energia (302,90 Kcal/100g ms), tendo-se superado apenas no teor de proteínas (24,27 g/100 g ms). Abdi *et al.* (2022) também estudaram, entre outros parâmetros, a composição proximal, de folhas de acelga suíça proveniente de produtores locais no oeste da Etiópia, e encontraram valores semelhantes de hidratos de carbono (44,95 g/100 g ms), lípidos (1,75 g/100 g ms), energia (316,41 Kcal/100g ms). Entretanto, nesse estudo, a acelga suíça apresentou menores teores de cinzas (2,66 g/100 g ms) e fibras dietéticas totais (11,49 %), e maior conteúdo em proteínas (30,19 g/100 g ms).

4.2. Composição Química Relativa aos Compostos Hidrofílicos

4.2.1. Açúcares livres

Os açúcares livres também foram analisados e os resultados estão apresentados na **Tabela 1**. Entre todas as amostras, as raízes destacaram-se pelos elevados teores em açúcares, tendo sido identificados apenas dois: maioritariamente a sacarose (33,94 a 40,79 g/100g ms), e a trealose (0,38 a 0,70 g/100g ms). A cv. Pablo F1 foi a amostra que apresentou maior teor em açúcares (41,5 g/100g ms). Já nas folhas, além da sacarose (3,24 a 6,21 g/100g ms) e trealose (0,41 a 0,82 g/100g ms), também foram identificadas a glucose (2,24 a 5,65 g/100g ms) e a frutose (0,45 a 2,8 g/100g ms), sendo a sacarose e a glucose os açúcares mais abundantes.

Wruss *et al.* (2015) analisaram a composição bioquímica do sumo preparado a partir de sete variedades de beterraba cultivadas na Áustria (Ägyptische Platttrunde, Bolivar, Forono, Mona Lisa, Moronia, Redval e Robuschka), e verificaram que em todas as variedades avaliadas a sacarose foi o açúcar mais abundante, seguido da glucose, assim como nesse estudo, além da presença da frutose, sendo a variedade Forono aquela que se destacou pelo maior conteúdo em açúcares totais.

Gruska *et al.* (2022), também determinaram o teor de hidratos de carbono em raízes de beterraba sacarina logo após a colheita e depois de 3 meses de armazenamento com e sem cobertura de proteção. Em todas as amostras foi igualmente identificada a presença da sacarose como açúcar predominante, e também da trealose, que é consistente com resultado encontrado no presente trabalho, além de frutose, glucose, galactose e rafinose.

Mzoughi *et al.* (2019) também identificaram a sacarose (7,4 g/100 g ms), a glucose (1,89 g/100 g ms) e frutose (0,306 g/100 g ms) em folhas de acelga silvestre colhidas na Tunísia, juntamente com a galactose (0,253 g/100 g ms), arabinose (0,019 g/100 g ms), ramnose (0,120 g/100 g ms) e rafinose (0,406 g/100 g ms), não sendo identificada a trealose.

4.2.2. Ácidos orgânicos

Em todas as amostras estudadas foram identificados e quantificados seis ácidos orgânicos: o ácido succínico, que foi o mais abundante, seguido pelos ácido oxálico, quínico, málico, cítrico e, por fim, o fumárico presente apenas vestigialmente (**Tabela 1**). De maneira geral, as folhas apresentaram maiores teores em ácidos orgânicos do que as raízes das beterrabas, com exceção da variedade Pablo F1, que se destacou pelos teores mais elevados tanto na raiz quanto nas folhas (22,9 e 19,7 g/100 g ms, respetivamente), sendo que todas as folhas apresentaram teores elevados em ácido oxálico. A acelga suíça apresentou teores elevados de ácido succínico (12,4 g/100 g ms) e menores em ácido oxálico e (2,37 g/100 g ms). Embora o ácido oxálico seja um componente de muitos alimentos, devido às suas propriedades antinutritivas, pode apresentar potenciais riscos para a saúde. É capaz de atuar na diminuição da biodisponibilidade de outros nutrientes e no aumento da formação de cálculos renais, e como a beterraba é conhecida pelos seus

níveis elevados de oxalato, é assim recomendado o seu consumo moderado (Babarykin *et al.*, 2019).

Bavec *et al.* (2010), avaliou a influência de cinco diferentes sistemas de cultivo (convencional, integrado, orgânico, biodinâmico e controle) na composição da raiz da beterraba (cv. Rote Kugel). Em todas as amostras foi identificada a prevalência do ácido cítrico, seguido pelo ácido xiquímico, e por fim, os ácidos málico e fumárico com os menores teores. Sagardoy *et al.* (2011), determinaram a influência do tratamento com diferentes concentrações de zinco no perfil de ácidos orgânicos nas folhas e raízes de beterraba sacarina (*B. vulgaris* L. cv. Orbis), onde verificaram a prevalência dos ácidos oxálico e málico, enquanto o ácido succínico foi o que apresentou menor conteúdo.

Freidig e Goldman (2011) avaliaram o teor de ácido oxálico em folhas e raízes de diferentes cultivares de beterraba e acelga suíça, e verificaram que os teores de oxalato solúvel e insolúvel nas folhas foram consideravelmente superiores quando comparados com as raízes, resultados coerentes com os obtidos no presente trabalho.

Tabela 1. Composição proximal, valor energético e compostos hidrofílicos encontrados nas amostras de *B. vulgaris* L. (média ± DP, n=3).

	<i>B. vulgaris</i> cv. Albina Vereduna		<i>B. vulgaris</i> cv. Burpee's Golden		<i>B. vulgaris</i> cv. Pablo F1		<i>B. vulgaris</i> subsp. cicla var. <i>flavescens</i>
	Folhas	Raízes	Folhas	Raízes	Folhas	Raízes	Folhas
Composição proximal	(g/100g ms)						
Lípidos	3,30 ± 0,06 b	1,12 ± 0,03 d	3,28 ± 0,02 b	0,48 ± 0,06 f	4,01 ± 0,04 a	0,55 ± 0,05 e	2,18 ± 0,10 c
Proteínas	11,84 ± 0,06 c	5,46 ± 0,04 g	12,23 ± 0,06 a	6,22 ± 0,07 f	12,18 ± 0,04 b	7,32 ± 0,06 e	9,94 ± 0,01 d
Cinzas	13,46 ± 0,01 c	2,35 ± 0,05 g	17,77 ± 0,07 b	3,21 ± 0,03 f	20,99 ± 0,04 a	4,0 ± 0,1 e	11,91 ± 0,09 d
Fibras dietéticas (%)	34,2 ± 0,2 b	20,9 ± 0,2 d	33,9 ± 0,4 b	19,5 ± 0,6 e	37,3 ± 0,7 a	19,9 ± 0,1 e	33,1 ± 0,9 c
Hidratos de carbono	37,18 ± 0,05 d	70,2 ± 0,2 a	32,8 ± 0,3 e	70,6 ± 0,4 a	25,5 ± 0,5 f	68,3 ± 0,1 b	42,9 ± 0,6 c
Energia (kcal/100g m.s.)	294,24 ± 0,5 e	354,4 ± 0,5 a	277,5 ± 0,7 f	350,5 ± 0,7 b	261,5 ± 0,8 g	347,0 ± 0,3 c	297,1 ± 1,8 d
Açúcares livres	(g/100g ms)						
Frutose	2,8 ± 0,02 a	nd	0,97 ± 0,07 c	nd	0,45 ± 0,04 d	nd	1,57 ± 0,02 b
Glucose	5,65 ± 0,08 a	nd	3,84 ± 0,06 b	nd	2,24 ± 0,04 c	nd	3,5 ± 0,06 d
Sacarose	5,08 ± 0,04 e	35,93 ± 0,03 b	6,21 ± 0,04 d	33,94 ± 0,03 c	3,24 ± 0,04 g	40,79 ± 0,67 a	4,04 ± 0,08 f
Trehalose	0,69 ± 0,03 b	0,38 ± 0,01 d	0,82 ± 0,01 a	0,46 ± 0,03 c	0,7 ± 0,05 b	0,7 ± 0,03 b	0,41 ± 0,06 d
Total	11,4 ± 0,2 d	36,31 ± 0,03 b	10,87 ± 0,03 e	34,4 ± 0,06 c	6,2 ± 0,1 g	41,5 ± 0,6 a	7,96 ± 0,2 f
Ácidos orgânicos	(g/100g ms)						
Ácido oxálico	2,13 ± 0,02 d	0,89 ± 0,02 f	2,89 ± 0,03 b	0,85 ± 0,03 f	3,78 ± 0,21 a	1,33 ± 0,01 e	2,37 ± 0,03 c
Ácido quínico	1,61 ± 0,03 d	0,49 ± 0,04 g	3,15 ± 0,07 b	0,64 ± 0,04 f	3,97 ± 0,09 a	1,36 ± 0,01 e	2,54 ± 0,01 c
Ácido málico	1,44 ± 0,01 c	0,34 ± 0,01 g	1,86 ± 0,04 b	0,76 ± 0,02 f	2,8 ± 0,04 a	0,95 ± 0,01 e	1,40 ± 0,01 d
Ácido cítrico	1,42 ± 0,02 d	0,35 ± 0,02 g	2,02 ± 0,03 c	0,81 ± 0,03 f	2,67 ± 0,05 a	1,11 ± 0,02 e	2,2 ± 0,2 b
Ácido succínico	5,2 ± 0,3 f	6,0 ± 0,2 e	6,7 ± 0,1 d	4,29 ± 0,01 g	9,7 ± 0,2 c	15 ± 0,3 a	12,4 ± 0,07 b
Ácido fumárico	v	v	v	v	v	v	v
Total	11,8 ± 0,4 e	8,1 ± 0,3 f	16,6 ± 0,3 d	7,4 ± 0,1 g	22,9 ± 0,2 a	19,7 ± 0,3 c	20,9 ± 0,3 b

v – vestígios; nd – não detetado. Diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas entre as amostras, de acordo com o teste HSD de Tukey ($p = 0,05$).

4.3. Composição Química Relativa aos Compostos Lipofílicos

4.3.1. Ácidos gordos

A avaliação do perfil em ácidos gordos permitiu identificar 21 compostos, estando descritos na **Tabela 2**, onde os mais abundantes foram os ácidos linoleico (C18:2n6c), ácido α -linolénico (C18:3n3), ácido palmítico (C16:0) e ácido oleico (C18:1n9c). Considerando a classificação dos ácidos gordos, as folhas exibiram os teores mais elevados em ácidos gordos polinsaturados (PUFAs), apresentando 63,5 a 65,8 %, principalmente pela contribuição dos teores de C18:3n3 (47,8 a 52,5 %) e C18:2n6c (12,61 a 17,6 %), seguidos pelos ácidos gordos saturados (SFAs) (24,2 a 26,8 %). Neste caso, a acelga suíça foi a que se destacou entre as restantes quanto ao seu teor em PUFAs, com elevados teores em ácido oleico e α -linolénico (17,6 e 47,8 %, respetivamente).

As raízes apresentaram teores de SFA superiores aos PUFAs, com grande influência do teor de C16:0 (29,3 a 57,7 %). Neste caso, a amostra que se destacou em termos de conteúdo em ácidos gordos polinsaturados foi novamente a cv. Pablo F1, apresentando o maior teor principalmente em ácido linoleico (37,2 %). A raiz da Burpee's Golden foi a que apresentou menor conteúdo em PUFAs entre todas as amostras (4,29 %), e maior teor de MUFAs (18,4 %).

Stuiver *et al.* (1978) analisaram a composição em lípidos da raiz e brotos de beterraba sacarina, onde também identificaram a prevalência de PUFAs nas folhas (65 %) em comparação com as raízes (57,9%). Resultados semelhantes foram encontrados nas folhas de beterraba desidratadas analisadas por Ebrahimi *et al.* (2022), que determinaram a prevalência dos ácidos linoleico, α -linolénico, palmítico e oleico, bem como no presente estudo. No trabalho de Mzoughi *et al.* (2019), avaliaram o perfil de ácidos gordos da acelga, determinando a presença de 17 compostos, dos quais 16 deles são comuns à variedade estudada no presente trabalho. Os teores do ácido palmítico e linoleico foram semelhantes (19,6 e 17,6 %, respetivamente), enquanto as concentrações de ácido α -linolénico (5,17 %) e oleico (7,67 %) foram consideravelmente menores do que os resultados obtidos.

Tabela 2. Composição química em relação aos compostos lipofílicos encontrados nas amostras de *B. vulgaris* L. (média ± DP, n=3).

	<i>B. vulgaris</i> cv. Albina Vereduna		<i>B. vulgaris</i> cv. Burpee's Golden		<i>B. vulgaris</i> cv. Pablo F1		<i>B. vulgaris</i> subsp. <i>cicla</i> var. <i>flavescens</i>
	Folhas	Raízes	Folhas	Raízes	Folhas	Raízes	Folhas
Ácidos gordos	Percentagem relativa (%)						
C11:0	nd	3,57 ± 0,02	nd	0,55 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,47 ± 0,01	nd
C12:0	0,61 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,75 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,10 ± 0,01
C13:0	0,60 ± 0,01	nd	0,61 ± 0,04	nd	0,64 ± 0,04	0,054 ± 0,002	0,56 ± 0,02
C14:0	0,91 ± 0,02	0,83 ± 0,01	0,64 ± 0,01	0,90 ± 0,01	0,75 ± 0,02	0,69 ± 0,01	0,52 ± 0,01
C14:1	nd	nd	0,26 ± 0,01	nd	nd	nd	nd
C15:0	0,22 ± 0,01	1,05 ± 0,01	0,19 ± 0,01	1,4 ± 0,04	0,21 ± 0,01	0,76 ± 0,03	0,19 ± 0,01
C15:1	0,17 ± 0,02	nd	0,19 ± 0,01	nd	nd	nd	0,19 ± 0,01
C16:0	19,17 ± 0,05	42,6 ± 0,1	19,6 ± 0,3	57,7 ± 0,1	20 ± 0,2	29,3 ± 0,4	19,6 ± 0,5
C16:1	1,59 ± 0,02	nd	1,64 ± 0,08	nd	1,78 ± 0,04	0,61 ± 0,02	1,43 ± 0,03
C17:0	0,55 ± 0,01	1,99 ± 0,03	0,48 ± 0,02	7,14 ± 0,09	0,48 ± 0,03	1,87 ± 0,03	0,36 ± 0,03
C18:0	2,07 ± 0,02	4,9 ± 0,01	1,4 ± 0,08	2,74 ± 0,03	1,66 ± 0,01	2,55 ± 0,1	1,36 ± 0,03
C18:1n9c	7,5 ± 0,01	9,53 ± 0,03	7,0 ± 0,2	17,4 ± 0,1	7,5 ± 0,2	16,03 ± 0,04	7,67 ± 0,09
C18:2n6c	13,82 ± 0,01	21,37 ± 0,06	12,61 ± 0,07	2,95 ± 0,02	13,1 ± 0,1	37,2 ± 0,4	17,6 ± 0,1
C18:3n6	nd	1,99 ± 0,01	0,34 ± 0,01	1,03 ± 0,01	nd	nd	0,37 ± 0,02
C18:3n3	49,85 ± 0,03	2,7 ± 0,01	52,5 ± 0,5	0,31 ± 0,01	50,3 ± 0,7	5,53 ± 0,03	47,8 ± 0,1
C20:0	nd	nd	nd	0,82 ± 0,02	nd	nd	nd
C20:1	0,45 ± 0,01	nd	0,31 ± 0,01	0,78 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,61 ± 0,02	0,45 ± 0,02
C22:0	0,85 ± 0,02	2,39 ± 0,07	0,67 ± 0,05	1,15 ± 0,01	0,96 ± 0,02	1,08 ± 0,02	0,51 ± 0,01
C22:1	nd	nd	nd	0,32 ± 0,01	nd	nd	nd
C23:0	0,53 ± 0,01	1,71 ± 0,05	0,36 ± 0,01	1,23 ± 0,01	0,45 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,25 ± 0,01
C24:0	1,11 ± 0,01	4,89 ± 0,01	0,97 ± 0,06	2,92 ± 0,02	1,31 ± 0,01	1,8 ± 0,03	0,74 ± 0,03
SFA	26,62 ± 0,01 d	64,4 ± 0,1 b	25,1 ± 0,6 e	77,3 ± 0,2 a	26,8 ± 0,3 d	40,0 ± 0,5 c	24,2 ± 0,4 f
MUFA	9,71 ± 0,04 d	9,53 ± 0,03 e	9,4 ± 0,08 f	18,4 ± 0,2 a	9,7 ± 0,2 d	17,25 ± 0,01 b	9,9 ± 0,1 c

