

Caracterização nutricional e propriedades bioactivas de espécies silvestres da etnoflora transmontana tradicionalmente consumidas em verde

Carla Susana Correia Pereira

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança
Alimentar*

Orientado por
Isabel Cristina F.R. Ferreira
Ana Maria Pinto Carvalho

**Bragança
2011**

AGRADECIMENTOS

A realização desta Dissertação de Mestrado só foi possível graças à colaboração, apoio e contributo de algumas pessoas às quais gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento e profundo reconhecimento, em particular:

À Professora Doutora Isabel Ferreira e à Professora Doutora Ana Carvalho, pela orientação, dedicação, disponibilidade, paciência e ensinamentos disponibilizados; cada uma de forma especial contribuiu para a conclusão desse trabalho.

À Doutora Lillian Barros pelo carinho, compreensão, apoio e ajuda que sempre me disponibilizou.

Aos meus pais e irmã, por todo o amor, apoio, incentivo e constante encorajamento a fim de prosseguir a elaboração deste trabalho.

Ao meu marido, pelo carinho e compreensão inestimáveis nos momentos em que a dedicação aos estudos foi exclusiva.

Ao meu grande amigo Roberto Costa, pela constante presença nos momentos importantes da minha vida e pelas conversas que foram fundamentais para me manter motivada e conseqüentemente contribuíram para a realização do trabalho.

E, por fim, a todos os que directa ou indirectamente contribuíram para esta longa caminhada, um sincero agradecimento.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	II
ABREVIATURAS	VII
RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. CONSUMO DE VERDURAS SILVESTRES NA PENÍNSULA IBÉRICA	1
1.2. POTENCIALIDADES NUTRICIONAIS E NUTRACÊUTICAS DAS VERDURAS SILVESTRES. 1	
1.2.1. <i>Preâmbulo</i>	1
1.2.2. <i>Compostos fenólicos</i>	2
1.2.3. <i>Flavonóides</i>	5
1.2.4. <i>Tocoferóis</i>	7
1.2.5. <i>Ácido ascórbico</i>	9
1.2.6. <i>Carotenóides</i>	10
1.2.7. <i>Açúcares</i>	11
1.2.8. <i>Ácidos gordos</i>	14
1.3. AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES.....	15
1.3.1. <i>Stress oxidativo</i>	15
1.3.2. <i>Métodos de avaliação da actividade antioxidante</i>	18
1.3.3. <i>Ensaio da capacidade de captação de radicais DPPH</i>	19
1.3.4. <i>Ensaio do poder redutor</i>	20
1.3.5. <i>Ensaio de inibição da descoloração do β-caroteno</i>	21
1.3.6. <i>Ensaio das substâncias reactivas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i>	22
1.4. OBJECTIVOS E HIPÓTESES DE ESTUDO	23
II. MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1. SELECÇÃO, COLHEITA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS	25
2.2. CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA DAS PLANTAS ESTUDADAS	26
2.3. PRODUTOS QUÍMICOS.....	27
2.4. ANÁLISE DE MACRONUTRIENTES	28
2.4.1. <i>Valor nutricional</i>	28
2.4.2. <i>Açúcares</i>	28
2.4.3. <i>Ácidos Gordos</i>	29
2.5. ANÁLISE DE MICRONUTRIENTES	30
2.5.1. <i>Tocoferóis</i>	30
2.5.2. <i>Ácido ascórbico</i>	30
2.5.3. <i>Pigmentos</i>	31
2.6. ANÁLISE DE NÃO-NUTRIENTES E AVALIAÇÃO IN VITRO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES.....	31
2.6.1. <i>Procedimento de extracção</i>	31
2.6.2. <i>Compostos fenólicos</i>	32
2.6.3. <i>Actividade captadora de radicais DPPH</i>	32
2.6.4. <i>Poder redutor</i>	33

2.6.5. <i>Inibição da descoloração do β-caroteno</i>	33
2.6.6. <i>Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reactivas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i>	34
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1. MACRONUTRIENTES	35
3.2. MICRONUTRIENTES	39
3.3. NÃO-NUTRIENTES BIOACTIVOS.....	42
IV. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	45
V. BIBLIOGRAFIA	47
VI. ANEXOS	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química de diferentes classes de compostos fenólicos.....	3
Figura 2. Estrutura química de diferentes classes de flavonóides.	6
Figura 3. Estrutura química de tocoferóis.	7
Figura 4. Estrutura química do ácido L-ascórbico.....	9
Figura 5. Estrutura química do β -caroteno.....	11
Figura 6. Estrutura química de açúcares encontrados em plantas.	13
Figura 7. Visão geral das principais reacções envolvendo espécies reactivas de oxigénio (ROS) /espécies reactivas de azoto (RNS), e das principais defesas antioxidantes endógenas, enzimáticas e não-enzimáticas, da célula	16
Figura 8. Principais causas para a super-produção de radicais livres (<i>stress</i> oxidativo), potenciais alvos celulares e consequências do <i>stress</i> oxidativo ..	18
Figura 9. Redução do DPPH'.	19
Figura 10. Reacção de MDA e TBA na formação de TBARS.....	23
Figura 11. Perfil de açúcares de <i>Rumex induratus</i>	36
Figura 12. Perfil individual de ácidos gordos de <i>Borago officinalis</i>	38
Figura 13. Perfil individual de tocoferóis de <i>Rumex acetosella</i>	41

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Consumo de verduras silvestres (excluídas as condimentares) na Península Ibérica: exemplos de espécies frequentemente citadas na bibliografia.....	1
Tabela 2. Humidade (g/100 g de massa fresca), macronutrientes (g/100 g de massa seca) e valor energético (kcal/100 g de massa seca) das cinco espécies estudadas (média ± DP, n = 3) Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).	35
Tabela 3. Composição em ácidos gordos (percentagem relativa) das cinco espécies estudadas (média ± DP, n = 3). Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).....	37
Tabela 4. Composição em micronutrientes e pigmentos das cinco espécies estudadas (média ± DP, n = 3). Os resultados são expressos em mg/100 g de massa seca. Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).....	40
Tabela 5. Composição em não-nutrientes e propriedades antioxidantes (valores de EC ₅₀) das cinco espécies estudadas. Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).....	42
Tabela 6. Correlações estabelecidas entre fenóis, flavonóides, flavonóis, antocianinas, ésteres tartáricos e os valores de EC ₅₀ de actividade atioxidante.....	44

ABREVIATURAS

A	Absorvância
ACR	Actividade captadora de radicais livres
ANOVA	Análise de variância
ArOH	Antioxidante fenólico
AsH ⁻	Ião ascorbato
BHT	2,6-di- <i>t</i> -butil-4-metilfenol
BRESA	Herbário da Escola Superior Agrária de Bragança
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DPPH	1,1-Difenil-2-picril-hidrazilo
EAC	Equivalentes de ácido cafeico
EC	Equivalentes de (+)-catequina
EC ₅₀	Concentração de extracto correspondente a 50% de actividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor
ELSD	Detecção evaporativa com espalhamento de luz
eNOS	Óxido nítrico endotelial
FAME	Mistura de ésteres metílicos de ácidos gordos
FID	Detector de ionização de chama
GC	Cromatografia Gasosa
GLA	Ácido γ -linolénico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HO [•]	Radical hidroxilo
HPLC-RI	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
L [•]	Radical lipídico
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LO [•]	Radical alcoxilo
LOO [•]	Radical peroxilo

LOOH	Hidroperóxido lipídico
MDA	Malondialdeído
MDA-TBA	Complexo malonaldeído-ácido tiobarbitúrico
NP	Fase normal
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados
RFC	Reagente de Folin-Ciocalteu
RNS	Espécies reactivas de azoto
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
RP	Fase reversa
SFA	Ácidos gordos saturados
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reactivas do ácido tiobarbitúrico
TO [•]	Radical tocoferoxilo
UV	Radiação Ultravioleta
VIS	Radiação Visível

RESUMO

É extraordinariamente importante que o consumidor tenha informação sobre a composição dos alimentos em macronutrientes e micronutrientes mas, também, em compostos bioactivos, nomeadamente antioxidantes. Esta informação torna-se ainda mais relevante para plantas silvestres da Etnoflora Transmontana tradicionalmente consumidas, de forma a recuperar a sua utilização em hábitos alimentares inerentes à nutrição moderna. As verduras, em particular, são conhecidas como excelentes fontes de antioxidantes naturais, e a sua inclusão na dieta alimentar pode contribuir para a ingestão diária de antioxidantes.

Neste trabalho, estudaram-se cinco espécies silvestres comestíveis amplamente consumidas em muitas comunidades rurais da região do Mediterrâneo como verduras de folha: *Borago officinalis* L. (borragem), *Montia fontana* L. (merujas), *Rorippa nasturtium-aquaticum* (L.) Hayek (agrião), *Rumex acetosella* L. (azedinhas) e *Rumex induratus* Boiss. & Reut. (azedas). O principal objectivo foi fundamentalmente descrever e caracterizar a composição em macronutrientes, micronutrientes e não-nutrientes dessas espécies. Também se pretendeu validar os conhecimentos e usos empíricos, fornecer novas perspectivas sobre os alimentos regionais e a cozinha tradicional e contribuir com alternativas úteis, passíveis de ser incorporadas nas dietas, de acordo com os princípios da nutrição moderna.

A análise de macronutrientes incluiu a determinação de proteínas, lípidos, cinzas e glúcidos, segundo procedimentos oficiais de análise. Identificaram-se os perfis individuais de açúcares e de ácidos gordos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de índice de refração (HPLC-RI) e cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama (GC-FID), respectivamente. Na análise de micronutrientes, determinaram-se tocoferóis, por HPLC-fluorescência, ácido ascórbico e carotenóides por técnicas espectrofotométricas. Na análise de não-nutrientes foram determinados compostos fitoquímicos com actividade antioxidante, tais como fenóis, flavonóides, flavonóis e antocianinas. A actividade antioxidante foi avaliada por quatro ensaios realizados *in vitro*: actividade captadora de radicais livres, avaliação do poder redutor, capacidade de inibição da descoloração do β -caroteno e inibição da peroxidação lipídica em homogeneizados cerebrais.

A espécie *R. induratus* revelou os maiores teores de açúcares, ácido ascórbico, tocoferóis, licopeno, clorofilas, flavonóides, flavonóis, ésteres tartáricos, e capacidade antioxidante, expressa em actividade captadora de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), inibição de descoloração do β -caroteno e inibição de formação de TBARS (espécies reactivas do ácido tiobarbitúrico). A espécie *R. nasturdium-aquaticum* mostrou razões de PUFA/SFA (ácidos gordos polinsaturados/ácidos gordos monoinsaturados) e n-6/n-3 mais saudáveis, e a espécie *B. Officinalis* provou ser uma fonte de GLA (ácido γ -linolénico) e outros ácidos gordos da série n-6 que são precursores de mediadores de resposta do processo inflamatório. As características nutricionais e o potencial antioxidante destas verduras silvestres requerem uma reconsideração do seu papel não só na dieta tradicional, como também na dieta contemporânea. Além disso, podem ser encontradas aplicações dos seus extractos na prevenção de doenças crónicas relacionadas com radicais livres, incluídas em formulações específicas de nutracêuticos ou como alimentos funcionais.

ABSTRACT

Beyond the composition of the usual macronutrients and micronutrients, it is important to provide information on the composition of bioactive compounds and antioxidant capacity of foods, particularly of wild species to regain them for nowadays dietary habits. Many greens are known as excellent sources of natural antioxidants, and consumption of fresh plants in the diet may contribute to the daily antioxidant intake.

In the present study five leafy wild greens traditionally consumed (*Borago officinalis*, *Montia fontana*, *Rorippa nasturtium-aquaticum*, *Rumex acetosella*, *Rumex induratus*) were studied in order to document macronutrients, micronutrients and non-nutrients composition. It was also intended to validate empirical uses and knowledge, to allow new perspectives about local foods and traditional cuisine, and to contribute with useful alternatives for incorporation in diet, according to the principles of modern nutrition.

The analysis of macronutrients included determination of proteins, lipids, ash and carbohydrates, according to official analysis methods. The individual profiles of sugars and fatty acids were obtained by high performance liquid chromatography coupled to index refraction detector (HPLC-RI) and gas chromatography coupled to flame ionization detector (GC-FID), respectively. The analysis of macronutrients included determination of tocopherols, by HPLC-fluorescence, ascorbic acid and carotenoids by spectrophotometric assays. The analysis of non-nutrients included determination of phytochemicals with antioxidant activity, such as phenolics, flavonoids, flavonols and antocyanines. The antioxidant activity was evaluated by four *in vitro* assays: free radical scavenging activity, reducing power, β -carotene bleaching inhibition and lipid peroxidation inhibition in brain homogenates.

R. induratus revealed the highest levels of sugars, ascorbic acid, tocopherols, lycopene, chlorophylls, flavonoids, and one of the highest antioxidant activity expressed as DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) scavenging activity, β -carotene bleaching inhibition, and TBARS (tiobarbituric acid reactive substances) formation inhibition. *R. nasturtium-aquaticum* showed the healthier PUFA/SFA and n-6/n-3 ratios, and *B. officinalis* proved to be a source of γ -linolenic acid (GLA) and other fatty acids from n-6 series that are precursors of mediators of the inflammatory response. The nutritional characteristics and antioxidant potential of these wild greens require reconsideration of their role in traditional as well as in contemporary diets. Furthermore, their extracts

might find applications in the prevention of free radical-related diseases, as functional food formulations.

I. INTRODUÇÃO

1.1. Consumo de verduras silvestres na Península Ibérica

Na Península Ibérica há uma larga tradição de consumo de verduras silvestres, como se documenta em inventários etnobotânicos realizados em várias regiões de Espanha e Portugal (Tardio *et al.*, 2005; Tardio *et al.*, 2006; Hadjichambis *et al.*, 2008; Polo *et al.*, 2009; Carvalho, 2010; Carvalho & Morales, 2010). A consulta dos trabalhos referidos permite identificar muitas espécies silvestres que eram habitualmente colhidas e consumidas de várias formas. Folhas basais, rebentos jovens, caules aéreos e subterrâneos, folhas expandidas, flores e inflorescências, frutos e sementes, de muitas dessas espécies silvestres eram, e algumas ainda são, consumidas cruas e cozinhadas, como aperitivos, entradas ou “mata-bicho”, em sopas ou como acompanhamento de pratos principais, em conservas doces ou salgadas, e também sob a forma de refrescos, tisanas, licores e bebidas fermentadas.

Em tempos de escassez, de menor disponibilidade e acesso a outros alimentos, estas verduras silvestres foram, certamente, uma importante fonte de vitaminas e minerais para as populações dos meios rurais. Além disso, a muitas destas espécies também se lhe atribuem virtudes medicinais pelo que se comiam também pelos efeitos terapêuticos que lhes estão associados (Tardio *et al.*, 2006; Carvalho, 2010).

Actualmente, graças ao avanço das tecnologias agrícola e de conservação de produtos vegetais, que permitem produzir em quantidade e qualidade e fora da época mais favorável, mas também ao desenvolvimento de novas técnicas de marketing e comercialização, é fácil encontrar nos mercados, mesmo nas regiões mais afastadas dos grandes centros populacionais, uma boa diversidade de frutas, verduras e outros legumes, disponíveis durante todo o ano.

Esta disponibilidade de produtos frescos teve como consequência directa um decréscimo do consumo de espécies silvestres e indirectamente, uma perda de conhecimentos e saberes tradicionais relativos às espécies, locais de ocorrência, épocas e técnicas de colheita, modos de consumo e preparação e sobretudo precauções e restrições de consumo, questão muito importante em particular no caso das espécies silvestres. Com efeito, tanto o facto destes saberes serem pertença dos mais idosos como

a ausência de transmissão geracional pode implicar alguns problemas relacionados com o consumo sem controlo de certas espécies visto que algumas são, durante parte do seu ciclo de vida, tóxicas para o homem.

Na maioria das regiões estudadas, estas espécies silvestres são tradicionalmente colhidas no final do inverno e início da primavera. Esta sazonalidade é uma das razões que levaram à manutenção do seu uso e consumo nas zonas rurais, uma vez que suplementam e contribuem para a dieta das populações sobretudo durante os períodos em que já se consumiram os produtos agrícolas armazenados e ainda não há novos produtos para colher.

Por vezes, acontece uma segunda época de colheita no Outono, dependendo das condições climáticas de cada região. Por exemplo, no leste e centro de Espanha, os agriões, *Rorippa nasturium-aquaticum*, são colhidos uma segunda vez devido ao clima ameno e húmido que se faz sentir, o qual propicia a germinação das sementes produzidas no início do verão e uma nova fase de jovens plantas com boas características organolépticas (caules pouco fibrosos, tenrura das folhas e ausência de flores). Ainda em Espanha, na região oeste da província da Estremadura, cujos invernos são bastante amenos, espécies como as merujas e as azedas (respectivamente, *Montia fontana* e *Rumex* sp.pl.) eram colhidas também entre Dezembro e Março. Estas espécies eram então vendidas nos mercados ou porta-a-porta, sendo hoje em dia muito raro encontrá-las à venda (Blanco & Cuadrado, 2000).

Apesar de ao longo das três últimas décadas, ter caído em desuso a colheita de espécies silvestres e de ser notória a quebra no consumo destas plantas (Carvalho, 2010; Carvalho & Morales, 2010), actualmente observa-se um interesse crescente pelos produtos naturais de origem vegetal, e consequentemente, pelas plantas silvestres comestíveis. Por esse motivo e pela sua relevância, tanto em termos de biodiversidade e conservação das espécies, como em termos da segurança alimentar, nutrição e saúde humana, os temas das plantas silvestres alimentares e da biodiversidade agrícola foram objecto de uma recente iniciativa transversal levada a cabo pela Convenção sobre Diversidade Biológica (CBD, 2005, disponível em <http://www.cbd.int/agro/food-nutrition/issues.shtml>) que pretende chamar a atenção para a diversidade de recursos vegetais e animais que constituem muitas das dietas humanas e que fornecem componentes nutritivos básicos, e, simultaneamente, desenvolver acções de

preservação, divulgação e uso sustentável destes recursos contribuindo assim para a manutenção da biodiversidade, das práticas e dos saberes e para a segurança alimentar de muitas regiões do globo (Programme Biodiversity for Food and Nutrition, COP 8 Decision VIII/23, disponível em <http://www.cbd.int/decision/cop/?id=11037>). A **Tabela 1** dá alguns exemplos do aproveitamento alimentar de plantas silvestres retirados da bibliografia e compilados por Tardio *et al.* (2005) e Carvalho (2010).

Estudos recentes (Heinrich *et al.*, 2005; The Local Food-Nutraceutical Consortium, 2005) mostram que estas plantas têm especial interesse pelo seu papel na manutenção de uma dieta equilibrada e como fonte de vitaminas, minerais e nutracêuticos.

Outros estudos parecem mostrar que os efeitos benéficos de frutas e legumes na prevenção do risco de doenças cardiovasculares e cancro pode não estar relacionado com o efeito dos bem caracterizados antioxidantes, tais como a vitamina E e C e β -caroteno, mas sim com outros fitoquímicos antioxidantes ou não-antioxidantes, ou com uma acção aditiva de diferentes compostos presentes em alimentos como o ácido α -linolénico, diversos compostos fenólicos e fibras (Simopoulos, 2003).

Tabela 1. Consumo de verduras silvestres (excluídas as condimentares) na Península Ibérica: exemplos de espécies frequentemente citadas na bibliografia.

