Ministério da Educação

Universidade Federal de Pelotas

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

Curso de Bacharelado em Química

Trabalho de Conclusão de Curso

Caracterização Elementar e Avaliação das Propriedades Bioativas em Amostras de Microgreens e Vegetais Crescidos por Técnicas Espectrométricas

Yasmin Ribeiro Bloedorn

Pelotas, 2022

Yasmin Ribeiro Bloedorn

Caracterização Elementar e Avaliação das Propriedades Bioativas em Amostras de Microgreens e Vegetais Crescidos por Técnicas Espectrométricas

Monografia apresentada referente ao curso de Bacharelado em Química da Universidade Federal de Pelotas, com requisito para à obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientadora: Profª. Drª. Adriane Medeiros Nunes

Pelotas, 2022

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a monografia de conclusão de curso com obtenção do grau de Bacharel em Química pela Universidade Federal de Pelotas

Caracterização Elementar e Avaliação das Propriedades Bioativas em Amostras de Microgreens e Vegetais Crescidos por Técnicas Espectrométricas

Elaborado por

Yasmin Ribeiro Bloedorn

Data da defesa: 28/11/2022

Comissão examinadora:

ADRIANE M. NUNES

Profª. Drª. Adriane Medeiros Nunes (Orientadora)

Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Mariana A. Vieira

Profª. Drª. Mariana Antunes Vieira

Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Wiliam Boschetti

Prof. Dr. Wiliam Boschetti (Convidado)

Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

AGRADECIMENTO

Gostaria de agradecer primeiramente a minha família, em especial aos meus pais, Luciane e Ricardo e minhas irmãs, Ketlyn e Kaylla por todo o suporte durante a graduação. Pelo incentivo de nunca deixarem desistir, sendo a base necessária e sempre me apoiando em cada passo que eu escolhi seguir.

Aos meus colegas e amigos, em especial a Daisa, Charlie, Sabrina e Jéssica que em pouco tempo se tornaram pessoas muito importantes pra mim, pessoas que, cada um de sua maneira, fizeram diferença para a minha formação. Proporcionando- me todo o suporte necessário em todas as etapas da minha iniciação científica e do meu desenvolvimento acadêmico.

A Daisa, por sempre buscar o melhor e estar disposta a ajudar da melhor maneira possível, por todo conhecimento transmitido ao longo desse tempo, por me ajudar nesses últimos meses de correria quebrando a cabeça comigo para fazer tudo funcionar no final. Obrigada chefe!

Ao Charlie, por todo esse tempo sempre me ajudando no que fosse preciso, pela paciência e todo conhecimento compartilhado, aguentando o desespero desses últimos meses também.

A Sabrina, que mesmo convivendo por pouco tempo me auxiliou e proporcionou todo o suporte necessário na parte inicial do meu trabalho.

A Jéssica, que desde que chegou sempre procurou me ajudar da melhor maneira possível e pela convivência.

Aos meus colegas e amigos do LabMeQui, Kaiane, Miguel, Nicolle e Mariana por todas as conversas e risadas, por todos os momentos de convivência que tornam os dias melhores.

Em especial, a Kaiane que se tornou minha melhor amiga para todas as horas e para todos os momentos, onde passamos por toda essa etapa das nossas vidas juntas, estando sempre presente na minha vida.

A minha orientadora Profa. Dra. Adriane Medeiros Nunes pela oportunidade de realização deste trabalho, por toda confiança e responsabilidade que me foi depositada durante esse período de iniciação científica.

A Universidade Federal de Pelotas e aos órgãos de fomento por todo o suporte financeiro.

Gostaria de agradecer todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse concluído, desde o meu desenvolvimento até a minha formação acadêmica. Muito obrigada!

BLOEDORN, Yasmin Ribeiro. **Caracterização Elementar e Avaliação das Propriedades Bioativas em Amostras de Microgreens e Vegetais Crescidos por Técnicas Espectrométricas**. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Bacharelado em Química) – Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

RESUMO

A constante busca por parte dos consumidores por produtos alimentícios que propiciem maior longevidade vem sendo maior ao longo dos anos. Desta forma, o consumo de alimentos funcionais e nutracêuticos vem crescendo a cada ano por proporcionarem diversos benefícios à saúde. Os microgreens são considerados vegetais nutritivos devido ao seu alto teor de minerais, bem como a presença de compostos bioativos em sua composição. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo a quantificação elementar de Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn, em amostras de microgreens e seus correspondentes crescidos por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Micro-ondas. O desenvolvimento da etapa de preparo de amostra foi realizado através de uma otimização multivariada. Desta forma, a partir do planejamento experimental se obteve a condição ótima de trabalho proposta para todos os analitos, sendo utilizado 0,5 g de amostra na presença de 14 mL de HNO_3 (1 mol L^{-1}), a mistura foi encaminhada para o banho ultrassônico por 10 minutos a 60°C. A exatidão do método proposto foi avaliada através do uso de Materiais de Referência Certificados e recuperações que variaram de 81 a 113%. Ademais, valores de desvio padrão relativos inferiores a 10% foram obtidos. A fim de complementar a avaliação destes alimentos foram realizadas determinações referentes ao seu perfil bioativo. Sendo que, os compostos fenólicos e a atividade antioxidante foram encontrados em altas concentrações para as amostras analisadas, obtendo destaque para os microgreens nas duas determinações, as quais apresentaram maiores concentrações. O teor de clorofila nas amostras apresentou concentrações superiores para os vegetais crescidos na comparação com os microgreens, o que já era previsto devido ao desenvolvimento e a intensidade da coloração desses alimentos. A partir deste estudo foi possível verificar que o método proposto para a determinação de metais se apresentou simples, de baixo custo e com boa frequência analítica, podendo ser utilizado para análises de rotina para a determinação das concentrações dos analitos de interesse nas amostras analisadas. Também, o presente trabalho possibilitou verificar a partir da quantificação dos compostos bioativos nas amostras, que os microgreens e seus correspondentes crescidos, são considerados uma excelente fonte de compostos fenólicos, possuindo um alto poder antioxidante que auxilia nas atividades essenciais da célula assim como seu processo de envelhecimento, resultando em que uma alimentação baseada nesses alimentos proporciona diversos benefícios à saúde, assim como na prevenção de doenças crônicas e degenerativas. Sendo alimentos considerados uma fonte densa de nutrientes essenciais para a manutenção do organismo, assim como na suplementação da alimentação humana.

Palavras-chave: Microgreens, Vegetais, Ultrassom, Planejamento experimental, Compostos Bioativos, MIP OES, UV-*Vis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Amostra de Microgreens de diferentes espécies.....	17
Figura 2	Processo de germinação dos Microgreens.....	18
Figura 3	Subdivisão de compostos bioativos presente em alimentos de origem vegetal.....	21
Figura 4	Estrutura química dos principais compostos fenólicos.....	21
Figura 5	Reação de redução do molibdênio, componente presente no reagente Folin-Ciocalteu pelo ácido gálico.....	23
Figura 6	Fontes e respostas foliares proveniente da atuação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN).....	24
Figura 7	Molécula de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (radical DPPH).....	25
Figura 8	Redução do radical DPPH pelo antioxidante.....	26
Figura 9	Estrutura química da clorofila *a* e *b*.....	28
Figura 10	Fenômeno de cavitação do banho ultrassônico.....	32
Figura 11	Principais componentes do MIP OES.....	39
Figura 12	Sistema de introdução de amostras de modo convencional.....	39
Figura 13	Diagrama esquemático do espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.....	40
Figura 14	Instrumentação do espectrômetro UV-*Vis*.....	41
Figura 15	Diagrama esquemático de um instrumento espectroscópico.....	41
Figura 16	Gráfico de Pareto com efeitos estimados obtidos a partir da desejabilidade global.....	53
Figura 17	Gráfico de superfície de resposta gerado a partir da desejabilidade global.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Informações sobre os Microgreens.....	16
Tabela 2	Exemplificação DoE.....	35
Tabela 3	Variáveis e níveis estudados no planejamento multivariado para a otimização das condições de extração.....	47
Tabela 4	Parâmetros de mérito para elementos de interesse obtidos a partir das leituras por MIP OES.....	50
Tabela 5	Variáveis do planejamento multivariado e respostas obtidas expressas em intensidade e suas desejabilidades globais....	52
Tabela 6	Resultados analíticos obtidos a partir da determinação de Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn por MIP OES para diferentes CRMs.....	55
Tabela 7	Determinação elementar em amostras de microgreens e seus correspondentes crescidos por MIP OES.....	57
Tabela 8	Conteúdo dos Compostos fenólicos totais obtidos a partir dos microgreens e seus correspondentes crescidos.....	60
Tabela 9	Atividade antioxidante em amostras de microgreens e seus correspondentes crescidos.....	61
Tabela 10	Porcentagem de inibição frente ao radical DPPH.....	62
Tabela 11	Determinação do teor de clorofila presente em amostras de microgreens e seus correspondentes crescidos.....	63

SIGLAS E ABREVIAÇÕES

ANOVA	Análise de variância, do inglês “Analysis of variance”
Ch’a	Clorofila *a*
Ch’b	Clorofila *b*
Ch’Total	Clorofila Total
CRM	Material de Referência Certificado, do inglês “Certified Reference Materials”
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional, do inglês “Central Composite Rotational Design”
DoE	Planejamento de Experimentos, do inglês “Design of Experiments”
DPPH	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
F AAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Chama, do inglês “Flame Atomic Absorption Spectrometry”
GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Forno Grafite, do inglês “Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry”
ICP MS	Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês “Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry”
ICP OES	Espectrometria de Emissão Ópticacom Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês “Inductively Coupled Plasma Optical EmissionSpectrometry””
IDR	Índice de Diário Recomendado
LOD(m)	Limite de Detecção
LOQ(m)	Limite de Quantificação
MIP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido

	por Micro-ondas, do inglês “Microwave Induced Plasma Optical Emission Spectrometry”
MSR	Metodologia de superfície de resposta, do inglês “Response Surface Methodology”
SD	Desvio Padrão
UV-V*is*	Espectrofotometria de Absorção na região do Ultravioleta e do Visível, do inglês “Ultraviolet-visible-near infrared Spectrophotometry”

SUMÁRIO

1. Introdução..... 13
2. Revisão Bibliográfica..... 15
2.1. Dietas Alimentares..... **15**
2.2. Composição dos Microgreens..... **16**
2.3. Elementos Essenciais..... **18**
2.4. Compostos Fenólicos..... **20**
2.5. Atividade Antioxidante..... **23**
2.6. Clorofila..... **27**
2.7. Preparo de Amostras..... **29**
2.8. Extração assistida por Ultrassom..... **30**
2.9. Planejamento Experimental **33**
2.9.1. Planejamento Fatorial Completo..... **35**
2.10. Técnicas Espectrométricas..... **37**
2.10.1. Espectrometria de Emissão óptica com plasma Induzido por Micro-ondas (MIP OES)..... **38**
2.10.2. Espectrofotometria de Absorção Molecular (UV - V*is*)..... **40**
3. Objetivos..... 43
3.1. Objetivo Geral..... **43**
3.2. Objetivos Específicos..... **43**
4. Materiais e Métodos..... 44
4.1. Instrumentação..... **44**
4.2. Reagentes e Padrões..... **44**
4.3. Amostras..... **46**
4.4. Otimização das Condições de Extração dos Metais..... **46**
4.5. Condições Experimentais..... **47**
4.5.1. Extração dos Metais..... **47**
4.5.2. Extração dos Compostos Bioativos..... **47**
4.5.3. Determinação dos Compostos Fenólicos Totais..... **48**

4.5.4. Determinação da Atividade Antioxidante..... **48**
4.5.5. Determinação do Teor de Clorofila..... **49**
5. Resultados e Discussão..... 49
5.1. Parâmetros de Mérito..... **49**
5.2. Otimização Multivariada das Condições de trabalho..... **51**
5.3. Avaliação da Exatidão..... **55**
5.4. Determinação da concentração elementar..... **56**
5.5. Determinação dos Compostos Fenólicos..... **60**
5.6. Determinação da Atividade Antioxidante..... **61**
5.7. Determinação do Teor de Clorofila..... **62**
6. Conclusão..... 65
7. Referências..... 66
8. Anexos..... 74

1. Introdução

O interesse por novos alimentos funcionais e nutracêuticos vem se destacando, impulsionados pelo crescente interesse da sociedade em uma alimentação mais saudável já que estes alimentos se caracterizam por oferecer vários benefícios à saúde, além do valor nutritivo inerente à sua composição química (Ministério da Saúde, 2009). Os consumidores estão em constante busca por produtos alimentícios saudáveis, neste aspecto os microgreens são produtos de especialidade emergente que tem atraído cada vez mais atenção dos consumidores e pesquisadores (Chen *et al*., 2020; Kyriacou *et al*., 2016; Kowitcharoen *et al*., 2021).

Os microgreens são uma classe de vegetais considerados alimentos devido ao seu alto teor nutritivo devido ao seu alto teor de minerais e a presença de compostos bioativos em sua composição (Paradiso *et al*., 2018; Sharma *et al*., 2020). Estes alimentos referem-se a vegetais imaturos colhidas em nível do solo entre a primeira e terceira semana após a semeadura, quando o cotilédone, que é considerado o embrião da planta, responsável pela fonte de nutrientes da mesma está totalmente desenvolvido e as primeiras folhas começam a surgir (Fuente *et al*., 2019; Canhoto, 2017). O interesse por microgreens também foi despertado a partir da divulgação dos resultados de Xiao *et al*. (2012), indicando que estes podem apresentar concentrações maiores, entre 4 e 40 vezes, em relação a alguns nutrientes e vitaminas quando comparado ao vegetal maduro (Weber, 2017; Xiao *et al*., 2012). Estudos também relatam uma maior quantidade de minerais como Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Se e Mo, vitaminas, antioxidantes e fitonutrientes como o ácido ascórbico, β-caroteno, α-tocoferol e filoquina em relação aos seus correspondentes maduros, sendo assim considerados como um bom transportador de componentes biologicamente ativos (Fuente *et al*., 2019; Sharma *et al*., 2020).

Com isso, fica evidente a importância deste tipo de amostras em estudos de análise elementar para o conhecimento da composição nutricional dos microgreens e seus correspondentes crescidos. A preparação da amostra é um passo essencial na análise química e para se obter um resultado satisfatório é fundamental o desenvolvimento de métodos que proporcionam juntamente com as técnicas de análise resultados rápidos, precisos e exatos (Louzada *et al*., 2022). Para a maioria das técnicas espectrométricas se faz necessário à conversão do estado sólido da

amostra a sua forma líquida para que a mesma possa ser introduzida no equipamento, outra importante vantagem é a minimização da matriz da amostras após o processo de preparo de amostras. Sendo assim, métodos de preparo de amostra baseados na decomposição ácida, extração por ultrassom, solubilização alcalina ou calcinação em mufla, podem ser consideradas opções de adaptação da amostra para análises instrumentais (Krug, 2010).

Um fator de extrema importância para o preparo de amostras, é a otimização das condições a serem utilizadas. Tradicionalmente, os processos de otimização das condições ideias de trabalho são realizadas através do monitoramento univariado, que consiste na variação de um fator por vez e a observação da sua influência sobre a resposta experimental. Assim, enquanto o nível de um fator é alterado, os níveis dos demais são mantidos constantes, como consequência está técnica é limitada em questão da avaliação dos efeitos de interação entre as variáveis, onde não possibilita esta observação. Uma alternativa a essa técnica é a otimização multivariada, uma poderosa ferramenta para analisar a influência que cada variável tem sobre o sistema, bem como o efeito da sinergia delas. Assim, a partir desta otimização, é possível obter, através das otimizações, condições ótimas de trabalho, que ao serem aplicadas produzem a melhor resposta possível para cada analito, garantindo a este uma maior sensibilidade e melhores características analíticas, melhorando o desempenho e a compreensão de um sistema (Pereira-Filho *et al*., 2020; Novaes *et al*., 2017).

A escolha da técnica analítica ideal é de suma importância para quantificação dos analitos, sendo que esta escolha dependerá das espécies de interesse, custo, praticidade e confiabilidade, assim como sensibilidade e detectabilidade da técnica. A técnica de espectrometria e emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES) é considerada uma interessante alternativa, por apresentar características de análise multielementar e pela utilização de nitrogênio retirado do ar atmosférico para a manutenção do plasma, diminuindo significativamente os custos das análises quando comparados com outras técnicas multielementares como a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) (Agilent Technologies, 2016; Leão *et al*., 2017; Diniz *et al*., 2017; Bonemann *et al*., 2021; Louzada *et al*., 2022).

Para a determinação dos compostos bioativos foi utilizada a técnica de espectrofotometria na região do ultravioleta e do visível (UV-V*is*), é caracterizada por fornecer informações que possibilitam a identificação de íons metálicos e grupos funcionais orgânicos, permitindo quantificar, identificar, caracterizar qualitativamente e quantitativamente materiais e substâncias químicas através de reações de complexação (Pratiwi; Nandiyanto; 2022).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Dietas Alimentares

O interesse por novos alimentos frescos, funcionais e nutracêuticos vem se destacando, impulsionados pela crescente conscientização da população em relação a uma alimentação saudável, já que estes alimentos se caracterizam por oferecer vários benefícios à saúde, além do valor nutritivo inerente à sua composição química (Sharma et al., 2020; Kyriacou *et al.,* 2016; Kowitcharoen *et al*., 2021; Ministério da Saúde, 2009). Um problema nutricional específico que é relativamente comum em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento é a desnutrição mineral. Mais de 60, 30 e 15% dos sete bilhões de pessoas do mundo possuem deficiência em Fe, Zn e Se, respectivamente. Neste conceito, a desnutrição mineral é considerada como um dos mais importantes desafios globais para a humanidade (Weber, 2017).

Dietas saudáveis são essenciais para esse requisito nutricional, conforme estabelecido por Neufeld *et al*., (2021) no qual uma dieta saudável consiste “na promoção da saúde e na prevenção de doenças, fornecendo uma adequação sem excesso, de nutrientes e substâncias promotoras da saúde e evita o consumo de substâncias nocivas à saúde. Uma dieta rica em frutas e vegetais fornecem uma abundância de compostos bioativos, como o ácido ascórbico (vitamina C), carotenóides (compostos da provitamina A), filoquinona (vitamina K1) e tocoferóis (vitamina E), que são conhecidos por seus benefícios protetores contra o câncer e doenças cardiovasculares (Xiao *et al.,* 2012).

Partindo deste contexto, os microgreens são produtos de especialidade emergente que tem atraído cada vez mais atenção dos consumidores e

pesquisadores, já que podem ser considerados uma fonte densa de nutrição devido a biofortificação, já que possui potencial de produção praticamente em qualquer ambiente (Weber, 2017; Chen et al., 2020).

2.2. Composição dos Microgreens

O conceito de microgreens originou-se na Califórnia no final dos anos 80, desde então vem ganhando cada vez mais popularidade, devido a sua densidade de nutrientes e propriedades (Enssle, 2020; Kyriacou et al., 2016; Xiao et al., 2016). Microgreens são uma classe de vegetais pequenos, frescos e comestíveis, considerados alimentos nutritivos devido ao seu alto teor de minerais e a presença de compostos bioativos em sua composição (Paradiso et al., 2018; Sharma et al., 2020). Estes alimentos são cultivados a partir de sementes de leguminosos, cereais, pseudocereais, oliaginosas, vegetais e ervas, conforme apresentado na Tabela 1 (Ebert, 2022). Em geral, as famílias de *Brassicaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae, Lamiaceae, Apiaceae, Amarillydaceae, Amaranthceae e Cucurbitaceae* possuem as espécies mais exploradas (Kyriacou et al., 2016).

Tabela 1. Informações dos Microgreens

Grupo	Família	Nome Científico	Nome Comercial
vegetais	*Amaryllidaceae*	Allium cepa	Cebola
	Brassicaceae	Brassica oleracea L.	Couve
	Brassicaceae	Brassica juncea	Mostarda
	Brassicaceae	Raphanus sativus	Rabanete
	Brassicaceae	Brassica oleracea var. capitata f. rubra	Repolho Roxo
	Brassicaceae	Eruca sativa L	Rúcula

Conforme apresentado na Figura 1, os microgreens possuem uma diversidade de sabores e texturas que provém da diversidade genética, os microgreens podem diferir em sabor que pode variar de simples a temperado, picante ou até amargo. Basicamente, seu sabor deve ser forte e concentrado (Weber, 2017).