PUFA	63,67 ± 0,04 c	26,06 ± 0,08 e	65,5 ± 0,5 b	4,29 ± 0,03 f	63,5 ± 0,5 c	42,8 ± 0,5 d	65,8 ± 0,2 a
Tocoferóis	(mg/100 g ms)						
<i>α</i> -Tocoferol	26,02 ± 0,05 c	0,22 ± 0,01 f	35,68 ± 0,03 a	0,09 ± 0,01 g	26,06 ± 0,01 b	0,31 ± 0,01 e	17,23 ± 0,09 d
<i>β</i> - Tocoferol	0,393 ± 0,003 a	nd	0,37 ± 0,02 b	nd	0,40 ± 0,01 a	nd	0,40 ± 0,01 a
<i>γ</i> - Tocoferol	nd	nd	3,10 ± 0,05 a	nd	0,42 ± 0,03 b	nd	0,42 ± 0,01 b
Total	26,41 ± 0,04 c	0,22 ± 0,01 f	39,15 ± 0,06 a	0,09 ± 0,01 g	26,88 ± 0,01 b	0,31 ± 0,01 e	18,05 ± 0,08 d

nd – não detetado. SFA: Ácidos Gordos Saturados; MUFA: Ácidos Gordos Monoinsaturados; PUFA: Ácidos Gordos Poli-insaturados; ácido undecanóico (C11:0), ácido láurico (C12:0), ácido tridecílico (C13:0), ácido mirístico (C14:0), ácido miristoleico (C14:1), ácido pentadecanóico (C15:0), ácido pentadecenóico (C15:1), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoléico (C16:1), ácido heptadecanóico (C17:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1n9c), ácido linoleico (C18:2n6c), ácido *γ*-linolénico (C18:3n6), ácido *α*-linolénico (C18:3n3), ácido araquídico (C20:0), ácido *cis*-11-eicosenóico (C20:1), ácido beénico (C22:0), ácido docosenóico (C22:1), ácido ácido tricosanóico (C23:0), ácido lignocérico (C24:0). Diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas entre as amostras, de acordo com o teste HSD de Tukey ($p = 0,05$).

4.3.2. Tocoferóis

Na **Tabela 2** também estão descritos os resultados relativos a composição em tocoferóis. As amostras de raízes apresentaram apenas a isoforma α -tocoferol (0,09 a 0,31 mg/100 g ms), enquanto nas amostras de folhas foram diferenciadas as isoformas α , β e γ -tocoferol, com exceção das folhas da cv. Albina vereduna, onde o γ -tocoferol não foi identificado. O conteúdo de tocoferóis totais nas folhas foi significativamente superior ao das raízes, especialmente influenciado pela prevalência da isoforma α - (17,23 a 35,68 mg/100 g ms), onde a acelga foi responsável pelo menor conteúdo em tocoferóis totais (18,05 mg/100 g ms), enquanto as folhas da cultivar Burpee's Golden se destacaram pelo maior teor (35,68 mg/100 g ms).

No trabalho desenvolvido por Xiao *et al.* (2012), também avaliaram a composição e conteúdo em tocoferóis de diferentes espécies de microvegetais, incluindo duas variedades de *B. vulgaris* L. (“Bull's Blood” e “Vermelha”), e em semelhança com o presente estudo, identificaram o α -tocoferol como a isoforma predominante em ambas as variedades (1,147 e 1,587 mg/100 g ms, respetivamente), além da presença de γ -tocoferol (Bull's Blood com 0,31 mg/100 g ms; Vermelha com 0,28 mg/100 g ms), não sendo identificado o β -tocoferol. Samuolienė *et al.* (2017) também avaliaram o conteúdo em tocoferóis nas folhas da variedade Bull's Blood, onde foram identificadas as quatro isoformas (α -, β -, γ - e δ -), sendo β - e γ -tocoferol os predominantes, e as isoformas α - e δ - presentes em teores significativamente inferiores. Santos *et al.* (2012) determinaram o conteúdo de vitaminas em diferentes espécies de vegetais folhosos, onde também foi detetada a presença α -tocoferol na acelga suíça.

4.4. Compostos fenólicos

Os resultados relativos à identificação e quantificação de compostos fenólicos presentes nas amostras de folhas e raízes são apresentados nas **Tabelas 3 e 4**, respectivamente. Nas folhas foram identificados 19 compostos, sendo que os maioritários incluem cinco que foram identificados como derivados de *O*-glucosilados da vitexina (flavonas *O,C*-glucosiladas). A vitexina, em si, é um derivado *C*-glucosilado da flavona apigenina, e é caracterizado principalmente devido à presença de um fragmento em *m/z* 293 (que representa a aglicona apigenina + 41 - 18 u), além de perdas de 120 u, característica da perda do hexósido em flavonas *C*-glucosiladas. Entretanto, os compostos identificados também apresentaram fragmentos abundantes referentes à fragmentação dos açúcares mais 18 u (H₂O), ocasionando em perdas de 180 u (162 + 18) para hexósidos e de 150 u (132 + 18) para pentóxidos, e 164 (146 + 18) para deoxihexósidos, gerando fragmentos abundantes em *m/z* 413 e *m/z* 455, respectivamente. Segundo Ferreres *et al.* (2008) e Hegazi *et al.* (2020), essa perda adicional de 18 u é característica de flavonas *O*-glicosiladas na posição 2" do açúcar *C*-glicosilado. Sendo assim, estes compostos foram tentativamente identificados como vitexina-2"-*O*-hexósido (pico **9**; $\lambda_{\text{máx}} = 336$ nm; [M-H]⁻ *m/z* 593), vitexina-2"-*O*-pentósido (pico **10a**; $\lambda_{\text{máx}} = 334$ nm; [M-H]⁻ *m/z* 563), vitexina-2"-*O*-deoxihexósido (pico **10b**; $\lambda_{\text{máx}} = 337$ nm; [M-H]⁻ *m/z* 577), vitexina malonil-2"-*O*-hexósido (pico **12a**; $\lambda_{\text{máx}} = 347$ nm; [M-H]⁻ *m/z* 679) e vitexina malonil-2"-*O*-pentósido (pico **13**; $\lambda_{\text{máx}} = 347$ nm; [M-H]⁻ = 679). No pico **9**, os fragmentos em *m/z* 413 são referentes à perda de 180 u (162+18), indicando a presença de um hexósido como açúcar, enquanto no pico **10a** a perda de 150 u (132+18) indica a perda de uma pentose. Já no composto do pico **10b**, o fragmento em *m/z* 413 indica a perda de uma deoxihexósido (164 u (146 + 18)). Nos picos **12a** e **13**, a presença dos fragmentos em *m/z* 455 são atribuídos às perdas de 180 u (o que indica a presença de um *O*-hexósido) e de 150 u (característica de um *O*-pentósido), além de fragmentos em *m/z* 593 e 563, respectivamente, que indicam a uma perda de 86 u, característica da presença do grupo malonil na sua estrutura (Gennari *et al.*, 2011; Hegazi *et al.*, 2020; Llorent-Martínez *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2012; Sakalem *et al.*, 2012; Zeb e Imran, 2019).

Além disso, três derivados de isoramnetina também foram identificados como isoramnetina di-*O*-hexósido (pico **11**; $\lambda_{\text{máx}} = 352$ nm; [M-H]⁻ *m/z* 639), isoramnetina *O*-hexosil-*O*-pentósido (pico **12b**; $\lambda_{\text{máx}} = 347$ nm; [M-H]⁻ *m/z* 609) e isoramnetina *O*-rutinósido (pico **14**; $\lambda_{\text{máx}} = 367$ nm; [M-H]⁻ *m/z* 623). Nos derivados de isoramnetina *O*-

glucosilada, são produzidos um pico base em m/z 315, característico da aglicona da isoramnetina e atribuídos à perda dos glucósidos, além do fragmento a m/z 300, que é resultante da perda de um grupo metil ($-CH_3$) característica de estrutura dos flavonoides metoxilados. O composto no pico **11** perdeu um fragmento de 324 u, o que indica a perda de duas hexoses (2×162 u), dando origem ao fragmento com m/z 315. Já o composto **12b** foi classificado como isoramnetina *O*-hexosil-*O*-pentósido, pelo que o ião $[M-H]^-$ com m/z 609 perde um fragmento de 294 u, que é referente à perda de uma hexose + pentose ($162 + 132$). O pico **14** apresentou uma perda de um fragmento com 308 m/z , que é indicativo da presença de uma deoxihexósido-hexósido (146 (deoxihexósido) + 162 (hexose)), que pelas características e comparação com padrões poderá ser considerado tentativamente um rutinósido (Cruz *et al.*, 2021; Hegazi *et al.*, 2020; Vissers *et al.*, 2017).

Dois derivados da quercetina foram identificados de acordo com a presença característica do pico base a m/z 300 e fragmento em m/z 301. No composto no pico **7**, o fragmento em m/z 301 indica a perda de 324 u, correspondente a duas hexoses (2×162 u), sendo este identificado como quercetina-*O*-dihexósido ($\lambda_{\text{máx}} = 351$ nm; $[M-H]^-$ m/z 625), enquanto o pico **8** foi identificado como quercetina-*O*-pentosil-hexósido ($\lambda_{\text{máx}} = 342$ nm; $[M-H]^-$ m/z 595), pois demonstrou a perda de um fragmento de 294 u, que é referente à hexose + pentose ($162 + 132$) (Apea-Bah *et al.*, 2021; Cruz *et al.*, 2021).

O composto presente no **pico 1** foi identificado como ácido *p*-cumaroil-hexárico ($\lambda_{\text{máx}} = 315$ nm; $[M-H]^-$ m/z 355), estando presente tanto em amostras de raízes e folhas. O ião molecular perde o ácido *p*-cumárico $[M-H-146]^-$ durante a fragmentação (ácido *p*-cumárico também caracterizado pela presença dos fragmentos característicos em m/z 163 e m/z 119), deixando o ácido hexárico (m/z 209) e seu derivado desidratado (m/z 191) como fragmentos principais (Apea-Bah *et al.*, 2021; Cruz *et al.*, 2021; Nguyen *et al.*, 2017).

Nos picos **3b** e **5a** foram identificados dois isómeros do composto tentativamente identificado como medioresinol (1 e 2, respetivamente) ($\lambda_{\text{máx}} = 230$ nm; $[M-H]^-$ m/z 387). Medioresinol é uma lignana do tipo furofurano que apresenta atividade antimicrobiana e antiparasitária, já descrita como compostos característicos na espécie *B. vulgaris* (Adebiyi *et al.*, 2019; Di Gioia, 2019; Llorent-Martinez *et al.*, 2015; Nyau *et al.*, 2015; Ozarowski *et al.*, 2013; Tsamo *et al.*, 2018).

Também foram identificados derivados dos ácidos sinápico e ferúlico, dos quais, alguns são comuns à composição das raízes, como ácido sinápico-ramnósido 1 e 2 (**Tabela 3: pico 2/Tabela 4: pico 4 e 5**; $\lambda_{\text{máx}} = 313$ nm; $[\text{M-H}]^- m/z 369$), que exibem um pico característico do ácido sinápico em $m/z 223$, indicando a perda de uma ramnose (146 u), e o ácido ferúlico-dihexósido (**Tabela 3: pico 5b/Tabela 4: pico 6b**; $\lambda_{\text{máx}} = 326$ nm; $[\text{M-H}]^- m/z 517$), que apresentou um pico base característicos do ácido ferúlico a $m/z 193$, que indica a perda de duas hexose (324 u), além dos fragmentos $m/z 175$ ($193 - 18$ (H_2O)) e $m/z 134$ (Chahdoura *et al.*, 2015; Vissers *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2015)

Alguns derivados do ácido ferúlico foram encontrados apenas nas folhas, como os isômeros 1 e 2 do ácido ferúlico-hexósido (picos **3a e 4**; $\lambda_{\text{máx}} = 330$ nm; $[\text{M-H}]^- m/z 355$), que demonstraram o pico característico do ácido ferúlico em $m/z 193$, indicando a perda da hexose (162 u), e fragmentos em $m/z 175$ e 134. Assim, o derivado do ácido ferúlico presente no pico **6a** também foi identificado como butanotetraol-(feruloil)-hexósido (pederol B; $\lambda_{\text{máx}} = 319$ nm; $[\text{M-H}]^- = 459$), devido a presença dos mesmos fragmentos característicos (Barros *et al.*, 2012; Chin *et al.*, 2010; Hegazi *et al.*, 2020; Mata *et al.*, 2016; M'rabet *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2014).

Outro derivado do ácido sinápico encontrado apenas nas folhas foi identificado como ácido sinápico-hexósido, ($\lambda_{\text{máx}} = 319$ nm; $[\text{M-H}]^- m/z 385$), que possui ião molecular a $m/z 385$ e a sua fragmentação originou um pico a $m/z 223$, $[\text{M-H-162}]^-$, caracterizado pela perda do resíduo hexósido (Hegazi *et al.*, 2020; Simirgiotis *et al.*, 2009; Spínola *et al.*, 2015).