Família/Espécie	Parte usada/consumo	Família/Espécie	Parte usada/consumo
APIACEAE		CUCURBITACEAE	
<i>Apium nodiflorum</i> Lag	Folhas, cruas em salada	<i>Bryonia dioica</i> Jacq	Rebentos do ano, salteados, tortilhas
<i>Eryngium campestre</i> L	Ápices caulinares, cru, snack	DIOSCOREACEAE	
<i>Foeniculum vulgare</i> Miller	Folhas basais, cru em saladas, sopas	<i>Tamus communis</i> L.	Rebentos do ano, salteados, tortilhas
ASTERACEAE		FABACEAE	
<i>Carduus tenuiflorus</i> L.	Folhas basais, cru em saladas e verduras cozidas	<i>Astragalus cymbaearpos</i> Brot.	Frutos imaturos, crus, snack
<i>Chondrilla juncea</i> L.	Folhas basais e rebentos, cru em saladas	<i>Astragalus pelecinus</i> (L.) Barneby	Frutos imaturos, crus, snack
<i>Cichorium intybus</i> L.	Folhas basais e rebentos, cru em saladas	<i>Lathyrus cicera</i> L.	Frutos imaturos e sementes, crus ou cozinhados
<i>Lactuca serriola</i> L.	Folhas basais, cru em saladas	<i>Vicia</i> sp. Pl	Frutos imaturos, crus, snack
<i>Sonchus</i> sp.pl.	Folhas basais e rebentos caulinares, cru, saladas	LILLIACEAE	
<i>Taraxacum</i> sp.pl.	Folhas basais, cru em saladas	<i>Allium ampeloprasum</i> L. (Bolbo e ápices caulinares, crus ou cozinhados
BORAGINACEAE		<i>Asparagus acutifolius</i> L.	Rebentos do ano, salteados, tortilhas, arroz
<i>Anchusa azurea</i> Miller	Flores, snack	POACEAE	
<i>Borago officinalis</i> L.	Folhas, verduras cozidas e sopas	<i>Stipa gigantea</i> Link (Rebentos caulinares, crus, snack e saladas
<i>Echium plantagineum</i> L.	Folhas, verduras cozidas e sopas	POLYGONACEAE	
BRASSICACEAE		<i>Rumex acetosa</i> L.	Folhas, cruas em salada
<i>Capsella bursa-pastoris</i> Medicus	Flores e folhas jovens, snack	<i>Rumex acetosella</i> L.	Folhas, cruas em salada
<i>Rorippa nasturtium-aquaticum</i> Hayek	Folhas, cruas em salada e sopas	<i>Rumex induratus</i> Boiss. & Reuter	Folhas, cruas em salada
CANNABACEAE		<i>Rumex obtusifolius</i> L.	Folhas, sopas
<i>Humulus lupulus</i> L.	Rebentos do ano, salteados, tortilhas	PORTULACACEAE	
CHENOPODIACEAE		<i>Montia fontana</i> L.	Parte aérea, crua em salada
<i>Beta maritima</i> L.	Folhas, sopas	<i>Portulaca oleracea</i> L.	Parte aérea, crua em salada e sopas

 Fonte: Tardio *et al.*, 2005; Carvalho, 2010.

1.2. Potencialidades nutricionais e nutracêuticas das verduras silvestres

1.2.1. *Preâmbulo*

Muitas plantas representam uma fonte de antioxidantes naturais que podem levar ao desenvolvimento de nutracêuticos e fármacos com acção anti-inflamatória, digestiva, antinecrótica, neuroprotectora e hepatoprotectora, podendo envolver um mecanismo antioxidante e/ou captador de radicais livres (Perry *et al.*, 1999; Lin & Huang, 2002; Repetto & Llesuy, 2002).

Nos dias de hoje, os consumidores exigem informações mais detalhadas sobre o valor nutricional e ingredientes que constituem os alimentos. Além disso, requerem novas formulações consistentes com as mais recentes recomendações em termos de saúde. Assim, além da composição nos macronutrientes e micronutrientes habituais, parece também importante fornecer informações sobre a composição em compostos bioactivos e capacidade antioxidante dos alimentos (Hassimoto *et al.*, 2009).

Os macronutrientes (glúcidos, proteínas e lípidos) são maioritários na dieta de um indivíduo, fornecendo energia e nutrientes essenciais necessários ao crescimento e sobrevivência. Os micronutrientes (nomeadamente vitaminas ou minerais) são necessários em quantidades muito pequenas para orquestrar um conjunto de funções fisiológicas, mas não podem ser produzidos pelo próprio organismo. Os não-nutrientes activos (compostos químicos encontrados em certos alimentos que não são essenciais às funções do organismo, mas melhoram a saúde tendo um papel activo ou protector) são também, juntamente com os nutrientes, muito importantes na dieta humana. Fitoquímicos antioxidantes como os compostos fenólicos são um bom exemplo de não-nutrientes saudáveis (Ferreira *et al.*, 2009).

Vários estudos epidemiológicos sugerem que uma ingestão elevada de alimentos ricos em antioxidantes naturais aumenta a capacidade antioxidante do plasma e reduz o risco de alguns tipos de cancro, doenças cardiovasculares e acidente vascular cerebral (Justesen & Knuthsen, 2001; Hassimoto *et al.*, 2009). Estas propriedades são atribuídas a vários constituintes, incluindo vitaminas e numerosos fitoquímicos, principalmente compostos fenólicos como os flavonóides (Justesen & Knuthsen, 2001).

Os vegetais são conhecidos como excelentes fontes de antioxidantes naturais e o consumo de plantas frescas na dieta pode, portanto, contribuir para a ingestão diária de

antioxidantes. Efectivamente, as plantas são uma fonte natural de compostos bioativos eficazes, incluindo antioxidantes, como polifenóis, vitaminas, carotenóides, ácidos gordos insaturados e açúcares redutores, que podem ser aplicados, por exemplo, como aditivos alimentares e como ingredientes na formulação de alimentos funcionais e nutracêuticos (Loziene *et al.*, 2007).

1.2.2. Compostos fenólicos

Estudos epidemiológicos e experimentais revelaram uma relação inversa entre o consumo de dietas ricas em frutos e vegetais e o risco de doenças crónicas como doenças cardiovasculares, artrite, inflamações crónicas e cancro (Saleem *et al.*, 2002; Prior, 2003; Chen *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). Estas funções fisiológicas dos frutos e vegetais podem ser atribuídas, em parte, à sua abundância em compostos fenólicos que têm efeitos captadores de radicais livres. Os polifenóis podem ainda ligar-se a iões metálicos e formar complexos, o que constitui outro tipo de função antioxidante deste grupo de compostos (Niki, 2010).

Os compostos fenólicos são fitoquímicos ubíquos no reino *Plantae*, entre os quais se encontram os fenóis simples, ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos), estilbenos, flavonóides, biflavonóides e proantocianidinas (**Figura 1**) ou compostos altamente polimerizados. Estes compostos são originados a partir das vias do xiquimato e do acetato-malonato (Silva *et al.*, 2007).

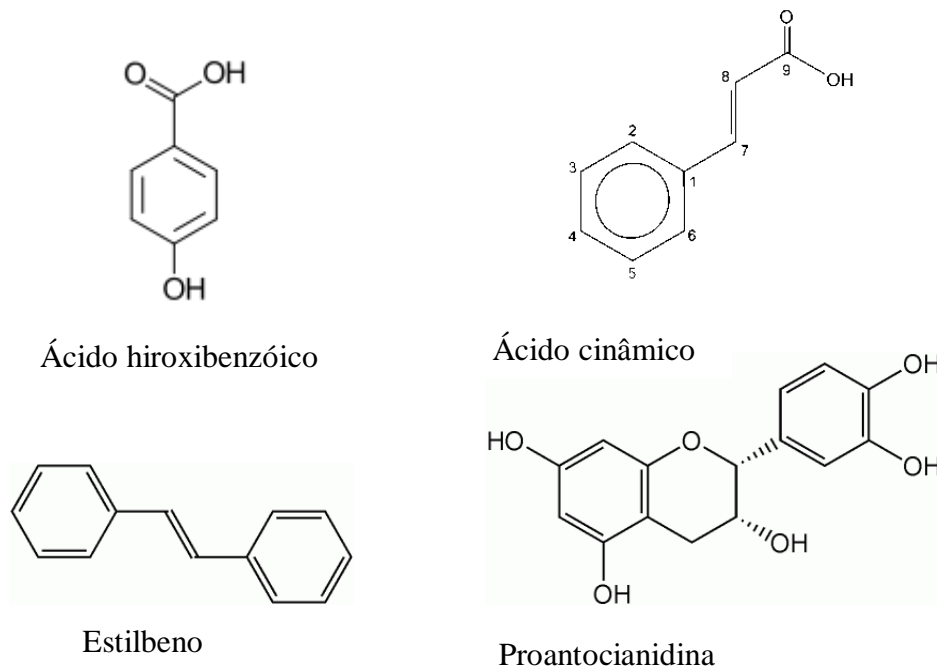


Figura 1. Estrutura química de diferentes classes de compostos fenólicos.

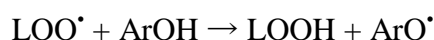
A presença destes compostos em plantas tem sido muito explorada não só pela sua actividade antioxidante mas também pela acção farmacológica e anti-nutricional, inibindo a oxidação lipídica e a proliferação de fungos (Nagem *et al.*, 1992; Gamache *et al.*, 1993; Ivanova *et al.*, 1997; Aziz *et al.*, 1998; Fernandez *et al.*, 1998; Hollman & Katan, 1998), participando ainda em processos responsáveis pela cor, aroma e adstringência de alguns alimentos (Peleg *et al.*, 1998).

Os compostos polifenólicos desempenham funções anti-histamínicas, anti-inflamatórias, antibacterianas e antivirais. Demonstram, ainda, actuar ao nível cardiovascular com efeito vasodilatador, sendo esta propriedade atribuída à capacidade destes compostos para aumentar a actividade da síntese de óxido nítrico endotelial (eNOS) em mais de 400% (Nathan & Brumaghim, 2009); actuam, ainda, na prevenção de doenças neurodegenerativas (Lau *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2008), osteoporose (Weaver & Cheong, 2005) e cancro (Yang *et al.*, 2001; Nichenametla *et al.*, 2006). Para além disso, demonstram também a capacidade de ligação a diferentes proteínas como as caseínas (Lorenz *et al.*, 2007) e de inibição da telomerase (Naasani *et al.*, 2003), α -amilase, pepsina, tripsina e lipase (He *et al.*, 2007), entre outras enzimas. Por outro lado, os polifenóis têm também a capacidade de inibir a oxidação das lipoproteínas de baixa

densidade (LDL) *in vivo* e *ex vivo* (Lamuela-Raventos *et al.*, 2004) protegendo, assim, de doenças cardiovasculares (Weisburger, 1999; Engler & Engler, 2006).

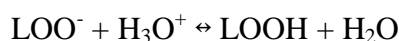
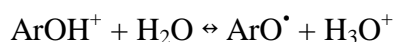
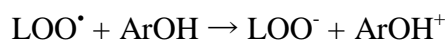
Algumas das propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos (ArOH) parecem estar relacionadas com os seus grupos fenólicos através de mecanismos de transferência de:

(i) átomos de hidrogénio (exemplificada para o processo de peroxidação lipídica):



O radical ArO^\bullet deve ser relativamente estável para que reaja lentamente com o substrato LH, mas rapidamente com LOO^\bullet , interrompendo as reacções em cadeia (Wright *et al.*, 2001).

(ii) electrão (exemplificada para o processo de peroxidação lipídica):



A equação global deste processo é idêntica à apresentada no mecanismo anterior (Wright *et al.*, 2001).

A separação, identificação e quantificação destes compostos em alimentos tem suscitado muitos problemas metodológicos uma vez que englobam uma grande gama de substâncias e, por outro lado, têm uma grande polaridade na maioria dos casos, sendo muito reactivos e susceptíveis à acção enzimática (King & Young, 1999).

O método mais utilizado quando se pretende determinar estes compostos envolve o reagente de Folin-Ciocalteu (RFC), cuja natureza química se desconhece sendo, no entanto, genericamente aceite conter complexos de ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico. Neste método, os compostos fenólicos e outras espécies redutoras cedem electrões ao molidénio, em meio alcalino, originando complexos azuis passíveis de monitorização espectrofotométrica a comprimentos de onda de 750-765 nm (Magalhães *et al.*, 2008). Para possibilitar a reacção entre os compostos fenólicos e o RFC é adicionada uma solução de carbonato de sódio de forma a aproximar o pH de 10 (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

O método foi inicialmente aplicado na determinação de fenóis totais em vinho por Singleton e Rossi, tendo sido desde então aplicado a muitas outras matrizes. Trata-se de um método simples, útil e reprodutível, apesar da natureza química exacta do RFC

ser indefinida (Huang *et al.*, 2005). No entanto, este método apresenta algumas limitações que se prendem com a falta de padronização aquando da utilização de outros padrões de referência como os equivalentes em catequina, ácido tânico, ácido clorogénico, ácido cafeico e ácido ferúlico, que podem conduzir a diferentes resultados. O facto do RFC não ser específico para compostos fenólicos, podendo ser reduzido por outros compostos não-fenólicos como açúcares redutores e ácido ascórbico, representa outra limitação do método, bem como o facto da absorvância final ser proporcional ao número de grupos hidroxilo fenólicos reactivos, dependendo ainda da estrutura da molécula. Não tem aplicação em antioxidantes lipofílicos quando realizado em meio aquoso. Apesar do RFC ser utilizado, na verdade, para medir a capacidade redutora de uma amostra, isto não é reflectido na sua denominação (Karadag *et al.*, 2009). Devem, portanto, ser utilizadas outras técnicas como espectrometria de massa ou ressonância magnética nuclear como complemento das técnicas cromatográficas na identificação e quantificação de compostos fenólicos.

1.2.3. Flavonóides

Os flavonóides presentes nas plantas são responsáveis pelas suas propriedades sensoriais, como a adstringência e o amargor (Harborne & Williams, 2000). Encontram-se divididos em várias famílias como os flavonóis, flavan-3-óis, flavonas, flavanonas, antocianinas, chalconas, entre outros (**Figura 2**), sendo que os componentes mais abundantes nas plantas são os flavonóis, os flavan-3-óis e as antocianinas (Robards & Antolovich, 1997).

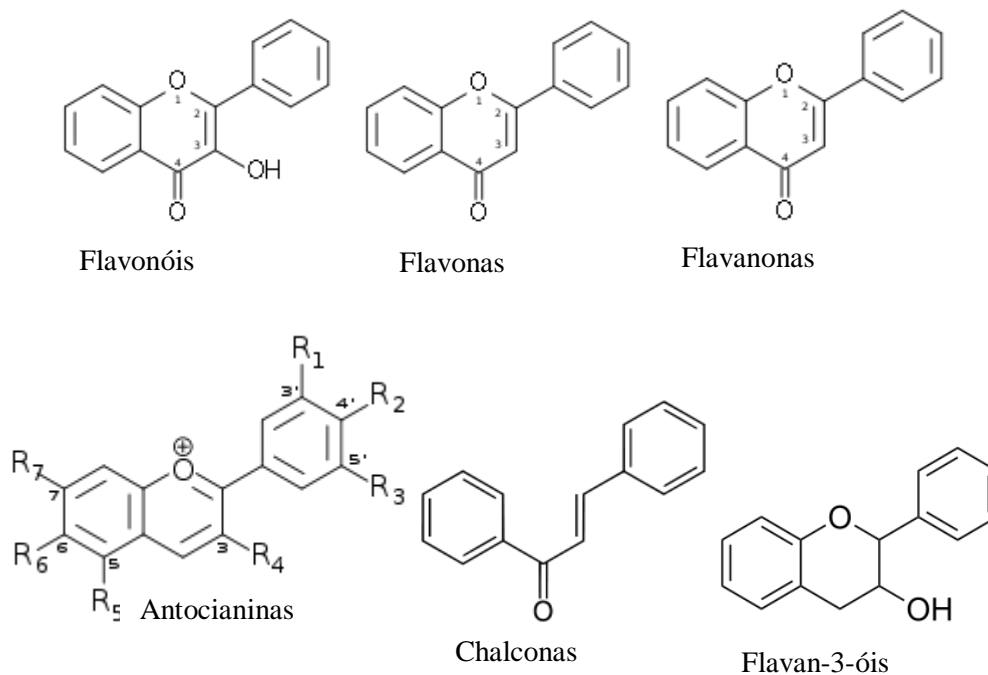


Figura 2. Estrutura química de diferentes classes de flavonóides.

Estes compostos, bem como outros compostos fenólicos derivados de plantas, entre eles os ácidos fenólicos, os taninos, as lenhanas e a lenhina, são comuns nas folhas, rebentos e partes lenhosas (Amarowicz *et al.*, 2004). São reconhecidos antioxidantes dietéticos uma vez que os grupos hidroxilo próximos de sistemas de electrões- π conjugados cedem muito facilmente hidrogénio às espécies reactivas de oxigénio (ROS) e às espécies reactivas de azoto (RNS) (Milbury *et al.*, 2006). Assim, os flavonóides apresentam uma grande bioactividade enquanto antioxidantes, não só pelas suas capacidades redutoras, mas também pela influência exercida no estado oxidativo intracelular (Hernandez-Montes *et al.*, 2006), podendo ainda ter actividade anti-depressiva e melhorar a função cognitiva (Samman *et al.*, 2003).

As isoflavonas actuam também ao nível da modulação das vias de sinalização celular, interacção com a mitocôndria e alterações na expressão genética (Hernandez-Montes *et al.*, 2006), podendo os efeitos benéficos destes compostos estar relacionados com a capacidade que as isoflavonas têm de aumentar as defesas antioxidantes da célula através da estimulação de enzimas como a catalase, a superóxido dismutase, a glutatona peroxidase e a glutatona redutase (Suzuki *et al.*, 2002). Estes compostos podem, ainda,

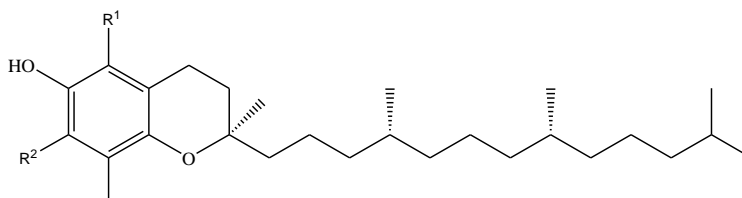
aumentar os níveis celulares de glutathiona reduzida regulando, assim, a síntese de glutathiona nas células (Hernandez-Montes *et al.*, 2006).

Na determinação dos flavonóides utiliza-se frequentemente um método colorimétrico que consiste na adição de um reagente contendo cloreto de alumínio e nitrito de sódio à amostra a analisar dando-se, assim, a formação de um complexo flavonóide-alumínio que, em meio alcalino, apresenta uma coloração rosa (Jia *et al.*, 1999). Através deste método, é possível evitar interferências nas medidas de absorvância uma vez que os complexos formados a partir do catião alumínio com os flavonóides em metanol absorvem em comprimentos de onda superiores com intensificação da absorção, ao contrário do que se verifica nos complexos formados por ácidos fenólicos com cloreto de alumínio. No entanto, apesar dos desvios verificados serem muito pequenos ou nulos entre diferentes ensaios de uma mesma amostra, o método pode ser pouco exacto, fornecendo, geralmente, valores ligeiramente inferiores relativamente à quantidade de flavonóides totais presente na amostra (Chang *et al.*, 2002).

As antocianinas e os flavonóis podem também ser determinados espectrofotometricamente por leitura das absorvâncias a 360 nm e a 520 nm, respectivamente (Glories, 1979; Romani *et al.*, 1996; Mazza *et al.*, 1999).

1.2.4. Tocoferóis

Os tocoferóis (**Figura 3**) são compostos quimicamente semelhantes que, juntamente com os tocotrienóis, são denominados por Vitamina E (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996).



$R^1=R^2=Me$	α -tocoferol
$R^1=Me, R^2=H$	β -tocoferol
$R^1=H, R^2=Me$	γ -tocoferol
$R^1=R^2=H$	δ -tocoferol

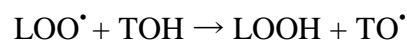
Figura 3. Estrutura química de tocoferóis.

Esta vitamina desempenha um papel relevante a nível intracelular uma vez que, quando presente em baixas concentrações, se verifica um aumento da fragilidade da membrana e da susceptibilidade ao ataque de radicais livres, o que torna a vitamina E um dos mais importantes antioxidantes. As suas isoformas estão, ainda, envolvidas em processos anti-tumorais a nível dos tecidos (Nesaretnam *et al.*, 1995).

Para além da capacidade de atenuar o envelhecimento (Blackett & Hall, 1981) e reforçar o sistema imunitário e prevenir doenças cardiovasculares e certos tipos de cancro (Nikiforova *et al.*, 1995; Traber & Packer, 1995), reduz também a carga viral em pessoas afectadas com HIV (Allard *et al.*, 1998), mantém a hidratação da pele (Kramer-Stickland *et al.*, 1999) e coadjuva os tratamentos do síndrome de Parkinson (Fahn, 1987). O α -tocoferol é o vitâmero que apresenta maior actividade biológica, sendo um eficaz captador de radicais livres.

O γ -tocoferol e o seu metabolito fisiológico, o 2,7,8-trimetil-2-(β -carboxietil)-6-hidroxicromano, podem ter propriedades anti-inflamatórias similares às dos fármacos não esteróis com as mesmas propriedades uma vez que inibem a formação da prostaglandina (Jiang *et al.*, 2000). O γ -tocoferol pode ainda participar na prevenção de doenças cardiovasculares devido às suas propriedades anti-inflamatórias (Rejón *et al.*, 2002). Os tocoferóis podem estabilizar os ácidos gordos presentes nos alimentos prevenindo a rancificação durante o armazenamento (Li *et al.*, 2007).

