



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Influência da cultivar e da estação do ano (inverno e verão) em compostos bioativos em
quatro cultivares de alface vermelha (*Lactuca sativa* L.)**

Alex Sandra Nascimento de Souza

Porto Alegre

2023

ALEX SANDRA NASCIMENTO DE SOUZA

**INFLUÊNCIA DA CULTIVAR E DA ESTAÇÃO DO ANO (INVERNO E VERÃO)
EM COMPOSTOS BIOATIVOS EM QUATRO CULTIVARES DE ALFACE
VERMELHA (*Lactuca Sativa L.*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Simone Hickmann Flôres

**Porto Alegre
2023**

CIP - Catalogação na Publicação

Souza, Alex Sandra Nascimento de

Influência da cultivar e da estação do ano (inverno e verão) em compostos bioativos em quatro cultivares de alface vermelha (*Lactuca sativa* L.) / Alex Sandra Nascimento de Souza. -- 2023.

165 f.

Orientador: Alessandro de Oliveira Rios.

Coorientadora: Simone Hickmann Flôres.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Alface roxa. 2. pigmentos. 3. flavonoides. 4. polifenóis solúveis e ligados. 5. CLAE. I. de Oliveira Rios, Alessandro, orient. II. Hickmann Flôres, Simone, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Autora: Alex Sandra Nascimento de Souza

Título da tese: **Influência do cultivar e do período de cultivo (inverno e verão) em compostos bioativos em quatro cultivares de alface vermelha (*Lactuca sativa* L.)**

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de
DOCTORA EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Aprovada em: 05/09/2023
Pela banca examinadora:

Homologada em:/...../2023
Por:

Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios
Orientador
Docente do Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos
PPGCTA/ UFRGS

Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Ciência e Tecnologia de Alimentos
PPGCTA/ UFRGS

Prof^ª. Dr^ª. Simone Hickmann Flôres
Coorientadora
Docente do Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos PPGCTA/ UFRGS

Prof^ª. Dr^ª. Florencia Cladera Olivera
Diretora do Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos ICTA/ UFRGS

Banca: Dr^ª. Ana Vania Carvalho
Pesquisadora da EMBRAPA Amazônia
Oriental

Banca: Prof^ª. Dr^ª. Viviani Ruffo de Oliveira
Docente do Departamento de Nutrição
UFRGS

Banca: Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz
Docente do Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos PPGCTA/ UFRGS

"Le temps n'endort pas les grandes douleurs, mais il les assoupit."

“O tempo não cura grandes dores, mas os entorpece” George Sand

**À minha mãe Maria Solange (*in memoriam*)
com amor e gratidão**

AGRADECIMENTOS

Reconheço e agradeço a todos que passaram pela minha vida e que contribuíram para minha formação, ser quem eu sou e o que consegui fazer durante essa jornada.

A Deus...

Aos meus pais, Maria Solange (*in memoriam*) e Francisco Barroso, obrigada pela vida, pelos cuidados e por nunca desistirem de mim. Aos meus irmãos e meus sobrinhos, especialmente minhas amadas irmãs Ruth e Katiana e ao meu sobrinho Isaac Viana e sua amada mãe Ana Cristina Viana (*in memoriam*).

Ao meu marido Emmanuel Demidover, gratidão por nossa família, por seu amor e apoio incondicional. Aos nossos maiores tesouros, Dominique e Dasha, por existirem e nos fazer cada dia melhor.

Ao meu orientador Prof. Alessandro de Oliveira Rios, que sempre esteve presente e disponível com paciência e compreensão. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos.

À minha coorientadora Profa. Simone Hickmann Flôres por ser, tão naturalmente, um grande exemplo em tudo que faz, pela solidariedade e amor aos seres humanos.

À Prof. Magnólia, por todo suporte e contribuição para a realização desse trabalho.

À banca examinadora, professora Viviane Ruffo, Ana Vânia (Embrapa) e professor Plínio, pela preciosa e inestimável contribuição para esta tese.

Aos queridos amigos do PPGCTA: Carlos Pagno, Renato Queiroz, Mariel Proz, Fernanda Khun, Eli Emanuel, Suiane Savazzi e a todos os colegas do Laboratório de Bioativos.

Agradecimento especial ao Lucas Alves, Helena Oliveira, Mariana Komerowski e Carolina Carboni por terem contribuído grandemente nas análises de laboratório e sem medir esforços e também aos bibliotecários e amigos Aline e Vinicius.

Aos amigos da vida: Virginia Facundo, Josy Sampaio, Bruna Mendes, João Romario, Neurilane Viana, Jerônimo.

À UFRGS, ao corpo docente e aos técnicos do PPGCTA e por todo suporte e contribuição para o desenvolvimento desse trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

A alface é uma hortaliça muito consumida e de grande importância econômica, e tem despertado interesse por seus componentes bioativos, como carotenoides e compostos fenólicos. Estes compostos são os principais responsáveis pela capacidade antioxidante de determinados alimentos, e o suprimento das necessidades diárias de antioxidantes, através da alimentação, está associado à prevenção ou redução de efeitos patológicos adversos, tais como os problemas cardiovasculares, câncer e *diabetes mellitus*. Atualmente existe uma ampla diversificação nos tipos de alface cultivada, sendo que a alface vermelha ocupa parte desse segmento; no entanto, ainda faltam pesquisas direcionadas aos perfis e teores de compostos bioativos em diferentes estações do ano em tais hortaliças. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da cultivar e do período de cultivo, inverno e verão, sobre o perfil dos carotenoides e da composição fenólica em quatro cultivares de alface de cor vermelha (Mila, Maira, Carmin e Scarlet). O experimento foi conduzido em ambiente protegido (casa de vegetação). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com 4 cultivares, 3 repetições e 16 plantas por parcela no inverno e no verão. Após a colheita, as amostras foram liofilizadas, embaladas à vácuo e armazenadas à -18 °C para determinação de atividade antioxidante (ABTS), carotenoides (CAR), antocianinas e compostos fenólicos extraíveis (CFE) e não extraíveis (CFNE). A cultivar e a estação do ano não influenciaram o perfil qualitativo dos carotenoides e compostos fenólicos da alface vermelha. No entanto, a estação influenciou a concentração desses componentes em todas as cultivares. Os níveis de CFE e antocianinas foram significativamente maiores no inverno, enquanto os níveis de carotenoides e CFNE foram maiores no verão. Foram identificadas dez antocianinas (cianidinas e delphinidinas). O principal carotenoide encontrado foi o all-trans- β -caroteno (45-48%), seguido pela luteína (13-20%) e zeaxantina (11-15%). Os principais CFE incluem ácido 5-cafeoilquínico e rutina. Foram encontrados 25 CFNE, como ácido gálico, caféico e clorogênico. Cultivares de alface vermelha têm seus principais compostos bioativos descritos e comparados em duas épocas de plantio. Os resultados deste estudo reforçam que a estação do ano pode modular a concentração de compostos bioativos na alface.

Palavras-chave: Alface roxa, pigmentos, flavonoides, polifenóis solúveis e ligados, CLAE.

ABSTRACT

Lettuce is a widely consumed vegetable of great economic importance, and has aroused interest for its bioactive components, such as carotenoids and phenolic compounds. These compounds are main responsible for the antioxidant capacity of certain foods, and the supplying the daily needs of antioxidants through food is associated with the prevention or reduction of adverse pathological effects, such as cardiovascular problems, cancer and *diabetes mellitus*. Currently there is a wide diversification in the types of cultivated lettuce, with red lettuce occupying part of this segment; however, there is still a lack of research aimed at the profiles and levels of bioactive compounds in different seasons of the year in such vegetables. Thus, the objective of this work was to verify the effect of cultivar and growing period, winter and summer, on the profile of carotenoids and phenolic composition in four red lettuce cultivars (Mila, Maira, Carmin and Scarlet). The experiment was conducted in a protected environment (greenhouse). The experimental design used was randomized blocks, with 4 cultivars, 3 replications and 16 plants per plot in winter and summer. After collection, samples were lyophilized, vacuum packed and stored at -18 °C for determination of antioxidant activity (ABTS), carotenoids (CAR), anthocyanins and extractable (EPC) and non-extractable (NEPC) phenolic compounds. Cultivar and season of the year did not influence the qualitative profile of carotenoids and phenolic compounds in red lettuce. However, the season influenced the concentration of these components in all cultivars. EPC and anthocyanin levels were significantly higher in winter, while carotenoid and NEPC levels were higher in summer. Ten anthocyanins (cyanidins and delphinidins) were identified. The main carotenoid found was all-trans- β -carotene (45-48%), followed by lutein (13-20%) and zeaxanthin (11-15%). Major EPC's include 5-caffeoylquinic acid and rutin. 25 NEPC were found, such as gallic, caffeic and chlorogenic acid. Red lettuce cultivars have their main bioactive compounds described and compared in two seasons. The results of this study reinforce that the season can modulate the concentration of bioactive compounds in lettuce.

Keywords: Purple lettuce, pigments, flavonoids, soluble and bound polyphenols, HPLC

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia geral da alface e seus cinco diferentes tipos comestíveis de alface nas espécies de <i>Lactuca sativa</i> L.....	19
Figura 2 - Principais tipos de alface (<i>Lactuca sativa</i> L.) comercializados no Brasil e sua cultivar correspondente na cor vermelha (roxa).....	20
Figura 3 - Estruturas moleculares dos principais carotenoides encontrados em alface.....	24
Figura 4 - Estrutura química da lactucaxantina – 4,4'-dideidro-6,6'-dihidro- β,β -caroteno-3,3'-diol.	25
Figura 5 - Subclasses de polifenóis.....	27
Figura 6 - Procedimento normalmente utilizado para análise de compostos fenólicos.....	29
Figura 7 - Estrutura básica dos flavonoides	30
Figura 8 - Estrutura central das antocianinas	32
Figura 9 - Esqueleto carbônico de alguns flavonoides importantes, classificados por sua cadeia estrutural C-3.....	33
Figura 10 - Estrutura da antocianina 1 (cianidina-3-O- (6''-malonil- β -D-glicopiranosídeo), 2 (cianidina-3-O- (6''-malonil- β -D -glicopiranosídeo metil éster) e 3 (cianidina-3-O β -D -glicopiranosídeo).....	34
Figura 11 - Cultivares de alface vermelha	37
Figura 12 - Localização geográfica do plantio das cultivares de alface (-30.070768, -51.139466).....	38
Figura 13 - Delineamento experimental utilizado no cultivo das alfaces	39

ARTIGO 1: INFLUENCE OF CULTIVAR AND SEASON ON CAROTENOIDS AND PHENOLIC COMPOUNDS FROM RED LETTUCE

Figure 1 - Four red lettuce cultivars, leaf shapes, and colors.....	50
Figure 2 - Principal components analysis (PCA) of bioactive compounds (carotenoids and phenolic compounds) of four cultivars of red lettuce: Mila Summer, Mila Winter, Scarlet Summer, Scarlet Winter, Maira Summer, Maira Winter, Carmin Summer, Carmin Winter.....	61

ARTIGO 2: EFFECT OF SEASON AND CULTIVAR ON BOUND PHENOLICS COMPOUNDS IN RED LETTUCE

Figure 1 - Lettuce cultivation phases: A: planting and germination; B: Transplantation and growth C: Development; D: Plant ready	85
Figure 2 - Chromatograms obtained by HPLC-DAD-MS of phenolic compounds from <i>Lactuca sativa</i> L. Peak characterization is presented in Table 2. Chromatograms of cultivated lettuces: in winter (blue color), in summer (red color).....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características das cultivares de alfaces utilizadas no experimento.....	37
Tabela 2: Faixas de concentração, r^2 , limites de quantificação (LOQ), limites de detecção (LOD) dos padrões de carotenoides e antocianinas.....	42

ARTIGO 1: INFLUENCE OF CULTIVAR AND SEASON ON CAROTENOIDS AND PHENOLIC COMPOUNDS FROM RED LETTUCE

Table 1 -Carotenoid content of four cultivars of red lettuce in winter (W) and summer (S) obtained by HPLC-DAD.....	60
Table 2 - p Two-way ANOVA values for bioactive compounds and antioxidant activities of red lettuce cultivars planted in winter and summer.	61
Table 3 - Phenolic compounds content of four cultivars of red lettuce in winter (W) and summer (S) obtained by HPLC-DAD.....	66
Table 4 - Anthocyanin content of the four cultivars of red lettuce in winter (W) and summer (S) obtained by HPLC.....	71
Table 5 - Antioxidant capacities determined by the ABTS assay from the four cultivars of red <i>Lactuca sativa</i> L. in winter (W) and summer (S).....	73

ARTIGO 2: EFFECT OF SEASON AND CULTIVAR ON BOUND PHENOLICS COMPOUNDS IN RED LETTUCE

Table 1- Profile representation of non-extractable phenolic compounds in red lettuce cultivars by HPLC-DAD-MS / MS.....	90
Table 2 - p Two-way ANOVA values for non-extractable phenolics compounds of red lettuce cultivars planted in winter and summer.	96
Table 3 - Content of phenolic compounds in the NEPC fraction of red lettuce cultivars in winter (W) and summer (S) obtained by HPLC-DAD	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
CFE	Compostos fenólicos extraíveis
CFNE	Compostos fenólicos não-extraíveis
cv.	Cultivar
DAD	Detector de arranjo de diodos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DW	<i>Dry weight</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
FW	<i>Fresh weight</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LOD	<i>Limit of detection</i>
LOQ	<i>Limit of quantification</i>
MS	Espectrometria de massas
MTBE	<i>Methyl tert-butyl ether</i>
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
N. C.	<i>Not calculated</i>
N. D.	<i>Not detected</i>
Q-TOF	<i>Quadrupole Time-of-Flight</i>
TA	<i>Total anthocyanins</i>
TP	<i>Total phenolics</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 Características da alface	18
3.2 Cultivo de verão e inverno da alface	20
3.3 Compostos bioativos em alface x atividade antioxidante.....	21
3.3.1 Carotenoides.....	22
3.3.2 Compostos Fenólicos (CF).....	25
3.3.3 Fatores que podem influenciar o teor e a composição de compostos bioativos.....	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Material.....	37
4.1.1 Material vegetal, montagem e condução do experimento	37
4.1.2 Reagentes e padrões.....	39
4.2 Métodos	40
4.2.1 Compostos Bioativos.....	40
4.2.2 Atividade antioxidante (método ABTS).....	44
4.2.3 Análise dos resultados	45
5 ARTIGOS CIENTÍFICOS	46
5.1 Artigo 1: Influence of cultivar and season on carotenoids and phenolic compounds from red lettuce.....	46
5.2 Artigo 2: Effect of season and cultivar on bound phenolics compounds in red lettuce....	81
6 DISCUSSÃO GERAL.....	106
7 CONCLUSÃO.....	109
REFERÊNCIAS	110
ANEXO1 - ARTIGO 1 - SUPPORTING INFORMATION.....	117

1 INTRODUÇÃO

A alface é a hortaliça mais cultivada do Brasil com 49,9% da área, seguida pelo repolho, com 15,3%; e couve, com 6,1%. Os tipos de alface mais consumida no País são: crespa, americana, mimosa e romana, que além de possuir boas características sensoriais, baixos teores de calorias, de sódio e de gordura, é uma rica fonte de fibras, vitaminas (provitamina A, vitaminas B1, B2 e C) e minerais (cálcio e ferro) (KIM et al., 2018;). A folha de alface pode ser verde, verde/vermelha e vermelha.

No Brasil popularmente utiliza-se o termo roxo para designar as alfaces de coloração avermelhada, o que seria, na realidade, uma mistura de azul e vermelho que confere a cor magenta. Os termos “alface roxa” ou “alface vermelha” são sinônimos e essa tonalidade, como resultado do acúmulo de antocianinas, pode ser conferida por fatores genéticos, pela condição de luz e/ou por algum gene intensificador de cor, sendo que a presença desse gene dispensa a necessidade de luz para gerar a intensidade da cor (WIEN, 2000). Na literatura internacional o termo “*red lettuce*” ou “alface vermelha” é o mais comum e mais indicado, assim neste trabalho foi utilizado o termo “alface vermelha”.

Os principais contribuintes pela coloração das folhas dos vegetais são as clorofilas e antocianinas; as primeiras são responsáveis pela cor verde (clorofilas a e b), e as antocianinas são responsáveis pelos tons avermelhados de algumas cultivares. As diferenças aparentes na cor do vegetal também ocorrem devido à presença e à distribuição variável de outros pigmentos associados, como carotenoides, os quais sempre acompanham as clorofilas (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Os carotenoides mais relevantes encontrados na alface são violaxantina, luteína e all-*trans*- β -caroteno (KIM et al., 2018). Os compostos fenólicos são metabólitos secundários gerados pela planta para se defender ou para promover o crescimento em condições desfavoráveis (TUNG MUNNITHUM et al., 2018). Esses compostos podem ser divididos em compostos fenólicos extraíveis, os quais são obtidos da matriz alimentar por aplicação direta de solventes orgânicos aquosos (ARRANZ; SILVÁN; SAURA-CALIXTO, 2010) e compostos fenólicos não extraíveis que estão mais ligados à matriz e permanecem nos resíduos de extrações anteriores, sendo obtidos por hidrólise química ou enzimática (GONZALES et al., 2015).

Em folhosos, além de fornecer coloração, os pigmentos estão envolvidos em processos fotossintéticos, nas defesas contra o estresse luminoso evitando a formação de espécies reativas de oxigênio, entre outros (PÉREZ-LÓPEZ et al., 2015). Em relação ao organismo humano, tais compostos podem apresentar atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas e reduzir o risco de doenças cardíacas (MACHADO et al., 2008; KALIORA et al., 2007; EMAN; GORDON, 2017).

As condições de cultivo, como temperaturas máxima e mínima do período de plantio e luminosidade e a cultivar são fatores que podem contribuir para que a alface apresente diferentes teores de pigmentos e/ou componentes bioativos (LÓPEZ et al., 2014).

Estudos que relacionam fatores ambientais e tipos de alface ao seu perfil de compostos bioativos ainda são escassos, especialmente os compostos fenólicos não extraíveis. Além disso, os dados sobre fitoquímicos em cultivares de alface de cor vermelha cultivadas na região Sul, a qual possui estações de frio e calor, não estão bem estabelecidos. Assim, torna-se importante identificar e quantificar os teores de compostos como carotenoides, antocianinas e compostos fenólicos extraíveis e não extraíveis em diferentes cultivares produzidas sob diferentes condições climáticas, principalmente pelo fato da alface representar uma hortaliça consumida durante todos os períodos do ano.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do período de cultivo (inverno e verão) e da cultivar no perfil qualitativo e quantitativo de compostos bioativos presentes em cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) crespa de cor vermelha.

2.2 Objetivos específicos

- Cultivar quatro cultivares de alface vermelha em sistema protegido (casa de vegetação) nos períodos de inverno e verão;
- Identificar e quantificar carotenoides, compostos fenólicos extraíveis e não extraíveis e antocianinas;
- Determinar a capacidade antioxidante total das alfaces;
- Avaliar a diferença de perfil de carotenoides, compostos fenólicos extraíveis e não extraíveis, incluindo antocianinas, em relação ao plantio nos períodos sob diferentes condições climáticas;
- Avaliar a diferença na concentração de compostos bioativos e na atividade antioxidante em relação ao plantio sob diferentes condições climáticas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

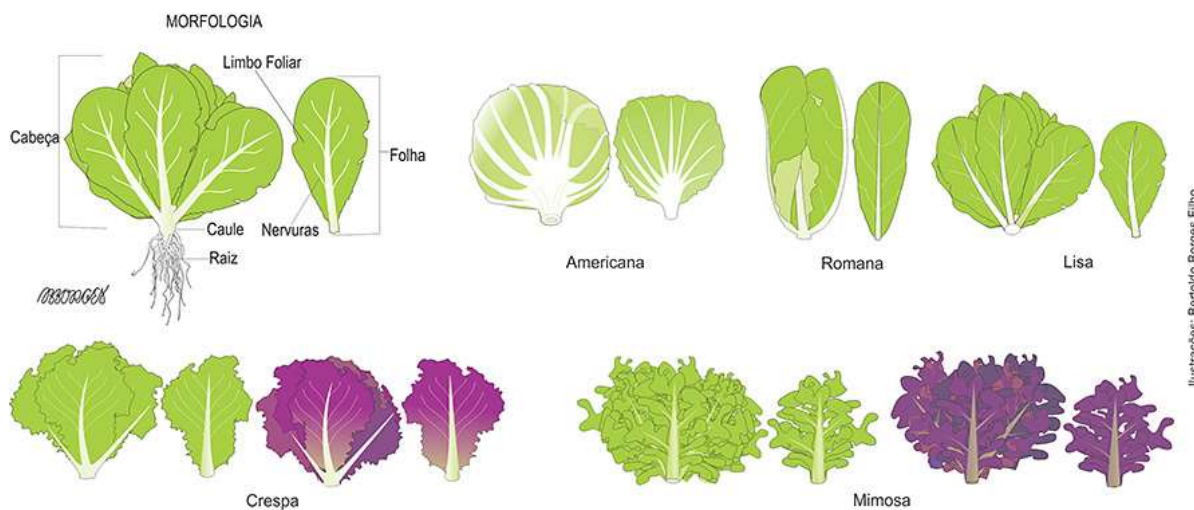
3.1 Características da alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma hortaliça da família *Asteraceae* e gênero *Lactuca*, originária do Mediterrâneo e da Ásia Ocidental (CRONQUIST, 1981). É uma planta herbácea, de ciclo anual (HENZ; SUINAGA, 2009), possui grande área foliar e apresenta ciclo curto (FILGUEIRA, 2008; FILGUEIRA, 2012). É uma hortaliça muito perecível e o momento da colheita deve representar o estado de maior qualidade para o consumo, uma vez que será utilizada principalmente *in natura*, como salada, onde mais nutrientes são retidos em comparação a outros vegetais que são cozidos ou processados (XIAO et al., 2012). Esta folhosa possui boas características sensoriais, baixo teor calórico, sódio e teor de gordura. Além de ser rica em fibras, possui elevados teores de vitaminas como provitamina A, vitaminas C, B1, B2 e minerais cálcio e ferro (KIM et al., 2018; RADIN et al., 2004).

Apesar de ser uma espécie originária de clima temperado e apresentar dificuldades de adaptação em locais de temperatura e luminosidade elevadas a alface pode ser plantada durante o ano, principalmente devido ao melhoramento genético, que tem desenvolvido cultivares adaptáveis a diferentes condições ambientais atendendo a necessidade da planta e otimizando o seu cultivo. Plantas de alta qualidade têm sido produzidas pela constante busca por tecnologia para atender as necessidades da planta e otimizar o seu cultivo (SALA; COSTA, 2012).

A alface é caracterizada por consideráveis variações morfológicas (HENZ; SUINAGA, 2009), possui uma variedade de cores, tamanhos e formas e, por essa diversidade, podem ser agrupadas por seus tipos (MALDONADE; MATTOS; MORETTI, 2014) (Figura 1). Um tipo é um grupo de cultivares que são morfológicamente similares e este pode ser subdividido em subtipos que compartilham mais semelhanças morfológicas e genéticas. Cultivar é uma variedade selecionada de acordo com características desejáveis para o seu cultivo; por sua vez, variedade é uma classificação taxonômica abaixo de espécies e subespécies (KIM et al., 2016).

Figura 1- Morfologia geral da alface e seus cinco diferentes tipos comestíveis nas espécies de *Lactuca sativa* L.



Morfologia geral da alface e seus cinco diferentes tipos comestíveis nas espécies de *Lactuca sativa* L.: americana, romana, lisa, crespa e mimosa – Ilustrações: Bertoldo Borges Filho – Fonte: <https://www.mundoecologia.com.br/plantas/leite-do-alface/> Data: 19 de novembro de 2022.

As folhas de alface podem ser lisas ou crespas, com formação ou não de “cabeça” e coloração variando de verde claro ao verde escuro, sendo que existem ainda algumas cultivares que possuem coloração vermelha devido à presença do pigmento antocianina (FILGUEIRA, 2008; RYDER; JANICK, 2002). Os principais tipos de alface produzidos e comercializados no Brasil são a americana, crespa, lisa e romana; sendo que a alface crespa possui a preferência do consumidor brasileiro (HENZ; SUINAGA, 2009), (Figura 2).

Figura 2 - Principais tipos de alface (*Lactuca sativa* L.) comercializados no Brasil e sua cultivar correspondente na cor vermelha (roxa)



Fonte: Elaborado pela autora.

3.2 Cultivo de verão e inverno da alface

A alface é uma planta sensível às condições adversas de temperatura e umidade, por isso, sua conservação e o transporte pós-colheita limitam a sua produção (SALA; COSTA, 2012). Os principais fatores limitantes na produção de alface são os índices pluviométricos e condições climáticas ocorridas em cada região produtora (ANUÁRIO, 2017). No cultivo da alface, o ciclo da semeadura à colheita pode variar de acordo com o período de cultivo e a cultivar. No inverno o ciclo médio é de aproximadamente 65 dias, no verão o ciclo é mais curto podendo ser menor que 60 dias (FELTRIM et al., 2009; TOSTA et al., 2010).

O melhor desenvolvimento tem sido observado quando as temperaturas oscilam entre 15 e 20°C; no entanto, quando cultivada em regiões de temperatura e luminosidade elevadas esta hortaliça pode não desenvolver todo o seu potencial genético (SALA, 2011). Os extremos de temperatura tolerada pela maioria das cultivares de alface variam entre 6 e 30° C, sendo que a umidade relativa mais adequada está entre 60 a 80% (CERMEÑO, 1990).

O estado do Rio Grande do Sul, assim como nos demais estados da região Sul e Sudeste, produz alface durante todo o ano, no entanto, nos períodos do verão e do inverno, as condições climáticas são desfavoráveis. No verão, ocorrem elevadas temperaturas do ar

(superiores a 20°C), alto índice de radiação solar, alta pluviosidade, o que favorece o pendoamento precoce das folhas, gerando perdas de até 60% em decorrência de maior umidade relativa que favorece o ataque de fungos e bactérias (SEGOVIA et al., 1997; RADIN et al., 2004; SALA; COSTA, 2012).

No inverno com ocorrência de baixas temperaturas (inferiores a 10°C) e precipitações pluviométricas prolongadas que podem retardar o crescimento e danificar as plantas, uma das alternativas para minimizar o efeito negativo das baixas temperaturas consiste na proteção ambiental com túneis ou estufas cobertas com filmes de polietileno (SEGOVIA et al., 1997) e uso de cultivares importadas que são adaptadas ao clima mais frio (HENZ; SUINAGA, 2009).

O cultivo em estufa acelera os parâmetros de crescimento de diferentes cultivares de alface, o que reflete principalmente na antecipação da colheita. Segundo Lima et al. (2008) a temperatura do ar é o elemento climático que exerce maior influência nos processos fisiológicos das plantas de alface, o que pode acelerar ou retardar as reações metabólicas, sob condição de temperatura ótima ou inferiores a esta, respectivamente. Para todas as cultivares de alface, a ocorrência de dias curtos e temperaturas amenas favorecem a etapa vegetativa, sendo estas, inclusive, resistentes a baixas temperaturas e geadas leves (FILGUEIRA, 2008).

O melhoramento genético tem beneficiado a cultura da alface com o desenvolvimento de cultivares mais resistentes à diferentes condições climáticas (MALDONADE; MATTOS; MORETTI, 2014).

3.3 Compostos bioativos em alface x atividade antioxidante

Antioxidante é uma substância que, em baixa concentração em relação a um determinado substrato, retarda ou previne a oxidação do substrato oxidável (HALLIWELL, 2003). Quando o mecanismo de ação for através de sua reação com o radical livre, o novo radical formado deve ser estável e incapaz de propagar a reação (CHANDRASEKARA; SHAHIDI, 2011), protegendo contra danos oxidativos ao DNA, proteínas e lipídios e têm um impacto significativo na regulação da expressão gênica, sendo os mais relatados as vitaminas C e E, carotenoides, polifenóis de baixo peso molecular (MANACH et al., 2004).

Essa atuação no sequestro de radicais livres está associada à redução da incidência de patologias degenerativas (SCALBERT et al., 2005).

Os alimentos vegetais são fontes de compostos bioativos, fenólicos e antioxidantes (AMODIO et al., 2014). Além disso, representam fonte de energia, proteína, vitaminas, minerais e fibras (BASTOS et al., 2009). Compostos bioativos podem apresentar efeitos benéficos à saúde humana, e muitas pesquisas epidemiológicas demonstraram efeitos protetores de dietas à base de plantas sobre doenças cardiovasculares e câncer (AUNE et al., 2018; DAMERUM; CHAPMAN; TAYLOR, 2020; PARK; PEZZUTO, 2012; YOUNUS et al., 2019). Contudo, o efeito protetor desses compostos frente a doenças crônicas não transmissíveis parece não se reproduzir pela ingestão isolada do constituinte químico na forma de suplementos. Estudos clínicos, em que a dieta foi suplementada com β -caroteno, vitamina C ou vitamina E, mostraram que essas substâncias, isoladas da matriz alimento, não foram eficazes na diminuição de risco de doenças, indicando que outros fatores atuam nesse processo, como a biodisponibilidade e a ação sinérgica entre os compostos (LIU et al., 2007).

Dentre os compostos bioativos presentes na alface, os majoritários dos carotenoides são luteína, β -caroteno, lactucaxantina, neoxantina e violaxantina (KIM et al., 2018; BASLAM et al., 2013; CALDWELL; BRITZ, 2006), que são tetraterpenos lipossolúveis presentes principalmente nos plastídeos. Entre os ácidos fenólicos principais estão os ácidos dicafeoil tartárico, clorogênico e caféico (NICOLLE et al., 2004). Em relação aos flavonóis, foi identificado apenas um, a quercetina (HUBER et al., 2007), e a principal antocianina encontrada foi a cianidina, em cultivares de alface vermelha (MULABAGAL et al., 2010).

3.3.1 Carotenoides

Os carotenoides têm sido amplamente estudados, devido à sua destacada atividade antioxidante (ARUNA; BASKARAN, 2010). São pigmentos naturais metabolizados por plantas, algas e bactérias fotossintéticas (NAMITHA; NEGI, 2010). Sua estrutura básica é obtida a partir da junção de oito unidades de isopreno, com cadeia linear e simétrica, chamados de tetraterpenos (C40) (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001), possui um conjunto de ligações duplas conjugadas podendo apresentar diferenças em sua cadeia, como ciclização,

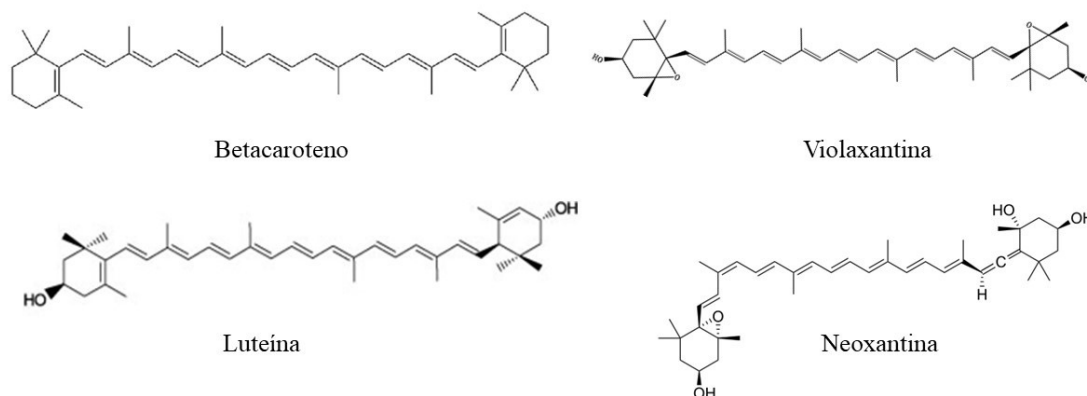
hidrogenação, desidrogenação, encurtamento ou extensão, o que permite a obtenção de compostos com diferentes características (NAGARAJAN et al., 2017; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Estes compostos podem ser divididos em dois grupos estruturais que são os carotenos hidrocarbonetos, possui apenas a cadeia de hidrocarboneto original sem qualquer grupo funcional, como α -caroteno, β -caroteno e licopeno, e as xantofilas contendo oxigênio como grupo funcional. As xantofilas consistem de diversos derivados, os quais podem conter grupos hidroxila, epóxi, aldeídos e ceto (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; SAINI et al., 2015), esses grupos polares adicionados às moléculas dos carotenoides alteram sua polaridade e suas funções biológicas (BRITTON, 2008). Os carotenoides desempenham papéis indispensáveis na fotossíntese como pigmentos acessórios para a absorção de luz e na prevenção de danos foto-oxidativos, sendo que os principais carotenoides que desempenham esta função nas plantas são as xantofilas luteína, violaxantina e neaxantina (BECKER et al., 2015; ROSA et al., 2014).

A localização dos carotenoides nos cromoplastos e a presença de um cromóforo em sua estrutura química os tornam sensíveis à intensidade da luz (DAMODARAN et al., 2010). A existência desse cromóforo, ou de uma cadeia de duplas ligações conjugadas, em sua molécula, permite que tais compostos forneçam às frutas e hortaliças cores amarelas, laranja e avermelhadas (FRASER; BRAMLEY, 2004). O processamento e armazenamento de alimentos, a exposição a ácidos e ao calor em excesso são alguns dos fatores que podem provocar a perda de carotenoides (RODRIGUEZ-AMAYA, 2002).

Alguns carotenoides podem ser convertidos em vitamina A e, como tal, desempenham um importante papel na prevenção da sua síndrome, que causa xerofthalmia bem como distúrbios de crescimento na primeira infância (XIAO et al., 2012). O mais ativo dos carotenoides provitamínicos A é o β -caroteno (NISAR et al., 2015), Figura 3. No Brasil, a recomendação de ingestão diária de referência para a população de vitamina A é de 900 μ g equivalente de retinol/dia para homens adultos e 700 μ g equivalente de retinol/dia para mulheres adultas (BRASIL, 2013). Uma porção de 100 gramas de alface fresca pode fornecer até 2.075 μ g de retinol equivalente de vitamina A, que atende a recomendação para adultos. Além disso, a mesma quantidade de alface fornece até 1038 μ g equivalente de atividade de retinol de vitamina A (ROSS et al., 2020), portanto, algumas variedades de alface podem ser consideradas alimento fonte de provitamina A.

Figura 3 - Estruturas moleculares dos principais carotenoides encontrados em alface



Fonte: Elaborado pela autora.

A luteína é um constituinte comum de plantas superiores e é um dos principais carotenoides em alfaces (NICOLLE et al., 2004; CALDWELL; BRITZ, 2006). Além da luteína, que é encontrada em quantidade de aproximadamente 30%, a violaxantina e a lactucaxantina representam uma média de 28% e 15%, respectivamente, do total de carotenoides.

Contudo, a proporção de carotenoides em alface pode ser diferente, conforme relatado por KIM et al. (2018) que ao avaliar diferentes cultivares de alface vermelha e verde, encontraram o β -caroteno como o carotenoide principal (50% do total dos carotenoides), seguido pela luteína (20%), lactucaxantina (13%), violaxantina (11%) e neoxantina (6%).

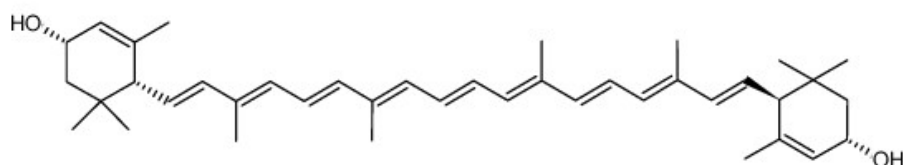
Outros pigmentos encontrados na alface em menores concentrações são α -caroteno, α ou β -criptoxantina, zeaxantina, antheraxantina e 5,6-epóxido-luteína (RODRIGUEZ-AMAYA, 2016). Em geral, as cultivares de alface vermelha acumulam maior quantidade de carotenoides do que as alfaces verdes (SAINI; KEUM, 2017; YANG et al., 2022) sendo que a proporção desses fitoquímicos pode variar de acordo com a cultivar, condições de cultivo, entre outros fatores ambientais e genéticos.

Dentre as xantofilas, a luteína e a zeaxantina possuem estrutura similar (Figura 3), sendo dois carotenoides encontrados na região macular dos olhos e evidências sugerem que a luteína protege contra a degeneração macular (HASLER, 2002; KIMURA; RODRÍGUEZ-

AMAYA, 2003), uma causa da cegueira em pessoas com mais de 50 anos de idade (RATNAPRIYA; CHEW, 2013). Van Den Berg et al. (2000) relataram uma grande variedade de conteúdo de luteína e β -caroteno em alface, com valores que variaram de 73 a 4537 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ e de 48 a 3120 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, respectivamente. López et al. (2014) encontraram um teor de β -caroteno que variou de 19 a 42 $\mu\text{g}/\text{g}$ em 16 cultivares de alface estudadas.

A lactucaxantina isolada de cloroplastos de alface (Figura 4) é o sexto isômero quirail do ϵ,ϵ -caroteno-3,3'-diol e é restrita para a alface (SIEFERMANN-HARMS et al., 1981; KIMURA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2003; BASLAM et al., 2013; LÓPEZ et al., 2014).

Figura 4 - Estrutura química da lactucaxantina – 4,4'-didehidro-6,6'-dihidro- β,β -caroteno-3,3'-diol



Fonte: Elaborado pela autora.

Em estudo *in vitro* em ratos diabéticos, a lactucaxantina mostrou possuir potencial de inibição da atividade da α -amilase e α -glucosidase (GOPAL et al., 2017). Caldwell e Britz (2006) detectaram em cultivares de alface de folhas verdes e vermelhas cultivadas sob as mesmas condições teores de lactucaxantina que variaram de 4,0 a 9,3 $\mu\text{g}/\text{g}$.

De modo geral, vários trabalhos têm demonstrado que o perfil e a concentração dos carotenoides em alface podem ser afetados por vários fatores como a cultivar (VOLPE et al 2021), tipo de cultivo (LÓPEZ et al., 2014), estágio de maturação (KIM et al., 2018), período de exposição à luz durante o desenvolvimento da planta (ILIC et al. 2017) e aplicação de radiação UV-B suplementar na pré-colheita (ASSUMPÇÃO et al., 2019). Os vegetais e as frutas são as principais fontes de carotenoides e a sua composição constitui um papel essencial na dieta (HASKELL, 2013).

3.3.2 Compostos Fenólicos (CF)

Compostos fenólicos são metabólitos secundários que são gerados pela planta para se defender ou para promover o crescimento em condições desfavoráveis (TUNGMUNNITHUM et al., 2018). São antioxidantes que interagem com os radicais livres,

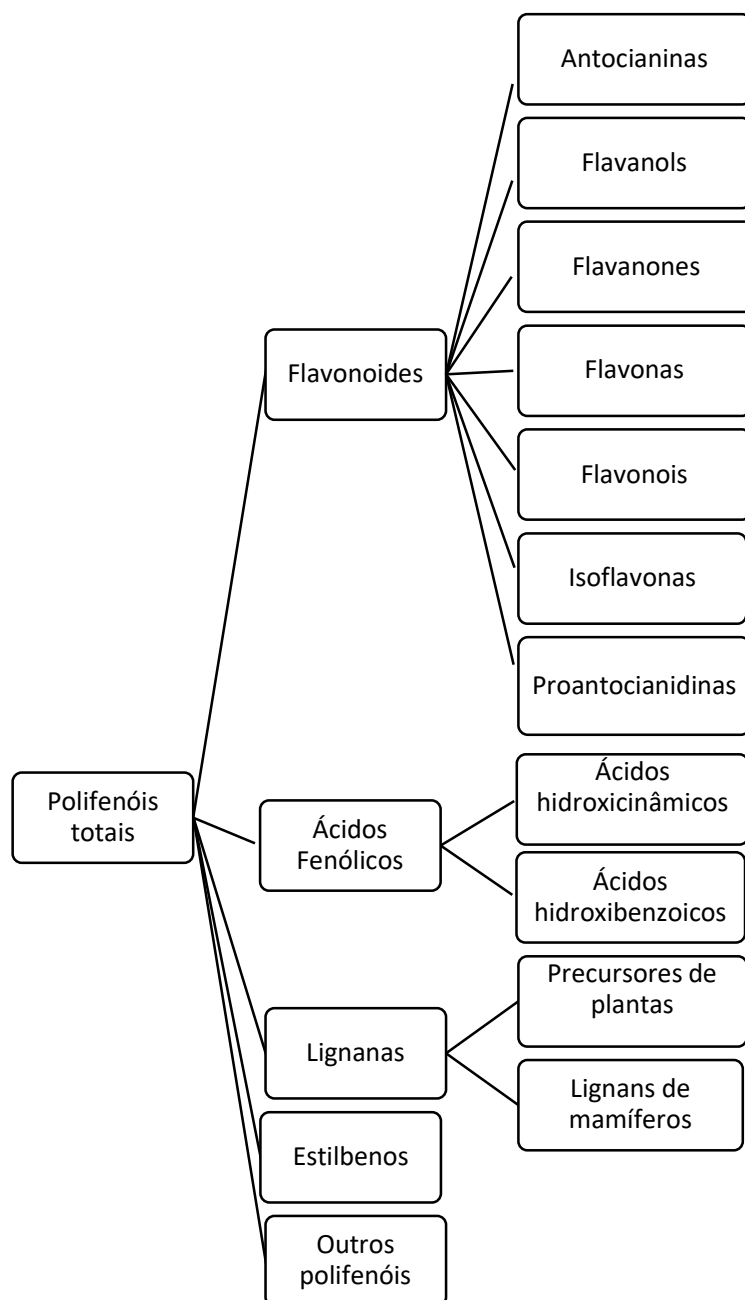
presentes em suas estruturas químicas hidroxilas e anéis aromáticos (ORDIDGE et al., 2010; PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2018). Tais compostos estão presentes em plantas e têm sido estudados em cereais, legumes, nozes, azeite, vegetais, frutas, chá e vinho tinto. Existem evidências suficientes para recomendar o consumo de alimentos ricos em compostos bioativos; (EMAN; GORDON, 2017; KALIORA; DEDOUSSIS, 2007; TROJAK; SKOWRON, 2017). Entre os principais compostos relacionados à promoção da saúde estão os ácidos clorogênico, caféico e chicórico que podem estar na forma livre ou complexados a açúcares e proteínas (ANGELO; JORGE, 2007). A quantidade desses antioxidantes e micronutrientes nas folhas de alface é suscetível a grande variação em resposta a cultivares (LLORACH et al., 2008), condições de crescimento (ou seja, cultivo ao ar livre ou interno), bem como ao estresse ambiental.

Existe uma ampla gama de polifenóis, os quais podem ser divididos em subclasses, como os flavonoides, ácidos fenólicos, lignanas, estilbenos e outros polifenóis (Figura 5). Os compostos fenólicos geralmente são sólidos de cor branca, embora alguns (flavonoides) apresentam cor amarela e outros apresentam cor vermelha (antocianinas) resultante de suas conjugações eletrônicas. Os fenólicos voláteis, de baixa massa molecular, muitas vezes possuem aromas característicos, como a vanilina e o eugenol, (CHEYNIER et al., 2013) componentes principais que dão o aroma característico da baunilha e do óleo de cravo, respectivamente.

Compostos fenólicos são eficientes na desativação de radicais livres, uma vez que os grupos fenólicos são prontamente ionizados e atuam como ácidos fracos, podendo estabilizar os radicais livres através da doação de um elétron e/ou hidrogênio e assim as estruturas aromáticas resultantes se estabilizam por ressonância, não se tornando reativas; e os grupos funcionais hidroxila (-OH) e carbonila (-CO) são centros de elevada afinidade para íons metálicos, atuando como quelantes de metais de transição (FRAGA et al., 2010).

Os principais compostos fenólicos da alface vermelha são glicosídeos de cianidina, quercetina e luteolina (LLORACH et al., 2008). O ácido dicafeoil tartárico é um dos principais compostos fenólicos identificados em alfaces verdes e vermelhas. Nicole e Carnel (2004) detectaram mais que o dobro de ácido dicafeoil tartárico e 10 vezes mais ácido clorogênico em alfaces vermelhas em comparação com as cultivares de alfaces verdes. Outro ácido fenólico importante encontrado na alface é o ácido caféico (BECKER; KLÄRING, 2016).

Figura 5 - Subclasses de polifenóis.



Fonte: Probst; Guan; Kent (2018).