Figura 1. Amostras de diferentes espécies de microgreens.
(1) Repolho Roxo, (2) Cebola, (3) Rabanete, (4) Rúcula, (5) Mostarda, (6) Couve.

O interesse por microgreens também foi despertado a partir da divulgação dos resultados de Xiao *et al.* (2012), indicando que estes podem apresentar concentrações maiores, entre 4 e 40 vezes, em relação a alguns nutrientes e vitaminas quando comparado ao vegetal maduro (Weber et al., 2017). Estudos também relatam uma maior quantidade de minerais (Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Se e Mo), vitaminas, antioxidantes e fitonutrientes como ácido ascórbico, β-caroteno, α-tocoferol e filoquina, em relação aos seus correspondentes maduros, sendo assim considerados como um bom transportador de componentes biologicamente ativos (Fuente et al., 2019; Sharma et al., 2020). Pesquisadores mostraram que o nível de nutrientes em microgreens é até nove vezes maior do que os encontrados em vegetais maduros, assim como também possuem antioxidantes e vários polifenóis em contraste aos seus equivalentes vegetais totalmente cultivados (Xiao et al., 2012).

Além de minerais e propriedades bioativas, os microgreens são ricos em fibras e são fontes de proteínas, sendo estas também superiores às fontes dos vegetais convencionais. As proteínas de origem animal possuem alto valor biológico em comparação as proteínas vegetais. Em contrapartida, populações de baixo poder aquisitivo têm acesso limitado a alimentos de origem animal, tornando os vegetais em questão, alimentos que podem contribuir para a ingestão de nutrientes, além de ser uma alternativa para as pessoas que possuem hábitos e dietas restritas (Kinupp; Barros, 2008).

Alguns estudos apresentam um considerável teor de proteínas nos microgreens. Renna et al. (2018) relatam um teor médio de 1,8-1,9 g por 100 g de peso fresco, Ghoor et al. (2020) destacou o teor de proteína variando entre 1,8-4,4 g por 100 g de peso fresco (Renna *et al.,* 2020), de acordo com o Ministério da Saúde,

para um adulto a ingestão diária recomendada é de 50 g de proteína. Desta forma, as hortaliças são consideradas uma abundante fonte complementar de proteínas, onde seu teor pode variar dependendo do seu genótipo e condições de cultivo (Kinupp; Barros, 2008).

As condições de crescimentos dos microgreens podem variar de acordo com a espécie. Geralmente referem-se a vegetais imaturos, aqueles colhidos em nível do solo entre a primeira e terceira semana após a semeadura, entre 7 e 21 dias, quando o cotilédone, que é considerado o embrião da planta, responsável pela fonte de nutrientes da mesma, está totalmente desenvolvido e as primeiras folhas começam a surgir, conforme apresentado na Figura 2 (Fuente *et al*., 2019; Canhoto, 2017). Durante a germinação, ocorrem mudanças bioquímicas no interior da semente incluindo a síntese de compostos bioquímicos, fazendo com que a quantidade de nutrientes aumente rapidamente (Kowitcharoen *et al.,* 2021). No processo de germinação ocorre a ativação das enzimas hidrolíticas liberando os nutrientes tornando os mesmos biodisponíveis, além das vitaminas que são sintetizadas e acumuladas nas plantas (Ebert, 2022).

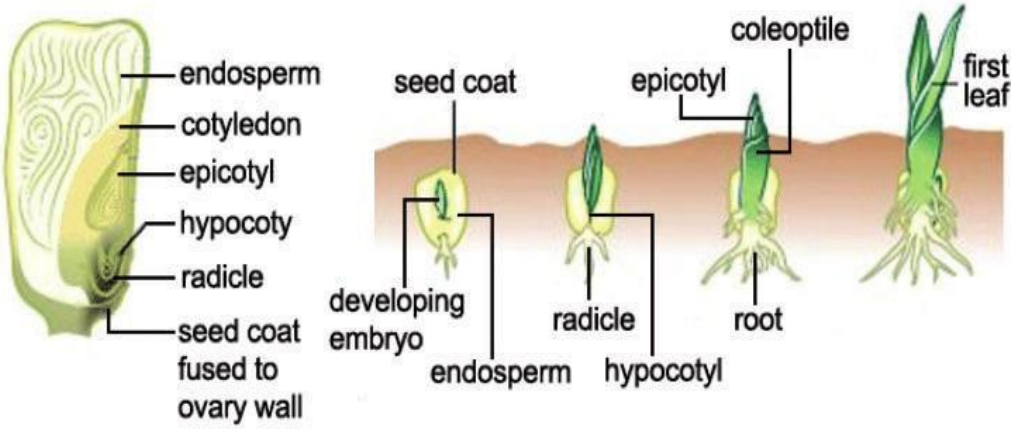


Figura 2. Processo de germinação dos microgreens.
Fonte: Zhao *et al.*, (2011)

2.3. Elementos Essenciais

Grande parte dos elementos químicos que compõem a tabela periódica está presentes no organismo humano, esses elementos aparecem combinados a diversas substâncias que desempenham diferentes funções (Massabni, 2006). Os minerais são elementos inorgânicos requeridos como nutrientes essenciais como

carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O) e hidrogênio (H), os quais juntos compõem cerca de 96% do peso do corpo humano. Além disso, os minerais são subdivididos em macronutrientes e micronutrientes que fazem parte do restante da composição corporal do ser humano (Massabni, 2006; Godswill *et al*., 2020; Taşğin, 2017).

Os elementos essenciais são uma classe de nutrientes importantes para a saúde humana, pois as mesmas participam de diversas reações enzimáticas, além de representarem grande importância em diversos sistemas do corpo humano (como sistema imunológico, cardiovascular, cerebral, respiratório, entro outros). Todavia, esses elementos não podem ser sintetizados bioquimicamente por organismos vivos, e, portanto, devem ser ingeridos através de alimentos que possuam consideráveis quantidades dos mesmos, como por exemplo, através da ingestão de leites, ovos, carnes, frutas, verduras e leguminosas, ou em alguns casos até mesmo fazendo o uso de suplementos. Consequentemente, o conhecimento da essencialidade dos elementos torna-se de extrema importância, uma vez que o bom funcionamento do corpo humano depende dos níveis de concentração destes elementos (Godswill *et al*., 2020; Xiao *et al*., 2012).

A Ingestão Diária Recomendada (IDR) para estes elementos é baseada em valores que variam para diferentes gêneros e idades, mas devem ser suficientes para cobrir as perdas de elementos essenciais. A falta de elementos essenciais pode ser prejudicial à saúde, ou seja, um desequilíbrio na concentração de alguns destes elementos podem causar drásticos danos à saúde como (Massabni, 2006).

Os elementos minerais essenciais são melhores obtidos a partir de fontes alimentares. Sendo divididos em macroelementos como cálcio, magnésio, fósforo, potássio e sódio, que são essenciais para adultos em uma concentração de até 100 mg/dia, já os microelementos são definidos como sendo ferro, zinco, cobre e manganês, que são requeridos em menores quantidades equivalentes a 15 mg/dia, ambos desempenhando papéis cruciais em vários processos biológicos tanto para as plantas quanto para os seres humanos (Xiao *et al*., 2016).

A deficiência desses elementos no organismo humano pode causar diversos distúrbios metabólicos e danos aos órgãos, levando a doenças crônicas e agudas. A importância da ingestão correta do Mg e do K no metabolismo ósseo, em uma dieta saudável, pode contribuir para otimizar a saúde óssea, enquanto a deficiências dos

mesmos pode acarretar diversos problemas na saúde (Xiao *et al*., 2016). Dentro da faixa de ingestão diária recomendada para cada elemento essencial existem intervenções, quando se há baixa ingestão de determinado elemento, pode haver riscos de o indivíduo obter o desenvolvimento de um quadro de deficiência, em contrapartida, o excesso da ingestão de algum elemento ultrapassando o limite recomendado pode haver sintomas de toxicidade (Becking, 2007). A ausência de alguns elementos essenciais no corpo humano pode ocasionar sérias doenças como anemia, no caso de deficiência em ferro, retardamento do crescimento de crianças, por falta de zinco, e má formação óssea em crianças, por falta de cálcio (Massabni, 2006).

2.4. Compostos Fenólicos

As plantas produzem uma larga e diversa escala de componentes orgânicos que são divididos em metabólitos primários e secundários (Vizzoto *et al*., 2010). Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, pois ocorre uma proteção contra possíveis ameaças climáticas e predadores, além de também auxiliar na coloração das plantas (Shahidi; Naczk, 2004). A diversidade estrutural dos compostos fenólicos deve-se à grande variedade de combinações que acontece na natureza, razão por que alguns dos compostos resultantes são chamados de polifenóis (Rodrigues, 2012).

Os compostos bioativos podem ser definidos como nutrientes e não nutrientes presentes na matriz alimentar, encontrados principalmente em alimentos funcionais como os de origem vegetal, animal e até mesmo em medicamentos. Estes compostos podem produzir efeitos fisiológicos benéficos a saúde, assim também como suas propriedades nutricionais que contribuem para a prevenção e o tratamento de doenças como câncer e diabetes. Também, podem ser utilizados na composição de fármacos, como em suplementos alimentares, ou ingeridos por meio da alimentação (Cazarin et al., 2021). Os compostos bioativos podem ter diversas classificações conforme ilustrado na Figura 3, podendo ser dividida em quantificação total do seu conteúdo, quantificação individual e por classes de compostos, já que

nos tecidos vegetais, os fenólicos estão amplamente distribuídos (Schafranski, 2019; Rodrigues, 2012).

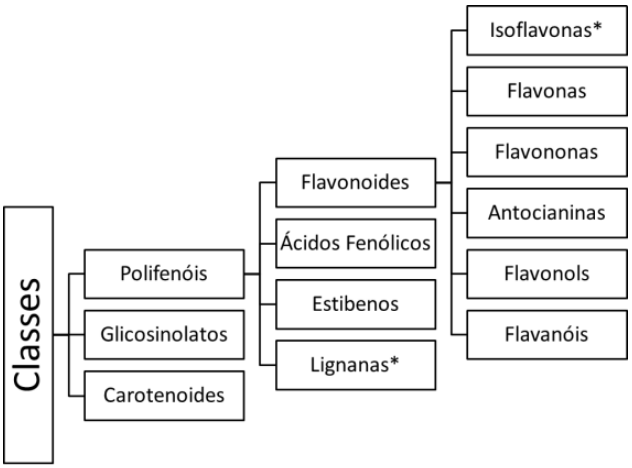


Figura 3. Subdivisão de compostos bioativos presente em alimentos de origem vegetal.
Fonte: HORST & LAJOLO, 2007.

Quimicamente, os compostos fenólicos são um grupo de compostos que possuem características estruturais um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Essas estruturas englobam uma vasta gama de substâncias, desde moléculas mais simples como ácidos fenólicos com um único anel aromático, compostos bifenóis como o ácido elágico, flavonoides que possuem uma estrutura de 2 a 3 anéis aromáticos como é o exemplo dos taninos, entre outros, conforme ilustrado na Figura 4 (Rodrigues, 2012).

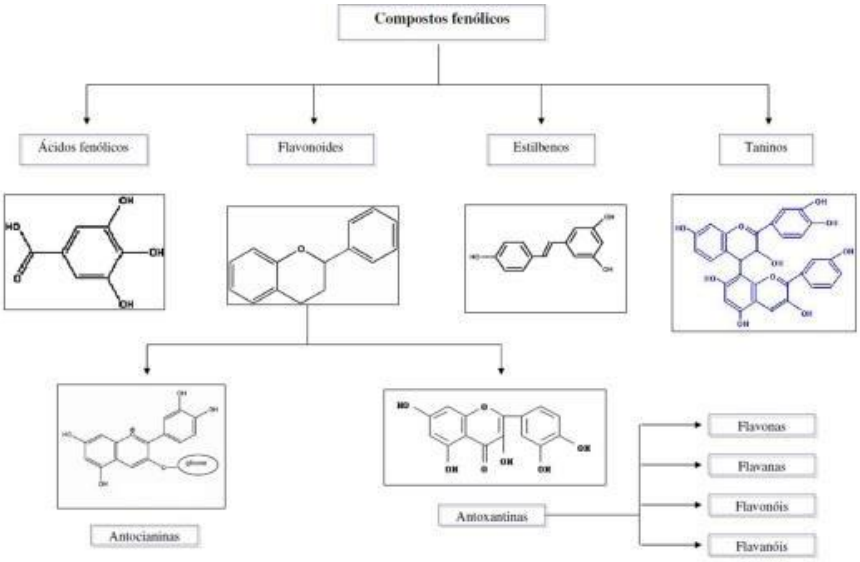


Figura 4. Estruturas químicas dos principais compostos fenólicos.
Fonte: Janiques *et al*., 2013.

Diversos fatores podem influenciar na quantidade de compostos fenólicos presentes nos alimentos. A produção de metabólitos secundários é o resultado de complexas interações entre biossíntese, clima, transporte, estocagem e degradação dessas moléculas; cada um desses processos é governado por genes e, portanto, influenciado por três fatores principais: hereditariedade (cultivar), ontogenia (estádio de desenvolvimento da planta e do fruto) e ambiente (Pineli, 2009). Como a maioria dos fitoquímicos bioativos possui capacidade antioxidante, o somatório desses potenciais confere a capacidade antioxidante total. Além disso, os compostos antioxidantes presentes nas frutas e hortaliças podem produzir sinergismo ou inibição entre si (Rodrigues, 2012).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos ocorre devido as propriedades redutoras presente em suas estruturas químicas. Essas características estruturais possuem um papel essencial na neutralização, no sequestro dos radicais livres e na quelação de metais de transição, atuando na etapa de iniciação como no desenvolvimento do processo oxidativo. Nessas reações ocorrem a formação de intermediários relativamente estáveis, esta estabilidade se dá devido a possibilidade de ressonância, e dependendo do substituinte presente na sua estrutura química (Sousa, 2007).

Existem diversos métodos de determinação dos compostos fenólicos. O mais utilizado consiste na metodologia contendo o reagente Folin-Ciocalteu. Os polifenóis disponíveis em extratos vegetais reagem com o reagente específico do complexo redox Folin-Ciocalteu para ocorrer à formação de um complexo azul que pode ser quantificado por espectrofotometria de luz visível (Hudz *et al*., 2019).

O reagente folin é uma mistura de ácidos fosfomolibídico e fosfotúngstico, onde o molibdênio e o tungstênio encontram-se em estados de oxidação 6^+ formando um complexo que possui coloração amarela, que é determinado por $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ que, na presença de agentes redutores, como é o caso dos compostos fenólicos, resulta na formação dos complexos molibdênio-tungstênio $[(PMoW_{11}O_4)^{4-}]$, observados na coloração azul, que apresenta estado de oxidação dos metais entre 5_+ e 6_+. E, a partir desta mudança de coloração permite a quantificação das espécies redutoras presentes nas matrizes das plantas. Com a

mudança na coloração quando ocorre a formação dos complexos é possível a quantificação do teor de compostos fenólicos em uma amostra utilizando a espectrofotometria e, como padrão, o ácido gálico que é caracterizado por ser um ácido fenólico (Rodrigues, 2012. Hudz *et al*. 2019).

Esse padrão fenólico, quando em meio básico sofre desprotonação gerando o ânion fenolato, conforme ilustrado na Figura 5. A partir disto, ocorre uma reação de oxirredução entre este ânion fenolato e o reagente de Folin-Ciocalteau, e assim o molibdênio que é componente do reagente sofre uma redução e o meio reacional altera sua coloração, de amarelo para azul (Oliveira et al., 2009)

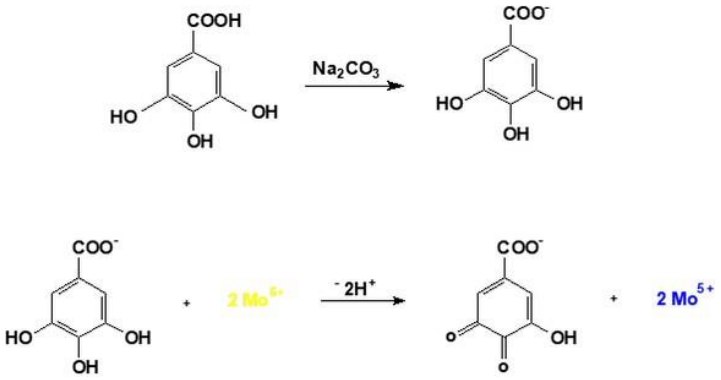


Figura 5. Reação de redução do molibdênio, componente presente no reagente de Folin-Ciocalteau pelo ácido gálico.
Fonte: Oliveira et al., 2009.

2.5. Atividade Antioxidante

A oxidação é um processo metabólico que auxilia na produção de energia necessária para as atividades essenciais da célula (Roesler *et al*., 2007). Agentes antioxidantes atuam de maneira significativa na manutenção da saúde e proteção, e trazem benefícios restaurando o equilíbrio fisiológico e modulação das vias biológicas (Barbosa *et al*., 2019). Desta maneira, o desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante no organismo, ou seja, o excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) pode causar um desequilíbrio no sistema do organismo, causando um estresse oxidativo. O estresse tem sido associado a diversas doenças crônicas e degenerativas e está envolvido no processo de envelhecimento celular, conforme ilustrado na Figura 6. Essas moléculas de antioxidantes como a vitamina A, C e E,

são produzidas pelo organismo ou podem ser consumidos através da alimentação, com a ingestão de frutas e legumes. Desse modo, os produtos naturais têm sido relatados como uma ótima fonte antioxidante (Barbosa *et al*., 2019; Roesler *et al*., 2007).

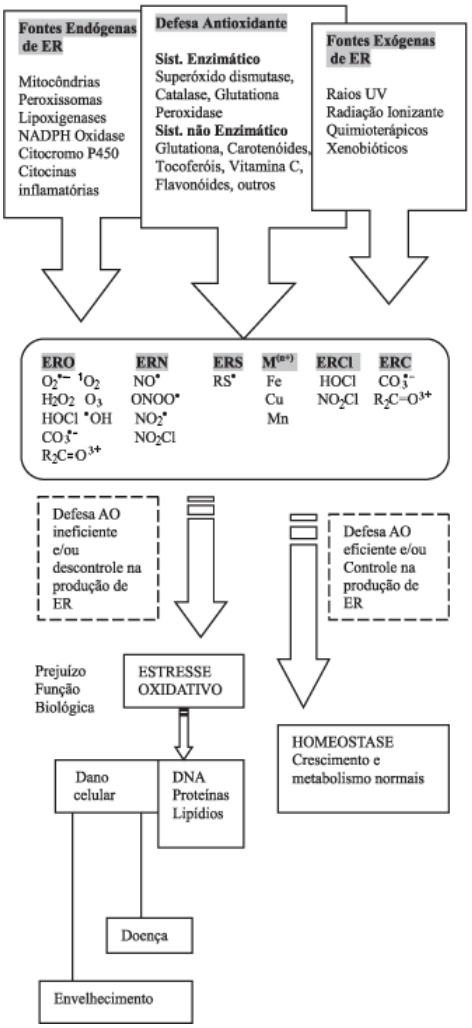


Figura 6. Fontes e respostas celulares proveniente da atuação das espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN).
Fonte: Vasconcelos *et al*., 2007.

Os compostos antioxidantes apresentam substituintes que atuam como doadores de elétrons ou de hidrogênio presente em sua estrutura possuem capacidade de realizar ressonância do radical formado ou da capacidade quelante de metais. Dentre os antioxidantes naturais pode-se citar os tocoferóis, vitamina C, carotenoides e compostos fenólicos (Silveira *et al.,* 2018). Estudos clínicos e epidemiológicos têm mostrado evidências de que antioxidantes fenólicos de cereais,

frutas e vegetais são os principais fatores que contribuem para a baixa e significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas encontradas em populações cujas dietas são altas na ingestão desses alimentos (Roesler *et al.,* 2007). Há um crescente interesse de pesquisadores no desenvolvimento de substâncias antioxidantes, principalmente a partir de produtos naturais como plantas (Oliveira, 2015).

Assim, uma das técnicas utilizada para detectar a capacidade antioxidante de compostos é o método baseado na eliminação do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•), conforme apresentado na Figura 7 (Oliveira, 2015). O método de DPPH foi desenvolvido por Blois em 1958 (Silveira *et al*., 2018).