Os tocoferóis actuam como antioxidantes no processo de peroxidação lipídica através da cedência de um átomo de hidrogénio a radicais peroxilo provenientes de ácidos gordos polinsaturados dos fosfolípidos membranares ou lipoproteínas, dando origem a um hidroperóxido lipídico estável (LOOH) e a um radical tocoferoxilo (TO \cdot) que, por sua vez, reage com outros radicais peroxilo ou tocoferoxilo originando compostos mais estáveis (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996; Lampi *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2009).



Estes compostos podem ainda reagir com radicais alcóxilo (LO \cdot) formados no passo de propagação (LO \cdot + TOH \rightarrow LOH + TO \cdot) ou, em condições limitantes de oxigénio e baixas concentrações de hidroperóxidos, podem reagir directamente com radicais L \cdot (L \cdot + TOH \rightarrow LH + TO \cdot) (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996).

A técnica normalmente eleita para a determinação da vitamina E é a cromatografia líquida de alta eficiência de fase normal (NP-HPLC) (Alasalvar *et al.*,

2003; Hewavitharana *et al.*, 2004; Kamal-Eldin *et al.*, 2000; Pyka & Sliwiok, 2001; Panfili *et al.*, 2003), no entanto, vários métodos por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) foram já ensaiados (Rupérez *et al.*, 2001; Escrivá *et al.*, 2002; Gliszczynka-Swiglo & Sikorska, 2004), tendo-se verificado que não permite resolver os vitâmeros β e γ (Kamal-Eldin *et al.*, 2000; Rupérez *et al.*, 2001; Pyka & Sliwiok, 2001; Alasalvar *et al.*, 2003). Para além disso, a NP-HPLC favorece a solubilidade dos lípidos e a capacidade de carga por permitir a utilização de solventes orgânicos (Kamal-Eldin *et al.*, 2000; Rupérez *et al.*, 2001). Para garantir a eficácia do método, vários parâmetros como a coluna e o eluente devem ser tidos em conta para evitar problemas como a adsorção irreversível dos tocoferóis; o modulador de polaridade deve também ser ensaiado em diferentes concentrações de modo a conseguir um boa separação dos diferentes vitâmeros (Amaral *et al.*, 2005).

1.2.5. Ácido ascórbico

O ácido ascórbico (Figura 4), vulgarmente designado por vitamina C, é um indicador comumente utilizado para avaliar a qualidade de alimentos congelados. Para além dos seus benefícios para a saúde humana, é geralmente observado que se este composto se encontra bem preservado nos alimentos, então também os restantes nutrientes estão ainda presentes nos mesmos (Lin *et al.*, 1998). Existe, geralmente, um equilíbrio reversível entre o ácido ascórbico e o ácido desidroascórbico, sendo este último irreversivelmente hidrolisado a ácido 2,3-dicetogulónico que não tem a actividade da vitamina C. A degradação da vitamina C é afectada pelo potencial oxidação-redução no meio da reacção (Serpen & Gokmen, 2007).

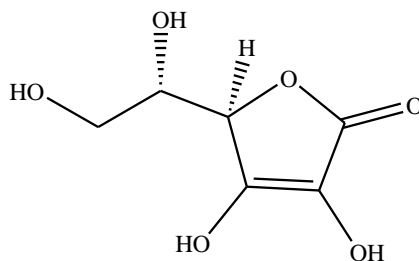
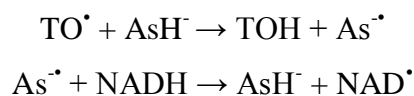


Figura 4. Estrutura química do ácido L-ascórbico.

A vitamina C e a vitamina E actuam sinergicamente na interface membrana-citosol regenerando a forma de vitamina E oxidada ligada à membrana (Chew, 1995; Nagaoka *et al.*, 2007). Sendo a vitamina E um antioxidante lipofílico, pode interagir com componentes lipídicos das membranas celulares ou com lipoproteínas de baixa densidade, protegendo-os de danos oxidativos. Os tocoferóis são, assim, oxidados e transformados em radicais tocoferoxilo reactivos que podem, então, reagir com lípidos insaturados ($\text{TO}^\bullet + \text{LH} \rightarrow \text{TOH} + \text{L}^\bullet$) ou hidroperóxidos lipídicos ($\text{TO}^\bullet + \text{LOOH} \rightarrow \text{TOH} + \text{LOO}^\bullet$), iniciando a oxidação lipídica (efeito pro-oxidante).

De forma a evitar este efeito, a vitamina E oxidada é novamente reduzida à sua forma antioxidante por substâncias redutoras em fase aquosa, como a vitamina C. O ião ascorbato (AsH^-) reage com o radical tocoferoxilo originando o radical ascorbato (semidesidroascorbato) que tem a capacidade de regenerar o ião ascorbato numa reacção catalisada pela semidesidroascorbato redutase (Li & Schellhorn, 2007; Nagaoka *et al.*, 2007).



Para além disso, o ascorbato pode também sequestrar radicais aquosos no plasma antes que estes possam oxidar a vitamina E da fase lipídica. Estas interacções são muito importantes na protecção das células uma vez que a concentração individual de cada um destes antioxidantes pode não ser suficiente para proteger efectivamente as células da peroxidação lipídica (Chew, 1995).

A determinação de vitamina C é normalmente feita espectrofotometricamente e um dos ensaios mais utilizados baseia-se na reacção colorimétrica com o 2,6-dicloindofenol.

1.2.6. Carotenóides

O interesse da determinação de carotenóides em diversos alimentos tem vindo a aumentar devido aos seus possíveis benefícios para a saúde.

A determinação destes compostos é obtida a partir da absorvância total a um determinado comprimento de onda ou, habitualmente, por técnicas cromatográficas. Particularmente, os métodos de HPLC permitem uma separação mais eficiente dos carotenóides, embora nas tabelas frequentemente disponíveis da composição de

alimentos, se encontrem expressos apenas o β -caroteno (**Figura 5**) e equivalentes de β -caroteno ou equivalentes de retinol (McCance & Widdowson, 1991; Souci *et al.*, 1986).

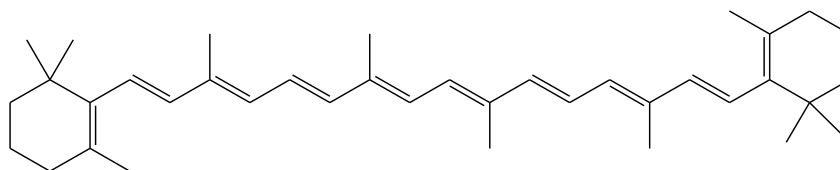


Figura 5. Estrutura química do β -caroteno.

Esta molécula é um carotenóide pertencente à classe dos terpenos (lípidos simples) e apresenta uma estrutura poliisoprénica com uma longa cadeia de ligações duplas conjugadas responsável pela sua reactividade química e propriedades de absorção de luz, apresentando em cada extremidade da molécula um ciclo-hexeno substituído (Lehninger *et al.*, 2008).

Os carotenóides interrompem reacções em cadeia em ambiente lipídico funcionando como antioxidantes. O facto de apresentarem ligações duplas torna-os susceptíveis ao ataque dos radicais peróxido (LOO^\bullet) dando origem a produtos inactivos. Foram também já descritas interacções sinérgicas entre o β -caroteno e o α -tocoferol na inibição lipídica membranar (Chew, 1995). Por outro lado, os carotenóides exercem também efeitos benéficos na prevenção de doenças nomeadamente cancro, doenças cardiovasculares e osteoporose (Rao & Rao, 2007).

1.2.7. Açúcares

Os glúcidos são, de longe, as moléculas orgânicas mais abundantes na natureza e quase todos os organismos sintetizam e metabolizam essas moléculas (Wade, 1999). O termo hidrato de carbono (também utilizado para referir glúcidos) surgiu do facto dos açúcares mais simples terem a fórmula empírica $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}_n$, onde $n \geq 3$, sugerindo que os átomos de carbono estejam, de alguma forma, combinados com água (Wade, 1999).

A glucose (**Figura 6**), por exemplo, é um monossacárido comum que é oxidado para formar dióxido de carbono e água, fornecendo energia para os processos celulares como síntese de proteínas, circulação e transporte. As plantas apresentam inúmeras moléculas de glucose ligadas entre si para formar moléculas com grande capacidade de armazenamento de energia, tal como o amido. No entanto, as moléculas de glucose

podem estar ligadas para formar uma variedade de outras macromoléculas. A celulose é um componente da parede celular em plantas que é composta por moléculas de glucose ligadas entre si através de ligações glucosídicas β -1,4. Por sua vez, os monómeros de amido encontram-se ligados através de ligações α -1,4 (Wade, 1999).

A frutose (**Figura 6**), comumente designada por açúcar das frutas, é um monossacárido muito abundante nas plantas, podendo encontrar-se ligada à glucose para formar um dissacárido igualmente presente em plantas, denominado por sacarose.

A sacarose (**Figura 6**) é o dissacárido mais amplamente adicionado aos produtos alimentares e tem muitas fontes, sendo dominantes a cana-de-açúcar e a produção de beterraba (MAFF, 1987; COMA, 1989).

Outros dissacáridos que podem ser encontrado em plantas são a trealose, que provém de uma ligação α,α -1,1-glucosídica entre duas unidades de α -glucose, e a rafinose, que é um trissacárido formado por galactose, frutose e glucose (**Figura 6**).

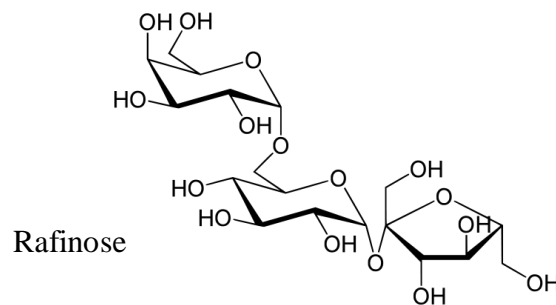
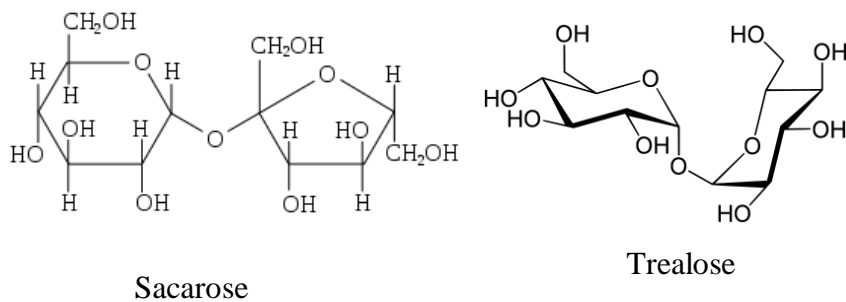
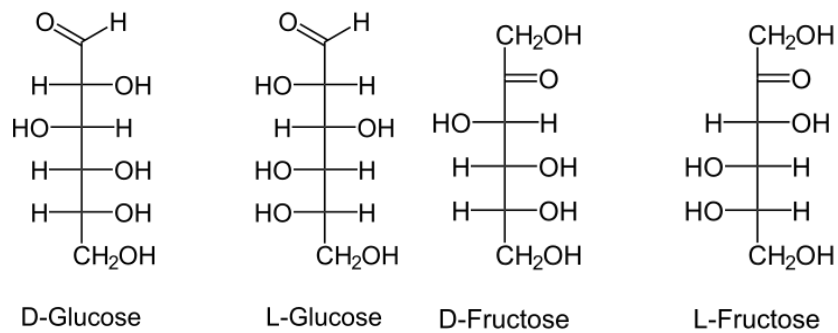


Figura 6. Estrutura química de açúcares encontrados em plantas.

O método mais utilizado na análise destes compostos é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) devido à sua precisão, capacidade de separação e rapidez. Apesar de ter sido descoberta há mais de 20 anos, continua a ser a técnica mais utilizada como é demonstrado pelo grande número de documentos publicados (Jandera & Churacek, 1974; Pirisino, 1984; Menuier *et al.*, 1986; Churms, 1990; Herbreteau, 1992).

A técnica de HPLC acoplada a um detector de índice de refração (RI) é bastante utilizada por razões económicas quando a análise não requer uma elevada sensibilidade, particularmente se as análises forem restritas a glúcidos como a glucose, a frutose e a sacarose. No entanto, o método foi também aplicado com sucesso a glúcidos mais

complexos como a maltose e a rafinose (Glyad & Russian, 2002; Cabalkova *et al.*, 2007). Os detectores RI medem as alterações do índice de refração do eluente induzidas pelo soluto. Em princípio, todos os solutos afectam o índice de refração do eluente, mas a sensibilidade varia, e compostos que não tenham a capacidade de adsorção ou outras propriedades que permitam uma detecção selectiva podem também ser detectados por RI (Bhandari *et al.*, 2008).

O inconveniente deste método está relacionado com as propriedades do eluente, que tornam o sinal do detector muito sensível à sua composição e impede a eluição em gradiente. Devido ao seu tamanho, as biomoléculas são boas dispersoras da luz em solução, permitindo assim a detecção evaporativa com espalhamento de luz (ELSD), onde o sinal é baseado na luz difusa de um aerossol seco produzido por pulverização do eluente numa câmara e evaporando o solvente e outros componentes do eluente. Solutos não voláteis formam micropartículas que são detectadas na fase gasosa ao passar pela célula de detecção. O método ELSD foi usado para detectar glucose, manitol, sacarose e xilose, entre outros, em amostras de Picorhiza da Índia (Bhandari *et al.*, 2008).

1.2.8. Ácidos gordos

Os ácidos gordos são constituintes dos triglicéridos que se encontram entre os componentes vegetais com baixa polaridade. Entre estes compostos encontram-se os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) que podem ser divididos em duas famílias principais, os ómega-3 (ω -3) e os ómega-6 (ω -6), possuindo propriedades anti-inflamatórias e efeitos positivos no tratamento de desordens psiquiátricas (Gurib-Fakim, 2006).

O ácido γ -linolénico é um PUFA ω -6 muito apreciado devido aos seus benefícios nutricionais e medicinais, é um ácido gordo incomum entre as plantas (Horrobin, 1992); este ácido apresenta propriedades anti-inflamatórias muito significativas, sendo a sua principal fonte os óleos de sementes (Gurib-Fakim, 2006).

Outro ácido gordo relativamente incomum em plantas é o ácido estearidónico, PUFA ω -3 (Hegnauer, 1989), o seu consumo pode levar a um atraso do crescimento de células tumorais, ao aumento da eficácia da quimioterapia e redução dos seus efeitos secundários (Harman, 2002).

Ácidos gordos essenciais são aqueles que o organismo não tem a capacidade de produzir como o ácido linoleico e o ácido linolénico, as suas ligações duplas encontram-se localizadas segundo o sistema “malónico” que, durante a oxidação lipídica, se transformam em sistemas conjugados menos estáveis à oxidação. Estes últimos, tendem a dividir-se dando origem a aldeídos e cetonas que, juntamente com outros compostos conferem aos alimentos o “odor a ranço” (Sánchez-Bel *et al.*, 2005). Os ácidos gordos podem ser determinados por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID), após um processo de derivatização (Barros *et al.*, 2010), podendo os resultados ser expressos em percentagem relativa de cada um dos ácidos gordos.

1.3. Avaliação de propriedades antioxidantes

1.3.1. *Stress oxidativo*

Os radicais livres são produzidos, no organismo, durante o funcionamento normal da célula, principalmente sob a forma de ROS, sendo, depois, removidos por espécies antioxidantes presentes na célula (Ferreira & Abreu, 2007; Valko *et al.*, 2007), podendo estas ser definidas como substâncias, moléculas simples ou complexas que, mesmo em baixas concentrações, inibem ou reduzem a oxidação de um substrato oxidável (Niki, 2010) (**Figura 7**). O equilíbrio entre as defesas antioxidantes da célula e a produção de radicais livres é essencial ao funcionamento normal do organismo (Ferreira & Abreu, 2007; Valko *et al.*, 2007). No entanto, o equilíbrio entre a produção de ROS e a presença de antioxidantes pode ser destruído devido a uma produção excessiva das primeiras ou a uma deficiência das defesas da célula (Machlin *et al.*, 1987; Ferreira & Abreu, 2007), este desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes é designado por *stress oxidativo*, que pode levar a danos cumulativos nas proteínas, lípidos e DNA (Dudonné *et al.*, 2009).

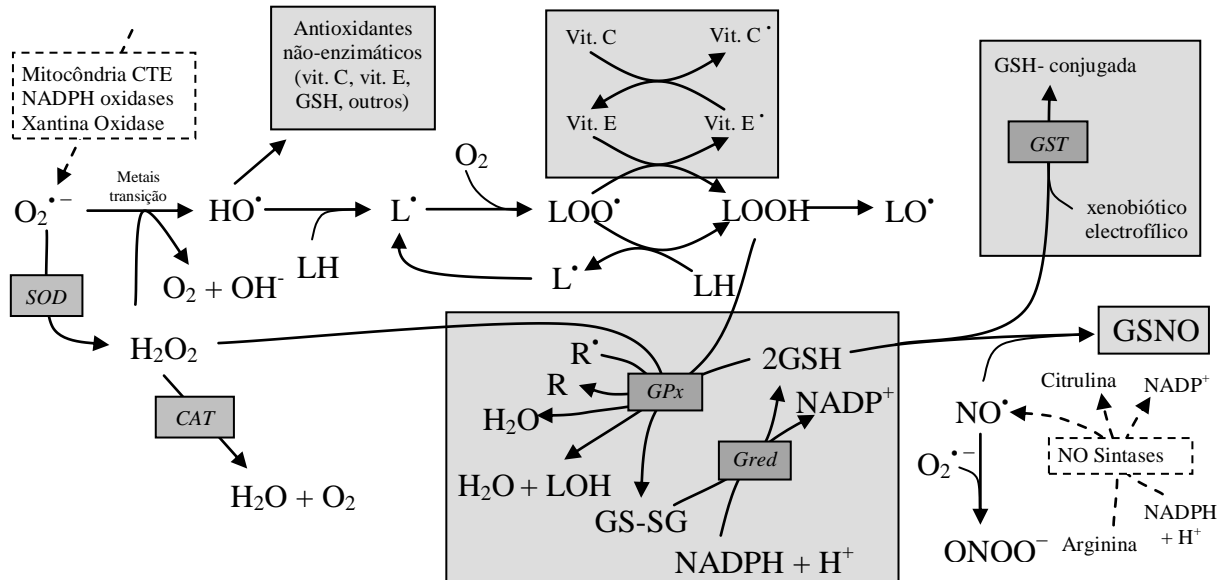


Figura 7. Visão geral das principais reacções envolvendo espécies reactivas de oxigénio (ROS) /espécies reactivas de azoto (RNS), e das principais defesas antioxidantes endógenas, enzimáticas e não-enzimáticas, da célula. Apresentam-se as fontes endógenas de ROS/RNS mais representativas (rectângulos tracejados): Cadeia transportadora de electrões mitocondrial (CTE), NADPH oxidases, Xantina oxidase para ROS e NO sintases para RNS. As principais defesas antioxidantes são representadas em rectângulos sombreados e as enzimas envolvidos aparecem em itálico. Oxigénio molecular (O_2), anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), radical hidroxilo (HO^{\cdot}), ião hidróxido (HO^-), lípidos membranares (LH), radical lipídico (L^{\cdot}), radical peróxido (LOO^{\cdot}), hidroperóxido lipídico ($LOOH$), radical lipídico alcóxido (LO^{\cdot}), óxido nítrico (NO^{\cdot}), radicais (R^{\cdot}), não- radicais (R), álcoois (LOH), glutathiona (GSH), glutathiona dissulfeto (GS-SG), α -tocoferol ou vitamina E (vit. E), radical vitamina E (vit. E $^{\cdot}$), vitamina C (vit. C), radical vitamina C (vit. C $^{\cdot}$), S-nitrosoglutathiona (GSNO), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada ($NADP^+$), reduzida ($NADPH$). Enzimas: Superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (Gred), glutathiona-S-transferases (GST), óxido nítrico sintase (NOS). (Ferreira *et al.*, 2009).

Existem vários tipos de antioxidantes, podendo estes ser classificados quanto ao mecanismo de acção que desempenham na célula: antioxidantes preventivos, captadores, reparadores ou *de novo*.