As raízes apresentaram menor composição em compostos fenólicos, sendo quantificados 8 ácidos fenólicos no total (**Tabela 4**). Além dos compostos já descritos acima, foram identificados 2 isômeros do ácido feruloil-sinápico (picos **6a e 7**; $\lambda_{\text{máx}} = 326$ nm; $[\text{M-H}]^- m/z 399$), que demonstraram fragmentos característicos tanto do ácido sinápico em $m/z 223$, quanto do ácido ferúlico em $m/z 193$ e 175, onde estes indicam as respectivas perdas de cada uma dessas porções. Nas raízes também foram encontrados 2 isômeros de um composto derivado do ácido cafeico (picos **2 e 3**; $\lambda_{\text{máx}} = 300$ nm; $[\text{M-H}]^- m/z 341$), caracterizados pelo ião molecular a $m/z 341$ que deu origem ao pico base em $m/z 179$, correspondente à perda do hexósido $[\text{M-H-162}]^-$, bem como fragmentos MS^2 característicos em $m/z 161$ $[\text{M-H-hexose-H}_2\text{O}]^-$, $m/z 135$, $m/z 153$ $[\text{M-H-hexose-HC}\equiv\text{CH-H}_2\text{O}]^-$ e $m/z 143$ $[\text{M-H-hexose-2}\times\text{H}_2\text{O}]^-$, sendo esses identificados como ácido

cafeico-hexósido 1 e 2 (Ben Said *et al.*, 2017; Garzón *et al.*, 2017; Hossain *et al.*, 2010; Koolen *et al.*, 2013).

Nas folhas, o teor em compostos fenólicos totais variou de 19,2 a 34,3 mg/g de extrato, sendo os mais abundantes a vitexina-2''-*O*-pentósido (pico **10a**), 4,87 a 8,5 mg/100 g de extrato) e a vitexina malonil-2''-*O* -pentósido (pico **13**) 2,34 a 4,9 mg/ 100 g de extrato). Já as raízes apresentaram menores teores em fenólicos totais (0,130 a 0,150 g/100 g de extrato), com um total de 8 compostos identificados, sendo todos derivados dos ácidos ferúlico, sinápico, *p*-cumárico e cafeico. A presença de glucósidos de flavonoides derivados da apigenina (vitexina), isorhamnetina e quercetina, além de derivados de ácidos fenólicos, como *p*-cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico, juntamente com derivados de quercetina e isoramnetina e flavonas (por exemplo, vitexinas) já foram reportadas em beterrabas e nas suas folhas, como por exemplo, nos trabalhos de Vissers *et al.* (2017) e Hegazi *et al.* (2020), que avaliaram o perfil de compostos fenólicos em folhas de beterrabas das variedades Arrival e *rubra*, respetivamente.

Gawlik-Dziki *et al.* (2020) analisaram o conteúdo em ácidos fenólicos presentes nas folhas de duas variedades de beterraba (vermelha e branca) e duas variedades de acelga suíça (vermelha (“acelga ruibarbo”) e branca) provenientes da Polónia, onde também foi detetada a presença dos ácidos *p*-cumárico, ferúlico, e sinápico, além de outros como sirínico, salicílico e o ácido cafeico, que no presente estudo foi identificado apenas nas raízes das variedades Albina Vereduna e Burpee’s Golden. Os resultados obtidos demonstraram que a variedade vermelha da acelga suíça possui o maior teor em ácidos fenólicos. Em contraste com os resultados obtidos, Płatosz *et al.* (2020), analisaram extratos de sumos de raízes de beterraba fermentados, e além dos ácidos cafeico, ferúlico, sinápico e *p*-cumárico, também identificaram a presença de outros ácidos como o protocatecuico, sirínico, clorogénico e flavonoides como a apigenina, vitexina, quercetina, kaempferol, rutina e luteolina.

Tabela 3. Tempo de retenção (**Tr**), comprimentos de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$), dados espectrais de massa, abundâncias relativas de iões fragmentos, tentativa de identificação e quantificação dos compostos fenólicos encontrados nos extratos hidroetanólicos das folhas de *B. vulgaris* L. (média \pm DP, n=3).

FOLHAS									
Pico n.º	Tr (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fragmentos MS ² (m/z)	Tentativa de identificação	Quantificação (mg/g de extrato)			
						<i>B. vulgaris</i> cv. Albina Vereduna	<i>B. vulgaris</i> cv. Burpee's Golden	<i>B. vulgaris</i> cv. Pablo F1	<i>B. vulgaris</i> subsp. <i>cicla</i> var. <i>flavescens</i>
1	4.42	315	355	MS ² [355]: 209 (100), 191 (90), 193 (87), 147 (56), 163 (29), 178 (25), 173 (10), 202 (10), 119 (8)	Ácido <i>p</i>-coumaroil-hexárico ^A (Apea-Bah <i>et al.</i> , 2021; Cruz <i>et al.</i> , 2021; Nguyen <i>et al.</i> , 2017)	v	nd	nd	nd
2	5.69	-	369	MS ² [369]: 129 (100), 223 (84), 205 (72), 163 (41), 119 (18), 202 (7)	Ácido sinápico-ramnósido 1 ^C (Zhang <i>et al.</i> , 2015)	0,050 \pm 0,001 a	nd	nd	nd
3a*	6.18	-	355	MS ² [355]: 193 (100), 178 (36), 134 (30), 149 (28), 194 (4), 175 (1)	Ácido ferúlico-hexósido 1 ^B (Barros <i>et al.</i> , 2012; Hegazi <i>et al.</i> , 2020; Mata <i>et al.</i> , 2016; M'rabet <i>et al.</i> , 2017; Sun <i>et al.</i> , 2014)	v	0,050 \pm 0,002 a	0,030 \pm 0,002 b	v
3b*	6.18	-	387	MS ² [387]: 163 (100), 387 (68), 119 (8), 388 (5), 164 (4), 207 (2), 369 (2)	Medioresinol 1 ^C (Adebisi <i>et al.</i> , 2019; Di Gioia e Petropoulos, 2019; Llorent-Martinez <i>et al.</i> , 2015; Ozarowski <i>et al.</i> , 2013)	0,090 \pm 0,002 c	0,110 \pm 0,007 b	0,110 \pm 0,001 a	0,010 \pm 0,005 d
4	6.53	330	355	MS ² [355]: 175 (100), 160 (21), 193 (9), 134 (6), 191 (3)	Ácido ferúlico-hexósido 2 ^B (Barros <i>et al.</i> , 2012; Hegazi <i>et al.</i> , 2020; Mata <i>et al.</i> , 2016; M'rabet <i>et al.</i> , 2017; Sun <i>et al.</i> , 2014)	nd	nd	nd	0,39 \pm 0,03 a
5a*	6.60	230	387	MS ² [387]: 163 (100), 387 (68), 119 (8), 388 (5), 164 (4), 207 (2), 369 (2)	Medioresinol 2 ^C (Adebisi <i>et al.</i> , 2019; Di Gioia e Petropoulos, 2019; Llorent-Martinez <i>et al.</i> , 2015; Ozarowski <i>et al.</i> , 2013)	0,100 \pm 0,002 c	0,50 \pm 0,02 a	0,33 \pm 0,01 b	0,480 \pm 0,004 a
5b*	6.60	326	517	MS ² [517]: 175 (100), 193(98), 235 (32), 134 (26), 149 (9), 337 (8)	Ácido ferúlico-dihexósido ^B (Chahdoura <i>et al.</i> , 2015; Vissers <i>et al.</i> , 2017)	v	0,46 \pm 0,01 a	0,040 \pm 0,002 c	0,100 \pm 0,003 b
6a*	6.88	319	459	MS ² [459]: 175 (100), 193 (46), 160 (12), 134 (10)	Butanotetraol-(feruloil)-hexósido ^B (Chin <i>et al.</i> , 2010; Hegazi <i>et al.</i> , 2020)	0,14 \pm 0,01 c	0,35 \pm 0,01 a	0,25 \pm 0,01 b	0,020 \pm 0,001 d

6b*	6.88	319	385	MS ² [385]: 223 (100), 208 (70), 164 (38), 179 (27), 149 (7), 205 (3), 193 (3)	Ácido sinápico-hexósido ^C (Hegazi <i>et al.</i> , 2020; Simirgiotis <i>et al.</i> , 2009; Spínola <i>et al.</i> , 2015)	0,240 ± 0,008 a	nd	nd	0,110 ± 0,002 b
7	9.31	257/340/351	625	MS ² [625]: 300 (100), 301 (61), 625 (31)	Quercetina-O-dihexósido ^D (Apea-Bah <i>et al.</i> , 2021)	0,170 ± 0,003 c	0,170 ± 0,003 c	0,37 ± 0,01 a	0,250 ± 0,005 b
8	11.04	267/302/342	595	MS ² [595]: 300 (100), 301 (54), 595 (34)	Quercetina-O-pentósil-hexósido ^D (Cruz <i>et al.</i> , 2021)	0,28 ± 0,01 b	0,230 ± 0,002 c	0,38 ± 0,02 a	0,090 ± 0,003 d
9	11.27	214/269/336	593	MS ² [593]: 293 (100), 413 (38), 311 (9), 294 (5), 414 (2), 473 (1)	Vitexina-2"-O-hexósido ^E (Hegazi <i>et al.</i> , 2020; Vissers <i>et al.</i> , 2017)	2,81 ± 0,02 b	0,55 ± 0,04 d	3,2 ± 0,1 a	0,89 ± 0,04 c
10a*	12.57	215/269/334	563	MS ² [563]: 293 (100), 413 (36), 311 (11), 294 (6), 201 (4), 414 (3), 341 (1)	Vitexina-2"-O-pentósido ^E (Hegazi <i>et al.</i> , 2020; Sakalem <i>et al.</i> , 2012; Vissers <i>et al.</i> , 2017)	2,87 ± 0,09 c	8,3 ± 0,4 a	8,5 ± 0,5 a	4,87 ± 0,03 b
10b*	12.57	214/269/337	577	MS ² [577]: 293 (100), 413 (43), 311 (16), 294 (4), 457 (3), 341 (3)	Vitexina-2"-O-deoxihexósido ^E (Hegazi <i>et al.</i> , 2020; Llorent-Martinez <i>et al.</i> , 2015)	nd	nd	nd	4,87 ± 0,03 a
11	13.9	204/256/352	639	MS ² [639]: 315 (100), 314 (30), 300 (7), 639 (6), 316 (4), 299 (3), 357 (1)	Isoramnetina-O-dihexósido ^D (Hegazi <i>et al.</i> , 2020; Vissers <i>et al.</i> , 2017)	3,29 ± 0,05 c	3,5 ± 0,2 b	5,2 ± 0,3 a	1,8 ± 0,1 d
12a*	14.99	258/266/347	679	MS ² [679]: 293 (100), 455 (44), 311 (11), 203 (6), 575 (6), 635 (1), 593 (1)	Vitexina malonil-2"-O-hexósido ^E (Hegazi <i>et al.</i> , 2020; Vissers <i>et al.</i> , 2017)	4,8 ± 0,2 a	2,32 ± 0,06 b	4,7 ± 0,2 a	1,24 ± 0,02 c
12b*	14.99	258/266/347	609	MS ² [609]: 315 (100), 314 (36), 609 (8), 300 (6)	Isoramnetina-O-pentósil-hexósido ^D (Cruz <i>et al.</i> , 2021; Hegazi <i>et al.</i> , 2020)	4,84 ± 0,05 a	2,34 ± 0,07 b	4,9 ± 0,2 a	nd
13	15.99	216/269/334	649	MS ² [649]: 293 (100), 455 (38), 311 (13), 545 (7), 294 (5), 341 (2), 605 (1), 563 (1)	Vitexina malonil-2"-O-pentósido ^E (Hegazi <i>et al.</i> , 2020; Vissers <i>et al.</i> , 2017)	2,37 ± 0,04 d	7,0 ± 0,3 a	5,9 ± 0,3 b	4,0 ± 0,3 c
14	16.64	267/338/367	623	MS ² [623]: 315 (100), 314 (45), 623 (12), 300 (7)	Isoramnetina-O-rutinósido ^D (Cruz <i>et al.</i> , 2021)	0,280 ± 0,003 b	nd	0,41 ± 0,02 a	nd
Ácidos fenólicos totais						0,92 ± 0,01 a	0,86 ± 0,005 b	0,32 ± 0,01 d	0,62 ± 0,02 c
Flavonoides totais						21,7 ± 0,4 c	24,5 ± 1,0 b	33,5 ± 1,6 a	18,2 ± 0,6 d
Compostos fenólicos totais						23,2 ± 0,4 c	25,9 ± 0,9 b	34,3 ± 1,6 a	19,2 ± 0,7 d

* – Corresponde ao somatório de compostos coeluídos no pico do mesmo número; v – vestígios; nd – não detetado; Retas de calibração: A – ácido *p*-cumárico ($y = 76029x + 102258$; $R^2 = 0,9852$); B – ácido ferúlico ($y = 85718x + 68543$; $R^2 = 0,9969$); C – ácido sinápico ($y = 65114x + 21123$; $R^2 = 0,9969$); D – quercetina-3-*O*-glicosídeo ($y = 28555x + 3032,3$; $R^2 = 0,9996$); E – apigenina-7-glicosídeo ($y = 30262x - 32276$; $R^2 = 0,9981$). Diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas entre as amostras, de acordo com o teste HSD de Tukey ($p = 0,05$).