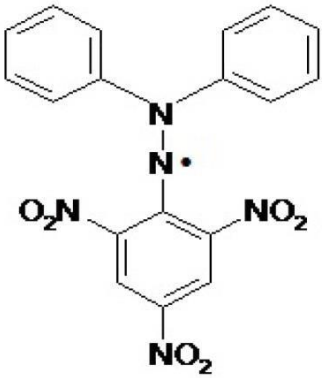


Figura 7. Molécula de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (radical DPPH•)
Fonte: OLIVEIRA, 2015.

A molécula de DPPH• é bastante conhecida por caracterizar-se como um radical orgânico livre estável e que possui estabilidade na ausência de luz (Silveira *et al*., 2018). Os radicais livres, por apresentarem um elétron desemparelhado, são instáveis e muito reativos, portanto, tem tempo de vida muito pequeno. No caso do DPPH, observa-se uma certa estabilidade, que pode ser explicada pelo fato de sua estrutura possuir ligações duplas alternadas nos anéis benzênicos, sofrendo assim efeito de ressonância, muito eficaz para estabilizar carga eletrônica por dispersá-la por toda molécula. Dessa forma, a espécie radicalar DPPH se torna mais estável e menos reativa. Além disso, os grupos NO_2 no anel picri-hidrazila auxiliam na estabilização do elétron desemparelhado, descentralizando-o, pois são grupos retiradores de elétrons. Esses efeitos eletrônicos associados explicam o fato do DPPH ser um radical livre relativamente estável, e por essa característica revolucionou as pesquisas com radicais livres (Oliveira, 2015).

O DPPH age como um capturador de radicais livres ou de substâncias neutras que possuem a capacidade de estabilizá-lo, substâncias com capacidades antioxidantes possuem essa capacidade, ou seja, o método de sequestro de radicais livres está baseado na habilidade dos antioxidantes presentes nas amostras se ligarem no radical (Oliveira, 2015; Silveira *et al*., 2018).

Quando ocorre a captura com o DPPH, resulta em uma reação de oxirredução, na qual a solução metanólica de DPPH que apresenta uma coloração violeta e absorve em um comprimento de onda referente a 515 nm, é reduzido através de um antioxidante ou de um radicalar (R•) resultando na formação do difenil-picril-hidrazina (DPPH-H). Então, quando o radical é reduzido, o elétron que anteriormente se encontrava desemparelhado do nitrogênio se emparelha com elétrons que foram doados pelo radical hidrogênio de um antioxidante presente na estrutura, o que resulta em uma alteração da coloração da solução, tornando-a amarela, e desta forma ocorreu à formação do DPPH-H reduzido e estável, conforme a Figura 8. O grau desta descoloração é avaliado pelo decréscimo da absorbância, permitindo a capacidade de sequestrar o radical livre (Oliveira, 2015; Silveira *et al*., 2018).

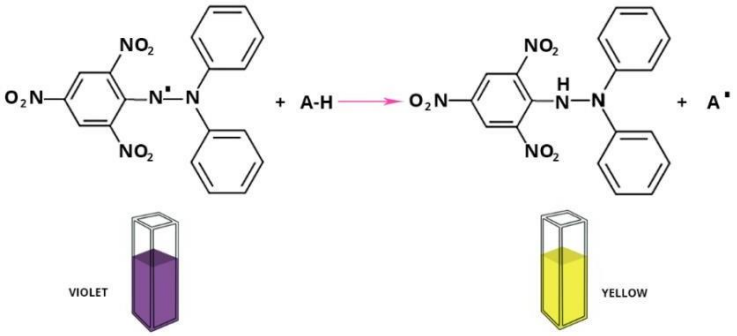


Figura 8. Redução do radical DPPH pelo antioxidante.
Fonte: Mairlland – ChimActive.

A capacidade antioxidante pode ser expressa em porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional, descrita na equação 1, isto corresponde a porcentagem de DPPH consumido pelo antioxidante presente nas amostras, sendo a quantidade necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% e é determinada concentração inibitória (IC_{50}). Desta maneira, quanto maior o consumo de DPPH• por uma amostra, menor será a sua IC_{50} e maior será a sua capacidade antioxidante (Oliveira, 2015).

$$\% \, de \, inibição = [(\frac{ABS_{Branco} - ABS_{Amostra}}{ABS_{Branco}})] * 100 \qquad Equação \, 1$$

2.6. Clorofila

A fotossíntese é um processo básico da substância de circulação de energia na natureza. É um fator dependente de luz, sendo ela a energia solar e então é transmitido como energia de excitação para os centros de reação dos fotossistemas (Pavlovic *et al*., 2004). As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes presentes nas plantas e ocorrem nos cloroplastos das folhas e em outros tecidos vegetais. As diferenças aparentes na cor do vegetal são devidas à presença e distribuição variável de outros pigmentos associados, como os carotenóides, os quais sempre acompanham as clorofilas. Atualmente os pigmentos clorofilianos são de grande importância comercial, podendo ser utilizados tanto como pigmentos quanto como antioxidantes (Streit *et al.,* 2005). A clorofila é considerada um composto antioxidante que está presente e armazenado no cloroplasto de plantas que possuem folhas verdes e estando presente principalmente nas folhas, caules, flores e raízes (Kamble *et al*., 2015).

As clorofilas são moléculas formadas por complexos derivados da porfirina, tendo como átomo central o Mg (magnésio) conforme a Figura 9. Esse composto é uma estrutura macrocíclica assimétrica totalmente insaturada constituída por quatro anéis de pirrol. Esses anéis numeram-se de l a 4 de acordo com o sistema de numeração de Fisher. As clorofilas *a* e *b* encontram-se na natureza numa proporção de 3:1, respectivamente, e diferem nos substituintes de carbono C-3. Na clorofila *a,* o anel de porfirina contém um grupo metil (-CH_3) no C-3 e a clorofila *b* (considerada um pigmento acessório) contém um grupo aldeído (-CHO), (Streit *et al.*, 2005).

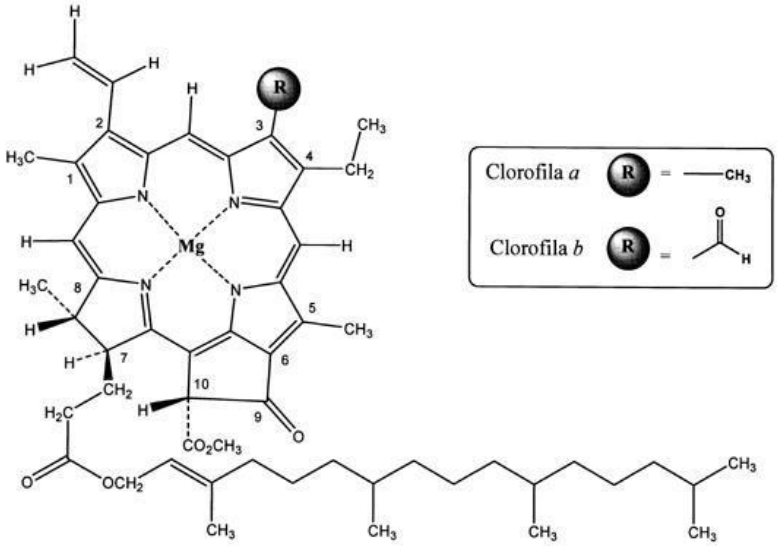


Figura 9. Estrutura química da clorofila *a* e *b*.
Fonte: Streit *et al.,* (2005).

Os pigmentos fotossintéticos presentes e a sua abundância variam de acordo com a espécie. A clorofila *a* (*Chl' a*) está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica. É o pigmento utilizado para realizar a fotoquímica (o primeiro estágio do processo fotossintético) auxiliando na produção de energia para a planta, a clorofila *a* costuma ser encontrada em maiores quantidades que a clorofila *b* (Kamble et al., 2015). A coloração verde característica das plantas se dá através da clorofila juntamente com pigmentos acessórios como carotenoides e outros tipos de clorofila. Estes pigmentos auxiliam na absorção e na transferência da energia radiante para os centros de reação.

A estabilidade da clorofila *b* deve-se ao efeito atrativo de elétrons de seu grupo aldoxíla no C-3. A clorofila *b* é sintetizada através da oxidação do grupo metil da clorofila a para um grupo aldeído. A clorofila *b* é convertida em clorofila *a* através de uma enzima chamada clorofila a oxigenase, que catalisa a conversão do grupo metil ao grupo. Ao considerar a importância da clorofila para a fotossíntese, as plantas devem otimizar a absorção de luz e a fotossíntese, ajustando seu conteúdo e proporções de clorofila para auxiliar no crescimento e na sobrevivência a longo prazo (Streit et al., 2005).

2.7. Preparo de Amostras

A determinação elementar a partir do uso de amostras com matrizes complexas, como são considerados os alimentos, exige uma etapa de preparo de amostra que antecede à análise instrumental. A sequência analítica possui diversas etapas consiste em um conjunto de etapas que deve ser considerada para a realização das análises, dentro desta sequência, o preparo de amostras é a etapa mais crítica, pois engloba diversos problemas e demanda a maior parte do tempo do analista, assim como é a etapa em que podem ocorrer os maiores erros e contaminações (Krug, 2019).

Levando em consideração a natureza de cada matriz de amostra é necessário um estudo preliminar para determinação do preparo de amostra ideal para que a mesma seja introduzida no equipamento de análise. Esta etapa é caracterizada como sendo uma etapa crítica de toda a sequência analítica, pois é responsável pela conversão da amostra em uma solução ou suspensão adequada para que a análise seja realizada, além de garantir a preservação da espécie química de interesse para sua total quantificação (Krug, 2019; Gomes, 2021; Oliveira, 2003). A preparação da amostra é um passo essencial na análise química, e para se obter um resultado satisfatório, é fundamental o desenvolvimento de métodos que proporcionam juntamente com as técnicas de análise resultados rápidos, precisos e exatos (Louzada et al., 2022). Esta etapa é responsável por 30% dos erros de análise e ocupa 60% do tempo da sequência analítica. Os métodos são divididos em via seca e via úmida (Krug, 2019; Oliveira, 2003).

O preparo de amostra por via seca é considerado um processo mais simples, no qual a amostra é submetida a um processo de calcinação em elevadas temperaturas para torna-lá facilmente solúvel. Este processo rompe as ligações químicas entre a matriz da amostra e as espécies de interesse (Krug, 2019; Gomes, 2021). Porém, este método de preparo de amostra acarreta alguns inconvenientes, como a perda de analitos por volatilização, riscos de contaminação, alto gasto de energia e tempo elevado para a queima de determinadas amostras (Krug, 2019).

Já o preparo de amostras por via úmida são métodos que consistem na destruição ou separação da espécie química de interesse através do rompimento das ligações da matriz orgânica com o uso de reagentes, normalmente na presença

de ácidos e aplicação de uma fonte externa de energia. Geralmente utilizam-se ácidos como o HNO_3, HCl, H_2SO_4, entre outros, ou a mistura deles, além de possibilitar a adição de agentes oxidantes como o H_2O_2 que auxiliam na decomposição da matriz (Oliveira, 2003; Krug, 2019).

Além disso, os métodos de decomposição da amostra podem ser realizados em sistemas fechados, permitindo a manutenção de elementos voláteis em solução, visto que não ocorre perdas de analitos e não há necessidade de reposição dos reagentes. No entanto, uma desvantagem deste sistema é o risco de explosão, pois estes sistemas possuem alta pressão interna como pode ser destacada a decomposição ácida assistida por micro-ondas. Outro método é a utilização de sistemas abertos como muflas, chapa de aquecimento e blocos digestores. Estes, normalmente são utilizados para a decomposição de grandes quantidades de amostra, além de possuírem um custo-benefício e uma simplicidade maior quando comparados aos sistemas fechados de decomposição. Em contrapartida apresentam algumas desvantagens como a perda de analitos por volatilização, maiores riscos de contaminação pelo ambiente e necessidade da reposição dos reagentes.

2.8. Extração assistida por Ultrassom

A maioria dos métodos de preparo de amostras envolve a completa destruição da matriz orgânica, fazendo o uso na maioria das vezes, de ácidos com propriedades oxidantes e de peróxido de hidrogênio a temperaturas elevadas. No entanto, muitos destes processos requerem equipamentos laboratoriais complexos, pode ocorrer aumento no risco de contaminação ou perdas de analitos por volatilização, ou ainda adsorção destes analitos nos frascos de digestão (Mendivelso et al., 2019). Uma alternativa para os métodos de preparo de amostras já mencionados, é a utilização da extração através da energia ultrassônica, que não utiliza medidas drásticas de decomposição da matriz da amostra, pois a extração ocorre sob leves condições, como em baixas temperaturas, menores tempos de extração, essas condições já se fazem adequadas para a extração dos componentes da matriz da amostra (Machado et al., 2016; Pereira-Filho et al., 2020).

Em vista disso, torna-se muito importante o desenvolvimento de novos métodos analíticos que visem à etapa de preparação de amostra, sendo que estes métodos devem ser mais rápidos, de baixo custo e que seja condizente com os princípios da química verde. A extração assistida por ultrassom é uma alternativa a estas técnicas (Mendivelso *et al*., 2019).

As ondas ultrassônicas são ondas mecânicas que possuem uma frequência acima de 20 kHz, a sonicação de um líquido que possui esta frequência decorre de uma agitação e do aquecimento do meio, assim podendo ocorrer à cavitação acústica. O banho ultrassônico é um equipamento habitualmente encontrado em laboratórios de análises químicas e bioquímicas (Krug, 2019; Gouda *et al.,* 2021). A utilização do banho ultrassônico para a etapa de preparo de amostras consiste na sonicação de uma mistura sólido-líquido resultando na formação de bolhas de cavitação podendo levar a degradação do material (Krug, 2016). O fenômeno de cavitação tem início na fase de rarefação das ondas acústicas, quando moléculas de gases e vapores presentes no líquido são direcionadas para o interior dos núcleos produzidos pela interrupção do meio devido às abruptas mudanças de pressão ocorridas quando uma onda acústica passa da fase de rarefação para a de compressão. Quando essas microbolhas presentes na etapa de compressão da onda acústica leva a formação de cavidades, assim fazendo com que poucas moléculas dos gases que estão contidas nas bolhas sejam expulsas do seu interior e direcionada para o líquido. Com o passar dos ciclos essas microbolhas aumentaram suas dimensões e ocorre um colapso, essa perturbação do sistema resulta em um brusco aumento de temperatura e pressão produzindo microjatos (Krug, 2016; Gouda *et al*., 2016), conforme ilustrado na Figura 10 abaixo.

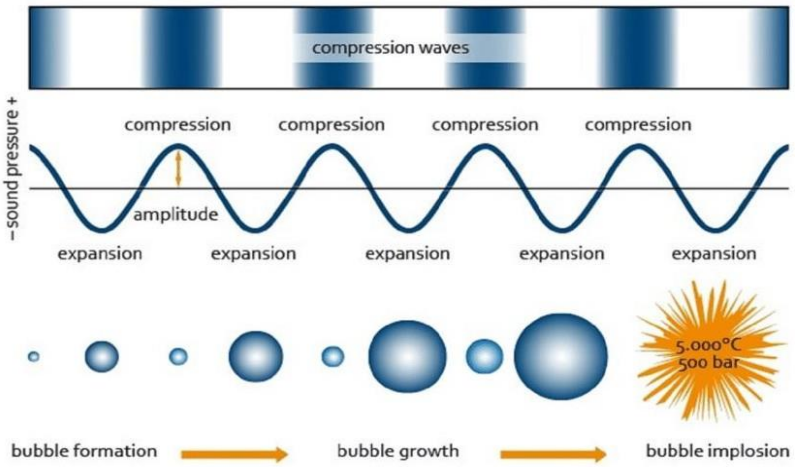


Figura 10. Fenômeno de cavitação no banho ultrassônico.
Fonte: Johansson *et al.,* 2018.

A presença de materiais sólidos no meio faz com que haja uma deformação das bolhas de cavitação, estando relacionado a intensificação da produção de bolhas por haver uma perda de uniformidade na distribuição de moléculas dissolvidas nas proximidades dos sólidos, assim como interações de reflexão das ondas com as partículas sólidas. Essas bolhas assumem um elevado grau de esfericidade e os microjatos ocorrem em todas as direções, quando o sistema possui partículas sólidas em suspensão, a geometria referente as bolhas passam a ter outra conformação, já que o sólido atrai essas bolhas para si, garantindo a agitação do meio. Nos procedimentos de amostragem de suspensões com agitação ultrassônica é comum que uma fração significativa do analito seja extraída para a fase líquida, melhorando, em alguns casos, a precisão e a exatidão (Krug, 2016; Gouda *et al*., 2016).

Assim, utilizando a extração assistida por ultrassom para ao preparo de amostras o procedimento ocorre através do rompimento das paredes das células, fazendo com que seus compostos sejam liberados de suas matrizes por intermédio das microbolhas, ou seja, o fenômeno de cavitação. Como consequência desta cavitação, uma maior dispersão da fase sólida no líquido é alcançada e a interface do contato é melhorada, permitindo a obtenção de maiores rendimentos em menor tempo e quantidade de solvente (Prieto *et al.,* 2022).

Em geral, a agitação ultrassônica diminui o tempo de extração quando comparada aos métodos de agitação manual, mecânica, magnética ou até mesmo

por vórtex. Entretanto, a extração quantitativa depende fortemente da ligação dos analitos com a matriz. Neste sentido, embora os métodos assistidos por ultrassom sejam promissores, é recomendável que as variáveis que influenciam a extração dos analitos sejam empírica e rigorosamente avaliadas para diferentes tipos de amostras antes da utilização dessa estratégia (Krug, 2019). Além disso, a extração das amostras é realizada com ácidos diluídos, oferecendo vantagens como a redução de interferências nas técnicas de espectrometria atômica, que são causadas pela acidez excessiva dos materiais digeridos, e, permitindo o desenvolvimento de métodos mais verdes, menor geração de resíduos e sem redução da eficiência do método (Louzada *et al.,* 2022).

2.9. Planejamento Experimental

O uso de ferramentas estatísticas é de grande importância para diversas áreas, e para química não é diferente. O desenvolvimento de técnicas analíticas e obtenção de resultados abre uma grande margem para uso dessas ferramentas. O uso da quimiometria pode trazer diversos benefícios para o desenvolvimento de métodos, bem como a utilização da otimização multivariada (planejamento experimental) (Costa *et al*., 2006). A otimização possui como objetivo melhorar o desempenho de um processo com intuito de obter o máximo de benefícios possíveis através do sistema (Novaes *et al*., 2017).

Convencionalmente, a realização dos processos de otimização se dá através do monitoramento de uma variável por vez, com a observação de sua influência sobre a resposta experimental, este processo de otimização é denominado univariada. Desta maneira, a otimização ocorre com a alteração de uma única variável envolvida no procedimento e as demais são mantidas com um valor constante, como decorrência este método pode haver algumas imperfeições, nem sempre uma variável exerce uma determinada influência nos resultados quando isolada, já com a ocorrência de interação entre dois fatores pode-se obter uma diferença significativa, que irá alterar os finais resultados. Por consequência, quando este tipo de otimização é utilizado não é possível a total observação das informações disponíveis sobre o método, a exploração desta área de domínio é

menor e pode acarretar resultados equivocados da melhor condição de trabalho (Gomes, 2021; Novaes *et al*., 2017; Costa Junior *et al*., 2019).

Uma alternativa a este método de otimização, que vem crescendo, são o uso de ferramentas quimiométricas como o planejamento de experimentos ou DoE (*design of experiments*), que são ferramentas multivariadas que vêm sendo bastante utilizadas para a otimização de métodos analíticos. A otimização multivariada possibilita a interpretação de resultados no qual são considerados todos os parâmetros experimentais envolvidos na etapa de preparo de amostra (Costa *et al.*, 2016). Baseia-se em um modelo matemático que permite estabelecer a significância e a relevância estatística para os efeitos estudados apresentando o efeito das possíveis interações entre as variáveis em evidência (Novaes *et al.,* 2017; Costa *et al.,* 2006). A principal vantagem dessa ferramenta é o melhor desempenho em compreender o sistema, possibilitando estudar as variáveis de forma individual, a sinergia entre elas, podendo misturar o efeito de múltiplas variáveis ao mesmo tempo. No entanto, a otimização multivariada pode conter alguns inconvenientes tais como número elevado de experimentos, maior tempo de conclusão e alto uso de reagentes, dentre essas circunstâncias há o surgimento de variações do planejamento multivariado, destacando-se a o Planejamento Fatorial Completo. O planejamento é formado pela combinação de três partes, sendo um planejamento formado por dois níveis fracionário ou completo, por pontos axiais, que são pontos extremos fora da área de trabalho escolhida e por pontos centrais (Novaes *et al.,* 2017; Gomes, 2021; Bezerra, 2019).