Composto fenólicos extraíveis e não extraíveis

Outra classificação existente para os compostos fenólicos está relacionada à forma em que esses compostos estão ligados à matriz alimentar. Assim, os compostos fenólicos extraíveis ou solúveis (CFE) são extraídos da matriz pela aplicação direta de solventes

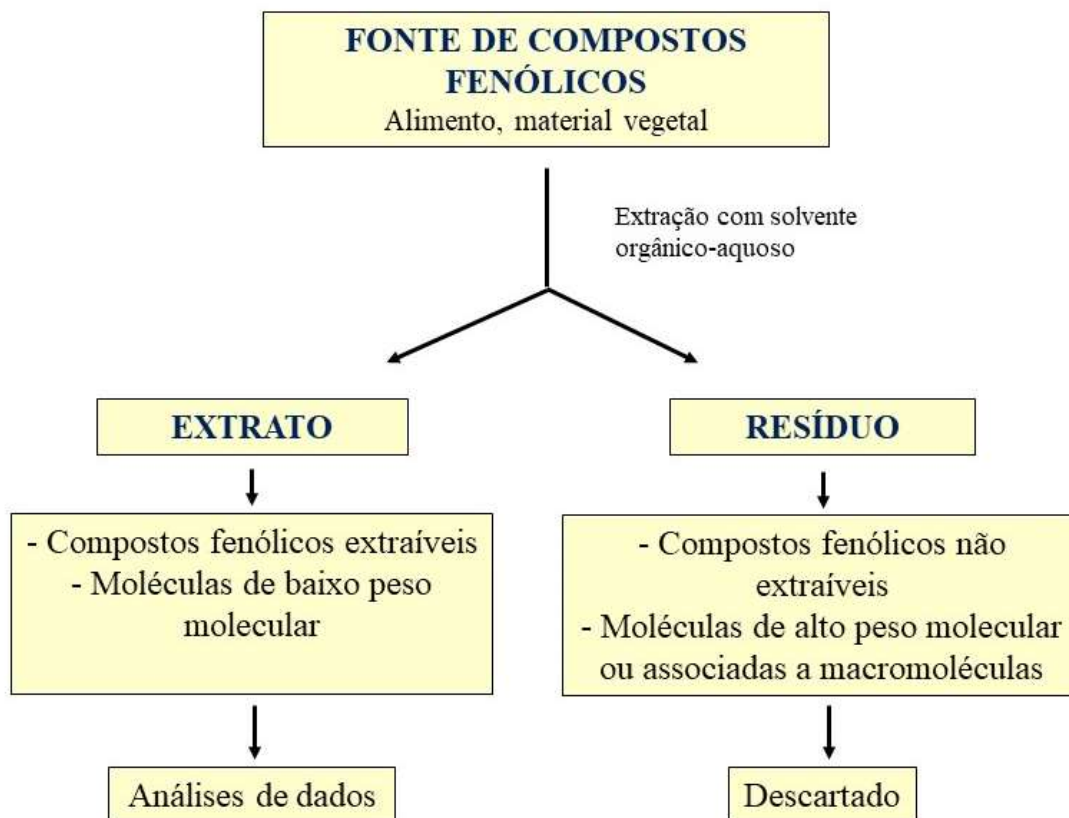
orgânicos-aquosos e normalmente são moléculas de baixa massa molecular agrupados em diversas classes e subclasses, incluindo proantocianidinas (geralmente até decâmetros) e taninos hidrolisáveis de baixo peso molecular (DURAZZO, 2018; HÜMMER; SCHREIER, 2008). CFE são conhecidos como “extraíveis” porque são facilmente removidos dos alimentos através de extrações com solventes e/ou água e agitação; no entanto não estão livres na matriz alimentar (MARTINS et al., 2022), estes compostos estão possivelmente ligados a componentes por diferentes interações fracas, como van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio ou forças eletrostáticas (LIU et al, 2019; ZHAO et al., 2020; ZHOU et al., 2020), as quais são rompidas durante a extração com solventes orgânicos. No entanto, CFNE (compostos fenólicos não extraíveis) permanecem nos resíduos das extrações anteriores e só podem ser liberados por tratamentos de hidrólise, sejam eles químicos ou enzimáticos. Os CFNE são polifenóis poliméricos e pequenos compostos fenólicos ligados à macromoléculas da parede celular, como celulose e proteínas (polifenóis hidrolisáveis) - incluem várias classes de componentes bioativos (por exemplo, taninos hidrolisáveis ou ácidos hidroxicinâmicos) ligados por meio de ligações covalentes, (PÉREZ-JIMÉNEZ; DÍAZ-RUBIO; SAURA-CALIXTO, 2013; PÉREZ-JIMÉNEZ; TORRES, 2011), por ligações éster e glicosídicas, contribuindo para a formação da estrutura da parede celular (AGATI et al., 2012; GAN et al., 2018; GIADA, 2013).

Os métodos utilizados para analisar compostos fenólicos em alimentos (Figura 6) consideravam que o conteúdo total e a composição desses compostos estavam nos extratos orgânicos aquosos de alimentos vegetais; nesse contexto, os compostos fenólicos presentes nos resíduos de extração eram desprezados (SAURA-CALIXTO, 2018).

Os CFNE compreendem uma média de 24% do total de fenólicos presentes em frutas e vegetais e, em grãos integrais, a proporção pode variar de 60 a 85% (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014). Estes compostos afetam significativamente a biodegradabilidade e a taxa de fermentação da fibra dietética no cólon humano. A absorção, as funções fisiológicas e a biodisponibilidade dos compostos fenólicos ligados à parede celular diferem dos compostos fenólicos livres (KROON et al., 1997) e a liberação pode ser influenciada por sua ligação à fibra dietética (EMAN; GORDON, 2017; ESPARZA-MARTÍNEZ et al., 2016). A ingestão dietética de formas ligadas terá uma atividade quimiopreventiva contra o câncer de cólon, e a ingestão de formas conjugadas livres e solúveis será mais rapidamente absorvida no estômago e intestino delgado e

distribuída por todo o corpo com outros benefícios à saúde, como atividades de inibição contra a oxidação do colesterol LDL e lipossomas (CHANDRASEKARA; SHAHIDI, 2011).

Figura 6 - Procedimento normalmente utilizado para análise de compostos fenólicos



Fonte: Adaptado de Saura-Calixto (2018).

Os CFNE mais comuns são ácido ferúlico, ácido caféico e ácido sinápico, ácidos elágicos e outros derivados, como tanino hidrolisável (DURAZZO, 2018). Em alface os principais CFNE reportados são os ácidos caféico e cafeoiltartárico (Zhou et al. 2018) e o ácido p-cumárico (LÓPEZ et al. 2014). A fração dos CFNE da alface pode representar uma média de 33% do teor dos compostos fenólicos totais (GALIENI et al. 2015).

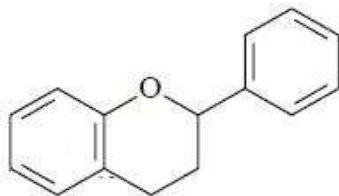
Correlações significativas ($P < 0,05$) foram encontradas entre o conteúdo das frações dos CFE e CFNE e a capacidade antioxidante correspondente (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2015; MALLMANN et al., 2020).

3.3.2.1 Flavonoides

Flavonoides são metabólitos secundários sintetizados pelas plantas e pertencem ao grupo dos compostos fenólicos (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008; MACHADO et al., 2008). Os flavonoides, principalmente antocianinas e flavonóis, atuam nas plantas atraindo polinizadores e disseminadores de sementes. Além da pigmentação em frutas, flores, sementes e folhas, os flavonoides também têm importantes funções na sinalização entre plantas e micróbios na fertilidade de algumas espécies, na defesa como agentes antimicrobianos e na proteção à radiação ultravioleta (WINKEL-SHIRLEY, 2001).

Os flavonoides são caracterizados pelo núcleo básico flavilium (cátion 2-fenilbenzopirílio) que consiste de dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos e condensados por um oxigênio (Figura 7). Eles podem ser divididos em várias classes de acordo com o grau de oxidação do heterofilo de oxigênio: flavonas, flavonóis, isoflavonas, antocianinas, flavonoides, proantocianidinas e flavanonas (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000).

Figura 7 - Estrutura básica dos flavonoides



Fonte: Scalbert; Williamson (2000).

Geralmente, flavonoides encontrados nas folhas podem ser diferentes daqueles presentes nas flores, nos galhos, raízes e frutos, podendo apresentar diferentes concentrações dependendo do órgão vegetal em que se encontra (SIMÕES et al., 2000). Fatores abióticos naturais como a radiação solar, períodos de seca ou chuva, nutrientes e estações do ano influenciam no metabolismo e na produção destes compostos e ainda, fatores artificiais, como poluentes, podem interferir também nesse mecanismo (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

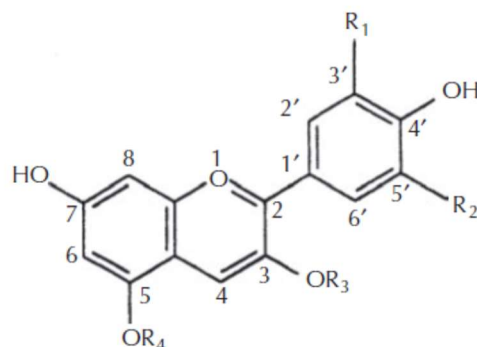
Muitos estudos têm demonstrado que os flavonoides têm uma forte atividade antioxidante e anti-inflamatória (BEARA et al., 2009; LI et al., 2009; LEONG et al., 2010). Os flavonoides são reconhecidos como agentes quimiopreventivos e inibidores da

progressão de tumores (WANG et al., 2019). A atividade antioxidante dos flavonoides é consequência das suas propriedades de óxido-redução, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Os flavonoides podem prevenir danos causados por radicais livres através dos seguintes mecanismos: neutralização direta de EROs; ativação de enzimas antioxidantes; quelação de metais; redução de radicais α -tocoferil; inibição de oxidases; mitigação do estresse oxidativo causado pelo NO• e aumento da atividade de antioxidantes de baixo peso molecular (PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011). Dessa forma, eles demonstram grande eficiência no combate de vários tipos de moléculas oxidantes que estão envolvidas em danos no DNA e formação de tumores (MACHADO et al. 2008). Os compostos fenólicos predominantes na alface vermelha são os ácidos fenólicos e os flavonóis (LLORACH et al., 2008).

3.3.2.2 Antocianinas

As antocianinas fazem parte do grupo dos flavonoides e são responsáveis pela pigmentação vermelha da alface. A palavra antocianina deriva de duas palavras gregas: *anthos* (flor) e *kyanos* (azul). Fazem parte dos grupos de pigmentos de maior distribuição no reino vegetal. (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Essa estrutura central, também chamada de aglicona, tem como cromóforo básico o cátion flavílium, 2-fenilbenzopirílio (Figura 8). O cromóforo é formado por 15 átomos de carbono e 1 de oxigênio como heteroátomo, todos em hibridização sp^2 (CHEREPLY et al., 1997).

Figura 8 - Estrutura central das antocianinas



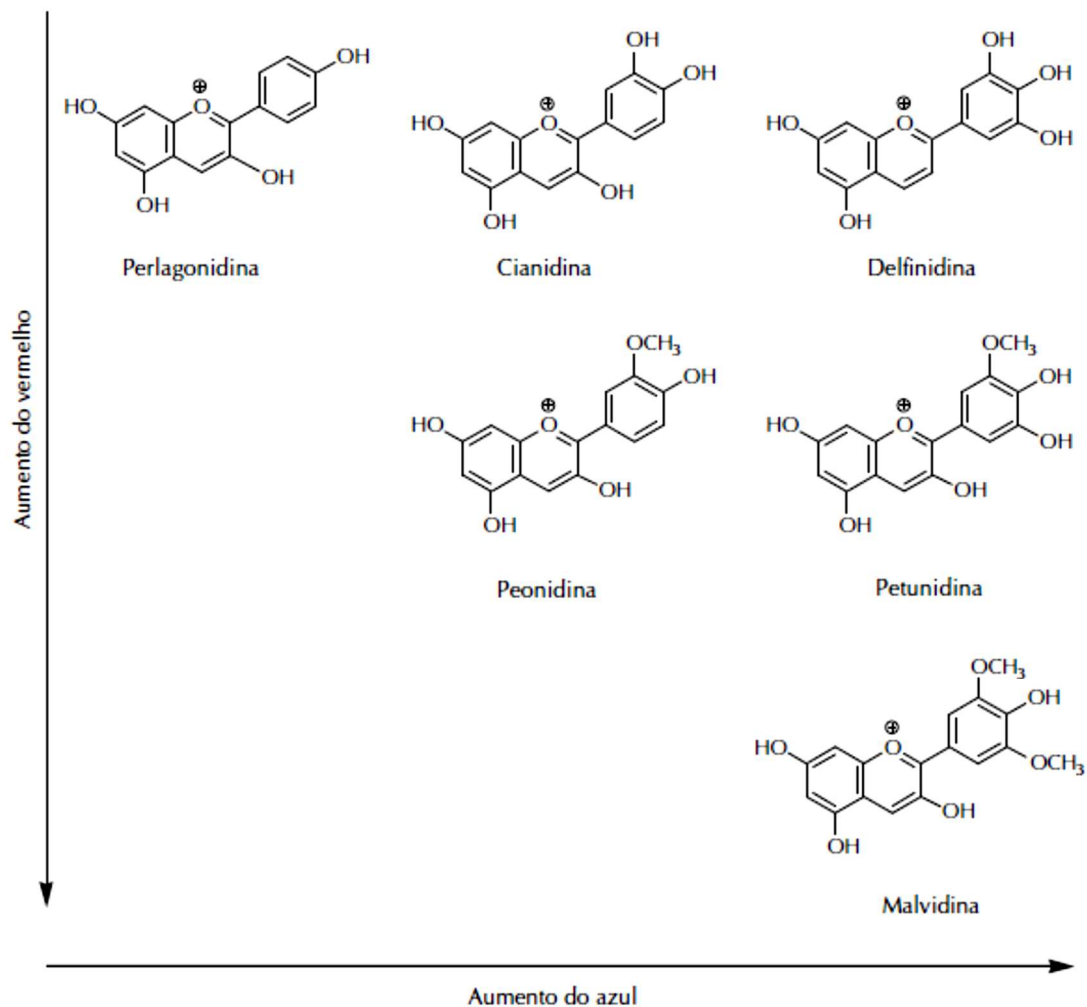
Estrutura central das antocianinas: Cátion flavilium. R1 e R2 = -H, -OH ou -OCH3, R3 = -glicosil, R4 = -H ou -glicosil.

Fonte: Damodaran; Parkin; Fennema, (2010).

A estabilidade das antocianinas é afetada por vários fatores e os principais são luz, pH, temperatura, concentração, oxigênio, estrutura química, solventes e presença de enzimas (REIN, 2005). As interações hidrofóbicas e as pontes de hidrogênio entre diferentes antocianinas e com outros ácidos fenólicos e alcaloides presentes em diversas plantas afetam a intensidade da cor, mudando o comprimento de onda da absorção da luz.

As seis antocianidinas mais comuns em alimentos são mostradas na Figura 9. O aumento da tonalidade é o resultado de uma mudança batocrômica, o que significa que a banda de absorção da luz na faixa de espectro visível muda de um comprimento menor para um maior, ou seja, ocorre um deslocamento do comprimento de onda de máxima absorção (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Os pigmentos variam dentro do espectro de cores desde o azul até o vermelho intenso e a relação com o número de grupos hidroxilas na molécula indica o nível de coloração azulada. Assim, quanto maior a quantidade de hidroxila na molécula, maior será a tendência à cor azul (BOBBIO et al, 1995). A agregação do grupo metoxila na molécula aumenta a intensidade do vermelho. Além disso, a coloração dos frutos pode ainda sofrer interferências da coexistência de outros pigmentos e possíveis ligações com outros metais podem interferir na coloração das antocianinas (RIBEIRO, SERAVALLI, 2007).

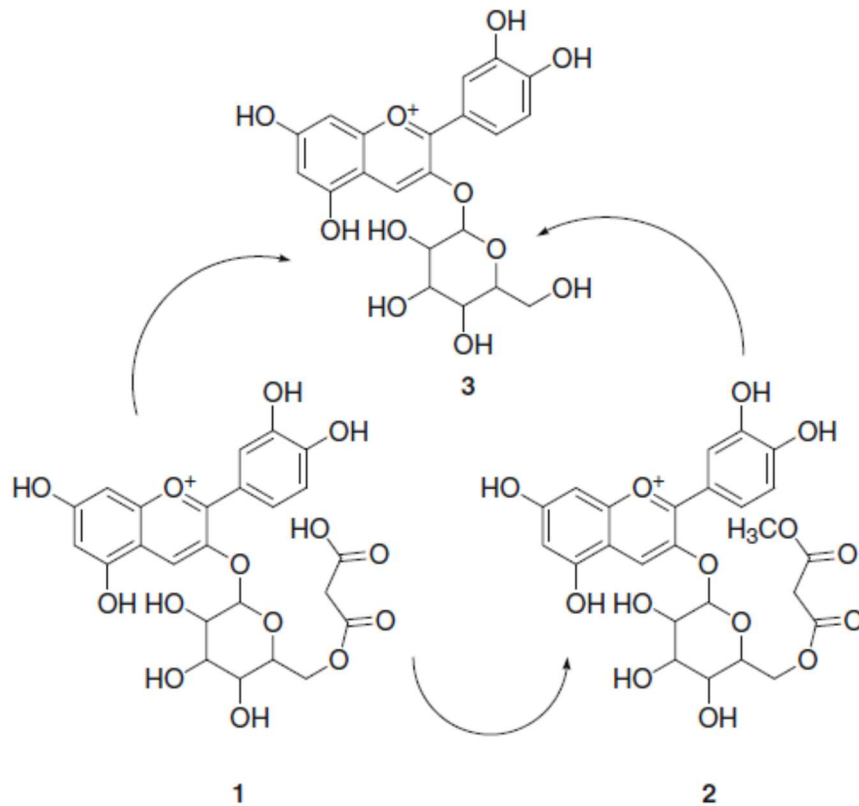
Figura 9 - Esqueleto carbônico de alguns flavonoides importantes, classificados por sua cadeia estrutural C-3



Fonte: (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Mulabagal et al., (2010) avaliaram as propriedades funcionais de cultivares de alface vermelha e verde cultivadas em condições de campo e identificaram apenas uma antocianina, cianidina-3-O-(6 “-malonil- β -glicopiranósido) (Figura 10:1), que se converteu imediatamente em éster metílico de cianidina-3-O- (6”-malonil- β -glicopiranósido) (Figura 10:2) e cianidina-3-O- β -glicopiranósido (Figura 10:3) em condições laboratoriais. Segundo os autores, a variação de fenólicos nas alfaces vermelhas e verdes, e especificamente a falta de antocianinas na alface verde, pode explicar a maior atividade biológica obtida com a variedade vermelha nesse estudo.

Figura 10 - Estrutura da antocianina 1 (cianidina-3-O- (6''-malonil- β -D-glicopiranosido), 2 (cianidina-3-O- (6''-malonil- β -D -glicopiranosido metil éster) e 3 (cianidina-3-O β -D -glicopiranosido)



Fonte: MULABAGAL et al., 2010.

De modo geral, estudos mostram que a alface, especialmente a de coloração vermelha, é uma hortaliça rica em carotenoides, antocianinas e compostos fenólicos, possui potencial antioxidante, além de ser rica fonte vitamina C, folatos e ferro, sendo assim uma fonte e acessível desses nutrientes.

3.3.3 Fatores que podem influenciar o teor e a composição de compostos bioativos

Diversos são os fatores que podem alterar o teor de compostos bioativos em alimentos. Embora esses compostos sejam determinados geneticamente, estes são influenciados também por fatores como estação do ano, clima, composição do solo, estágio de maturação, preparo, processamento e estocagem dos alimentos (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

O conteúdo fenólico das plantas depende quantitativa e qualitativamente da sua informação genética (REE; HARBORNE, 1984). O meio ambiente também desempenha um papel importante na determinação da composição fenólica. A irrigação e a composição do solo têm um efeito marcante sobre o conteúdo fenólico das plantas e sobre os distúrbios fisiológicos fenólicos. A irradiação solar, a intensidade da luz e a qualidade também têm um efeito importante no metabolismo fenólico, uma vez que afetam a biossíntese de flavonoides (NICOLLE et al., 2004). Além disso, sua contribuição para a fotossíntese é clara através da coleta e transferência de energia luminosa para moléculas de clorofila. Em particular, as moléculas de clorofila a e b são pigmentos vitais, que permitem a absorção de luz e transferência de energia luminosa nos centros de reação dos fotossistemas. De acordo com a cultivar, o teor de clorofila e carotenoides pode variar (BASLAM et al., 2013).

Em estudo com cultivares de alface verde e vermelha, cultivadas em estufa sob controle e expostas às radiações UV-A e UV-B, verificou-se que as alfaces verde e vermelha diferiram em suas respostas às radiações que podem ser atribuídas a mudanças dependentes da luz nos níveis de seus fitoquímicos. O UV-B suplementar aumentou a concentração de carotenoides e clorofila de alface verde, enquanto reduziu os níveis destes compostos em alface vermelha; esses resultados sugerem que a seleção de variedades específicas de alface para produção em estufa pode aumentar seus benefícios nutricionais (CALDWELL; BRITZ, 2006). Outra pesquisa em folhas de alface de coloração verde-escura quantificou nas folhas externas da planta um teor 30 vezes maior de vitamina A que as internas (FRANCO, 1987). A seleção de cultivares específicas e a produção em estufas comerciais pode resultar em alface com teor de fitonutrientes modificado (CALDWELL; BRITZ, 2006). Estudos comparativos mostraram que cultivares de alface pigmentada vermelha apresentam diferença em seus conteúdos fenólicos e sua capacidade antioxidante em relação às cultivares verdes, cultivadas nas mesmas condições. Para a maioria dos casos a alface vermelha apresentou maior teor nos componentes com bioatividade (MULANAGAL et al., 2010; BASLAM et al., 2013; BECKER; KLRING, 2016).

Em análise de estabilidade de compostos bioativos entre cultivares de alface de cor verde e vermelha em temperatura ambiente e em refrigeração a 4 °C por 12 dias, concluiu-se que as alterações no teor de carotenoides foram maiores quando armazenados em temperatura ambiente, aproximadamente 36% até o terceiro dia, de 8,41 a 5,42 mg / 100 g de FW, sendo que essa alteração não foi observada quando as alfaces foram refrigeradas.

Enquanto isso, o teor de antocianina total na alface vermelha não diminuiu significativamente, indicando que as antocianinas possuem maior estabilidade durante o armazenamento se comparada aos carotenoides. Este resultado sugere que os carotenoides em alface verde são mais estáveis quando refrigerados do que à temperatura ambiente (PARK et al., 2015). O genótipo, juntamente com outros fatores ambientais, influencia a proporção de cada carotenoide; essa afirmativa já pode ser constatada em outros compostos bioativos, como as antocianinas (VOLPE et al., 2021). Liu et al. (2007) analisaram a influência do período de cultivo sobre compostos bioativos e capacidade antioxidante e constataram que a alface colhida em julho possuía maior capacidade antioxidante, medidos pelo método DPPH, do que a alface colhida em setembro, sugerindo que as condições ambientais poderiam influenciar o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante da alface. Lourdes et al. (2014) mostraram que variedades de alface vermelha expostas a maior intensidade de luz possuíam maior capacidade antioxidante e atividades enzimáticas. Além disso, a resposta antioxidante em relação à luz foi principalmente dependente do potencial genético das variedades. O β -caroteno é um carotenoide fotossensível que pode ser degradado pela luz (especialmente em UV $\lambda < 425$ nm) (GARCÍA-FUENTES; TORRES; ALONSO, 2003); assim ao absorver a luz, o sensibilizador é convertido em um estado tripleto excitado que pode facilmente interagir com outra molécula e produzir radicais livres ou oxigênio singleto altamente reativo (LÓPEZ-RUBIO; LAGARON, 2011).

Com relação às antocianinas, as plantas não somente podem conter misturas desse fitoquímico, mas também proporções relativas que variam com o tipo de cultivo e a maturidade da planta (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Diversos autores têm relacionado o efeito dos fatores como luz e pH na degradação das antocianinas (FLESCHHUT et al., 2006; RODRIGUEZ-AMAYA, 2019; WEBER et al., 2017). O aumento da metilação aumenta a estabilidade das antocianinas, e diminui com um número crescente de grupos hidroxila no anel B das antocianidinas (FEI et al., 2021). Porém, a alta acidez favorece a estabilidade desse pigmento, que em meio ácido encontram-se quase totalmente em sua forma mais importante e mais estável, que é a de cátion flavilium (KOO et al., 2017). O processamento e o armazenamento dos alimentos provocam a degradação das antocianinas, e os principais fatores envolvidos são temperatura e concentração de oxigênio. Outros fatores de menor importância são presença de enzimas deteriorantes, ácido ascórbico, dióxido de enxofre, íons metálicos e açúcares (DAMODARAN; PARKIN;

FENNEMA, 2010). A suplementação de radiação UV-B pode afetar positivamente os compostos fenólicos, especialmente as antocianinas (JIANG et al., 2016).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material

As sementes das cultivares de alface vermelha (*Lactuca sativa* L.) (Figura 11) foram produzidas e doadas pela Empresa Sakata, sendo utilizadas quatro cultivares (Mila, Maira, Carmin e Scarlet) as quais apresentam características próprias, conforme descritas na Tabela 1.

Figura 11 - Cultivares de alface vermelha



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 1 - Características das cultivares de alfaces utilizadas no experimento

Número	Nome da cultivar	Nome botânico	Grupo do cultivar	Cor da folha	Ciclo médio
1	Mila	<i>Lactuca sativa</i> L.	Mimosa	Verde/vermelha	56 dias
2	Maira	<i>Lactuca sativa</i> L.	Mimosa	Vermelha	56 dias
3	Carmin	<i>Lactuca sativa</i> L.	Crespa roxa	Vermelha	60 dias
4	Scarlet	<i>Lactuca sativa</i> L.	Crespa roxa	Verde/vermelha	60 dias

Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.1 Material vegetal, montagem e condução do experimento

O experimento foi conduzido em ambiente protegido (estufas de cultivo) na Faculdade de Agronomia, localizada no Setor de Horticultura do Campus do Vale da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (Figura 12).

Figura 12 - Localização geográfica do plantio das cultivares de alface (-30.070768, -51.139466)



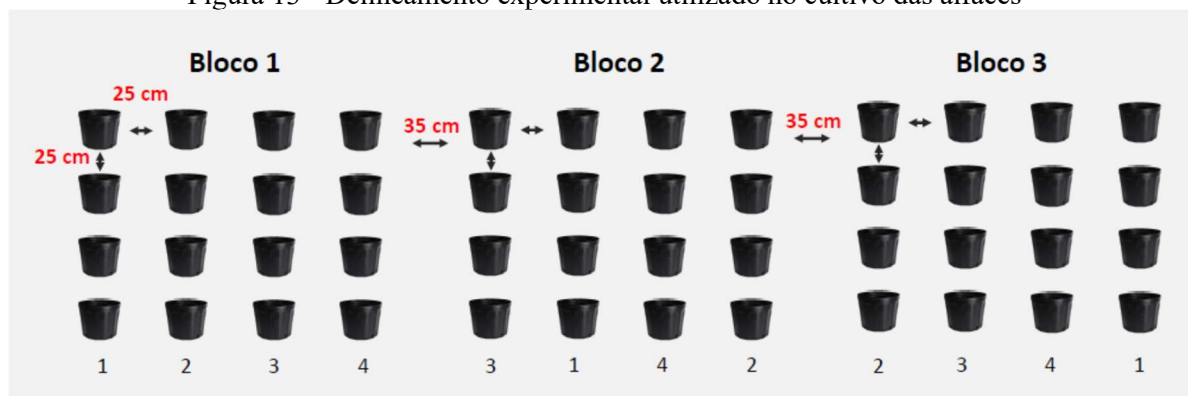
Fonte: Google Maps. Acesso em: 01 agosto de 2023.

As cultivares foram semeadas em bandejas de poliestireno de 128 células, contendo substrato Carolina Soil®, mantidas em sistema *floating* até o transplântio, o qual foi realizado aos 40 dias após a semeadura. Foram utilizados vasos de 8 litros contendo o substrato Carolina Soil®, onde foi adicionado 500 g/m^3 do adubo mineral PG mix™ (fórmula 14-16-18). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados para as quatro cultivares de alface com três repetições.

Os vasos contendo as plantas foram dispostos sobre uma mesa divididos em blocos de quatro linhas na bancada, com espaçamento de 0,25 m entre linhas e entre plantas (Figura 13). Foram empregadas 12 mudas para cada cultivar, sendo que 4 plantas formaram uma parcela. A irrigação foi realizada a cada dois dias com um volume de 190 mL de água por planta.

As plantas foram colhidas aos 40 dias após o transplântio no período do inverno e 30 dias no período do verão, quando apresentaram padrão comercial, sem indícios de florescimento e com máximo de desenvolvimento vegetativo. Em seguida, todas as amostras foram congeladas, liofilizadas e acondicionadas em embalagens plásticas a vácuo a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises.

Figura 13 - Delineamento experimental utilizado no cultivo das alfaces



Delineamento experimental utilizado no cultivo das alfaces que consistiu em blocos ao acaso com 4 tratamentos e 3 repetições, os números de 1 a 4 representam as 4 cultivares de alface.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.2 Reagentes e padrões

Acetato de sódio, fosfato de sódio monobásico e bibásico, fosfato de potássio monobásico e bibásico foram obtidos da Neon Comercial® (São Paulo, Brasil). Ácido clorídrico, ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido fórmico, ácido sulfúrico suprapuro, ácido ortofosfórico 85% acetona, éter de petróleo, éter etílico, e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram obtidos pela Dinâmica Química Contemporânea® (São Paulo, Brasil). Reagentes grau HPLC como éter terc-metil-butilico (MTBE), acetonitrila, dimetilformamida e metanol foram obtidos da Panreac® (Barcelona, Espanha).

O radical 2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foram obtidos da Sigma-Aldrich® (St Louis, Estados Unidos).

O padrão do carotenoide β -caroteno foi obtido pela Sigma-Aldrich®; α -caroteno e zeaxantina pela Fluka Analytical® (Munique, Alemanha); e luteína pela Indofine Chemical Company® (Nova Jersey, Estados Unidos). Os padrões de ácidos fenólicos como: gálico,

clorogênico e caféico, catequina, epicatequina, galato de epigallocatequina, luteolina, miricetina, quercetina e resveratrol e os padrões de antocianinas: cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3,5-glicosídeo, delphinidina-3- β -glicosídeo, pelargonidina-3-glicosídeo, delphinidina aglicona, cianidina aglicona, malvidina-3,5-diglicosídeo pelargonidina aglicona foram obtidos da Sigma-Aldrich® (St Louis, Estados Unidos). Padrão de ácido ascórbico foi obtido pela Neon Comercial® (São Paulo, Brasil). Cartuchos strata SPE C18 (Phenomenex) foi obtido pela empresa Allcrom® (São Paulo, Brasil).

A água foi purificada pelo sistema Milli-Q® (modelo Integral 10). As amostras e solventes foram filtrados por membranas Millipore 0,45 μ m (Millex LCR 0,45 μ m, 13 mm) antes de serem injetadas no cromatógrafo.

4.2 Métodos

4.2.1 Compostos Bioativos

4.2.1.1 Carotenoides

O extrato de carotenoides foi preparado de acordo com Rodriguez-Amaya (2001). A extração exaustiva dos carotenoides foi feita com acetona e homogeneização em Ultra-Turrax®. Em seguida, foi feita a partição, utilizando éter de petróleo e éter etílico, e saponificação com metanol 10 % KOH por 16 horas à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após esse período o álcali foi removido e o extrato foi concentrado em evaporador rotativo (Quimis®/Q334.2) ($T < 25^{\circ}$ C), seco em um fluxo de nitrogênio e armazenados a -18° C para posterior quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência. No momento da análise, o extrato concentrado foi ressuscitado em 1 mL de éter terc-metil-butílico (MTBE) colocado em ultrassom (Unique, modelo USC 1400) por 5 minutos e filtrado em filtro (Millex LCR 0,45 μ m, 13 mm) para ser injetado em cromatógrafo.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo Agilent série 1100 (Santa Clara, CA, EUA), equipado com um sistema solvente quaternário de bombeamento e um detector UV-Visível. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C30 polimérica de 250 mm x 4,6 mm ID, 3 μ m (YMC, modelo CT99SO3-2546WT). Na fase móvel foi utilizado um gradiente de eluição inicial de água: metanol: MTBE a partir de 5:90:5, atingindo em 12 minutos 0:95:5, em 25 minutos, 0:89:11, 0:75:25, em 40 minutos e, finalmente, 00:50:50 depois de um total

de 60 minutos, com uma taxa de fluxo de 1 mL/min a 33° C. Os espectros foram realizados, entre 250 e 600 nm e os cromatogramas transformados em um comprimento de onda fixo de 450 nm para carotenoides.

Os carotenoides foram identificados e quantificados por comparação dos tempos de retenção dos picos da amostra e de seus respectivos padrões, sob as mesmas condições cromatográficas e características de absorção no UV-vis. Para a quantificação, uma curva padrão para carotenoides foi construída nos intervalos dos carotenoides (Tabela 2).

4.2.1.2 Antocianinas

As antocianinas foram extraídas conforme metodologia de Zanatta et al. (2005). O extrato foi preparado a partir da adição de 30 mL de solução metanólica de HCl 1% a 0,1 grama de amostra liofilizada que foi homogeneizada em Ultra-Turrax®. A extração foi repetida, exaustivamente, até as amostras não apresentarem mais cor. Em seguida a solução foi filtrada e concentrada a vácuo, a uma temperatura de 38 °C. O extrato concentrado de antocianinas foi filtrado (filtro Millex LCR 0,45 µm, 13 mm), acondicionado em frasco âmbar sob atmosfera de nitrogênio e armazenado em freezer até o momento das análises, que foram realizadas no mesmo dia da extração.

As condições cromatográficas para a análises das antocianinas foi proposta por (VARGAS et al., 2016). Foi utilizado cromatógrafo (Agilent®, Série 1100, Santa Clara, EUA) equipado com um sistema de bomba quaternária e um detector UV-visível. Os pigmentos foram separados em uma coluna de fase reversa C18 Shim-pak CLC-ODS (5 µm, 250 x 4,6 mm), utilizando como fase móvel um gradiente linear de eluição com 5% ácido ortofosfórico aquoso/metanol de 85:15 (v/v) a 20:80 em 25 minutos, sendo mantida essa proporção isocrática por 15 minutos. O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL.min⁻¹, o volume de injeção foi de 5 µL e a temperatura da coluna mantida à 29 °C. Os cromatogramas foram processados a 520 nm.

As antocianinas foram identificadas através de curvas que foram construídas a partir dos padrões de cianidina 3-glicosídeo, cianidina 3,5 diglicosídeo, conforme Tabela 2, efetuada por comparação dos tempos de retenção dos picos da amostra e do controle, nas mesmas condições e através de dados disponíveis na literatura. A quantificação foi feita por comparação da área do pico da amostra com a área do padrão injetado.

Tabela 2 - Faixas de concentração, R², limites de quantificação (LOQ), limites de detecção (LOD) dos padrões de carotenoides e antocianinas

Compostos Bioativos	Faixa de concentração	R²	LOD (µg.g⁻¹)	LOQ (µg.g⁻¹)
Carotenoides				
Luteína (µg.g ⁻¹)	1-65	0,9991	0,069	0,115
Zeaxantina (µg.g ⁻¹)	1-40	0,9997	0,956	0,159
β-caroteno (µg.g ⁻¹)	5-50	0,9998	0,653	1,089
Compostos Fenólicos				
Ácido caféico	0,36-12	0,9961	9,70	29,70
Antocianinas				
Cianidina-3-glicosídeo (mg.mL ⁻¹)	5-40	0,9987	0,845	1,40
Cianidina-3,5-diglicosídeo (mg.mL ⁻¹)	16-84	0,9983	10,25	17,50

Fonte: Dados da pesquisa.

4.2.1.3 Compostos fenólicos antociânicos

A extração dos compostos antociânicos das cultivares de alface foi realizada conforme metodologia proposta por Bochi et al. (2015), com modificações. As amostras liofilizadas foram adicionadas ao solvente de extração (metanol a 20% com ácido ortofosfórico 0,35% em água destilada), na proporção de 0,2:10 (p/v), e deixadas sob agitação magnética por 20 minutos. Em seguida, o homogeneizado foi filtrado à vácuo. Esse processo de extração foi realizado em triplicata e repetido três vezes até a ausência de cor no extrato, indicando a ausência de compostos fenólicos antociânicos. O extrato foi concentrado em rotaevaporador (Quimis® Q334.2) para remoção do metanol.

Fases móveis: A - ácido ortofosfórico a 3% em água (v/v) e B - 100% de acetonitrila. A separação foi obtida usando um gradiente linear de 5% a 20% B em 30 min, 20% de B foi mantido até 32 min. O fluxo foi de 0,8 mL.min⁻¹ e o volume de injeção foi de 5 µL.

4.2.1.4 Compostos fenólicos não-antociânicos

Para extrair os compostos fenólicos não-antociânicos, seguiu-se a metodologia descrita por Rodrigues et al. (2013). Foram feitas extrações exaustivas utilizando-se Ultraturrax (IKA®, T25 digital 1/min x 1000) por 2 minutos, utilizando-se 20 mL da mistura de metanol com água destilada (80:20%; v/v) à 0,1 g da amostra liofilizada à temperatura ambiente (22±3° C). Em seguida, o extrato foi centrifugado (Hitachi, Himac, CR21 GIII, Japão) a 10.000 g durante 10 minutos a 20° C e o sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de cor âmbar. Esse procedimento foi realizado em triplicata e repetido cinco

vezes para todas as cultivares até a ausência de cor. Os sobrenadantes foram combinados obtendo um volume final de 100 mL (extrato de compostos fenólicos). Para a quantificação dos compostos fenólicos, os extratos foram rotaevaporados (Quimis® Q334.2) e avolumados com a fase móvel A não antociânica (água MilliQ® e ácido fórmico, na proporção de 99,9: 0,1%, v/v) para 25 mL em balão volumétrico. Após, as amostras foram filtradas por membranas Millipore 0,45µm (Millex LCR 0,45 µm, 13 mm) e injetadas em um cromatógrafo.

A ausência de compostos fenólicos no sobrenadante foi verificada previamente utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, seguindo a metodologia proposta por Becatti et al. (2010), com modificações. Foram adicionados 1375 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich Chemical®, St. Louis, EUA) preparado (375 mL de água para 37,5 mL do reagente) à 25 µL da amostra, que reagiram por 8 minutos. Em seguida, foram adicionados 600 µL de água destilada e 500 µL de carbonato de sódio a 20%. A solução foi homogeneizada e deixada em repouso durante 30 min ao abrigo da luz. A absorbância foi lida a 750 nm no espectrofotômetro (Shimadzu UV-Vis 1800/08302).

Para os compostos não-antociânicos a fase móvel A foi constituída por uma mistura de água Milli-Q® e ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v) e a fase móvel B por uma mistura de acetonitrila e ácido fórmico, nas mesmas proporções (99,9:0,1%, v/v), em um gradiente linear de 99:1 (v/v) fase móvel A/B para 50:50 (v/v) A/B por 50 minutos, e então 50:50 (v/v) A/B para 1:99 (v/v) A/B por 5 minutos. Essa razão foi mantida por mais 5 minutos. A taxa de fluxo da corrida foi de 0,7 mL.min⁻¹ a 29 °C e o volume de injeção de 5 µL.

Procedimentos de purificação SPE- C18

Os extratos antociânicos e não-antociânicos foram purificados conforme descrito por Rodriguez-Saona e Wrolstad (2001) com algumas modificações. Os cartuchos de extração em fase sólida (SPE) C18 (Strata, Phenomenex, Torrance, CA) foram previamente condicionados com metanol e água acidificada com HCl 0,01%. O cartucho foi carregado com a amostra. Os compostos polares foram eluídos com dois volumes de solução aquosa com HCl 0,01%. Os compostos fenólicos não-antociânicos foram eluídos usando acetato de etila e os antociânicos foram eluídos com metanol acidificado (com HCl 0,01%). Os extratos foram concentrados em rotaevaporador rotativo (36 °C), e as amostras foram reconstituídas

em 1 mL da fase móvel A não antociânica (água MilliQ® e ácido fórmico, na proporção de 99,9: 0,1%, v/v). Após, as amostras foram imediatamente injetadas no aparelho HPLC-DAD-MS/MS.

4.2.1.5 Compostos fenólicos não-extraíveis (CFNE)

Os CFNE foram obtidos a partir do tratamento de resíduos sólidos (pellet), gerados na extração de CFE, com um solvente contendo ácido forte. O sedimento foi submetido à hidrólise utilizando 10 mL de metanol acidificado com HCl (15%, v/v) por 15 minutos em banho-maria a 90 °C. O extrato obtido foi colocado em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente e posteriormente centrifugado a 3000 g por 5 minutos (4 °C), então o sobrenadante foi transferido para um frasco de fundo plano e o procedimento repetido. Após a segunda hidrólise, o sedimento foi extraído com metanol 7 vezes para garantir a extração completa de CFNE. Os extratos foram combinados e concentrados em um evaporador rotativo para remoção do metanol. Extratos aquosos de CFNE foram filtrados em filtros de acetato de celulose (0,22 µm) antes da análise por LC-DAD-ESI-MS / MS.

4.2.2 Atividade antioxidante (método ABTS)

Para a determinação da atividade antioxidante, foi feito um extrato utilizando-se 0,1 g de cada cultivar. Esse extrato foi homogeneizado e centrifugado a 15000 rpm por 15 min., sendo o sobrenadante recolhido, filtrado e então analisada sua atividade antioxidante pelo método ABTS (2,2-azino-bis (ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt), conforme metodologia descrita por Rufino et al. (2007), com algumas modificações. O radical ABTS foi gerado através da reação de 5 mL de solução aquosa de ABTS (7 mM) e 88 µL de solução de persulfato de potássio a 140 mM (2,45 mM concentração final). A mistura foi acondicionada na ausência de luz por 14h e após esse período foi diluída em etanol até obter absorvância de $0,700 \pm 0,02$ a 734 nm utilizando espectrofotômetro da marca SHIMADZU, modelo UV-1800. Uma amostra de 30 µL do extrato das cultivares e do antioxidante padrão Trolox (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano) reagiram com 3 mL da solução resultante do radical verde-azulado ABTS na ausência da luz. O decréscimo da absorvância a 734 nm foi medido depois de 6 minutos. Foi feita uma

curva padrão linear entre 500-1500 μM de Trolox. Os resultados foram expressos como TEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox) em $\mu\text{M/g}$ de amostra seca.

4.2.3 Análise dos resultados

A influência da cultivar, época de cultivo e seu efeito interativo sobre os compostos estudados foram avaliadas por análise de variância bidirecional (ANOVA) utilizando o software data R 4.1.0. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas em todos os componentes com valor de $p < 5\%$, com valor de $p < 0,1\%$ para a maioria deles. As diferenças entre as médias dos tratamentos foram calculadas usando três repetições, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Um teste de análise de componentes principais (PCA) foi realizado. Os dados foram padronizados (matriz de correlação) e submetidos à PCA. Os coeficientes de correlação foram estabelecidos pela correlação produto-momento de Pearson.

5 ARTIGOS CIENTÍFICOS

5.1 ARTIGO 1: INFLUENCE OF CULTIVAR AND SEASON ON CAROTENOIDS AND PHENOLIC COMPOUNDS FROM RED LETTUCE.

Alex Sandra Nascimento de SOUZA¹, Helena de Oliveira SCHMIDT¹, Carlos PAGNO¹,
Eliseu RODRIGUES¹, Magnolia Aparecida Silva da SILVA², Simone H. FLÔRES¹,
Alessandro de Oliveira RIOS^{1*}.

Food Research International, 155 (2022), Article 111110

ABSTRACT

This paper presents complete HPLC profiles and MS spectrometric data of bioactive compounds from four cultivars of red lettuce produced in winter and summer and their antioxidant capacity. The experiment was carried out in a greenhouse, where red curly lettuce was cultivated: Mila, Maira, Carmin and Scarlet. The cultivar and season have not influenced the qualitative profile of carotenoids (CAR) and phenolic compounds (PC) of red lettuce. Instead, the season influenced the concentration of these components in all cultivars. The levels of phenolic compounds were significantly higher in winter, while the levels of carotenoids were higher in summer. Ten anthocyanins were identified (cyanidins and delphinidins). The main carotenoid found was the all-*trans*- β -carotene (45-48%), followed by lutein (13-20%) and zeaxanthin (11-15%). Major phenolic compounds include 5-caffeoylquinic acid, rutin and amentoflavone. Red lettuce cultivars have their main bioactive compounds described and compared within the variety and within the growing season. Different season and different lettuce cultivars may differ in the content of their bioactive compounds and in their antioxidant capacity.

Keywords: *Lactuca sativa*; phenolic acids; anthocyanins; bioactive compounds; antioxidant capacity; HPLC-DAD-MS.

1 INTRODUCTION

In Brazil, the vegetable that is most cultivated is lettuce, comprising 49.9% of the area, followed by cabbage, with 15.3%; and kale, with 6.1%. Lettuce is cultivated 86.8 thousand hectares by more than 670 thousand farmers, reaching a total volume of 575.5 thousand tons. The main types of lettuce cultivated and consumed in the Country, in order of importance, are as follows: crisphead, American, garden lettuce and Romaine (Brazilian horti&fruti Yearbook, 2019).

Lettuce is classified in curly, flat leaf and American lettuce, and it is mainly used *in natura*, as a salad, but can also be found in soups, sandwiches, and wraps. This vegetable has good sensory characteristics, low calories, sodium, and fat content. Besides it is rich in fiber, it has high levels of vitamins such as pro-vitamin A, vitamins C, B1, B2 and minerals calcium and iron (KIM et al., 2018; RADIN et al., 2004).

Carotenoids are the most widely distributed tetraterpene pigments *in nature* responsible for the yellow, orange, red and purple colors, and are present in photosynthetic bacteria, some species of archaea and fungi, algae, plants and animals (MAOKA, 2020). The main carotenoids found in lettuce are violaxanthin, lutein and β -carotene (KIM et al., 2018; SUNG PARK et al., 2015). The red color of lettuce is the result of anthocyanin accumulation, it can be conferred by genetic factors, light condition and/or by some color enhancer gene, and the presence of this gene eliminates the need for light to generate color intensity (WIEN, 2000). The phenolic compounds of lettuce have been widely investigated due to their antioxidant properties (LLORACH et al., 2008). The content of phenolic

compounds and the antioxidant capacity of leafy vegetables were analyzed and the results varied depending on the species, growth stage, and the specific phenolic compounds (SYTAR et al., 2018).

In addition to providing color to plants, pigments are involved in photosynthetic processes in defenses against the light, stress avoiding the formation of reactive oxygen species, among others. Currently, many studies correlate fruit and vegetable consumption and their health benefits because they are rich sources of bioactive compounds. These compounds can have antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities and reduce the risk of heart disease (ENAM; GORDON, 2017).