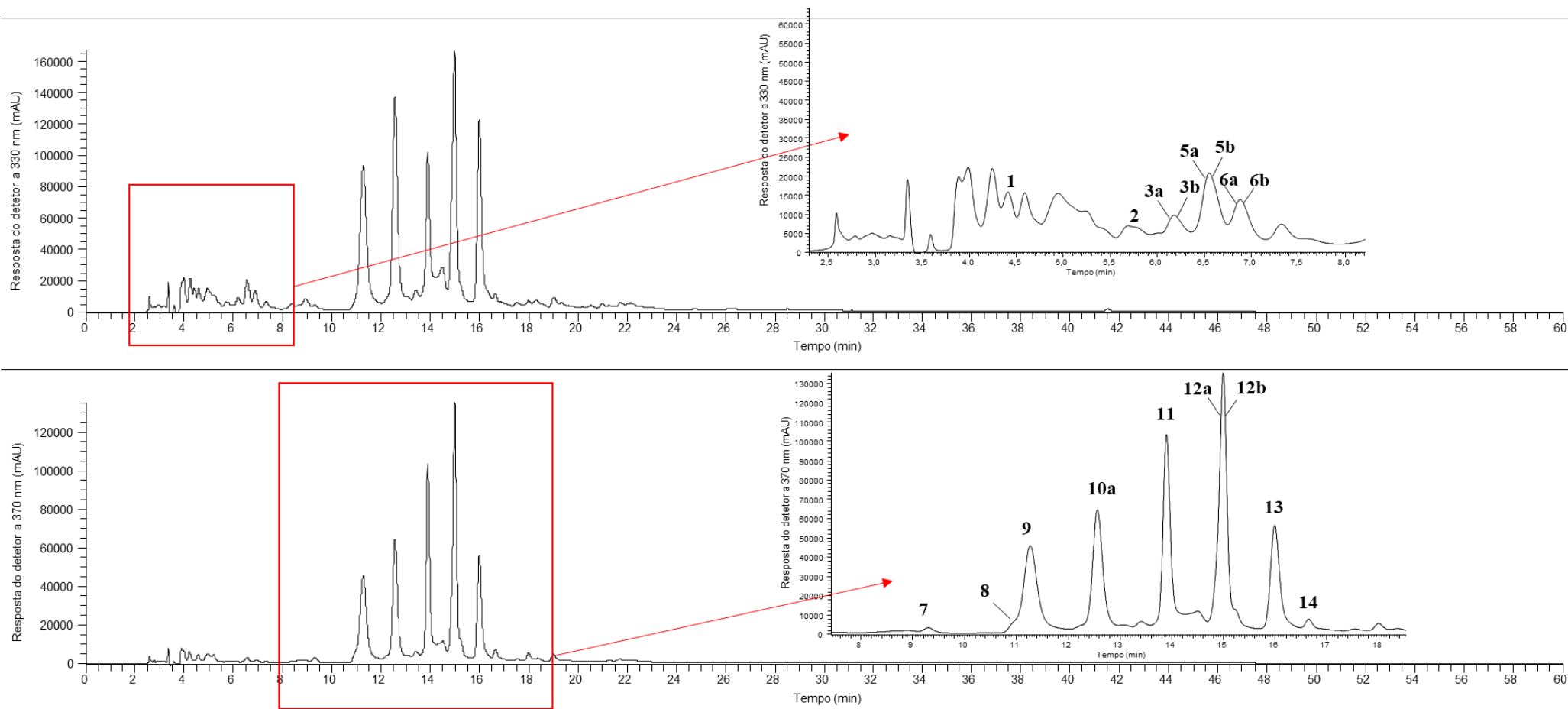


Figura 16. Exemplo de cromatograma de compostos fenólicos – folhas da cv. Albina Vereduna. (Fonte: Elaboração própria através dos programas Microsoft PowerPoint Versão 2309 e Xcalibur® versão 2.2.0.48).

Tabela 4. Tempo de retenção (**Tr**), comprimentos de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$), dados espectrais de massa, abundâncias relativas de iões fragmentos, tentativa de identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos hidroetanólicos das raízes de *B. vulgaris* L. (média \pm DP, n=3).

RAÍZES								
Pico n.º	Tr (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fragmentos MS ² (m/z)	Tentativa de identificação	Quantificação (mg/g de extrato)		
						<i>B. vulgaris</i> cv. Albina Vereduna	<i>B. vulgaris</i> cv. Burpee's Golden	<i>B. vulgaris</i> cv. Pablo F1
1	4.42	315	355	MS ² [355]: 209 (100), 191 (90), 193 (87), 147 (56), 163 (29), 178 (25), 173 (10), 119 (8)	Ácido <i>p</i> -coumaroil-hexárico ^A (Apea-Bah <i>et al.</i> , 2021; Cruz <i>et al.</i> , 2021; Nguyen <i>et al.</i> , 2017)	v	v	nd
2	4.60	296	341	MS ² [341]: 119 (100), 179 (47), 143 (29), 161 (24), 341 (24), 149 (20), 135 (3)	Ácido cafeico-hexósido 1 ^F (Barreira <i>et al.</i> , 2014; Ben Said <i>et al.</i> , 2017; Gouveia e Castilho, 2011)	0,060 \pm 0,002 b	0,060 \pm 0,002 a	nd
3	4.95	300	341	MS ² [341]: 153 (100), 119 (19), 179 (19), 143 (7), 161 (6), 341 (5), 149 (3), 135 (1)	Ácido cafeico-hexósido 2 ^F (Barreira <i>et al.</i> , 2014; Ben Said <i>et al.</i> , 2017; Gouveia e Castilho, 2011)	0,050 \pm 0,001 b	0,060 \pm 0,001 a	nd
4	5.68	313	369	MS ² [369]: 129 (100), 223 (77), 205 (69), 163 (42), 119 (39), 161 (8)	Ácido sinápico-ramnósido 1 ^C (Zhang <i>et al.</i> , 2015)	0,020 \pm 0,002 b	v	0,040 \pm 0,003 a
5	6.23	300	369	MS ² [369]: 129 (100), 223 (80), 205 (70), 163 (47), 119 (19), 161 (10)	Ácido sinápico-ramnósido 2 ^C (Zhang <i>et al.</i> , 2015)	v	v	nd
6a*	6.60	326	399	MS ² [399]: 129 (100), 205 (48), 223 (44), 193 (37), 134 (14), 161 (6), 175 (6)	Ácido feruloil-sinápico 1 ^C (Garzón <i>et al.</i> , 2017)	0,020 \pm 0,001 c	0,030 \pm 0,001 b	0,060 \pm 0,002 a
6b*	6.60	326	517	MS ² [517]: 175 (100), 193(83), 235 (27), 134 (21), 149 (9), 337 (8)	Ácido ferúlico-dihexósido ^B (Chahdoura <i>et al.</i> , 2015; Vissers <i>et al.</i> , 2017)	v	v	v
7	7.34	323	399	MS ² [399]: 129 (100), 205 (48), 193 (48), 223 (37), 134 (17), 161 (8), 175 (3)	Ácido feruloil-sinápico 2 ^C (Garzón <i>et al.</i> , 2017)	v	v	0,020 \pm 0,002 a
Ácido fenólicos totais						0,150 \pm 0,001 a	0,150 \pm 0,002 a	0,130 \pm 0,003 b
Compostos fenólicos totais						0,150 \pm 0,001 a	0,150 \pm 0,002 a	0,130 \pm 0,003 b

* – Corresponde ao somatório de compostos coeluídos no pico do mesmo número; v – vestígios; nd – não detetado; Retas de calibração: A – ácido *p*-cumárico ($y = 76029x + 102258$; $R^2 = 0,9852$); B – ácido ferúlico ($y = 85718x + 68543$; $R^2 = 0,9969$); C – ácido sinápico ($y = 65114x + 21123$; $R^2 = 0,9969$); F – ácido cafeico ($y =$

90492x -29265; $R^2 = 0,9998$). Diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas entre as amostras, de acordo com o teste HSD de Tukey ($p = 0,05$).

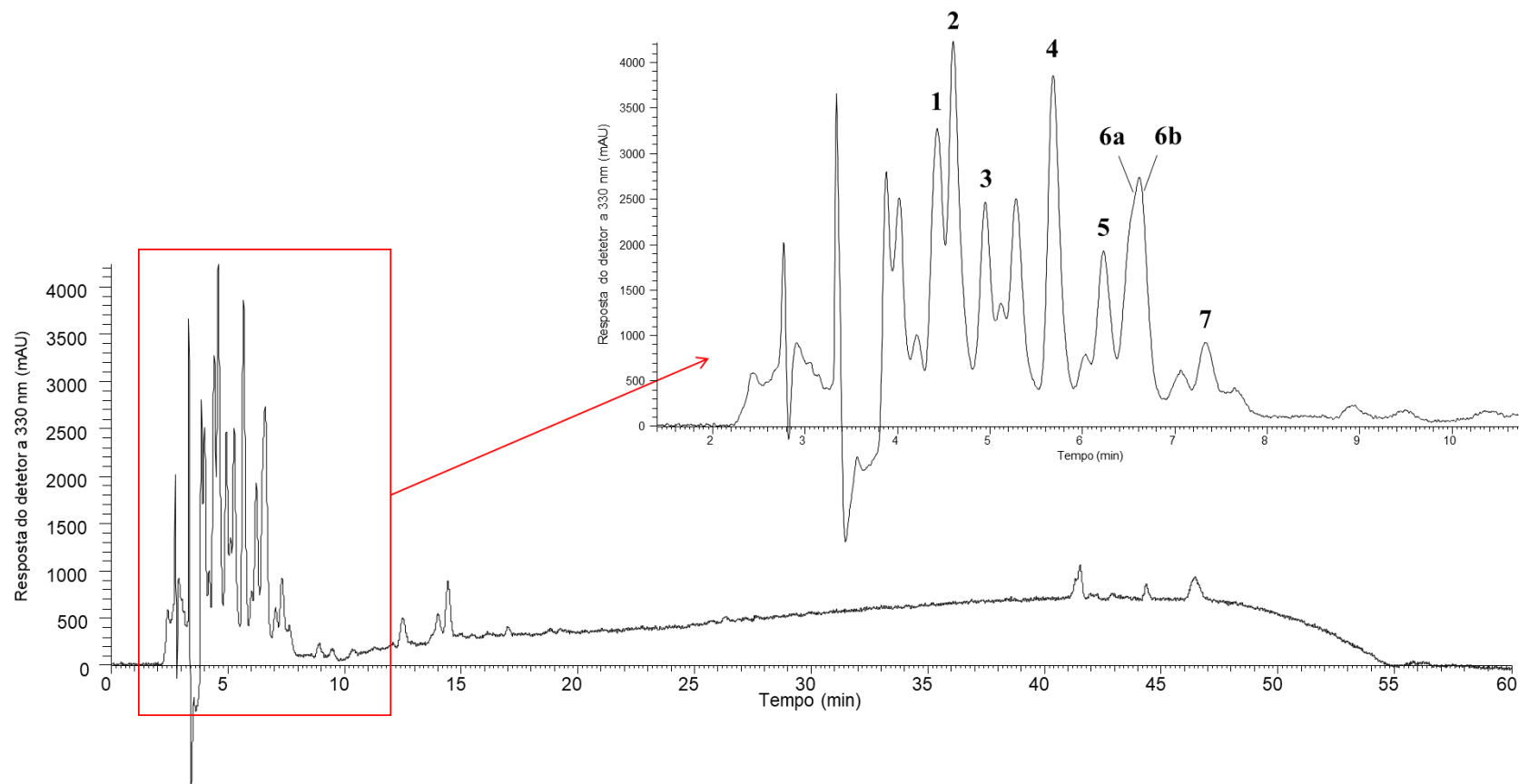


Figura 17. Exemplo de cromatograma de compostos fenólicos – raízes da cv. Albina Vereduna. (Fonte: Elaboração própria através dos programas Microsoft PowerPoint Versão 2309 e Xcalibur® versão 2.2.0.48).

4.5. Betalaínas

Apenas as amostras de folhas e raízes da cv. Pablo F1, de raiz da cv. Burpee's Golden e a acelga suíça apresentaram betalaínas, sendo identificadas, no total, 7 betacianinas e 1 betaxantina, apresentados na **Tabela 5**. Os compostos nos picos **1** e **2** apresentaram o íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 551 ($\lambda_{\text{máx}} = 534/532$) e no espectro MS^2 , um fragmento característico em m/z 389 $[M+H - 162]^+$, que foi formado pela perda da molécula de glicose resultando na presença das agliconas $[\text{betanidina}+H]^+$ e $[\text{isobetanidina}+H]^+$, sendo identificados como betanina e isobetanina, respectivamente (Escribano *et al.*, 2017; Herbach *et al.*, 2004; Roriz *et al.*, 2020; Slatnar *et al.*, 2015).

Além disso, o composto no pico **5** foi identificado como neobetanina ($\lambda_{\text{máx}} = 534/532$), devido ao seu maior tempo de retenção em relação a betanina e a isobetanina, e à presença do íon molecular em m/z 549 ($551 - 2 H$), bem como pelos fragmentos de MS^2 típicos gerando em m/z de 387 ($549 - 162$) e 343 ($387 - 44 (CO_2)$) (Herbach *et al.*, 2004; Slatnar *et al.*, 2015).

Os picos **3b** e **4** correspondem a decarboxi-betanina e decarboxi-isobetanina, respectivamente, que geraram íons moleculares $[M+H]^+$ em m/z 507 e um fragmento MS^2 em m/z 345 ($507 - 162$) e λ_{max} de 515 nm, sendo estes os produtos da descarboxilação da betanina e da isobetanina ($551 - 44$). O composto no pico **6** correspondeu a decarboxi-neobetanina, com $[M+H]^+$ em m/z 505 e um fragmento MS^2 em m/z 343 ($505 - 162$) e resultou da descarboxilação da neobetanina ($549 - 44$) (Herbach *et al.*, 2004; Slatnar *et al.*, 2015).

O composto no pico **7** foi tentativamente identificado como feruloil-hexosil-(iso)betanina apresentando o íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 889 e no espectro MS/MS , um fragmento em m/z 389, característico na presença de agliconas $[M+H - \text{betanidina} + H]^+$ ou $[\text{isobetanidina} + H]^+$, em m/z 713 $[M+H - 176]^+$ indicando a perda do grupo feruloil, e em m/z 727 $[M+H - 162]^+$ indicando a perda de uma hexose (Slatnar *et al.*, 2015).

A única betaxantina identificada foi a miraxantina-V (pico **3a**; $\lambda_{\text{máx}} = 468$; $[M+H]^+$ m/z 347), em menor proporção, sendo a única betalaína identificada na amostra de raiz da cv. Burpee's Golden. Foi caracterizada devido à observação de um íon molecular em m/z 347, e a sua dissociação induzida produziu um espectro informativo de íons filhos dominado pela perda sucessiva dos grupos carboxila (pico base m/z 303 ($[M+H$

– 44 (CO₂)⁺ e fragmento em m/z 259 ([M+H – 88 (2 x CO₂)]⁺). Apresentou também fragmentações que correspondem à perda de aminoácidos (m/z em 194 (347 – 153 (dopamina)), e não proeminente em m/z 137, que representa a dopamina desaminado (153 – 16 (NH₂)) (Escribano *et al.*, 2017; Kugler *et al.*, 2007; Schliemann *et al.*, 1999).