A aplicação de um procedimento de otimização multivariado resulta em uma avaliação dos resultados através de análise de variância (ANOVA), análise de superfície de resposta e análise dos gráficos de Pareto, assim possuindo uma alta eficiência para a exploração do sistema. A aplicação deste procedimento no preparo de amostras ocorre à definição de variáveis independentes, que são os fatores que passam diretamente pelo processo de otimização, ou seja, pode ocorrer a influência entre as mesmas como o volume de ácido da solução, tempo, temperatura entre outras. Já as variáveis dependentes, que são representadas pelas respostas obtidas podem ser acompanhadas devido ao teor de sólidos, acidez residual em conjunto

com as respostas do equipamento de análise (Novaes et al., 2017; Gomes, 2021; Bezerra, 2019).

2.9.1. Planejamento Fatorial Completo

Em um planejamento fatorial são investigadas todas as variáveis de interesse e o efeito das suas interações com a resposta obtida, no qual a quantidade de experimentos a ser realizada é descrito pela combinação de n fatores em dois níveis, assim o planejamento será constituído por 2^n experimentos. Para os níveis, geralmente utiliza-se sinais (+) para o nível mais alto e (-) para o nível mais baixo de sua designação, enquanto n é descrito por variáveis quantitativas referente as concentrações, tempo, temperatura, por exemplo. Estas respostas que serão obtidos através da multiplicação dos fatores, conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Exemplificação do DoE.

Média	Variáveis			Interações			
	x_1	x_2	x_3	x_{11}	x_{12}	x_{23}	x_{123}
+	-	-	-	+	+	+	-
+	-	+	+	+	-	+	-
+	+	-	+	+	-	-	-

x_{12}, x_{13} e x_{23} são interações de segunda ordem, x_{123} representa terceira ordem, assim os índices indicam os fatores que estão sendo multiplicados

As respostas utilizadas para acompanhar o planejamento, não costumam ser únicas, desta forma há necessidade de encontrar uma condição de trabalho que seja ideal e maximize todos os elementos envolvidos no mesmo conjunto de dados. Assim, uma forma de trabalhar estas diversas respostas é aplicando a função da desejabilidade. Esta função proposta por Derringer e Suich (1980), ocorre a transformação de cada resposta em uma escala admensional de desejabilidade, correlacionando todas as respostas do planejamento (Teófilo e Ferreira, 2006; Gomes, 2021). A escala da desejabilidade possui uma variação que vai de 0 referente a uma resposta inaceitável, a 1 que é a resposta desejável para o planejamento. Com todas as desejabilidades individuais (di) é possível que se defina a desejabilidade global (D), definida geometricamente pela equação 2 (Teófilo e Ferreira, 2006).

Fórmula da desejabilidade:

$$Di = \begin{cases} 0 \; se \; y < L \\ \left(\dfrac{y - L}{T - L} \right) \\ \dfrac{U - y}{\;} \left(U - t \right) \\ 0 \; se \; y > U \end{cases} \qquad Equação\ 2$$

y= resposta;

L= menor valor aceitável;

T= valor alvo;

t= peso (varia de 1 a 0);

U= maior valor aceitável.

Com isso, se faz necessário um ponto em que todas as respostas apresentem valores aceitáveis, permitindo a otimização simultânea das várias respostas baseadas na função de desejabilidade global. Para uma interpretação dos resultados, utiliza-se os gráficos de Pareto, os quais consistem na interação das variáveis analisadas e seus efeitos em formato de barras horizontais, que são calculados a partir de seu valor de efeitos e seu desvio padrão obtidos no momento da otimização, identificando as interações que foram significativas (Pereira-Filho, 2015).

Além dos gráficos de Pareto, são obtidos gráficos de superfície de resposta. A superfície de resposta obtida permite comparar os valores ótimos em relação a cada variável que satisfaça simultaneamente, e na medida do possível, todas as respostas consideradas. Desta forma, a metodologia de superfície de resposta (MSR) é muito utilizada para interpretar as relações entre as respostas e os efeitos dos fatores. Esta metodologia pode ser entendida como uma combinação de técnicas de planejamento de experimentos, assim como análise de regressão e métodos de otimização, onde se baseia no ajuste de modelos matemáticos empíricos aos dados experimentais obtidos através de uma determinada matriz experimental, com o objetivo de descrever o comportamento dos dados e realizar previsões estatisticamente válidas (Novaes *et al*., 2017).

2.10. Técnicas Espectrométricas

Diferentes técnicas espectrométricas são utilizadas na determinação elementar, sendo estas aplicadas à análise de uma ampla variedade de amostras. A escolha da técnica ideal a ser utilizada depende do objetivo do trabalho, quais os analitos de interesse que se deseja quantificar, bem como a sensibilidade desejada, a detectabilidade e precisão necessária para cada estudo em desenvolvimento. Há uma gama de variedade de técnicas para determinação elementar, assim a escolha deve ser baseada em alguns parâmetros, como a faixa de concentração do analito, espécie de analito a ser determinado, estado da amostra, entre outros (Agilent Technologies, 2016; Karlsson *et al.*, 2015). Neste contexto, pode-se destacar técnicas instrumentais como a espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS), espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS), espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP MS), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES) (Gonzales e de la Guardia, 2013).

As técnicas espectrométricas que seguem o princípio da absorção atômica convencional como o F AAS e o GF AAS, utilizam como fonte de radiação lâmpadas de cátodo oco que apresentam, para cada elemento analisado, comprimento de onda específico. São técnicas monoelementares o que resulta em um maior tempo de análise em comparação as técnicas instrumentais multielementares (Balaram, 2020; Gomes, 2021, Gonzales e de la Guardia, 2013; Scherdien, 2022). As técnicas que utilizam plasma como fonte de atomização como o ICP OES e o MIP OES, costumam se destacar, pois possuem diversas vantagens como diminuição no tempo de análise já que se trata de técnicas multielementares, disponibilidade de várias linhas espectrais intensas para cada elemento, maior energia na sua atomização devido ao gás de manutenção do plasma. A técnica de ICP OES possui maior destaque devido a sua alta sensibilidade, assim como baixos limites de detecção, mas em contrapartida apresenta um alto custo operacional pela utilização do plasma de argônio (Gomes, 2021; Scherdien, 2022). Com isso, a técnica de MIP OES é uma alternativa, como relatado por Muller *et al*. (2020), a qual destaca a grande aplicabilidade desta técnica em diferentes alimentos. Considerado uma

interessante alternativa, não só por apresentar características de análise multielementar, o que resulta em uma diminuição no tempo de análise e o consumo da amostra, mas também por utilizar nitrogênio retirado do ar atmosférico para a manutenção do plasma, diminuindo significativamente os custos das análises (Agilent Technologies, 2016; Leão *et al*., 2017; Diniz *et al.,* 2017; Bonemann *et al*., 2021; Louzada *et al*., 2022).

2.10.1. Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Micro-ondas (MIP OES)

Neste contexto, a técnica de MIP OES vem ganhando visibilidade e se tornando uma alternativa a outras técnicas de espectrometria. Nesta técnica, é no plasma onde ocorre a formação de micro-ondas que são responsáveis por transmitir a energia para os elétrons que estão presentes nas moléculas dos gases, esta energia promove a perturbação do sistema ocorrendo à colisão ionizante e o mesmo fica parcialmente ionizado, ocorrendo assim o plasma induzido por micro-ondas, onde atuam com frequência na região de GHz (Agilent Tchenologies, 2016; Muller *et al*., 2020).

Após o equipamento entrar em operação, o gás é substituído por N_2 que é retirado do ar atmosférico, a alimentação do plasma ocorre por via de um compressor de ar e um gerador de N_2, diminuindo significativamente o custo das análises, além de se tratar de uma técnica multielementar o que diminui o tempo gasto nas análises (Agilent Technologies, 2016; Leão *et al.,* 2017; Diniz *et al.,* 2017; Bonemann *et al.,* 2021; Louzada *et a*l., 2022).

Conforme apresentado na Figura 11, o equipamento é constituído por um sistema de introdução de amostra, possui também uma fonte de excitação utiliza-se um gerador de micro-ondas, assim como um sistema de alimentação do gás do plasma e um sistema óptico de computador (Agilente Tchnologies, 2016).

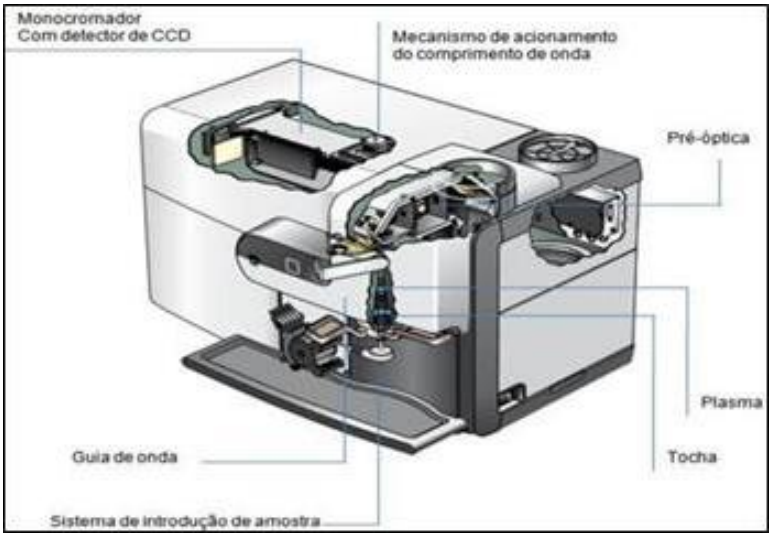


Figura 11. Principais componentes do MIP OES.
Fonte: Agilent Tchnologies, 2016

A introdução da amostra no equipamento de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas é feita através do uso de uma bomba peristáltica, que possui a função de levar a amostra até o nebulizador pneumático onde à amostra é convertida em aerossol com o auxílio do gás nitrogênio, conforme descreve a Figura 12.

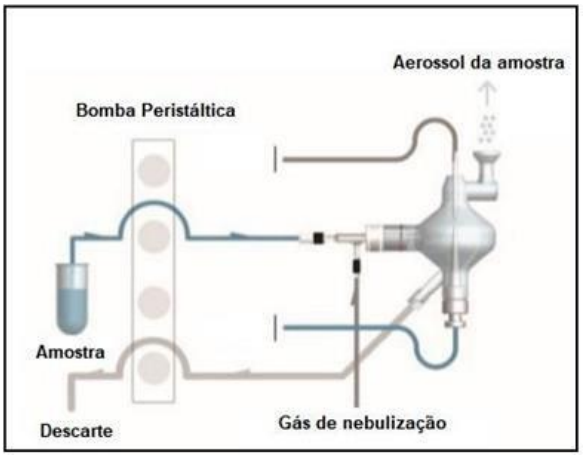


Figura 12. Sistema de introdução de amostras do modo convencional
Fonte: Agilent Tchnologies, 2016.

De acordo com a Figura 13, desta forma, no nebulizador ocorre a homogeneização das partículas do aerossol, condensando as de maior diâmetro e deixando passar para o plasma um aerossol mais finamente disperso. Quando o aerossol atinge o plasma é convertido em átomos, moléculas e íons pelas etapas de

dessolvatação, vaporização, atomização e ionização. A radiação emitida pelo plasma é dirigida para o detector de dispositivo de carga acoplada (CCD) que medirá simultaneamente os espectros de sinal de fundo, garantindo precisão e bons imites de quantificação (Agilent Tchnologies, 2016).

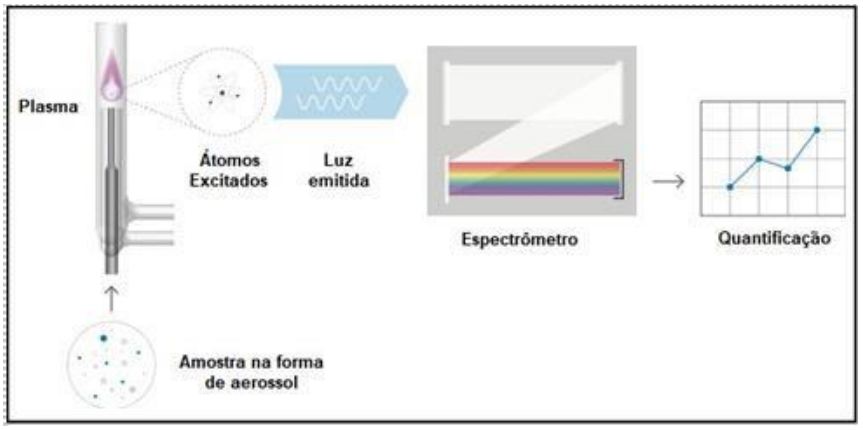


Figura 13. Diagrama esquemático do espectrofotômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.
Fonte: Agilent Tchnologies, 2016.

Considerando todos estes fatores, a técnica de MIP OES vem sendo considerada uma interessante alternativa, podendo ser aplicada em análises de rotina, possuindo ampla aplicação em diversas matrizes, como em amostras de alimentos, ambientais, agrícolas, minerais, farmacêuticas, dentre outras (Muller *et al.,* 2020).

2.10.2. Espectrometria de Absorção na região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis)

A Espectrofotometria UV-VIS é definida como uma técnica analítica capaz de determinar a presença e/ou concentração de um analito de interesse, baseando-se em medidas de absorção/transmissão de radiação eletromagnética, nas regiões ultravioleta e visível do espectro eletromagnético. A absorção de energia depende da estrutura eletrônica da molécula, e por isso, a espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, tem ampla aplicação na caracterização de diversas espécies orgânicas e inorgânicas. pois cada composto químico possui um comprimento de onda característico para cada molécula, sendo possível a identificação do composto

químico através do seu “espectro de absorção”, a instrumentação base desta técnica esta apresentada na Figura 14 (Júnior et al., 2013; Skoog, 2002).

Figura 14. Espectrômetro de absorção na região Ultravioleta e Visível (UV-*Vis*).
Fonte: Perkin Elmer, 2011.

O princípio da técnica de espectroscopia de baseia-se nas medidas de absorção de radiação eletromagnética nas regiões do visível e do ultravioleta do espectro. Então desta maneira, mede-se a quantidade de luz absorvida pela amostra relacionando com a concentração em que o analito se encontra na solução. Em uma solução, a espécie absorvente é circundada pelo solvente e a natureza da banda da absorção molecular torna-se indistinta, pois as colisões tendem a desdobrar as energias dos estados quânticos, originando picos de absorção suavizados e contínuos.

A lei da absorção molecular esta associada a Lei de Lambert-Beer, onde revela que quantitativamente esta grandeza depende da concentração das moléculas absorvidas com o caminho óptico que a luz irá percorrer. À medida que a luz atravessa o caminho óptico, o analito absorve a radiação eletromagnética, onde um decréscimo de intensidade ocorre na proporção que o analito é excitado. Desta forma, o equipamento possui os componentes descritos na Figura 15 (Skoog, 2002).

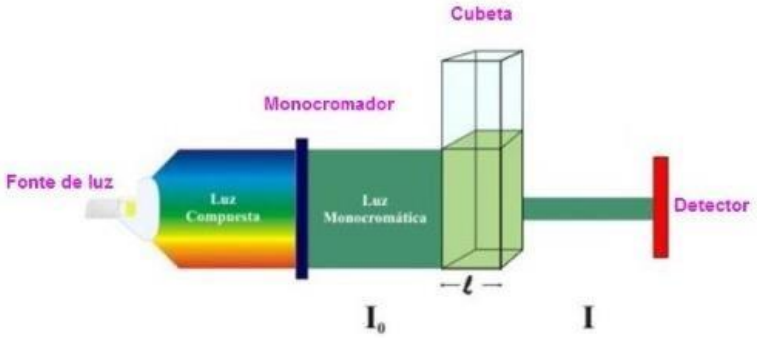


Figura 15. Diagrama esquemático de um instrumento espectroscópico.
Fonte: Siqueira, 2018.

Os espectrofotômetros, em geral, possuem uma fonte estável e contínua de energia radiante, que é encontrada como uma lâmpada de deutério ou tungstênio que irá produzir a radiação na faixa completa do equipamento. Essa energia passará pelo monocromador que são determinados como dispositivo essencial em espectrofotômetros, que possui a função de selecionar o comprimento de onda que se tem interesse durante a análise, é constituído por uma fenda de entrada, de um elemento de dispersão de radiação e de uma fenda de saída, este elemento de dispersão pode ser o prisma ou uma rede de difração.

Após a seleção do comprimento de onda, a radiação passa pelo recipiente que contém a amostra, ou seja, as cubetas, que possuem 1 cm para que colabore com a Lei de Lambert-Beer. A radiação selecionada passará pela amostra, que absorverá a quantidade necessária de energia e o restante sairá diretamente para o detector. Este componente apresentará a cor complementar ao comprimento de onda escolhido e assim apresentando no sistema de leitura a absorbância que da amostra orgânica.

Esta técnica é utilizada, neste caso, por se tratar de amostras que possuem coloração e sua absorbância possa ser medida através da intensidade desta coloração. Desta maneira, quando um foco de luz monocromático incide sob a substância colorida, a intensidade da luz absorvida é proporcional à concentração da espécie colorida (Skoog, 2002).

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

O presente estudo tem como finalidade a determinação da concentração total de Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn em amostras de microgreens para posterior comparação aos seus correspondentes crescidos, utilizando a técnica de MIP OES. Assim como a determinação complementar de compostos bioativos presentes em sua composição.

3.2. Objetivos Específicos

- Desenvolvimento de método analítico de preparo de amostra que seja simples, rápido, com custo acessível e eficiente para a determinação das concentrações de elementos essenciais em amostras de microgreens e seus correspondentes crescidos para posterior comparação;
- Verificação da exatidão do método a partir de materiais de referência certificados;
- Comparação do teor de minerais nas amostras de microgreens e seus correspondentes crescidos;
- Quantificação dos compostos fenólicos presentes na composição das amostras;
- Determinação do potencial antioxidante nas amostras;
- Determinação do teor de clorofila presente nas amostras vegetais.

4. Materiais e Métodos

4.1. Instrumentação

Um espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES) modelo Agilent 4200 (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia) equipado com um nebulizador OneNeb séries 2 e uma câmara de nebulização ciclônica, foi utilizado para a determinação das concentrações dos elementos essenciais como Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn. O nitrogênio que é utilizado para a manutenção do plasma é proveniente do ar atmosférico a partir de um compressor (modelo MSV12 da Schulz, Joinville, Brasil), o qual é convertido por um gerador de nitrogênio (modelo 4107 da Agilent Techonologies, Melbourne, Austrália) com vazões de 20 L min^{-1} e 1,5 min^{-1} para o gás de plasma e de 1,5 min^{-1} para o gás auxiliar (nebulização). Para que ocorra a ignição do plasma, foi utilizado um pequeno fluxo de Ar com pureza de 99,996% (Agilent Technologie, Califórnia).

As medidas das amostras foram realizadas em triplicata, onde a bomba peristáltica possui uma velocidade de 15 rpm e tempo de aspiração de 15 s, a estabilização em 15 s e cada tempo de leitura de 3 s, com uma correção automática dos sinais de fundo por meio de uma diminuição dos valores dos brancos.

Todas as amostras de microgreens e seus correspondentes crescidos, antes das extrações, foram cortadas em pequenos pedaços com o auxílio de uma tesoura de uso doméstico, previamente descontaminada. As amostras foram pesadas utilizando uma balança analítica (modelo AR 2140 da Ohaus Adventurer, Parsippany, EUA). Para a extração das amostras foi utilizado o banho ultrassônico (modelo S40H da Elmassonic, Alemanha). E para a quantificação dos compostos bioativos foi utilizado um equipamento de espectrômetro UV-*Vis* do modelo Lambda 25 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts) e para a extração das clorofilas, utilizou-se uma centrífuga (Quimis).