Os antioxidantes preventivos actuam, como o próprio nome indica, na primeira linha de defesa do organismo, suprimindo a formação de ROS, podendo ser produzidos como intermediários na combustão biológica do processo de respiração, e RNS,

reduzindo o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e hidroperóxidos lipídicos a hidróxidos aquosos ou lipídicos, respectivamente, ou ainda captando iões metálicos como o cobre e o ferro.

Por sua vez, os antioxidantes captadores, funcionam como a segunda linha de defesa, removendo rapidamente espécies activas, impedindo o ataque de moléculas biologicamente essenciais. A superóxido dismutase (SOD) converte o oxigénio (O_2) a H_2O_2 , enquanto os carotenóides captam, física ou quimicamente, singletos de oxigénio (1O_2). Os compostos fenólicos enquadram-se também neste tipo de antioxidantes, actuando como captadores de radicais livres.

As enzimas que actuam numa terceira linha de defesa do organismo são consideradas antioxidantes reparadores, actuando, assim, ao nível da reparação de lesões, da eliminação de resíduos ou da reconstituição de funções perdidas.

Por último, os antioxidantes *de novo*, que constituem a quarta linha de defesa, exercem uma função de adaptação de mecanismos, onde os antioxidantes apropriados são produzidos na altura certa e transferidos nas quantidades certas para as posições adequadas. Os antioxidantes actuam ainda, como foi já evidenciado, como mensageiros de sinalização celular, regulando o nível de compostos antioxidantes e enzimas (Niki, 2010).

Os radicais livres desencadeiam o processo de peroxidação dos lípidos membranares, levando à acumulação de peróxidos lipídicos, que têm a capacidade de danificar uma larga gama de biomoléculas essenciais (**Figura 8**). Estes compostos induzem um *stress* oxidativo que é considerado um factor primário nas doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (Markesbery & Lovell, 2006), doenças cardiovasculares como a arteriosclerose (Vokurkova *et al.*, 2007), causando, ainda, a morte celular e lesões nos tecidos resultantes de enfartes do miocárdio (Ide *et al.*, 2001), envelhecimento e processos inflamatórios (Wang *et al.*, 2007) e cancro (Huang, 2003). Sabe-se também que as lesões dérmicas provocadas por radiação UV envolvem a geração de ROS e RNS, provocando alterações estruturais e funcionais no tecido cutâneo (Herrling *et al.*, 2006).

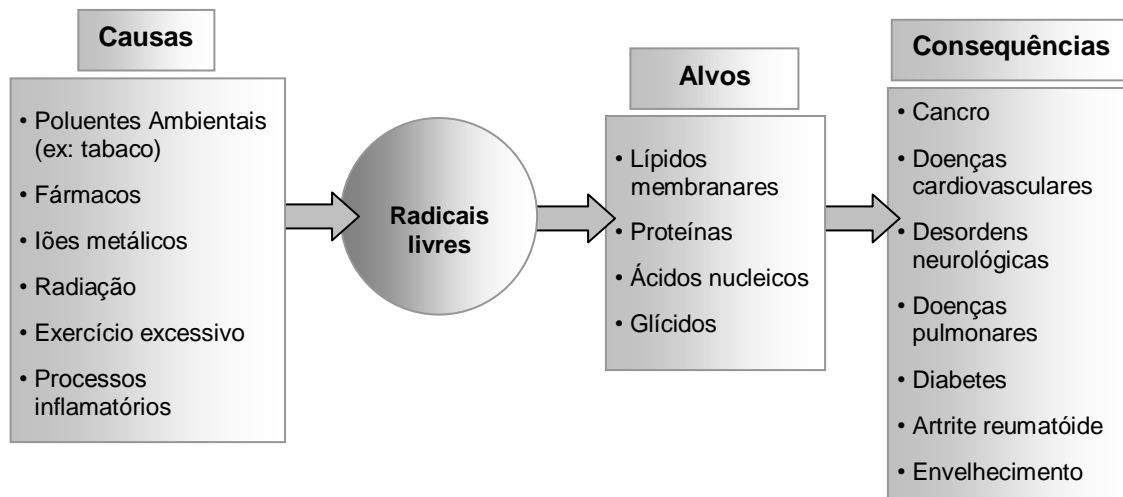


Figura 8. Principais causas para a super-produção de radicais livres (*stress* oxidativo), potenciais alvos celulares e consequências do *stress* oxidativo (Ferreira *et al.*, 2009).

Sendo o *stress* oxidativo induzido por radicais livres, responsável por várias destas doenças crónicas, os fitoquímicos presentes em frutos e vegetais assumem uma crescente importância (Liu 2003; Ferreira & Abreu, 2007).

1.3.2. Métodos de avaliação da actividade antioxidante

De forma a avaliar a eficácia de diversos antioxidantes têm vindo a realizar-se vários estudos baseados em métodos realizados em diferentes condições, embora se verifique, muitas vezes, uma falta de correlação entre as actividades determinadas por diferentes ensaios, em diferentes laboratórios, numa mesma matriz, o que pode ser justificado pela multiplicidade de espécies activas e mecanismos reaccionais envolvidos no *stress* oxidativo de um organismo. Torna-se, assim, necessária a discussão das vantagens e desvantagens associadas a cada método relacionadas com a instrumentação necessária, os mecanismos, a simplicidade, o método de quantificação e a relevância biológica (Niki, 2010).

Tendo em conta que existem vários tipos de capacidade antioxidante, devem ser aplicados os respectivos métodos de forma a incluir os vários modos de acção, não havendo, portanto, nenhum método suficiente por si só (Huang *et al.*, 2005).

Quando se trata de extractos vegetais, a capacidade antioxidante não depende apenas da composição do extracto, mas também das condições do ensaio. Os métodos

de avaliação da capacidade antioxidante total *in vitro* baseiam-se na transferência de átomos de hidrogénio e na transferência de electrões.

No primeiro, o átomo e o substrato entram em competição por radicais peróxido (Haung *et al.*, 2005); não dependem do solvente nem do pH (Wright *et al.*, 2001), e são de rápida acção, no entanto, espécies redutoras como os metais podem causar interferências no método (Prior *et al.*, 2005). Os métodos baseados na transferência de electrões, medem a capacidade de um antioxidante reduzir um oxidante, que ao sofrer redução muda de cor, esta variação da cor está relacionada com a concentração de antioxidante presente (Haung *et al.*, 2005). Dependem do pH e a avaliação da capacidade antioxidante é feita com base na percentagem de diminuição da formação do produto, sendo estas reacções quase sempre longas (Wright *et al.*, 2001). A diferenciação entre estes dois mecanismos pode tornar-se difícil uma vez que ocorrem quase sempre em conjunto em todas as amostras (Karadag *et al.*, 2009).

1.3.3. Ensaio da capacidade de captação de radicais DPPH

Uma vantagem deste método é o facto de não ser afectado por reacções laterais como a quelatação de iões metálicos e a inibição enzimática, ao contrário de certos radicais produzidos em laboratório (Amarowicz *et al.*, 2004).

Imediatamente a seguir à sua preparação, uma solução de DPPH apresenta uma cor violeta forte com um máximo de absorção a 517 nm; quando em contacto com um antioxidante, esta coloração fica menos intensa, logo, as espécies antioxidantes têm a capacidade de captar DPPH convertendo-o a 2,2-difenil-1-picril-hidrazina que, por sua vez, apresenta uma coloração amarela pálida, o que se reflecte numa diminuição da absorvância a 517 nm (**Figura 9**) (Ferreira & Abreu, 2007).

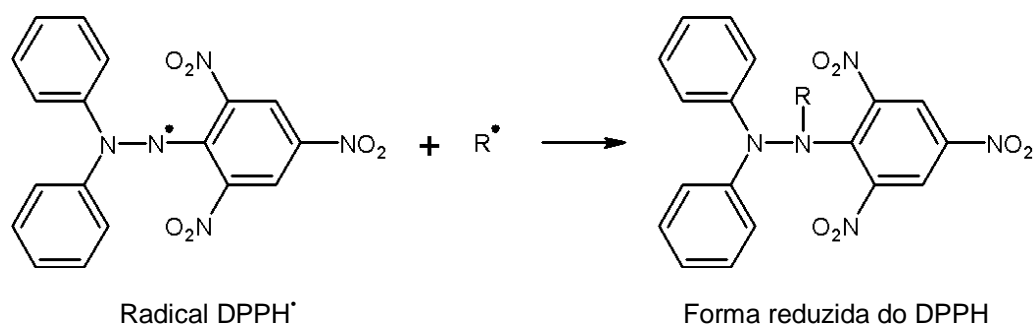


Figura 9. Redução do DPPH[•].

A concentração de antioxidante que causa uma diminuição de 50% da quantidade inicial de DPPH é denominada EC₅₀. Trata-se de uma técnica simples e rápida, sendo portanto frequentemente utilizada, apresenta ainda a vantagem de ser possível recorrer a microplacas no caso de se tratar um grande número de amostras (Karadag *et al.*, 2009).

No entanto, o método apresenta algumas limitações como o facto do DPPH só poder ser dissolvido em meio orgânico (especialmente em solventes alcoólicos) e os resultados poderem ser afectados pelas alterações do DPPH por acção da luz, do oxigénio e do tipo de solvente (Karadag *et al.*, 2009). Para além disso, parte do DPPH coagula acima de um certo limite de percentagem de água, impossibilitando a reacção com antioxidantes, o que se traduz numa diminuição da capacidade antioxidante; por outro lado, existem outros compostos com absorvância a 517 nm, como os carotenóides, podendo interferir nos resultados (Karadag *et al.*, 2009).

Deve ainda ter-se em consideração que o DPPH é um radical estável, podendo os antioxidantes presentes na amostra interferir na redução de outros radicais envolvidos na peroxidação lipídica como os ROO[•], por exemplo, e não ter qualquer efeito ou agir lentamente na captação do DPPH que se torna inacessível aos mesmos (Prior *et al.*, 2005).

1.3.4. Ensaio do poder redutor

A solução de ensaio de Fe(III)/ferricianeto [FeCl₃/K₃Fe(CN)₆], que apresenta uma coloração amarela, é reduzida a Fe(II) pelos agentes antioxidantes presentes na amostra, verificando-se, então, uma alteração da cor para diferentes tipos de verde ou azul; a alteração da cor pode ser medida a 700 nm (Amarowicz *et al.*, 2004). A reacção ocorre em meio ácido (pH = 3,6) para manter a solubilidade do ferro (Karadag *et al.*, 2005). A reacção em pH baixo diminui o potencial de ionização que impulsiona a transferência de electrões e aumenta o potencial redox, causando uma mudança no mecanismo de reacção (Pior *et al.*, 2005).

A química dos ensaios baseados no ferro pode ser resumida pela seguinte equação:



Onde L é o ligando cromogéneo selectivo para o ião ferroso, que produz o complexo corado Fe(II)-L em resultado da reacção redox associada.

Trata-se de um ensaio simples, rápido, económico e bastante fiável, que pode ser aplicado de forma manual, automatizada ou semi-automatizada (Prior *et al.*, 2005).

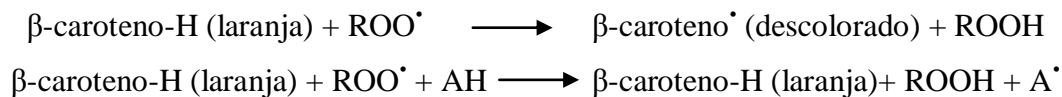
Mas, nem todos os redutores capazes de reduzir o Fe(III) podem ser considerados antioxidantes, qualquer substância capaz de doar electrões com potencial redox inferior ao par Fe(III)/Fe(II) pode influenciar o ensaio. Por outro lado, um antioxidante capaz de reduzir pro-oxidantes, pode não ser capaz de reduzir o Fe(III) não sendo detectados os compostos que captam radicais (Karadag *et al.*, 2009). Outro ponto a ter em consideração é a produção simultânea de Fe(II), que é um conhecido pro-oxidante e pode resultar na produção adicional de radicais, como HO[•] a partir de H₂O₂. Este radical livre é um dos mais nocivos encontrados *in vivo*. Finalmente, compostos que absorvem no mesmo comprimento de onda podem interferir na determinação, causando sobre-estimação dos resultados (Magalhães *et al.*, 2008).

1.3.5. Ensaio de inibição da descoloração do β-caroteno

Os lípidos constituintes do organismo, como o colesterol, os PUFA ou as correspondentes formas esterificadas podem sofrer ataques por parte de radicais livres, responsáveis pela peroxidação lipídica, sendo assim induzidas alterações nas membranas biológicas, o que origina também compostos potencialmente tóxicos. A função dos antioxidantes é retardar este processo em alimentos e amostras biológicas (Blair, 2008).

Quando auto-oxidados pela luz, calor ou radicais ROO[•], os carotenóides podem sofrer uma rápida descoloração (Karadag *et al.*, 2009). Também o β-caroteno sofre descoloração quando se encontra na presença de um radical linoleato. O ácido linoleico possui um grupo metileno bis-alílico activo ao qual é removido um átomo H durante a oxidação, formando-se assim um radical pentadieno que ataca o β-caroteno insaturado para readquirir átomos de H. Quando isto acontece, os carotenóides perdem a sua cor laranja, o que pode ser verificado espectrofotometricamente a 470 nm (Burda & Oleszek, 2001; Amarowicz *et al.*, 2004).

Para inibir a descoloração do β -caroteno basta adicionar uma amostra contendo antioxidantes ou extractos vegetais (Laguerre *et al.*, 2007) pois estes podem ceder átomos de H aos radicais, prevenindo assim a descoloração do β -caroteno:



Este método tem como vantagem o facto de não requerer instrumentação especializada (Amarowicz *et al.*, 2004), tendo também sido sugerida uma versão em microplacas para determinações de rotina (Roginsky & Lissi, 2005). Outra vantagem associada a este método é a sua aplicabilidade em ambientes lipofílicos e hidrofílicos. Além disso, o ensaio de descoloração do β -caroteno pode detectar tanto a acção antioxidante como pro-oxidante de compostos (Ndhlala *et al.*, 2010). A limitação frequentemente apontada a este método é o facto do β -caroteno poder sofrer descoloração a 470 nm por vias múltiplas, podendo por isso a interpretação dos resultados ser difícil (Ndhlala *et al.*, 2010).

1.3.6. Ensaio das substâncias reactivas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Outro método muito utilizado para detectar a peroxidação lipídica é o ensaio TBARS, que se baseia na medição de malondialdeído (MDA) formado por clivagem de ácidos gordos insaturados após oxidação de um substrato lipídico. Quando a formação deste composto provem de ácidos gordos com um número de ligações duplas inferior a três, dá-se a oxidação secundária de compostos carbonilo primários (Fernández *et al.*, 1998). A posterior reacção entre o MDA e o ácido barbitúrico (TBA) origina TBARS que possuem uma coloração rosa que pode ser medida por espectrofotometria a 532 nm (Ng *et al.*, 2000) (**Figura 10**).

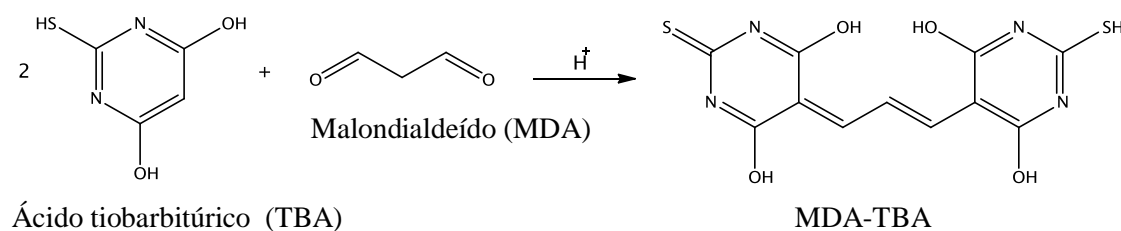


Figura 10. Reacção de MDA e TBA na formação de TBARS.

Numa primeira fase deste ensaio, um ião de um metal de transição ou um radical livre oxida o substrato, só então, e após adição de TBA, se verifica a extensão da oxidação que pode ser medida espectrofotometricamente. Verifica-se, normalmente, uma diminuição da absorvância, uma vez que um antioxidante é adicionado; por esta razão, os resultados são expressos em percentagem de inibição da oxidação (Antolovich *et al.*, 2002).

No TBARS, a detecção é feita por espectrofotometria e o material requerido não é altamente específico. Mas recentemente o MDA-TBA pode ser medido por HPLC com UV/VIS ou detecção de fluorescência, ou por GC-ME, após derivatização (Niki, 2010).

Este ensaio TBARS, é muitas vezes criticado por ser inespecífico, pois mede a formação não só de MDA, mas também de outros oxocompostos (Ndhlala *et al.*, 2010).

1.4. Objectivos e Hipóteses de Estudo

As dietas tradicionais, em particular nas zonas rurais, incluíam quantidades interessantes de verduras, ou seja, rebentos frescos, folhas de plantas por vezes ligadas a pecíolos ou outras estruturas morfológicas e caules aéreos e subterrâneos, que eram comidos crus, em saladas, refogados, cozidos ou cozinhados a vapor e incluídos em tortilhas. A muitas dessas verduras são atribuídas propriedades promotoras da saúde ou preventivas de doenças para além da função básica de fornecer nutrientes (Heinrich *et al.*, 2005; Pardo de Santayana *et al.*, 2005; Carvalho & Morales, 2010).

Assim, no presente trabalho, estudaram-se cinco espécies silvestres comestíveis amplamente consumidas em muitas comunidades rurais da região do Mediterrâneo como verduras de folha (Tardio *et al.*, 2006; Hadjichambis *et al.*, 2008; Carvalho & Morales, 2010): *Borago officinalis* L. (borragem), *Montia fontana* L. (merujas), *Rorippa*

nasturtium-aquaticum (L.) Hayek (agrião), *Rumex acetosella* L. (azedinhas) e *Rumex induratus* Boiss. & Reut. (azedas).

O principal objectivo foi fundamentalmente descrever e caracterizar a composição em macronutrientes, micronutrientes e não-nutrientes das espécies escolhidas. Mas, também se pretendeu validar os conhecimentos e usos empíricos, fornecer novas perspectivas sobre os alimentos regionais e a cozinha tradicional e contribuir com alternativas úteis, passíveis de ser incorporadas nas dietas, de acordo com os princípios da nutrição moderna.

Na análise de macronutrientes determinaram-se proteínas, lípidos, cinzas e glúcidos, segundo procedimentos oficiais de análise, tendo-se também determinado o valor nutricional das amostras. Identificaram-se os perfis individuais de açúcares e de ácidos gordos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de índice de refração (HPLC-RI) e cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama (GC-FID), respectivamente. Na análise de micronutrientes, determinaram-se tocoferóis, por HPLC-fluorescência, ácido ascórbico e carotenóides por técnicas espectrofotométricas. Na análise de não-nutrientes foram determinados compostos fitoquímicos com actividade antioxidante, tais como fenóis, flavonóides, flavonóis e antocianinas. A actividade antioxidante foi avaliada por quatro ensaios realizados *in vitro*: actividade captadora de radicais DPPH, avaliação do poder redutor, capacidade de inibição da descoloração do β -caroteno e inibição da peroxidação lipídica em homogeneizados cerebrais, pelo ensaio TBARS.

II. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Selecção, colheita e preparação de amostras

Com base em inventários etnobotânicos realizados em Trás-os-Montes (Carvalho, 2010), foram seleccionadas cinco espécies silvestres habitualmente utilizadas nessa região: *Borago officinalis* L., *Montia fontana* L., *Rorippa nasturtium-aquaticum* (L.) Hayek, *Rumex acetosella* L. e *Rumex induratus* Boiss. & Reut., designadas, popularmente por borragem, merujas, agrião, azedinhas e azedas, respectivamente.

A colheita dos exemplares silvestres, bem como a escolha das partes da planta mais adequadas para analisar, foi feita de forma a respeitar os critérios e preferências dos consumidores locais (Carvalho, 2010; Carvalho & Morales, 2010), bem como o estágio vegetativo mais adequado ao consumo destas espécies, tendo em conta o padrão de desenvolvimento anual das mesmas. Foi realizada no início da Primavera de 2010, na região de Trás-os-Montes.

Nas amostras de borragem e azedas foram colhidas, respectivamente, as folhas basais jovens e as folhas completamente expandidas, de plantas situadas na beira de caminhos rurais. As folhas de azedinhas, por sua vez, foram colhidas em prados e as partes aéreas de merujas e agrião, em ribeiras de água corrente.