The accumulation of secondary metabolites in plants depends on external (environmental) factors. The content of phytochemicals in plants can be influenced by adjusting cultivation conditions, such as temperatures of the planting period, light intensity, quality, and photoperiod, and the concentration of CO₂ (SUNG PARK et al., 2015). Other factors that are also important and may influence the type and concentration of the pigments and bioactive components in the lettuce are the type of cultivar and the stage of maturity at harvest (LÓPEZ et al., 2014). Photosynthetically active radiation (PAR) is the fraction of the spectrum of global solar radiation between the lengths of 0.4 to 0.7 μm, which is used in the process of photosynthesis (FINCH et al., 2004). The PAR (photosynthetically active radiation) is an important marker for studies in areas related to plant physiology and agricultural sciences, as they are directly associated with the production of biomass, morphology and plant growth. Further important climatic factor is temperature, which is directly linked to light, as it affects the rates of photosynthesis, metabolism, hormonal regulation and the distribution of metabolites between the different parts and organs of plants (FRANKLIN et al., 2014).

Studies focused on the composition of bioactive compounds related to red lettuce cultivars type and cultivation periods are still limited. Furthermore, data on phytochemicals in red lettuce cultivars grown in southern Brazil, which has an intense cold and heat seasons, are not well established. Then, this research aimed to identify and quantify the contents of compounds such as carotenoids, anthocyanins and phenolics in four cultivars of red lettuce produced under different climatic conditions, winter and summer, mainly because lettuce represents a vegetable consumed during all periods of the year.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Reagents and standards

Analytical grade reagents such as sodium acetate, monobasic and dibasic sodium phosphate, potassium phosphate monobasic, and dibasic and potassium persulfate were obtained from Commercial Neon[®] (São Paulo, Brazil). Hydrochloric acid (HCl), supra pure sulfuric acid, 85% orthophosphoric acid, acetone, ethanol, methyl alcohol, petroleum ether, and ethyl ether were obtained from Dinâmica Química Contemporânea[®] (São Paulo, Brazil). High-performance liquid chromatography (HPLC) grade reagents such as metil tert-butyl ether (MTBE), acetonitrile, dimethylformamide, and methanol were acquired from Panreac AppliChem[®] (Barcelona, Spain). Standards of ABTS radical [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] and Trolox ((±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), (all-E)-β-carotene, cyanidin-3-glucoside, were purchased from Sigma-Aldrich[®] (St Louis, USA). Fluka Analytical[®] donated zeaxanthin, (all-E). Lutein was obtained from Indofine Chemical Company (New Jersey, USA). Caffeic acid purchased from Sigma-Aldrich[®] (St Louis, USA) and cartridge strata SPE C₁₈ Phenomenex[®] from Allcrom (Sao Paulo, Brazil). Purified water obtained through a Milli-Q[®]

system (Integral, 10). The samples and solvents filtered through Millipore 0,45 μm membranes (Millex LCR, PTFE 0,45 μm , 13 mm).

2.2 Plant material and treatment

Four cultivars of lettuce (*Lactuca sativa* L.) were studied. The cultivars Mila and Maira are from the oak leaf group; they present leaf color green/red and red, respectively. The cultivars Carmin and Scarlet belong Leaf group and have leaf and red and green/red colors respectively (Figure 1).

Figure 1 - Four red lettuce cultivars, leaf shapes, and colors



The experiment was conducted in a protected environment (cultivation greenhouses) at the Faculty of Agronomy, located in the Horticulture Sector of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil (30° 04' 14.0 S, 51° 08' 23.6 W). The cultivars were sown in 128 cell polystyrene trays containing Carolina Soil® substrate, kept in a floating system until

transplantation. The transplant was carried out at 63 days (in winter) and 26 days (in summer) after sowing.

For this reason, 8-liter pots containing Carolina Soil[®] substrate were used, where 500 g.m⁻³ PG mix[™] mineral fertilizer (formula 14-16-18) was added. The experimental design was a randomized block design for the four lettuce cultivars with four replications in three blocks (totaling 48 plants, being 4 cultivars x 4 repetitions x 3 blocks). The pots containing the plants were arranged on a table divided into four-row blocks on the bench, with 0.25 m spacing between rows and between plants. Twelve seedlings were used for each cultivar, and four plants formed a plot. Irrigation was performed every two days with a volume of 190 mL (for winter) and 250 mL (for summer) of water per plant.

The plants were harvested when presented commercial pattern, without evidence of flowering and maximum vegetative development. The samples were harvested at 40 and 31 days for periods of winter and summer, respectively. All samples were then frozen, lyophilized, homogenized and packed in plastic vacuum containers at -18 °C until the time of analysis. Temperatures were measured in the mornings and afternoons with a maximum-minimum thermometer (Zurich Indústria e Comércio LTDA, São Paulo, Brazil), the minimum and maximum values found in the present experiment were from 13 to 27 °C for the winter period and 24 to 37 °C for the summer period. The PAR was measured with a photometer (LI-250A Light Meter, LI-COR[®] Biosciences, Lincoln, NE, USA) equipped with a quantum sensor (LI-190R, LI-COR[®] Biosciences), the average of PAR was 629.27 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ for the winter period and 1036.53 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ for the summer.

2.3 Extraction of bioactive compounds

Carotenoids

Carotenoids were exhaustively extracted in triplicate according to Rodriguez-Amaya (2001). Approximately 100 mg of the lyophilized sample was homogenized with 20 mL of acetone in Ultra-Turrax for 3 minutes (IKA[®]/ digital T25/ 1/min x 1000), this process was repeated until the extract had no more color, in this case, 4 repetitions were necessary. Subsequently, partitioning was performed with a mixture of petroleum ether and ethyl ether [1:1 (v/v)], and the sample was saponified with the 10 % methanolic KOH solution overnight at room temperature, followed by removal of the alkali by washing with distilled water, the extract was concentrated on a rotary evaporator (Quimis[®] / Q334.2) ($T < 25\text{ }^{\circ}\text{C}$), dried in a stream of nitrogen and stored in amber tubes in the freezer ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$). For analysis, the dried extract was resuspended in 1 mL of MTBE by sonication (Unique[®], USC 1400A model) for 5 minutes and filtered through a 0.45 μm membranes (Millex LCR, PTFE 0,45 μm , 13 mm) and quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC).

Phenolic compounds

Non-anthocyanin phenolic compounds were extracted exhaustively according to the methodology of Rodrigues et al. (2013) with modifications. Approximately 0.1 g of the lyophilized sample was homogenized with 20 mL of a mixture of methanol:water (80:20; v/v) in ultra-turrax (IKA[®], digital T25 1/min x 1000) for 2 minutes at room temperature ($21\text{ }^{\circ}\text{C}$). The extract was centrifuged (Hitach CR21 GIII-Himac) at 15,000 g for 10 minutes at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and the supernatant was transferred to an amber volumetric flask. This procedure was performed in triplicate and repeated six times for the winter samples and five times for the summer sample until no color was found. The supernatants were combined, and the final volume concentrated on a rotary evaporator (Fisatom[®], Model 801) ($T < 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) and resuspended to a 25 mL volumetric flask of the mobile phase A. The samples were filtered

on a 0.45 μm Millex LCR filter and immediately injected into the HPLC. The absence of phenolic compounds in the supernatant was previously verified with Folin-Ciocalteu reagent, with modifications (BECATTI et al., 2010; SINGLETON; ROSSI, 1965).

The extraction of anthocyanins was performed according to the methodology proposed by Vargas et al., (2016) with modifications. The compounds were exhaustively extracted from the freeze-dried sample (100 mg) with 20 mL of a 1% methanolic HCl solution and homogenized in ultra-turrax (IKA[®], digital T25 1/min x 1000). After that, the solution was vacuum filtered and repeated thoroughly until sample color loss. Finally, the extract was evaporated (Fisatom[®], Model 801) ($T < 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) to remove methanol and resuspended to a 10 mL volumetric flask. Afterward, the anthocyanin extract was filtered Millex LCR 0.45 μm and injected in the chromatograph. Before identification analysis, the phenolic compounds extracts were purified (RODRIGUEZ-SAONA; WROLSTAD, 2001)

SPE clean-up procedure

Anthocyanin and non-anthocyanin extracts were purified according to Rodriguez-Saona and Wrolstad (2001) with modifications. Solid-phase extraction C18-E cartridges Phenomenex[®] (Strata, Torrance, USA) previously activated with methanol and conditioned with acidified water (0.01% HCl) was used. The cartridge was loaded with the sample, and the polar compounds were washed with two volumes of aqueous acid solution (0.01% HCl). No anthocyanin phenolic compounds were eluted using ethyl acetate and anthocyanins with acidified methanol (0.01% HCl). The extracts were concentrated on a rotary evaporator, and the samples reconstituted in 1 mL of the mobile phase. The extracts were injected into the HPLC-DAD-MS / MS apparatus.

2.4 Chromatographic conditions

To identify the carotenoids, the phenolic compounds non-anthocyanins and the anthocyanins, a Shimadzu® (Kyoto, Japan) HPLC apparatus was used equipped with two pumps (Shimadzu LC-20AD), a degasser (Shimadzu DGU-203R), a column oven (Shimadzu CTO-20A), system connected in series to a diode array detector (DAD) (Shimadzu SPD-M20A) and a mass spectrometer (MS) (model micrOTOF-QIII, Bruker Daltonics, Bremen, Germany), with quadrupole analyzer – time of flight (Q-Tof) and electrospray ionization source (ESI) for phenolic and APCI for carotenoids.

The carotenoids were quantified according to Rodriguez-Amaya (2001) using an Agilent® chromatography equipment, 1100 series (Santa Clara, CA, USA), equipped with a quaternary solvent pumping system (G1311A – DE14917573 Agilent 1100 Series, Waldbronn, Germany) with a UV-Vis detector (G1314B – DE71358944 Agilent 1100 Series, Waldbronn, Germany), and a fluorescence detector (G1321A- Agilent 1100 Series, Waldbronn, Germany). The carotenoids were separated on a C30 reversed-phase polymeric column (YMC, model CT99SO3-2546WT) [250 mm x 4.6 mm, 3 µm] using as mobile phase water:methanol: MTBE, from 5:90:5 (v/v/v), reaching 0:95:5 (v/v/v) in 12 min, 0:89:11 (v/v/v) in 25 min, 0:75:25 (v/v/v) in 40 min, and finally 00:50:50 (v/v/v), after a total of 60 min, with a flow rate of 1 mL.min⁻¹, an injection volume of 5 µL, and the column temperature set to 22 °C. The chromatograms were processed at 450 nm, and the results were expressed in µg.g⁻¹ sample (dry weight). The carotenoids were identified by following the method proposed by Diprat et al. (2020), using C30 YMC column (Ireland) [250 mm x 4.6 mm, 5 µm], and as mobile phases a linear gradient of methanol/MTBE mixture from 95:5 (v/v) to 70:30 (v/v) over 30 min, followed by a 50:50 (v/v) for 20 min; this ratio was kept up to 60 min. At 62 min, it returned to the initial condition (5 % MTBE)

and was maintained for 5 min, with a flow rate of $0.9 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, an injection volume of $20 \mu\text{L}$.

The phenolic compounds (non anthocyanics) were quantified using a Waters Alliance (2695, Milford, MA, USA) chromatograph connected to a diode array detector (DAD 2996), column C18 Phenomenex (Synergi TM, Allcrom[®], São Paulo, Brazil) [250 mm x 4.6 mm, $4 \mu\text{m}$]. The quantification and identification of non-anthocyanin phenolic compounds was following the method proposed by Schmidt et al. (2020), it was used as mobile phases a linear gradient of Milli-Q[®] water/formic acid mixture [99.9: 0.1 %, (v/v)] - solvent A, and acetonitrile/formic acid mixture [99.9: 0.1 %, (v/v)] – solvent B; from 99:1 (v/v) A/B to 50:50 (v/v) A/B over 50 min, and then from 50:50 (v/v) A/B to 1:99 (v/v) A/B over 5 min, maintaining this latest condition for more 5 min Rodrigues et al. (2013). The flow rate was $0.7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, the column temperature was at $29 \text{ }^\circ\text{C}$, and the injection volume was $20 \mu\text{L}$. The UV-Vis spectra obtained between 200 and 600 nm, and the chromatograms processed at 280, 320, and 360 nm. The mass spectra acquired with a scan range from m/z 100 to 1000. MS parameters were defined as follows: ESI source in negative mode; capillary voltage, 3000 V; dry gas temperature (N₂), $310 \text{ }^\circ\text{C}$; flow rate, $0.35 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; nebulizer gas, 4 bar. MS/MS was set in automatic mode.

The anthocyanins were quantified using a chromatograph (Agilent[®], Series 1100, Santa Clara, USA) equipped with a quaternary pump system and a UV-visible detector; the compounds were separated with a reversed-phase C18 Shim-pak CLC-ODS column [250 mm x 4.6 mm, $5 \mu\text{m}$]. It was used as mobile phases a linear gradient of Milli-Q water/formic acid [96:4 (v/v)] (solvent A), and 100 % methanol (solvent B); from 85:15 (v/v) A/B to 20:80 (v/v) A/B in 25 min, maintaining this isocratic ratio for 15 min, according to conditions established experimentally (VARGAS et al., 2016). The flow rate was $1 \text{ mL}/\text{min}$,

the injection volume was 5 μL , and the column temperature maintained at 29 $^{\circ}\text{C}$. The chromatograms were processed at 520 nm. To identify the anthocyanins, it was used C18 Merck reverse-phase column [250 mm x 4.6 mm, 5 μm]; the mobile phase flow was 0.8 mL/min, the injection volume was 5 μL , and the ESI source was in positive mode.

Results were expressed in micrograms per gram of sample and the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were, respectively, 0.069 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ and 0.115 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ for lutein; 0.956 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ and 0.159 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ for zeaxanthin; 0.653 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ and 1.089 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ for β -carotene; 0.845 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ and 1.405 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ for cyanidin-3-glucoside; and 9.7 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ and 29.4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ for caffeic acid.

The limits of detection and quantification and the linearity range are shown in Table S1 in the supplementary material. Compounds that did not have a standard for quantification were quantified in equivalents, and the definition of which standard should be used for quantification was based on similarity of UV-visible absorption and class of compounds. Mass spectrometry (MS) data were processed using Data Analysis 4.3 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Other combined parameters were used to identify the compounds: UV-visible spectral characteristics (λ_{max}), elution order, retention time, MS spectral characteristics and comparison with data available in the literature and in the Pubchem database.

2.5 Antioxidant capacity

The antioxidant activity of the methanolic extract was measured using 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) was assessed as described by (RUFINO et al., 2007) For the extract, 0.1 g of the lyophilized sample was diluted with 20 mL of 50% methanol and homogenized in ultra-turrax[®] (IKA[®], digital T25 / 1 min. x 1000) and allowed

to stand for 60 minutes in the dark. Then the extract was centrifuged at 25,400 g for 15 minutes, and the supernatant was transferred to a 50 ml amber volumetric flask. This process was repeated using 70 % acetone. Test tubes of three different dilutions were prepared in triplicate from the obtained extract. In a dark environment, a 100 μ L aliquot of each dilution extract transferred to test tubes containing 1.0 mL of ABTS radical. The tubes were homogenized on a shaker, and after 6 minutes of mixing the reading was taken at 734 nm on a spectrophotometer (Shimadzu UV-Vis 1800/08302). The results were expressed as Trolox equivalent (μ M TE/g of sample) in dry weight. The analysis was conducted in the dark under controlled temperature (22 °C).

2.6 Statistical Analysis

Statistical analysis and the influence of cultivar, cultivation period and their interactive effect on the compounds studied were evaluated by two-way analysis of variance (ANOVA) using data R 4.1.0 software. Statistically significant differences were observed in all components with p value < 5%, with p value < 0.1% for most of them. Differences between treatment means were calculated using three replications, according to Tukey's test ($p \leq 0.05$). A principal component analysis (PCA) test was performed. Data were standardized (correlation matrix) and submitted to PCA. Correlation coefficients were established by Pearson's product moment correlation.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The carotenoid composition of four cultivars of red *Lactuca sativa* L. in winter and summer is shown in Table 1. Twelve carotenoids were separated and tentatively identified by HPLC-DAD-APCI-MS/MS (Figure S1, Supplementary material). Nine carotenoids of

four red lettuce cultivars were quantified in two growing seasons, winter and summer, and only one was not identified (peak 5). The peak spectra and MS/MS fragments were obtained from the most abundant ion in the MS experiment (see additional Table S2 in supplementary material). The overall statistical analysis presented in Table 2 shows that both factors, species and season, have significant effects ($p < 0.001$) on all bioactive compounds of the lettuce studied. All bioactive compounds showed interaction with season and cultivar, except for the not identified carotenoid (Table 1).

Principal components analysis (PCA) was applied to improve the visualization of the results. Figure 2 shows PCA with the lettuce cultivars and the evaluated attributes (bioactive compounds) of spatial distribution to simplify the results of visualization, as represented by Principal Components 1, 2, and 3, which make up 83.27% of the total.

The main carotenoid found for all lettuce cultivars studied in winter and summer were all-*trans*- β -carotene (peak 11), representing about 45-48 % of the total carotenoids, followed by all-*trans*-lutein (peak 8) with 13-20 %, all-*trans*-zeaxanthin (peak 9) making up about 11-15 %, and compared to other green leafy vegetables, lettuce also contains all-*trans*-lactucaxanthin (peak 6) with 7-10 %.

According to Tables 1 and 2 and the PCA (Figure 2), represented by the main components 1 and 2, the contents of most carotenoids and total carotenoids of the cultivar Mila did not vary in relation to the season. However, the other species varied their levels according to time, with higher concentrations in the summer. When compared in each growing season, Mila and Maira in winter showed the greatest differences in total carotenoid contents. The content of β -carotene was higher for Mila, among the other cultivars there was no significant difference. In the summer period, Mila and Carmin did not differ in their contents of total carotenoids and β -carotene. The values of total carotenoids for Maira cv

were 1490.25 and 2040.25 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW (dry weight), winter and summer, respectively. The Maira S, in addition to obtaining the highest total carotenoid content, also had the highest β -carotene content ($943.37\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) among all samples analyzed.

However, the proportion of carotenoids in lettuce may differ, as reported by Sung Park et al. (2015) who found that when evaluating stability of bioactive compounds among green and red lettuce cultivars they found lutein (26 %) as the main carotenoid, followed by β -carotene (23 %) and violaxanthin (23 %), respectively, these three compounds accounted for 72 % of the total carotenoids. Other results were reported by Kim et al. (2018) that when evaluating different red and green lettuce cultivars, they found β -carotene as the main carotenoid (50 % of total carotenoids), followed by lutein (20 %), lactucaxanthin (13 %), violaxanthin (11 %) and neoxanthin (6 %). They also confirmed the significant presence of lactucaxanthin in lettuce cultivars, which have in their structure ϵ ring, which are rare (ϵ,ϵ -carotene-3,3'-diol, $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$, M.W. = 568.87) in the vegetable kingdom there are commonly carotenoids with rings α and β (SIEFERMANN-HARMS et al., 1981). A recent study related lactucaxanthin in lettuce with inhibition of α -amylase and α -glucosidase activity and may have medical and nutritional relevance in the treatment of diabetes (GOPAL et al., 2017). Lutein, common in higher plants, is one of the main carotenoids found in lettuce (CALDWELL; BRITZ, 2006; NICOLLE et al., 2004).

Table 1 -Carotenoid content of four cultivars of red lettuce in winter (W) and summer (S) obtained by HPLC-DAD

Peak	Carotenoids	Rt (min)	Mila W	Mila S	Maira W	Maira S	Carmin W	Carmin S	Scarlet W	Scarlet S
1	(di- <i>Z</i>)-violaxanthin	6.2	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
2	(all- <i>E</i>)-violaxanthin	7.4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	(9- <i>Z</i>)-violaxanthin ¹	8.2	44.46 ± 3.62 ^d	47.28 ± 2.81 ^d	39.68 ± 3.08 ^d	88.09 ± 6.73 ^{ab}	65.02 ± 3.74 ^c	89.92 ± 6.59 ^a	63.82 ± 2.53 ^c	75.85 ± 4.01 ^{bc}
4	(all- <i>E</i>)-luteoxanthin ¹	8.6	41.81 ± 4.96 ^{ab}	41.13 ± 2.54 ^{ab}	29.14 ± 3.05 ^c	42.22 ± 2.67 ^{ab}	35.01 ± 2.04 ^{bc}	34.50 ± 1.74 ^{bc}	35.37 ± 2.38 ^{bc}	45.41 ± 4.55 ^a
5	not identified ^a	9.2	13.52 ± 0.89 ^{bcd}	21.31 ± 2.14 ^a	13.37 ± 3.39 ^{bcd}	18.99 ± 0.23 ^a	11.31 ± 2.39 ^d	17.35 ± 0.08 ^{abc}	12.31 ± 0.90 ^{cd}	18.37 ± 1.45 ^{ab}
6	(all- <i>E</i>)-lactucaxanthin ¹	10.2	156.11 ± 3.16 ^{ab}	150.95 ± 8.98 ^{ab}	108.42 ± 7.04 ^c	146.71 ± 17.35 ^{ab}	149.99 ± 5.53 ^{ab}	168.22 ± 11.59 ^a	141.39 ± 5.97 ^b	164.47 ± 3.34 ^{ab}
7	(13 <i>z</i>)- lutein and/or (13' <i>z</i>)-lutein +	11.4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
8	(all- <i>E</i>)- lutein ¹	12.4	266.34 ± 12.13 ^{cd}	289.56 ± 12.18 ^{bc}	245.97 ± 15.08 ^{de}	365.11 ± 10.33 ^a	220.10 ± 14.45 ^e	232.66 ± 9.63 ^e	315.22 ± 7.91 ^b	315.12 ± 8.45 ^b
9	(all- <i>E</i>)-zeaxanthin ²	14.5	195.59 ± 6.03 ^b	201.17 ± 6.25 ^b	199.10 ± 21.71 ^b	247.65 ± 3.41 ^a	246.52 ± 21.40 ^a	217.70 ± 20.75 ^{ab}	179.66 ± 21.59 ^b	206.07 ± 8.79 ^{ab}
10	(13- <i>Z</i>)- β-carotene ³	27.4	61.14 ± 2.26 ^b	62.03 ± 2.08 ^b	54.67 ± 1.24 ^{bc}	75.97 ± 5.47 ^a	51.57 ± 1.51 ^{bc}	48.17 ± 6.35 ^{cd}	38.66 ± 1.95 ^d	83.32 ± 5.07 ^a
11	(all- <i>E</i>)-β-carotene ³	33.9	842.51 ± 14.13 ^b	800.11 ± 26.91 ^{bc}	723.76 ± 45.48 ^c	943.37 ± 40.02 ^a	747.34 ± 11.36 ^c	790.18 ± 27.08 ^{bc}	708.91 ± 46.49 ^c	865.48 ± 29.00 ^{ab}
12	(9- <i>Z</i>)-β-carotene ³	36.1	109.79 ± 7.48 ^a	104.73 ± 1.08 ^{ab}	76.13 ± 3.99 ^c	112.13 ± 6.53 ^a	91.51 ± 3.49 ^{bc}	102.18 ± 2.70 ^{ab}	78.57 ± 9.88 ^c	103.05 ± 6.08 ^{ab}
	Total carotenoids		1731.29 ± 35.27 ^c	1718.27 ± 44.06 ^c	1490.25 ± 70.85 ^e	2040.25 ± 46.62 ^a	1618.37 ± 33.98 ^{cde}	1700.89 ± 54.25 ^{cd}	1573.92 ± 47.77 ^{de}	1877.15 ± 24.56 ^b

Results expressed in µg/g dry basis. Values are the mean of three replications (± standard error). Superscripts in uppercase: the peaks were quantified as lutein equivalents (1), zeaxanthin equivalents (2), and β-carotene equivalents (3). Different superscripts in the same line indicate a significant difference ($p < 0.05$). ND.: not detected. < LOQ: value lower than the limit of quantification. Rt: Time retention. W- winter, S – Summer.

Table 2 - p Two-way ANOVA values for bioactive compounds and antioxidant activities of red lettuce cultivars planted in winter and summer.

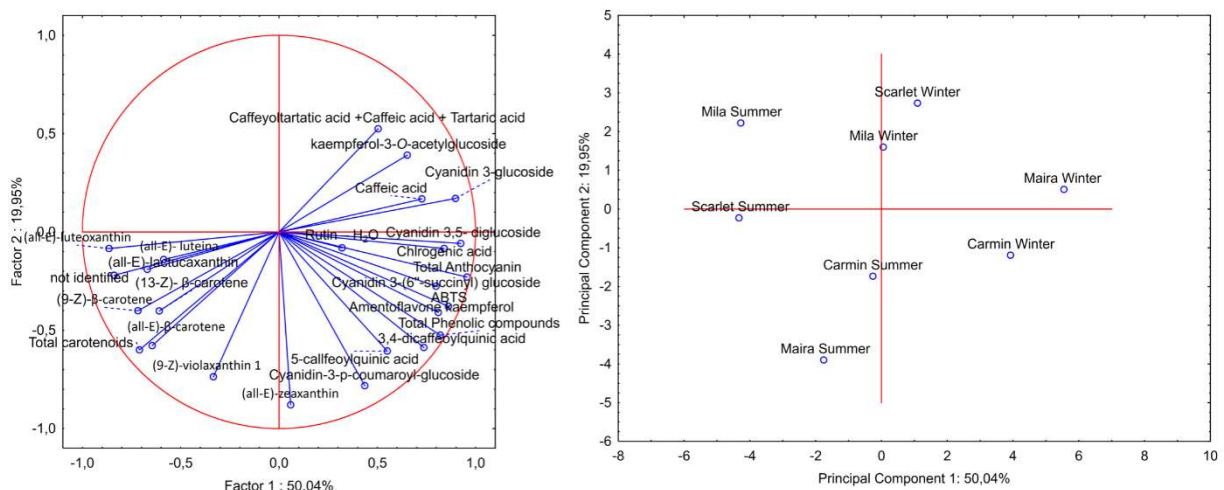
Factor	DF	Carotenoids (C)				
		luteoxanthin	Lutein	Zeaxanthin	β -carotene	Total C
Cultivar (C)	3	<0.0001	<0.0001	<0.001	0.012	0.01
Season (S)	1	<0.001	<0.0001	0.045	<0.0001	<0.0001
C*S	3	0.006	<0.0001	0.002	<0.0001	<0.0001

Factor	DF	Phenolics compounds (PC)				
		5-CQA	Chlorogenic acid	Caffeic acid	3,4-DCQA	Total PC
Cultivar (C)	3	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Season (S)	1	<0.001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
C*S	3	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.01	<0.0001

Factor	DF	Anthocyanins (A)			Antioxidant activity
		C3G	C3-6"-SG	Total A	ABTS
Cultivar (C)	3	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Season (S)	1	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
C*S	3	<0.0001	<0.0001	<0.001	<0.0001

DF: Degrees of Freedom, 5-CQA: 5-Caffeoylquinic acid, 3,4-DCQA: 3,4-Dicaffeoylquinic Acid, C3G: Cyanidin 3-glucoside, C3-6"-SG: Cyanidin 3-(6"-succinyl) glucoside

Figure 2 - Principal components analysis (PCA) of bioactive compounds (carotenoids and phenolic compounds) of four cultivars of red lettuce: Mila Summer, Mila Winter, Scarlet Summer, Scarlet Winter, Maira Summer, Maira Winter, Carmin Summer, Carmin Winter.



Maturation can cause changes in the content and/or profile of carotenoids (KIM et al., 2018) since light stimulates their synthesis. The degree of exposure to light during the development of the plant can also affect their concentration (FREDE; SCHREINER; BALDERMANN, 2019). At large, red lettuce cultivars have a significantly higher carotenoid content than green/red and green lettuce (KIM et al., 2018). In our study, one of the most intense red colored lettuces (Maira) showed a higher concentration of total carotenoids in the summer period, where there was a greater incidence of sunlight. Ilić et al. (2017) in a study on the influence of light on the quality of lettuce, found that the content of carotenoids was significantly higher in shaded lettuce leaves than in control plants, produced in open fields, with the shade condition being used to reduce impacts high intensity of light, which can reach about $2,000 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Additional radiation generates reactive oxygen species that can cause photoinhibition if not eliminated by carotenoids (BERGQUIST et al., 2007). The summer climate conditions in which lettuces were grown, with temperature ranging from 22 to 37 °C and PAR of $1036.53 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, seem to have contributed to the higher carotenoid content in relation to the winter period. In all the samples evaluated and in the two cultivation seasons, β -carotene was the major, representing approximately 45 % of the total carotenoids, this carotenoid has a greater potential for vitamin A. Vegetables and fruits are the principal sources of carotenoids and their composition constitutes an essential role in diet due to vitamin A activity (HASKELL, 2013).

The HPLC–DAD–MS/MS method allowed the separation and identification of the phenolic compounds based on the interpretation of their fragmentation patterns obtained in four cultivars of red *Lactuca sativa* L. in winter and summer and is shown in Table S3 (Supplementary material). Tentative identification was based on UV–vis and mass spectra as well as relative HPLC retention times, standards and published data. Fifteen phenolic compounds were tentatively identified, in

which the four main found were 5-caffeoylquinic acid, amentoflavone, 3,5-dicaffeoylquinic acid, and rutin, as shown in Figure S2 (Supplementary material). These compounds were the majority in all lettuce samples studied. However, the content of these compounds varied significantly with lettuce types, as well as between growing periods, winter and summer, according to Table 3.

Peak 2 with a $[M - H]^-$ ion at m/z 451 yielding an MS ion at m/z 353 (caffeoyl-quinic acid or chlorogenic acid) and MS^2 ions at m/z 191 (quinic acid) and m/z 179 (caffeic acid) was identified as an unknown chlorogenic acid derivative conform (SIMIRGIOTIS et al., 2015). This phenolic acid was the majority in all samples, except for the Maira W sample whose main acid was 3,4-dicaffeoylquinic acid (Peak 12). This compound was previously identified in lettuce by Llorach et al. (2008). Chlorogenic acid was also the primary component found in the study by López et al. (2014) who worked with the Romaine cultivar. In general, romaine lettuce showed the highest concentration of chlorogenic and caffeic acids, and a considerable variability also observed between cultivars. Caffeoylquinic acids (CQA) are generally involved in plant responses to biotic and abiotic stresses, and 5-O-caffeoylquinic acid (5-O-CQA) is an intermediate in the lignin biosynthesis pathway (MONDOLOT et al., 2006). There are several advantageous health properties associated to this class of compounds, such as antioxidant capacity, antiviral, antibacterial, anti-inflammatory, reduction of the relative risk of cardiovascular disease, diabetes type 2 and Alzheimer's disease (FARAH et al., 2008; SPÍNOLA; CASTILHO, 2017).

According to Tables 2 and 3, and the PCA, represented by principal components 1 and 2, the cultivars Maira and Carmin presented the highest content of total non-anthocyanic phenolics. The Maira cultivar with 10437.52 and 9333.57 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW, for the winter and summer periods, respectively, and the cultivar Carmin, 9489.54 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW (winter) and 8669.61 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW (summer).

Both cultivars have visually higher red coloring; some works have already shown that red leafy plants are generally more abundant in phenolic compounds (EL-NAKHEL et al., 2020; NICOLLE et al., 2004).

When comparing the cultivation seasons, unlike what occurred for carotenoids, all cultivars produced in the winter period had a higher concentration of phenolic compounds than those produced in the summer period. Similar results were reported (XU et al., 2011) about higher synthesis and accumulation of phenolic compounds in the winter in relation to the summer period in seeds and skins of grape cultivars. These seasonal variations of phenolic compounds and antioxidant properties are largely contributed to climatic factors such as temperature, solar radiation, precipitation and hydrothermal coefficient between different growing seasons. The cultivation conditions also have a significant impact on the content of bioactive compounds in lettuce. In summer, there are high temperatures (above 30 °C), high solar radiation, high rainfall (RADIN et al., 2004). Winter has low temperatures (below 10 °C) and prolonged rainfall. The carotenoid and phenolics levels are significantly influenced by genetics, temperature, and light (GAZULA et al., 2007). Hydroponic management with the nutrient solution also is a useful practice to increase the bioactive compounds of lettuce (EL-NAKHEL et al., 2020). Flavonoids can serve as photoprotectors and can protect the photosystem from excess energy and UV radiation (SOFO et al., 2012). Increased radiation intensity (both UV and PAR), high temperature and high availability of macronutrients are factors that affect the flavonoid content in lettuce (ILIĆ et al., 2017). When the temperature is higher, the concentrations of flavonoids and anthocyanins in the leaf tissue generally decrease (SYTAR et al., 2018). In our study, in the winter period, the temperature ranged from 13 to 27 °C and the mean PAR (Photosynthetically Active Radiation) value was 629.27 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, these factors may have favored the production of these secondary metabolites in this

period. A light intensity of 400 to 600 proved to be ideal for the production of certain types of lettuce in certain latitudes (FU; LI; WU, 2012).

Table 3 - Phenolic compounds content of four cultivars of red lettuce in winter (W) and summer (S) obtained by HPLC-DAD

Peak	Phenolic Compounds	Rt (min)	Mila W	Mila S	Maira W	Maira S	Carmin W	Carmin S	Scarlet W	Scarlet S
1	Caffeyoltartatic acid (Caftaric acid) Caffeic acid + Tartaric acid	19.3	469.82 ± 18.99 ^a	232.49 ± 17.08 ^d	427.70 ± 18.54 ^a	231.75 ± 9.24 ^d	280.47 ± 28.00 ^c	118.10 ± 6.09 ^e	355.00 ± 11.81 ^b	230.97 ± 8.24 ^d
2	5-Cafeoylquinic acid	22.1	2183.14 ± 48.63 ^e	1248.27 ± 29.51 ^g	2873.26 ± 0.68 ^{cd}	3193.03 ± 9.39 ^b	2930.88 ± 152.37 ^c	3845.11 ± 63.17 ^a	2618.87 ± 93.43 ^d	1574.14 ± 40.82 ^f
3	Chlogenic acid	23.2	309.07 ± 12.18 ^a	128.89 ± 7.29 ^{de}	326.86 ± 19.64 ^a	182.66 ± 4.34 ^{bc}	334.31 ± 17.13 ^a	202.60 ± 12.20 ^b	155.27 ± 11.41 ^{cd}	116.88 ± 8.33 ^e
4	Not identified	23.7								
5	Caffeic acid	24.6	368.68 ± 13.15 ^a	115.90 ± 5.79 ^e	352.20 ± 10.16 ^a	168.40 ± 7.79 ^d	238.05 ± 8.88 ^b	188.02 ± 3.35 ^{cd}	190.77 ± 2.81 ^c	130.63 ± 5.53 ^e
6	kaempferol-3- Oacetylglucoside	25.4			10.16 ^a		238.05 ± 8.23 ^b	190.77 ± 2.81 ^c		
7	anthocyanins	25.6								
8	Rutin – H ₂ O	26.6	750.82 ± 34.18 ^a	404.25 ± 11.29 ^d	633.84 ± 22.51 ^b	626.81 ± 27.57 ^b	460.75 ± 5.64 ^c	280.03 ± 17.00 ^f	338.64 ± 13.19 ^e	341.66 ± 7.72 ^e
9	Quercetin-3-O- glucuronide	30.4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	Quercetin-7-O- galactoside	30.3								
10	kaempferol-3-O-hexoside	31.1	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
11	Kaempferide-3-O-(6''-O- malonyl)-glucoside	31.3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	Quercetin-7-O-(6''-O- acetyl)glucoside ou quercetin acetyl-hexoside	31.4								
12	3,4-Dicaffeoylquinic acid	32.5	533.28 ± 26.35 ^f	311.35 ± 26.48 ^f	3187.61 ± 123.32 ^a	2469.20 ± 137.7 ^{bc}	2581.47 ± 155.60 ^b	2162.59 ± 113.94 ^c	1369.71 ± 150.93 ^d	861.51 ± 26.72 ^e
13	Caftaric acid	33.6	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
14	Amentoflavone	34.3	1942.45 ± 50.76 ^b	861.37 ± 38.15 ^e	2247.92 ± 64.26 ^a	2146.64 ± 100.37 ^a	2309.35 ± 80.39 ^a	1546.34 ± 88.52 ^c	1690.53 ± 85.34 ^c	1212.28 ± 58.08 ^d
	Not identified	34.5								
	kaempferol-3-O- alonylglucoside	34.7								
15	kaempferol-3-O- acetylglucoside	34.8	442.75 ± 16.91 ^a	288.95 ± 9.40 ^d	388.12 ± 24.37 ^b	315.07 ± 17.87 ^{cd}	354.26 ± 23.32 ^{bc}	326.81 ± 7.31 ^{cd}	440.49 ± 13.75 ^a	207.67 ± 5.48 ^e

Total Phenolic compounds	7000.02 ± 91.07 ^d	3591.46 ± 159.26 ^f	10437.52 ± 146.26 ^a	9333.57 ± 312.40 ^b	9489.54 ± 105.13 ^b	8669.61 ± 124.19 ^c	7159.29 ± 353.79 ^d	4675.74 ± 138.75 ^e
--------------------------	------------------------------	-------------------------------	--------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------

Results expressed in $\mu\text{g/g}$ dry basis. Values are the mean of three replications (\pm standard error). The peaks were quantified as caffeic acid equivalents Different superscripts in the same line indicate a significant difference ($p < 0.05$). < LOQ: value lower than the limit of quantification. Rt: Time retention W- winter, S – Summer

On the other hand, some studies have shown that exposure to high temperature and radiation increased the production of phenolic compounds (MARIN et al., 2015) and the antioxidant capacity in lettuce (OH; CAREY; RAJASHEKAR, 2009).

Regarding the types of cultivation, the conventional system may be favorable in the production of total phenolic acids and flavonols in lettuce compared to organic cultivation, this may be associated with the presence of more stressful conditions, in terms of mineral deficits of the plant and / or from the ground (SOFO et al., 2016). Open field cultivation provides the plant with adverse agronomic and environmental factors, especially large variations in temperature, ultraviolet light, insect attack, pathogen infection and possible nutrient deficiencies can increase the amounts of phenolics and / or change their profiles, even with a decrease in crop productivity (OH; CAREY; RAJASHEKAR, 2009). Another factor that can influence secondary metabolites is co-cultivation, (JU et al., 2021) evaluated the effect of co-cultivation of lettuce and chicory in an internal LED camera, in which lettuce had higher levels of β -carotene and lutein, almost double the value of lettuce grown alone, however chicory was not benefited.

In agreement with the present work, studies that present the higher total phenolic content in red lettuces than in green/red lettuces have been reported (LIU et al., 2007; LLORACH et al., 2008) and growing conditions such as light and UV can increase phenolic content by promoting phenolic synthesis (ORDIDGE et al., 2010).

Anthocyanins are an essential phenolic sub-group. Their presence in plants is responsible for the blue, purple and red color of most flowers, fruit, and leaves, and the regular consumption of these compounds has been associated with reducing the risk of chronic disease, because of the potential antioxidant effect (MANACH et al., 2004). Anthocyanin content is the main difference between red and green lettuce leaves. Results obtained from the MS analysis of anthocyanins are

shown in Table S4, (Supplementary Material), and the MS² fragments shown in Supplementary Material.

The HPLC chromatogram obtained from freeze-dried lettuce shows peaks with proper resolution and magnitude (Figure S3, Supplementary material). The four lettuce cultivars shared a similar anthocyanin profile. Ten anthocyanins were identified: cyanidine 3-glucoside (peak 1); cyanidin 3,5- diglucoside, cyanidin 3-(malonoyl) glucoside delphinidin 3-glucoside (coeluted at peak 2); cyanidin 3-p-coumaroyl glycoside, cyanidin 3-O-galactoside, cyanidin 3-(3''-malonoyl) glucoside, delphinidin 3-glucoside and delphinidin 3-malonoyl glucoside (coeluted at peak 3), and peak 4 was identified to cyanidin 3-(6''-succinyl) glucoside.

In this study, the major anthocyanin was found cyanidin and its glucosides, however, three delphinids were tentatively identified (Table S4, Supplementary Material), their concentrations showed significant differences between cultivars (Table 4). Cyanidin was also identified as the major anthocyanin in different cultivars in other studies (ASSEFA et al., 2019; KIM et al., 2018). Wild lettuce can develop a red pigmentation through the accumulation of cyanidin and traces of delphinidin (PARK et al., 2008). In the lettuces grown in the winter period, Maira, Carmin and Scarlet, had as their major anthocyanin identified Cyanidin 3-glucoside (Peak 1), followed by Cyanidin-3- (p-coumaroyl-glucoside) and its coelutents (Peak 3). In cultivar Mila W, as well as all the cultivars produced in the summer, the main anthocyanins identified were Cyanidin-3- (p-coumaroyl-glucoside) and its coelutents (Peak 3) and cyanidin 3-(6''-succinyl) glucoside (Peak 4). The profile and content of secondary metabolites may vary according to the plant cultivar, thus Wu and Prior (2005) reported cyanidin 3- (6''-malonoyl) glucoside as the major anthocyanidin in red lettuce, with minor contents for cyanidin 3-glucoside, cyanidin 3-(6''-acetyl) glucoside. Yamaguchi

et al. (1996) previously reported two major anthocyanins in red lettuce: cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3 (6" - malonoyl) glucoside.

Table 4 - Anthocyanin content of the four cultivars of red lettuce in winter (W) and summer (S) obtained by HPLC.

Peak	Anthocyanins	Rt	Mila W	Mila S	Maira W	Maira S	Carmin W	Carmin S	Scarlet W	Scarlet S
		(min)								
1	Cyanidin 3-glucoside	17.5	849.62 ± 79.90 ^c	104.83 ± 3.20 ^e	2607.37 ± 154.8 ^b	538.89 ± 27.77 ^d	2940.28 ± 184.03 ^a	563.20 ± 22.02 ^d	2509.69 ± 46.04 ^b	242.95 ± 6.99 ^e
2	Cyanidin 3,5- diglucoside	18.2	299.14 ± 55.05 ^d	98.50 ± 14.83 ^e	615.02 ± 2.50 ^b	176.57 ± 6.30 ^e	771.89 ± 38.54 ^a	452.79 ± 26.86 ^c	438.37 ± 43.13 ^c	136.99 ± 4.67 ^e
	Cyanidin 3-(malonoyl) glucoside	18.3								
	Delphinidin 3-glucoside	18.5								
3	Cyanidin-3-p-coumaroyl-glucoside	19.6	1476.65 ± 257.18 ^c	980.68 ± 74.48 ^d	2571.57 ± 214.26 ^a	2512.42 ± 217.03 ^a	1973.83 ± 64.2 ^b	2696.44 ± 26.67 ^a	1053.77 ± 38.07 ^d	1495.07 ± 54.02 ^c
	Cyanidin 3-O-galactoside	20.0								
	Cyanidin 3-(3'-malonoyl) glucoside	20.2								
	Delphinidin-3-glucoside	20.7								
	Delphinidin 3-(malonoyl) glucoside	21.0								
4	Cyanidin 3-(6"-succinyl) glucoside	21.6	931.41 ± 19.94 ^c	397.70 ± 13.50 ^d	1809.35 ± 93.98 ^a	1107.57 ± 78.68 ^{bc}	1565.33 ± 154.20 ^{ab}	689.91 ± 36.30 ^{cd}	864.72 ± 63.20 ^c	1005.38 ± 12.18 ^c
	Total Anthocyanin									

Results expressed in µg/g dry basis. Values are the mean of three replications (± standard error). The peaks were quantified as cyanidin-3-glucoside equivalents. Different superscripts in the same line indicate a significant difference ($p < 0.05$). Rt: Time retention W- winter, S – Summer

When comparing the two growth periods, as well as for phenolic compounds, all samples grown in winter showed higher levels of total anthocyanins, except for Maira cv, which did not show a significant difference in the levels of lettuce harvested in winter and summer. Xu et al. (2011) found higher levels of phenolic compounds and greater antioxidant capacity in the seed and skin of winter grape berries than in summer berries for all cultivars investigated, thus, factors such as genetics, light and temperature significantly influence the anthocyanin content (GAZULA et al., 2007).

As happened to the phenolic compound, the cultivar Maira W, also had the highest concentration of anthocyanins ($7603.31 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW), followed by Carmin W ($7251.33 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW), among the analyzed samples. These varieties had twice as much anthocyanin content as the "Caesar red" variety ($3656 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW) studied by Kim et al. (2018). These two cultivars with the highest anthocyanin content are those classified as red leaf lettuce. The red color of the lettuce is formed by the accumulation of anthocyanins. Thus, visual assessment of red intensity can also help to measure the relative anthocyanin content (KIM et al., 2018).

The antioxidant content of plants varies according to growing conditions and in response to environmental stress. The average of ABTS antioxidant capacities of the lettuce's extracts is presented in Table 5. The antioxidant content of plants varies according to growing conditions and in response to environmental stress. In winter, lettuce cultivars showed greater antioxidant capacity than in summer (Table 2), with emphasis on cultivars Carmin W ($1463.93 \mu\text{M TE} / \text{g dw}$) was 2.2 times larger than Carmin S ($637.08 \mu\text{M TE} / \text{g dw}$) and Maira W ($1252.90 \mu\text{M TE} / \text{g dw}$) 1.7 times larger than Maira S ($723.69 \mu\text{M TE} / \text{g dw}$), which have leaves with a more intense red

colour. In the winter period, Mila and Scarlet had an antioxidant capacity of 458.43 and 472.77 $\mu\text{Mol TE/g dw}$, respectively, whereas, for the summer periods the antioxidant capacity was 210.27 and 331.95 $\mu\text{Mol TE/g dw}$, respectively. On the other hand, Liu et al. (2007), in a study with lettuce cultivars grown in two harvest periods, showed that lettuce grown at higher temperatures and greater light intensity had a significantly greater antioxidant capacity than lettuce grown at lower temperatures and in less light.