4.2. Reagentes e Padrões

Todos os reagentes utilizados possuem grau de pureza analítico. Nas soluções preparadas utilizou-se água desionizada, a qual foi obtida através de um destilador de vidro (modelo MA-075 da Marconi, Piracicaba, Brasil) seguido de sua

desionização a partir de uma coluna com resina mista catiônica e aniônica (modelo CS1800 da Permution, Curitiba, Brasil).

As soluções dos analitos foram preparadas a partir de uma solução estoque 6 para ICP OES (Sigma – Aldrich, Alemanha) de 100 mg L^{-1} de cada analito. Para a etapa de preparo de amostra foi utilizado ácido nítrico (HNO_3) (Dinâmica, Brasil) que passou por um processo de bidestilação abaixo do seu ponto de ebulição em um destilador de quartzo, (modelo MA-075, Marconi, Brasil). Para a etapa de filtração utilizou-se papel filtro quantitativo C42 (faixa azul), diâmetro 125 mm (Unifil, Alemanha). Também utilizou-se para a extração de clorofila, acetona P.A ACS (C_3H_6O) (Êxodo Científica), para a extração dos demais compostos bioativos foi utilizado metanol P.A –ACS (CH_3OH) (Dinâmica, Brasil). Para as reações referente aos compostos fenólicos foi utilizado o reagente Folin-Ciocalteu´s Phenol 2 N e carbonato de sódio (Na_2CO_3) (Sigma Aldrich, Brasil), para a quantificação foi utilizado ácido gálico. Na determinação de antioxidantes foi utilizado o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) Sigma Aldrich e a quantificação ocorreu por meio do reagente Trolox (Sigma – Aldrich, Alemanha).

Os materiais de referência certificado utilizados para avaliar a exatidão método, foram a folha de tomate (CRM-Agro C1003a) produzido pelo Laboratório de Radioisótopos – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (USP, Piracicaba, SP); cana-de-açúcar (CRM-Agro C1005a) elaborado pelo Laboratório de Radioisótopos – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (USP, Piracicaba, SP) e folha de espinafre (CRM 1570ª) fabricado pelo *National Institute of Standards and Technologies*. Todos os materiais e vidrarias ficaram 48 horas em um banho de descontaminação com HNO_3 10%v/v, após o tempo determinado foram enxaguadas com água desionizada e secos a temperatura ambiente.

Todas as soluções resultantes que foram analisadas pelo equipamento (MIP OES), quando se fez necessário foram diluídas, isto devido ao fato de não ser recomendado a solução das amostras ultrapassarem 3% de m/v de sólidos dissolvidos e 5% v/v de acidez, de acordo com as recomendações dispostas pelo fabricante do equipamento (Agilent Technologies, 2016).

4.3. Amostras

As amostras analisadas de microgreens e seus correspondentes crescidos foram adquiridas no comércio local da região (Pelotas/RS, Brasil). As mesmas foram lavadas com água desionizada e cortadas com o auxílio da tesoura para a obtenção de uma superfície de contato maior no momento da extração. As amostras foram acondicionadas em frascos de polipropileno (PP) de 50 mL, sendo estas identificadas e armazenadas a -16°C em um refrigerador para posterior análise.

As amostras obtidas dos dois estados de crescimento de cada vegetal são rabanete, repolho roxo, couve, rúcula, mostarda (pertencentes à família *Brassicaceae*), cebola (família *Amaryllidaceae*).

4.4. Otimização da Condições de Extração dos Metais

Para uma melhor avaliação da etapa de preparo de amostra e quantificação dos analitos de interesse através de uma extração ácida em amostras de microgreens e seus correspondentes crescidos, foi proposto um planejamento de otimização multivariado. O trabalho foi baseado no estudo designado por Pereira Filho et al., (2020), sendo realizado um planejamento fatorial do tipo Delineamento de Composto Central Rotacional (DCCR) 2^3, com três réplicas do ponto central e 6 pontos axiais totalizando assim 17 experimentos. As variáveis estudadas foram a concentração do ácido nítrico (mol L^{-1}), o tempo de sonificação (minutos) e a temperatura (°C) em dois níveis, apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Variáveis e níveis estudados no planejamento multivariado para a otimização das condições de extração.

Variáveis	**Níveis**				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Concentração (mol L^{-1})	0,32	1,0	2,0	3,0	3,68
Tempo (minutos)	3,3	5	7,5	10	11,7
Temperatura (°C)	40	50	60	70	80

A partir dos ensaios aleatórios designados pelo planejamento, foram realizadas leituras de cada solução resultante com o intuito de observar a

maximização da intensidade do sinal das intensidades de cada analito dentro dos parâmetros de interesse, e desta maneira aplicando a fórmula de desejabilidade. As respostas foram analisadas posteriormente pela análise de variância, onde contou com o auxílio de gráficos de Pareto e superfície de respostas, esses modelos combinados a maior desejabilidade estabeleceram a melhor condição de trabalho de extração para todos os analitos de interesse. Para a análise destes dados foi utilizado o *software Statistica 7.0* (Statsoft, 2004).

4.5. Condições Experimentais

4.5.1. Extração dos Metais

A etapa de preparo de amostras para a determinação elementar nas amostras através do uso de uma extração ácida assistida por ultrassom prosseguiu-se fixando as condições ideais de trabalho proposta pelo estudo feito a partir do planejamento, assim, pesou-se 0,5 g de cada amostra vegetal diretamente em tubos de polipropileno, posteriormente foram adicionados 14 mL de HNO_3 diluído na concentração de 1 mol L^{-1} e levados ao banho ultrassônico a uma temperatura de 60°C por 10 minutos.

Após o tempo de extração, os tubos com as amostras foram retirados do banho ultrassônico e a solução resultante foi filtrada para a posterior análise das concentrações dos analitos de interesse por MIP OES.

4.5.2. Extração dos Compostos Bioativos

A metodologia do preparo do extrato que foi utilizado para as determinações dos compostos fenólicos totais e do potencial antioxidante das amostras foi descrito por Antunes *et al.*, (2021). Desta forma, pesou-se 1 g de amostra *in natura* diretamente nos tubos de polipropileno, em seguida adicionou-se 5 mL de metanol. A mistura resultante foi armazenada por 24 horas em temperatura ambiente e na ausência de luz, o extrato resultante pode ser utilizado para as demais determinações.

4.5.3. Determinação dos Compostos Fenólicos Totais

Para a determinação dos compostos fenólicos totais presentes nas folhas analisadas, utilizou-se a método de Folin-Ciocalteu descrita por Antunes *et al*., (2021), o qual consiste em retirar uma alíquota de 0,5 mL do extrato obtido na etapa (4.5.2), acrescentar a 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (0,2 N), posteriormente, esta mistura foi deixada em repouso por 5 minutos. Após o tempo determinado adicionou-se 2.0 mL da solução de Na_2CO_3 (7,5%). A mistura foi mantida em temperatura ambiente por um tempo de 2 horas na ausência de luz. E, sua absorbância foi determinada pelo equipamento UV-*Vis* a um comprimento de onda referente a 725 nm.

Para a calibração e posterior quantificação da concentração dos compostos fenólicos presentes, uma curva de calibração de ácido gálico foi construída para calibração. Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico por 100 g de matéria fresca (mg EAG.100g^{-1}).

4.5.4. Determinação da Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante total é descrita pelo método de sequestro de radicais livres, o qual baseia-se na habilidade dos antioxidantes presente nas amostras se ligarem ao radical DPPH•. A metodologia utilizada para esta determinação foi descrita por Brand-Willians *et al*., (1995), inicialmente foi necessário o preparo de uma solução mãe do radical, a qual consiste em pesar 24 mg de DPPH e diluir 100 mL de metanol, sendo a solução armazenada a -20°C. Desta solução preparada, retira-se uma alíquota de 10 mL e dilui-se em 45 mL de metanol, a qual deverá ser prepara somente no dia das análises, já que é a solução de trabalho, desta forma sua absorbância deverá ser ajustada de 1,08-1,12 em um comprimento de onda de 515 nm.

Para dar início a reação de determinação de antioxidantes adiciona-se em um tubo de polipropileno 100 µL do extrato (obtido no item 4.5.2), posteriormente acrescenta 3,9 mL da solução do radical DPPH recentemente preparado e com a absorbância ajustada, a mistura resultante é agitada por 30 segundos com o auxílio de um vórtex e as soluções são incubadas por 2h30min em temperatura ambiente e

na ausência de luz. Após o tempo determinado, as soluções foram lidas a uma absorbância de 515 nm.

Para a quantificação destas amostras foi realizada uma curva de calibração de Trolox. Os resultados foram expressos em µmol de TEAC por g de massa fresca.

4.5.5. Determinação do Teor de Clorofila

Para a avaliação do teor de clorofila presente nas amostras de microgreens e seus correspondentes crescidos foi seguida a metodologia descrita por Antunes *et al*., (2021). Desta forma, pesou-se 1,0 g de amostra *in natura* diretamente nos tubos de polipropileno e adicionou-se 5 mL de acetona 80% (v/v), os tubos foram levados a centrífuga por 15 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de polipropileno e novamente repetido o mesmo procedimento já descrito anteriormente, este procedimento foi repetido cinco vezes até que atinja o volume final de 25 mL do extrato.

O extrato resultante foi submetido a uma leitura de absorbância no espectrofotômetro UV-*Vis* a um comprimento de onda de 647 e 663 nm, referente às clorofilas '*a*' e '*b*'. E, seus resultados, foram expressos em mg g^{-1} de massa fresca.

5. Resultados e Discussões

5.1. Parâmetros de Mérito

Os parâmetros de mérito para a determinação multielementar das concentrações totais de Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn nas amostras de microgreens e seus correspondentes crescidos a partir da metodologia de extração ácida foram obtidos por MIP OES, sendo o resultado apresentado na Tabela 4. A faixa linear utilizada foi de 0,1 a 5,0 mg L^{-1}, que foi determinada pela linearidade da curva e os padrões de calibração foram preparadas nas mesmas condições das amostras, ou seja, um caráter ácido proporcional.

Tabela 4. Parâmetros de mérito para os elementos de interesse obtidos a partir das leituras por MIP OES.

Elementos	Curva analítica (mg L^{-1})	*a* (L mg^{-1})	R^2	$LOD_{(m)}$ (mg kg^{-1})	$LOQ_{(m)}$ (mg kg^{-1})
Ca	0.1 – 5.0	1132442	0,997	0,84	2,79
Fe	0.1 – 5.0	14435	0,999	0,07	0,22
K	0.1 – 5.0	31615	0,999	0,09	0,31
Mg	0.1 – 5.0	373423	0,999	0,09	0,30
Mn	0.1 – 5.0	65215	0,999	0,01	0,04
Na	0.1 – 5.0	53157	0,999	0,19	0,64
Zn	0.1 – 5.0	23872	0,999	0,28	0,93

a: inclinação da curva analítica; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; R^2: coeficiente de correlação linear.

Através dos resultados obtidos, verifica-se que as curvas de calibração para todos os analitos de interesse apresentam bons coeficientes de correlação linear ao quadrado, com valores superiores a 0,99, como estabelecido pelo Inmetro. Além disso, o método proposto apresentou limites de detecção e quantificação adequados ao objetivo do trabalho.

Os limites de detecção e quantificação apresentados na Tabela 5 disposta acima, foram realizados seguindo as equações de 3 a 6. Os cálculos precederam a partir de dez leituras do branco analítico, considerando os valores obtidos referentes ao desvio padrão e valores de Concentração Equivalente de Fundo (BEC – *Background Equivalent Concentration*) obtido para cada analito (Silva, *et al.*, 2002; Araújo, 2007; Bonemann, 2019).

$$BEC = \frac{C_{ponto\ da\ curva}}{SBR} \qquad Equação\ 3$$

$$SBR = \frac{I_{ponto\ da\ curva} - I_{branco}}{I_{branco}} \qquad Equação\ 4$$

$$LQ_i = \frac{10 * SRD_{branco} * BEC}{100} \qquad Equação\ 5$$

$$LD_i = \frac{3 * SRD_{branco} - BEC}{100} \qquad Equação\ 6$$

Sendo:

RSD: Desvio padrão da leitura do branco (n=10)

BEC: Concentração equivalente do fundo

$C_{padrão}$: Concentração de um padrão da curva analítica

$I_{padrão}$: Intensidade do sinal de emissão do padrão da curva escolhido

I_{branco}: Intensidade do sinal de emissão do branco analítico

SRB: Razão entre o sinal de emissão e sinal de fundo.

5.2. Otimização Multivariada das Condições de trabalho

A otimização multivariada foi realizada para a avaliação da melhor condição experimental para as amostras de microgreens e seus correspondentes. Desta forma, as variáveis e os níveis em que o preparo de amostras foi submetido no planejamento juntamente com os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 5. O resultado com maior desejabilidade, ou seja, mais próxima de 1 foi utilizada como melhor condição.

Tabela 5. Variáveis do planejamento multivariado e respostas obtidas expressas em intensidades e suas desejabilidade global.

	Ác.	T.	Temp.	Zn	Ca	Fe	K	Mn	Mg	Na	Desejabilidade
1	1	5	50	6879,68	6412804	1728,42	1259700	4514,11	1718250	2047078	0
2	3	5	50	10763	5977248	4054,88	1260350	4710,1	1739010	2441296	0,37919
3	1	10	50	9007,22	6564111	1948,6	1290502	4936,48	1824869	2524631	0,2826
4	3	10	50	10824	6169458	4416,33	1302985	4942,02	1758377	2364460	0
5	1	5	70	11559,9	5766802	2513,31	1236288	4560,98	1625053	2356646	0
6	3	5	70	15960,3	6087224	4734,58	1325813	4955,84	1728799	2502605	0,41509
7	1	10	70	16258,9	6234041	4060,27	1445788	5952,43	1892022	2971231	0,84464
8	3	10	70	16494,3	5392267	3524,07	1241083	4341,6	1489416	2213542	0
9	0,32	7,5	60	11223,6	5983440	1033,03	1349864	5056,26	1706188	2754877	0
10	3,68	7,5	60	18683,9	6682123	3438,31	1285652	4179,67	1461242	2629863	0
11	2	3,3	60	16961,7	5874992	2891,15	1379278	4780,06	1495405	2724661	0,48062
12	2	11,7	60	14482,9	5699445	2160,62	1311291	4826,31	1502579	2567333	0
13	2	7,5	43	11937,4	6322152	2148,23	1383214	4861,07	1517027	2641664	0,43182
14	2	7,5	77	7362,79	5899762	4283,81	1281546	4288,11	1402443	2936022	0
15	2	7,5	60	6977,06	5804213	2884,39	1333129	5251,26	1445493	2949014	0,27555
16	2	7,5	60	6724,52	5777620	2874,38	1349628	5363,35	1462815	3033336	0,24028
17	2	7,5	60	6603,53	6060709	3123,46	1375626	5475,9	1437326	2878879	0

Ác: ácido nítrico (mol L^{-1});
T: tempo (minutos);
Temp: temperatura (°C).

A partir dos valores encontrados na tabela e do *software Statistic*, estes foram avaliados pela ANOVA e os resultados foram observados a partir do gráfico de Pareto originado dos resultados do planejamento. O gráfico gerado está apresentado na Figura 16, considerando os efeitos avaliados a 95% de confiança, que são os efeitos que excedem a linha tracejada vermelha, ou seja, as barras horizontais que ultrapassarem esta linha serão efeitos significativos entre as variáveis observadas. Todas as variáveis observadas foram realizadas considerando os pontos axiais propostos pelo planejamento.

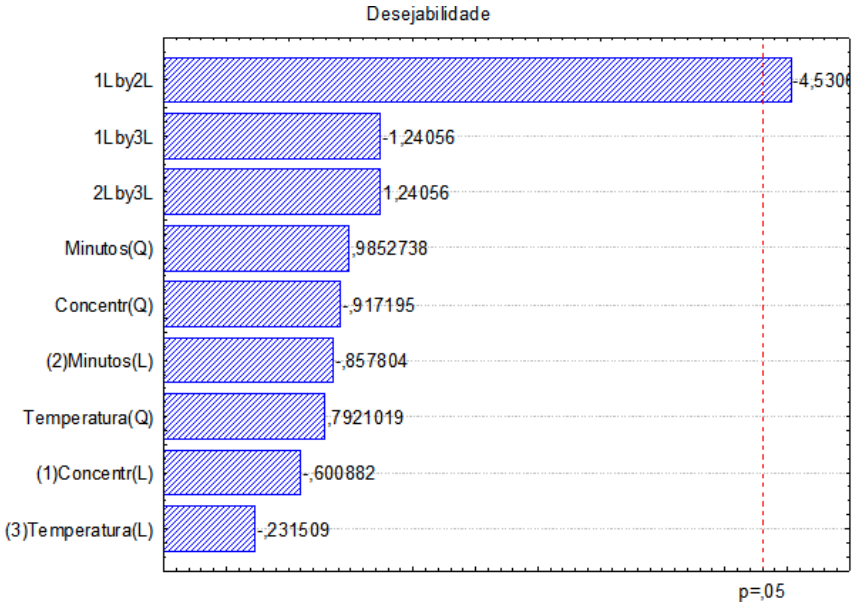


Figura 16. Gráfico de Pareto com os efeitos estimados obtido a partir da desejabilidade global.

Observando o gráfico gerado nota-se que nenhuma variável foi significativa, quando considerada individualmente. No entanto percebe-se que a interação concentração e tempo de sonicação possui efeito significativo negativo. Desta forma, optou-se em utilizar a variável concentração no nível -1, levando em consideração um método mais ambientalmente amigável, interpreta-se que a melhor zona de resposta é obtida quando menor a concentração do ácido maior o tempo de sonicação da extração.

Além do gráfico de Pareto, foi gerado um gráfico de superfície de resposta, apresentado na Figura 17.

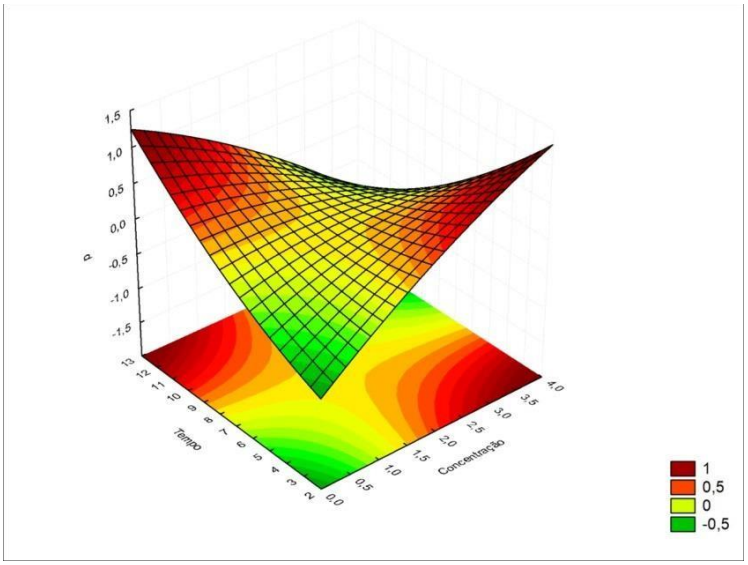


Figura 17. Gráfico de superfície de resposta gerado a partir da desejabilidade global.

De acordo com a desejabilidade global destaca-se o gráfico acima, onde é possível notar os espaços observáveis do experimento. Dentro desta superfície, observou-se duas respostas localizadas na área vermelha do gráfico, onde uma poderia favorecer uma concentração de ácido maior combinado a diminuição do tempo. Por possuir vantagens a utilização do ácido mais diluído em relação a diversas questões relacionadas tanto para as análises no fator de acidez quanto para a colaboração com os princípios da química verde, optou-se por um ácido mais diluído com um maior tempo de sonicação. Ou seja, elas podem ser interpretadas utilizando-as em níveis opostos, mostrando um efeito antagonista entre uma e outra, quanto menor a concentração do ácido, a extração será favorecida com um maior tempo.

Desta forma, optou-se em utilizar a variável concentração no nível -1, levando em consideração um método mais ambientalmente amigável, interpreta-se que a melhor zona de resposta é obtida quanto menor a concentração do ácido maior o tempo de sonicação da extração.