Sawicki *et al.* (2016), analisaram o perfil de betalaínas de raízes de 13 variedades de beterraba provenientes da Polónia (NOE1, NOE2, NOE6, NOE8, 1A, 3A, 2B, 4B, SKR, SKB, Czarnota, Rywal and Crosby), nas quais foram caracterizadas as mesmas betacianinas identificadas no presente trabalho. Entretanto, não foi identificada a miraxantina-V, estando presentes outras betaxantinas como vulgaxantina I, II, III, e miraxantina II e III. Slatnar *et al.* (2015) também avaliaram o conteúdo em betalaínas em diferentes partes (casca, polpa e pecíolo) de duas variedades de beterraba vermelha (cv. Pablo F1 e cv. Taunus F1) e uma variedade de beterraba amarela (cv. Boldor), onde nas variedades vermelhas foram identificadas betacianinas como betanina, isobetanina, neobetanina, decarboxi-betanina e feruloil-hexosil-betanina, e algumas betaxantinas como vulgaxantina-I e indicaxantina, enquanto na variedade amarela foi detetada apenas a presença de betaxantinas.

Já os autores Kugler *et al.* (2007) detetaram a presença de miraxantina-V ao avaliar o perfil de betaxantinas em variedades de beterraba vermelha (var. *conditiva* Alef.) e amarela (var. *conditiva* Alef. cv. Burpee's Golden), e uma variedade acelga suíça amarela (*B. vulgaris* subsp. *cicla* cv. 'Bright Lights'). Ainda foram identificadas outras betaxantinas como vulgaxantina I, II, III e IV, miraxantina II e III, e portugalaxantina II e III, por exemplo, totalizando 25 compostos identificados.

Tabela 5. Tempo de retenção (**Tr**), comprimentos de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$), dados espectrais de massa, abundância relativa de iões fragmentos, tentativa de identificação e quantificação das betalainas encontradas nas folhas e raízes das variedades de *B. vulgaris* L. estudadas. (média \pm DP, n=3).

Pico n.º	Tr (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	[M + H] ⁺ (m/z)	Fragmentos MS ² (m/z)	Tentativa de identificação	Quantificação (mg/g ms)			
						Folhas		Raízes	
						<i>B. vulgaris</i> cv. Pablo F1	<i>B. vulgaris</i> subsp. <i>cicla</i> var. <i>flavescens</i>	<i>B. vulgaris</i> cv. Pablo F1	<i>B. vulgaris</i> cv. Burpees Golden
1	18.00	534	551	MS ² [551]: 389 (100), 390 (11), 302 (2)	Betanina (Escribano <i>et al.</i> , 2017; Herbach <i>et al.</i> , 2004; Roriz <i>et al.</i> , 2020; Sawicki <i>et al.</i> , 2016; Slatnar <i>et al.</i> , 2015)	0,820 \pm 0,001 c	3,86 \pm 0,02 a	0,90 \pm 0,02 b	nd
2	19.40	532	551	MS ² [551]: 389 (100), 390 (19)	Isobetanina (Escribano <i>et al.</i> , 2017; Roriz <i>et al.</i> , 2020; Sawicki <i>et al.</i> , 2016; Slatnar <i>et al.</i> , 2015)	0,800 \pm 0,002 c	2,35 \pm 0,04 a	1,48 \pm 0,07 b	nd
3a*	20.65	468	347	MS ² [347]: 303 (100), 137 (93), 259 (57), 106 (44), 194 (14), 164 (12)	Miraxantina-V (Escribano <i>et al.</i> , 2017; Kugler <i>et al.</i> , 2007)	nd	0,350 \pm 0,007 a	nd	0,140 \pm 0,002 b
3b*	20.65	501	507	MS ² [507]: 345 (100), 346 (20), 257 (3), 417 (3), 357 (2)	Decarboxi-betanina (Herbach <i>et al.</i> , 2004; Sawicki <i>et al.</i> , 2016)	0,210 \pm 0,001 c	0,350 \pm 0,007 b	0,69 \pm 0,05 a	nd
4	22.50	533	507	MS ² [507]: 345 (100), 346 (12), 479 (1)	Decarboxi-isobetanina (Herbach <i>et al.</i> , 2004; Sawicki <i>et al.</i> , 2016)	1,29 \pm 0,02 c	2,54 \pm 0,02 b	18,18 \pm 0,03 a	nd
5	23.30	535	549	MS ² [549]: 387 (100), 388 (20), 343 (1)	Neobetanina (Herbach <i>et al.</i> , 2004; Sawicki <i>et al.</i> , 2016; Slatnar <i>et al.</i> , 2015)	nd	0,300 \pm 0,008 b	0,63 \pm 0,06 a	nd
6	26.10	481	505	MS ² [505]: 343 (100), 344 (11), 296 (3)	Decarboxi-neobetanina (Herbach <i>et al.</i> , 2004; Sawicki <i>et al.</i> , 2016; Slatnar <i>et al.</i> , 2015)	nd	0,170 \pm 0,001 b	1,64 \pm 0,01 a	nd
7	28.80	535	889	MS ² [889]: 389 (100), 390 (14), 713 (3), 727 (3)	Feruloil-hexosil (iso)betanina (Sawicki <i>et al.</i> , 2016; Slatnar <i>et al.</i> , 2015)	nd	0,47 \pm 0,04 a	nd	nd

Betacianinas totais	3,12 ± 0,02 c	10,0 ± 0,1 b	22,8 ± 1,3 a	-
Betaxantinas totais	-	0,350 ± 0,007 a	-	0,140 ± 0,002 b
Betaláínas totais	3,12 ± 0,02 c	10,4 ± 0,1 b	22,8 ± 1,3 a	0,140 ± 0,002 d

* – Corresponde ao resumo de compostos coeluídos no pico do mesmo número; nd – não detetado; Reta de calibração: gonfrenina III ($y = 14670x - 197725$, $R^2 = 0,9997$).
Diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas entre as amostras, de acordo com o teste HSD de Tukey ($p = 0,05$).

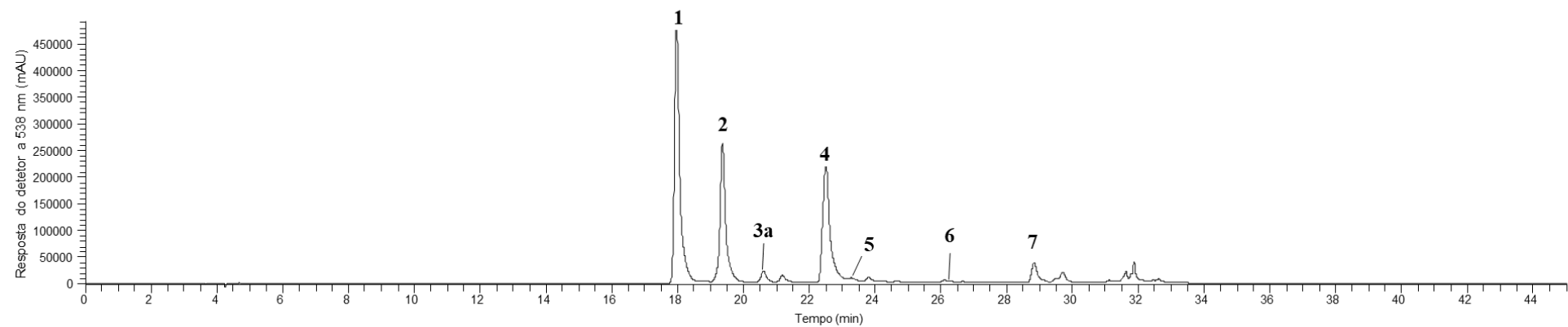
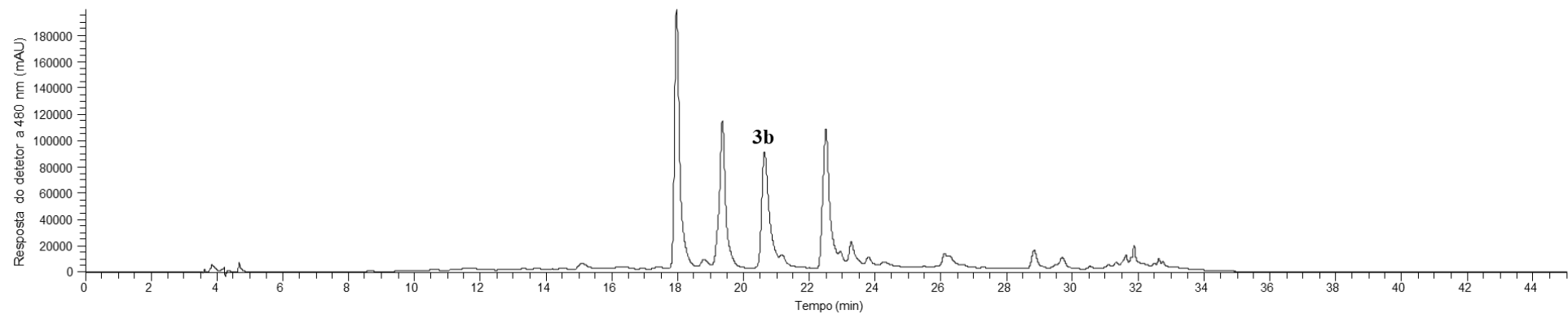


Figura 18. Exemplo de cromatograma de betalaínas – folhas da acelga suíça (*B. vulgaris* subsp. *cicla* var. *flavescens*). (Fonte: Elaboração própria através dos programas Microsoft PowerPoint Versão 2309 e Xcalibur® versão 2.2.0.48).

4.6. Avaliação de propriedades biológicas

4.6.1. Atividade antioxidante

Os resultados obtidos referentes à avaliação da atividade antioxidante são apresentados na **Tabela 6**. Em ambos os ensaios (TBARS e OxHLIA) foi possível identificar diferenças significativas entre as amostras, tendo-se verificado nas folhas melhor atividade antioxidante do que nas raízes. A cultivar Pablo F1 foi a que apresentou a melhor atividade antioxidante em ambos os ensaios, com destaque para ambas as partes estudadas (folhas e raiz). Apesar dos resultados, os valores de EC₅₀ para todas as amostras foram mais elevados do que o controlo positivo trolox utilizado.

A atividade antioxidante do extrato metanólico de beterraba vermelha foi avaliada por Rey *et al.* (2005) através da metodologia de TBARS, tendo revelado ação antioxidante bastante elevada (com a concentração de 0,5 mg/g). Existem outros métodos muito utilizados para avaliar o potencial antioxidante de extratos que, embora também sejam eficazes na avaliação dessa propriedade, a grande maioria são ensaios químicos baseados na eliminação de radicais livres, pelo que não permitem uma comparação efetiva com a metodologia aplicada no presente estudo. Como por exemplo, Gawlik-Dziki *et al.* (2020) analisaram a atividade antioxidante dos extratos metanólicos de folhas de duas cultivares de beterraba (branca e vermelha) e de acelga suíça (acelga ruibarbo e branca) provenientes da Polónia mediante o ensaio de ABTS, e observaram que a acelga ruibarbo e as folhas da beterraba vermelha também apresentaram capacidade antioxidante (EC₅₀ = 9,91 e 11,9 g mg/mL, respetivamente).

4.6.2. Citotoxicidade

Os resultados da avaliação da citotoxicidade dos extratos hidroetanólicos também estão descritos na **Tabela 6**, e demonstram que nenhuma das amostras apresentou potencial citotóxico contra a linha celular testada. Edziri *et al.* (2019) também analisaram a capacidade citotóxica do extrato metanólico e do sumo de beterraba vermelha proveniente da Tunísia em uma linha de células hepáticas humanas (C3A), onde ambas as amostras não apresentaram qualquer efeito citotóxico.

Tabela 6. Atividade antioxidante e citotóxica dos extratos hidroetanólicos das amostras de *B. vulgaris* L. estudadas (média ± DP, n=3).

Atividade antioxidante	<i>B. vulgaris</i> cv. Albina Vereduna		<i>B. vulgaris</i> cv. Burpee's Golden		<i>B. vulgaris</i> cv. Pablo F1		<i>B. vulgaris</i> subsp. <i>cicla</i> var. <i>flavescens</i>	
	Folhas	Raízes	Folhas	Raízes	Folhas	Raízes	Folhas	Trolox
TBARS (EC ₅₀ , mg/mL)	0,39 ± 0,06 f	3,06 ± 0,05 b	0,65 ± 0,02 e	12,3 ± 0,6 a	0,35 ± 0,02 g	1,13 ± 0,04 c	0,88 ± 0,02 d	0,054 ± 0,003
OxHLIA (EC ₅₀ , Δt = 60 min, μg/mL)	72 ± 4 e	575 ± 30 b	52 ± 1 f	585 ± 13 a	29 ± 1 g	497 ± 31 c	148 ± 2 d	21,5 ± 0,1
Citotoxicidade para linhas celulares não tumorais (GI₅₀ μg/mL)								Elipticina
PLP2	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	1,4 ± 0,1

Diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas entre as amostras, de acordo com o teste HSD de Tukey ($p = 0,05$).

4.6.3. Atividade antimicrobiana

A **Tabela 7** apresenta os resultados relativos à avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos hidroetanólicos das amostras contra três bactérias patogênicas Gram-positivas e cinco Gram-negativas, além de dois fungos. Todas as amostras exibiram capacidade antibacteriana contra as estirpes testadas, com exceção das bactérias *Enterobacter Cloacae* e *Pseudomonas aeruginosa*, contra as quais não foi evidenciada nenhuma atividade. A amostra de folhas da cv. Albina Vereduna foi a única que apresentou atividade contra os fungos analisados, destacando-se pela sua capacidade antimicrobiana, de maneira geral. A acelga suíça também exibiu atividade antibacteriana, especialmente contra a bactéria Gram-negativa *Staphylococcus aureus*. Em contraste, as raízes da cv. Burpee's Golden apresentaram menor capacidade antimicrobiana.

No estudo efetuado por Salamatullah *et al.* (2021), a atividade antimicrobiana dos extratos (metanólicos e aquoso) da polpa e casca de raiz de beterraba vermelha (var. *rubra*) foi avaliada contra as estirpes *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* pelo ensaio de difusão em ágar, e a CMI dos extratos foi determinada usando o método de microdiluição. Como resultado, todos os extratos também apresentaram atividade antimicrobiana promissora contra os patógenos testados, exibindo capacidades inibitórias e bactericidas. Vulić *et al.* (2013) avaliaram o mesmo parâmetro no extrato do resíduo de beterrabas obtido após separação do sumo, numa fábrica de processamento de frutas e vegetais na Sérvia. Os microrganismos utilizados para essa determinação foram culturas provenientes de alimentos e da água, que incluíram seis bactérias Gram-negativas, oito bactérias Gram-positivas, duas leveduras e dois bolores, das quais todas as bactérias Gram-negativas e algumas Gram-negativas foram inibidas pelo extrato testado, embora este não tenha demonstrado o mesmo efeito nos fungos.