Table 5 - Antioxidant capacities determined by the ABTS assay from the four cultivars of red *Lactuca sativa* L. in winter (W) and summer (S).

Reducing capacity (ABTS) – Equivalent trolox ($\mu\text{Mol TE/g d.w.}$)				
	Mila	Maira	Carmin	Scarlet
Winter	458.43 \pm 21.13 ^e	1252.90 \pm 58.01 ^b	1463.93 \pm 52.27 ^a	472.77 \pm 20.19 ^e
Summer	210.27 \pm 10.05 ^g	723.69 \pm 13.75 ^c	637.08 \pm 10.01 ^d	331.95 \pm 11.36 ^f

Results expressed in $\mu\text{Mol TE/g dry weight}$. Values are the mean of three replications (\pm standard error) Different superscripts in the same column indicate a significant difference ($p < 0.05$)

In addition to PCA and Two-way ANOVA, a correlation analysis was performed to assess the antioxidant potential of the compounds under study, based on the ABTS radical scavenging assay. The Figure 2 and the Table S5 (Supplementary Material) showed a high positive correlation, at the 5% level of significance, with phenolic compounds ($r = 0.83$) and especially anthocyanins ($r = 0.94$). The main phenolic compounds responsible for this strong correlation were Chlorogenic acid ($r = 0.79$), 3,4-dicaffeoylquinic acid ($r = 0.85$) and Amentoflavone, kaempferol-3-O-alonylglucoside ($r = 0.82$). The anthocyanins with the highest correlation with ABTS radical scavenging activity were Cyanidin 3-glucoside ($r = 0.76$), Cyanidin 3,5-diglucoside ($r = 0.87$) and Cyanidin 3-(6"-succinyl) glucoside ($r = 0, 88$). In the study of Liu et al. (2007), the total

phenolics represented more than 60% of the total antioxidant capacity, Nicolle et al. (2004) found the DicaFFEoyl tartaric acid representing 55% of the antioxidant capacity; and Sung Park et al. (2015) verified that the anthocyanin extract showed greater antioxidant activity than the carotenoid extract. Phenolic compounds are considered antioxidants when in low concentration they are able to prevent and delay auto-oxidation or oxidation mediated by free radicals and the product formed after the reaction is stable (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997). The high content of phenolic compounds in red lettuce cultivars can be attributed to higher anthocyanin content and the high antioxidant capacity may be related to the anthocyanins (LIU et al., 2007). Anthocyanins have the potential to reduce photooxidative damage to leaves, protecting chloroplasts from excess high-energy quanta and eliminating reactive oxygen species without significantly compromising photosynthesis (NEILL; GOULD, 2003). Different seasons and different cultivars can differ in the oxidative power of plants and in their compounds with bioactivity (LIU et al., 2007). Lettuce cultivars genetically predisposed to contain higher concentrations of anthocyanins respond more strongly to annual or seasonal temperature patterns (GAZULA et al., 2007). Studies showed that lettuce provides not only a variety of bioactive compounds but also different amounts of these compounds among lettuce types, with a direct ratio between the intensity of the red color and the amount of these phytochemicals (LIU et al., 2007; LLORACH et al., 2008; MULABAGAL et al., 2010; NICOLLE et al., 2004; OUZOUNIS et al., 2015; ZAPATA-VAHOS et al., 2020).

Therefore, the variability in the compositions and quantities of compounds in different foods indicates the importance of eating a variety of food sources in particular, colored foods, in every meal (LLORACH et al., 2008).

4 CONCLUSIONS

In our work, the applied statistical analyzes make it clear that lettuces have a similar profile of bioactive compounds within the variety and this profile is not affected by the growing season, however, the content of these compounds behave differently (distinct) both within the cultivate as well as within the growing season. The concentrations of phenolic compounds, anthocyanins and antioxidant capacity were significantly higher ($p < 0.05$) in the winter; however, higher levels of carotenoids were found in lettuce cultivated in summer. Thus, lettuce cultivation in the summer period may present different levels of bioactive compounds from those cultivated in the winter period, since climatic conditions, such as the incidence of photosynthetic light and temperature, are different in these seasons. Plants were rich in carotenoids, phenolic compounds and antioxidant potential, being a food source for these compounds.

Acknowledgements: The authors are grateful to The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for financial support.

REFERENCES

- ASSEFA, Awraris Derbie et al. Identification and quantification of selected metabolites in differently pigmented leaves of lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars harvested at mature and bolting stages. **BMC Chemistry** 2019 **13:1**, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2019.
- BECATTI, Elisa et al. Short-term postharvest carbon dioxide treatments induce selective molecular and metabolic changes in grape berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 13, p. 8012–8020, 2010.
- BERGQUIST, Sara Å M et al. Effects of shade nettings, sowing time and storage on baby spinach flavonoids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 13, p. 2464–2471, 2007.
- CALDWELL, Charles R.; BRITZ, Steven J. Effect of supplemental ultraviolet radiation on the carotenoid and chlorophyll composition of green house-grown leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2006.
- DIPRAT, Andressa Bacalau et al. Chlorella sorokiniana: A new alternative source of carotenoids and proteins for gluten-free bread. **Lwt**, v. 134, n. July, p. 109974, 2020.
- EL-NAKHEL, Christophe et al. The bioactive profile of lettuce produced in a closed soilless system as configured by combinatorial effects of genotype and macrocation supply composition. **Food Chemistry**, v. 309, n. October 2019, p. 125713, 2020.
- FARAH, Adriana et al. Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 12, p. 2309–2315, 2008.
- FINCH, Daniel et al. Photosynthetically active radiation regimes in a southern African savanna environment. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 122, p. 229–238, 2004.
- FRANKLIN, Keara A et al. Interaction of light and temperature signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 11, p. 2859–2871, 2014.
- FREDE, Katja; SCHREINER, Monika; BALDERMANN, Susanne. Light quality-induced changes of carotenoid composition in pak choi *Brassica rapa* ssp. *chinensis*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 193, p. 18–30, 2019.
- FU, Weiguo; LI, Pingping; WU, Yanyou. Effects of different light intensities on chlorophyll fluorescence characteristics and yield in lettuce. **Scientia Horticulturae**, v.

135, p. 45–51, 2012.

GAZULA, Aparna et al. Anthocyanin Levels in Nine Lettuce (*Lactuca sativa*) Cultivars: Influence of Planting Date and Relations among Analytic, Instrumented, and Visual Assessments of Color. **HortScience**, v. 42, n. 2, p. 232–238, 2007.

GOPAL, Sowmya Shree et al. Lactucaxanthin-a potential anti-diabetic carotenoid from lettuce (*Lactuca sativa*) inhibits α -amylase and α -glucosidase activity in vitro and in diabetic rats. **Food and Function**, v. 8, n. 3, p. 1124–1131, 2017.

HASKELL, Marjorie J. Provitamin A Carotenoids as a Dietary Source of Vitamin A. In: TANUMIHARDJO, Sherry A (org.). **Carotenoids and Human Health**. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. p. 249–260.

ILIĆ, S Z et al. Light modification by color nets improve quality of lettuce from summer production. **Scientia Horticulturae**, v. 226, p. 389–397, 2017.

JU, Jin Hee et al. Growth and Carotenoid Contents of Intercropped Vegetables in Building-Integrated Urban Agriculture. **Journal of Food Quality**, v. 2021, 2021.

KIM, DE et al. Metabolite profiling of green, green/red, and red lettuce cultivars: Variation in health beneficial compounds and antioxidant potential. **Food Research International**, v. 105, p. 361–370, 2018.

KIM, Moo Jung et al. Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.), **Academic Press Inc.**, 2016.

LIU, Xiangfei et al. Total phenolic content and DPPH radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 3, p. 552–557, 2007.

LLORACH, Rafael et al. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 1028–1038, 2008.

LÓPEZ, Alicia et al. Chemical composition and antioxidant capacity of lettuce: Comparative study of regular-sized (Romaine) and baby-sized (Little Gem and Mini Romaine) types. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, n. 1, p. 39–48, 2014.

MANACH, Claudine et al. Polyphenols: Food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727–747, 2004.

MAOKA, Takashi. Carotenoids as natural functional pigments. **Journal of Natural**

Medicines, v. 74, n. 1, p. 1–16, 2020.

MARIN, Alicia et al. Weather Variability Influences Color and Phenolic Content of Pigmented Baby Leaf Lettuces throughout the Season. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 6, p. 1673–1681, 2015.

MONDOLOT, Laurence et al. Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during *Coffea canephora* leaf development. **Annals of Botany**, v. 98, n. 1, p. 33–40, 2006.

MULABAGAL, Vanisree et al. In vitro evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 300–306, 2010.

NAGARAJAN, Jayesree et al. Carotenoids. **Nutraceutical and Functional Food Components: Effects of Innovative Processing Techniques**, p. 259–296, 2017.

NEILL, Samuel O.; GOULD, Kevin S. Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants?. **Functional Plant Biology**, v. 30, n. 8, p. 865–873, 2003.

NICOLLE, Catherine et al. Characterisation and variation of antioxidant micronutrients in lettuce (*Lactuca sativa* folium). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 15, p. 2061–2069, 2004.

OH, Myung-Min; CAREY, Edward E; RAJASHEKAR, C B. Environmental stresses induce health-promoting phytochemicals in lettuce. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 7, p. 578–583, 2009.

ORDIDGE, Matthew et al. Phenolic contents of lettuce, strawberry, raspberry, and blueberry crops cultivated under plastic films varying in ultraviolet transparency. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1224–1227, 2010.

OUZOUNIS, Theoharis et al. Predawn and high intensity application of supplemental blue light decreases the quantum yield of PSII and enhances the amount of phenolic acids, flavonoids, and pigments in *Lactuca sativa*. **Frontiers in Plant Science**, 2015.

PARK, Jong Sug et al. Arabidopsis R2R3-MYB transcription factor AtMYB60 functions as a transcriptional repressor of anthocyanin biosynthesis in lettuce (*Lactuca sativa*). **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 6, p. 985–994, 2008.

RADIN, Bernadete et al. Crescimento de cultivares de alface conduzidas em estufa e a campo. **Horticultura Brasileira**, v. 2222, n. 22, p. 178–181, 2004.

RICE-EVANS, Catherine A; MILLER, Nicholas J; PAGANGA, George. Antioxidant

properties of phenolic compounds. **Trends in plant science**, v. 2, n. 4, p. 152–159, 1997.

RODRIGUES, Eliseu; MARIUTTI, Lilian R B; MERCADANTE, Adriana Z. Carotenoids and Phenolic Compounds from *Solanum sessiliflorum*, an Unexploited Amazonian Fruit, and Their Scavenging Capacities against Reactive Oxygen and Nitrogen Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 12, p. 3022–3029, 2013.

RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. **A Guide To Analysis in Carotenoid**. Washington, D. C: ILSI Press, 2001.

RODRIGUEZ-SAONA, Luis E.; WROLSTAD, Ronald E. Extraction, Isolation, and Purification of Anthocyanins. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 00, n. 1, p. F1.1.1-F1.1.11, 2001.

RUFINO, M do S Moura et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS +. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, n. 128, p. 1–4, 2007.

SCHMIDT, Helena et al. New insights into the phenolic compounds and antioxidant capacity of feijoa and cherry fruits cultivated in Brazil. **Food Research International**, v. 136, n. March, p. 109564, 2020.

SIEFERMANN-HARMS, Dorothea et al. Lactucaxanthin, an ϵ,ϵ -carotene-3,3'-diol from *Lactuca sativa*. **Phytochemistry**, v. 20, p. 85–88, 1981.

SIMIRGIOTIS, Mario J. et al. Antioxidant capacities and analysis of phenolic compounds in three endemic nolana species by HPLC-PDA-ESI-MS. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 11490–11507, 2015.

SINGLETON, V L; ROSSI, Joseph A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144 LP – 158, 1965.

SOFO, Adriano et al. Berry morphology and composition in irrigated and non-irrigated grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 11, p. 1023–1031, 2012.

SOFO, Adriano et al. Different agronomic and fertilization systems affect polyphenolic profile, antioxidant capacity and mineral composition of lettuce. **Scientia**

Horticulturae, v. 204, p. 106–115, 2016.

SPÍNOLA, Vítor; CASTILHO, Paula C. Evaluation of Asteraceae herbal extracts in the management of diabetes and obesity. Contribution of caffeoylquinic acids on the inhibition of digestive enzymes activity and formation of advanced glycation end-products (in vitro). **Phytochemistry**, v. 143, p. 29–35, 2017.

SUNG PARK, Woo et al. Changes in Carotenoid and Anthocyanin Contents, as well as Antioxidant Activity during Storage of Lettuce. **J Korean Soc Food Sci Nutr**, v. 44, n. 9, p. 1325–1332, 2015.

SYTAR, Oksana et al. Shift in accumulation of flavonoids and phenolic acids in lettuce attributable to changes in ultraviolet radiation and temperature. **Scientia Horticulturae**, v. 239, p. 193–204, 2018.

VARGAS, Emanuela F de et al. Pelargonidin 3-Glucoside Extraction from the Residue from Strawberry Processing (*Fragaria X Ananassa*). **Current Bioactive Compounds**, v. 12, p. 269–275, 2016.

WU, Xianli; PRIOR, Ronald L. Identification and Characterization of Anthocyanins by High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Tandem Mass Spectrometry in Common Foods in the United States: Vegetables, Nuts, and Grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 3101–3113, 2005.

XU, Changmou et al. Influence of growing season on phenolic compounds and antioxidant properties of grape berries from vines grown in subtropical climate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 4, p. 1078–1086, 2011.

YAMAGUCHI, Masa Atsu et al. Cyanidin 3-malonylglucoside and malonyl-coenzyme a: Anthocyanidin malonyltransferase in *Lactuca sativa* leaves. **Phytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 661–663, 1996.

ZAPATA-VAHOS, Isabel Cristina et al. Comparison of antioxidant contents of green and red leaf lettuce cultivated in hydroponic systems in greenhouses and conventional soil cultivation. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v. 73, n. 1, p. 9077–9088, 2020.

6 DISCUSSÃO GERAL

Pesquisas têm dado ênfase a alimentos de origem vegetal de coloração vermelha por apresentar altos valores de compostos bioativos e alta capacidade antioxidante se comparados a alimentos de cor verde (KHANAM et al., 2012; PÉREZ-LÓPEZ et al., 2018; SYTAR et al., 2018; YANG et al., 2022). A alface tem se destacado por apresentar altos teores de componentes bioativos como polifenóis e carotenoides, compostos responsáveis pela capacidade antioxidante de frutas e hortaliças.

No artigo 1 foi apresentado o estudo no qual investigou-se o efeito de duas estações (inverno e verão) sobre o perfil e o conteúdo de carotenoides e compostos fenólicos, incluindo antocianinas, além da atividade antioxidante. Os resultados mostraram que a cultivar e a estação do ano não influenciaram o perfil qualitativo dos carotenoides e dos compostos fenólicos das alfaces estudadas, o que sugere que os fatores genéticos, nas condições de cultivo propostas para as cultivares, não foram influenciados pelos fatores ambientais, assim, as cultivares apresentaram o mesmo perfil de compostos, variando apenas suas concentrações.

A estação influenciou o teor desses componentes em todas as cultivares, os níveis de compostos fenólicos foram significativamente maiores no inverno, enquanto os níveis de carotenoides foram maiores no verão. Temperaturas muito elevadas ou muito baixas podem ter um efeito adverso para o desenvolvimento da alface, dessa forma, as temperaturas mais baixas do inverno podem ter favorecido o aumento do teor dos CFE. A luminosidade é outro fator que pode contribuir para que a alface apresente diferentes teores de carotenoides, esse aumento pode estar relacionado uma maior incidência de luz no período do verão.

Foram identificadas dez antocianinas, a principal antocianidina foi a cianidina, sendo também encontrada delphinidina e seu conteúdo está relacionado com a intensidade da coloração vermelha das folhas.

O principal carotenoide encontrado foi o all-trans- β -caroteno, importante precursor da vitamina A, sendo responsável por quase 50% da concentração total dos carotenoides, seguido pela luteína e a zeaxantina. O ácido 5-cafeoilquínico e a rutina foram os principais compostos fenólicos identificados. Na análise de correlação avaliou-se o potencial antioxidante dos compostos bioativos com base no ensaio de eliminação de radicais ABTS; os resultados mostraram alta correlação com compostos fenólicos ($r = 0,83$) e principalmente antocianinas ($r = 0,94$). O alto teor de compostos fenólicos e a alta capacidade antioxidante nas cultivares de alface vermelha podem ser atribuídos ao maior teor de antocianinas.

O perfil dos compostos fenólicos não extraíveis (CFNE), apresentado no Artigo 2, foi semelhante entre as cultivares de alface e entre os dois períodos de cultivo, sendo formado principalmente por ácidos fenólicos, como os ácidos caféico, gálico, vanílico, clorogênico e protocatecúico. Os compostos presentes em ambas as frações (CFE e CFNE) foram os ácidos cafeoiltartárico, caféico e clorogênico. Os diferentes perfis dessas frações fenólicas sugerem a importância de considerar ambas as frações ao analisar os compostos fenólicos em matrizes vegetais para obter informação mais completa de sua composição.

Ao comparar os resultados entre as cultivares, as alfaces mais intensamente vermelhas (Maira e Carmin) apresentaram as maiores concentrações para a maioria dos compostos fenólicos. Embora a cor da folha (verde/vermelha vs. vermelha) tenha sido relacionada ao conteúdo da maioria dos fitoquímicos estudados, o período de crescimento afetou suas concentrações em ambas as cores e cultivares. As condições climáticas do verão em que as alfaces foram cultivadas, como temperatura e radiação fotossinteticamente ativa (PAR), podem ter contribuído para o maior teor de compostos fenólicos não extraíveis em relação ao período de inverno.

A alface é consumida principalmente *in natura* na forma de salada, sendo um alimento muito perecível e que gera grandes quantidades de resíduos que representa uma grande perda econômica para os produtores. Esses resíduos são gerados principalmente nas etapas de pós-colheita e distribuição, onde muitos produtos são descartados com base nos padrões de qualidade exigidos por varejistas e consumidores (PLAZZOTTA; MANZOCCO; NICOLI, 2017). Assim, diferentes técnicas têm enfatizado o reaproveitamento desses resíduos de alface para a obtenção de ingredientes de alto valor agregado por meio da extração de compostos funcionais específicos, como polifenóis e glucosinolatos (SOLANA; MIROFCI; BERTUCCO, 2016), desenvolvimento de tecnologias para obtenção de extratos enriquecidos de inositóis, os quais podem reduzir os níveis de glicose, colesterol total e LDL no sangue e têm sido utilizados no tratamento de diversas patologias, como ovário policístico, síndrome metabólica e diabetes gestacional (ZULUAGA et al., 2020).

Os extratos de alface ricos em compostos bioativos podem ser utilizados como ingredientes funcionais adicionados em alimentos processados, melhorando sua qualidade nutricional. Compostos com alta capacidade antioxidante podem ser aplicados em produtos de cosméticos, nutracêuticos e farmacêuticos. Os métodos de extração de fitoquímicos precisam ser desenvolvidos para que possam ser utilizados como ingredientes funcionais.

Subprodutos de alface são exemplos de fontes de baixo custo e ricas em compostos com bioatividade que podem ser extraídos e utilizados para funcionalizar alimentos (LLORACH; TOMÁS-BARBERÁN; FERRERES, 2004). Ainda é necessário realizar mais estudos sobre toxicidade, atividade *in vivo* e biodisponibilidade.

Cultivares de alface vermelha têm seus principais compostos bioativos descritos e comparados em duas épocas de plantio. Os resultados deste estudo reforçam que a estação do ano pode modular a concentração de compostos bioativos na alface.

7 CONCLUSÃO

Foi estudado o possível efeito da cultivar e das estações do ano, inverno e verão, sob os principais compostos bioativos e a atividade antioxidante de quatro cultivares de alface vermelha.

Os resultados das análises qualitativas e quantitativas sugeriram que :

- a - As cultivares apresentaram perfil semelhante para carotenoides e compostos fenólicos livres (CFE) e ligados (CFNE) e antocianinas.
- b – Entre as cultivares houve diferença nas concentrações para a maioria dos compostos.
- c - O período de cultivo não influenciou nos perfis dos compostos bioativos para a maioria das cultivares.
- d - Compostos fenólicos totais (fração CFE) e antocianinas, das amostras de inverno foram superiores em relação às amostras de verão.
- e – Os teores de carotenoides e compostos fenólicos não extraíveis (CFNE) foram maiores nas amostras de verão para a maioria dos compostos. Afinal, qual foi o melhor e o menos promissor nas suas condições experimentais
- f - A cultivar Maira se destacou pelo alto conteúdo dos compostos bioativos analisados no presente estudo.

Assim, o cultivo da alface no período de verão pode apresentar teores de compostos bioativos diferentes daqueles cultivados no período de inverno, uma vez que as condições climáticas, como a incidência de luz fotossintética e a temperatura são diferentes nessas estações. As plantas mostraram-se ricas em carotenoides, compostos fenólicos e atividade antioxidante, sendo uma fonte alimentar para obtenção desses compostos.

REFERÊNCIAS

ACOSTA-ESTRADA, Beatriz A.; GUTIÉRREZ-URIBE, Janet A.; SERNA-SALDÍVAR, Sergio O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v. 152, p. 46–55, 2014.

AMODIO, M.L., DEROSI, A., COLELLI, G. Modeling phenolic content during storage of cut fruit and vegetables: A consecutive reaction mechanism, **Journal of Food Engineering**, v. 140, p. 1-8, 2014.

ANGELO, Priscila Milene; JORGE, Neuza. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

ANUÁRIO. Hortaliças. Santa Cruz do Sul, p. 56, 2017.

ARRANZ, Sara; SILVÁN, Jose Manuel; SAURA-CALIXTO, Fulgencio. Nonextractable polyphenols, usually ignored, are the major part of dietary polyphenols: A study on the Spanish diet. **Molecular Nutrition Food Research Journal**. v. 54, n. 11, p. 1646-58, 2010.

ARUNA, G.; BASKARAN, V. Comparative study on the levels of carotenoids lutein, zeaxanthin and β -carotene in Indian spices of nutritional and medicinal importance. **Food Chemistry**, v. 123, n. 2, p. 404–409, 2010.

ASSUMPCÃO, Carolina Fagundes et al. Application of supplemental UV-B radiation in pre-harvest to enhance health-promoting compounds accumulation in green and red lettuce. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 11, p. e14213, 2019.

AUNE, Dagfinn et al. Dietary intake and blood concentrations of antioxidants and the risk of cardiovascular disease, total cancer, and all-cause mortality: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 108, n. 5, p. 1069–1091, 2018.

BASLAM, Marouane et al. Nutritional quality of outer and inner leaves of green and red pigmented lettuces (*Lactuca sativa* L.) consumed as salads. **Scientia Horticulturae**, v. 151, p. 103–111, 2013.

BASTOS, Deborah H. M.; ROGERO, Marcelo M.; ARÊAS, José Alfredo G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, p. 646–656, 2009.

BECATTI, Elisa et al. Short-term postharvest carbon dioxide treatments induce selective molecular and metabolic changes in grape berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 13, p. 8012–8020, 2010.

BECKER, Christine et al. Nitrogen limited red and green leaf lettuce accumulate flavonoid glycosides, caffeic acid derivatives, and sucrose while losing chlorophylls, β -carotene and xanthophylls. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, 2015.

BECKER, Christine; KLÄRING, Hans Peter. CO₂ enrichment can produce high red leaf lettuce yield while increasing most flavonoid glycoside and some caffeic acid derivative concentrations. **Food Chemistry**, v. 199, p. 736–745, 2016.

BOCHI, V. C., Godoy, H. T., & Giusti, M. M. Anthocyanin and other phenolic compounds in Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) fruits. **Food Chemistry**, v. 176, p. 234–243, 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual de condutas gerais do Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2013.

BRITTON, G. **Functions of Intact Carotenoids**. In: Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (eds) Carotenoids. Carotenoids, v. 4, 2008.

CALDWELL, Charles R.; BRITZ, Steven J. Effect of supplemental ultraviolet radiation on the carotenoid and chlorophyll composition of green house-grown leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2006.

CARBONI MARTINS, Caroline et al. New insights into non-extractable phenolic compounds analysis. **Food Research International**, v. 157, p. 111487, 2022.

CERMEÑO, Z.S. **Estufas - Instalações e manejo**. Lisboa. Litexa Editora, Ltda, 1990. 355 p.

CHANDRASEKARA, Anoma; SHAHIDI, Fereidoon. Bioactivities and antiradical properties of millet grains and hulls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 17, p. 9563–9571, 2011.

CHEYNIER, V.; COMTE, G.; DAVIES, K. M.; LATTANZIO, V.; MARTEN, S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, p. 1–20, 2013

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants** New York: Columbia University Press, p.1021-1028, 1981.

DAMERUM, Annabelle; CHAPMAN, Mark A.; TAYLOR, Gail. Innovative breeding technologies in lettuce for improved post-harvest quality. **Postharvest Biology and Technology**, v. 168, p. 111266, 2020.

DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L; FENNEMA, Owen R. **Química de Alimentos de Fennema**. Tradução Adriano Brandelli et al. - 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DE, Enayde et al. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 2, p. 193–201, 2008.

DURAZZO, A. **Extractable and non-extractable polyphenols: An overview**. In F. Saura-Calixto, & J. Pérez-Jiménez (Eds.), Non-extractable polyphenols and carotenoids: Importance in human nutrition and health. Food Chem., Func. Anal. No. 5 (pp. 1–37). London, UK: Royal Society of Chemistry, 2018.

EMAN, M. Alissa; GORDON, A. Ferns. Dietary fruits and vegetables and cardiovascular diseases risk. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 9, p. 1950–1962, 2017.

ESPARZA-MARTÍNEZ, FJ et al. Extractable and Non-Extractable Phenolics and Antioxidant Capacity of Mandarin Waste Dried at Different Temperatures. **Plant foods for**

human nutrition (Dordrecht, Netherlands), v. 71, n. 3, p. 294–300, 2016.

FEI, Peng et al. Acylation of blueberry anthocyanins with maleic acid: Improvement of the stability and its application potential in intelligent color indicator packing materials. **Dyes and Pigments**, v. 184, p. 108852, 2021.

FELTRIM, Anderson Luiz et al. Produção de alface-crespa em solo e em hidroponia, no inverno e verão, em Jaboticabal-SP. **Científica**, v. 37, n. 1, p. 9–15, 2009.

FILGUEIRA, Fernando Antonio dos Reis. **Manual de olericultura: cultura e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2008.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. UFVed. Viçosa: 2012.

FLESCHHUT, Jens et al. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. **European journal of nutrition**, v. 45, p. 7-18, 2006.

FRAGA, CESAR G.; CELEP, GULCIN SAGDICOGLU; GALLEANO, MONICA. Biochemical actions of plant phenolics compounds: thermodynamic and kinetic aspects. **Fraga CG (ed.), Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology**, p. 91-106, 2010.

FRASER, PAUL D; PETER M BRAMLEY. “The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids.” **Progress in lipid research**, v. 43, n. 3, p. 228-65, 2004.

GARCÍA-FUENTES, M.; TORRES, D.; ALONSO, M. J. Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 27 /3, n. 2–3, p. 159–168, 2003.

GONZALES, Gerard Bryan et al. Liquid chromatography-mass spectrometry coupled with multivariate analysis for the characterization and discrimination of extractable and nonextractable polyphenols and glucosinolates from red cabbage and Brussels sprout waste streams. **Journal of Chromatography A**, v. 1402, p. 60–70, 2015.

HALLIWELL, Barry. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem?. **FEBS Letters**, v. 540, n. 1–3, p. 3–6, 2003.

HASKELL, Marjorie J. Provitamin A Carotenoids as a Dietary Source of Vitamin A. *In*: TANUMIHARDJO, Sherry A (org.). **Carotenoids and Human Health**. Totowa, NJ: Humana Press, p. 249–260, 2013.

HASLER, C.M. Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges—A Position Paper from the American Council on Science and Health. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 3772-3781, 2002.

HENZ, Gilmar Paulo; SUINAGA, Fábio. Tipos de alface cultivados no Brasil. **Embrapa Hortaliças - Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, v. 75, n. 36477, p. 1–7, 2009.

HUBER, Lísia S; RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. v. 19, n. 1, p. 97–108, 2008.

HUBER, Lísia S; RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B; RODRIGUES, Maria I. Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em

hortaliças Optimization and validation of HPLC methodology for determining flavonols and flavones in vegetables. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 66, n. 2, p. 142-151, 2007.

HÜMMER, Wolfgang; SCHREIER, Peter. Analysis of proanthocyanidins. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, n. 12, p. 1381–1398, 2008.

JIANG, M., REN, L., LIAN, H., LIU, Y., & CHEN, H. Novel insight into the mechanism underlying light-controlled anthocyanin accumulation in eggplant (*Solanum melongena* L.). **Plant Science**, 249, 46-58, 2016.

KALIORA, AC; DEDOUSSIS, GV. Natural antioxidant compounds in risk factors for CVD. **Pharmacological Research**, v. 56, n. 2, p. 99–109, 2007.

KHOO, Hock Eng et al. Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. **Food & nutrition research**, v. 61, n. 1, p. 1361779, 2017.

KIM, Moo Jung et al. Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Academic Press Inc.**, 2016.

KIM, Dae-Eun et al. te profiling of green, green/red, and red lettuce cultivars: Variation in health beneficial compounds and antioxidant potentialMetaboli. **Food Research International**, v. 105, p. 361–370, 2018.

KIMURA, M. ., RODRIGUEZ-AMAYA, D. Carotenoides de tomate e extrato de tomate: verificação da ocorrência de γ -caroteno. **Revista Do Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n.1, p. 21–6, 2003.

KROON, Paul A. et al. Release of Covalently Bound Ferulic Acid from Fiber in the Human Colon. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 661–667, 1997.

LIU, Xiangfei et al. Total phenolic content and DPPH radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 3, p. 552–557, 2007.

LLORACH, Rafael et al. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 1028–1038, 2008.

LLORACH, Rafael; TOMÁS-BARBERÁN, Francisco A.; FERRERES, Federico. Lettuce and chicory byproducts as a source of antioxidant phenolic extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 16, p. 5109–5116, 2004.

LÓPEZ-RUBIO, Amparo; LAGARON, Jose M. Improved incorporation and stabilisation of β -carotene in hydrocolloids using glycerol. **Food Chemistry**, v. 125, n. 3, p. 997–1004, 2011.

LOURDES, Regina; HIPOL, B; DIONISIO-SESE, Maribel L. Impact of Light Variation on the Antioxidant Properties of Red Lettuce. **Electronic Journal of Biology**, v. 10, n. 2, p. 28–34, 2014.

MACHADO, Hussen et al. Flavonóides e seu potencial terapêutico Flavonoids and potential therapeutic. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MALDONADE, I.R; MATTOS, L.M.; MORETTI, C.L. **Manual de boas práticas agrícolas na produção de alfaceEmbrapa Hortaliças - Comunicado Técnico (INFOTECA-E).**

Brasilia DF: [s. n.], 2014.

MALLMANN, Luana P. et al. Comprehensive identification and quantification of unexploited phenolic compounds from red and yellow araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) by LC-DAD-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 131, n. September 2019, p. 108978, 2020.

MANACH, Claudine et al. Polyphenols: Food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727–747, 2004.

MULABAGAL, Vanisree et al. In vitro evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 300–306, 2010.

NAGARAJAN, Jayesree et al. Carotenoids. **Nutraceutical and Functional Food Components: Effects of Innovative Processing Techniques**, p. 259–296, 2017.

NAMITHA, K K, P S NEGI. “Chemistry and biotechnology of carotenoids.” Critical Reviews in **Food Science and Nutrition** vol. 50, n. 8, p. 2728–60, 2010.

NICOLLE, Catherine et al. Characterisation and variation of antioxidant micronutrients in lettuce (*Lactuca sativa* folium). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 15, p. 2061–2069, 2004.

NISAR N., LI L., LU S., KHIN N. C., POGSON, B. J. Carotenoid Metabolism in Plants Molecule. **Plant**, v. 8, p. 68–82, 2015.

PARK, Eun-Jung; PEZZUTO, John M. Flavonoids in Cancer Prevention. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 836–851, 2012.

PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara; DÍAZ-RUBIO, M. Elena; SAURA-CALIXTO, Fulgencio. Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: Occurrence, metabolic fate and health effects. **Nutrition Research Reviews**, v. 26, n. 2, p. 118–129, 2013.

PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara; SAURA-CALIXTO, Fulgencio. Macromolecular antioxidants or non-extractable polyphenols in fruit and vegetables: Intake in four European countries. **Food Research International**, v. 74, p. 315–323, 2015.

PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara; TORRES, Josep Lluís. Analysis of Nonextractable Phenolic Compounds in Foods: The Current State of the Art. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 24, p. 12713–12724, 2011.

PÉREZ-LÓPEZ, Usue et al. Growth and nutritional quality improvement in two differently pigmented lettuce cultivars grown under elevated CO₂ and/or salinity. **Scientia Horticulturae**, v. 195, p. 56–66, 2015.

PLAZZOTTA, Stella; MANZOCCO, Lara; NICOLI, Maria Cristina. Fruit and vegetable waste management and the challenge of fresh-cut salad. **Trends in Food Science and Technology**, v. 63, p. 51–59, 2017.

PROBST, Yasmine; GUAN, Vivienne; KENT, Katherine. A systematic review of food composition tools used for determining dietary polyphenol intake in estimated intake studies. **Food Chemistry**, 2018.

PROCHÁZKOVÁ, D; BOUŠOVÁ, I; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant

- properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 513–523, 2011.
- RADIN, Bernadete et al. Crescimento de cultivares de alface conduzidas em estufa e a campo. **Horticultura Brasileira**, v. 2222, n. 22, p. 178–181, 2004.
- RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. **A guide to carotenoids analysis in foods**. ILSI Humaned. Campinas, SP, Brazil, 2001.
- RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Update on natural food pigments-A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. **Food Research International**, v. 124, p. 200-205, 2019.
- ROSA, Aline Mabel et al. Production and photosynthetic activity of Mimosa Verde and Mimosa Roxa lettuce in two farming systems. **Revista Ceres**, 2014.
- ROSS, A. C., CABALLERO, B., COUSINS, R. J., TUCKER, K. L., AND ZIEGLER, T. R. **Modern nutrition in health and diseases**. Eleventh ed Wolters Kluwer Health Adis, 2020.
- SALA, Fernando Cesar; COSTA, Cyro Paulino da. Retrospectiva e tendência da alfaceicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 187–194, 2012.
- SAURA-CALIXTO, F. **The Story of the Introduction of Non-extractable Polyphenols into Polyphenol Research: Origin, Development and Perspectives**. [S. l.: s. n.], 2018.
- SCALBERT, Augustin et al. Critical Reviews in Food Science and Nutrition Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 287–306, 2005.
- SEGOVIA, Jorge Frederico Orellana et al. Comparação do crescimento e desenvolvimento da alface (*Lactuca sativa* L.) no interior e no exterior de uma estufa de polietileno em Santa Maria, RS. **Ciência Rural**, v. 27, n. 1, p. 37–41, 1997.
- SIEFERMANN-HARMS, Dorothea et al. Lactucaxanthin, an ϵ,ϵ -carotene-3,3'-diol from *Lactuca sativa*. **Phytochemistry**, v. 20, p. 85–88, 1981.
- SOLANA, M.; MIROFCI, S.; BERTUCCO, A. Production of phenolic and glucosinolate extracts from rocket salad by supercritical fluid extraction: Process design and cost benefits analysis. **Journal of Food Engineering**, v. 168, p. 35–41, 2016.
- TOSTA, P.A.F. et al. Utilização de coberturas de solo no cultivo de alface ‘Babá de Verão’ em Cassilândia (MS). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 1, p. 85–89, 2010.
- TROJAK, Magdalena; SKOWRON, Ernest. Role of anthocyanins in high-light stress response. **WSN**, v. 81, n. 2, p. 150–168, 2017.
- TUNGMUNNITHUM, Duangjai et al. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. **Medicines**, v. 5, n. 3, p. 93, 2018.
- VAN DEN BERG, H et al. Review The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 880-912, 2000.

VARGAS, Emanuela F de et al. Pelargonidin 3-Glucoside Extraction from the Residue from Strawberry Processing (*Fragaria X Ananassa*). **Current Bioactive Compounds**, v. 12, p. 269–275, 2016.

VOLPE, Melisa Lanza et al. Bioactive Compounds, Antioxidant Activity and Growth Behavior in Lettuce Cultivars Grown under Field and Greenhouse Conditions. p. 52, 2021.

WANG, Hong et al. Comparative study of phenolic profiles, antioxidant and antiproliferative activities in different vegetative parts of Ramie (*Boehmeria nivea* L.). **Molecules**, v. 24, n. 8, 2019.

WEBER, Fabian; LARSEN, Lena Rebecca. Influence of fruit juice processing on anthocyanin stability. **Food Research International**, v. 100, p. 354–365, 2017.

WIEN, Chris. Lettuce, Endive and Chicory. By E. J. Ryder. Wallingford, UK: CABI Publishing (1999), pp. 208, £27.50. ISBN 0-85199-285-4. **Experimental Agriculture**, v. 36, n. 4, p. 525, 2000.

XIAO, Zhenlei et al. Assessment of Vitamin and Carotenoid Concentrations of Emerging Food Products: Edible Microgreens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 31, p. 7644–7651, 2012.

YOUNUS, I et al. Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory activities of in vitro and field-grown Iceberg lettuce extracts. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, v. 7, n. 5, p. 343–355, 2019.

ZANATTA, C. F. et al. Determination of anthocyanins from Camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 24, p. 9531–9535, 2005.

ZHOU, Weiwei et al. Short-Term Nitrate Limitation Prior to Harvest Improves Phenolic Compound Accumulation in Hydroponic-Cultivated Lettuce (*Lactuca sativa* L.) without Reducing Shoot Fresh Weight. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 40, p. 10353–10361, 2018.

ZULUAGA, Ana M. et al. Development of a microwave-assisted extraction method for the recovery of bioactive inositols from lettuce (*Lactuca sativa*) byproducts. **Electrophoresis**, v. 41, n. 20, p. 1804–1811, 2020.

ANEXO1 - ARTIGO 1 - SUPPORTING INFORMATION

Tabela 1 - Chromatographic and spectroscopic characteristics of red lettuce saponified extract by HPLC-DAD-MS / MS.

Peak	Carotenoid	Rt (min)	λ_{max} (nm)	%III/II	[M+H] ⁺ (m/z)	fragments ions (m/z)
1	(di-Z) violaxanthin	6.2	(327), 404, 427, 455	41	601.4162	583.3938[M + H - 18] ⁺ , 565.4179 [M + H - 18 - 18] ⁺ , 509.3006[M + H - 92] ⁺ , 491.3450[M + H - 92 - 18] ⁺
2	(all-E)-violaxanthin	7.4	416,438,468	82	601.4109	583.3923[M + H - 18] ⁺ , 565.3706[M + H - 18 - 18] ⁺ , 547.3345[M + H - 18 - 18 - 18] ⁺ , 509.3691[M + H - 92] ⁺ , 491.3392[M + H - 92 - 18] ⁺
3	(9-Z)-violaxanthin	8.2	(326), 411,435, 463	83	601.4159	583.4073 [M + H - 18] ⁺ , 565.4005 [M + H - 18 - 18] ⁺ , 547.3490 [M + H - 18 - 18 - 18] ⁺ , 491.3552[M + H - 92 - 18] ⁺ , 477.42 [M + H - 92] ⁺
4	(all-E)-luteoxanthin	8.4	398, 421, 448	91	601.4112	583.3919[M + H - 18] ⁺ , 565.3853[M + H - 18 - 18] ⁺ , 509.3257[M + H - 92] ⁺ , 491.3394[M + H - 92 - 18] ⁺
5	not identified	9.2	(327), 407-8, 430, 459	50	569.4093	551.4131[M + H - 18] ⁺ , 533.4068[M + H - 18 - 18] ⁺ , 459.3312[M + H - 18 - 92] ⁺ , 429.3517, 409.3707
6	(all-E)-lactucaxanthin	10.2	414, 438, 467	86	569.42 98	551.4138[M + H - 18] ⁺ , 533.3693[M + H - 18 - 18] ⁺ , 459.3617[M + H - 18 - 92] ⁺ , 429.2979, 409.2722
7	(13-Z)- luteína and/or (13'Z)-luteína +	11.4	(329), 413, 436, 463	53	569.4385	551.4120[M + H - 18] ⁺ , 533.3960[M + H - 18 - 18] ⁺ , 459.3439[M + H - 18 - 92] ⁺ , 429.3589, 409.3747
8	(all-E)- lutein	12.0	418, 444, 471	50	569.4303	551.4121[M + H - 18] ⁺ , 533.2930[M + H - 18 - 18] ⁺ , 495.4448[M + H - 18 - 56] ⁺ , 459.3572[M + H - 18 - 92] ⁺ , 429.3144
9	(all-E)-zeaxanthin	14.2	420, 449, 476	25	569.4217	551.3955[M + H - 18] ⁺ , 533.4095[M + H - 18 - 18] ⁺ , 477.3477[M + H - 92] ⁺ 459.3565[M + H - 18 - 92] ⁺ , 429.3090
10	(13-Z)- β -carotene	27.2	(336), 418, 444, 471	12,5	537.4337	444.3263[M - 92] ⁺ ,
11	(all-E)- β -carotene	33.3	422, 451, 476	23	537.4334	413.3303[M + H - 124] ⁺ , 400.2902[M + H - 137] ⁺
12	(9-Z)- β -carotene	36.0	(335), 420, 445, 472		537.4331	444.3636[M - 92] ⁺ ,

Table 2 - Profile representation of phenolic compounds in red lettuce cultivars by HPLC-DAD-MS / MS.

Peak	Identification	Rt (min)	UV λ máx (nm)	m/z [M-H] ⁻	MS ²
1	Caffeyoltartatic acid (Caftaric acid) + Caffeic acid + Tartaric acid	19.3	328	311.0387	179.0300, 135.0429
				179.0308	134.0348
				149.0073	-
2	5-calleoylquinic acid Chlrogenic acid Quinic acid Quinic acid derivative	22.1 22.2 22.2 22.3	325	353.0850	191.0568
				707.1846 [2M-H] ⁻	353.0850, 191.0568
				191.0550	111.0362
				451.0571	191.0569
3	Chlrogenic acid	23.2	314	707.1846 [2M-H] ⁻	353.0850, 191.0568
				353.0860	191.0550
4	Not identified	23.7	327	267.0462	133.0260, 105.0163 161.0331
5	Caffeic acid	24.6	323	179.0318	135.0436
6	kaempferol-3-O-acetylglucoside	25.4	278	489.1051	284.0296, 285.0397
7	anthocyanins	25.6	230/278	533.0954	285.0397
8	(Rutin – H ₂ O)	26.6	328	591.0993	179.0314, 133.0121
9	Quercetin-3-O-glucuronide Quercetin-7-O-galactoside	30.4 30.3	268/354	477.0681	301.0340
				463.1013	349.6627, 301.0341 151.0082
10	kaempferol-3-O-hexoside	31.1	343	447.0955	285.0378
11	Kaempferide-3-O-(6''-O-malonyl)- glucoside Quecetin-7-O-(6''-O- acetyl)glucoside ou quercetin acetyl- hexoside	31.3 31.4	348	549.0716	505.0978, 376.9746 335.9413, 301.0332
				505.0961	301.0334, 285.0289
12	3,4-dicaffeoylquinic acid	32.5	327	515.1193	353.0796, 335.0701
					173.0454, 179.0331
					191.0444, 135.0446
13	Caftaric acid Not identified	33.6 33.6	328 329	311.0392	179.0348, 149.0054
				495.0540	135.0394, 201.0149 179.0333, 149.0054
14	Amentoflavone Not identified kaempferol-3-O-alonylglucoside	34.3 34.5 34.7		537.1033	493.1311, 447.1263 375.0685, 335.0752
				353.0864	284.0323
				533.0982	191.0541, 135.0468 113.4116
15	kaempferol-3-O-acetylglucoside	34.7		489.1035	447.1081, 284.0304285.0348

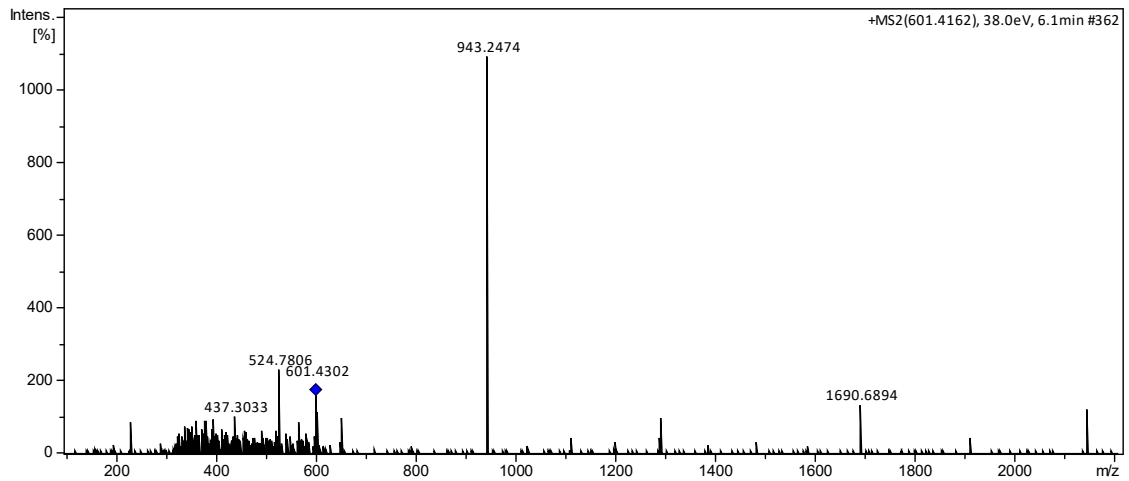
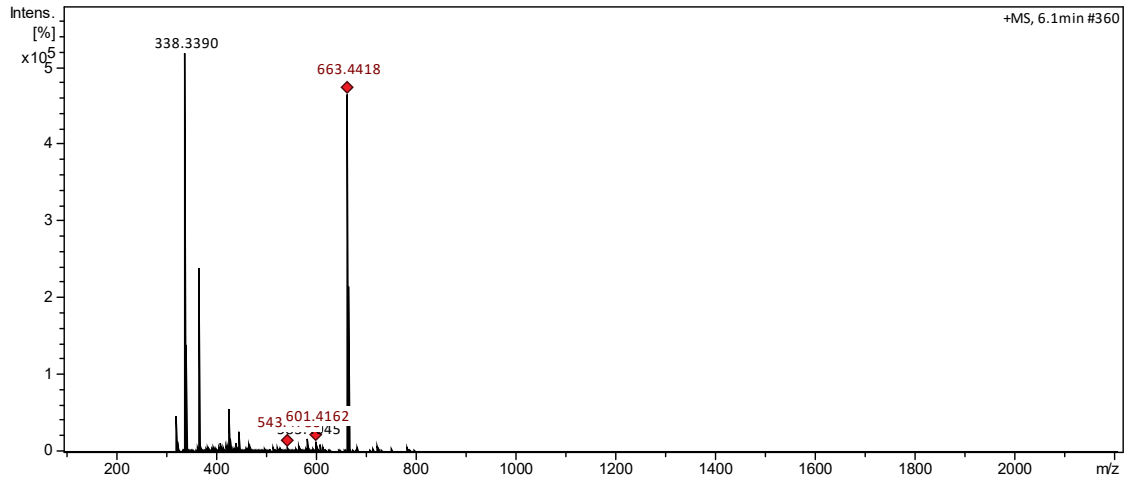
Table 3 - Anthocyanins present in red lettuce by HPLC-PDA-MS/MS.