Desta maneira, a partir do que foi observado, fixou-se a variável concentração do ácido no nível -1(1,0 mol L^{-1}), e a variável tempo em +1 (10 minutos) e a temperatura permaneceu o ponto central 0 (60°C), visto que esta não possui influência no método.

5.3. Avaliação da Exatidão

Após a otimização do método de extração ácida por ultrassom para a determinação multielementar nas amostras de microgreens e seus correspondentes crescidos por MIP OES, avaliou-se a exatidão da metodologia proposta através do uso de Materiais de Referência Certificado, foram utilizados três CRMs que possuíam a matriz mais semelhante à amostra a ser analisada, onde passou pelos mesmos processos de extração das amostras. Foram aplicados de Folha de Tomate (CRM-Agro C1003a), Folha de Espinafre (CRM-Agro C1570a) e Folha de Cana-de-açúcar (CRM-Agro C1005a). Todas as amostras foram realizadas em triplicata. Os resultados obtidos de recuperação para cada analito estão dispostos na Tabela 6, sendo calculados a partir da equação 7.

Tabela 6. Resultados analíticos obtidos para a determinação de Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn por MIP OES em diferentes Materiais de Referências Certificado.

Analitos	**Folha de Tomate**		
	Certificado (mg/kg)	**Encontrado (mg/kg)**	**Recuperação (%)**
Ca	27400 ± 4400	30968 ± 1580	113
Fe	1120 ± 190	940 ± 40	84
K	43300 ± 3800	43024 ± 1683	99
Mg	4110 ± 360	3505 ± 60	85
Mg	470 ± 69	445 ± 16	95
Zn	37,5 ± 5	40,1 ± 2	107
	Folha de Espinafre		
Ca	15260 ± 0,066	13585 ± 3265	89
K	29000 ± 0,026	25780 ± 2180	89
Mn	76 ± 1	62 ± 4	81
Na	18210 ± 0,023	15864 ± 1351	87
Zn	82,3 ± 3,9	72,8 ± 3,5	88

Folha de Cana-de-Açúcar

Ca	4378 ± 150	4095 ± 317	93
K	16190 ± 720	15043 ± 1004	93
Mg	1517 ± 75	1600 ± 139	105
Mn	126 ± 6	127 ± 3	100
Zn	13,3 ± 0,87	10,7 ± 0,8	80

Média ± desvio padrão (mg/kg); Recuperação (%);

Para as estimações dos valores de recuperação, utiliza-se a seguinte fórmula:

$$Recuperação\ (\%) = \left(\frac{Média\ das\ concentraçãoes}{Valor\ certificado}\right) * 100 \qquad \text{Equação 7}$$

Após a realização dos cálculos, foram obtidos valores para as recuperações dos analitos de interesse, variando de 81 a 113% estando dentro da faixa aceitável que é de 80 as 120%, comprovando assim a exatidão do método desenvolvido para a análise dos analitos por MIP OES, conforme ilustrado nos Anexos de A e B para o CRM de folha de tomate, Anexos C e D para a folha de espinafre e Anexos E e F para a folha de cana-de-açúcar.

5.4. Determinação da concentração elementar

Após a etapa de preparo de amostras e a avaliação da exatidão do método proposto, foi aplicada a condição ótima de trabalho para as amostras de microgreens e seus respectivos crescidos, e os valores das concentrações obtidas estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Determinação elementar em amostra de microgreens e seus correspondentes crescidos.

Amostras	Microgreens					
	Cebola	Couve	Mostarda	Rabanete	Repolho Roxo	Rúcula
Ca	974 ± 89	640± 78	802,52 ± 0,23	855 ± 32	938 ± 97	638,55 ± 39,18
Fe	14,4 ± 1,4	2,33 ± 0,32	4,75 ± 0,003	3,5 ± 0,2	2,98 ± 0,70	3,90 ± 0,38
K	2228 ± 206	2627 ± 216	2992 ± 49	2070 ± 9	1935 ± 18	2693 ± 15
Mg	6,42 ± 0,03	800 ± 70	5,78 ± 0,40	894 ± 28	907 ± 59	798 ± 15
Mn	13,8 ± 0,9	8,67 ± 0,39	5,96 ± 0,43	5,78 ± 0,16	8,09 ± 0,74	4,83 ± 0,16
Na	57,5 ± 2,4	110 ± 8	88,2 ± 3,6	92,9 ± 6,5	147 ± 7,6	53,3 ± 1,1
Zn	3,9 ± 0,23	6,89 ± 0,43	5,31 ± 0,49	9,70 ± 0,57	10,3 ± 0,8	8,63 ± 0,54
Amostras	**Vegetais Crescidos**					
	Cebola	**Couve**	**Mostarda**	**Rabanete**	**Repolho Roxo**	**Rúcula**
Ca	1582 ± 1	27,1 ± 1,9	1888 ± 68	87,2 ± 5,2	42,9 ± 0,6	72,2 ± 6,3
Fe	2,1 ± 0,2	6,56 ± 0,18	8,05 ± 0,62	1,39 ± 0,01	3,34 ± 0,25	6,44 ± 0,48
K	3456 ± 139	60,26 ± 2,44	4802 ± 63	2550 ± 66	2324 ± 66,2	32,47 ± 1,84
Mg	348 ± 20	4,1 ± 0,2	9,48 ± 0,33	68,5 ± 0,9	138 ± 4,7	4,57 ± 0,32
Mn	2,66 ± 0,19	10,9 ± 0,5	6,69 ± 0,37	0,557 ± 0,003	2,78 ± 0,03	8,77 ± 0,81
Na	6,57 ± 0,20	74,8 ± 2,3	38,9 ± 2,8	78,4 ± 6,7	41,9 ± 0,7	38,9 ± 1,6
Zn	3,22 ± 0,20	5,87 ± 0,39	6,6 ± 0,15	1,51 ± 0,04	2,81 ± 0,18	13,9 ± 0,64

Concentração expressa em x: (mg kg^{-1}); sd: desvio padrão (mg kg^{-1});

A partir dos resultados apresentados na Tabela 4, foi possível observar que todos os analitos possuem concentrações consideráveis em todas as amostras estudadas. Os valores encontrados a partir deste estudo foram comparados a valores encontrados na literatura, levando em consideração o trabalho feito por Xiao *et al*. (2012), no qual os autores ressaltam que os microgreens poderiam apresentar maiores concentrações de elementos essenciais em relação aos seus correspondentes crescidos. Em contrapartida, para o presente estudo, observa-se que nem todas as amostras obtiveram este comportamento.

Para o Ca, observa-se que a maior parte das amostras em questão possuem concentrações maiores para os microgreens, exceto as amostras de cebola e couve que apresentaram maiores concentrações nos vegetais crescidos, onde sua ingestão diária recomendada é de 1000 mg, conforme mostrado no Anexo G.

Já para o Fe, as amostras de cebola, couve e rabanete mostraram o comportamento descrito na literatura, o restante das amostras apresentou o comportamento inverso, ilustrado no Anexo H. Também levando em consideração a quantidade de 14 mg da ingestão diária do analito.

Considerando o K, a maioria das amostras apresentaram maiores concentrações dos analitos analisados nas amostras de vegetais crescidos, somente a couve e o rabanete mostraram maiores concentrações para os microgreens, o que está dentro do limite de ingestão diária do analito, que se refere a 3500 mg, de acordo com o Anexo I.

Já para o Mg, as amostras de couve, rabanete, repolho roxo e a rúcula disponibilizaram concentrações mais elevadas para os microgreens, o restante das amostras apresentou variações, fazendo com que os vegetais crescidos apresentassem maiores concentrações. Levando-se em consideração o seu limite de ingestão diária, a concentração deste analito está dentro do indicado, não ultrapassando 260 mg, apresentado no Anexo J.

Para o Mn, quatro amostras apresentaram boas concentrações dos respectivos elementos essenciais para os microgreens, sendo elas a cebola, rabanete e o repolho roxo, as outras amostras intituladas couve, rúcula e mostarda apresentaram maiores concentrações para os vegetais crescidos. Para este micronutriente é sugerido ingestão de 2,3 mg/dia, estando as

amostras analisadas dentro do limite recomendado. Conforme descrito no Anexo K.

Somente o Na seguiu o comportamento descrito na literatura, onde todas as amostras de microgreens analisadas possuíram concentrações maiores em comparação aos vegetais crescidos. Para este analito o limite de ingestão diário é representado por 2000 mg/dia, conforme a ilustração no Anexo L.

Para o Zn, a maior parte das amostras de cebola, couve, rabanete e repolho roxo apresentaram maiores concentrações para os microgreens, já o restante das amostras mostrou-se com o comportamento inverso ao descrito na literatura. Utilizando a quantidade de ingestão diária deste analito, que é referente a 7 mg, a análise mostrou que para todas as amostras está dentro deste limite, de acordo com o Anexo M.

Desta maneira, nota-se que as amostras analisadas não seguiram por completo o comportamento descrito na literatura, de acordo com o trabalho de Xiao *et al.,* (2012), onde os autores verificaram concentrações mais elevadas para todos os analitos de interesse. De fato, todas as amostras, nos dois estágios analisados, apresentaram altas concentrações dos elementos em questão, possuindo a maior parte dos mesmos as concentrações mais elevadas para os microgreens, em contrapartida em alguns elementos ocorrem uma variação referente a esta concentração, podendo estar relacionada com o modo de cultivo de cada alimento. A possibilidade de modular o conteúdo mineral de microgreens, com base na diversidade genética ou em parâmetros agronômicos, está sendo explorada com o objetivo de fornecer suplementação adequada ou reduzir a exposição da dieta a nutrientes e minerais.

Correlacionando os valores encontrados neste trabalho com o limite de ingestão diária recomendado pelo Ministério da Saúde, levando em consideração uma quantidade referente a 100 g de cada amostra, observa-se que a ingestão destes alimentos é essencial para a diminuição das deficiências nutricionais, fornecendo uma fonte alternativa de elementos essenciais para pessoas com hábitos nutricionais restritos, ou até mesmo pela população que possui baixo poder aquisitivo. Estas hortaliças possuem alta concentração dos elementos essenciais para a manutenção do corpo humano, fazendo com que seja essencial o consumo para o auxílio da suplementação nutricional (Ministério da Saúde, 2009).

5.5. Determinação dos Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos totais em vegetais sofrem influência de diversos fatores como o tipo de cultivar que cada amostra, o estágio de desenvolvimento da planta, assim como também, o seu ambiente de cultivo. Já que o teor de compostos fenólicos altera o sabor e a coloração dos alimentos. Neste trabalho, o teor de compostos fenólicos totais foi quantificado pelo método Folin-Ciocalteau e os resultados estão expressos em mg equivalente de ácido gálico por 100 g de amostra, apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Conteúdo de compostos fenólicos totais obtidos a partir dos microgreens e seus correspondentes crescidos.

Amostras	**Fenólicos Totais (mg EAG 100 g^{-1})**	
	Microgreens	**Vegetais Crescidos**
Cebola	1497 ± 140	998 ± 116
Couve	484 ± 15	69 ± 22
Mostarda	62 ± 14	528 ± 22
Rabanete	366 ± 357	49,4 ± 0,3
Repolho Roxo	735 ± 927	16,2 ± 4,4
Rúcula	864± 13	507 ± 51

Média ± desvio padrão

A partir dos resultados dispostos acima, é notório que as maiores concentrações de compostos fenólicos presente nas amostras, encontram-se nos microgreens. Observou-se uma grande faixa de variação, de 366 a 735 mg/100g enquanto para os vegetais crescidos, apesar de ser encontrados em menor quantidade, apresentou variações maiores de 16,2 a 998 mg/100 g de amostra.

Os resultados obtidos estão equivalentes aos encontrados na literatura, já que alguns pesquisadores apontam que os microgreens possuem propriedades bioativas em maior concentração nos microgreens, dentre estes pesquisadores destacam-se Xiao *et al*., (2012), Sharma *et al*., (2020) e Fuente *et al*., (2019).

Desta forma, o comportamento para todas as amostras segue o descrito na literatura, somente a amostra de couve mostrou um comportamento inverso, apresentando maior concentração para os vegetais crescidos, isso pode ser resultante de alguns fatores agronômicos no momento do seu cultivo fazendo

com que o vegetal possa ter sofrido um estresse oxidativo em suas células fazendo com que ocorra uma menor absorção de nutrientes e consequentemente suas propriedades são alteradas(Kowitcharoen *et al*., 2021).

Em destaque observa-se os microgreens de repolho roxo, onde apresentou maior concentração de compostos fenólicos em relação as demais amostras, esse fato pode ser explicado pela sua coloração roxa, o que já é um indicativo de quantidades elevadas de fenólicos. Com menor concentração, têm-se mostarda com menor, como foi observada sua coloração possui menor intensidade.

O comportamento descrito na Tabela 8 pode ser observado perante ao Anexo N.

5.6. Determinação da Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante nos microgreens e seus devidos correspondentes crescidos foram estimados com a eliminação do radical DPPH• através da doação de um átomo de hidrogênio, passando para sua forma reduzida. Assim, é possível observar a alteração de sua coloração. Os resultados expressos em µM TEAC g^{-1} estão dispostos na Tabela 9.

Tabela 9. Atividade Antioxidante para as amostras de microgreens e seus correspondentes crescidos.

Amostras	**Atividade Antioxidante (µM TEAC g^{-1})**	
	Microgreens	**Vegetais Crescidos**
Cebola	17,7 ± 2,0	130 ± 1
Couve	42,9 ± 2,5	168 ± 7
Mostarda	9,8 ± 1,7	198 ± 8
Rabanete	85,4 ± 7,6	114 ± 8
Repolho Roxo	49,9 ± 0,9	298 ± 38
Rúcula	189 ± 70	258 ± 19

Média ± desvio padrão

De acordo com os resultados, é possível verificar que comparando os microgreens com os vegetais crescidos, este último apresentou maior atividade antioxidante. Korus et al (2007), afirma que a atividade antioxidante não depende, somente da quantidade, mas também do tipo de compostos bioativos (taninos, flavonóides, ácidos carboxílicos C6-C1 e C6-C3, dentre outros) redutores de radicais livres presente na amostra, conforme o Anexo O.

Em relação aos microgreens, a rúcula apresentou maior atividade antioxidante seguido do rabanete. Já nos vegetais crescidos, o repolho roxo seguido da rúcula foram os que apresentaram maiores atividades antioxidantes. Considerando-se o conjunto dos resultados, todas as amostras apresentaram ação antioxidante, entretanto a intensidade dessa ação foi diferenciada, tanto entre as espécies como em função do tipo de cultivo. Tendo isto em vista, é possível a observação que o comportamento descrito na literatura é comprovado, já que as maiores atividades antioxidante é apresentado nos microgreens, conforme a Tabela 10.

Tabela 10. Porcentagem de inibição frente ao radical DPPH.

Amostras	**Inibição (%)**	
	Microgreens	**Vegetais Crescidos**
Cebola	4,6	31,7
Couve	10,9	41,5
Mostarda	2,8	50
Rabanete	21,2	26,6
Repolho Roxo	12,3	68,5
Rúcula	46,6	55,5

Desta forma, temos que quanto menor a porcentagem de inibição do radical, maior será a sua atividade antioxidante presente nas amostras analisadas, assim observa-se que para os microgreens a mostarda possui maior capacidade antioxidante enquanto para os vegetais crescidos é a cebola, que é ilustrado de acordo com o Anexo P**.**

5.7. Determinação do Teor de Clorofila

A determinação do teor de pigmentos fotossintéticos, no caso a clorofila, em folhas é uma técnica de extrema importância no estudo do processo de fotossíntese e na medição da produtividade da planta. Os cálculos referentes à quantificação foram realizados através da maneira descrita por Oliveira *et al.,* (2021), referente as equações de 8 a 10.

$$Ch'a' = 12{,}25(Abs_{663}) - 2{,}79(Abs_{647}) \qquad Equação\ 8$$

$$Ch'b' = 21{,}50(Abs_{663}) - 5{,}10(Abs_{647}) \qquad Equação\ 9$$

$$Ch'Total = 7{,}15(Abs_{663}) + 18{,}71(Abs_{647}) \qquad Equação\ 10$$

A quantificação do teor de clorofila presente em cada amostra está apresentada na Tabela 11.

Tabela 11. Determinação do teor de clorofila presente em amostras de microgreens e seus devidos correspondentes crescidos.

Amostras	**Vegetais Crescidos**		
	Ch' a'	***Ch' b'***	***Ch' Total***
Cebola	0,40 ± 0,01	0,82 ± 0,02	0,66 ± 0,02
Couve	0,47 ± 0,02	0,75 ± 0,07	0,67 ± 0,04
Mostarda	0,45 ± 0,04	0,79 ± 0,07	0,68 ± 0,06
Rabanete	0,0205 ± 0,0008	0,037 ± 0,001	0,0185 ± 0,0008
Repolho Roxo	0,046 ± 0,003	0,082 ± 0,006	0,067 ± 0,004
Rúcula	0,47 ± 0,03	0,82 ± 0,05	0,67 ± 0,03
Analitos	**Microgreens**		
	Ch' a'	***Ch' b'***	***Ch' Total***
Cebola	0,17 ± 0,02	0,29 ± 0,03	0,26 ± 0,02
Couve	0,052 ± 0,003	0,092 ± 0,005	0,67 ± 0,03
Mostarda	0,09 ± 0,02	0,17 ± 0,04	0,1653 ± 0,0005
Rabanete	0,07 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,123 ± 0,007
Repolho Roxo	0,14 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,222 ± 0,009
Rúcula	0,47 ± 0,03	0,82 ± 0,05	0,67 ± 0,03

Concentração: mg g^{-1}; desvio padrão: mg g^{-1}

De acordo com os resultados expressos acima, observa-se que as concentrações de clorofila nas amostras de cebola mostraram-se maiores nos vegetais crescidos, apresentando uma concentração total de 0,66 mg g^{-1} mostrando-se superior a concentração dos microgreens, que se encontrou com 0,26 mg g^{-1}. Levando em consideração que a clorofila é o pigmento verde da planta, no momento da extração observou-se que a cebola dos vegetais crescidos possuía uma coloração mais intensa que a amostra de microgreens, isso resultaria em uma maior concentração da clorofila presente no vegetal já desenvolvido.

Já para as amostras de couve analisadas nos dois estágios de maturação, apresentaram concentrações semelhantes, onde quantificou-se 0,67 mg g^{-1} para as duas amostras, sendo diferenciadas minimamente pelo desvio padrão onde apresentou maior para os vegetais crescidos.

As amostras de mostarda analisadas, foram encontradas maiores concentrações de clorofila nos vegetais crescidos onde apresentou concentração de aproximadamente 0,68 mg g^{-1}, ficando com uma diferença considerável para os microgreens. Neste caso, também foi possível observar a diferença na intensidade da coloração de cada vegetal, onde os microgreens possuíam coloração menos intensa em suas folhas quando comparados ao vegetai já desenvolvido.

O rabanete e o repolho roxo apresentaram o mesmo comportamento, as duas amostras apresentaram maiores concentrações de clorofila nos microgreens, o comportamento oposto as demais amostras, sendo observadas concentrações de 0,123 e 0,222 mg g^{-1}, respectivamente. Este desempenho pode ser explicado pelo fato de que estes vegetais quando totalmente desenvolvidos apresentam colorações diferentes dos microgreens, ou seja, quando essas estão em desenvolvimento possuem coloração verde em suas folhas, quando o desenvolvimento do vegetal é concluído sua coloração é alterada, não possuindo mais a coloração verde característica da clorofila.

Para as amostras de rúcula, apresentaram a mesma concentração sendo referente a 0,67 mg g^{-1}. As amostras nos dois estágios de maturação apresentam a mesma coloração em suas folhas, desta maneira o teor de clorofila não se altera.

Diante todas as amostras analisadas, observa-se que o teor de clorofila é predominante nas amostras de vegetais crescidos, o que pode ser levado em consideração o total desenvolvimento da matriz da planta. Somente para as amostras que alteram suas colorações depois de crescidas observa-se o comportamento inverso, apresentando um teor de clorofila maior nos microgreens, estes resultados estão dispostos no Anexo Q.