Chaari *et al.* (2022) analisaram o potencial antibacteriano de diferentes extratos (acetoneitrilo, etanol e água em diferentes proporções) de folhas de beterraba contra a bactéria Gram-positiva (*S. aureus*) e duas bactérias Gram-negativas (*S. enterocolitica* e *E. coli*), onde o extrato otimizado das folhas foi capaz não apenas de inibir, mas também revelou ação bactericida contra todos os patógenos estudados. O estudo de Ahmadi *et al.* (2020) avaliou a atividade antimicrobiana de extratos metanólico, aquoso e de óleos essenciais de folhas beterraba vermelha, onde foi constatado que o extrato metanólico e óleo essencial apresentaram a maior capacidade de inibição do crescimento das bactérias

E.coli, *B. cereus*, *S. aureus*, *S. enteritidis*, além de apresentarem atividade antifúngica contra *Byssochlamys fulva*, *Aspergillus niger*, *Geotrichum* spp., *Alternaria* spp. e *Fusarium* spp..

Tabela 7. Atividade antimicrobiana (concentração mínima inibitória (CMI), concentração mínima bactericida (CMB) e concentração mínima fungicida (CMF), mg/mL) dos extratos hidroetanólicos das amostras de *B. vulgaris* L. estudadas (média ± DP, n=3).

Atividade antibacteriana	<i>B. vulgaris</i> cv. Albina Vereduna				<i>B. vulgaris</i> cv. Burpee's Golden				<i>B. vulgaris</i> cv. Pablo F1				<i>B. vulgaris</i> subsp. <i>cicla</i> var. <i>flavescens</i>				Controlos positivos				
	Folhas		Raízes		Folhas		Raízes		Folhas		Raízes		Folhas		Estreptomicina 1mg/mL		Meticilina 1mg/mL		Ampicilina 10mg/mL		
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	
Bactérias Gram-negativo																					
<i>Enterobacter Cloacae</i>	10	>10	10	>10	10	>10	10	>10	10	>10	10	>10	10	>10	0,007	0,007	nt	nt	0,15	0,15	
<i>Escherichia coli</i>	5	>10	10	>10	10	>10	10	>10	5	>10	10	>10	5	>10	0,01	0,01	nt	nt	0,15	0,15	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	0,06	0,06	nt	nt	0,63	0,63	
<i>Salmonella enterocolitica</i>	5	>10	5	>10	5	>10	>10	>10	10	>10	10	>10	5	>10	0,007	0,007	nt	nt	0,15	0,15	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1,25	>10	1,25	>10	2,5	>10	>10	>10	5	>10	5	>10	2,5	>10	0,007	0,007	nt	nt	0,15	0,15	
Bactérias Gram-positivo																					
<i>Bacillus cereus</i>	10	>10	>10	>10	5	>10	>10	>10	10	>10	2,5	>10	>10	>10	0,007	0,007	nt	nt	nt	nt	
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	>10	>10	>10	2,5	>10	5	>10	2,5	>10	5	>10	5	>10	0,007	0,007	nt	nt	0,15	0,15	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,6	>10	1,25	>10	2,5	>10	5	>10	5	>10	1,25	>10	0,6	>10	0,007	0,007	0,007	0,007	0,15	0,15	
Atividade antifúngica																Cetoconazol					
	CMI	CMI	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	-	-	-	-	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	>10	>10	5	>10	>10	>10	10	10	>10	10	>10	10	10	10	10	0,5	0,06	-	-	-	-
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	10	>10	5	>10	10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	1	0,125	-	-	-	-

nt – não testado.

5. CONCLUSÃO

A crescente conscientização sobre os efeitos benéficos de uma alimentação e estilo de vida mais saudáveis tem despertado o interesse da comunidade, o que se tem refletido numa maior preocupação com o bem-estar, qualidade de vida e, até mesmo, numa maior consciência ambiental. Nesse sentido, a avaliação da composição química e das propriedades biológicas dos alimentos é de extrema importância, uma vez que fornecem informações sobre a qualidade, segurança e benefícios do seu consumo, desempenhando um papel fundamental na promoção de escolhas alimentares mais saudáveis. No contexto dessa importância, a beterraba destaca-se por ser um alimento muito diverso e popularmente conhecido pela sua rica composição nutricional e propriedades medicinais. No entanto, para além das raízes, as folhas também são edíveis e apresentam elevado potencial nutricional e bioativo. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização proximal, química e bioativa de raízes e folhas de diferentes variedades de beterraba (*B. vulgaris* subsp. *vulgaris*), bem como de uma variedade da subespécie folhosa conhecida como acelga suíça (*B. vulgaris* subsp. *cicla*).

Nas raízes, os hidratos de carbono foram os principais macronutrientes encontrados, seguidos pelas fibras dietéticas, proteínas, cinzas e lípidos. Ao invés, nas folhas, de forma geral, as fibras foram os macronutrientes que se sobressaíram, com cinzas e proteínas a seguir. Entre todas as amostras estudadas, as raízes foram as que apresentaram o valor energético mais elevado, resultado assim em elevados teores de açúcares totais, sendo que a sacarose se destacou nas raízes comparativamente com as folhas. Além da sacarose, outros açúcares livres também puderam ser identificados nas amostras, tendo as raízes apresentado também a trealose, enquanto nas folhas, além dos dois açúcares já mencionados, também foram detetadas a presença de glucose e a frutose.

Também foram identificados um total de 6 ácidos orgânicos, presentes em todas as amostras: ácido oxálico, quínico, málico, cítrico e fumárico, estando o último presente apenas em vestígios. De maneira geral, as folhas também demonstraram maior conteúdo em ácidos orgânicos comparando com as raízes das beterrabas, sendo também responsáveis pelos maiores teores em ácido oxálico.

A avaliação do perfil em ácidos gordos permitiu identificar 21 compostos, dos quais os mais abundantes foram os ácidos linoleico (C18:2n6c), ácido α -linolénico (C18:3n3), ácido palmítico (C16:0) e ácido oleico (C18:1n9c). As amostras de folhas

apresentaram os maiores teores em PUFA, enquanto nas raízes prevaleceram os SFA. Com relação aos tocoferóis, as raízes apresentaram apenas a isoforma α -tocoferol, enquanto nas amostras de folhas foram diferenciadas as isoformas α , β e γ -tocoferol, com teores superiores quando comparadas com as raízes, especialmente influenciadas pela prevalência da isoforma α .

Em relação à identificação de compostos fenólicos, nas folhas foram identificados 19 no total, dos quais, a maior parte inclui derivados glicosilados de flavonoides como vitexina, isoramnetina e quercetina, além da presença de derivados de ácidos fenólicos, como os ácidos *p*-cumárico, sinápico e ferúlico, e da lignanas furofurano denominada medioresinol. Já nas raízes, foram detectados apenas derivados dos ácidos *p*-cumárico, sinápico, ferúlico e cafeico. A avaliação do conteúdo em betalaínas permitiu identificar estes compostos apenas nas amostras de folhas e raízes da cv. Pablo F1, de raiz da cv. Burpee's Golden e acelga suíça, sendo identificadas, no total, 7 betacianinas (betanina, isobetanina, neobetanina, decarboxi-betanina, decarboxi-isobetanina, decarboxi-neobetanina, feruloil-hexosil-(iso)betanina) e 1 betaxantina (miraxantina-V), sendo essa última encontrada apenas na acelga e na raiz da cv. Burpee's Golden (amarela).

Além disso, os resultados obtidos na avaliação das propriedades biológicas indicam que as folhas apresentam relevante atividade antioxidante, enquanto ambas as folhas e raízes apresentam capacidade antimicrobiana contra uma variedade de bactérias, tendo apenas uma amostra a capacidade de inibir os fungos testados. Nenhuma das amostras avaliadas apresentou citotoxicidade.

Em conclusão, as folhas destacaram-se em grande parte nos parâmetros avaliados, tendo as folhas de beterraba sobressaído em relação à acelga e também às suas respectivas raízes. Os resultados obtidos foram bastante promissores, pois permitiram fornecer e confirmar informações relevantes sobre a composição proximal, química e propriedades biológicas associadas à espécie *B. vulgaris*, bem como às variedades e partes avaliadas. Entretanto, também sugerem que, apesar de o consumo e as propriedades das raízes da beterraba e da acelga serem muito mais populares, as folhas de beterraba também podem ser consideradas como uma opção muito nutritiva a ser mais valorizada e introduzida na alimentação, pois podem contribuir para a diversificação alimentar, garantindo a ingestão de uma ampla gama de nutrientes essenciais e compostos bioativos que podem desempenhar ter benefícios para a saúde.

6. REFERÊNCIAS

- Abdi, F. A., Gemedo, H. F., e Olike Keyata, E. (2022). Nutritional Composition, Antinutrient Contents, and Polyphenol Compounds of Selected Underutilized and Some Commonly Consumed Vegetables in East Wollega, West Ethiopia. *Journal of Food Quality*, 2022, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2022/6942039>
- Abdo, E., El-Sohaimy, S. A., Shaltout, O., Abdalla, A., e Zeitoun, A. (2020). Nutritional Evaluation of Beetroots (*Beta vulgaris* L.) and Its Potential Application in a Functional Beverage. *Plants*, 9, 1752. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9121752>
- Abreu, R. M. V., Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R. C., Lima, R. T., Vasconcelos, M. H., Adegas, F., Chaves, R., e Queiroz, M. J. R. P. (2011). Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno[3,2-b]pyridine-2-carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 5800–5806. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2011.09.029>
- Adebiyi, J. A., Njobeh, P. B., e Kayitesi, E. (2019). Assessment of nutritional and phytochemical quality of Dawadawa (an African fermented condiment) produced from Bambara groundnut (*Vigna subterranea*). *Microchemical Journal*, 149, 104034. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2019.104034>
- Ahmadi, S., Soleimani-Zad, S., e Zaeim, D. (2020). Antibacterial and Antifungal Activity of the Aqueous and Methanolic Extracts and Essential Oils of Red Beets *Beta vulgaris* Leaves. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 22, e83725. <https://doi.org/10.5812/zjrms.83725>
- Amerikova, M., Pencheva El-Tibi, I., Maslarska, V., Bozhanov, S., e Tachkov, K. (2019). Antimicrobial activity, mechanism of action, and methods for stabilisation of defensins as new therapeutic agents. *Biotechnology e Biotechnological Equipment*, 33, 671–682. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1611385>
- Angelo, P. M., e Jorge, N. (2006). Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 66, 1–9.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., e Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*, 127, 183–198. <https://doi.org/10.1039/b009171p>

- AOAC. (2016). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (G. Latimer, Ed.).
- Apea-Bah, F. B., Li, X., e Beta, T. (2021). Phenolic composition and antioxidant properties of cooked rice dyed with sorghum-leaf bio-colorants. *Foods*, *10*, 2058. <https://doi.org/10.3390/FOODS10092058/S1>
- Arbex, A. K., Bizarro, V. R., Santos, J. C. S., Araújo, L. M. M., de Jesus, A. L. C., Fernandes, M. S. A., Salles, M. M., Rocha, D. R. T. W., e Marcadenti, A. (2015). The Impact of the Essential Fatty Acids (EFA) in Human Health. *Open Journal of Endocrine and Metabolic Diseases*, *05*, 98–104. <https://doi.org/10.4236/ojemd.2015.57013>
- Azeredo, H. M. C. (2009). Betalains: properties, sources, applications, and stability - a review. *International Journal of Food Science e Technology*, *44*, 2365–2376. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01668.x>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., e Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, *117*, 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Azzi, A. (2019). Tocopherols, tocotrienols and tocomonoenols: Many similar molecules but only one vitamin E. *Redox Biology*, *26*, 101259. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2019.101259>
- Babarykin, D., Smirnova, G., Pundinsh, I., Vasiljeva, S., Krumina, G., e Agejchenko, V. (2019). Red Beet (*Beta vulgaris*) Impact on Human Health. *Journal of Biosciences and Medicines*, *07*, 61–79. <https://doi.org/10.4236/jbm.2019.73007>
- Banwo, K., Olojede, A. O., Adesulu-Dahunsi, A. T., Verma, D. K., Thakur, M., Tripathy, S., Singh, S., Patel, A. R., Gupta, A. K., Aguilar, C. N., e Utama, G. L. (2021). Functional importance of bioactive compounds of foods with Potential Health Benefits: A review on recent trends. *Food Bioscience*, *43*, 101320. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101320>
- Barreira, J. C. M., Dias, M. I., Živković, J., Stojkovic, D., Soković, M., Santos-Buelga, C., e Ferreira, I. C. F. R. (2014). Phenolic profiling of *Veronica* spp. grown in

- mountain, urban and sandy soil environments. *Food Chemistry*, *163*, 275–283. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.04.117>
- Barros, L., Dueñas, M., Dias, M. I., Sousa, M. J., Santos-Buelga, C., e Ferreira, I. C. F. R. (2012). Phenolic profiles of in vivo and in vitro grown *Coriandrum sativum* L. *Food Chemistry*, *132*, 841–848. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.11.048>
- Barros, L., Pereira, C., e Ferreira, I. C. F. R. (2013). Optimized Analysis of Organic Acids in Edible Mushrooms from Portugal by Ultra Fast Liquid Chromatography and Photodiode Array Detection. *Food Analytical Methods*, *6*, 309–316. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9443-1>
- Bavec, M., Turinek, M., Grobelnik-Mlakar, S., Slatnar, A., e Bavec, F. (2010). Influence of Industrial and Alternative Farming Systems on Contents of Sugars, Organic Acids, Total Phenolic Content, and the Antioxidant Activity of Red Beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* Rote Kugel). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 11825–11831. <https://doi.org/10.1021/jf103085p>
- Ben Said, R., Hamed, A. I., Mahalel, U. A., Al-Ayed, A. S., Kowalczyk, M., Moldoch, J., Oleszek, W., e Stochmal, A. (2017). Tentative Characterization of Polyphenolic Compounds in the Male Flowers of *Phoenix dactylifera* by Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry and DFT. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*, 512. <https://doi.org/10.3390/ijms18030512>
- Blau, N., Duran, M., e Gibson, K. M. (2008). Laboratory guide to the methods in biochemical genetics. *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics*, 1–860. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-76698-8/COVER>
- Borjan, D., Šeregelj, V., Andrejč, D. C., Pezo, L., Šaponjac, V. T., Knez, Ž., Vulić, J., e Marevci, M. K. (2022). Green Techniques for Preparation of Red Beetroot Extracts with Enhanced Biological Potential. *Antioxidants* *2022*, *11*, 805. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11050805>
- Çalışkan, B., e Çalışkan, A. (2021). Antioxidant and Oxidative Stress. Em *Antioxidants - Benefits, Sources, Mechanisms of Action*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.96643>
- Carreón-Hidalgo, J. P., Franco-Vásquez, D. C., Gómez-Linton, D. R., e Pérez-Flores, L. J. (2022). Betalain plant sources, biosynthesis, extraction, stability enhancement