Peak	Identification	Rt (min)	UV λ máx (nm)	m/z [M-H] ⁺	MS ²
1	Cyanidin 3-glucoside	17.5	329/521	449.0947	287.0502
2	Cyanidin 3-laminaribioside	18.2	286/329/521	611.1586	287.0550
	Cyanidin 3,5- diglucoside	18.3	334/523	535.1063	287.0553
	Delphinidin 3-glucoside	18.5		465.1026	303.0540
3	Cyanidin-3-p-coumaroyl-glucoside trans	19.6	330/525	595.1650	287.0546
	Cyanidin 3-glucoside	20.0		449.1073	287.0554
	Cyanidin 3-(3''-malonoyl) glucoside	20.1	345/523	535.1065	287.0557
	Delphinidin-3-glucoside	20.2		463.8662	287.0559
	Delphinidin 3-(malonoyl) glucoside	20.6	346/526	551.1015	303.0496, 303.0502
4	Cyanidin 3-(6''-succinyl) glucoside	21.6	330/524	549.1220	287.05151

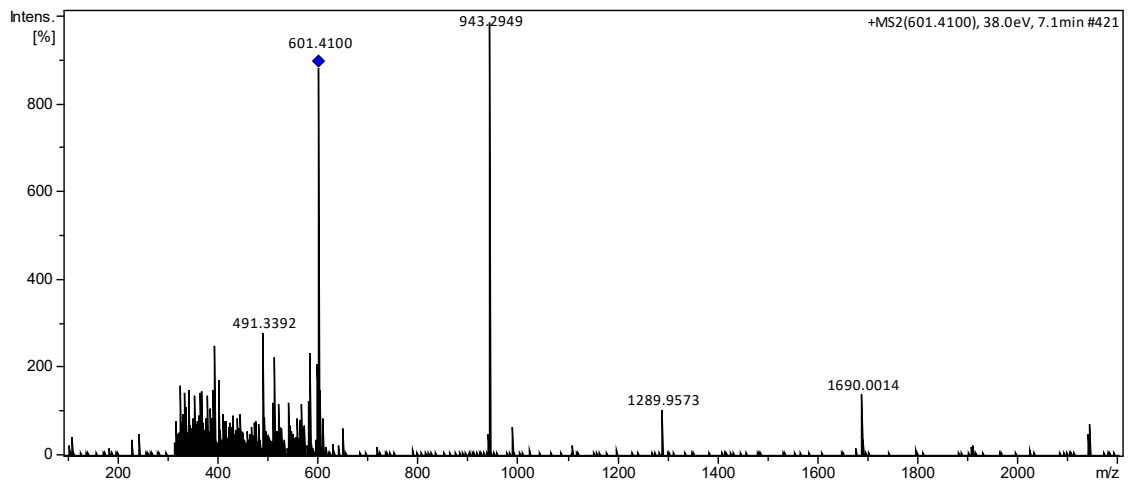
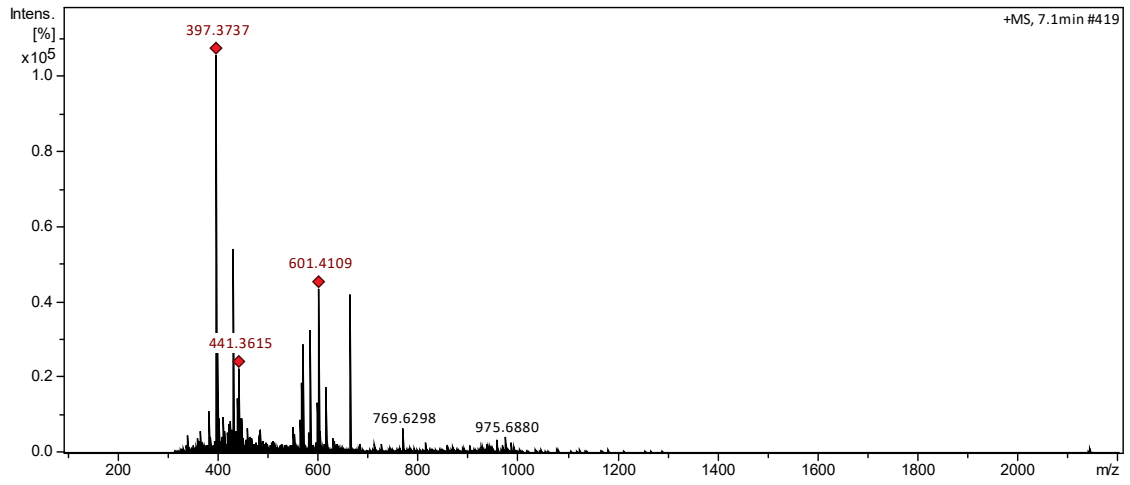
Mass spectra of red lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars

1. Mass spectra of red lettuce carotenoids

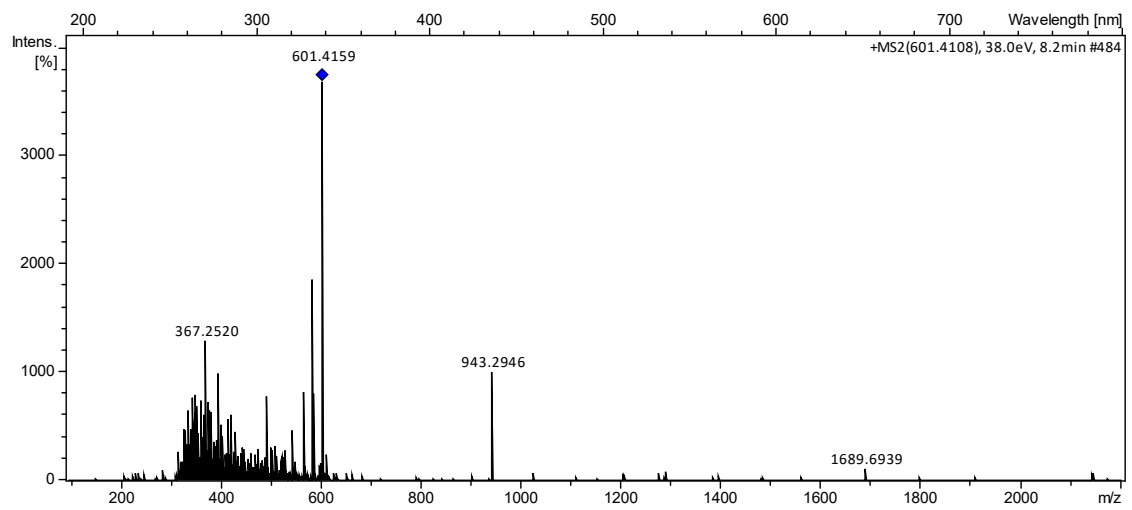
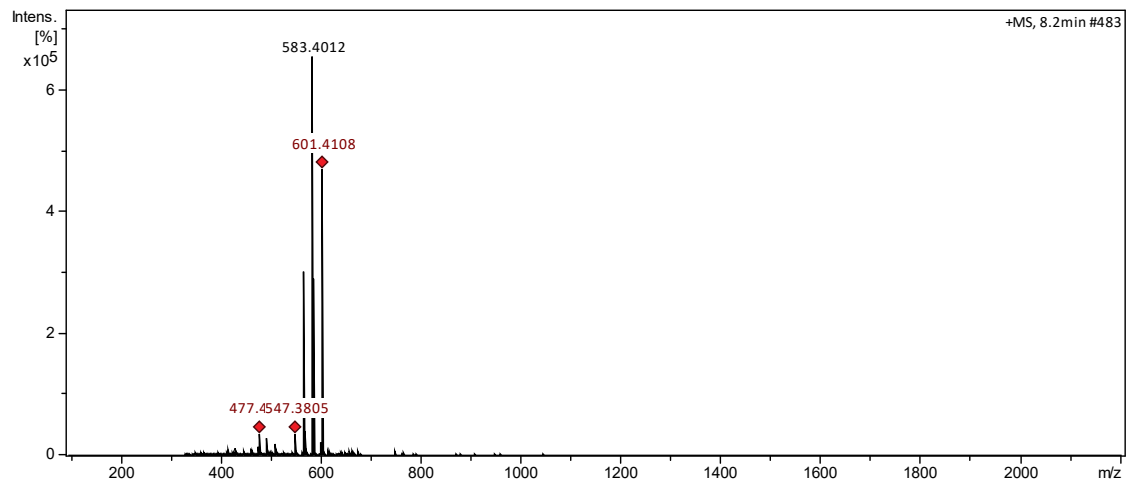
Peak 1 – (di-Z) violaxanthin



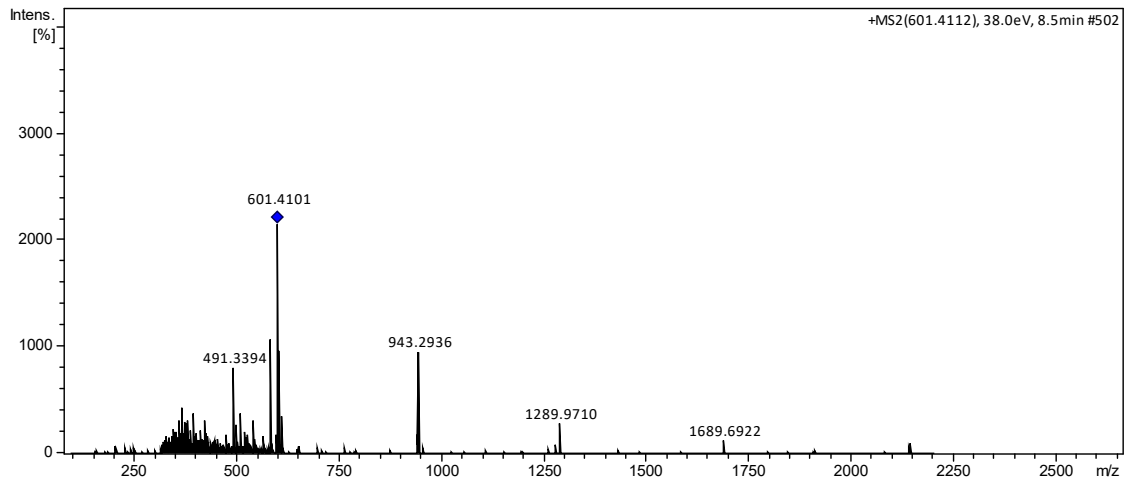
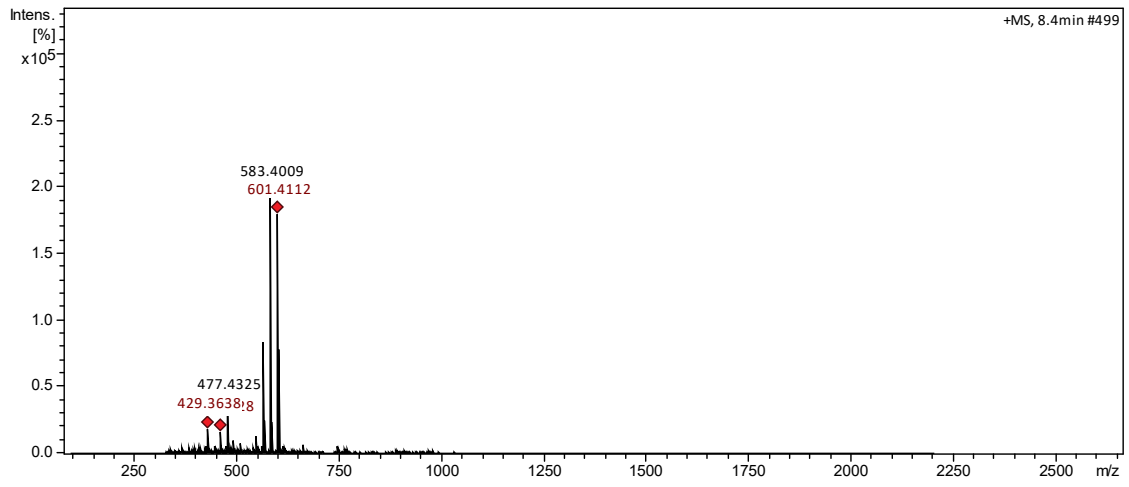
Peak 2 - (all-E)-violaxanthin



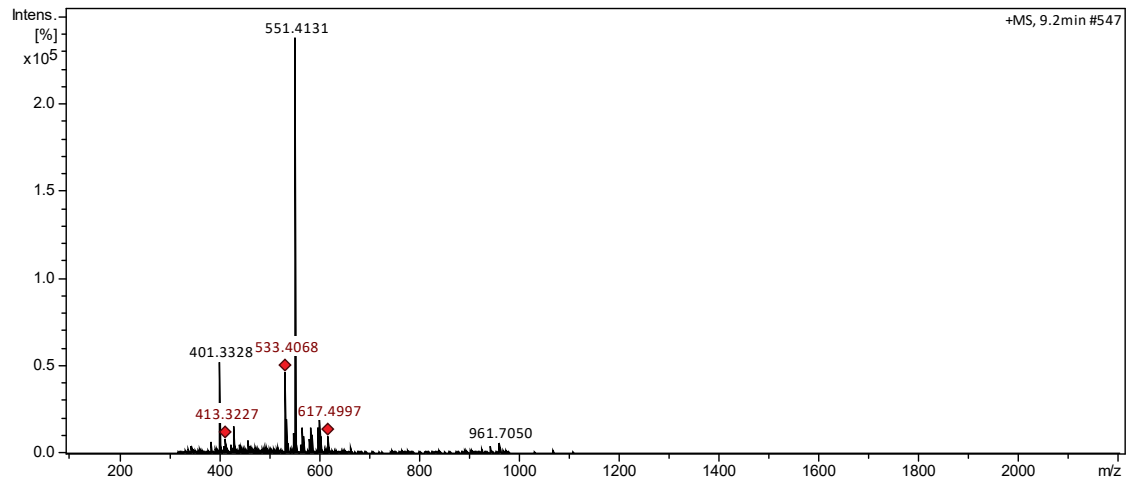
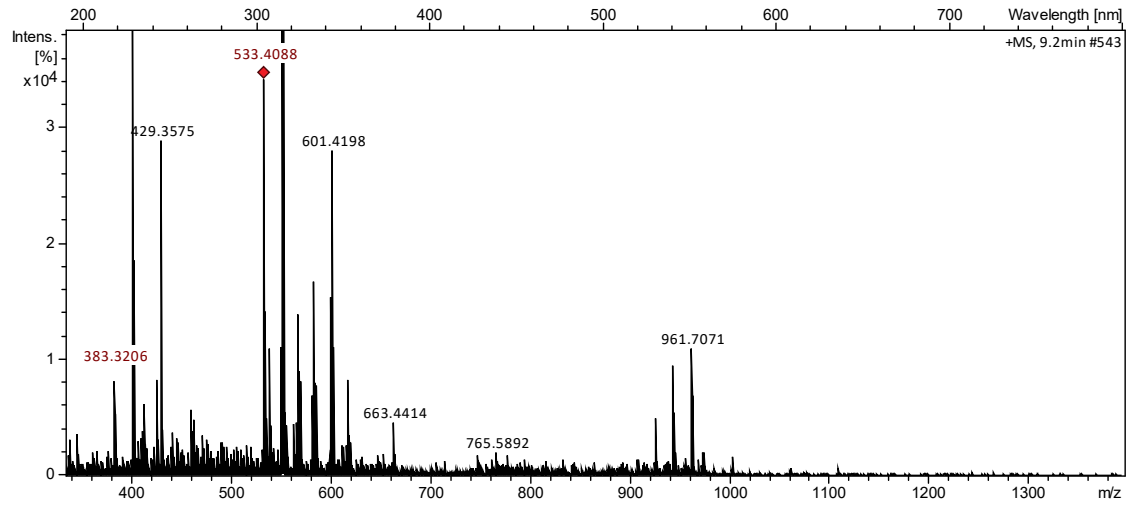
Peak 3 - (9-Z)-violaxanthin



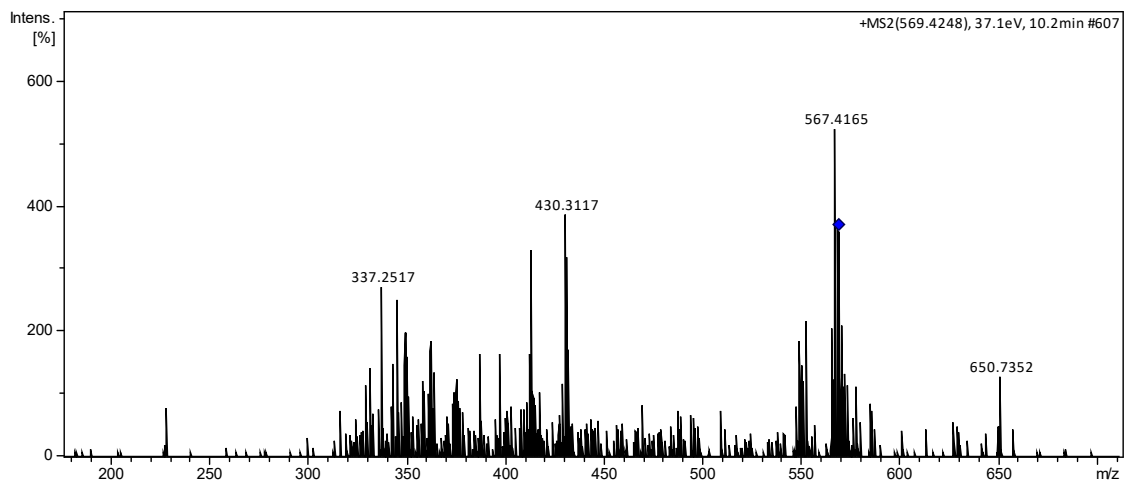
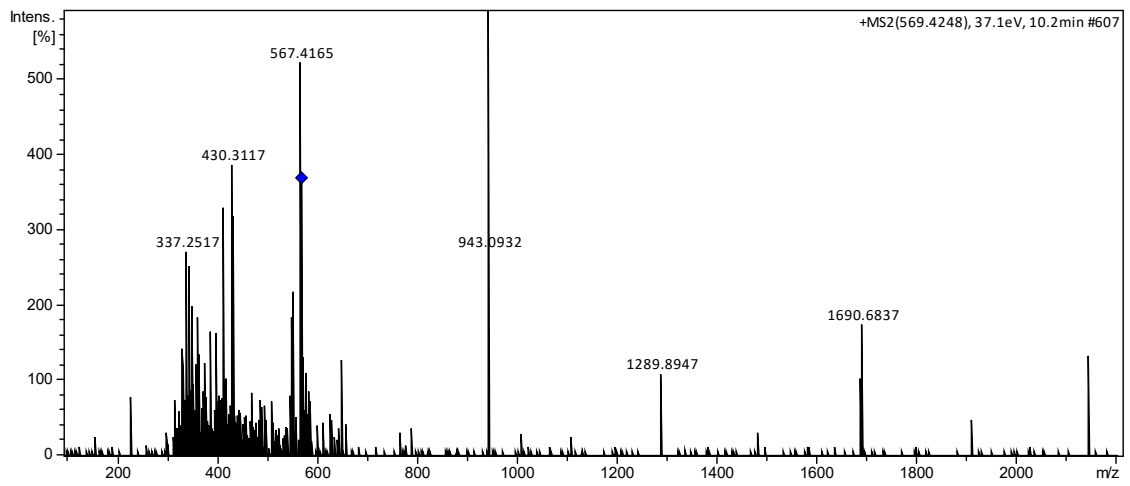
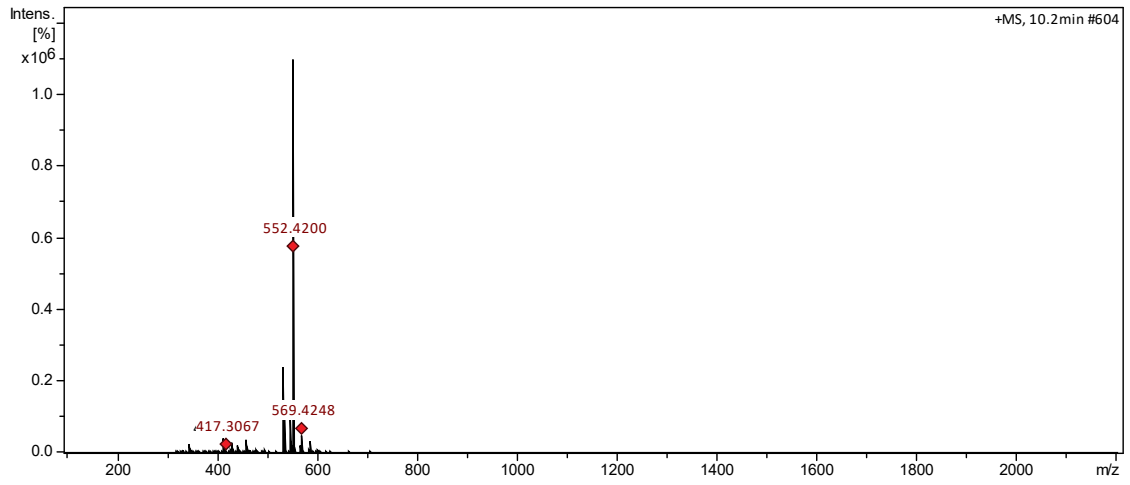
Peak 4 - (all-E)-luteoxanthin



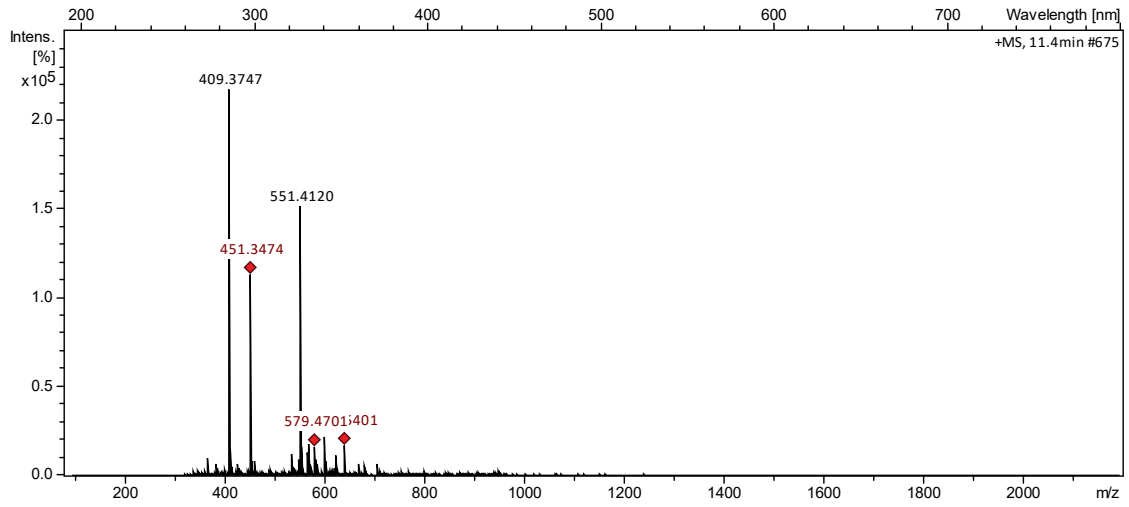
Peak 5 - not identified



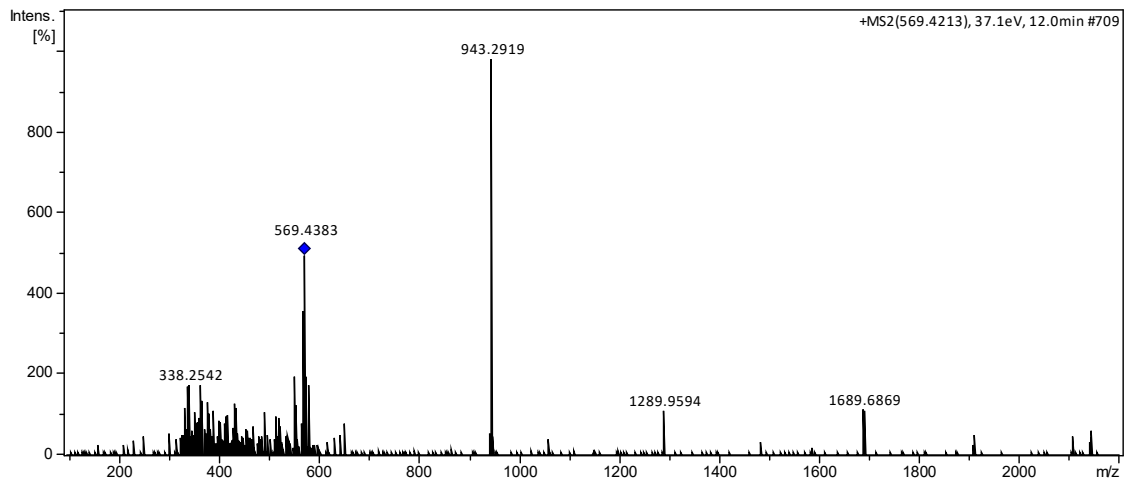
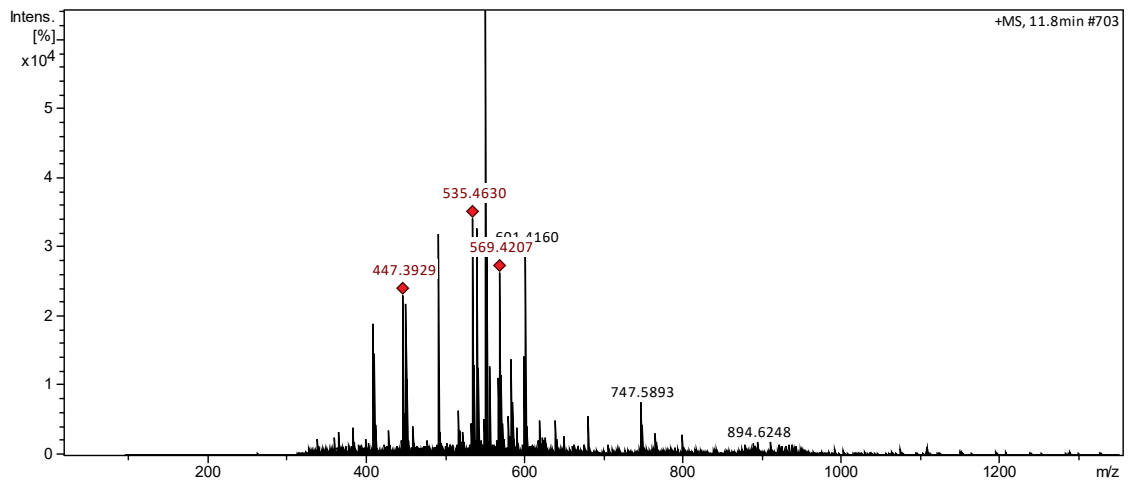
Peak 6 - (all-E)-lactucaxanthin



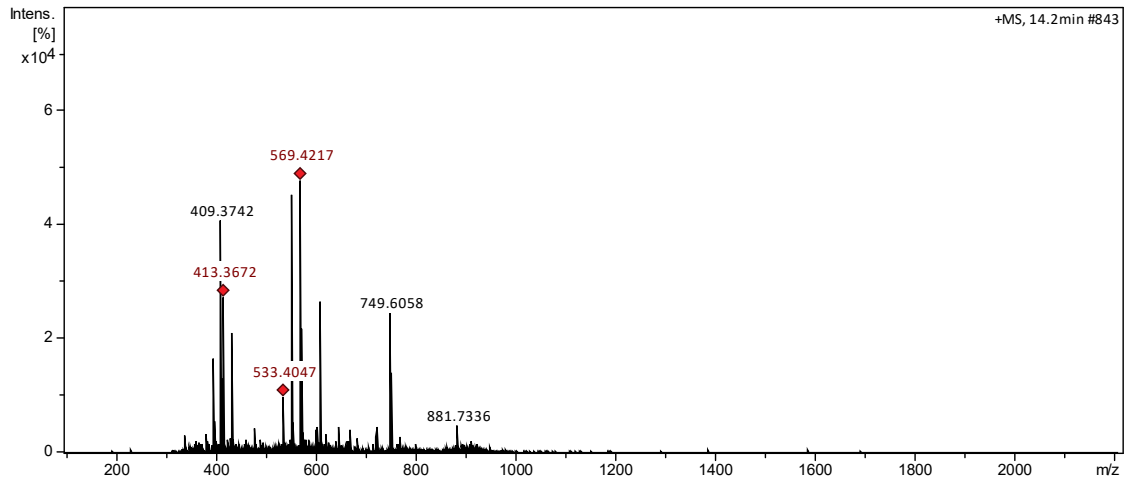
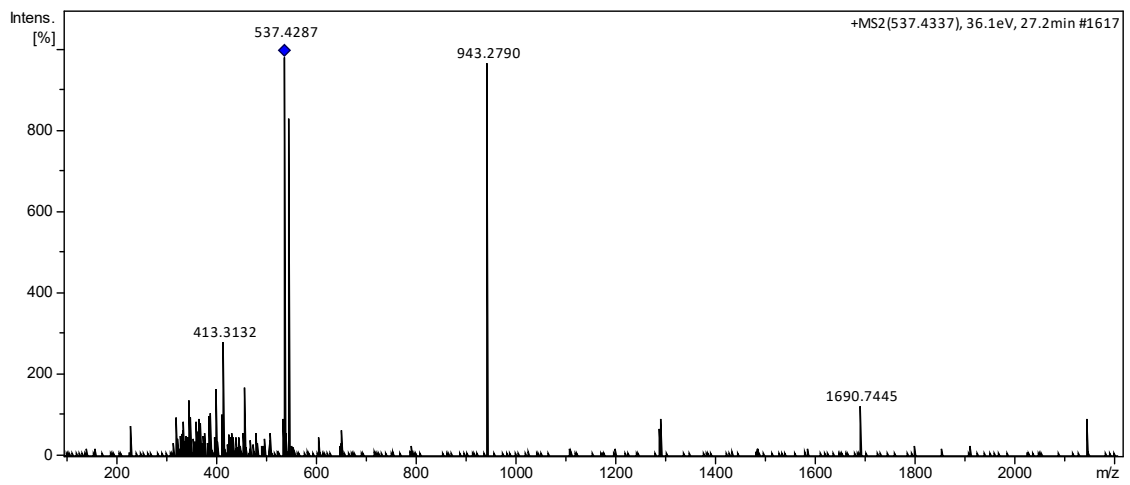
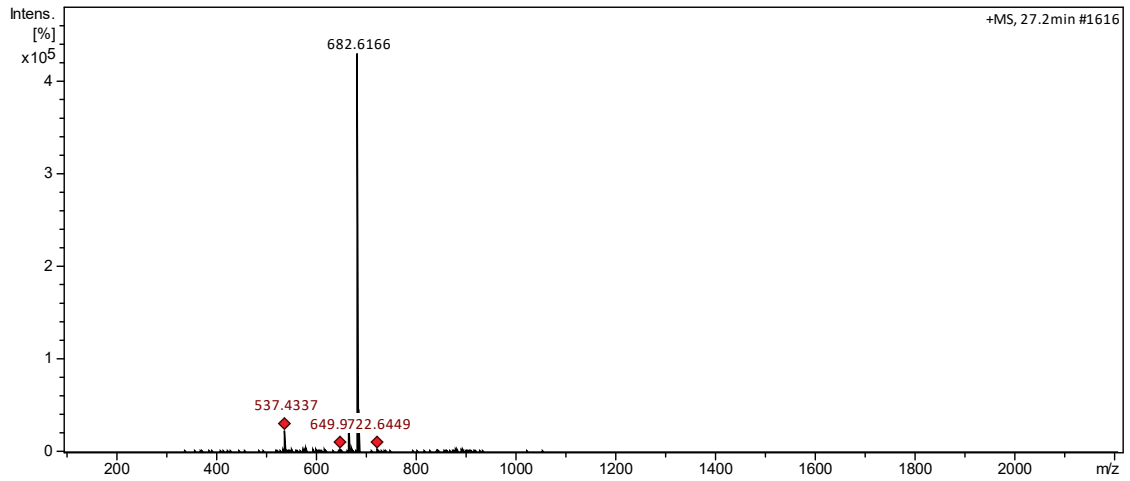
Peak 7 - (13-Z)-lutein and/or (13'-Z)-lutein



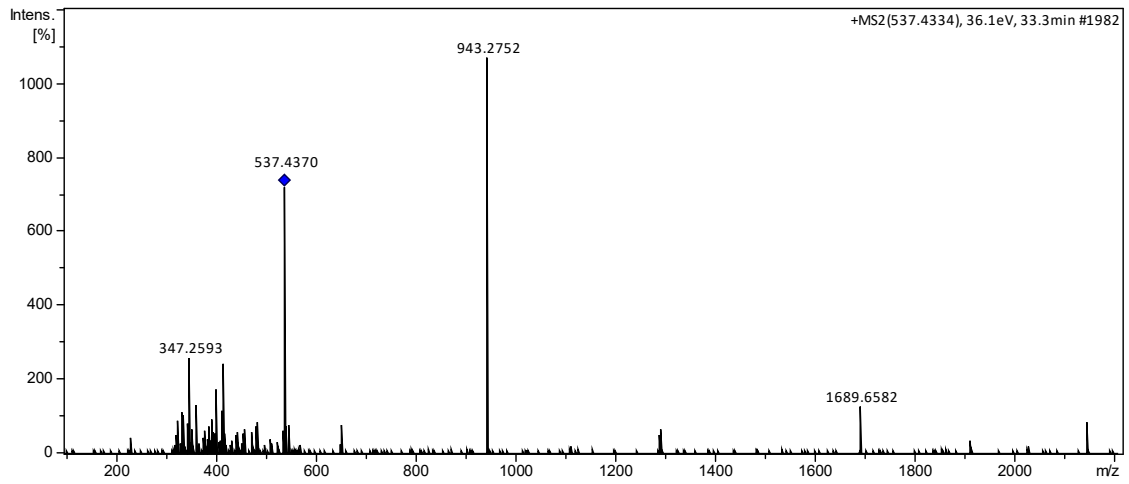
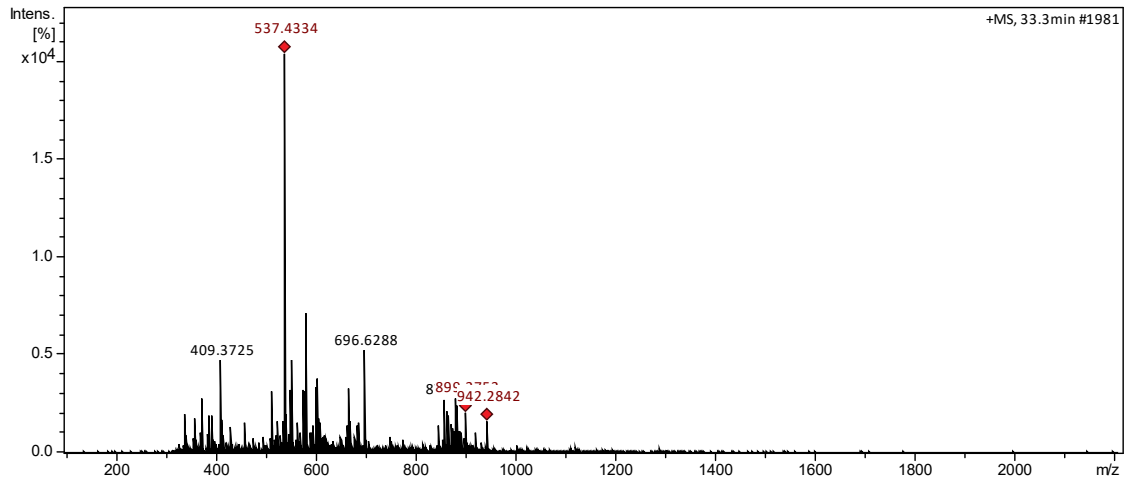
Peak 8 - (all-E)-lutein

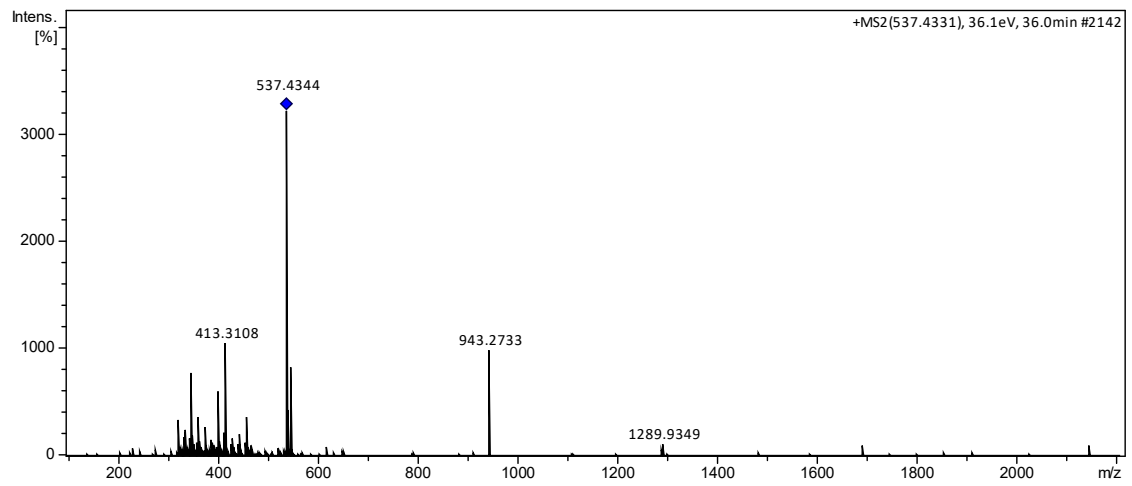
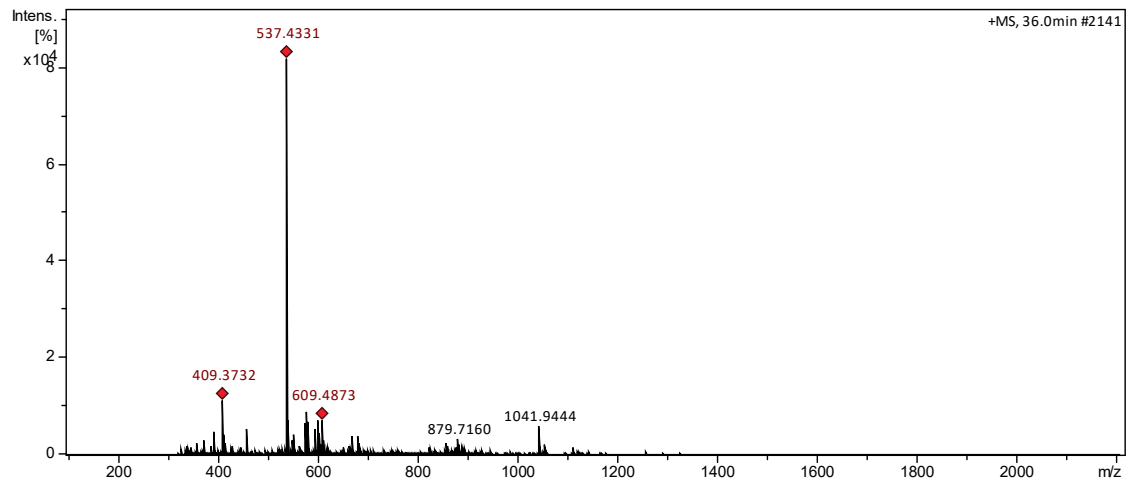


Peak 9 - (all-E)-zeaxanthin

Peak 10 - (13-Z)- β -caroteno

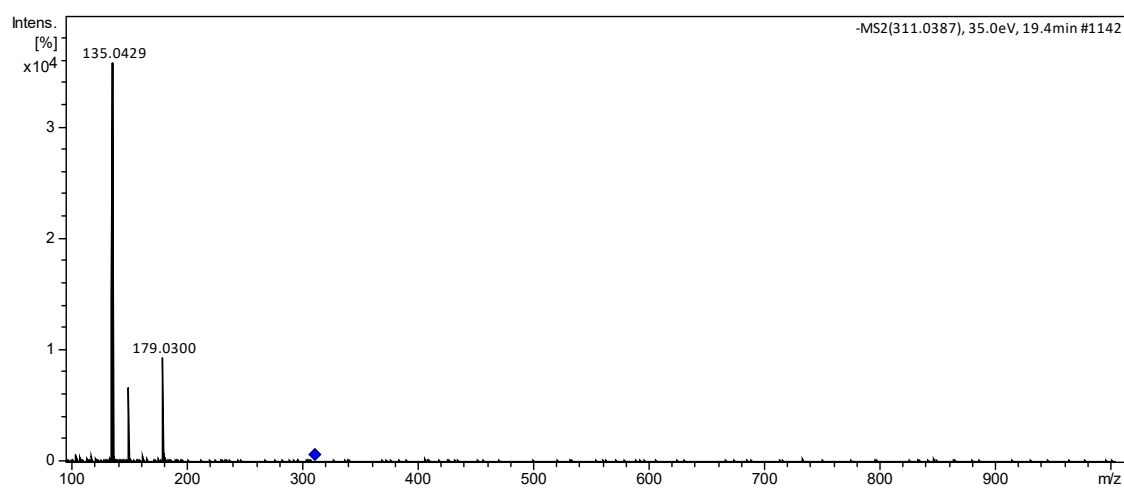
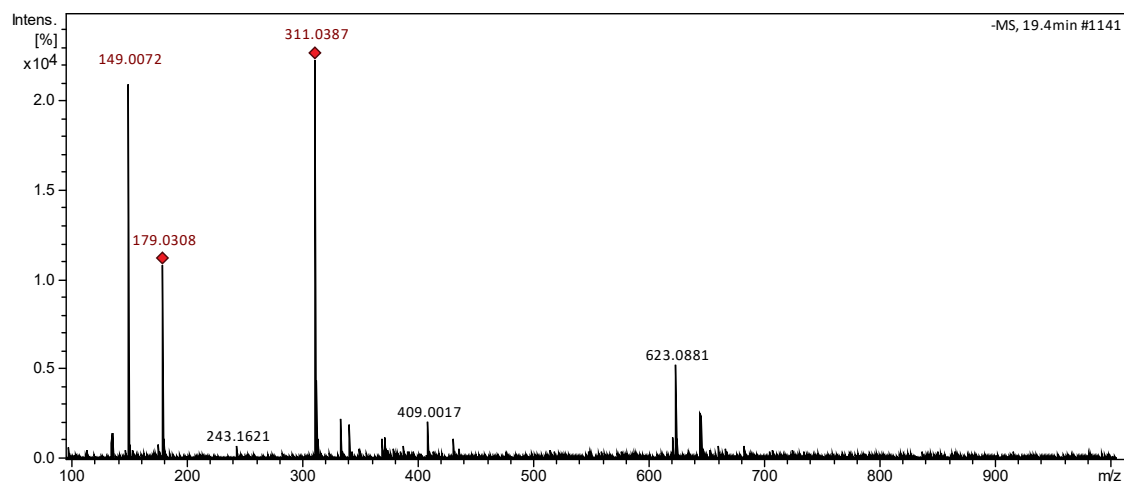
Peak 11 - (all-E)- β -caroteno