6. Conclusão

O método analítico de preparo de amostra proposto baseado na extração ácida assistida por ultrassom mostrou-se preciso e exato para o objetivo do trabalho, apresentando bons valores de recuperação dos analitos de interesse, bem como sensibilidade adequada para análise. Além disso, trata-se de uma metodologia que apresenta muitas vantagens em comparação com os métodos de preparo de amostras convencionais, propicia uma rápida etapa de extração dos analitos, assim como uma boa frequência analítica, sendo um sistema de baixo custo aliado a uma menor geração de resíduos. Esta metodologia acarreta uma maior segurança ao analista, já que a extração é realizada na presença de ácidos diluídos a baixas temperaturas, reduzindo também as possíveis interferências no equipamento de análise das concentrações, devido ao meio ácido das soluções, contribuindo de forma significativa com os princípios da química verde e para a determinação das concentrações nas amostras analisadas, além de garantir também a segurança do analista durante a realização da análise.

Os estudos realizados para a extração de minerais em microgreens e seus correspondentes maduros a fim de comparação mostraram-se adequados para a quantificação das concentrações dos elementos de interesse. Todas as amostras estudadas são ótimas fontes de minerais, mas é perceptível a existência de uma variação da concentração em cada estágio da planta, desta forma nem todos os elementos apresentam o mesmo comportamento já dito na literatura. Apesar da maioria possuir maiores concentrações nos microgreens, ainda assim em alguns casos ocorrem uma variação da mesma. Todas as amostras possuem boas concentrações de nutrientes, a variação dos mesmos pode decorrer do genótipo da planta, como também de diversos critérios no momento do plantio. Sendo consideradas então boas fontes de nutrientes que auxiliam a suplementação humana.

Além disso, na realização da quantificação dos compostos bioativos presentes na matriz do vegetal, mostrou-se que estes compostos apresentaram boas concentrações nas amostras analisadas. Desta maneira, a importância da quantificação destes compostos se dá pelo fato de que os mesmos participam do desenvolvimento nutricional da planta, e alimentos ricos em compostos

bioativos são essenciais para o funcionamento do organismo humano. Observa-se que para todas as amostras analisadas, os compostos bioativos se encontram em boas concentrações, tanto para os microgreens quanto para os vegetais crescidos. Nota-se que o comportamento descrito na literatura é mantido, onde os microgreens possuem maiores concentrações destes compostos em relação ao seu correspondente crescido.

Assim, o consumo de alimentos de origem vegetal é essencial para a manutenção do organismo humano, já que são fontes ricas em minerais e compostos bioativos, o que além de auxiliar na nutrição contribui para a prevenção de diversas doenças.

7. Referências

A. Technologies Microwave Plasma Atomic Emission Spectroscopy (MP-AES). Aplication 2016, 167.

Alimentos Funcionais. Biblioteca Virtual da Saúde: **Ministério da Saúde**, 2009. Disponível em: < https://bvsms.saude.gov.br/alimento-funcionais/>

BALARAM, V. Microwave plasma atomic emission spectrometry (MP-AES) and its applications – A critical review. **Microchemical Journal**, v. 159, n. 105483, 2020.

BARBOSA, D. C. S.; SILVA, W. V.; CORREIA, M. T. S. Antioxidant Activity of Essential Oils of Myrtaceae Family by DPPH Method: A Review, v. 7, No. 2, p. 325-338, 2019.

BEZERRA, M. A.; FERREIRA, S. L. C.; NOVAES, C. G.; SANTOS, A. M. P.; VALASQUES, G. S.; CERQUEIRA, U. M.F. M.; ALVES, J. P. S. Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry - A review. **Talanta**, v. 194, p. 941-959, 2019.

BONEMANN, D. H.; LUCKOW, A. C. B.; PEREIRA, C. C.; DOUZA, A. O.; CADORE, S.; NUNES, A. M.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S. Determination of total concentration and bioaccessible fraction os metals in tomatoes and theis derivatives by MIP OES. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 96, p. 1-7, 2021.

CANHOTO, J. Semente. **Revista Ciência Elementar**, v. 5, n. 01, 2017.

CAZARIN, C. B. B.; BICAS, J. L.; PASTORE, G. M.; JÚNIOR, M. R. M. **Atividade de Componentes Alimentares Bioativos em Abordagem Mecanística**, Cap. 1, pág. 1-3, Elsevier Inc., 2021.

CHEN, H.; TONG, X.; TAN, L.; KONG, L. Consumers' acceptability and perceptions toward the consumption of hydroponically and soil grown broccoli microgreens.' **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 2, p. 1-6, 2020.

COSTA JUNIOR, F. A. S.; PETRARCA, M. H.; MEINHART, A. D.; FILHO, M. J.; COSTA, L. M.; CORN, M. G. A.; CASTRO, J. T.; SANTOS, W. P. C.; CARVALGO, E. V.; NOGURIRA, A. R. A. Planejamento Fatorial aplicado a digestão de amostras de feijão assistida por radiação micro-ondas**. Química Nova**, v. 29, p. 149-152, 2006.

DE LEÃO, P. R. P.; MEDINA, A. L.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S. Decomposição de amostras de cerveja com sistema de refluxo para determinação monoelementar por F AAS/ AES e determinação multielementar por MIP OES. **Brazilian Journal of the Food Technology**, v. 21, p. 1-11, 2017.

DINIZ, L.M.N.; CARRASCO, T.S.; MEDINA, A.L.; RIBEIRO, A.S.; NUNES, A.M. Use of MIP OES and F AAS/ F AES for determination of Ca, K, Na and Mg in brazilian cream cheese. **Química Nova**, v.40, p. 711-719, 2017.

FLUENTE, B.; GARCÍA, G. L.; MAÑEZ, V.; ALEGRÍA, A.; BARBERÁ, R.; CILLA, A. Evaluation of the Bioaccessibility of Antioxidant Bioactive Compounds and Minerals of Four Genotypes of Brassicaceae Microgreens. **Foods**, v. 8, p. 250, 2019.

GAMELA, R. R.; COSTA, V. C.; FILHO, E. R. P. Multivariate Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction Procedure for the Determination of Ca, Fe, K, Mg, Mn, P, and Zn in Pepper Samples by ICP OES. **Food Analytical Methods**, v. 13, p. 69 -77, 2020.

GODOY, H. T. Multivariate optimization of extraction and validation of

phenolic acids in edible mushrooms by capillary electrophoresis. **Food Research International**, v. 126, p. 108685, 2019.

GODSWILL, A. C.; SOMTOCHUKWU, I. V.; IKECHUKWU, A.; KATE, E. C. Benefícios para a Saúde dos Micronutrientes (vitaminas e minerais) e suas Deficiências Associadas: Uma Revisão Sistemática. **International Journal of Food Sciences**, v.3, p.1-32, 2020.

GOMES, C. G. Prospecção de Metais em Diferentes etapas do Consumo de café Comercial por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Micro-ondas. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Pelotas, 2021.

GONZÁLVEZ, A.; DE LA GUARDIA, M. Comprehensive Analytical Chemistry – Chapter 3 – Mineral Profile. v. 60, p. 51-76, 2013.

GOUDA, M.; BEKHIT, A. E-D.; TANF, Y.; HUANG, Y.; HUANG, L. HE, Y.; LI, X. Recent innovations of ultrassound greens techonology in herbal phytochemistry: A review**. Ultrasonics Sonochemistry**, v. 73, p. 1-15, 2021.

HORST, M. A. e LAJOLO, F. M.. Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos. Biodisponibilidade de Nutrientes.

HUDZ, N. YEZERSKA, O. SHANAIDA, M. SEDLACKOVÁ, V. V.; WIECZOREK, P. P. Application pf the Folin-Ciocalteau Method to the evaluation os Salvia Sclarea Extracts. **Pharmacia**, v. 66, p. 209-215, 2019.

JANIQUES, A. G. P. R.; LEAL, V. O.; MOREIRA, N. X.; SILVA, A. A. M.; MAFRA, D. Phenolic compounds: possible applicability in chronic kidney disease. Nutrire: **Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. J. Brazilian Soc. Food Nutr**., São Paulo, SP, v. 38, p. 322-337, dez. 2013.

JUNIOR, R. G. O.; ARAÚJO, C. S.; SOUZA, G. R.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; LIMA-SARAIVA, S. R. G.; MORAIS, A. C. S.; SANTOS, J. S. R.; ALMEIDA, J. R. G. S. In vitro antioxidant and photoprotective activities of dried extracts from Neoglaziovia variegata (Bromeliaceae). **Journal of Applied Pharmaceutical Science,** v. 3, p. 122-127, 2013.

KINUPP, V. F.; BARROS, I. B. I. Teor de proteínas e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 846-857, 2008.

KOWITCHAROESN, L.; PHORNVILLAY, S.; LEKKHAM, P.; PONGPRASERT, N.; SRILAONG, V. Bioactive Composition and Nutritional Profile of Microgreens Cultivated in Thailand. **Applied. Sciences**, v. 11, N. 17, p. 7981, 2021.

KRAMBLE, P. N.; GIRI, S. P.; MANE, R. S.; TIWANA, A. Estimativa do teor de Clorofila em Folhas jovens e Adultas de Algumas Plantas Selecionadas. **Jornal Universal de Pesquisa e Tecnologia Ambiental,** v. 5, No. 6, p. 306-310, 2015.

KRUG, F. J. ROCHA, F, R. P.; **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. 2ª ed. SBQ, p. 185-202, 2019.

KRUG, F. J.; **Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1ª d. Piracicaba, p.340, 2010.

KYRIACOU, M. C.; EL-NAKHEL, C.; GRAZIANI, G.; PANNICO, A.; SOTERIOU. G. A.; GIORDANO, M.; RITIENI, A.; PASCALEB, S.; ROUPHAELL, Y. Functional quality in novel food sources: Genotypic variation in the nutritive and phytochemical composition of thirteen microgreens species. **Food Chemistry**, v. 277, p. 107-118, 2019.

KYRIACOU, M. C.; ROUPHAEL, Y.; GIOIA, F. D.; KYRATZIS, A.; SERIO, F.; RENNA, M.; PASCALE, S. D.; SANTAMARIA, P. Micro-scale vegetable production and the rise of microgreens. **Trends in Food Science & Technology**, v. 57, p. 103 – 105, 2016.

LOUZADA, A. R. R.; OLIZ, L. O.; GOMES, C. G.; BONEMANN, D.; SCHERDIEN, S. H.; RIBEIRO, A. S.; VIEIRA. M. A. Assessment of total concentration and bioaccessible fraction of minerals in peaches from different cultivars by MIP OES. **Food Chemistry**, v. 391, p. 1-10, 2022.

MACHADO, I.; BERGMANN, G.; PISTÓN, M. A simple and fast ultrasound-assisted extraction procedure for Fe and Zn determination in milk-based infant

formulas using flame atomic absorption spectrometry (FAAS). **Food Chemistry**, v. 194, p. 373-376, 2016.

MAILLARD, M. N. Antioxidant: ChimActive. AgroParisTech, Massy Campus (Massy, França), Université Paris-Saclay. Disponível em: < http://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/theorie >.

MASSABNI, A.C. Os metais e a Saúde Humana. **Conselho Regional de Química**, UNESP, 2006. Disponível em: < https://www.crq4.org.br/quimica_viva os_metais_e_a_saude_humana#:~:text=Entre%20eles%20est%C3%A3o%20o%20cr%C3%B4mio,bom%20funcionamento%20do%20corpo%20humano. >.

MENDIVELSO, E. J. D.; ANDRADE, J. K.; FELSNER, M. L. Extração Assistida por Ultrassom Aplicada a Determinação de Mg, Mn e Zn em Sementes e Farinhas de Chia por F AAS. **Revista Virtual da Química**, v. 11, n. 4, 2019.

MULLER, A. POZEBON, D.; RIBEIRO, A. S. Mothodology for elemental microwave-incduced plasma optical spectrometry (MIP OES). **Analytical Methods**, v. 12, p. 2638-2644, 2020.

NOVAES, C. G.; YAMAKI, R. T.; DE PAULA, V. F.; DO NASCIMENTO, B. B.; BARRETO, J. A.; VALASQUES, G. S.; BEZERRA, M. A. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies De Resposta - Parte I: Variáveis de Processo. **Revista Virtual da Química**, v. 9, n. 3, p. 1184-1215, 2017.

OLIVEIRA, A. C. D., VALENTIM, I. B., GOULART, M. O. F., SILVA, C. A., BECHARA, E. J. H., TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. *32*, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, E. Sample preparation for atomic spectroscopy: Evolution and future trends. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 174-182, 2003.

OLIVEIRA, G. L. S. Determination in vitro of the antioxidante capacity of natural products by DPPH· Methos: review study**. Revista Brasileira Plantas Medicinais**, v. 7, No. 1, p. 45-50, Campinas, 2015.

PARADISO, V. M.; CASTELLINO, M.; RENNA, M.; GATTULLO, C. E.; CALASSO, M.; TERZANO, R.; ALLEGRETTA, I.; LEONI, B.; CAPONIO, F.; SANTAMARIA, P. Nutricional characterization and shelf-life of package microgreens. **Journal Foods and Function**, v. 9, p. 5629-5640, 2018.

PAVLOVIC, D.; NIKOLIC, B.; YUROVIC, S. WAISI, H.; ANYELKOVIC, A. Clorofila como medida de Saúde das plantas: Aspectos Agroecológicos. **Peste. Fitomed.** (Belgrado), v. 29, No. 1, p. 21-34, 2014.

PEREIRA FILHO, E. R. Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados. São Carlos: Editora UFSCar, p. 88, 2015.

PINELLI, L. L. O. Qualidade e potencial antioxidante in vitro de morangos in natura e submetidos a processamentos. Dissertação (Tese Doutorado) — Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, 2009.

PRATIWI, R. A.; NANDIYANTO, A. B. D. How to Read and Interpret UV-VIS Spectrophotometric Results in Determining the Structure of Chemical Compounds. **Indonesian Journal of Educational Research and Technology**, V. 2, No. 1, 1-20, 2020.

PRIETRO, B. J. Y.; GONZALES, M. G.; ESPINOSA, M. V.; PEREDO, A. V. G.; ALBARADO, M. A. G.; PALMA, M.; JIMENES, G. C. R.; BARBERO, G. F. Optimization of an Ultrasound-Assisted Extraction Method Applied to the Extraction of Flavonoids from Moringa Leaves (Moringa oleífera Lam.). **Agronomy**, v. 12, p. 261-274, 2022.

RENNA, M.; STELLACCI, A. M.; CORBO, F.; SANTAMARIA, P. The Use of a Nutrient Quality Score is Effective to Assess the Overall Nutritional Value of Three Brassica Microgreens. **Foods**, v. 9, p. 1226-1241, 2020.

RODRIGUES, J. S. Q. Infusões de Folhas de Passifloras do Cerrado: Compostos Fenólicos, Atividade Antioxidante *in vitro* e Perfil Sensorial.

Dissertação (Tese Mestrado em Ciencias da Saúde). Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade Antioxidante das Frutas do Cerrado. **Ciências Tecnologia em Alimentos**, v. 27, No. 1, p. 53-60, 2007.

SCHAFRANSKI, K. Extração e Caracterização de Compostos Fenólicos de Folhas de Amoreira Preta (*Morus Nigra L.*) e Encapsulamento em Esferas de Alginato. Dissertação (Tese Mestrado em Biotecnologia). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2019.

SCHERDIEN, S. H. Desenvolvimento de Métodos Analíticos pata Determinação Elementar e Fração Bioacessível em Cogumelos Comestíveis por MIP OES. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

SHAHIDI, F., NACZK, M. Phenolics in food and nutraceuticals, CRC Press: Boca Raton, Flórida, p. 576, 2004.

SHARMA, S.; DHINGRA, P.; KORANNE, S. Microgreens: Exciting new food for 21st Century. **Ecology, Environment and Conservation**, v. 26, p. 248-251, 2020.

SILVEIRA, A. C.; KASSUIA, Y. S.; DOMAHOVSKI, R. C.; LAZAROTTO, M. Método de DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos da erva-mate de forma rápida e reprodutível**, Embrapa Clima Temperado**, Documento 421, Paraná, 2018.

SKOOG, D.A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**.5ª. ed. Editora Bookman-Porto Alegre-RS, p. 836, 2002.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA, M. G.; CHARLLYTON, M. C. A.; COSTA, L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D; BARROS, E.D.S.; BRANDÃO, M.S.; P.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; KECKTHEUER, L. H. H. The Chlorophylls. Tecnologia de Alimentos. **Ciência Rural**, v. 35, p. 748-754, 2005.

TAŞĞIN, E. Macronutrients and Micronutrients in Nutrition. **International Journal of Innovative Research and Reviews**, v. 1, pag. 10-15, 2017.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; UBOTA, L. T. Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos para sua Determinação**. Química Nova,** v. 30, p. 1323-1338, 2007.

VIZZOTO, M.; KROLOW, A.C.; WEBER, G. E. B. Metabolismo Secundário Encontrado em Plantas e sua Importância**. Embrapa Clima Tempera**do, Documento 316, p. 16, Pelotas, 2010.

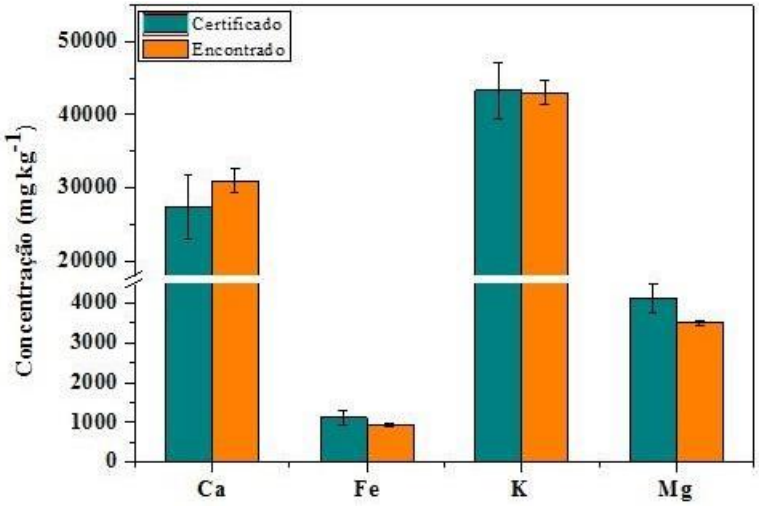
WEBER, C. F. Broccoli Microgreens: A Mineral – Rich Crop That Can Diversifi Food System. **Frontiers in Nutricion**, v. 4, n. 7 p. 1-9, 2017.

XIAO, Z.; CODLING, E.; LUO, Y.; NOU, X.; LESTER, G. E.; WANG, Q. Microgreens of Brassicaceae: Mineral composition and content of 30 varieties. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 49, p. 87-93, 2016.

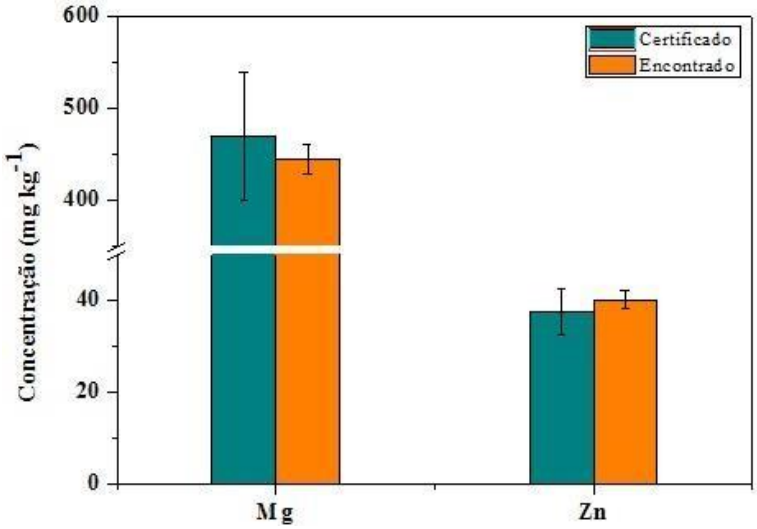
XIAO, Z.; LESTER, G. E.; LUO, Y.; WANG, Q. Assessment of Vitamin and Carotenoid Concentrations of Emerging Food Products: Edible Microgreens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7644-7651, 2012.