- methods, bioactivity, and applications. *Food Research International*, 151, 110821. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2021.110821>
- Chaari, M., Elhadef, K., Akermi, S., Hlima, H. Ben, Fourati, M., Chakchouk Mtibaa, A., Sarkar, T., Shariati, M. A., Rebezov, M., D'Amore, T., Mellouli, L., e Smaoui, S. (2022). Multiobjective response and chemometric approaches to enhance the phytochemicals and biological activities of beetroot leaves: an unexploited organic waste. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1, 1–15. <https://doi.org/10.1007/S13399-022-03645-0/FIGURES/7>
- Chahdoura, H., Barreira, J. C. M., Barros, L., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R., e Achour, L. (2015). Seeds of *Opuntia* spp. as a novel high potential by-product: Phytochemical characterization and antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 65, 383–389. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2014.11.011>
- Cheung, P. C. K., e Mehta, B. M. (Eds.). (2015). *Handbook of Food Chemistry*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-36605-5>
- Chhikara, N., Kushwaha, K., Sharma, P., Gat, Y., e Panghal, A. (2019). Bioactive compounds of beetroot and utilization in food processing industry: A critical review. *Food Chemistry*, 272, 192–200. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.08.022>
- Chin, Y.-W., Yoon, K.-D., Ahn, M.-J., e Kim, J.-W. (2010). Two New Phenylpropanoid Glycosides from the Aerial Parts of *Paederia scandens*. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 3, 1070–1072. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2010.31.04.1070>
- Chow, C. K. (2007). Fatty Acids in Foods and their Health Implications (3^o ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420006902>
- Cruz, T. M., Santos, J. S., do Carmo, M. A. V., Hellström, J., Pihlava, J. M., Azevedo, L., Granato, D., e Marques, M. B. (2021). Extraction optimization of bioactive compounds from ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) leaves and their in vitro antioxidant and antihemolytic activities. *Food Chemistry*, 361. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.130078>
- Cunha, A. L., Moura, K. S., Barbosa, J. C., e Dos Santos, A. F. (2016). Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. *Diversitas Journal*, 1, 175. <https://doi.org/10.17648/diversitas-journal-v1i2.332>

- Cust, A. E., Skilton, M. R., van Bakel, M. M. E., Halkjær, J., Olsen, A., Agnoli, C., Psaltopoulou, T., Buurma, E., Sonestedt, E., Chirilaque, M. D., Rinaldi, S., Tjønneland, A., Jensen, M. K., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M. C., Kaaks, R., Nöthlings, U., Chloptsios, Y., Zylis, D., Slimani, N. (2009). Total dietary carbohydrate, sugar, starch and fibre intakes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition*, *63*, S37–S60. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2009.74>
- Di Gioia, F., e Petropoulos, S. A. (2019). Phytoestrogens, phytosteroids and saponins in vegetables: Biosynthesis, functions, health effects and practical applications. *Advances in Food and Nutrition Research*, *90*, 351–421. <https://doi.org/10.1016/BS.AFNR.2019.02.004>
- Di Gioia, F., Renna, M., e Santamaria, P. (2017). Sprouts, Microgreens and “Baby Leaf” Vegetables. Em *Food Engineering Series*, 403–432. Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7018-6_11
- Ebrahimi, P., Mihaylova, D., Marangon, C. M., Grigoletto, L., e Lante, A. (2022). Impact of Sample Pretreatment and Extraction Methods on the Bioactive Compounds of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Leaves. *Molecules*, *27*, 8110. <https://doi.org/10.3390/molecules27228110>
- Edziri, H., Jaziri, R., Haddad, O., Anthonissen, R., Aouni, M., Mastouri, M., e Verschaeve, L. (2019). Phytochemical analysis, antioxidant, anticoagulant and in vitro toxicity and genotoxicity testing of methanolic and juice extracts of *Beta vulgaris* L. *South African Journal of Botany*, *126*, 170–175. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2019.01.017>
- Elmadfa, I., e Meyer, A. L. (2010). Importance of food composition data to nutrition and public health. *European Journal of Clinical Nutrition*, *64*, S4–S7. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.202>
- Escribano, J., Cabanes, J., Jiménez-Atiénzar, M., Ibañez-Tremolada, M., Gómez-Pando, L. R., García-Carmona, F., e Gandía-Herrero, F. (2017). Characterization of betalains, saponins and antioxidant power in differently colored quinoa (*Chenopodium quinoa*) varieties. *Food Chemistry*, *234*, 285–294. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.04.187>

- FAOSTAT. (2023). *Crops and livestock products - Sugar beet*.
<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Fernandes, Â., Barros, L., Antonio, A. L., Barreira, J. C. M., Oliveira, M. B. P. P., Martins, A., e Ferreira, I. C. F. R. (2014). Using Gamma Irradiation to Attenuate the Effects Caused by Drying or Freezing in *Macrolepiota procera* Organic Acids and Phenolic Compounds. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 3012–3021.
<https://doi.org/10.1007/s11947-013-1248-8>
- Ferreira, A. L. A., e Matsubara, L. S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 43, 61–68. <https://doi.org/10.1590/S0104-42301997000100014>
- Ferreres, F., Andrade, P. B., Valentão, P., e Gil-Izquierdo, A. (2008). Further knowledge on barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves O-glycosyl-C-glycosyl flavones by liquid chromatography-UV diode-array detection-electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1182, 56–64.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.12.070>
- Figueiredo, I. C. R., Jaime, P. C., e Monteiro, C. A. (2008). Fatores associados ao consumo de frutas, legumes e verduras em adultos da cidade de São Paulo. *Revista de Saúde Pública*, 42, 777–785. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102008005000049>
- Florin Danet, A. (2021). Recent Advances in Antioxidant Capacity Assays. Em *Antioxidants - Benefits, Sources, Mechanisms of Action*.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.96654>
- Freidig, A. K., e Goldman, I. L. (2011). Variation in Oxalic Acid Content among Commercial Table Beet Cultivars and Related Crops. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 136, 54–60.
<https://doi.org/10.21273/JASHS.136.1.54>
- Fu, Y., Shi, J., Xie, S.-Y., Zhang, T.-Y., Soladoye, O. P., e Aluko, R. E. (2020). Red Beetroot Betalains: Perspectives on Extraction, Processing, and Potential Health Benefits. *J. Agric. Food Chem*, 68, 11595–11611.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04241>

- Garzón, G. A., Narváez-Cuenca, C. E., Vincken, J. P., e Gruppen, H. (2017). Polyphenolic composition and antioxidant activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) from Colombia. *Food Chemistry*, 217, 364–372. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.08.107>
- Gawlik-Dziki, U., Dziki, L., Anisiewicz, J., Habza-Kowalska, E., Sikora, M., e Dziki, D. (2020). Leaves of White Beetroot As a New Source of Antioxidant and Anti-Inflammatory Compounds. *Plants*, 9, 944. <https://doi.org/10.3390/plants9080944>
- Gengatharan, A., Dykes, G. A., e Choo, W. S. (2015). Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. *LWT - Food Science and Technology*, 64, 645–649. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2015.06.052>
- Gennari, L., Felletti, M., Blasa, M., Angelino, D., Celeghini, C., Corallini, A., e Ninfali, P. (2011). Total extract of *Beta Vulgaris* var. *Cicla* seeds versus its purified phenolic components: antioxidant activities and antiproliferative effects against colon cancer cells. *Phytochemical Analysis*, 22, 272–279. <https://doi.org/10.1002/pca.1276>
- Geris, R., Dos Santos, N. A. C., Amaral, B. A., Maia, I. D. S., Castro, V. D., e Carvalho, J. R. M. (2007). Biodiesel de soja: reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. *Química Nova*, 30, 1369–1373. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000500053>
- Ghani, M. A., Barril, C., Bedgood, D. R., e Prenzler, P. D. (2017). Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chemistry*, 230, 195–207. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.127>
- Goldman, I. L., e Janick, J. (2021). Evolution of Root Morphology in Table Beet: Historical and Iconographic. *Frontiers in Plant Science*, 12, 689926. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.689926/BIBTEX>
- Gouveia, S., e Castilho, P. C. (2011). Characterisation of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of *Helichrysum obconicum* by a RP-HPLC–DAD(–)–ESI–MSn method. *Food Chemistry*, 129, 333–344. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.078>
- Gruska, R. M., Baryga, A., Kunicka-Styczyńska, A., Brzeziński, S., Rosicka-Kaczmarek, J., Miśkiewicz, K., e Sumińska, T. (2022). Fresh and Stored Sugar Beet Roots as a

- Source of Various Types of Mono- and Oligosaccharides. *Molecules*, 27, 5125. <https://doi.org/10.3390/molecules27165125>
- Hegazi, N. M., Radwan, R. A., Bakry, S. M., e Saad, H. H. (2020). Molecular networking aided metabolomic profiling of beet leaves using three extraction solvents and in relation to its anti-obesity effects. *Journal of Advanced Research*, 24, 545–555. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.06.001>
- Heleno, S. A., Ferreira, I. C. F. R., Esteves, A. P., Ćirić, A., Glamočlija, J., Martins, A., Soković, M., e Queiroz, M. J. R. P. (2013). Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, *p*-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. *Food and Chemical Toxicology*, 58, 95–100. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2013.04.025>
- Herbach, K. M., Stintzing, F. C., e Carle, R. (2004). Impact of Thermal Treatment on Color and Pigment Pattern of Red Beet (*Beta vulgaris* L.) Preparations. *Journal of Food Science*, 69, C491–C498. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2004.TB10994.X>
- Hossain, M. B., Rai, D. K., Brunton, N. P., Martin-Diana, A. B., e Barry-Ryan, C. (2010). Characterization of Phenolic Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10576–10581. <https://doi.org/10.1021/jf102042g>
- Joana Gil-Chávez, G., Villa, J. A., Fernando Ayala-Zavala, J., Basilio Heredia, J., Sepulveda, D., Yahia, E. M., e González-Aguilar, G. A. (2013). Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12, 5–23. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12005>
- Khameneh, B., Iranshahy, M., Soheili, V., e Fazly Bazzaz, B. S. (2019). Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8, 118. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0559-6>
- Kohajdová, Z., Karovičová, J., Kuchtová, V., e Lauková, M. (2018). Utilisation of beetroot powder for bakery applications. *Chemical Papers*, 72, 1507–1515. <https://doi.org/10.1007/s11696-018-0392-z>

- Koolen, H. H. F., Da Silva, F. M. A., Gozzo, F. C., De Souza, A. Q. L., e De Souza, A. D. L. (2013). Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC-ESI-MS/MS. *Food Research International*, 51, 467–473. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.039>
- Kowalski, I. S. G., Ferrari, C. M. M., Dos Santos Pito Alexandre, L. B., Ohara, E. C. C., e Nunes, M. I. (2020). Risk factors for chronic noncommunicable diseases in users of two Basic Health Units in the city of São Paulo, Brazil. *Mundo da Saude*, 44, 76–83. <https://doi.org/10.15343/0104-7809.202044076083>
- Kugler, F., Graneis, S., Stintzing, F. C., e Carle, R. (2007). Studies on betaxanthin profiles of vegetables and fruits from the Chenopodiaceae and Cactaceae. *Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 62, 311–318. <https://doi.org/10.1515/ZNC-2007-5-601/PDF>
- Lazăr, S., Constantin, O. E., Stănciuc, N., Aprodu, I., Croitoru, C., e Râpeanu, G. (2021). Optimization of Betalain Pigments Extraction Using Beetroot by-Products as a Valuable Source. *Inventions* 2021, 6, 50. <https://doi.org/10.3390/INVENTIONS6030050>
- Llorent-Martínez, E. J., Gouveia, S., e Castilho, P. C. (2015). Analysis of phenolic compounds in leaves from endemic trees from Madeira Island. A contribution to the chemotaxonomy of Laurisilva forest species. *Industrial Crops and Products*, 64, 135–151. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2014.10.068>
- Llorent-Martinez, E. J., Spinola, V., Gouveia, S., e Castilho, P. C. (2015). HPLC-ESI-MSn characterization of phenolic compounds, terpenoid saponins, and other minor compounds in *Bituminaria bituminosa*. *Industrial Crops and Products*, 69, 80–90. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2015.02.014>
- Lockowandt, L., Pinela, J., Roriz, C. L., Pereira, C., Abreu, R. M. V., Calhella, R. C., Alves, M. J., Barros, L., Bredol, M., e Ferreira, I. C. F. R. (2019). Chemical features and bioactivities of cornflower (*Centaurea cyanus* L.) capitula: The blue flowers and the unexplored non-edible part. *Industrial Crops and Products*, 128, 496–503. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2018.11.059>

- Lucky, A. R., Al-Mamun, A., Hosen, A., Toma, M. A., e Mazumder, M. A. R. (2020). Nutritional and sensory quality assessment of plain cake enriched with beetroot powder. *Food Research*, 4, 2049–2053. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.4\(6\).268](https://doi.org/10.26656/fr.2017.4(6).268)
- Mata, A., Ferreira, J. P., Semedo, C., Serra, T., Duarte, C. M. M., e Bronze, M. R. (2016). Contribution to the characterization of *Opuntia* spp. juices by LC-DAD-ESI-MS/MS. *Food Chemistry*, 210, 558–565. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.033>
- Maurino, V. G., Martinoia, E., Zürich, U., Teresa Sanchez-Ballesta, S. M., Igamberdiev, A. U., e Eprintsev, A. T. (2016). Organic Acids: The Pools of Fixed Carbon Involved in Redox Regulation and Energy Balance in Higher Plants. *Front. Plant Sci*, 7, 1042. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01042>
- Mehta, B. M., e Cheung, P. C. K. (2015). Overview of Food Chemistry. Em *Handbook of Food Chemistry*, 3–13. Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-36605-5_34
- Mello, V. D. de, e Laaksonen, D. E. (2009). Fibras na dieta: tendências atuais e benefícios à saúde na síndrome metabólica e no diabetes melito tipo 2. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 53, 509–518. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302009000500004>
- Mirmiran, P., Houshialsadat, Z., Gaeini, Z., Bahadoran, Z., e Azizi, F. (2020). Functional properties of beetroot (*Beta vulgaris*) in management of cardio-metabolic diseases. *Nutrition and Metabolism*, 17, 1–15. <https://doi.org/10.1186/S12986-019-0421-0/FIGURES/2>
- M'rabet, Y., Rokbeni, N., Cluzet, S., Boulila, A., Richard, T., Krisa, S., Marzouki, L., Casabianca, H., e Hosni, K. (2017). Profiling of phenolic compounds and antioxidant activity of *Melia azedarach* L. leaves and fruits at two stages of maturity. *Industrial Crops and Products*, 107, 232–243. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2017.05.048>
- Mzoughi, Z., Chahdoura, H., Chakroun, Y., Cámara, M., Fernández-Ruiz, V., Morales, P., Mosbah, H., Flamini, G., Snoussi, M., e Majdoub, H. (2019). Wild edible Swiss chard leaves (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*): Nutritional, phytochemical composition