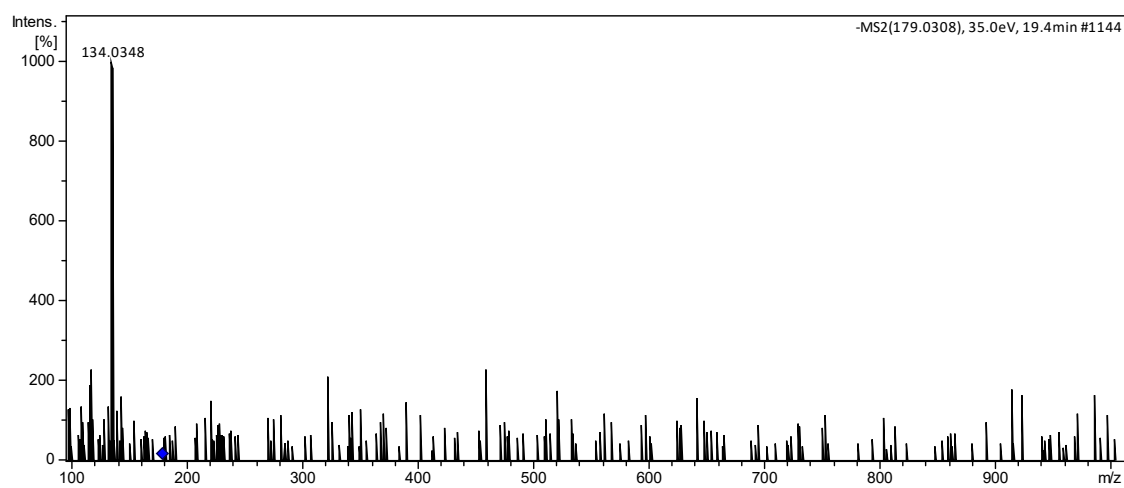
Peak 12 - (9-Z)- β -caroteno

2. Mass spectra of red lettuce phenolics compounds (non anthocyanics)

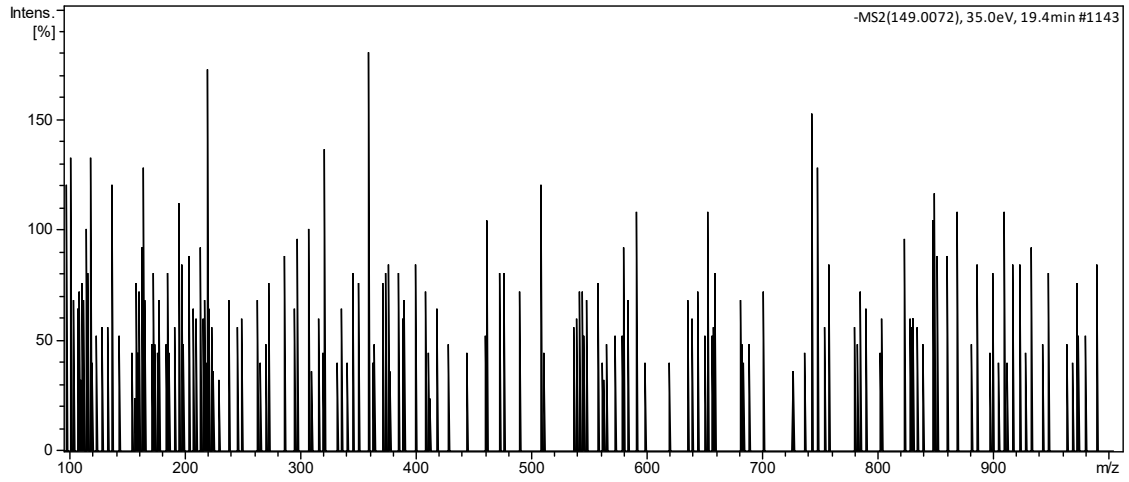
Peak 1 - Caffeyoltartatic acid (Caftaric acid)



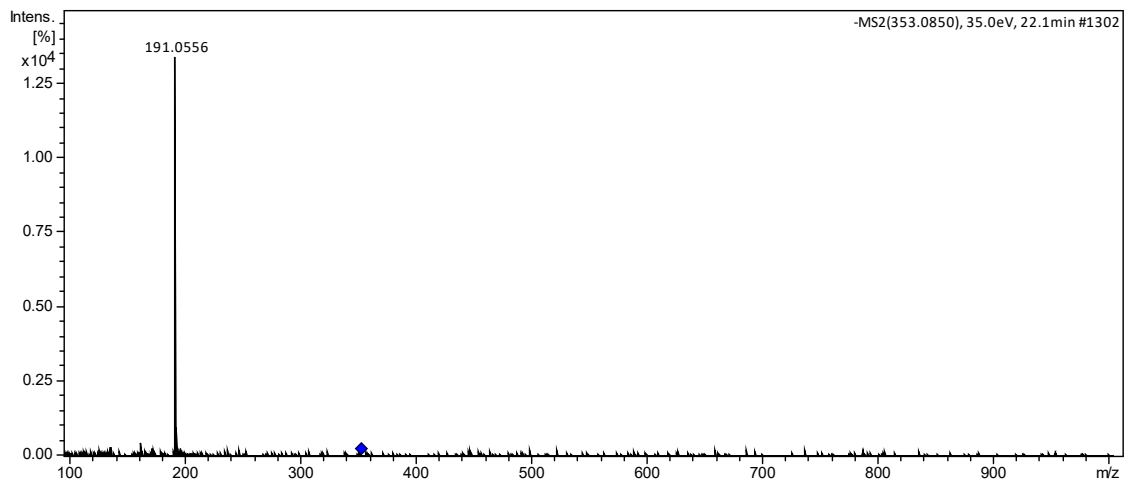
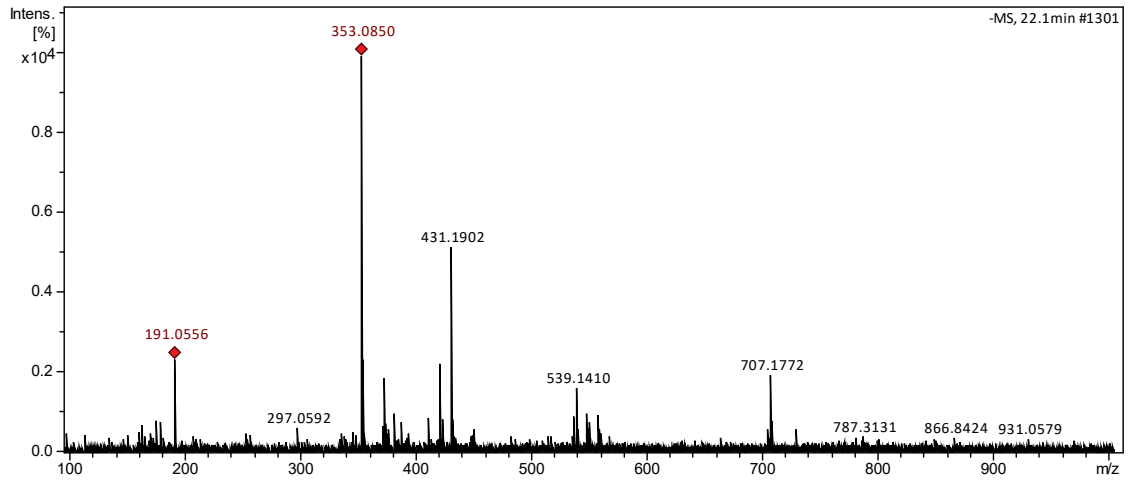
Caffeic acid



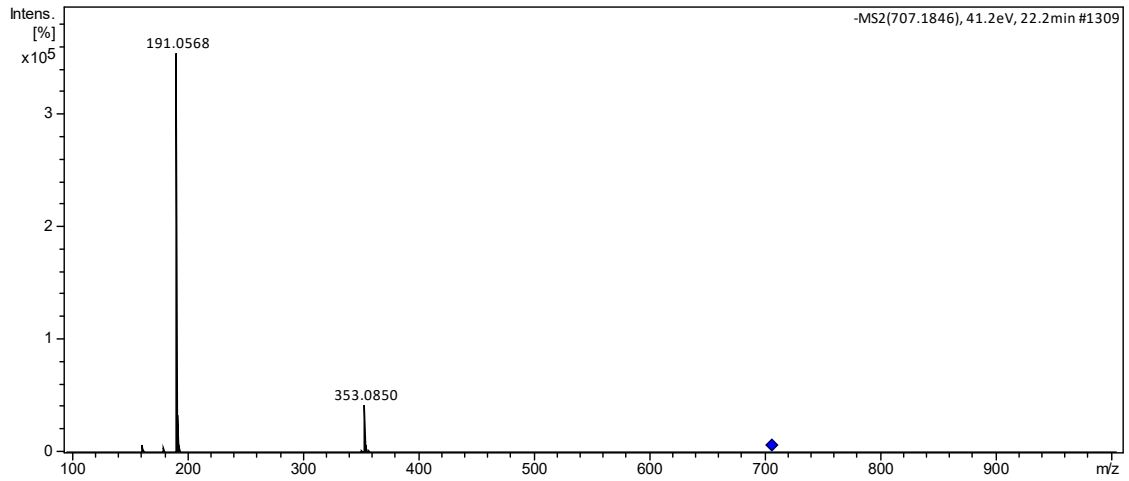
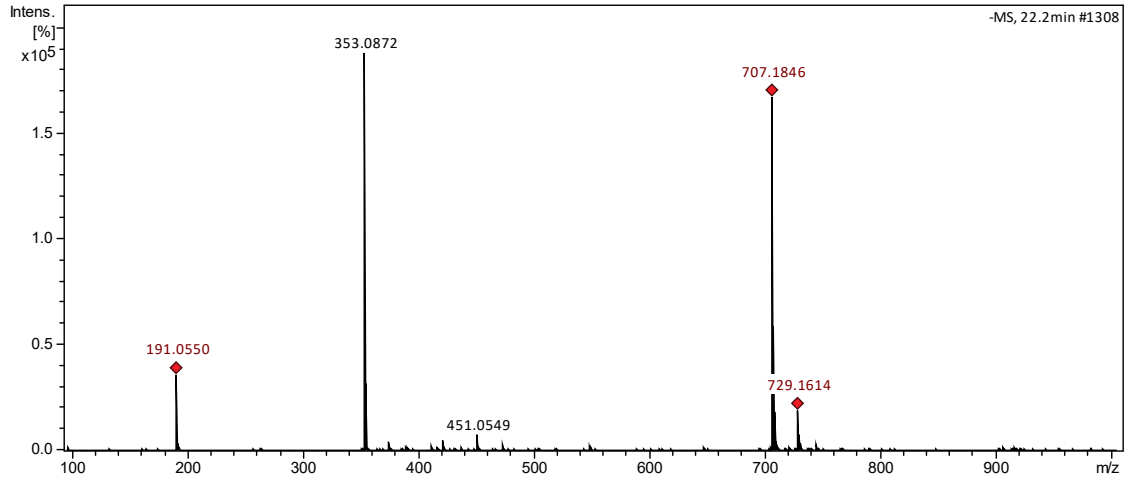
Tartaric acid



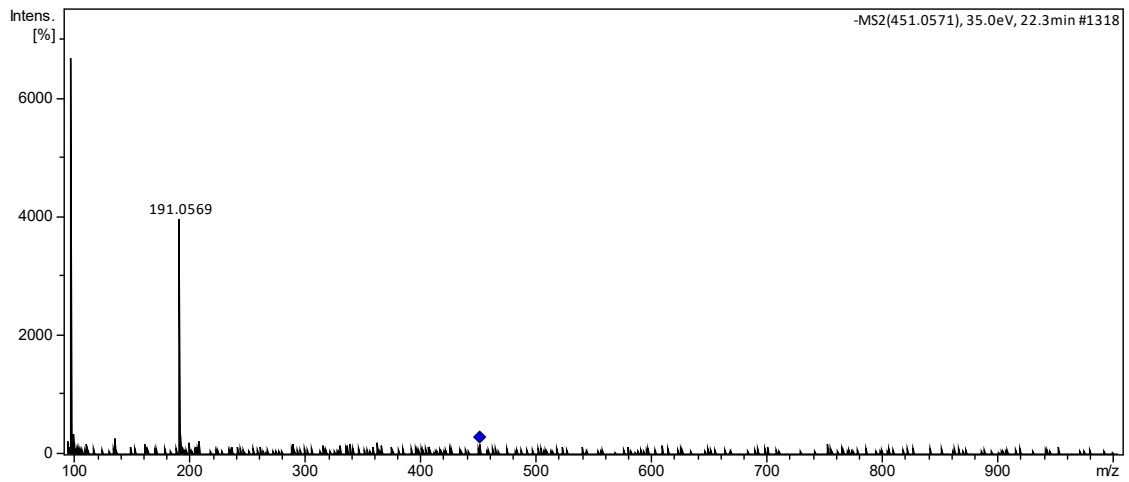
Peak 2 - 5-callfeoylquinic acid

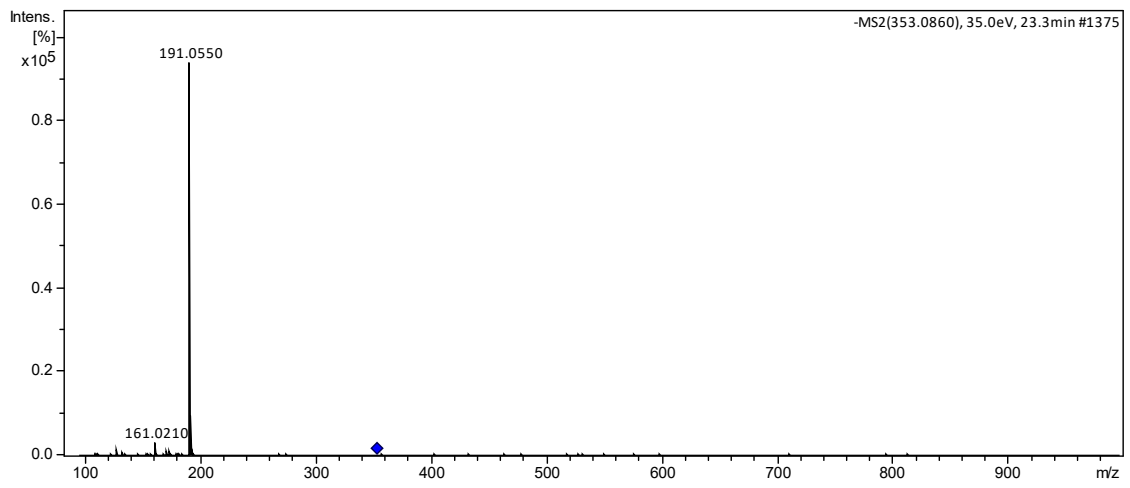
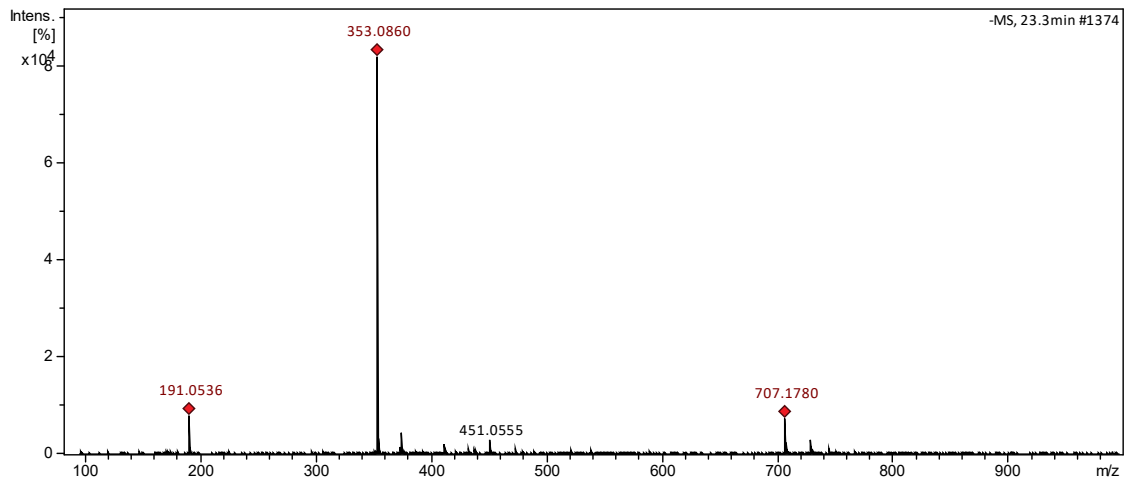


Chlogenic acid

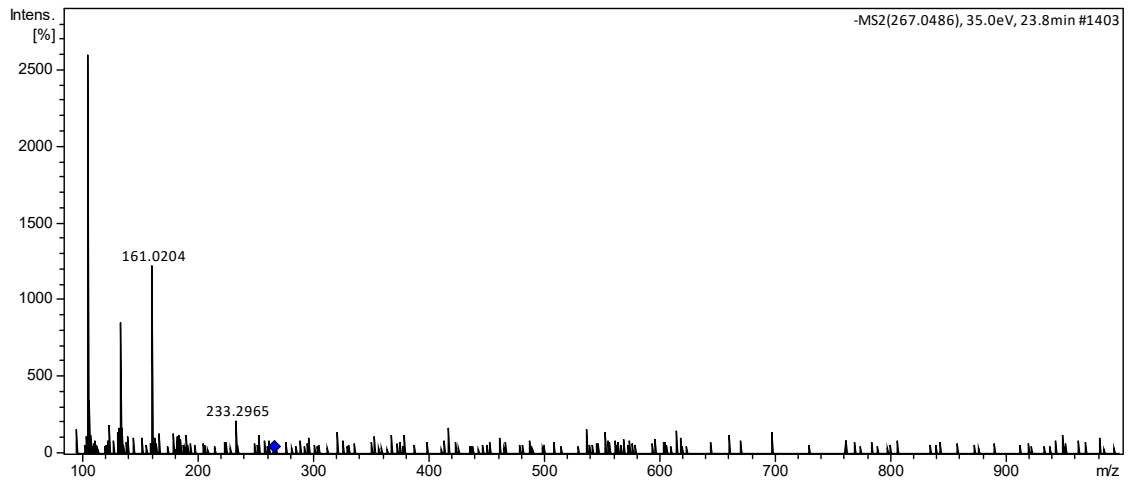
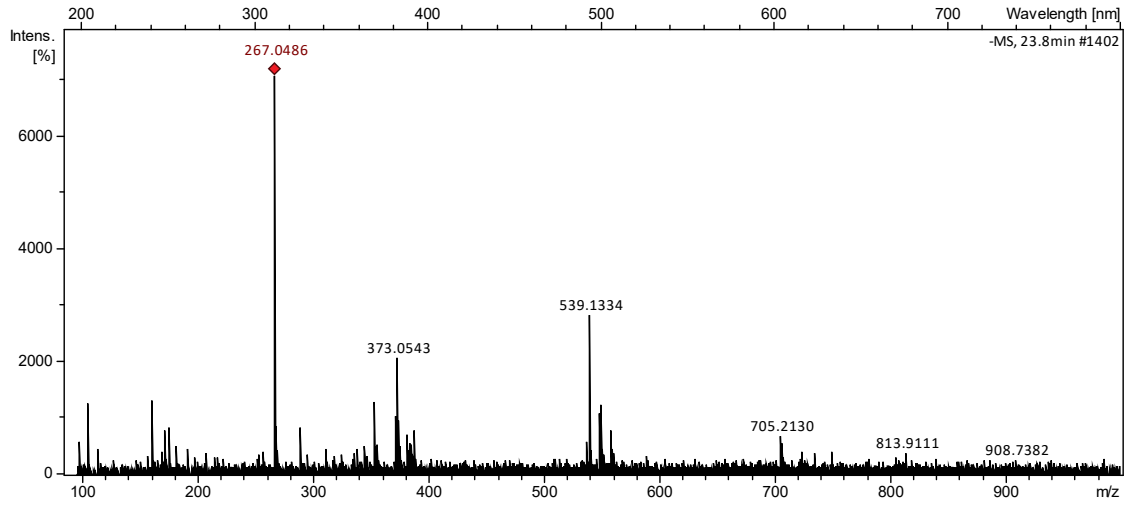


Quinic acid and quinic acid derivative

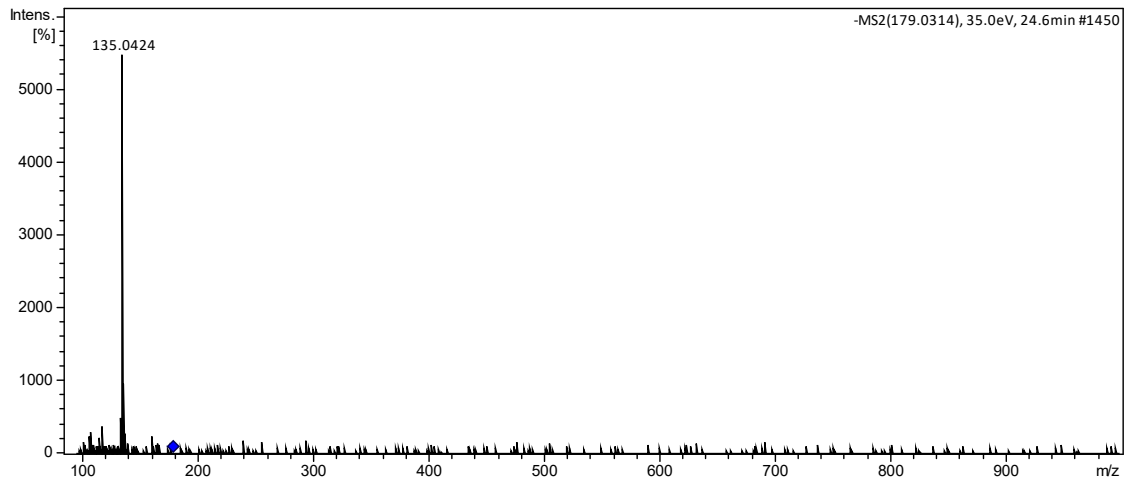
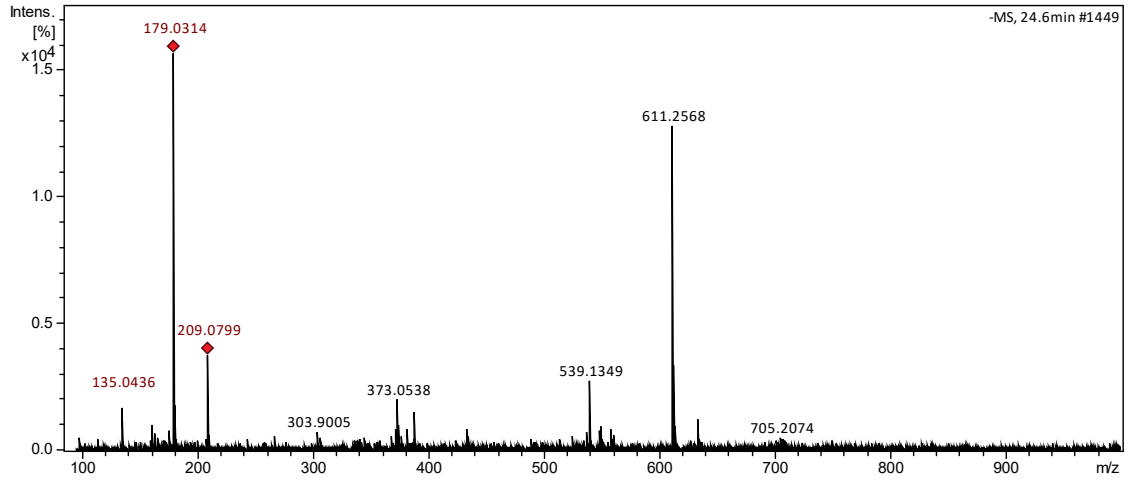


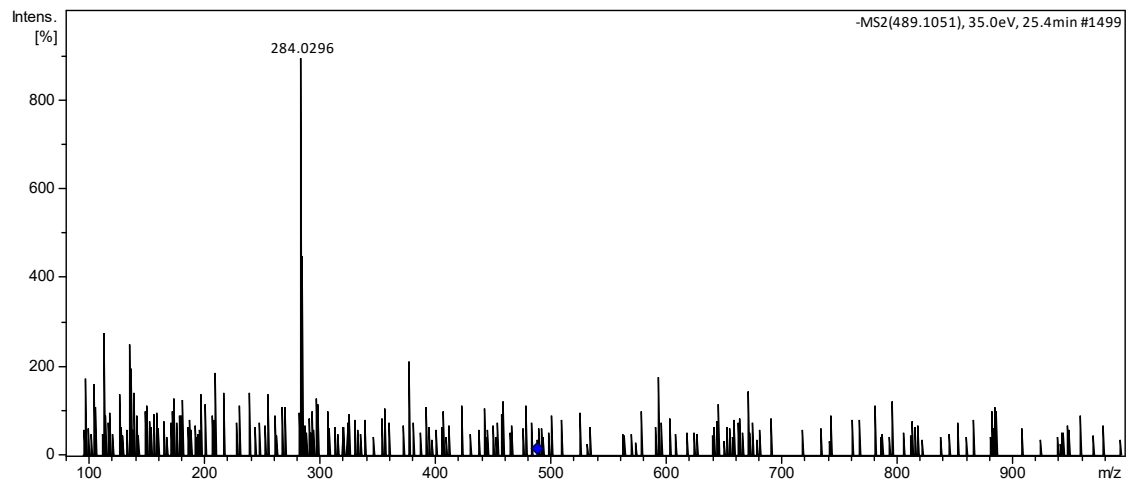
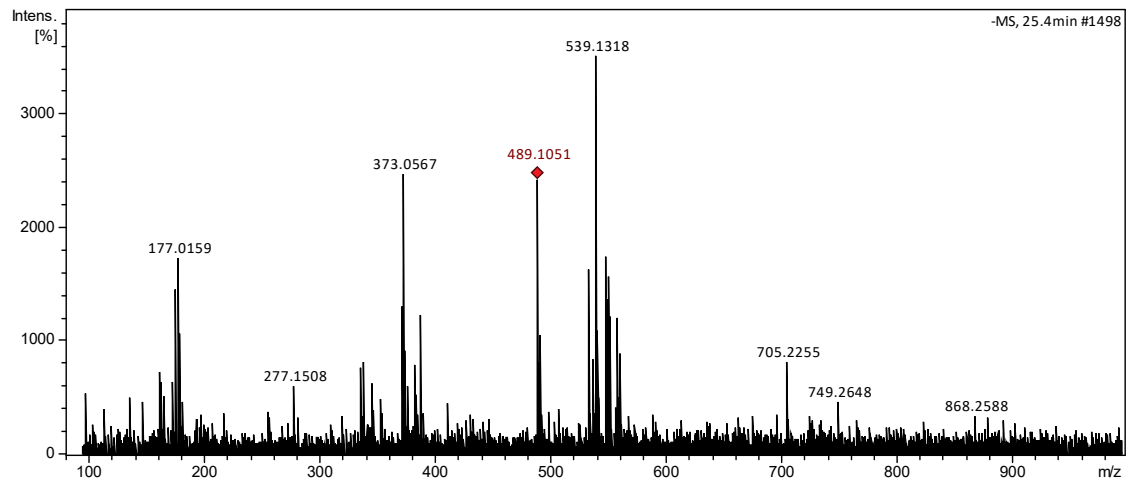
Peak 3 - Chlorogenic acid

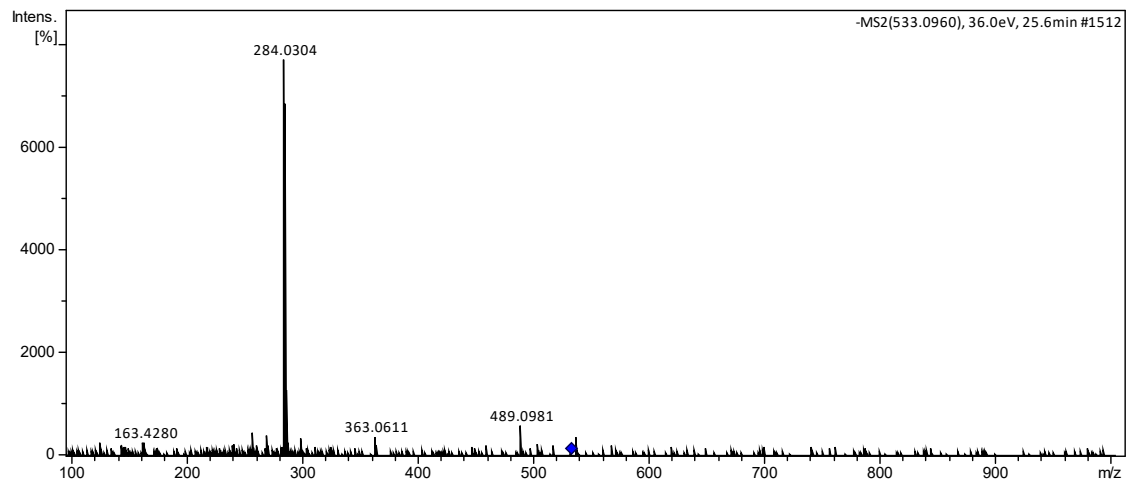
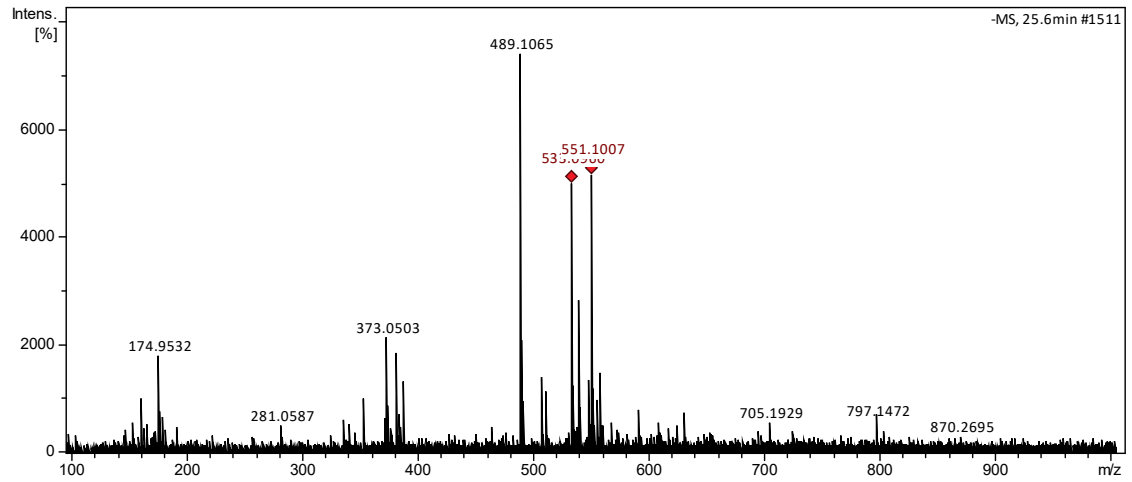
Peak 4 - not identified



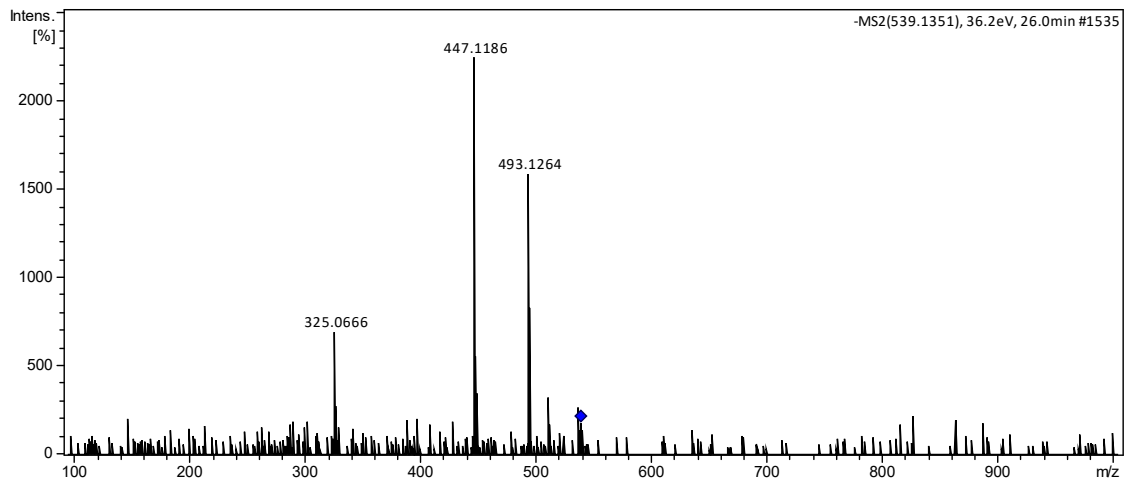
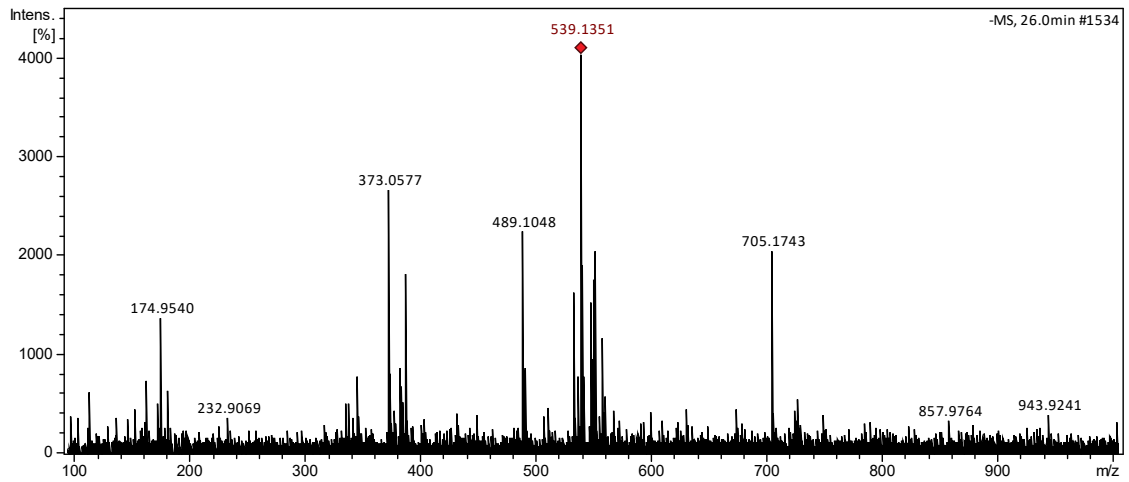
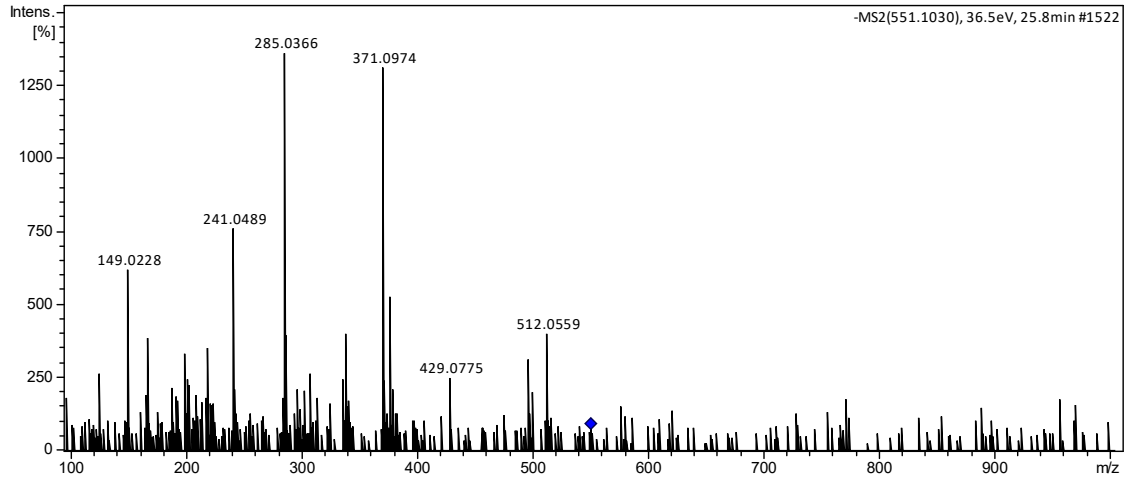
Peak 5 - caffeic acid

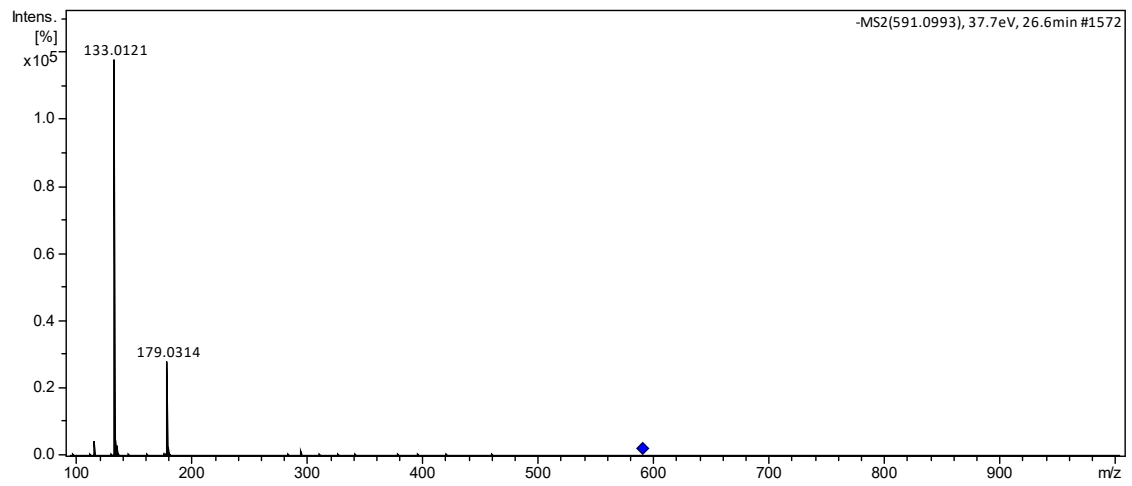
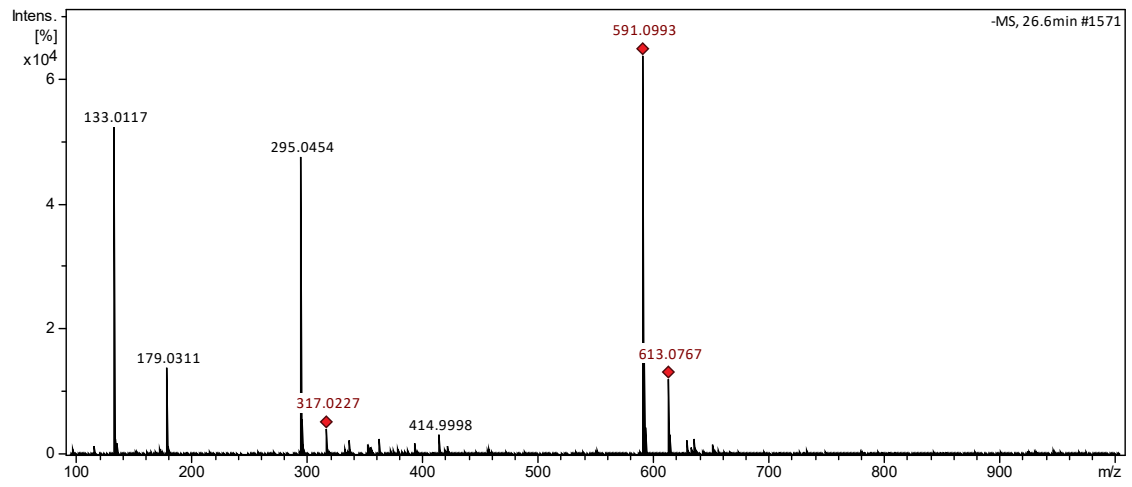


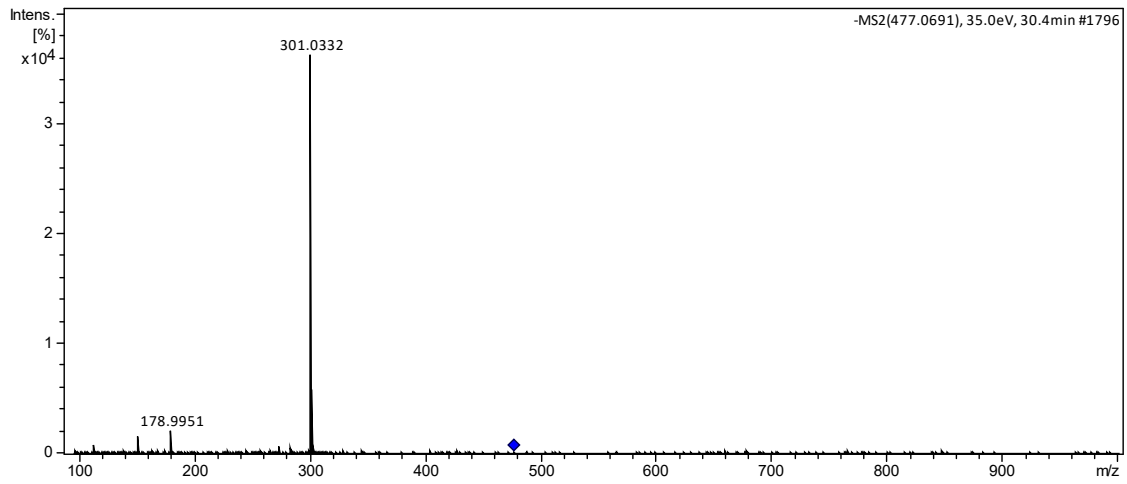
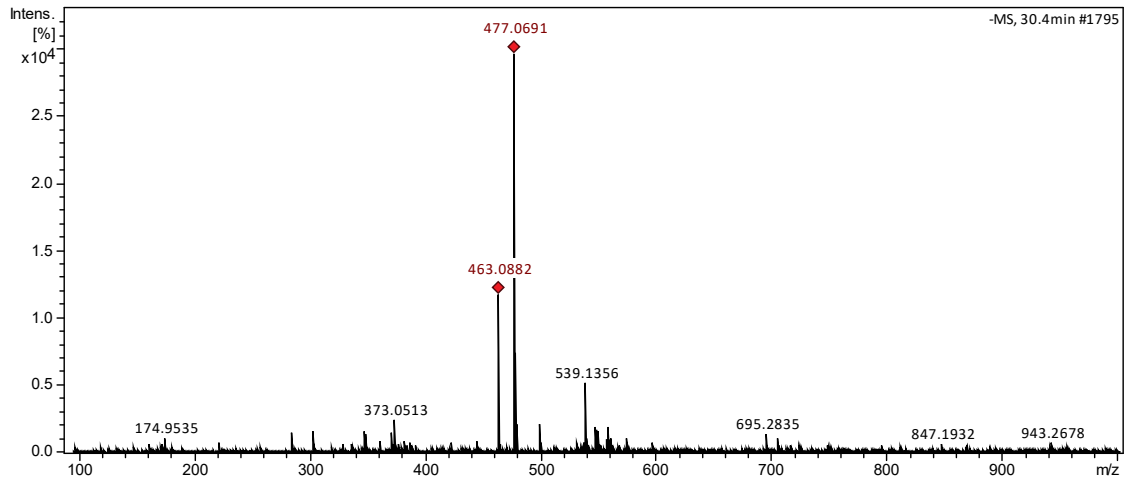
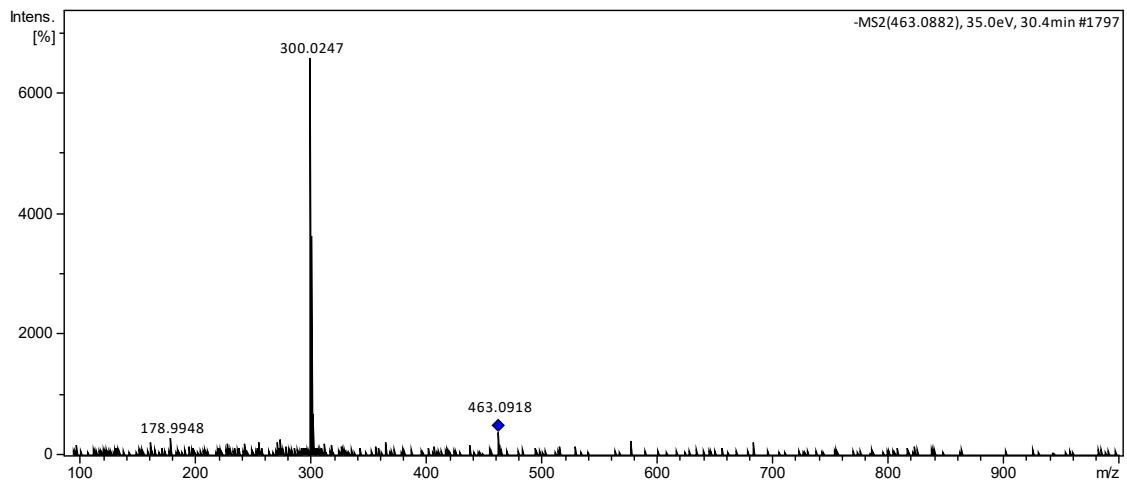
Peak 6 - kaempferol-3-Oacetylglucoside