De acordo com inventários etnobotânicos já mencionados, o consumo adequado, as características organolépticas e os benefícios para a saúde estão relacionados com o local de colheita e o estágio de desenvolvimento vegetativo de cada espécie. Considerando a época mais favorável de colheita, estas plantas são conhecidas pelas suas propriedades antioxidantes e nutricionais. São usadas cruas ou cozinhadas, com excepção da borragem que é consumida principalmente cozida, porque, segundo vários informantes, quando utilizada em cru tem efeitos nocivos e é prejudicial à saúde (Carvalho, 2010).

Exemplares de cada espécie encontram-se depositados no Herbário da Escola Superior Agrária de Bragança (BRESA). As amostras foram liofilizadas usando o equipamento Ly-8-FM-ULE (Snijders, Holanda), reduzidas a pó e mantidas a -20 °C até posterior análise.

2.2. Caracterização botânica das plantas estudadas

O *Borago officinalis* L. é uma planta herbácea anual uni ou multicaule, da família *Boraginaceae*, com indumento muito denso, de pelos longos e curtos, especialmente abundantes na inflorescência. Apresenta um caule até 70 cm, simples ou pouco ramificado e folhas com limbo de largamente a estreitamente oval, oval-elíptico ou elíptico, estreitando gradualmente num pecíolo. As folhas da base com pecíolo mais comprido (15 cm) e limbo maior (até 15 x 10 cm); as do caule com pecíolo e limbo mais pequeno (até 6,5 cm e 8 (-15) x 6 (-10) cm, respectivamente. Apresenta inflorescência laxa, ramificada, com cimos parciais de até 13 (-16) cm. Brácteas mais curtas que os pecíolos; pecíolos de 10-30 (-40) mm na flor, prolongando-se até 40 mm e tornando-se marcadamente recurvados no fruto.

Trata-se de uma planta ruderal (bermas de caminhos e espaços similares) que se desenvolve sobre substratos básicos ou ácidos mais ou menos nitrificados, preferencialmente em solos calcários ou argilosos de 0-900 m. Ocorre sobretudo na região mediterrânica, SW da Ásia, Macaronésia (excepto Cabo Verde). Encontra-se naturalizada praticamente em toda a Europa, podendo ser cultivada; comum na Península Ibérica, excepto em algumas das províncias do interior (Castroviejo *et al.*, 2011).

A *Montia fontana* L. é uma planta anual ou vivaz da família das *Portulacaceae* (Castroviejo *et al.*, 1991). Caule de 5 a 50 cm, por vezes maiores quando se encontram na água, ramificados nos nós inferiores, ramos muito delgados. Folhas 3-20 x (1,5) 2-6,5 mm, uninervias, oblongo-espátuladas ou linear-espátuladas, geralmente arredondadas no ápice, atenuadas na base. Cosmopolita (que ocorre em qualquer condição de solo e clima) na actualidade, tendo ocupado, originalmente, áreas mais limitadas. Coloniza charcas, ribeiras, fontes, de águas parcialmente paradas, mas com alguma corrente (Castroviejo *et al.*, 1991).

A *Rorippa nasturtium-aquaticum* (L.) Hayek da família das *Brassicaceae*, é uma espécie perene com enraizamento nos nós, com cerca de 20 a 10 cm. Caules robustos, erectos ou ascendentes, fistulosos, glabros, ou escassamente pilosos. Folhas caulinares, 2-18 x 1-6(7) cm, glabras, com aurículas mais ou menos largas e amplexicaules, pecioladas, com limbo maior que o pecíolo, simples, ovado ou suborbicular. É uma

planta hidrófila, de águas correntes, charcas e ribeiras. Cosmopolita, foi introduzida na América, África do Sul e Oceania (Castroviejo *et al.*, 2003).

Quanto às espécies do género *Rumex* da família Polygonaceae (Castroviejo *et al.*, 1991), são ervas perenes bianuais ou anuais, raramente pequenos arbustos, em geral com um sistema radical muito desenvolvido, com caules retorcidos, ócreas membranosas, inteiras ou mais ou menos laciniadas, por vezes caducas. Folhas pecioladas ou as superiores sésseis. Flores hermafroditas ou unisexuadas, verticiladas, em inflorescências mais ou menos ramificadas ou, raramente, simples com pecíolos articulados.

A espécie *Rumex acetosella* é uma planta verde ou glauca de cepa às vezes um pouco lenhosa, rizoma bem desenvolvido, por vezes estolonífero. Folhas (3)6-60(100) x (0,5)1-15(20) mm, de lineares a ovadas - raramente suborbiculares -, hastadas ou sagitadas, excepcionalmente cunheadas ou arredondadas na base, lobos basais geralmente divergentes, inteiros, raramente biforcados e, muito excepcionalmente, multífidos, pecíolo de até 4(12) cm. Inflorescência com ramos simples ou ramificados e verticilos de 6-10 flores. Esta espécie é também cosmopolita e cresce em zonas temperadas e frias do hemisfério norte, sendo por vezes considerada uma infestante das culturas.

No que respeita a *Rumex induratus* Boiss. & Reut., é uma planta polígama e com flores hermafroditas de até 80 (100) cm, glabra, frequentemente glauca, fruticulosa, de cepa lenhosa, possuindo numerosos caules ramificados. Folhas (5)8-35(42) x (2)3-20(35) mm, hastadas ou sagitadas, de ovado-lanceoladas a suborbiculares, obtusas, estreitando por cima dos lobos basais. A relação longitude/largura do limbo é de 0,8-2(3). Frequente em solos rochosos, sebes, muros, encostas secas e taludes, preferencialmente em substrato silício. Habitualmente encontra-se na Península Ibérica e no norte de África (Castroviejo *et al.*, 1991).

2.3. Produtos químicos

Os solventes acetoneitrilo 99,9%, *n*-hexano 95% e acetato de etilo 99,8% eram de gradiente HPLC e marca Lab-Scan (Lisboa, Portugal). A mistura padrão com 37 ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) (C4-C24; norma 47885-U) foi adquirida na Sigma (St. Louis, MO, EUA), assim como outros isómeros individuais de ácidos gordos, ácido

ascórbico, padrões de tocoferóis (α , β , γ e δ -isoformas), padrões de açúcares (D(-)-frutose, D(+)-glucose anidra, D(+)-melezitose mono-hidratada, D(+)-rafinose penta-hidratada, D(+)-sacarose, e D(+)-trealose) e os padrões utilizados nos ensaios de actividade antioxidante: trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), ácido gálico, ácido clorogénico e (+)-catequina. O tocol racémico, 50 mg/ml, foi adquirido na Matreya (PA, EUA). O 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi obtido na Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA). Todos os outros solventes usados eram de grau analítico e foram adquiridos em fontes comuns. A água foi tratada num sistema de purificação Milli-Q (TGI Water Systems, EUA).

2.4. Análise de macronutrientes

2.4.1. Valor nutricional

Para estudar a composição química das amostras foram analisadas a humidade, as proteínas, os lípidos, os glúcidos e as cinzas segundo os procedimentos AOAC (1995). O teor de proteínas totais ($N \times 6.25$) das amostras foi estimado pelo método macro-Kjeldahl, os lípidos foram determinados por extração com éter de petróleo de uma massa conhecida de amostra em pó, usando um aparelho de Soxhlet e o teor de cinzas determinou-se por incineração a 660 ± 15 °C. Os glúcidos calcularam-se por diferença ($100 - (g \text{ proteínas} + g \text{ lípidos} + g \text{ cinzas})$) e a energia total foi calculada usando a seguinte equação: Energia (kcal) = $4 \times (g \text{ proteínas} + g \text{ glúcidos}) + 9 \times (g \text{ lípidos})$.

2.4.2. Açúcares

Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de índice de refração (HPLC-RI), conforme descrito por Barros *et al.* (2010), utilizando melezitose como padrão interno (PI, 25 mg/ml). A amostra liofilizada (1 g) foi enriquecida com o PI e extraída com 40 ml de etanol a 80% durante 1h30min a 80 °C. A suspensão resultante foi centrifugada (centrífuga refrigerada Centorion K240R-2003) a 15.000g durante 10 min. O sobrenadante foi concentrado a 60 °C sob pressão reduzida; os vestígios de lípidos foram removidos em

três lavagens sucessivas com 10 ml de éter etílico. Após a concentração a 40 °C, os resíduos sólidos foram dissolvidos em água para um volume final de 5 ml.

Os açúcares foram determinados por HPLC num sistema integrado com uma bomba (Knauer, sistema Smartline 1000), um desgaseificador (Smartline 5000), um amostrador automático (AS-2057 Jasco) e um detector de RI (Knauer Smartline 2300). Os dados foram analisados usando Clarity 2.4 Software (DataApex). A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna 100-5 NH₂ Eurospher (4,6 × 250 mm, 5 mm, Knauer) operando a 30 °C (forno Grace 7971 R). A fase móvel foi acetonitrilo/água desionizada, 7:3 (v/v) com um caudal de 1 ml/min. A identificação dos açúcares foi feita comparando os tempos de retenção relativos dos picos das amostras com padrões e os resultados foram expressos em g por 100 g de massa seca.

2.4.3. Ácidos Gordos

O método utilizado na determinação de ácidos gordos, após trans-esterificação, foi a cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID), como descrito por Barros *et al.* (2010). A massa obtida após extracção em Soxhlet foi misturada com 5ml de metanol: ácido sulfúrico: tolueno 2:1:1 (v/v/v), permanecendo num banho a 50 °C com uma agitação de 160 rpm durante pelo menos 12 h. Adicionaram-se, de seguida, 3 ml de água desionizada com o objectivo de separar as diferentes fases. Recuperou-se a FAME com 3 ml de éter agitando em vortex, removeu-se a água presente com sulfato de sódio anidro e, por fim, recolheu-se a amostra para um *vial* utilizando um filtro de nylon 0,2 µm Milipore.

A análise de ácidos gordos foi feita com a ajuda de um sistema GC modelo DANI 1000 equipado com um injector *split/splitless*, detector FID e uma coluna Macherey Nagel (30 m × 0.32 mm × 0.25 µm). O programa de temperatura do forno foi o seguinte: a temperatura inicial da coluna foi 50 °C, durante 2 min; em seguida, aumentou-se a temperatura a 30 °C/min até 125 °C, 5°C/min até 160 °C, 20°C/min até 180 °C, 3°C/min até 200 °C e 20°C/min até 220 °C, que foi mantida por 15 min. O gás de transporte (hidrogénio) tinha um caudal de 4,0 ml/min (0,61 bar), medido a 50 °C. A injeção *split* (1:40) foi realizada a 250 °C e o volume de injeção foi 1µl. O perfil de ácidos gordos foi obtido com base nos tempos de retenção relativos dos picos da FAME

e das amostras. Os resultados foram processados usando o software CSW 1.7 (DataApex 1.7) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.

2.5. Análise de micronutrientes

2.5.1. Tocoferóis

O teor de tocoferóis foi determinado segundo um procedimento previamente otimizado e descrito por Barros *et al.* (2010). A 500 mg de amostra liofilizada foram adicionados 100 µl de BHT e 400 µl de tocol (50 µg/ml). Homogeneizou-se a amostra com 4 ml de metanol e agitou-se usando um vortex (1 min). Adicionou-se, de seguida, hexano (4 ml) agitando novamente (1 min) no vortex e, por fim, adicionou-se uma solução aquosa concentrada de NaCl (2 ml), homogeneizou-se (1 min) e centrifugou-se (5 min, 4000 g). O sobrenadante foi, cuidadosamente, transferido para um *vial*. A amostra foi re-extraída com hexano repetindo-se o procedimento acima descrito e secou-se a amostra sob corrente de azoto. O extracto foi re-dissolvido em 2 ml de hexano e desidratado com sulfato de sódio anidro, filtrado através de um filtro descartável LC de 0,22 µm, transferido para um *vial* de injeção *ambar* e analisado no sistema de HPLC acima descrito, acoplado a um detector de fluorescência FP-2020 (Jasco, Japão) programado para excitação a 290 nm e emissão a 330 nm. Os dados foram analisados usando o software Clarity 2.4 (DataApex). A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna em fase normal Poliamida II (250 × 4.6 nm) YMC Waters (Japão) operando a 30 °C Utilizou-se uma mistura de hexano e acetato de etilo (7:3, v/v) como fase móvel com um caudal de 1 ml/min. A quantificação foi baseada na resposta do sinal de fluorescência, usando o método do padrão interno e por comparação cromatográfica com padrões. Os resultados foram expressos em µg por g de massa seca.

2.5.2. Ácido ascórbico

A determinação de ácido ascórbico foi realizada utilizando o método descrito por Barros *et al.* (2010), com 2,6-dicloroindofenol, medindo-se a absorvância a 515 nm (espectrofotómetro Analytikijena 200-2004).

A extracção foi feita com ácido metafosfórico a 1%, tendo-se adicionado 10 ml do mesmo a 500 mg de amostra liofilizada. A mistura permaneceu sob agitação magnética (45 min) à temperatura ambiente e foi, por fim, filtrada usando filtros Whatman n.º 4. A 0.5 ml de filtrado foram adicionados 4.5 ml de 2,6-dicloroindofenol, agitou-se no vortex e deixou-se repousar (15 min) para, posteriormente, ler a absorvância no espectrofotómetro acima referido. A concentração de ácido ascórbico foi calculada com base na curva de calibração de ácido L-ascórbico (6×10^{-3} -0.1 mg/ml), e os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico por g de massa seca.

2.5.3. Pigmentos

O β -caroteno, o licopeno e as clorofilas a e b foram determinadas segundo o procedimento descrito por Barros *et al.* (2010), medindo a absorvância a 453, 505, 645, e 663 nm no espectrofotómetro já mencionado. A 500 mg de amostra liofilizada adicionaram-se 10 ml de acetona/hexano (4:6 v/v) agitando-se no vortex (1 min). Filtrou-se através de papel de filtro e mediu-se a absorvância.

A quantificação foi feita de acordo com as seguintes equações: β -caroteno (mg/100 ml) = $0.216 \times A_{663} - 1.220 \times A_{645} - 0.304 \times A_{505} + 0.452 \times A_{453}$; Licopeno (mg/100 ml) = $-0.0458 \times A_{663} + 0.204 \times A_{645} - 0.304 \times A_{505} + 0.452 \times A_{453}$; Clorofila a (mg/100 ml) = $0.999 \times A_{663} - 0.0989 \times A_{645}$; Clorofila b (mg/100 ml) = $-0.328 \times A_{663} + 1.77 \times A_{645}$, e posteriormente expressos em mg por 100 g de massa seca.

2.6. Análise de não-nutrientes e avaliação *in vitro* das propriedades antioxidantes

2.6.1. Procedimento de extracção

A extracção da amostra liofilizada (1 g) foi feita com metanol (50 ml) a 25°C, sob agitação magnética a 150 rpm durante 1 hora sendo posteriormente filtrada através de papel de filtro Whatman n.º 4. Os resíduos foram re-extraídos com um volume adicional de 50 ml de metanol e filtrou-se novamente. Os extractos metanólicos foram levados à secura num evaporador rotativo (Büchi R-210) a 35°C e pressão reduzida, re-dissolvidos em metanol numa concentração de 5 mg/ml, utilizada posteriormente para

preparar soluções do extracto em diferentes concentrações. Todas as soluções foram armazenadas a 4°C até uso posterior.

2.6.2. Compostos fenólicos

A solução de extracto de concentração 2,5 mg/ml (250 µL) foi misturada com HCl 0,1% em 95% de etanol (250 µl) e HCl 2% (4550µl). Após 15 min, a absorvância foi medida a 280, 320, 360 e 520 nm. As absorvâncias obtidas a estes quatro comprimentos de onda diferentes foram utilizadas para estimar, respectivamente, o teor de fenóis totais, ésteres tartáricos, flavonóis e antocianinas (Mazza *et al.*, 1999). Para a construção das rectas de calibração utilizou-se; ácido clorogénico (0,2-3,2 mM) sendo os resultados dos fenóis expressos em mg equivalentes de ácido clorogénico (EACI) por grama de extracto; quercetina (0,2-3,2 mM) sendo os resultados dos flavonóis expressos em mg equivalentes de quercetina (EQ) por grama de extracto; malvidina 3-glicósido (0,1-2,3 mM) sendo os resultados de antocianinas expressos em mg equivalentes de malvidina 3-glicósido (ME) por grama de extracto; e ácido caféico (0,2-3,6 mM) sendo os resultados de ésteres tartáricos expressos em mg equivalentes de ácido cafeico (EAC) por grama de extracto.

Na quantificação de flavonóides, a solução de extracto com concentração 2,5 mg/ml (0,5 ml) foi misturada com água destilada (2 ml) e solução de NaNO₂ (5%, 0,15 ml), agitando-se a mistura no vortex. Decorridos 6 min, adicionou-se uma solução de AlCl₃ (10%, 0,15 ml), agitou-se novamente e deixou-se repousar 6 min. Adicionou-se à mistura uma solução de NaOH (4%, 2 ml), seguido de água destilada até um volume final de 5 ml, deixando-se repousar por 15 minutos. A intensidade da coloração rosa foi medida a 510 nm (Jia *et al.*, 1999). Utilizou-se (+)-catequina para construir a recta-padrão (1,5 × 10⁻²-1.0 mM) e os resultados foram expressos em mg equivalentes de (+)-catequina (EC) por grama de extracto.

2.6.3. Actividade captadora de radicais DPPH

Na aplicação desta metodologia foi utilizado um Leitor de Microplacas ELX800 (Bio-Tek equipamento, Inc.). Nos poços da placa foram colocados 30 µl de solução de extracto com diferentes concentrações e 270 µl de solução metanólica de DPPH 6 × 10⁻⁵ M. Após 1 hora de repouso ao abrigo da luz, mediu-se a absorvância a 515 nm com o

objectivo de determinar a redução do radical DPPH. A actividade captadora de radicais livres (ACR) foi calculada como percentagem de descoloração do DPPH usando a equação: $\% \text{ RSA} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{S}})/A_{\text{DPPH}}] \times 100$, onde A_{S} é a absorvância da solução na presença de extracto numa determinada concentração e A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH. A concentração de extracto que fornece 50% da actividade captadora de radicais (EC_{50}) foi calculada a partir do gráfico de ACR em função da concentração de extracto. Como padrão foi utilizado trolox.

2.6.4. Poder redutor

A metodologia aplicada a esta análise requereu a utilização do Leitor de Microplacas acima mencionado. Às diferentes concentrações de extracto (0,5 ml) foram adicionados 0,5 ml de solução tampão de fosfato de sódio (pH 6,6; 200mM) e 0,5 ml de ferricianeto de potássio (1%, w/v). A mistura foi incubada a 50°C durante 20 min e adicionou-se, posteriormente, 0,5 ml de ácido tricloroacético (10%, w/v). Colocou-se, na placa, 0,8 ml da mistura, 0,8ml de água destilada e 0,16 ml de cloreto de ferro (0,1%, w/v). Mediu-se a absorvância a 690 nm sendo a concentração de extracto com 0,5 de absorvância (EC_{50}) calculada a partir do gráfico de absorvância a 690 nm em função da concentração do extracto. O padrão utilizado foi o trolox.

2.6.5. Inibição da descoloração do β -caroteno

Preparou-se, por dissolução, uma solução de β -caroteno (2 mg) em clorofórmio (10 ml). Transferiram-se 2 ml desta solução para um balão de fundo redondo e evaporou-se a 40 °C sob vácuo, para remoção do clorofórmio. Adicionou-se ácido linoleico (40 mg), emulsionante Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 ml), agitando vigorosamente. Transferiram-se 4,8 ml desta emulsão para tubos de ensaio contendo 0,2 ml das diferentes concentrações dos extractos, leu-se a absorvância a 470 nm, e incubou-se a 50 °C em banho-maria sob agitação. Após 2 horas de incubação, mediu-se novamente a absorvância. A inibição da descoloração do β -caroteno foi calculada utilizando a equação: $(\text{conteúdo de } \beta\text{-caroteno após 2 h de ensaio}/\text{conteúdo inicial de } \beta\text{-caroteno}) \times 100$. A concentração de extracto que origina 50% de actividade antioxidante (EC_{50}) foi calculada por interpolação a partir do gráfico de percentagem da inibição da

descoloração do β -caroteno em função da concentração de extracto. Utilizou-se, como padrão, trolox.