- and biological activities. *Food Research International*, 119, 612–621.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.10.039>
- Nelson, D. L., e Cox, M. M. (2014). *Princípios de Bioquímica de Lehninger*.
- Nguyen, T. K. O., Jamali, A., Grand, E., Morreel, K., Marcelo, P., Gontier, E., e Dauwe, R. (2017). Phenylpropanoid profiling reveals a class of hydroxycinnamoyl glucaric acid conjugates in *Isatis tinctoria* leaves. *Phytochemistry*, 144, 127–140.
<https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2017.09.007>
- Nguyen, T. L. A., e Bhattacharya, D. (2022). Antimicrobial Activity of Quercetin: An Approach to Its Mechanistic Principle. *Molecules*, 27, 2494.
<https://doi.org/10.3390/molecules27082494>
- Nikan, M., e Manayi, A. (2019). *Beta vulgaris* L. Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements, 153–158. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812491-8.00021-7>
- Ninfali, P., e Angelino, D. (2013). Nutritional and functional potential of *Beta vulgaris cicla* and *rubra*. *Fitoterapia*, 89, 188–199.
<https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2013.06.004>
- NTNU. (2023). *Beta vulgaris subsp. cicla* - Mangold, Chard, Spinach beet | Ringve Botanical Garden - NTNU University Museum, Trondheim, Norway.
<https://ringve.gardenexplorer.org/taxon-14863.aspx>
- Nyau, V., Prakash, S., Rodrigues, J., e Farrant, J. (2015). Identification of Nutraceutical Phenolic Compounds in Bambara Groundnuts (*Vigna subterranea* L. Verdc) by HPLC-PDA-ESI-MS. *British Journal of Applied Science e Technology*, 6, 77–85.
<https://doi.org/10.9734/BJAST/2015/14780>
- Ozarowski, M., Mikolajczak, P. L., Bogacz, A., Gryszczynska, A., Kujawska, M., Jodynis-Liebert, J., Piasecka, A., Napieczynska, H., Szulc, M., Kujawski, R., Bartkowiak-Wieczorek, J., Cichocka, J., Bobkiewicz-Kozłowska, T., Czerny, B., e Mrozikiewicz, P. M. (2013). *Rosmarinus officinalis* L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain. *Fitoterapia*, 91, 261–271.
<https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2013.09.012>

- Ozogul, F., Houicher, A., Hatab, S. R., Gonelimali, F. D., Lin, J., Miao, W., Xuan, J., Charles, F., e Chen, M. (2018). Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1639. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01639>
- Pereira, O. R., Silva, A. M. S., Domingues, M. R. M., e Cardoso, S. M. (2012). Identification of phenolic constituents of *Cytisus multiflorus*. *Food Chemistry*, 131, 652–659. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.045>
- Pires, T. C. S. P., Dias, M. I., Barros, L., Calhelha, R. C., Alves, M. J., Oliveira, M. B. P. P., Santos-Buelga, C., e Ferreira, I. C. F. R. (2018). Edible flowers as sources of phenolic compounds with bioactive potential. *Food Research International*, 105, 580–588. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2017.11.014>
- Platosz, N., Sawicki, T., e Wiczowski, W. (2020). Profile of Phenolic Acids and Flavonoids of Red Beet and Its Fermentation Products. Does Long-Term Consumption of Fermented Beetroot Juice Affect Phenolics Profile in Human Blood Plasma and Urine? *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 70, 55–65. <https://doi.org/10.31883/PJFNS/116613>
- Prieto, M. A., e Vázquez, J. A. (2014). A Time-Dose Model to Quantify the Antioxidant Responses of the Oxidative Hemolysis Inhibition Assay (OxHLIA) and Its Extension to Evaluate Other Hemolytic Effectors. *BioMed Research International*, 2014, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2014/632971>
- Punia Bangar, S., Sharma, N., Sanwal, N., Lorenzo, J. M., e Sahu, J. K. (2022). Bioactive potential of beetroot (*Beta vulgaris*). *Food Research International*, 158, 111556. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2022.111556>
- Raymond, J. L., Scott-Stump, S., e Mahan, L. K. (2013). *Krause - Alimentos, Nutrição e Dietoterapia* (Elsevier, Ed.; 13.^a ed.).
- Rey, A. I., Hopia, A., Kivikari, R., e Kahkonen, M. (2005). Use of natural food/plant extracts: cloudberry (*Rubus Chamaemorus*), beetroot (*Beta Vulgaris* “Vulgaris”) or willow herb (*Epilobium angustifolium*) to reduce lipid oxidation of cooked pork patties. *LWT - Food Science and Technology*, 38, 363–370. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.06.010>

- Roriz, C. L., Heleno, S. A., Carocho, M., Rodrigues, P., Pinela, J., Dias, M. I., Fernandes, I. P., Barreiro, M. F., Morales, P., Barros, L., e Ferreira, I. C. F. R. (2020). Betacyanins from *Gomphrena globosa* L. flowers: Incorporation in cookies as natural colouring agents. *Food Chemistry*, 329, 127178. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.127178>
- Sagardoy, R., Morales, F., Rellán-Álvarez, R., Abadía, A., Abadía, J., e López-Millán, A. F. (2011). Carboxylate metabolism in sugar beet plants grown with excess Zn. *Journal of Plant Physiology*, 168, 730–733. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.10.012>
- Sakalem, M. E., Negri, G., e Tabach, R. (2012). Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22, 1219–1232. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000108>
- Salamatullah, A. M., Hayat, K., Alkaltham, M. S., Ahmed, M. A., Arzoo, S., Husain, F. M., Al-Dossari, A. M., Shamlan, G., e Al-Harbi, L. N. (2021). Bioactive and Antimicrobial Properties of Oven-Dried Beetroot (Pulp and Peel) Using Different Solvents. *Processes*, 9, 588. <https://doi.org/10.3390/pr9040588>
- Samuolienė, G., Viršilė, A., Brazaitytė, A., Jankauskienė, J., Sakalauskienė, S., Vaštakaitė, V., Novičkovas, A., Viškelienė, A., Sasnauskas, A., e Duchovskis, P. (2017). Blue light dosage affects carotenoids and tocopherols in microgreens. *Food Chemistry*, 228, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.144>
- Santos, J., Mendiola, J. A., Oliveira, M. B. P. P., Ibáñez, E., e Herrero, M. (2012). Sequential determination of fat- and water-soluble vitamins in green leafy vegetables during storage. *Journal of Chromatography A*, 1261, 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.067>
- Sarmiento, A., Barros, L., Fernandes, Â., Carvalho, A. M., e Ferreira, I. C. F. R. (2015). Valorization of traditional foods: nutritional and bioactive properties of *Cicer arietinum* L. and *Lathyrus sativus* L. pulses. *Journal of the science of food and agriculture*, 95, 179–185. <https://doi.org/10.1002/JSFA.6702>
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K., e Latha, L. (2010). Extraction, Isolation And Characterization Of Bioactive Compounds From Plants' Extracts.

- African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8, 1–10.
<https://doi.org/10.4314/ajtcam.v8i1.60483>
- Sawicki, T., Ba, N., e Wiczowski, W. (2016). Betalain profile, content and antioxidant capacity of red beetroot dependent on the genotype and root part. *Journal of Functional Foods*, 27, 249–261. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.09.004>
- Schliemann, W., Kobayashi, N., e Strack, D. (1999). The Decisive Step in Betaxanthin Biosynthesis Is a Spontaneous Reaction1. *Plant Physiology*, 119, 1217–1232. <https://doi.org/10.1104/pp.119.4.1217>
- Simirgiotis, M. J., Caligari, P. D. S., e Schmeda-Hirschmann, G. (2009). Identification of phenolic compounds from the fruits of the mountain papaya *Vasconcellea pubescens* A. DC. grown in Chile by liquid chromatography–UV detection–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 115, 775–784. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.12.071>
- Slatnar, A., Stampar, F., Veberic, R., e Jakopic, J. (2015). HPLC-MSn Identification of Betalain Profile of Different Beetroot (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) Parts and Cultivars. *Journal of Food Science*, 80, 1952–1958. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12977>
- Spínola, V., Pinto, J., e Castilho, P. C. (2015). Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD–ESI-MSn and screening for their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 173, 14–30. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.09.163>
- Spréa, R. M., Fernandes, Â., Calhelha, R. C., Pereira, C., Pires, T. C. S. P., Alves, M. J., Canan, C., Barros, L., Amaral, J. S., e Ferreira, I. C. F. R. (2020). Chemical and bioactive characterization of the aromatic plant *Levisticum officinale* W.D.J. Koch: a comprehensive study. *Food e Function*, 11, 1292–1303. <https://doi.org/10.1039/C9FO02841B>
- Stuiver, C. E. E., Kuiper, P. J. C., e Marschner, H. (1978). Lipids from Bean, Barley and Sugar Beet in Relation to Salt Resistance. *Physiologia Plantarum*, 42, 124–128. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1978.tb01551.x>

- Sun, J., Liu, X., Yang, T., Slovin, J., e Chen, P. (2014). Profiling polyphenols of two diploid strawberry (*Fragaria vesca*) inbred lines using UHPLC-HRMSn. *Food Chemistry*, *146*, 289–298. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.08.089>
- Takebayashi, J., Chen, J., e Tai, A. (2010). A Method for Evaluation of Antioxidant Activity Based on Inhibition of Free Radical-Induced Erythrocyte Hemolysis. *Methods in Molecular Biology*, *594*, 287–296. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_20
- Timoneda, A., Feng, T., Sheehan, H., Walker-Hale, N., Pucker, B., Lopez-Nieves, S., Guo, R., e Brockington, S. (2019). The evolution of betalain biosynthesis in Caryophyllales. *New Phytologist*, *224*, 71–85. <https://doi.org/10.1111/NPH.15980>
- Tsamo, A. T., Ndibewu, P. P., e Dakora, F. D. (2018). Phytochemical profile of seeds from 21 Bambara groundnut landraces via UPLC-qTOF-MS. *Food Research International*, *112*, 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.028>
- Vasconcelos, S. M. L., Goulart, M. O. F., Moura, J. B. de F., Manfredini, V., Benfato, M. da S., e Kubota, L. T. (2007). Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, *30*, 1323–1338. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000500046>
- Vissers, A., Kiskini, A., Hilgers, R., Marinea, M., Wierenga, P. A., Gruppen, H., e Vincken, J. P. (2017). Enzymatic Browning in Sugar Beet Leaves (*Beta vulgaris* L.): Influence of Caffeic Acid Derivatives, Oxidative Coupling, and Coupled Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*, 4911–4920. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.7B01897/SUPPL_FILE/JF7B01897_SI_001.PDF
- Voragen, A. G. J. (1998). Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trends in Food Science e Technology*, *9*, 328–335. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00059-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00059-4)
- Vulić, J. J., Čebović, T. N., Čanadanović, V. M., Četković, G. S., Djilas, S. M., Čanadanović-Brunet, J. M., Velićanski, A. S., Cvetković, D. D., e Tumbas, V. T. (2013). Antiradical, antimicrobial and cytotoxic activities of commercial beetroot pomace. *Food e Function*, *4*, 713. <https://doi.org/10.1039/c3fo30315b>

- Walker, J. F., Yang, Y., Feng, T., Timoneda, A., Mikenas, J., Hutchison, V., Edwards, C., Wang, N., Ahluwalia, S., Olivieri, J., Walker-Hale, N., Majure, L. C., Puente, R., Kadereit, G., Lauterbach, M., Eggli, U., Flores-Olvera, H., Ochoterena, H., Brockington, S. F., Moore, M. J., Smith, S. A. (2018). From cacti to carnivores: Improved phylotranscriptomic sampling and hierarchical homology inference provide further insight into the evolution of Caryophyllales. *American Journal of Botany*, *105*, 446–462. <https://doi.org/10.1002/AJB2.1069>
- Walker, R. P., e Famiani, F. (2018). Organic Acids in Fruits: Metabolism, Functions and Contents. Em *Horticultural Reviews*, 371–430. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119431077.ch8>
- WHO. (2022). *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2022*. <https://www.who.int/publications/book-orders>.
- WHO. (2023). *World Health Statistics 2023*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240074323>
- Wijngaard, H., Hossain, M. B., Rai, D. K., e Brunton, N. (2012). Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Research International*, *46*, 505–513. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.027>
- Wruss, J., Waldenberger, G., Huemer, S., Uygun, P., Lanzerstorfer, P., Müller, U., Höglinger, O., e Weghuber, J. (2015). Compositional characteristics of commercial beetroot products and beetroot juice prepared from seven beetroot varieties grown in Upper Austria. *Journal of Food Composition and Analysis*, *42*, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.03.005>
- Xiao, Z., Lester, G. E., Luo, Y., e Wang, Q. (2012). Assessment of Vitamin and Carotenoid Concentrations of Emerging Food Products: Edible Microgreens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 7644–7651. <https://doi.org/10.1021/jf300459b>
- Yan, Y., Li, X., Zhang, C., Lv, L., Gao, B., e Li, M. (2021). Research Progress on Antibacterial Activities and Mechanisms of Natural Alkaloids: A Review. *Antibiotics*, *10*, 318. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030318>
- Yuan, G., Guan, Y., Yi, H., Lai, S., Sun, Y., e Cao, S. (2021). Antibacterial activity and mechanism of plant flavonoids to gram-positive bacteria predicted from their

lipophilicities. *Scientific Reports*, *11*, 10471. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90035-7>

Zeb, A., e Imran, M. (2019). Carotenoids, pigments, phenolic composition and antioxidant activity of *Oxalis corniculata* leaves. *Food Bioscience*, *32*, 100472. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100472>

Zeinab, S., Mohammad, A. &, e Khan, A. (2021). The Effect of Beetroot (*Beta vulgaris* L.) Leaves Powder on Nutritional, Textural, Sensorial and Antioxidant Properties of Cookies. *Journal of Culinary Science e Technology*, *19*, 424–438. <https://doi.org/10.1080/15428052.2020.1787285>

Zhang, C., Ren, B., Lin, Z., Tong, L., Wang, H., e Chen, S. (2015). An analysis method for simultaneous screening of deoxyribonucleic acid-binding active compounds and investigating their mechanisms by ultra-fast liquid chromatography tandem mass spectrometry coupled with fluorescence detection technology. *Journal of Chromatography A*, *1381*, 160–172. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2015.01.019>