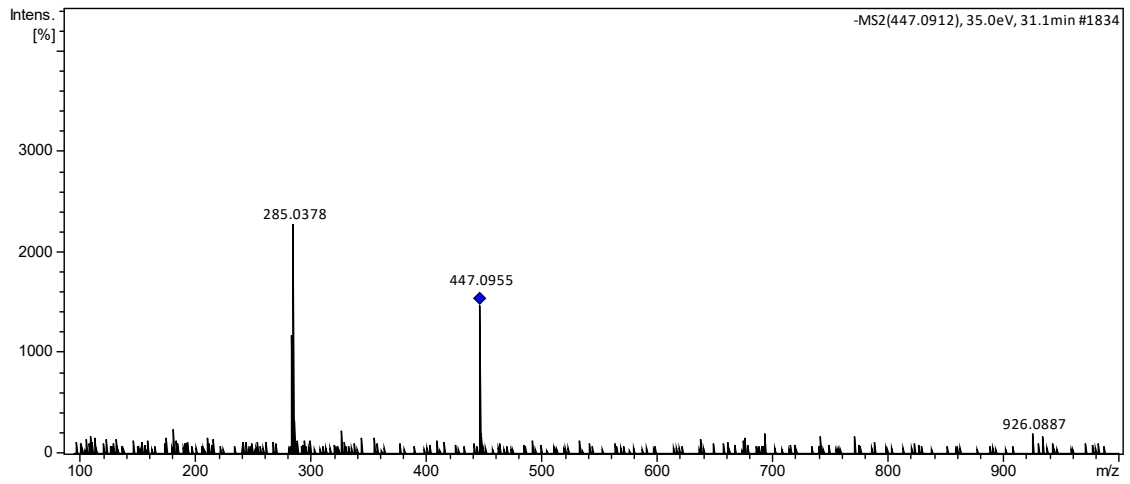
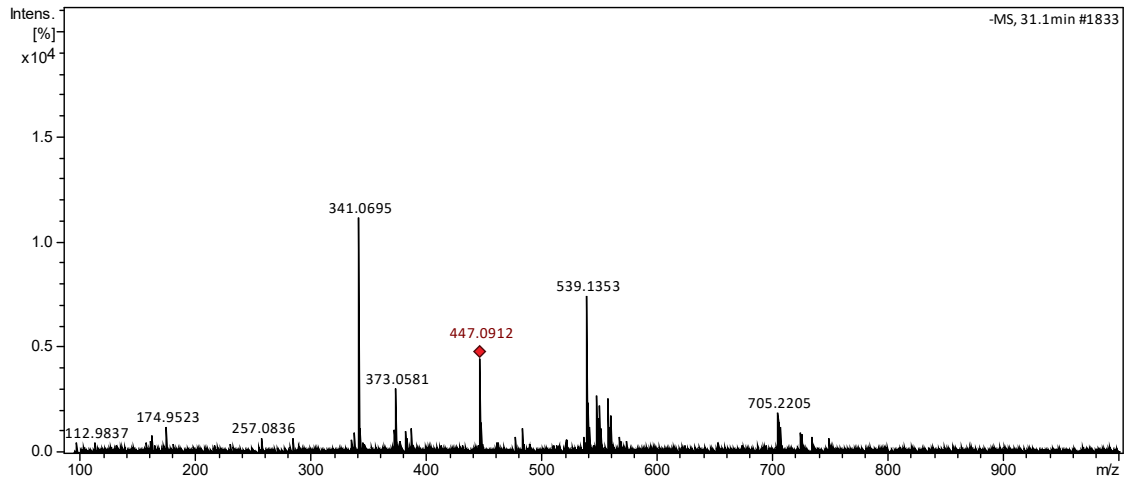
Peak 7 – anthocyanins

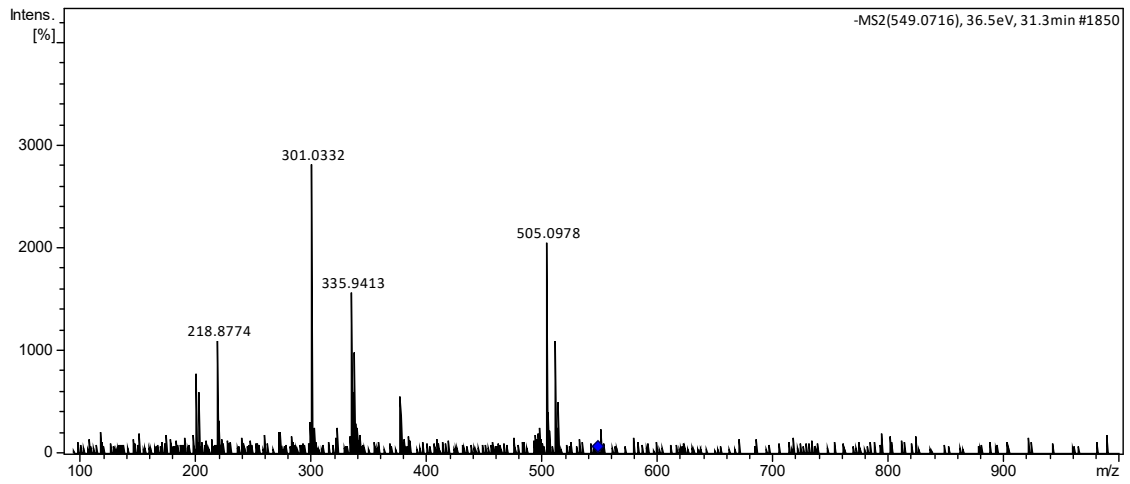
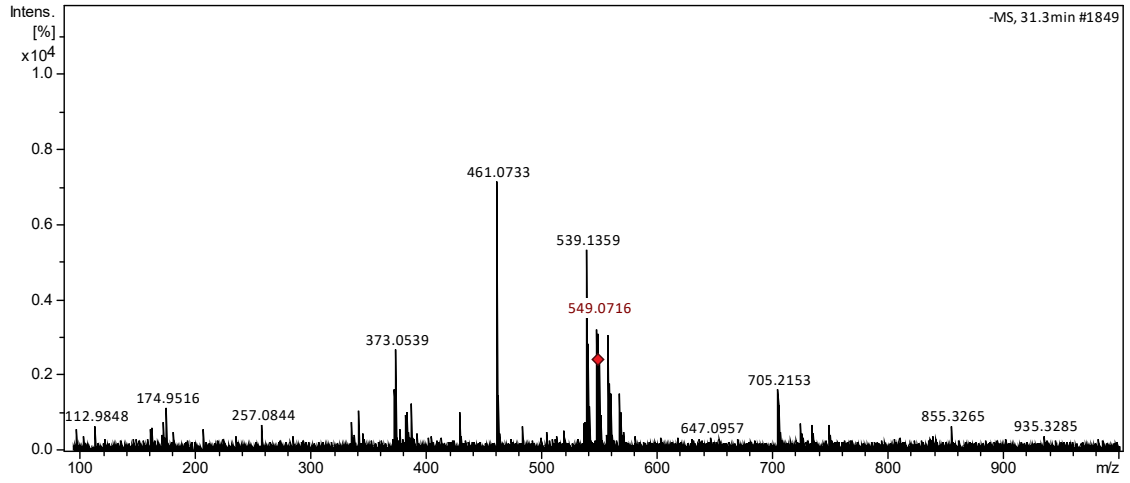
Delfinidina 551



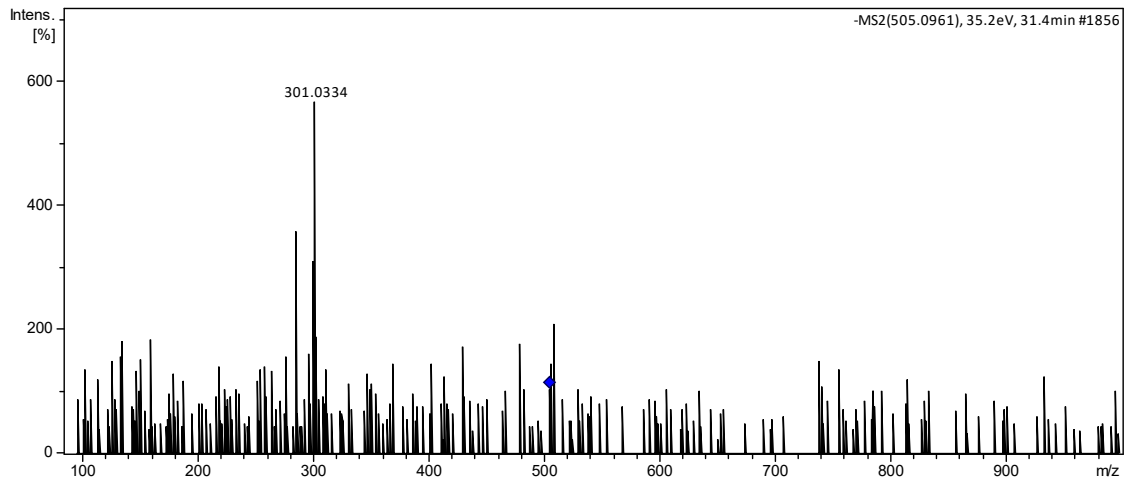
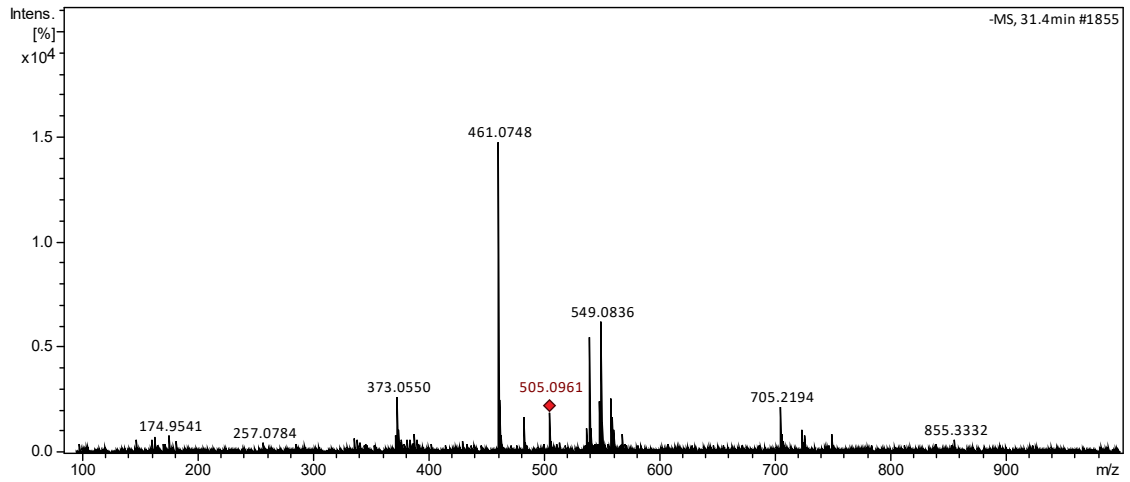
Peak 8 - Rutin – H₂O

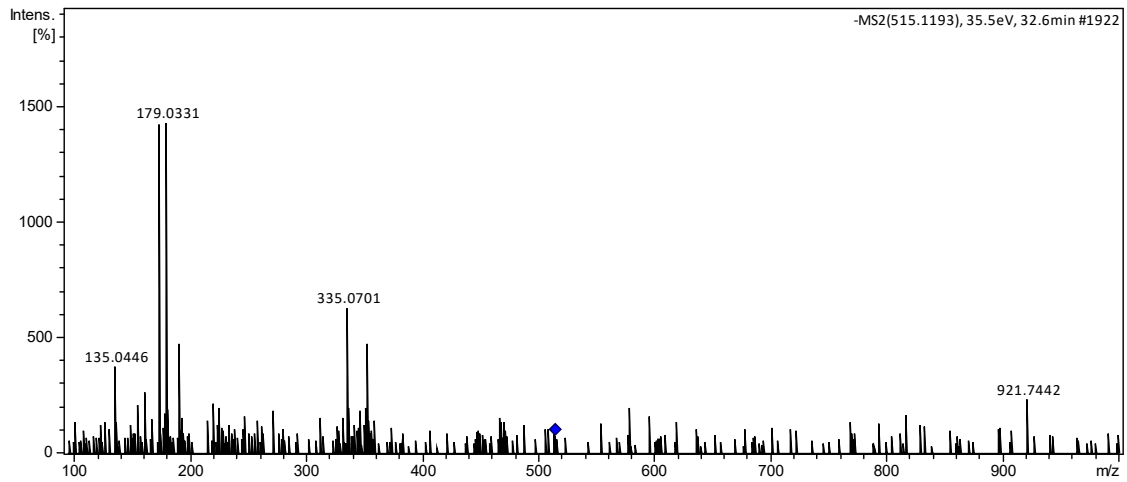
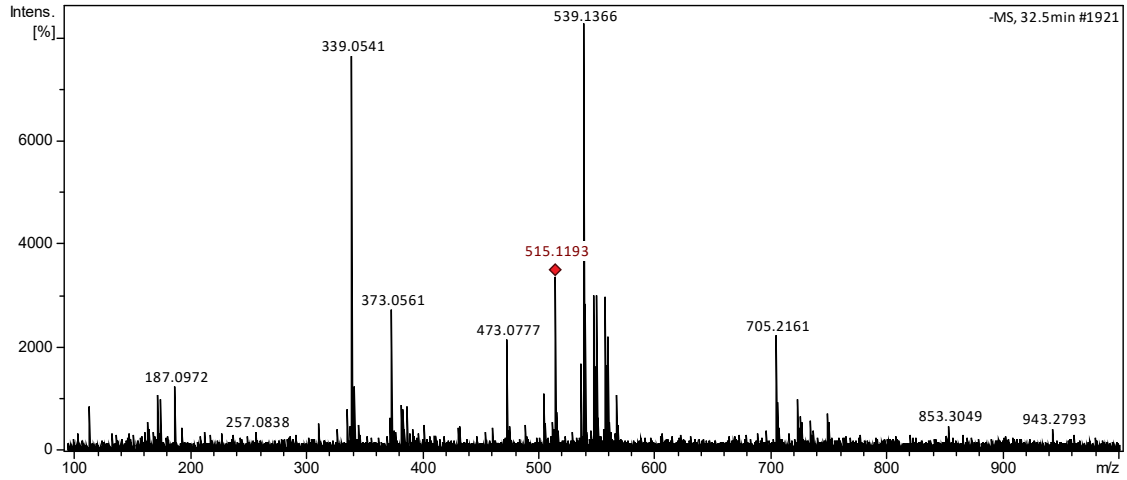
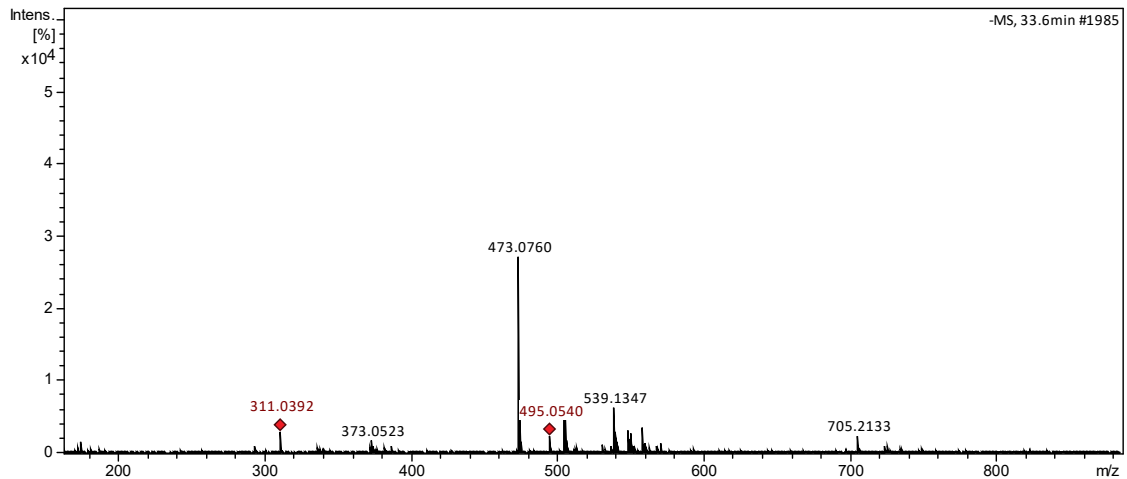
Peak 9 – Quercetin-3-O-glucuronide**Quercetin-7-O-glactoside**

Peak 10 – Kaempferol-3-O-hexoside

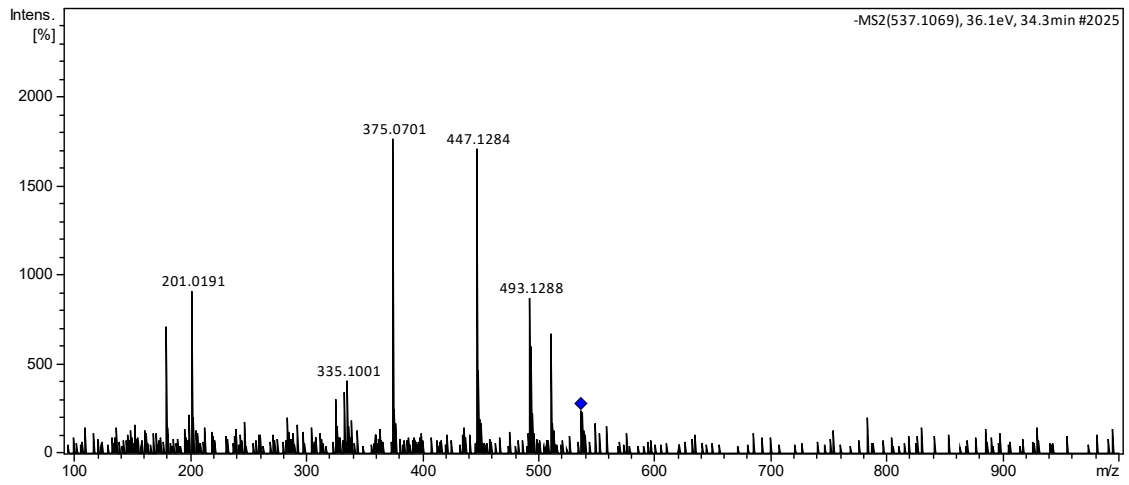
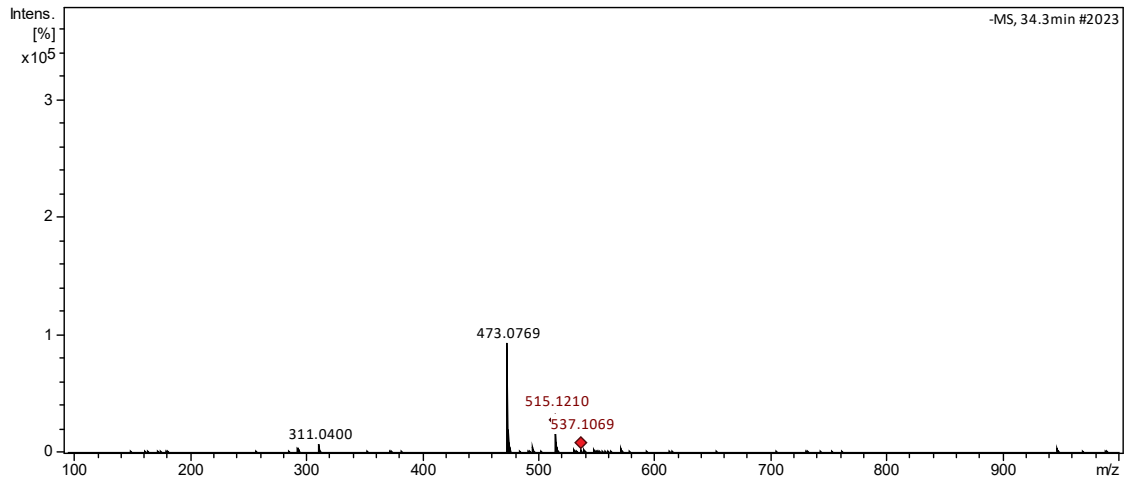
Peak 11 - Kaempferide-3-O-(6''-O-malonyl)-glucoside

Quercetin-7-O-(6''-O-acetyl) glucoside or quercetin acetyl-hexoside

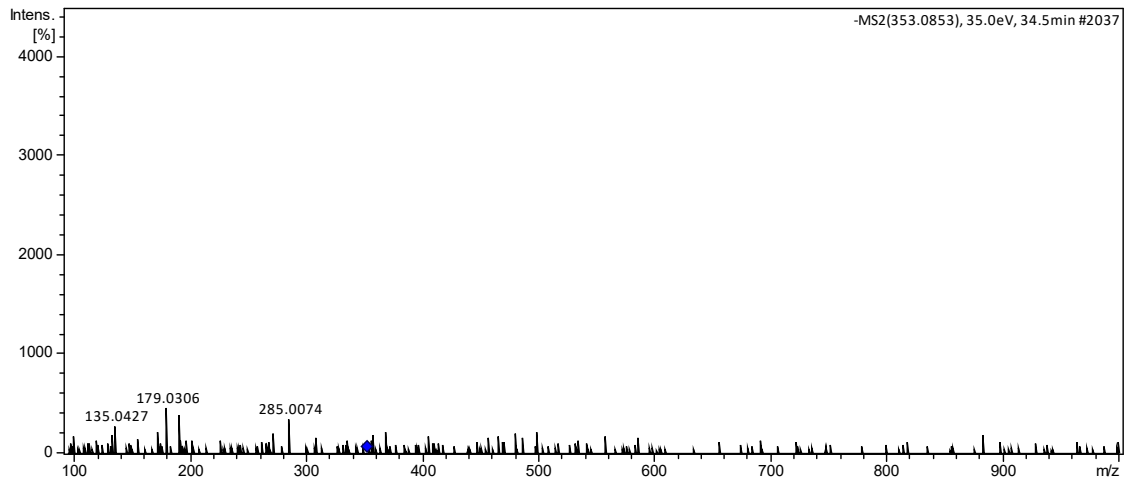
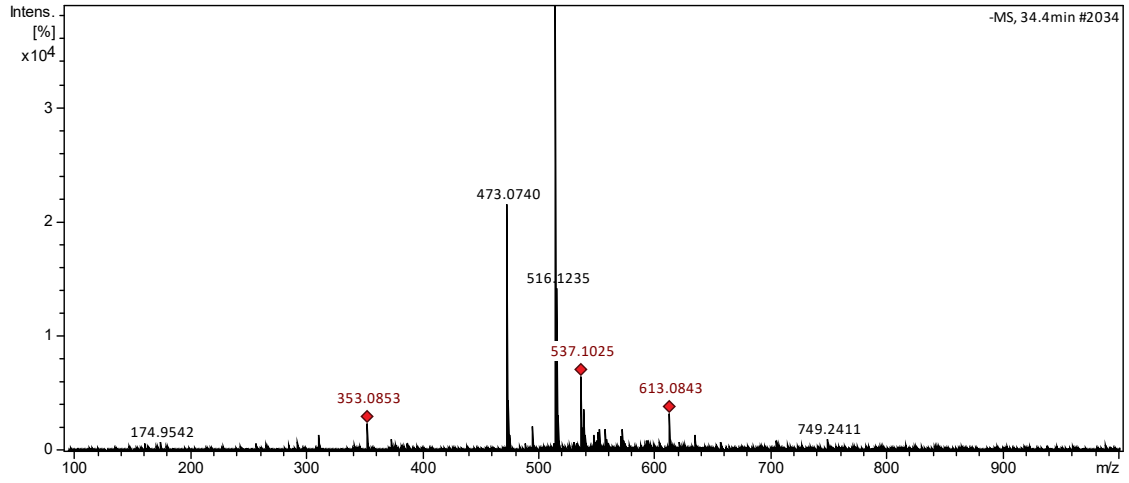


Peak 12 - 3,4-dicaffeoylquinic acid**Peak 13 - Caftaric acid and not identified**

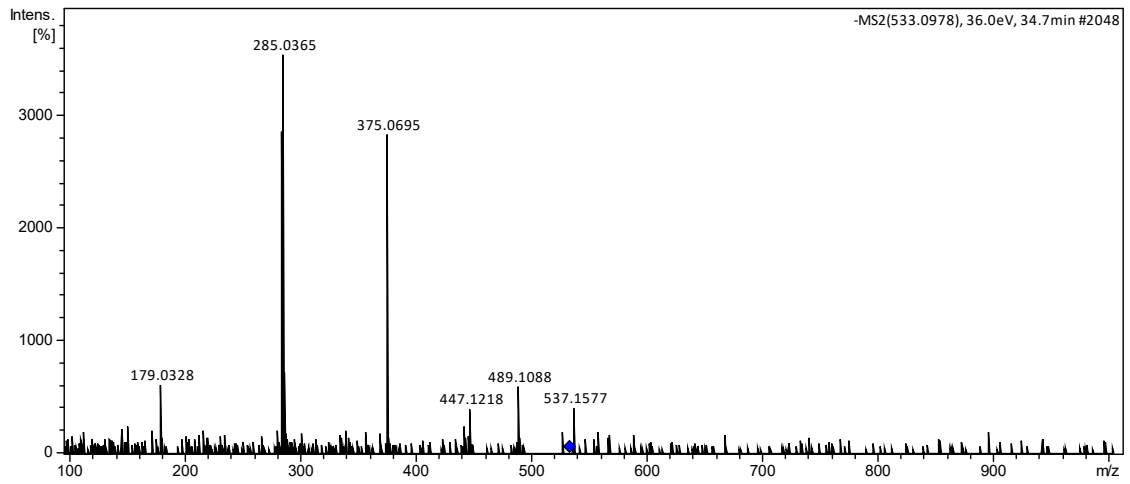
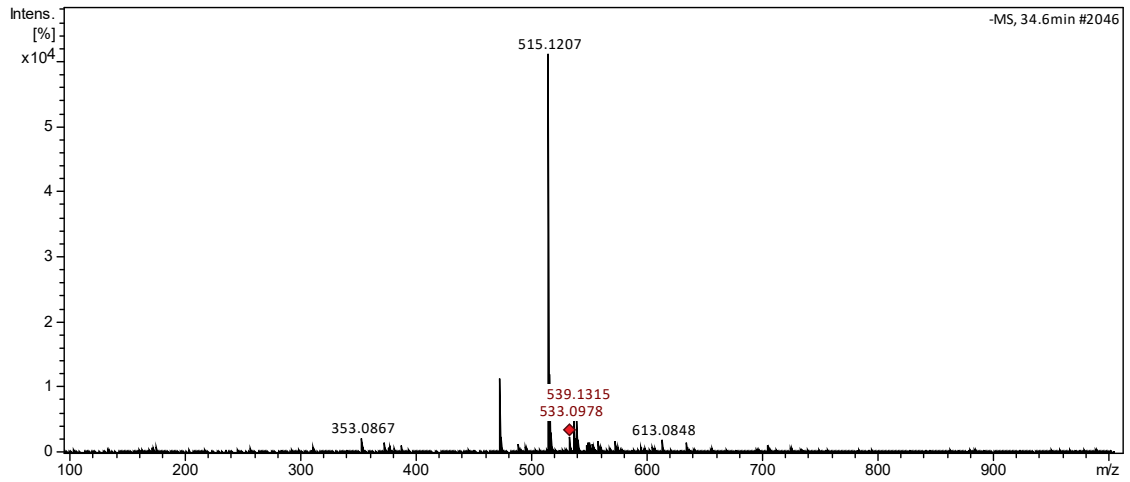
Peak 14 – Amentoflavone



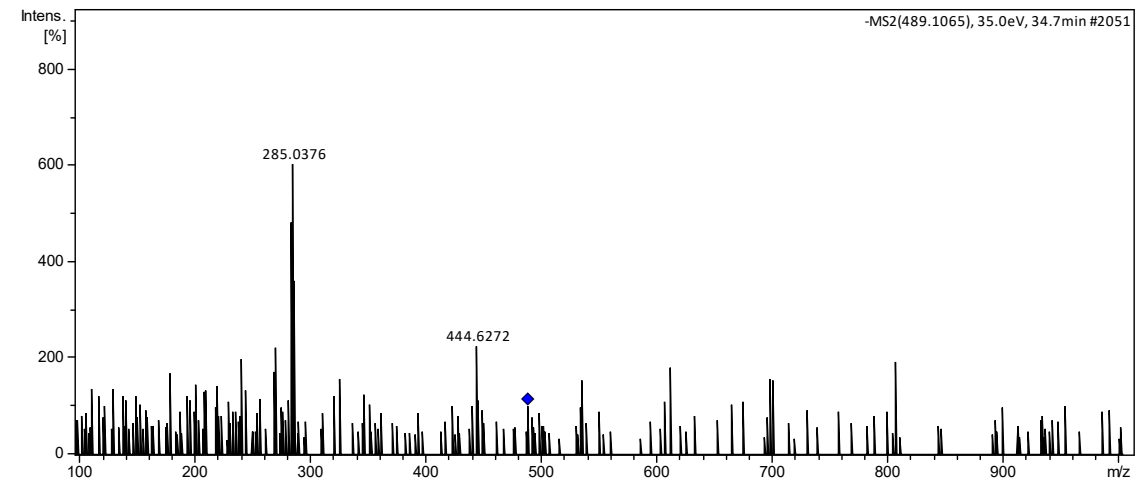
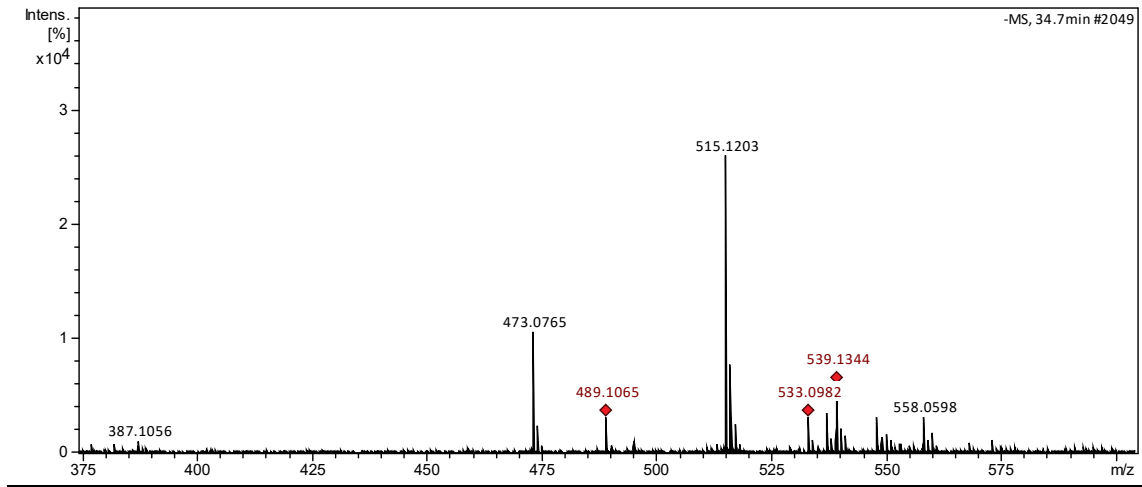
Not identified compound



kaempferol-3-O-allylglucoside

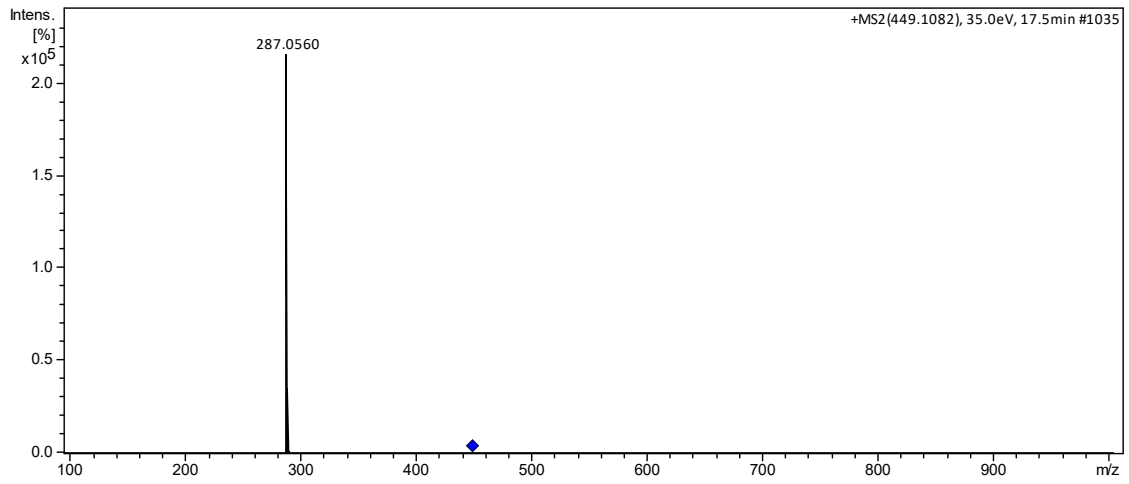
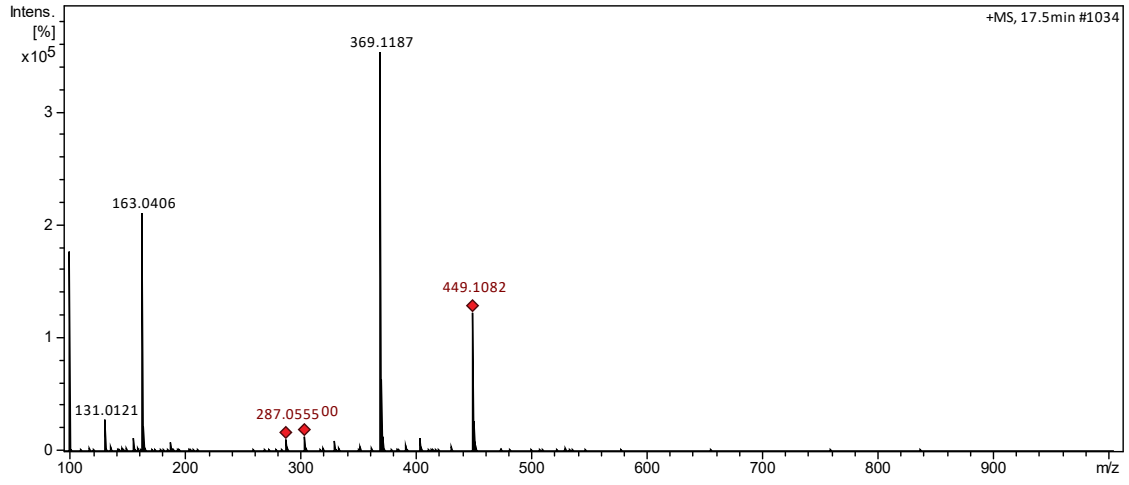


Peak 15 - Kaempferol-3-O-acetylglucoside

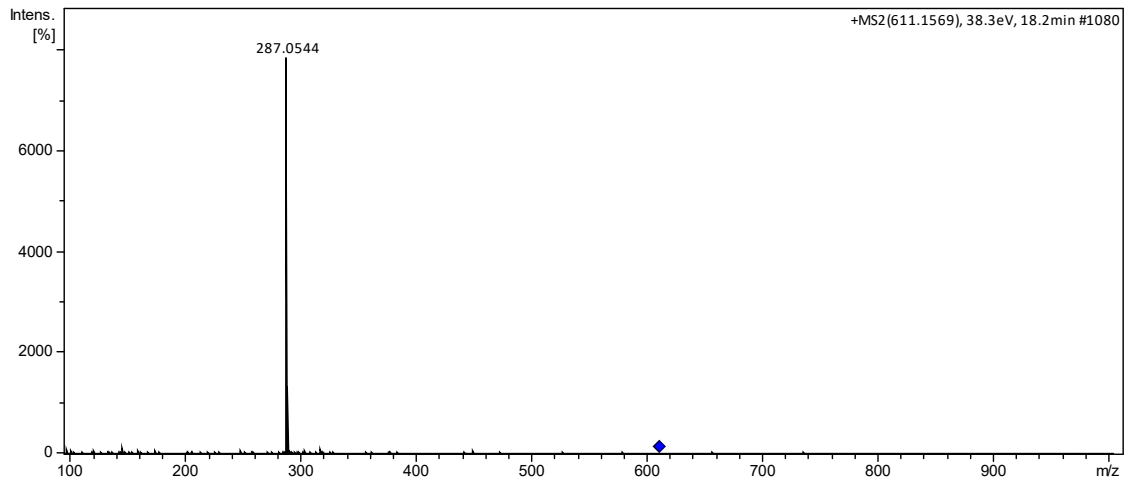
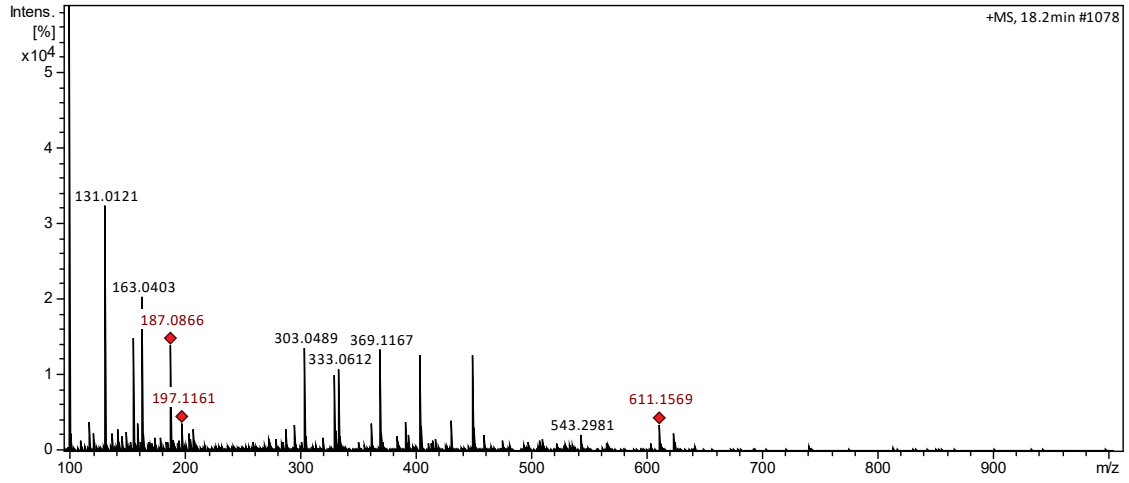


3. Anthocyanins

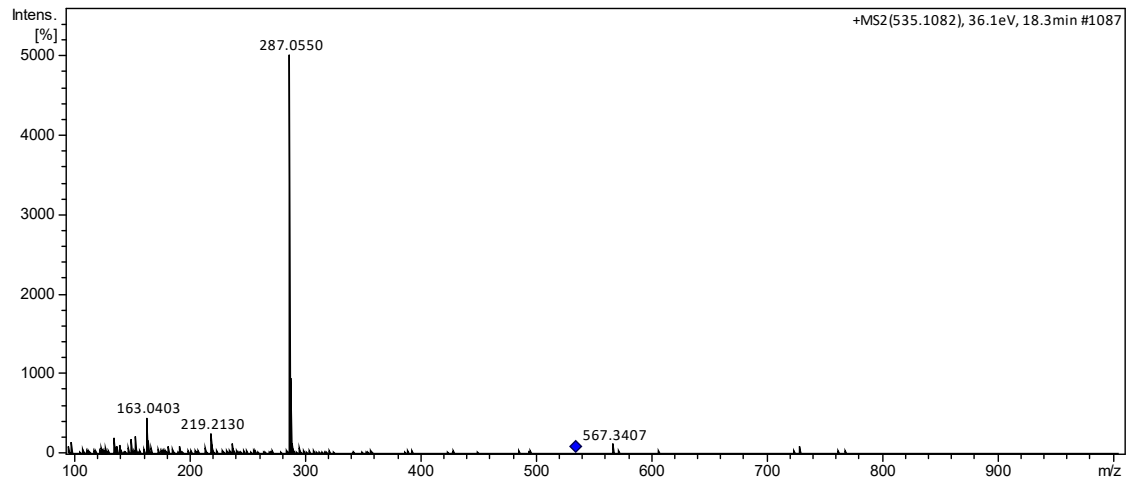
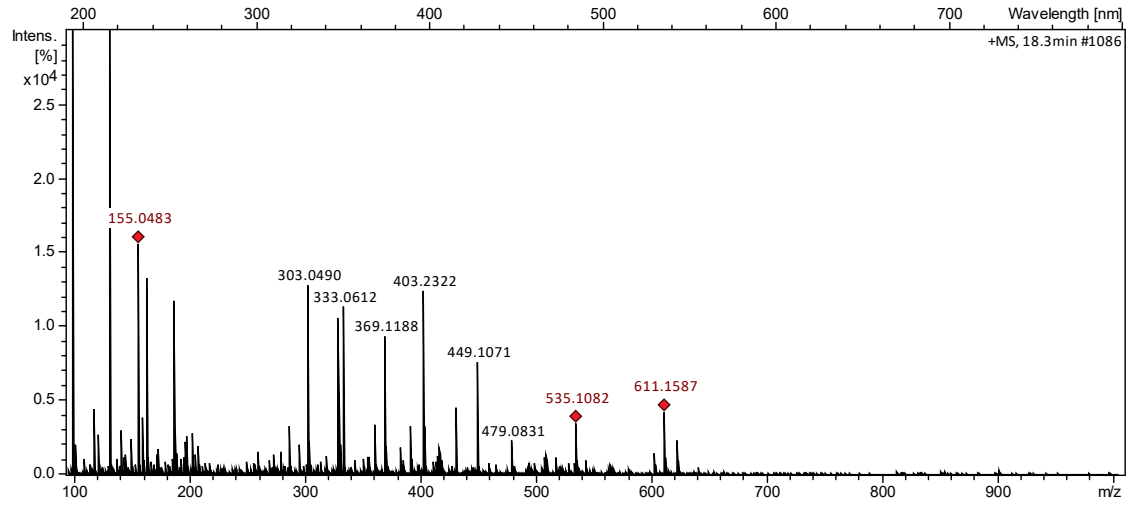
Peak 1 – Cyanidin 3-glucoside



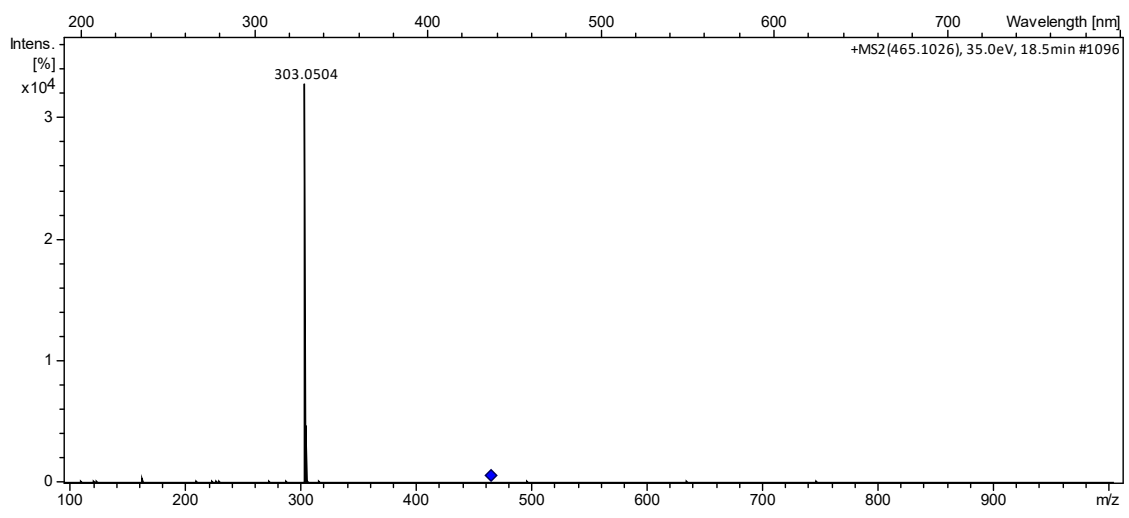
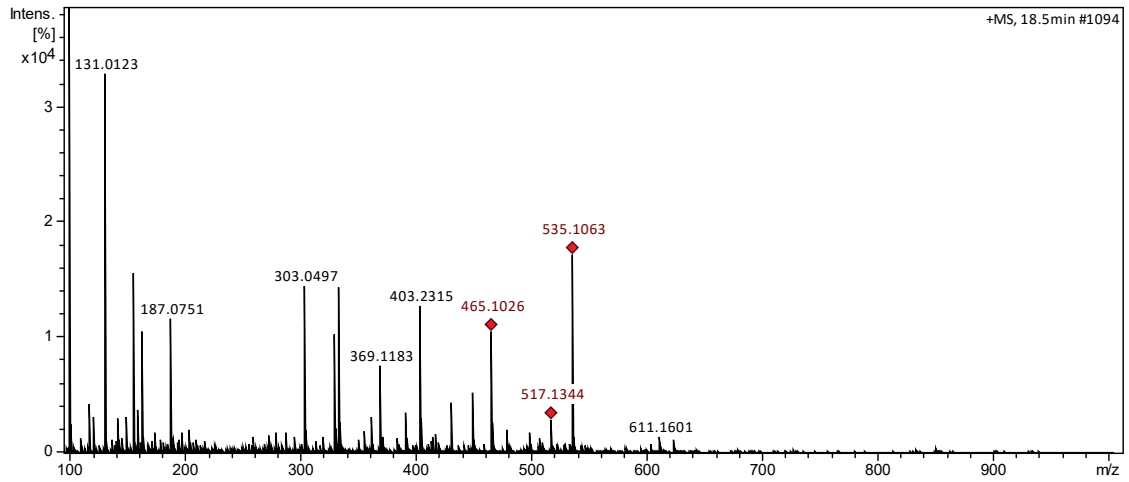
Peak 2 – Cyanidin 3-laminaribioside