8. ANEXOS

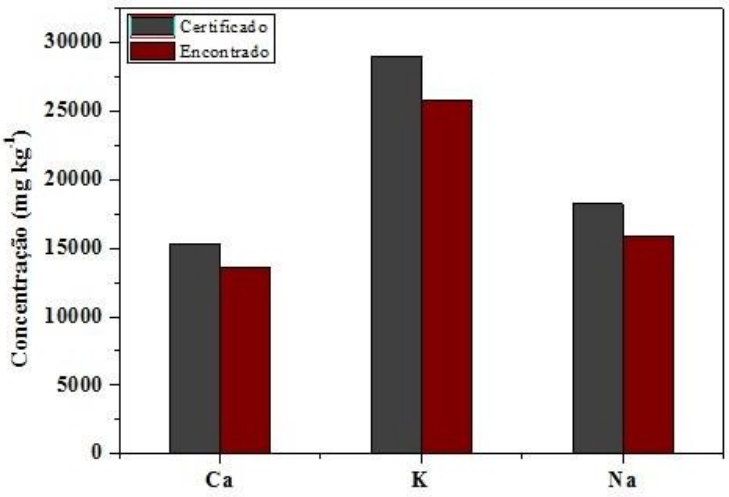
ANEXO A – Comparação dos valores de recuperação obtidos a partir do método proposto com os valores certificados para o CRM de folha de tomate (CRM-Agro C1003a) para Ca, Fe, K e Mg.



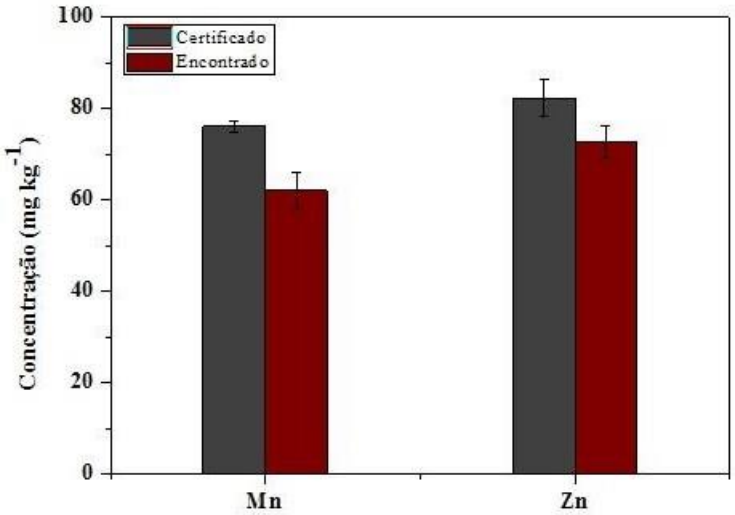
ANEXO B - Comparação dos valores de recuperação obtidos a partir do método proposto com os valores certificados para o CRM de folha de tomate (CRM-Agro C1003a) para Mg e Zn.



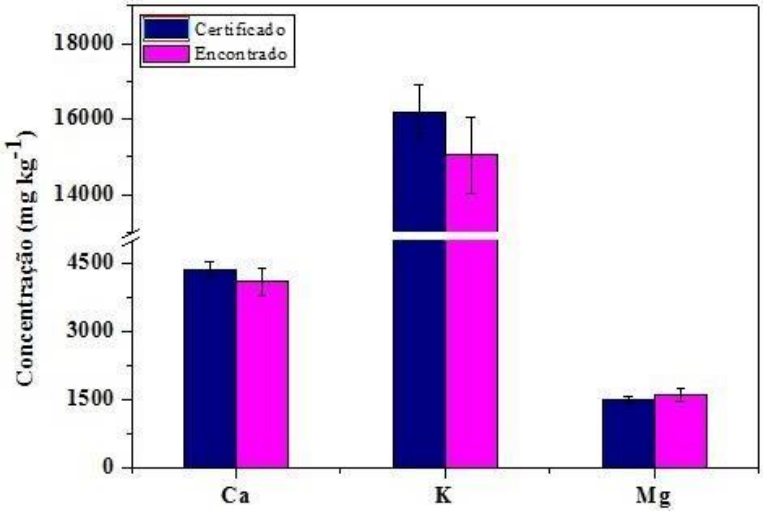
ANEXO C - Comparação dos valores de recuperação obtidos a partir do método proposto com os valores certificados para o CRM de folha de espinafre (CRM-Agro C1570a) para Ca, K e Na.



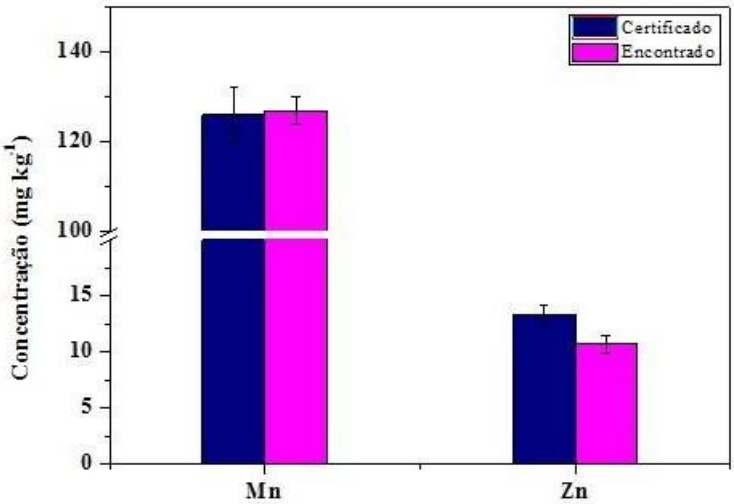
ANEXO D - Comparação dos valores de recuperação obtidos a partir do método proposto com os valores certificados para o CRM de folha de espinafre (CRM-Agro C1570a) para Mn e Zn.



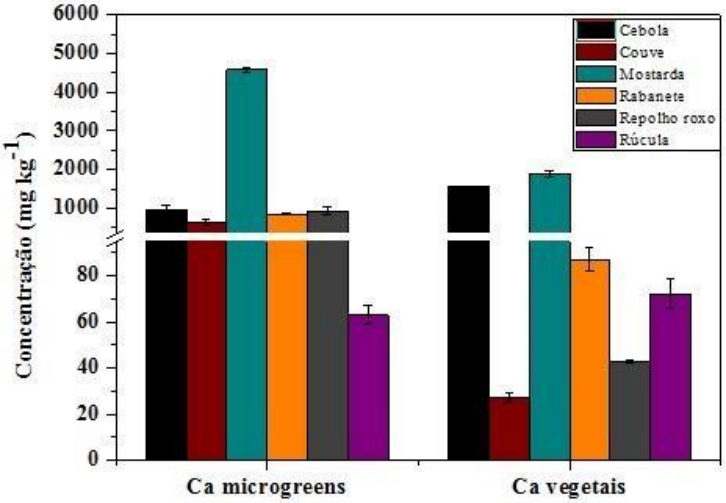
ANEXO E - Comparação dos valores de recuperação obtidos a partir do método proposto com os valores certificados para o CRM de folha de cana-de-açúcar (CRM-Agro C1005a) para Ca, K e Mg.



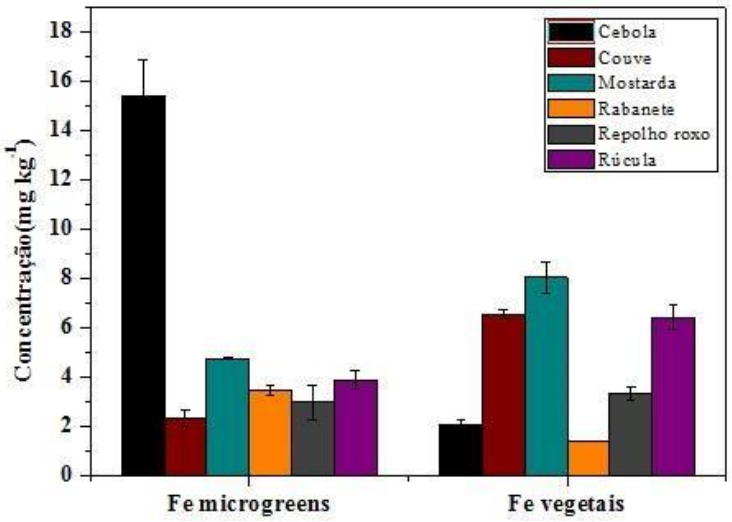
ANEXO F - Comparação dos valores de recuperação obtidos a partir do método proposto com os valores certificados para o CRM de folha de cana-de-açúcar (CRM-Agro C1005a) para Mn e Zn.



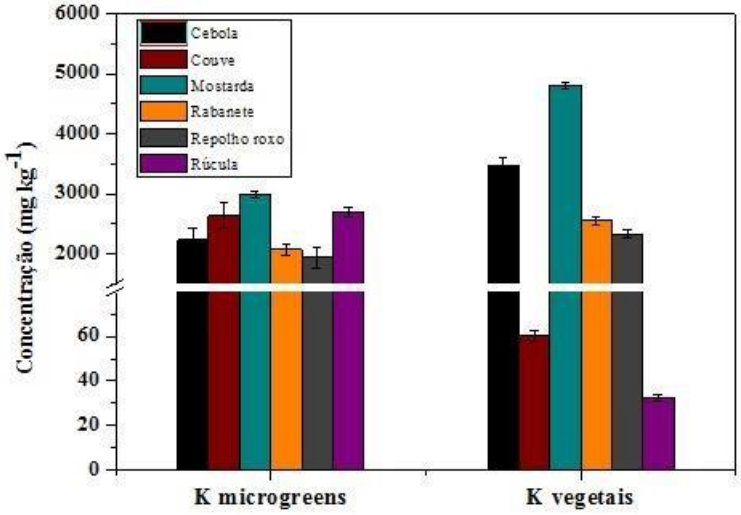
ANEXO G – Comparação da concentração elementar obtida a partir do método de extração proposto para o Ca.



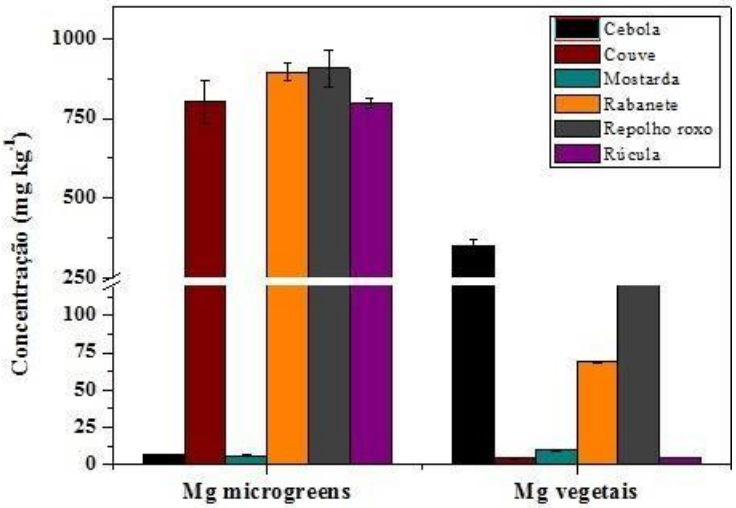
ANEXO H - Comparação da concentração elementar obtida a partir do método de extração proposto para o Fe.



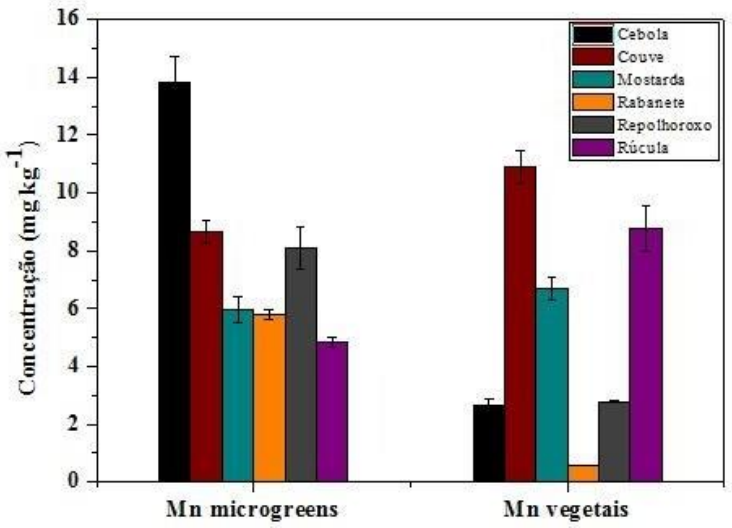
ANEXO I - Comparação da concentração elementar obtida a partir do método de extração proposto para o K.



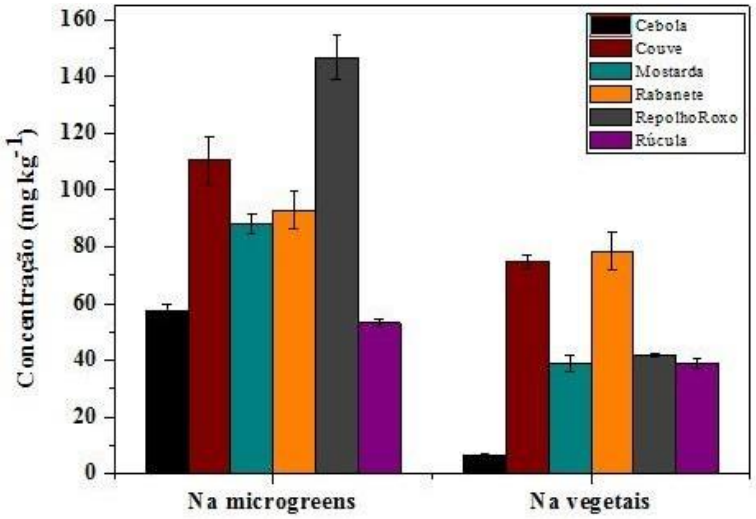
ANEXO J - Comparação da concentração elementar obtida a partir do método de extração proposto para o Mg.



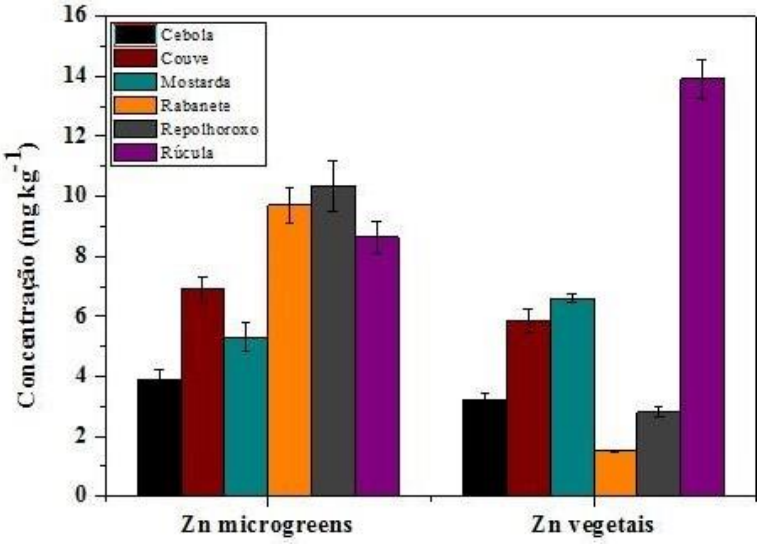
ANEXO K - Comparação da concentração elementar obtida a partir do método de extração proposto para o Mn.



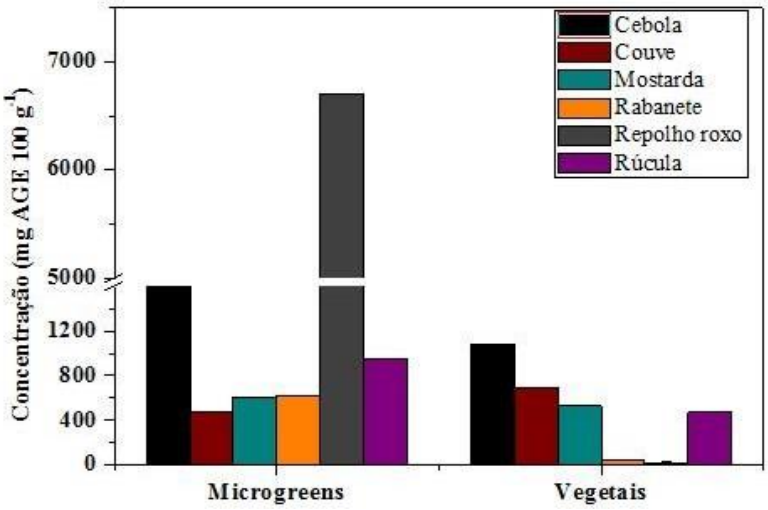
ANEXO L - Comparação da concentração elementar obtida a partir do método de extração proposto para o Na.



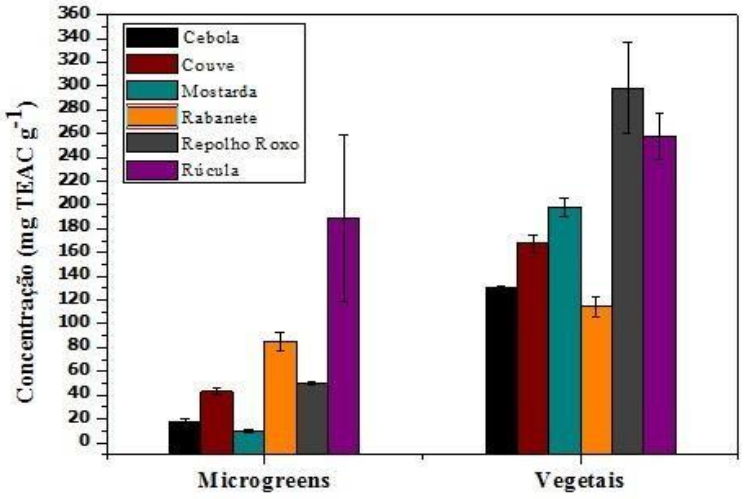
ANEXO M - Comparação da concentração elementar obtida a partir do método de extração proposto para o Zn.



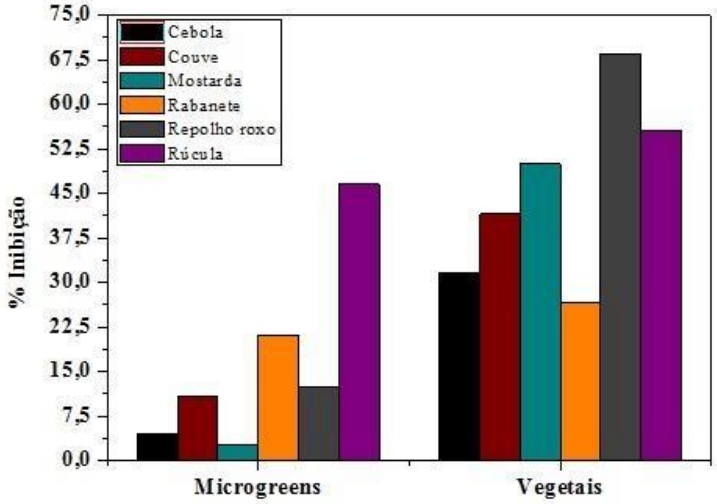
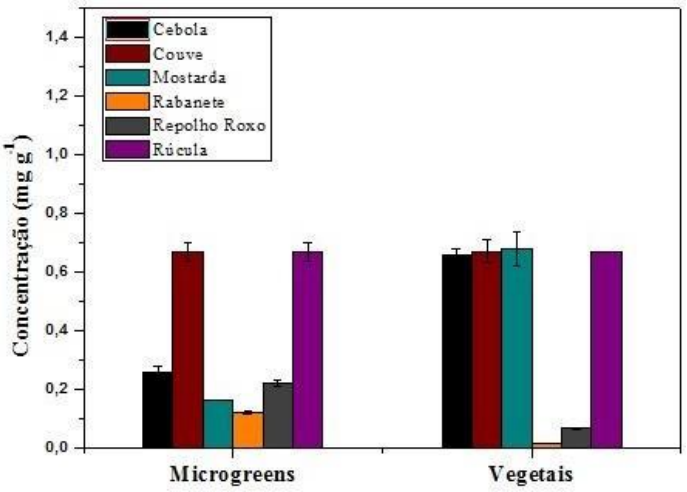
ANEXO N – Comparação da concentração de compostos fenólicos presente nas amostras de microgreens e vegetais crescidos.



ANEXO O – Comparação da atividade antioxidante presente nas amostras de microgreens e vegetais crescidos.



ANEXO P – Comparação da % de inibição nas amostras de microgreens e seus correspondentes crescidos.



ANEXO Q – Comparação do teor de clorofila presente nas amostras nos dois estágios de maturação.