2.6.6. Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reactivas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Neste método de determinação da inibição da peroxidação lipídica foi utilizado tecido cerebral de porco (*Sus scrofa*). O tecido foi dissecado e homogeneizado em gelo com tampão tris-HCl (20 mM, pH 7,4) numa proporção 1:2 (w/v). A mistura foi agitada e centrifugada a 3000g durante 10 min. Adicionou-se a cada uma das diferentes soluções de extracto (200 μ l), ácido ascórbico (100 μ l), sulfato de ferro (100 μ l) e sobrenadante do homogeneizado cerebral (100 μ l), e incubou-se durante 1 hora a 37,5 °C. Adicionou-se então, ácido tricloroacético (28% w/v; 500 μ l) com o objectivo de interromper a reacção, e TBA (2%, w/v; 380 μ l), colocando-se novamente a incubar a 80 °C durante 20 min. Centrifugou-se a 3000 rpm durante 5 min com o intuito de remover as proteínas precipitadas, e leu-se a intensidade da cor do complexo malonaldeído (MDA)-TBA do sobrenadante a 532 nm. A percentagem de inibição da peroxidação lipídica (%) foi calculada utilizando a seguinte fórmula: $[(A - B)/A] \times 100\%$, onde A e B eram a absorvância do controlo e da solução com o extracto, respectivamente. A concentração de extracto que fornece 50% de inibição da peroxidação lipídica (EC_{50}) foi calculada a partir do gráfico da percentagem de inibição da formação de TBARS em função da concentração de extracto. O padrão utilizado foi o trolox.

2.7. Análise estatística

Para cada uma das espécies foram usadas três amostras e todos os ensaios foram efectuados em triplicado. Os resultados foram expressos apresentando o valor médio e o desvio-padrão. Os resultados foram analisados usando a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey HSD com $\alpha = 0.05$. Este tratamento foi realizado usando o programa SPSS v. 16.0.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Macronutrientes

Os resultados da composição em macronutrientes e valor energético, obtidos no estudo de cinco verduras silvestres apresentam-se na **Tabela 2**.

Tabela 2. Humidade (g/100 g de massa fresca), macronutrientes (g/100 g de massa seca) e valor energético (kcal/100 g de massa seca) das cinco espécies estudadas (média \pm DP, n = 3) Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).

	<i>Borago officinalis</i>	<i>Montia fontana</i>	<i>Rorippa nasturtium-aquaticum</i>	<i>Rumex acetosella</i>	<i>Rumex induratus</i>
Humidade	86,85 \pm 0,40 e	95,22 \pm 0,74 a	93,23 \pm 0,99 b	89,09 \pm 1,01 d	90,29 \pm 0,53 c
Cinzas	17,88 \pm 0,86 a	15,07 \pm 0,10 b	16,81 \pm 0,08 a	10,93 \pm 1,06 c	11,07 \pm 0,30 c
Proteínas	8,93 \pm 1,58 b	13,38 \pm 0,01 a	13,58 \pm 0,38 a	7,85 \pm 1,86 b	13,54 \pm 0,28 a
Lípidos	1,25 \pm 0,23 d	3,09 \pm 0,47 b	2,97 \pm 0,47 b	2,35 \pm 0,28 c	3,97 \pm 0,14 a
Glúcidos	71,94 \pm 1,70 b	68,46 \pm 0,29 c	66,64 \pm 0,31 c	78,87 \pm 1,50 a	71,42 \pm 0,28 b
Energia	334,73 \pm 3,26 e	355,18 \pm 0,84 c	347,61 \pm 1,24 d	368,03 \pm 3,98 b	375,55 \pm 0,36 a
Frutose	0,14 \pm 0,03 d	0,76 \pm 0,17 cb	0,89 \pm 0,02 b	0,60 \pm 0,00 c	1,71 \pm 0,09 a
Glucose	0,58 \pm 0,06 c	1,00 \pm 0,02 ba	0,82 \pm 0,08 bc	0,73 \pm 0,01 c	1,26 \pm 0,20 a
Sacarose	1,52 \pm 0,13 a	0,44 \pm 0,05 c	0,99 \pm 0,17 b	0,21 \pm 0,07 c	1,25 \pm 0,31 ba
Trealose	0,22 \pm 0,06 c	0,38 \pm 0,06 bc	0,33 \pm 0,05 bc	0,63 \pm 0,14 a	0,55 \pm 0,12 ba
Rafinose	nd	0,28 \pm 0,07 a	0,07 \pm 0,01 c	0,12 \pm 0,03 bc	0,20 \pm 0,02 ba
Açúcares totais	2,46 \pm 0,16 bc	2,86 \pm 0,32 bc	3,10 \pm 0,27 b	2,29 \pm 0,19 c	4,97 \pm 0,31 a

nd - não detectado

Borago officinalis (borragem), *Montia fontana* (merujas), *Rorippa nasturtium-aquaticum* (agrião), *Rumex acetosella* (azedinhas) e *Rumex induratus* (azedas).

A humidade foi o macronutriente mais abundante nas cinco espécies estudadas, tendo as merujas revelado o teor mais elevado (95 g/100 g). Os glúcidos foram também macronutrientes abundantes e os níveis mais altos foram encontrados nas azedinhas (79 g/100 g), o que pode ser devido ao tipo morfológico do material vegetal consumido, ou

seja, tecidos fibrosos e folhas com muitos veios. A borragem e o agrião revelaram os maiores teores de cinzas (~17-18 g/100 g), enquanto as merujas, o agrião e as azedas evidenciaram os mais elevados níveis de proteínas (~ 13 a 14 g/100 g), sem diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Os níveis de lípidos mais elevados foram encontrados nas azedas (4 g/100 g), contribuindo para o seu maior valor energético (376 g/100 g). Uma amostra de *Rumex vesicarius* obtida na Arábia Saudita, uma espécie do mesmo género de *Rumex induratus* (azedas) e de utilização similar, revelou elevados níveis de proteínas (19 g/100 g) e cinzas (17 g/100 g), mas um teor de lípidos ligeiramente inferior (3 g/100 g) (Alfawaz, 2006).

As verduras silvestres estudadas revelaram elevado poder nutricional com uma baixa contribuição energética de 356 kcal/100 g, em média. Ao que se sabe, este é o primeiro relatório acerca do valor nutricional destas verduras, com excepção da borragem (Medrano, Masoud, & Martinez, 1992) que é amplamente estudado devido ao seu crescente interesse agrícola pela produção de ácido γ -linolénico (GLA) e potencial antioxidante (Mhamdi *et al.*, 2010).

Todas estas verduras apresentaram frutose, glucose, sacarose, trealose e rafinose como principais açúcares (**Tabela 2**). As azedas revelaram o teor mais elevado de açúcares totais (5 g/100 g), com os mais elevados níveis de frutose (2 g/100 g) e glucose (1 g/100 g). O seu perfil de açúcares pode ser observado na **Figura 11**. Os açúcares são apenas uma pequena parte dos glúcidos, que também incluem polissacáridos, como amido e celulose.

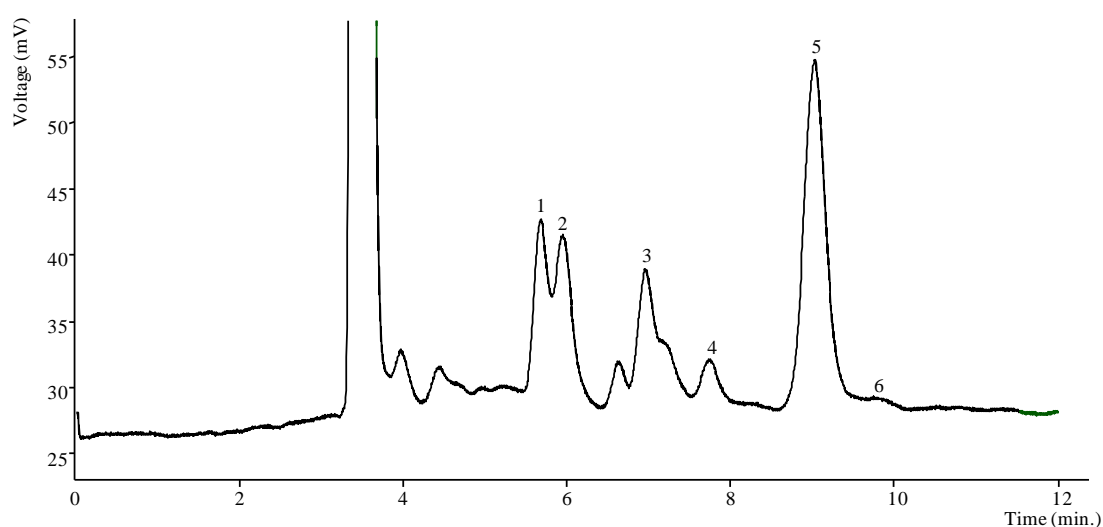


Figura 11. Perfil de açúcares de *Rumex induratus* (azedas): 1-frutose; 2-glucose; 3-sacarose; 4-trealose; 5-melezitose (PI); 6-rafinose.

Os resultados da composição em ácidos gordos, ácidos gordos saturados (SFA), ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), ácidos gordos polinsaturados (PUFA), e as razões de PUFA/SFA e n-6/n-3 das verduras comestíveis silvestres apresentam-se na **Tabela 3**.

Tabela 3. Composição em ácidos gordos (percentagem relativa) das cinco espécies estudadas (média \pm DP, n = 3). Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).

	<i>Borago officinalis</i>	<i>Montia fontana</i>	<i>Rorippa nasturtium-aquaticum</i>	<i>Rumex acetosella</i>	<i>Rumex induratus</i>
C6:0	0,70 \pm 0,09	0,04 \pm 0,01	0,03 \pm 0,00	0,10 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01
C8:0	0,31 \pm 0,03	0,03 \pm 0,00	0,06 \pm 0,01	0,06 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00
C10:0	0,35 \pm 0,06	0,05 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,08 \pm 0,02	0,09 \pm 0,02
C12:0	0,92 \pm 0,19	0,17 \pm 0,01	0,28 \pm 0,06	0,54 \pm 0,02	0,93 \pm 0,20
C14:0	2,80 \pm 0,69	0,43 \pm 0,01	0,64 \pm 0,06	1,69 \pm 0,13	2,66 \pm 0,34
C14:1	0,23 \pm 0,03	0,94 \pm 0,01	0,55 \pm 0,05	3,55 \pm 0,27	4,25 \pm 0,34
C15:0	0,28 \pm 0,01	0,04 \pm 0,00	0,20 \pm 0,01	0,20 \pm 0,08	0,25 \pm 0,04
C16:0	12,03 \pm 0,70	17,22 \pm 1,06	13,20 \pm 0,31	11,23 \pm 0,73	9,36 \pm 0,71
C16:1	0,13 \pm 0,01	0,33 \pm 0,06	0,49 \pm 0,01	0,71 \pm 0,15	0,72 \pm 0,00
C17:0	0,17 \pm 0,01	0,11 \pm 0,02	0,15 \pm 0,01	0,16 \pm 0,00	0,16 \pm 0,00
C18:0	2,28 \pm 0,04	0,10 \pm 0,03	0,92 \pm 0,02	0,95 \pm 0,07	2,34 \pm 0,09
C18:1n9	2,08 \pm 0,20	2,37 \pm 0,38	0,70 \pm 0,03	3,43 \pm 0,32	2,20 \pm 0,05
C18:2n6	9,50 \pm 1,25	18,71 \pm 0,45	11,84 \pm 0,18	20,18 \pm 0,48	13,76 \pm 0,01
C18:3n6	10,86 \pm 0,92	0,04 \pm 0,00	0,08 \pm 0,00	nd	nd
C18:3n3	12,26 \pm 1,90	55,57 \pm 0,80	68,42 \pm 0,24	51,34 \pm 1,41	58,84 \pm 1,03
C20:0	11,91 \pm 0,30	1,90 \pm 0,26	0,14 \pm 0,02	0,86 \pm 0,01	1,48 \pm 0,15
C20:1	0,26 \pm 0,05	0,19 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00	0,18 \pm 0,00	0,07 \pm 0,00
C20:2	12,56 \pm 2,01	0,28 \pm 0,04	0,04 \pm 0,00	0,67 \pm 0,17	0,13 \pm 0,04
C20:3n6	nd	0,27 \pm 0,02	0,04 \pm 0,00	0,14 \pm 0,02	nd
C20:4n6	nd	nd	0,04 \pm 0,00	nd	nd
C20:3n3+C21:0	0,21 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	0,15 \pm 0,05	0,16 \pm 0,02	0,15 \pm 0,03
C20:5n3	Nd	0,05 \pm 0,01	0,60 \pm 0,03	0,02 \pm 0,00	nd
C22:0	12,00 \pm 1,06	0,50 \pm 0,04	0,22 \pm 0,00	1,44 \pm 0,09	0,85 \pm 0,09
C22:1n9	0,44 \pm 0,06	0,17 \pm 0,06	nd	0,07 \pm 0,01	nd
C22:2	nd	0,04 \pm 0,00	nd	0,08 \pm 0,03	0,13 \pm 0,02
C23:0	3,02 \pm 0,05	nd	0,01 \pm 0,00	0,49 \pm 0,03	0,56 \pm 0,12
C24:0	4,55 \pm 0,43	0,24 \pm 0,06	0,80 \pm 0,02	1,67 \pm 0,13	0,94 \pm 0,16
C24:1	0,17 \pm 0,02	0,01 \pm 0,00	0,36 \pm 0,04	0,02 \pm 0,00	nd
SFA totais	51,32 \pm 0,93 a	20,83 \pm 0,14 b	16,68 \pm 0,51 c	19,45 \pm 1,12 b	19,76 \pm 0,73 b
MUFA totais	3,30 \pm 0,49 b	4,02 \pm 0,50 b	2,11 \pm 0,00 c	7,96 \pm 0,06 a	7,24 \pm 0,39 a
PUFA totais	45,38 \pm 1,92 d	75,15 \pm 0,36 b	81,20 \pm 0,50 a	72,59 \pm 1,06 c	73,01 \pm 1,12 cb
PUFA/SFA	0,88 \pm 0,05 c	3,61 \pm 0,01 b	4,87 \pm 0,18 a	3,74 \pm 0,27 b	3,70 \pm 0,19 b
n-6/n-3	1,64 \pm 0,08 a	0,34 \pm 0,01 b	0,17 \pm 0,00 c	0,39 \pm 0,02 b	0,23 \pm 0,00 c

nd - não detectado.

Borago officinalis (borragem), *Montia fontana* (merujas), *Rorippa nasturtium-aquaticum* (agrião), *Rumex acetosella* (azedinhas) e *Rumex induratus* (azedas).

As merujas e o agrião revelaram um perfil semelhante com o ácido α -linolénico (C18:3n3), como ácido gordo principal, seguido pelo ácido palmítico (C16:0) e linoleico (C18: 2n6). O mesmo foi observado para as azedas e azedinhas, mas com uma inversão nos teores de ácidos linoleico e palmítico. O presente estudo adiciona informações detalhadas sobre a composição de ácidos gordos ao trabalho descrito por Taveira *et al.* (2009) em folhas de azedas.

As quarto espécies mencionadas revelaram uma nítida prevalência de PUFA (>72%). Pelo contrário, as folhas de borragem revelaram uma diferente composição em ácidos gordos (**Figura 12**), com prevalência de SFA devido ao contributo dos ácidos palmítico, araquídico (C20:0) e beénico (C22:0), (12% cada SFA). Os principais PUFA foram os ácidos linoleico (10%); γ -linolénico (C18:3n6; GLA; 11%), α -linolénico (12%); e *cis*-11,14-eicosadienóico (C20:2c; 13%).

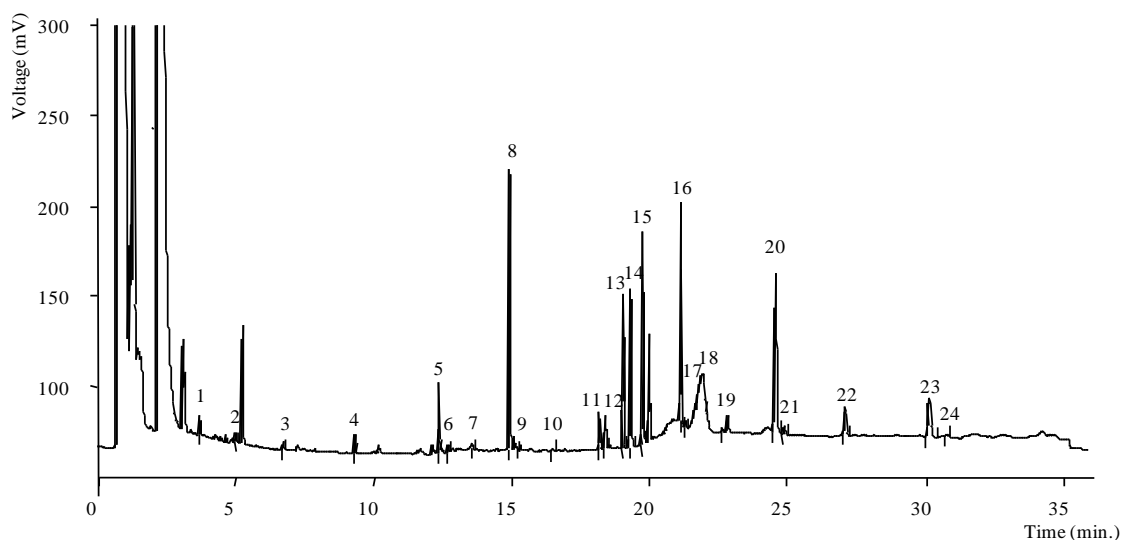


Figura 12. Perfil individual de ácidos gordos de *Borago officinalis* (Borragem).

1- C6:0; 2- C8:0; 3- C10:0; 4- C12:0; 5- C14:0; 6-C14:1; 7- C15:0; 8- C16:0; 9- C16:1; 10- C17:0; 11- C18:0; 12- C18:1n9; 13 C18:2n6; 14- C18:3n6; 15-C18:3n3; 16- C20:0; 17- C20:1; 18- C20:2c; 19- C20:3n3+C21:0; 20- C22:0; 21- C22:1n9; 22- C23:0; 23- C24:0; 24- C24:1.

A família *Boraginaceae* Juss. é uma das mais conhecidas fontes de GLA, um ácido gordo incomum em plantas, muito apreciado devido aos seus benefícios nutricionais e medicinais. As concentrações de ácido linoleico, α -linolénico, GLA e ácido erúico (22:1n9) tem especial importância quimiotaxonómica nesta família (Velasco & Goffman, 1999). A maioria dos estudos disponíveis foi focada no óleo de

sementes de borragem (Velasco & Goffman, 1999; Wettasinghea *et al.*, 1999). Nestes estudos, podemos encontrar os quatro ácidos gordos mencionados, também em folhas de borragem.

Para uma "boa qualidade nutricional", incluindo os efeitos benéficos à saúde, a razão PUFA/SFA deve ser superior a 0,45, enquanto a razão dos ácidos gordos n-6/n-3 deve ser inferior a 4,0 (Guil *et al.*, 1996), como se pode observar no presente estudo (**Tabela 3**). Os melhores valores foram registados no agrião (4,9 e 0,2, respectivamente).

3.2. Micronutrientes

Os resultados da composição em micronutrientes e vitaminas para as cinco diferentes espécies estudadas apresentam-se na **Tabela 4**. O ácido ascórbico foi a vitamina mais abundante na borragem, nas azedinhas e nas azedas, tendo as últimas revelado a concentração mais elevada (1064 mg/100 g). O ácido ascórbico (ou vitamina C) é um indicador comumente usado para avaliar a qualidade de legumes congelados. Apesar de sua importância para a saúde humana, observa-se geralmente que se esta vitamina se encontrar bem preservada, então os outros nutrientes estão também bem retidos (Gonçalves *et al.*, 2009).

Tabela 4. Composição em micronutrientes e pigmentos das cinco espécies estudadas (média ± DP, n = 3). Os resultados são expressos em mg/100 g de massa seca. Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).