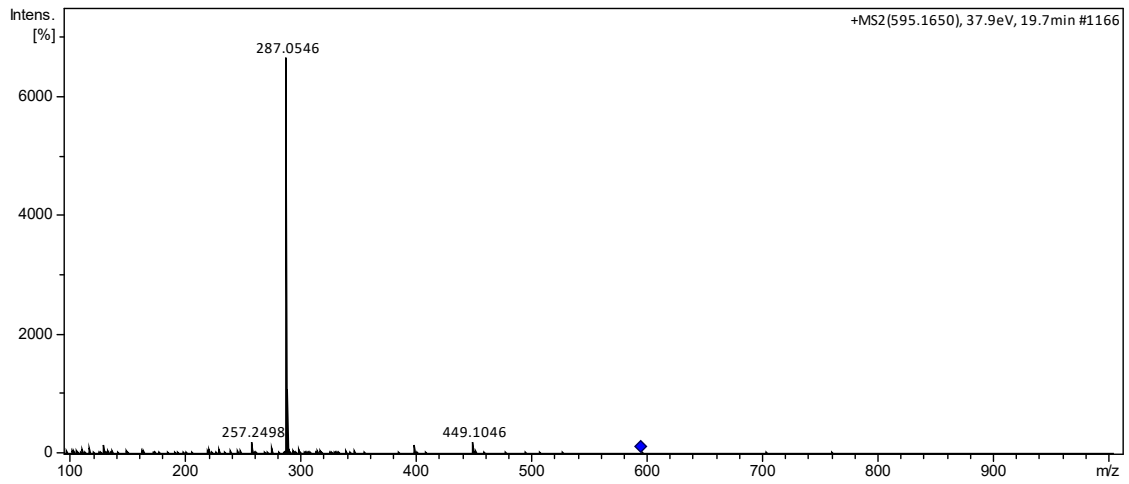
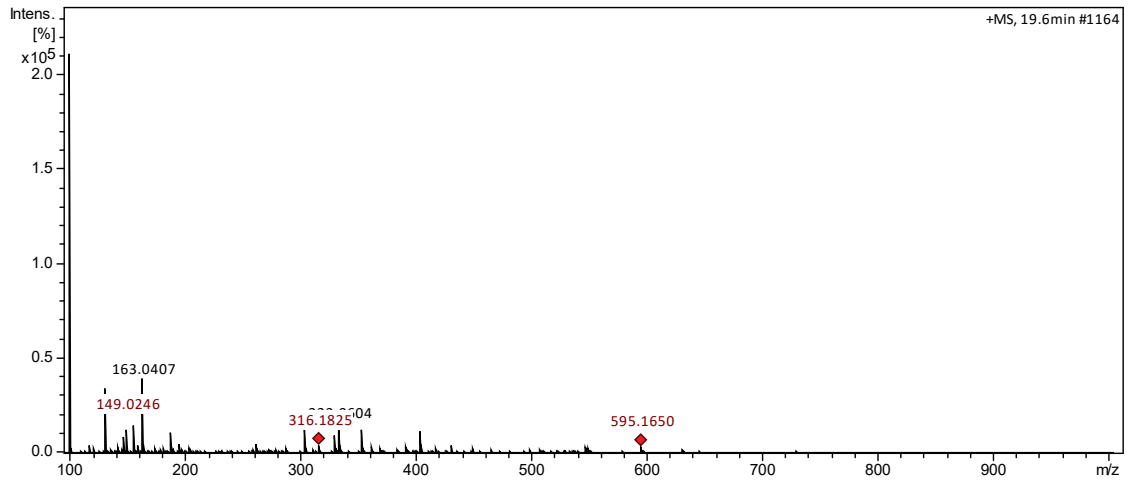
Cyanidin 3,5-diglucoside



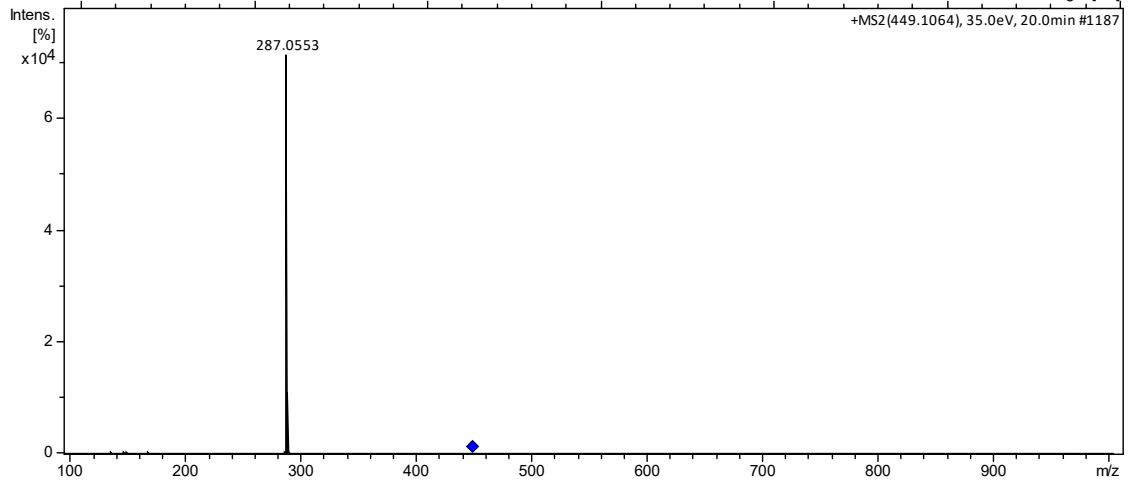
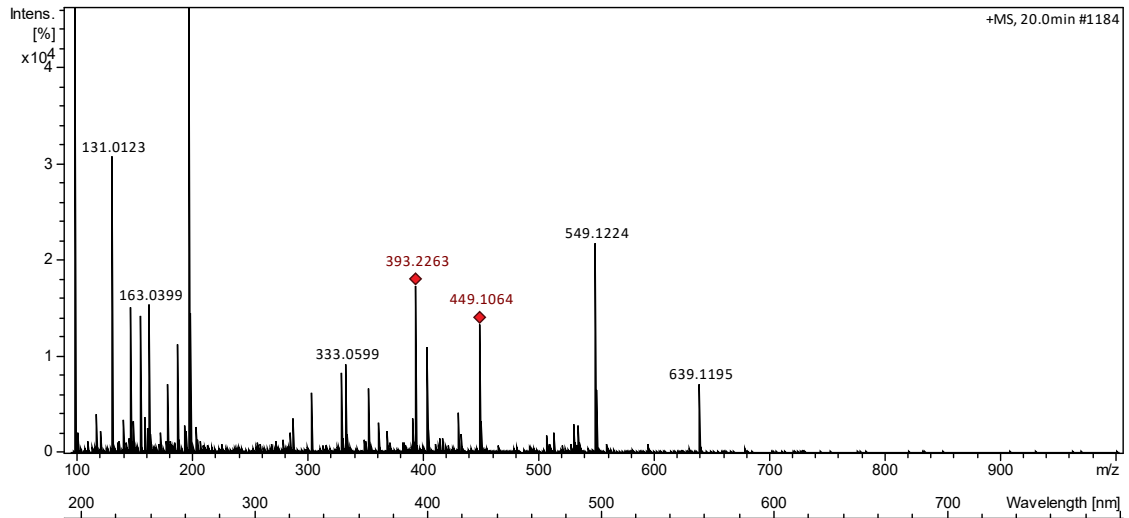
Delphinidin 3-glucoside



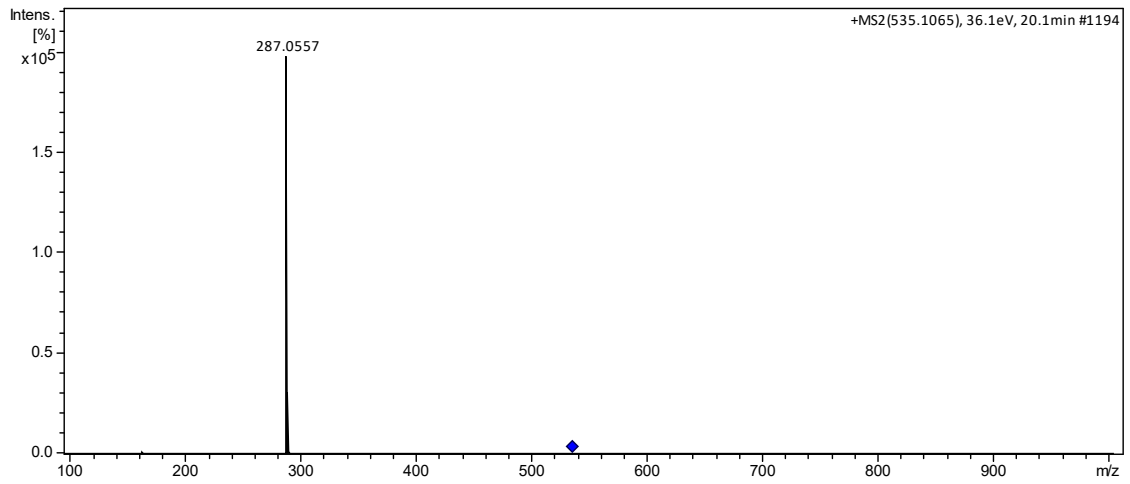
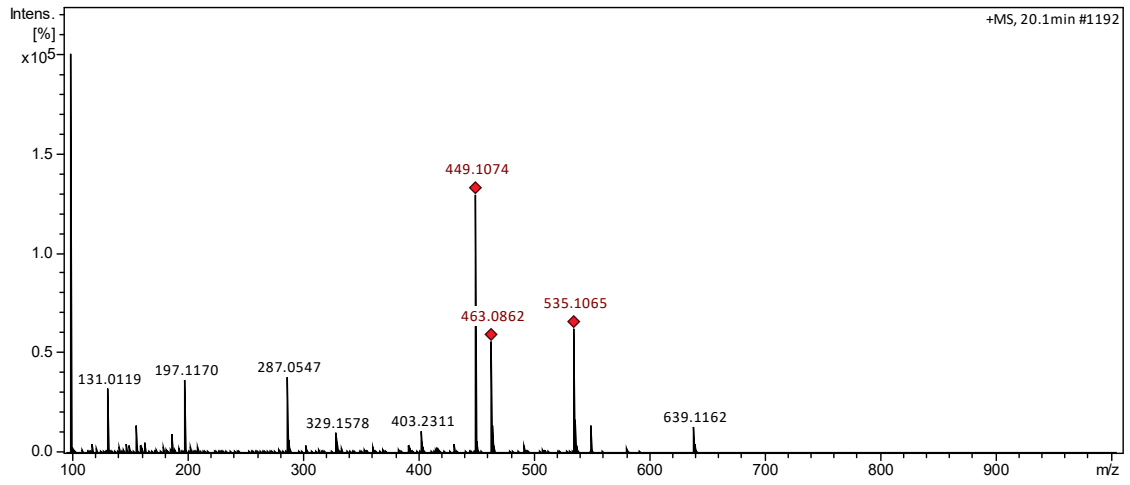
Peak 3 – Cyanidin 3-p-coumaroyl-glucoside trans



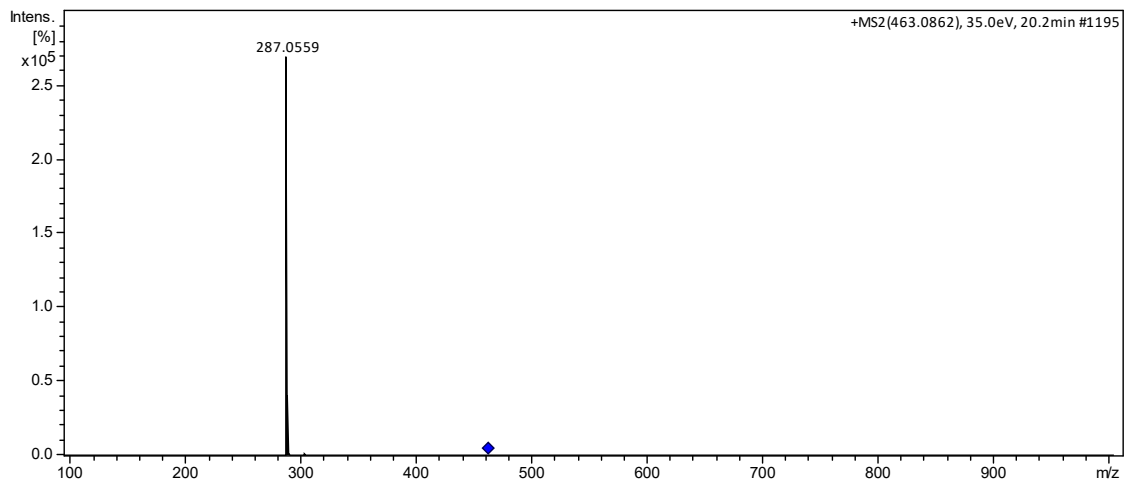
Cyanidin 3-glucoside



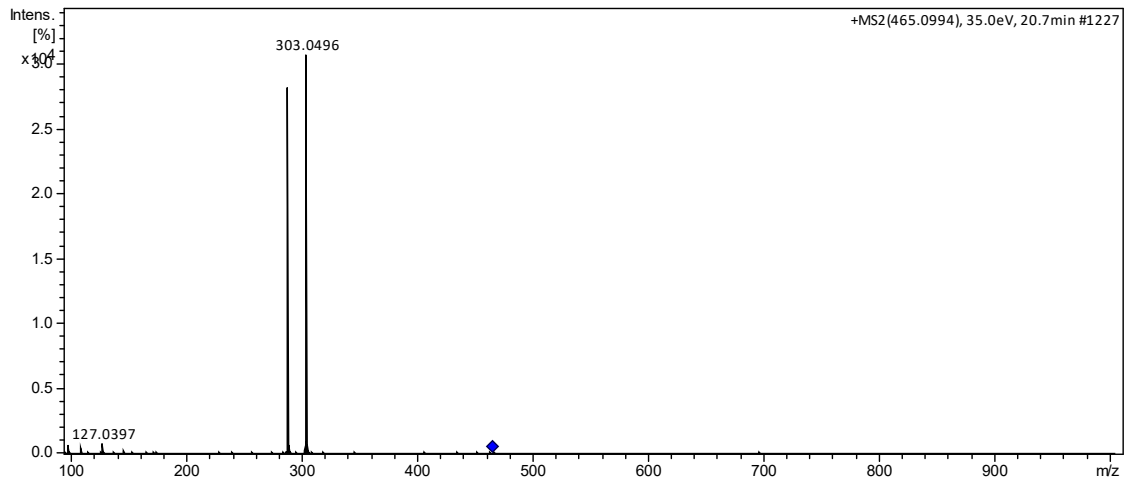
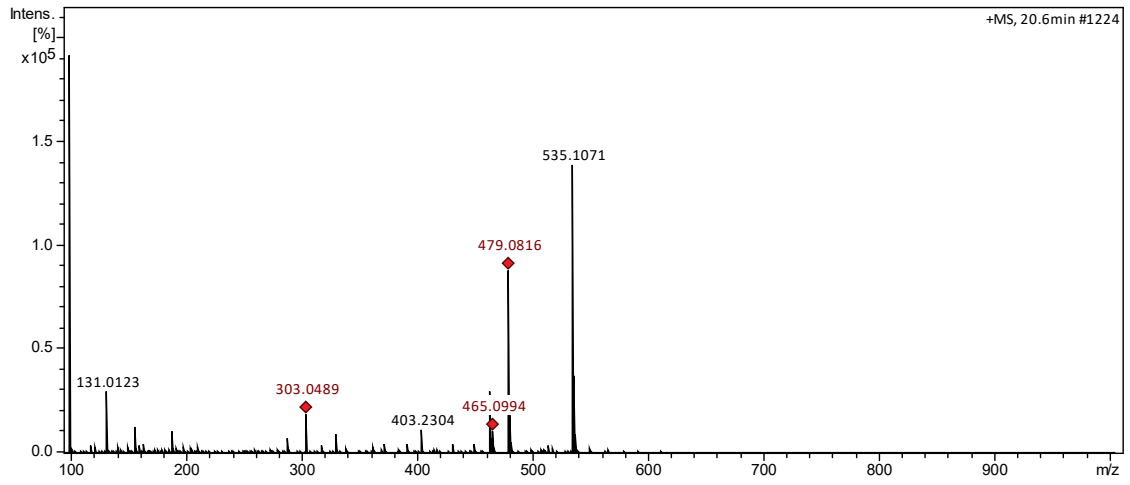
Cyanidin 3-(3''-malonyl) glucoside



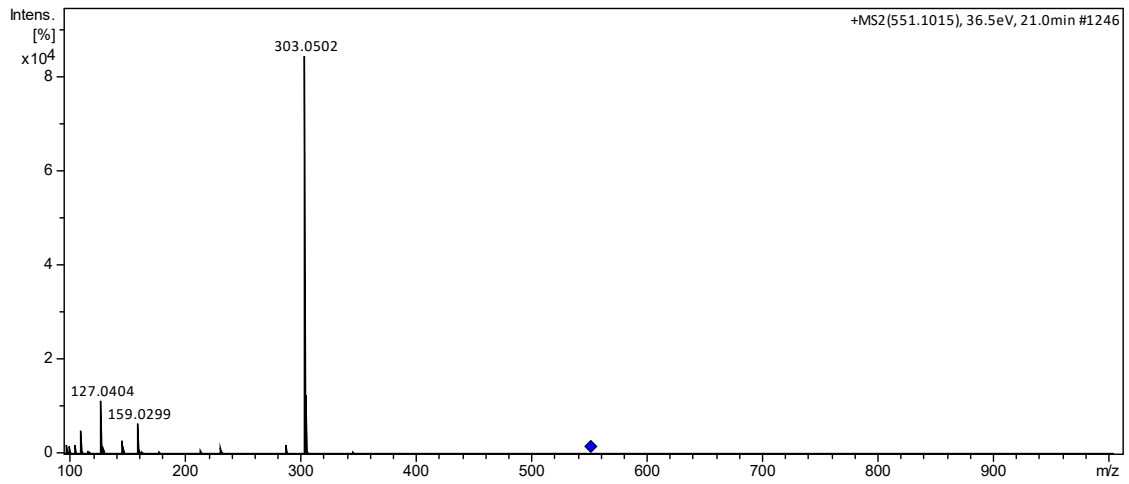
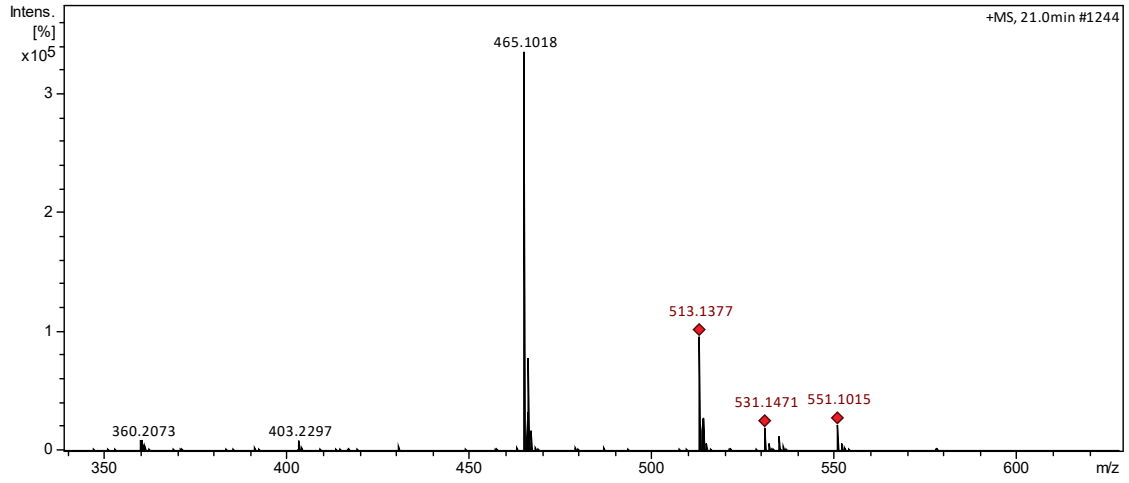
Kaempferol-3-glucuronide



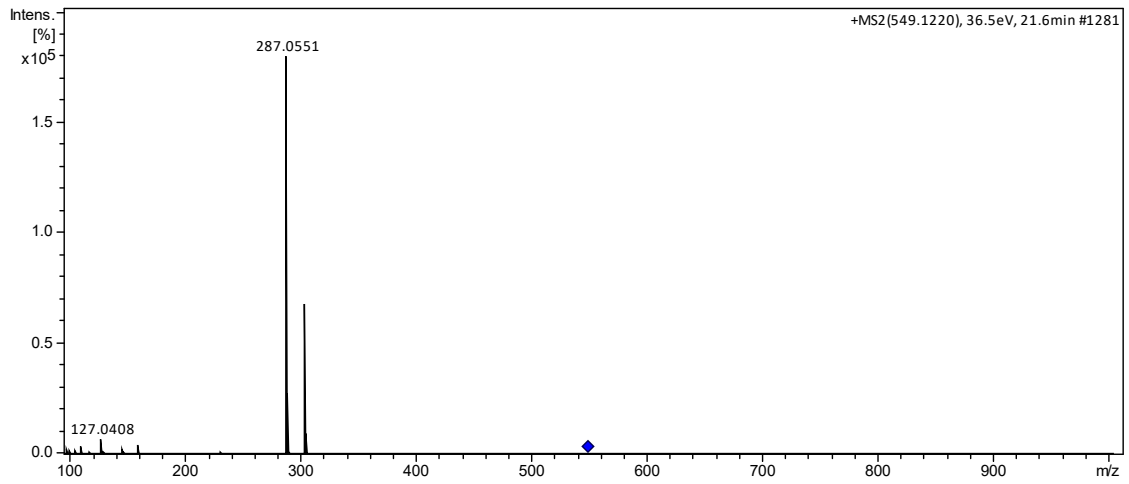
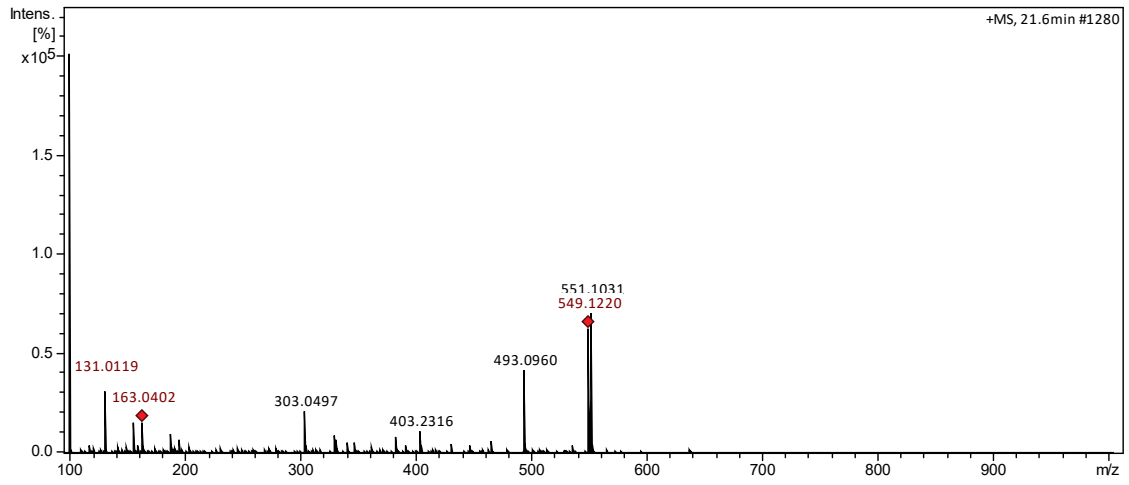
Delphinidin-3-glucoside



Delphinidin-3-malonoyl glucoside

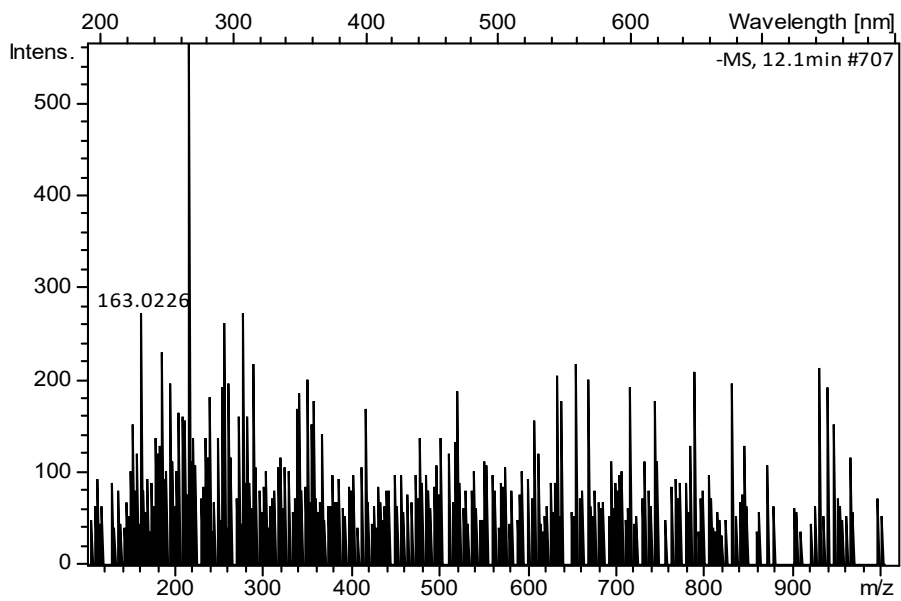
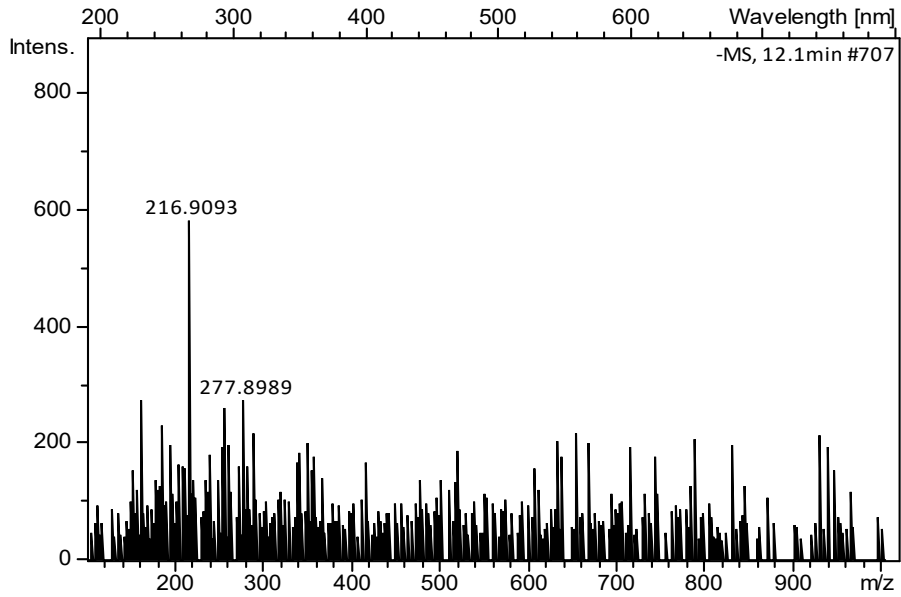


Peak 4 - Cyanidin 3-(6"-succinyl) glucoside

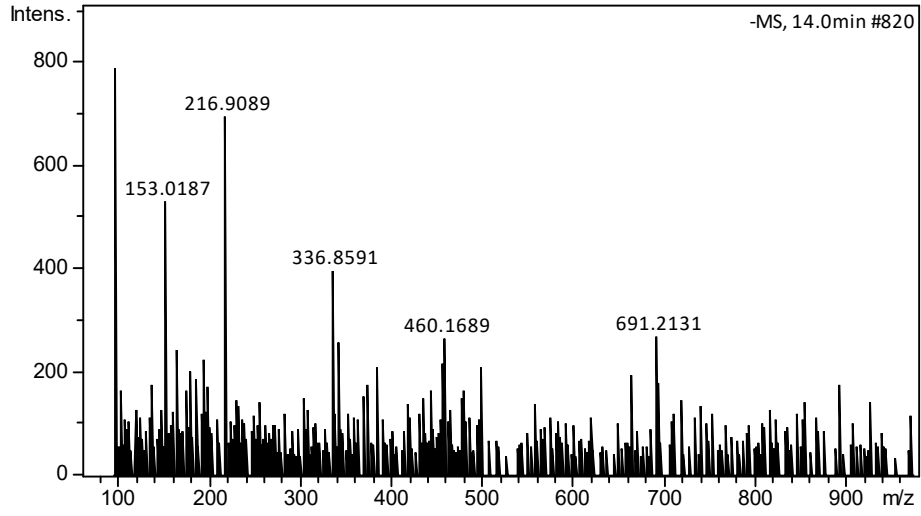


ANEXO 2 - ARTIGO 2 - SUPPORTING INFORMATION**Mass spectra of red lettuce phenolics compounds**

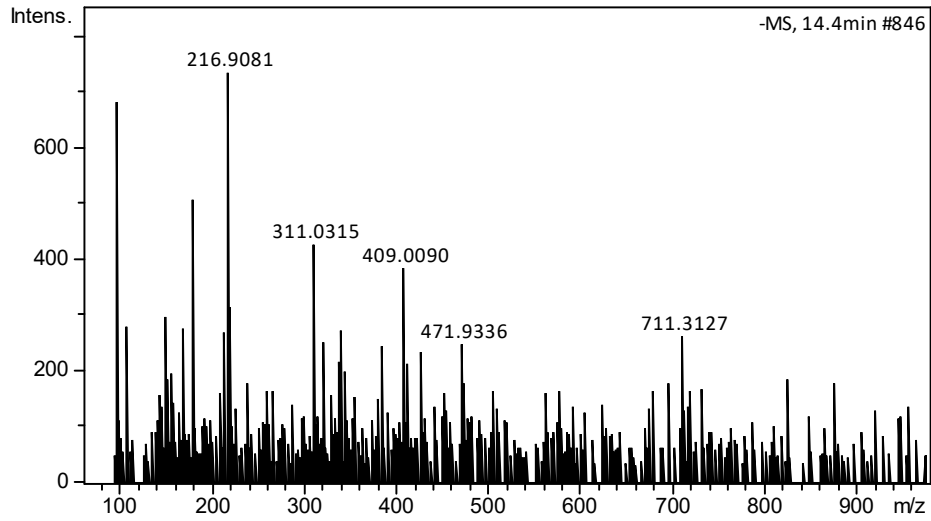
Pico 1 – Coumarate ion



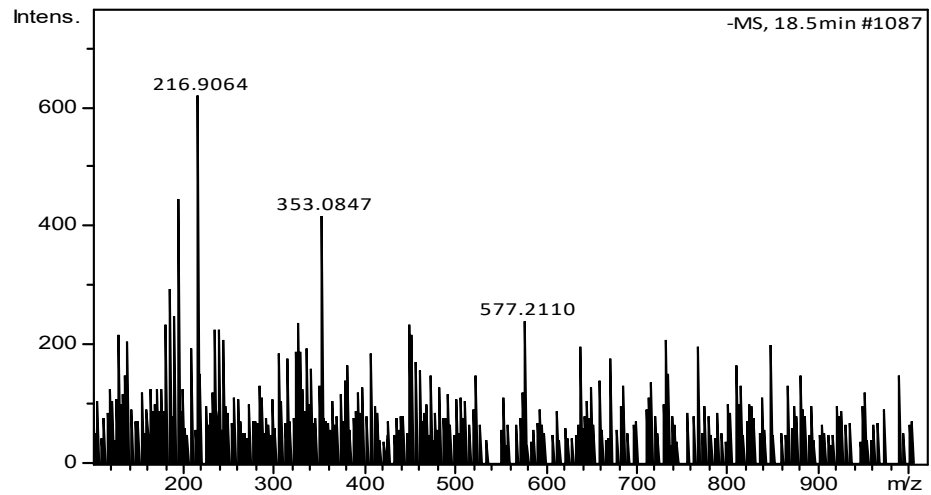
Pico 2 - 3,4-dihydroxybenzoic acid



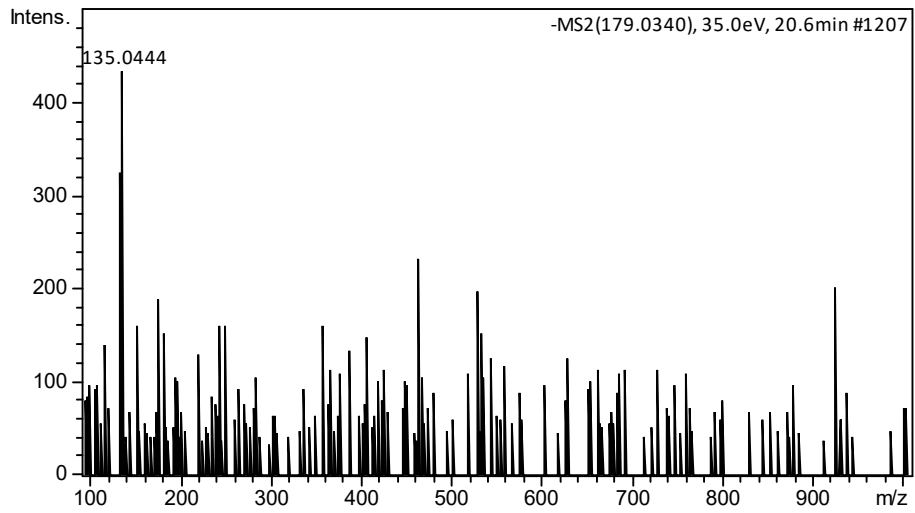
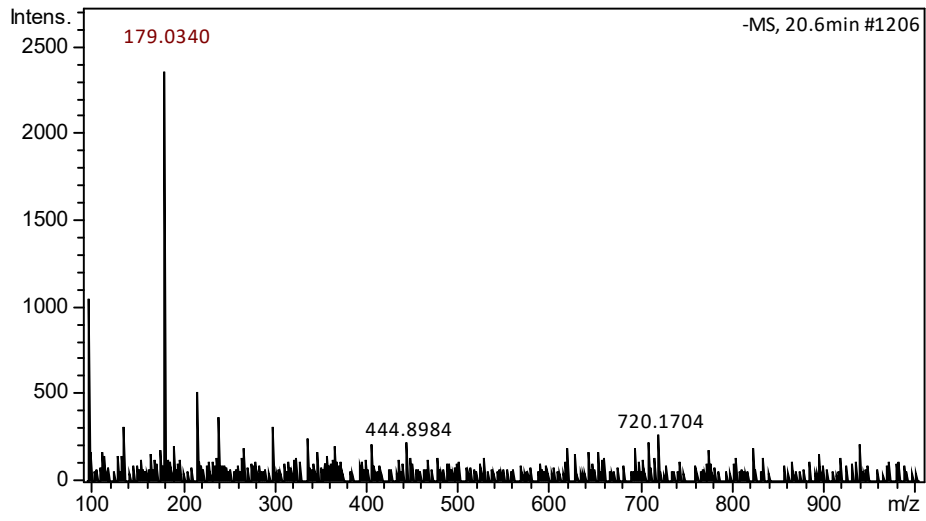
Peak 3 - Caffeate ion



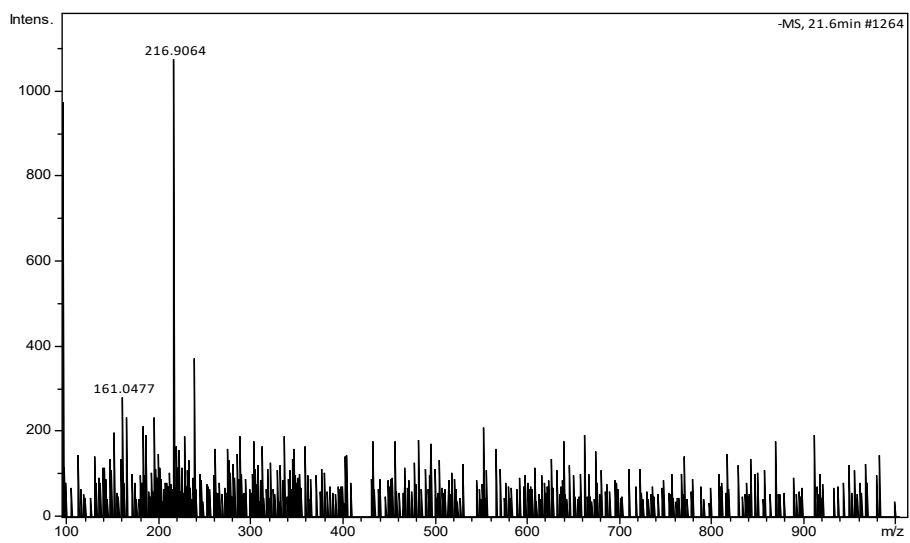
Peak 4 - Quinate ion



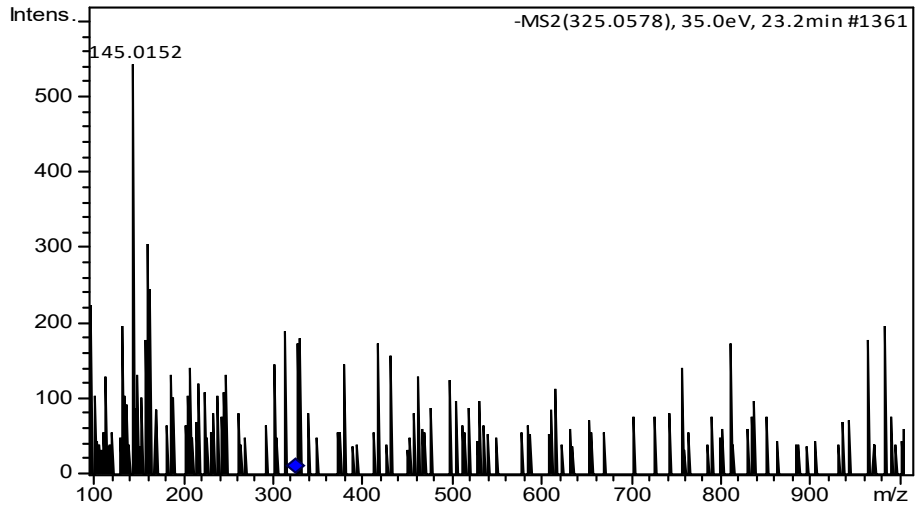
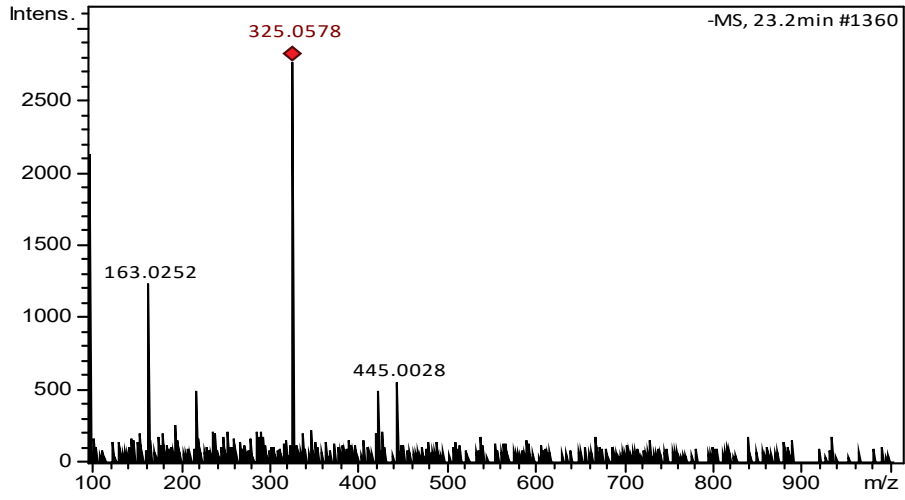
Peak 5 - Caffeic acid



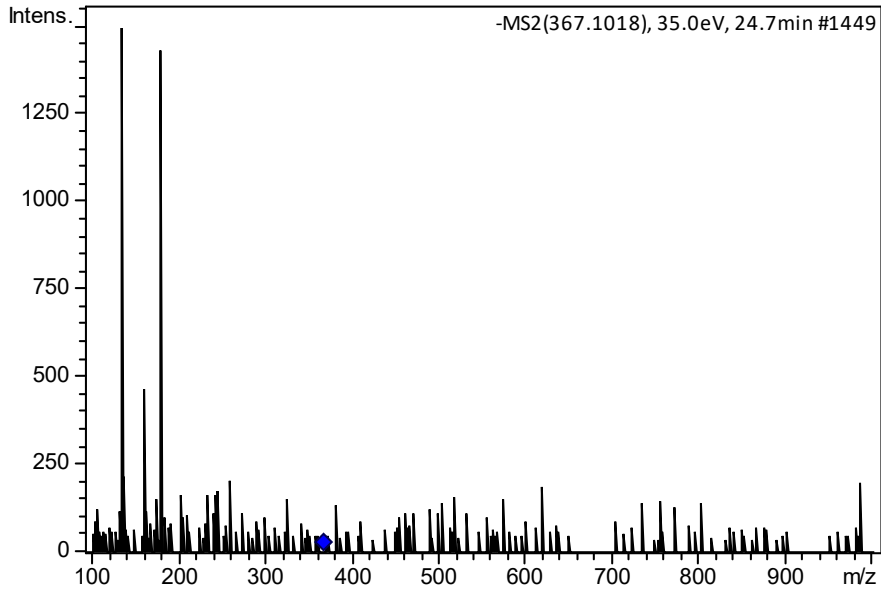
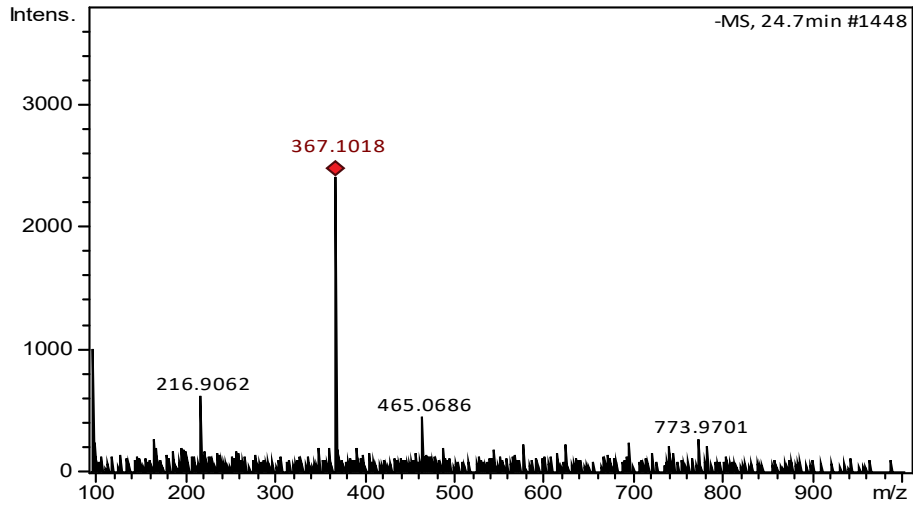
Peak 6 - Dicafeoylquinic acid



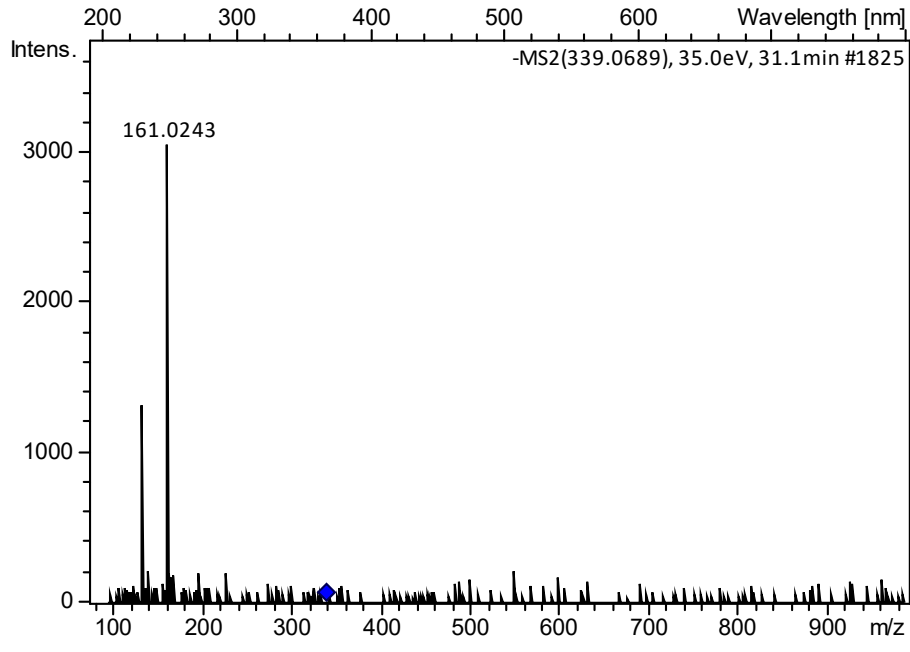
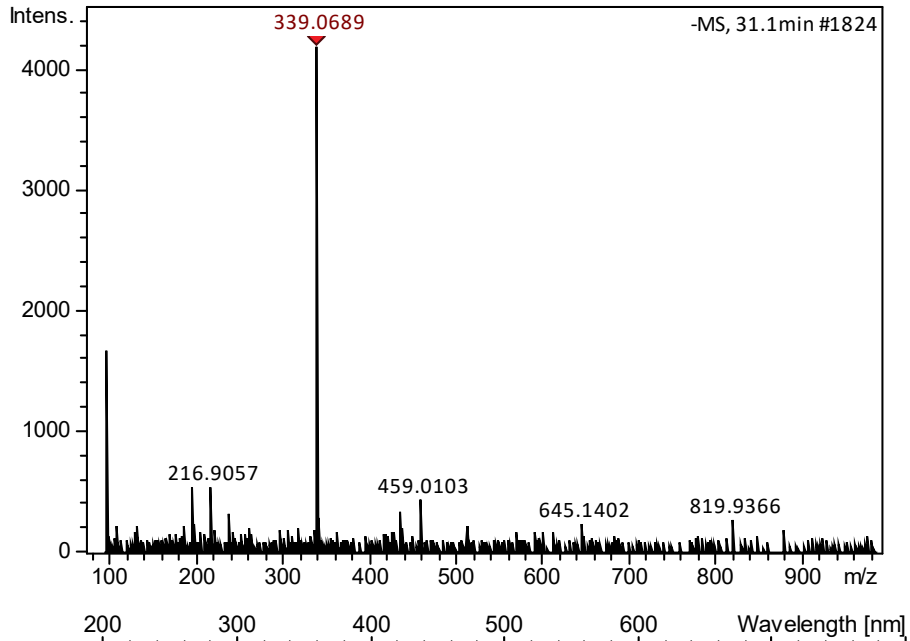
Peak 7 - Coumaric acid glycoside



Peak 8 –Feruloylquinic acid



Peak 9- Caffeat acid glucuronide



Peak 10 - Ferulic acid isomer