	<i>Borago Officinalis</i>	<i>Montia fontana</i>	<i>Rorippa nasturtium-aquaticum</i>	<i>Rumex acetosella</i>	<i>Rumex induratus</i>
α -tocoferol	8,75 ± 0,57 d	45,23 ± 5,65 b	22,30 ± 0,16 c	52,24 ± 9,18 ba	62,55 ± 1,61 a
β -tocoferol	0,31 ± 0,02 c	1,76 ± 0,35 b	0,66 ± 0,02 cb	4,83 ± 0,93 a	0,50 ± 0,02 c
γ -tocoferol	2,30 ± 0,15 c	8,63 ± 1,37 cb	2,09 ± 0,05 c	24,91 ± 5,68 a	15,65 ± 0,41 b
δ -tocoferol	0,13 ± 0,01 c	0,98 ± 0,04 c	1,37 ± 0,24 c	16,71 ± 1,08 a	5,58 ± 0,56 b
Tocoferóis totais	11,49 ± 0,70 c	56,60 ± 7,40 b	26,42 ± 0,43 c	98,69 ± 16,86 a	84,28 ± 0,62 a
Vitamina C	19,09 ± 1,73 d	39,48 ± 7,23 c	17,34 ± 3,22 d	180,48 ± 4,38 b	1064,51 ± 2,56 a
β -caroteno	2,35 ± 0,04 b	3,80 ± 0,32 a	nd	nd	nd
Licopeno	Nd	nd	1,42 ± 0,04 c	3,42 ± 0,06 b	4,80 ± 0,06 a
Clorofila a	2,40 ± 0,05 d	8,80 ± 0,64 c	10,26 ± 0,04 b	11,18 ± 0,05 a	10,86 ± 0,09 a
Clorofila b	0,54 ± 0,03 e	2,70 ± 0,33 d	10,87 ± 0,10 b	7,25 ± 0,22 c	13,62 ± 0,22 a

nd- not detected.

Borago officinalis (borragem), *Montia fontana* (merujas), *Rorippa nasturtium-aquaticum* (agrião), *Rumex acetosella* (azedinhas) e *Rumex induratus* (azedas).

Foram detectados as quatro isoformas de tocoferóis, sendo o α -tocoferol o principal composto em todas as espécies. As espécies de *Rumex* apresentaram os teores mais elevados de tocoferóis (84-99 mg/100 g), sem diferença estatística significativa ($p < 0,05$), com os níveis mais altos de todas as isoformas. O perfil de tocoferóis de *R. acetosella* (azedinhas) é apresentado na **Figura 13**.

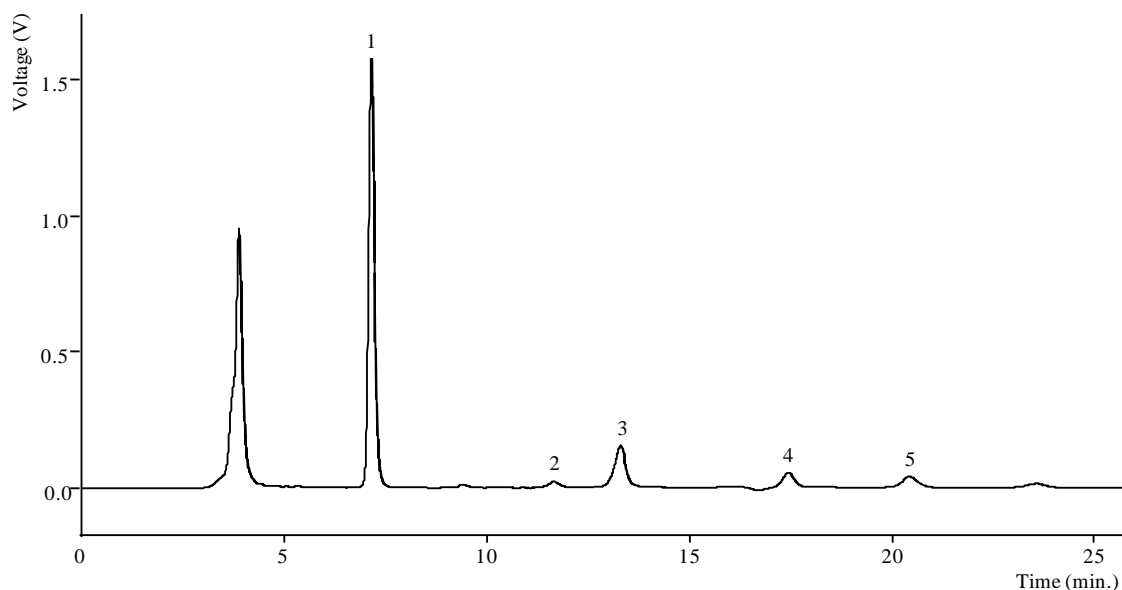


Figura 13. Perfil individual de tocoferóis de *Rumex acetosella* (azedinhas): 1- α -tocoferol; 2- β -tocoferol; 3- γ -tocoferol; 4- δ -tocoferol; 5-tocol (PI).

A espécie *R. induratus* (azedas) apresentou níveis de vitaminas mais elevados que uma amostra de *Rumex vesicarius* da Arábia Saudita (253 e 4.7 mg/100 g de ácido ascórbico e tocoferóis, respectivamente) (Alfawaz, 2006).

Pigmentos como as clorofilas a e b foram encontrados em todas as verduras estudadas, sendo que o primeiro se apresentava em maior quantidade nas azedas e azedinhas, sem diferença estatística significativa ($p < 0,05$) e o segundo nas azedas (14 mg/100 g; **Tabela 4**). O β -caroteno não foi detectado no agrião nem nas duas espécies de *Rumex*. No entanto, este pigmento foi encontrado numa amostra de agrião obtida no Reino Unido (4,7 mg/100g de massa fresca), utilizando um método de HPLC (Hart & Scott, 1995). O licopeno não foi detectado na borragem nem nas merujas, e os níveis mais altos foram encontrados, mais uma vez, nas azedas (5 mg/100 g).

As análises realizadas permitiram a primeira caracterização destas verduras silvestres quanto à sua composição em vitaminas (ácido ascórbico e tocoferóis) e pigmentos (clorofilas e carotenóides), uma vez que os relatórios disponíveis na literatura descreveram resultados em sementes de *B. officinalis* (Velasco & Goffman, 1999) e *Nasturtium officinale* cultivada (Gonçalves *et al.*, 2009).

3.3. Não-nutrientes bioativos

A composição em não-nutrientes e atividade antioxidante das verduras silvestres estudadas apresenta-se na **Tabela 5**.

Tabela 5. Composição em não-nutrientes e propriedades antioxidantes (valores de EC₅₀) das cinco espécies estudadas. Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).

	<i>Borago officinalis</i>	<i>Montia fontana</i>	<i>Rorippa nasturtium-aquaticum</i>	<i>Rumex acetosella</i>	<i>Rumex induratus</i>
Fenóis (mg EACI/g extracto)	177,50 ± 2,57 b	93,26 ± 3,40 d	98,10 ± 1,86 c	200,07 ± 0,91 a	178,61 ± 3,66 b
Flavonóides (mg EC/g extracto)	88,17 ± 2,73 a	25,88 ± 1,01 d	35,17 ± 3,36 c	67,91 ± 3,02 b	89,78 ± 2,81 a
Flavonóis (mg EQ/g extracto)	51,71 ± 0,53 b	24,40 ± 1,23 d	32,76 ± 0,67 c	56,95 ± 0,40 b	57,17 ± 1,17 a
Antocianinas (mg EM/g extracto)	51,50 ± 1,29 a	14,02 ± 0,32 d	14,81 ± 0,42 d	35,49 ± 0,10 c	42,94 ± 1,58 b
Ésteres tartáricos (mg EAC/g extracto)	34,88 ± 2,93 b	18,43 ± 0,78 c	19,72 ± 0,69 c	36,43 ± 1,23 b	39,99 ± 3,23 a
Actividade captadora de DPPH (mg/ml)	0,07 ± 0,00 c	0,22 ± 0,01 a	0,13 ± 0,03 b	0,03 ± 0,00 d	0,03 ± 0,00 d
Poder redutor (mg/ml)	0,23 ± 0,01 c	0,84 ± 0,02 a	0,74 ± 0,02 b	0,16 ± 0,01 d	0,22 ± 0,01 c
Inibição da descoloração do β-caroteno (mg/ml)	0,13 ± 0,02 c	0,46 ± 0,04 b	0,85 ± 0,16 a	0,12 ± 0,01 c	0,19 ± 0,03 c
Inibição de TBARS (mg/ml)	0,14 ± 0,00 c	0,25 ± 0,01 b	0,38 ± 0,06 a	0,11 ± 0,02 cd	0,10 ± 0,01 d

Borago officinalis (borragem), *Montia fontana* (merujas), *Rorippa nasturtium-aquaticum* (agrião), *Rumex acetosella* (azedinhas) e *Rumex induratus* (azedas).

As azedas apresentaram os melhores resultados na actividade captadora de radicais DPPH, inibição da descoloração do β-caroteno e inibição de formação de TBARS, o que está em concordância com os seus elevados níveis de flavonóides (90 mg EC/g de extracto), flavonóis (57 mg EQ/g de extracto) e ésteres tartáricos (40 mg EAC/g de extracto). Esta planta tinha já sido reconhecida como sendo uma fonte de flavonóides, incluindo flavonas glicosiladas (Ferrerres *et al.*, 2007). As azedinhas demonstraram também boas propriedades antioxidantes com a concentração mais elevada de fenóis (200 mg EACI/g extracto).

A borragem apresentou maior inibição da descoloração do β -caroteno com os mais altos níveis de antocianinas (52 mg EM/g de extracto) e concentração de flavonóides, sem diferença estatística ($p < 0,05$) das azedas (88 e 90 mg EC/g de extracto, respectivamente). Os extractos metanólicos de sementes de borragem da Tunísia revelaram muito menor teor de compostos fenólicos (medido pelo método de Folin-Ciocalteu) e efeito captador de radicais DPPH, que as folhas (Mhamdi *et al.*, 2010). As propriedades antioxidantes de sementes de borragem foram atribuídas aos seus constituintes fenólicos, incluindo os ácidos fenólicos, como os ácidos rosmarínico, siríngico e sinápico (Wettasinghea *et al.*, 2001). Extractos etanólicos de folhas de Itália revelaram um teor inferior de fenóis e flavonóides (97 e 9 mg equivalentes de ácido clorogénico/g de extracto, respectivamente), mas actividade captadora de radicais DPPH ligeiramente superior (0,06 mg/ml) (Conforti *et al.*, 2008). Ao que parece, as suas propriedades antioxidantes estão relacionados com outros antioxidantes, que não correspondem a compostos fenólicos. O extrato metanólico de *R. nasturtium-aquaticum* estudado demonstrou níveis semelhantes de fenóis, maior concentração de flavonóides e inibição de TBARS e menor efeito captador de radicais DPPH que os extractos de etanol:água de uma amostra do Irão: 96-97 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto, 62-63 mg equivalentes de catequina/g de extracto, 0,27 mg/ml e 0,12 mg/ml, respectivamente) (Yazdanparast *et al.*, 2008; Bahramikia & Yazdanparast, 2010). Há também relatórios disponíveis sobre as propriedades antioxidantes (Hassimotto *et al.*, 2009) e a composição em flavonóides (Justesen & Knuthsen, 2001) de amostras cultivadas.

Foram estabelecidas correlações lineares negativas entre o teor de não-nutrientes e os valores de EC_{50} da actividade antioxidante (**Tabela 6**), o que prova que as verduras silvestres com maior teor de nutrientes bioactivos são as mais eficientes na actividade antioxidante (com os menores valores de EC_{50}). As correlações foram mais significativas para o ensaio do poder redutor. A actividade captadora de radicais DPPH relaciona-se melhor com flavonóis, o poder redutor com fenóis e flavonóides, a inibição de descoloração do β -caroteno com fenóis e a inibição de TBARS com fenóis e ésteres tartáricos.

Tabela 6. Correlações estabelecidas entre fenóis, flavonóides, flavanóis, antocianinas ésteres tartáricos e os valores de EC₅₀ de actividade atioxidante.

	Actividade captadora de DPPH (mg/ml)		Poder Redutor (mg/ml)		Inibição da descoloração do β-caroteno (mg/ml)		Inibição de TBARS (mg/ml)	
	Equação linear	R ²	Equação linear	R ²	Equação linear	R ²	Equação linear	R ²
Fenóis (mg EACI/g extracto)	$y=-0,0015x+0,3211$	0,8116	$y=-0,0065x+1,4032$	0,9810	$y=-0,0054x+1,1565$	0,7032	$y=-0,0021x+0,5149$	0,7489
Flavonóides (mg EC/g extracto)	$y=-0,0024x+0,2423$	0,7256	$y=-0,0101x+1,0603$	0,8564	$y=-0,008x+0,8458$	0,5547	$y=-0,0033x+0,3977$	0,6272
Flavanóis (mg EQ/g extracto)	$y=-0,0054x+0,3330$	0,9189	$y=-0,0213x+1,3883$	0,9726	$y=-0,0158x+1,0569$	0,5518	$y=-0,0066x+0,4907$	0,6538
	$y=-0,0039x+0,2180$	0,6052	$y=-0,0176x+0,9963$	0,8241	$y=-0,0152x+0,8377$	0,6413	$y=-0,0058x+0,3812$	0,6318
Antocianinas (mg EM/g extracto)								
Ésteres tartáricos (mg EAC/g extracto)	$y=-0,0073x+0,3130$	0,7973	$y=-0,0303x+1,3424$	0,9099	$y=-0,0152x+1,0879$	0,6212	$y=-0,0103x+0,5048$	0,7417

IV. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Com a realização deste trabalho pretendeu-se caracterizar a composição nutricional e nutracêutica de cinco plantas silvestres comestíveis provenientes da região de Trás-os-Montes: *Borago officinalis* L. (borragem), *Montia fontana* L. (merujas), *Rorippa nasturtium-aquaticum* (L.) Hayek (agrião), *Rumex acetosella* L. (azedinhas) e *Rumex induratus* Boiss. & Reut. (azedas). Para tal, determinou-se a sua composição em macronutrientes, micronutrientes e não-nutrientes.

Na pesquisa de macronutrientes analisou-se o seu valor nutricional em humidade, proteínas, lípidos, glúcidos e cinzas, segundo métodos oficiais de análise, bem como o perfil individual de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de índice de refração (HPLC-RI) e de ácidos gordos por cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama (GC-FID). A análise de micronutrientes incluiu a determinação de tocoferóis por HPLC-fluorescência, ácido ascórbico e carotenóides por técnicas espectrofotométricas. A análise de não-nutrientes consistiu na determinação de compostos fitoquímicos com actividade antioxidante como fenóis, flavonóides, flavonóis e antocianinas, tendo sido também avaliada a actividade antioxidante com recurso a quatro ensaios *in vitro*: actividade captadora de radicais livres, avaliação do poder redutor, capacidade de inibição da descoloração do β -caroteno e inibição da peroxidação lipídica em homogeneizados cerebrais.

Concluiu-se que as plantas em estudo apresentavam um elevado potencial nutricional e antioxidante uma vez que foram encontrados os compostos acima referidos. A espécie *R. induratus* (azedas) revelou os maiores teores de açúcares, ácido ascórbico, tocoferóis, licopeno, clorofilas, flavonóides, flavonóis, ésteres tartáricos e capacidade antioxidante, expressa em actividade captadora de radicais DPPH, inibição de descoloração do β -caroteno e inibição de formação de TBARS. Por sua vez, a espécie *R. nasturtium-aquaticum* (agrião) mostrou razões de PUFA/SFA e n-6/n-3 mais saudáveis, e a espécie *B. Officinalis* (borragem) provou ser uma fonte de ácido γ -linolénico e outros ácidos gordos da série n-6.

Assim, a inclusão destas verduras, das quais tradicionalmente se consumiam sobretudo as folhas, na dieta contemporânea deve ser considerada de forma a contribuir na ingestão diária de antioxidantes naturais. Podem ainda ser encontradas outras

aplicações na prevenção de doenças crónicas relacionadas com o *stress* oxidativo, uma vez que os seus constituintes apresentam propriedades antioxidantes nomeadamente, actividade captadora de radicais livres, podendo ser incluídas em formulações de nutracêuticos ou consumidas como alimentos funcionais devido às suas características nutricionais.

O estudo do conhecimento e uso tradicional de plantas medicinais tem em vista recuperar o património cultural tradicional assegurando a sua sobrevivência e continuidade, optimizar os usos populares através do desenvolvimento de novos produtos com funções terapêuticas a um baixo custo e reunir os conhecimentos tradicionais de forma a poderem ser utilizados em processos de desenvolvimento tecnológico (Amorozo 1996; Elisabetsky *et al.*, 2001; Fonte *et al.*, 2005).

Uma vez que um terço da população não tem acesso a medicamentos, torna-se importante o desenvolvimento de políticas nacionais de avaliação e regulação da prática da Medicina Tradicional, a criação de uma base de evidências mais forte para a qualidade, eficácia e segurança dos produtos e práticas desta medicina, a certificação sobre a disponibilidade e acessibilidade bem como a promoção do uso terapêutico sólido e documentação da Medicina Tradicional e seus remédios (OMS, 2002).

Em suma, este trabalho visa sublinhar a importância do consumo de plantas silvestres aliando um estudo científico das características das plantas aos conhecimentos empíricos que remontam aos tempos mais antigos, com o intuito de sensibilizar e incentivar a população para o uso destas plantas quer na dieta quer na formulação de novos alimentos ou medicamentos à base de produtos naturais.

V. BIBLIOGRAFIA

- Alasalvar, C., Shahidi, F. & Cadwallader, K.R. (2003). Comparison of natural and roasted Turkish Tömbul hazelnut (*Corylus avellana* L.) volatiles and flavor by DHA/GC/MS and descriptive sensory analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5067–5072.
- Alfawaz, M.A. (2006). Chemical composition of hummayd (*Rumex vesicarius*) grown in Saudi Arabia. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 552–555.
- Allard, J.P., Aghdassi, E., Chau, J., Tam, C., Kovacs, C.M., Salit, I.E. & Walmesley, S. L. (1998). Effects of vitamin E and C supplementation on oxidative stress and viral load in HIV-infected subjects. *AIDS* (London, U.K.) 12, 1653-1659.
- AOAC. (1995). *Official methods of analysis* (16th Ed.). Arlington VA, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Amaral, J.S., Casal, S., Torres, D., Seabra, R.M. & Oliveira, B.P.P. (2005). Simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in hazelnuts by a normal phase liquid Chromatographic method. *Analytical Sciences*, 21, 1545-1548.
- Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B. & Weil, J. A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, 551-562.
- Amorozo, M.C.M. (1996). A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: Di Stasi, L.C. Plantas medicinais: arte e ciência. São Paulo: UNESP, 47-68.
- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S. & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183-198.

- Aziz, E., Bouillot, L., Sapena, R., Tillement J.P. & Morin, D. (1998). Dose-related inversion of cinnarizine and flunarizine effects on mitochondrial permeability transition. *European Journal of Pharmacology*, 348, 115-121.
- Bahramikia, S. & Yazdanparast, R. (2010). Antioxidant efficacy of *Nasturtium officinale* extracts using various *in vitro* assay systems. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 3, 283–290.
- Barros, L., Carvalho, A. M., Morais, J.S. & Ferreira, I.C.F.R. (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterization in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*, 120, 247–254.
- Barros, L., Heleno, S.A., Carvalho, A.M. & Ferreira, I.C.F.R. (2010). Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: Vitamins and phenolics. *LWT — Food Science and Technology*, 43, 544–550.
- Bhandari, J.P., Kumar, N., Singh, B. & Kaul, V.K. (2008). *Journal of Chromatography A*, 1194, 257-261.
- Blackett, A.D. & Hall D.A. (1981). The effects of vitamin E on mouse fitness and survival. *Gerontology*, 27, 133–13.
- Blair, I.A. (2008). DNA adducts with lipid peroxidation products. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 15545-15549.
- Blanco, E. & Cuadrado, C. (2000). *Etnobotánica en Extremadura: Estudio de La Calabria y La Siberia Extremeñas*. Madrid: Emilio Blanco, CEP Alcoba de los Montes.
- Burda, S. & Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activity of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2774-2779.

- Cabalkova, J., Wahlund, K.G. & Chmelik, J. (2007). Complex analytical approach to characterization of the influence of carbon dioxide concentration on carbohydrate composition in Norway spruce needles. *Journal of Chromatography A*, 1148, 189-199.
- Carvalho, A.M. (2010). Plantas y sabiduría popular del Parque Natural de Montesinho. Un estudio etnobotánico en Portugal. *Biblioteca de ciencias*, 35, Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Carvalho, A.M. & Morales, R. (2010). Persistence of wild food and wild medicinal plant knowledge in a North-Eastern region of Portugal. In M. Pardo de Santayana, A. Pieroni, & R. Puri (Eds.), *Ethnobotany in the new Europe: People, health and wild plant resources*. Oxford, UK: Berghahn Books.
- Castroviejo, S. (coord). (1991). Flora Iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol. II. Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC.
- Castroviejo, S. (coord). (2011). Flora Iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol. XI. Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC.
- Castroviejo, S. (coord). (2003). Flora Iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol. IV. Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC.
- Chang, W.C., Sei, C.K., Soon, S.H., Bong, K.C., Hye, J.A., Min, Y.L., Sang, H.P. & Soo, K.K. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, 163, 1161-1168.
- Chen, C.C., Liu, L.K., Hsu, J.D., Huang, H.P., Yang, M.Y. & Wang, C.J. (2005). Mulberry extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol fed rabbits. *Food Chemistry*, 91, 691-607.

- Chew, B.P. (1995). Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. *Journal of Nutrition*, 125, 1804–1808.
- Churms, S.C. (1990). Recent developments in the chromatographic analysis of carbohydrates. *Journal of Chromatography*, 500, 555-583.
- Committee on Medical Aspects of Food Policy (COMA) (1989). Dietary Sugars and Human Disease 37. Department of Health. Report on Health and Social Subjects. Report on the Panel on Dietary Sugars. HMSO, London.
- Conforti, F., Sosa, S., Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G. A., Uzunov, D., et al. (2008). *In vivo* anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 144–151.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M. & Mérillon J.M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1768-74.
- Elizabetsky, E. (2001). Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3.^a ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/ Ed. UFSC, 87-99.
- Engler, M.B. & Engler, M.M. (2006). The emerging role of flavonoid-rich cocoa and chocolate in cardiovascular health and disease. *Nutrition Reviews*, 64, 109-118.
- Escriva, A., Esteve, M.J., Farre, R. & Frigola, A. (2002). Determination of liposoluble vitamins in cooked meals. milk and milk products by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 947, 313-318.
- Fahn, S., Elton, R.L., Committee, M.O.T.U.D. (1987). Unified Parkinson's Disease Rating Scale. In Fahn, S., Marsden, C. D., Calne, D. B., and Goldstein, M. (eds.). *Recent Developments in Parkinson's Disease*, 2, 153-163.

- Fernandez, E., Reyes, A., Hidalgo, M. E. & Quilhot, W. (1998). Photoprotector capacity of lichen metabolites assessed through the inhibition of the 8-methoxypsoralen photobinding to protein. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 42, 195-201.
- Ferreira, I.C.F.R. & Abreu, R.M.V. (2007). Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. Bioanálise - Sociedade Portuguesa de BioAnalistas da Saúde, Ano IV, n.º 2, Julho/Dezembro.
- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L. & Abreu, R.M.V. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 1543–1560.
- Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A., Andrade, P.B., Valentão, P. & Tomás-Barberán, F.A. (2007). Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography– tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1161, 214–223.
- Fonte, N.N., Santos, F.O.S., Dugonski J., Lucas R., Sessak M.H.M.A., Nerone M.L., Verdeckim M.G., Bolognesi T., Fiusa T.S., Teixeira T.T. (2005). Incentivo ao uso racional de plantas medicinais. Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal. Sector de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Paraná. Versão online: <http://www.proec.ufpr.br/enec2005/download/pdf/SA%DADE/PDF%20SAUDE/25%20%20INCENTIVO%20AO%20USO%20RACIONAL%20DE%20PLANTAS%20MEDICINAIS%20-%20rev.pdf>
- Gamache, P., Ryan, E. & Acworth, I.N. (1993). Analysis of phenolic and flavonoid compounds in juice beverages using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection. *Journal of Chromatography*, 635, 143-150.
- Gliszczyńska-Świgło, A. & Sikorska, E. (2004). Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils”. *Journal of Chromatography A*, 1048, 195-198.

- Glories, Y. (1979). Reserches sur la matière colorante des vins rouges. *Bulletin de la Société Chimique de France*, 9, 2649-2655.
- Glyad, V.M. & Russian, J. (2002). Determination of monosaccharides, disaccharides, and oligosaccharides in the same plant sample by High-Performance Liquid Chromatography. *Russian Journal of Plant Physiology*, 49, 277-282.
- Gonçalves, E.M., Cruz, R.M.S., Abreu, M., Brandão, T.R.S. & Silva, C.L.M. (2009). Biochemical and colour changes of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) during freezing and frozen storage. *Journal of Food Engineering*, 93, 32–39.
- Guil, J.L., Torija, M.E., Giménez, J.J. & Rodriguez, I. (1996). Identification of fatty acids in edible wild plants by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 719, 229–235.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 1-93.
- Hadjichambis, A., Paraskeva-Hadjichambi, D., Athena, D., Giusti, E., de Pasquale, C., Lenzarini, C., et al. (2008). Wild and semi-domesticated food plant consumption in seven circum-Mediterranean areas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59, 383–414.
- Harborne, J.B. & Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504.
- Harman, J. (2002). The toxicology of herbs in equine practice. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 1, 74-80.
- Hart, D. J. & Scott, K.J. (1995). Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chemistry*, 54, 101–111.

- Hassimotto, N.M.A., Genovese, M.I. & Lajolo, F.M. (2009). Antioxidant capacity of Brazilian fruit, vegetables and commercially-frozen fruit pulps. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 394–396.
- He, Q., Lv, Y. & Yao, K. (2007). Effects of tea polyphenols on the activities of α -amylase, pepsin, trypsin and lipase. *Food Chemistry*, 101, 1178-1182.
- Hegnauer, R. (1989). *Chemotaxonomie der pflanzen*, 8, 611-612.
- Heinrich, M. Co-ordinator of The Local Food-Nutraceuticals Consortium. (2005). Understanding local Mediterranean diets: A multidisciplinary pharmacological and ethnobotanical approach. *Pharmacological Research*, 52, 353–366.
- Herbreteau, B. (1992). Review And State Of Sugar Analysis By High Performance Liquid Chromatography. *Analyst*, 20, 355-374.
- Hernandez-Montes, E., Pollard, S.E., Vauzour, D., Jofre-Montseny, L., Rota, C., Rimbach, G., Weinberg, P.D. & Spencer, J.P.E. (2006). Activation of glutathione peroxidase via Nrfl mediates genistein's protection against oxidative endothelial cell injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346, 851-859.
- Herrling, T., Jung, K. & Fuchs, J. (2006). Measurements of UV-generated free radicals/reactive oxygen species (ROS) in skin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 63, 840-845.
- Hewavitharana, A.K., Lanari, M.C. & Becu, C. (2004). Simultaneous determination of vitamin E homologs in chicken meat by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1025, 313-317.
- Hollman, P.C.H. & Katan, M.B. (1998). Quercetin in the diet and in health. Pathophysiology. *International Congress of Pathophysiology*, 5, 267-274.

- Horrobin D.F. (1992). Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. *Progress in Lipid Research*, 31, 163-194.
- Huang, N.K. (2003). Adenosine A_{2A} receptors regulate oxidative stress formation in rat pheochromocytoma PC12 cells during serum deprivation. *Neuroscience Letters*, 350, 127-131.
- Huang, D., Ou, B. & Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Ide, T., Tsutsui, H., Hayashidani, S., Kang, D., Suematsu, N., Nakamura, K., Utsumi, H., Hamasaki, N. & Takeshita, A. (2001). Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ. Res.*, 88, 529–535.
- Ivanova, A.B., Glinsky, G.V. & Eisenstark, A. (1997). Role of ROS in resistance to oxidative stress and near- UV radiation in ΔOXYR suppressor mutants of *Escherichia coli*. *Free Radical Biology and Medicine*, 23, 627-636.
- Jandera P. & Churacek J. (1974). Ion exchange chromatography of aldehydes, ketones, ethers, alcohols, polyols and saccharides. *Journal of Chromatography*, 98, 55-104.
- Jia, Z., Tang, M. & Wu, J. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555–559.
- Jiang, Q., Elson-Schwab, I., Courtemanche, C. & Ames, B.N. (2000). γ-tocopherol and its major metabolite, in contrast to alpha-tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 11494–11499.
- Justesen, U. & Knuthsen, P. (2001). Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chemistry*, 73, 245–250.

- Kamal-Eldin, A. & Appelqvist, L. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31, 671-701.
- Kamal-Eldin, A., Gorgen, S., Petterson, J. & Lampi, A. M. (2000). Normal phase high-performance liquid chromatography columns. *Journal of Chromatography A*, 881, 217-227.
- Karadag, A., Ozcelik, B. & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2, 41-60.
- King, A. & Young, G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 99, 213-218.
- Kramer-Stickland, K., Edmonds, A., Bair, W. B. & Bowden, G.T. (1999). Inhibitory effects of deferoxamine UVB-induced AP-1 transactivation. *Carcinogenesis*, 20, 2137-2142.
- Laguerre, M., Lecomte, P. & Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counter lipid oxidation: Existing methods: New trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46, 244-282.
- Lampi, A., Kataja, L., Kamal-Eldin, A. & Piironen, V. (1999). Antioxidant activities of α - and γ -tocopherols in the oxidation of rapeseed oil triacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 76, 749-755.
- Lamuela-Raventos, R. M., Gimeno, E., Fitó, M., Castellote, A., Covas, M., Torre-Boronat, M. C. & López-Sabater, C. (2004). Interaction of Olive Oil Phenol Antioxidant Components with Low-density Lipoprotein. *Biol Res*, 37 247-252.
- Lau, F.C., Shukitt-Hale, B. & Joseph, J.A. (2005). The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging. *Neurobiology of Aging*, 26, 128-132.

- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. Cox, M.M. (2008). Principles of Biochemistry. W.H. Freeman, 5th edition.
- Loziene, K., Venskutonis, P.R., Sipailiene, A. & Labokas, J. (2007). Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chemistry*, 103, 546-559.
- Li, Y., Schellhorn & H.E. (2007). New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *Journal of Nutrition*, 137, 2171–2184.
- Li, L., Tsao, R., Yang, R., Kramer, J. K. G. & Hernandez, M. (2007). Fatty acid profiles, tocopherol contents, and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* Var. *cordiformis*) and persian walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1164–1169.
- Lin, T.M., Durance, T.D. & Scaman, C.H. (1998). Characterization of vacuum microwave, air and freeze dried carrot slices. *Food Research International*, 31, 111-117.
- Lin, C.C. & Huang, P.C. (2002). Antioxidant and hepatoprotective effects of *Acatopanax senticosus*. *Phytotherapy Research*, 14, 489-494.
- Liu, R.H. (2003). Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combination of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 517-520.
- Lorenz, K., Lal, R., Preston, C.M. & Nierop, K.G.J. (2007). Strengthening the soil organic carbon pool by increasing contributions from recalcitrant aliphatic bio(macro)molecules. *Geoderma*, 142, 1–10.
- Machlin, L.J. & Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1, 441-445.

- MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G. & Garg, M.L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2046-2056.
- Markesbery, W.R. & Lovell, M.A., (2006). DNA oxidation in Alzheimer's disease. *Antioxidant Redox Signal*, 11, 2039–204.
- Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Reis, S. & Lima, J.L.F.C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613, 1-19.
- Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B. & Ewert, B. (1999). Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot noir wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4009–4017.
- McCance, R. A. & Widdowson, E. M. (1994). The composition of food. 5.ed. Cambridge: *Royal Society of Chemistry*, 462.
- Medrano, A., Masoud, T.A. & Martinez, M.C. (1992). Mineral and proximate composition of borage. *Journal of Food Composition and Analysis*, 5, 313–318.
- Menuier, A., Caude, M. & Rosset, R. (1986). HPLC Analysis of Biological Compounds. *Analyst*, 14, 363-377.
- Mhamdi, B., Wannes, A., Sriti, J., Jellali, I., Ksouri, R. & Marzouk, B. (2010). Effect of harvesting time on phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Borago officinalis* seed extracts. *Industrial Crops and Products*, 31, e1–e4.
- Milbury, P.E., Chen, C.Y., Dolnikowski, G.G. & Blumberg, J.B. (2006). Determination of flavonoids and phenolics and their distribution in almonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5027-5033.

- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF). National Food Survey Committee. (1987). Household Food Consumption and Expenditure: Annual Report of the National Food Survey Committee, 1949-1987. HMSO, London.
- Naasani, I., Oh-Hashi, F., Oh-Hara, T., Feng, W.Y., Johnston, J., Chan, K. & Tsuruo, T. (2003). Blocking telomerase by dietary polyphenols is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Research*, 63, 824-830.
- Nagaoka, S., Kakiuchi, T., Ohara, K. & Mukai, K. (2007). Kinetics of the reaction by vitamin E is regenerated which natural by vitamin C. *Chemistry and Physics of Lipids*, 146, 26-32.
- Nagem, T.J., Da Silva, M.C. & Da Silveira, J.C. (1992). Clathraxanthone, a 1,2,7-trioxygenated xanthone from *Haploclathra paniculata*. *Phytochemistry. The International Journal of Plant Biochemistry*, 31, 2913-2914.
- Nathan, R.P. & Brumaghim, J.L. (2009). A Review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 53, 75-100.
- Ndhlala, A., Moyo, M. & Van Staden, J. (2010). Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules? *Molecules*, 15, 6905–6930.
- Nesaretnam, K., Guthrie, N., Chambers, A. F. & Carroll K.K. (1995). Effect of tocotrienols on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Lipids*, 30, 1139-1143.
- Ng, T.B., Liu, F. & Wang, Z. (2000). Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Science*, 66, 709-723.
- Nichenametla, S.N., Taruscio, T.G., Barney, D.L. & Exon, J.H. (2006). A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 161-183.

- Niki, E. (2010). Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 503-515.
- Nikiforova, A.A., Kuz'min, A.A. & Richter, W. (1995). Effect of sodium citrate on the rate of cholesterol esterification and on the formation of primary products of lipid peroxidation in human blood. Are these processes related? *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 120, 962-964.
- OMS/WHO - World Health Organization (2002). Medicina tradicional: necessidades crescentes y potencial. Policy perspectives on medicines. Geneva, 2, 1-6.
- Panfili, G., Fratianni, A. & Irano, M. (2003). Normal phase highperformance liquid chromatography method for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3940-3944.
- Pardo de Santayana, M., Tardío, J. & Morales, R. (2005). The gathering and consumption of wild edible plants in the Campoo (Cantabria, Spain). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56, 529-542.
- Peleg, H., Bodine, K.K. & Noble, A.C. (1998). The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. *Chemical Senses*, Oxford, 23, 371-378.
- Perry, E.K., Pickering, A.T., Wang, W.W., Houghton, P.J., Perru, N.S., (1999). Medicinal plants and Alzheimer's disease: from ethnobotany to phytotherapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51, 527-534.
- Pirisino, J.F. (1984). Food Constituents and Food Residues, Their Chromatographic Determination, Marcel Dekker, New York. *Food Science and Technology*, 11, 159-193.
- Polo, S., Tardío, J., Vélez-del-Burgo, A., Molina, M. & Pardo-de-Santayana, M. (2009). Knowledge, use and ecology of golden thistle (*Scolymus hispanicus* L.) in Central Spain. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 5-42.

- Prior, R.L. (2003). Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 570S-578S.
- Prior, R.L., Wu, X.L. & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Pyka, A. & Sliwiok, J. (2001). Chromatographic separation of tocopherols. *Journal of Chromatography A*, 935, 71-76.
- Rao, A.V. & Rao, L.G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55, 207-216.
- Rejón, F.R., Martín-Peña, G., Granado, F., Ruiz-Galiana, J., Blanco, I. & Olmedilla, B., 2002. Plasma status of retinol, α - and γ -tocopherols, and main carotenoids to first myocardial infarction: case control and follow-up study. *Nutrition*, 18, 26-31.
- Repetto, M.G. & Llesuy, S.F. (2002). Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Brazilian Journal of Medicine and Biological Research*, 35, 523-534.
- Robards, K. & Antolovich, M. (1997). Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. *Analyst*, 122, 11R-34R.
- Roginsky, V. & Lissi, E.A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92, 235-254.
- Romani, A., Baldi, A., Mulinacci, N., Vincieri, F.F. & Tattini M. (1996). Extraction and identification procedures of polyphenolic compounds and carbohydrates in phillyrea (*Phillyrea angustifolia* L.) leaves. *Chromatographia*, 42, 571-577.

- Rupérez, F.J., Martín, D., Herrera, D. & Barbas, C. (2001). Chromatography analysis of a α -tocopherol and related compounds in various matrices. *Journal of Chromatography A*, 935, 45-69.
- Saleem, A., Husheem, M., Harkonen, P. & Pihlaja, K. (2002). Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. Fruit. *Journal of Ethnopharmacology*, 81, 327-336.
- Samman, S., Sivarajah, G., Man, J. C., Ahmad, Z. I. Petocz, P. & Caterson, I. D. (2003). A mixed fruit and vegetable concentrate increases plasma antioxidant vitamins and folate and lowers plasma homocysteine in men. *Journal of Nutrition*, 133, 2188-2193.
- Sánchez-Bel, P. (2005). Oil quality and sensory evaluation of almond (*Prunus amygdalus*) stored after electron beam processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2567- 2573.
- Serpen, A. & Gökmen, V. (2007). Reversible degradation kinetics of ascorbic acid under reducing and oxidizing conditions. *Food Chemistry*, 104, 721–725.
- Silva, E. M., Souza, J. N. S., Rogez, H., Rees, J. F. & Larondelle Y. (2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*, 101, 1012-1018.
- Simopoulos, A.P. (2003). ‘Preface’, in A.P. Simopoulos and C. Gopalan (eds), *Plants in Human Health and Nutrition Policy*. Basel: Karger, pp. vii–xiii.
- Singh, S. K., Sahay, R. K. & Krishna, A., 2008. Oxidative stress in diabetic foot ulcer. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 2, 109-113.
- Singleton, V.L. & Rossi, J.A. Jr. (1965). Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

- Souci, S. W., Fachmann, W. & Kraut, H. (1986). Food composition and nutrition tables. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Suzuki, T., Honda, Y., Funatsuki, W. & Nakatsuka, K. (2002). Purification and characterization of flavonol 3-glucosidase, and its activity during ripening in tartary buckwheat seeds. *Plant Science*, 163, 417-423.
- Tardio, J., Pascual, H. & Morales, R. (2005). Wild food plants traditionally used in the province of Madrid, central Spain. *Economic Botany*, 59, 122–136.
- Tardío, J., Pardo de Santayana, M. & Morales, R. (2006). Ethnobotanical review of wild edible plants in Spain. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152, 27–71.
- Taveira, M., Pinho, P. G., Gonçalves, R. F., Andrade, P. B. & Valentão, P. (2009). Determination of eighty-one volatile organic compounds in dietary *Rumex induratus* leaves by GC/IT-MS, using different extractive techniques. *Microchemical Journal*, 93, 67–72.
- Traber, M.G. & Packer, L. (1995). Vitamin E: beyond antioxidant function. Review Articles. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62, 1501-1509.
- Valko, M., Leibfritz D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 44-84.
- Velasco, L. & Goffman, F.D. (1999). Chemotaxonomic significance of fatty acids and tocopherols in Boraginaceae. *Phytochemistry*, 52, 423–426.
- Vokurkova, M., Xu, S. & Touyz, R.M. (2007). Reactive oxygen species, cell growth, cell cycle progression and vascular remodeling in hypertension. *Future Cardiology*, 3, 53–56.
- Wade, L.G. (1999). Organic chemistry, Prentice-Hall.

- Wang, Q., Han, P., Zhang, M., Xia, M., Zhu, H., Ma, J., Hou, M., Tang, Z. & Ling, W. (2007). Supplementation of black rice pigment fraction improves antioxidant and anti-inflammatory status in patients with coronary heart disease. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16, 1295-1301.
- Weaver, C.M. & Cheong, J.M. (2005). Soy isoflavones and bone health: The relationship is still unclear. *Journal of Nutrition*, 135, 1243–1247.
- Weisburger, J. (1999). Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 943-948.
- Wettasinghea, M., Shahidia, F., Amarowicz, R. & Abou-Zaid, M. M. (2001). Phenolic acids in defatted seeds of borage (*Borago officinalis L.*). *Food Chemistry*, 75, 49–56.
- Wright J.S., Johnson E.R. & DiLabio G.A. (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 123, 1173-1183.
- Yang, E. B., Guo, Y. J., Zhang, K., Chen, Y.Z. & Mack, P. (2001). Inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by chalcone derivatives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1550, 144-152.
- Yazdanparast, R., Bahramikia, S. & Ardestani, A. (2008). *Nasturtium officinale* reduces oxidative stress and enhances antioxidant capacity in hypercholesterolaemic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 172, 176–184.
- Zhang, Y., Varred, S.K. & Nair, M.G. (2005). Human tumor cell growth inhibition by non-toxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sciences*, 76, 1465-1472.

VI. ANEXOS

Publicação em revista indexada ao ISI, com base nos resultados descritos nesta dissertação:

Carla Pereira, Lillian Barros, Ana Maria Carvalho, Isabel C.F.R. Ferreira.
Nutritional composition and bioactive properties of commonly consumed wild greens: Potential sources for new trends in modern diets. Food Research International, 2011, 44, 2634-2640.