



Propriedades nutricionais e nutracêuticas de
Grelos e Espigos

Cátia Emanuela Oliveira Batista

*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 2012

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a algumas pessoas a sua valiosa colaboração, disponibilidade e apoio irrefutável no desenvolvimento desta dissertação de Mestrado, sem esse apoio seria impossível a concretização deste sonho.

Às Professoras Doutoras Isabel Ferreira e Ana Carvalho agradeço a disponibilidade, a sabedoria e os ensinamentos constantes em todo o processo de orientação científica desta dissertação, e todo o seu incentivo, confiança e paciência. Foi um privilégio ter sido sua orientada. Com muita admiração, agradeço o estímulo sempre tão eficaz que conduziu também ao meu crescimento pessoal.

À Doutora Lillian Barros com quem tanto partilhei experiências e incertezas, agradeço a amizade e o incentivo ao longo da concretização desta dissertação. Agradeço a amabilidade, o empenho e a paciência.

A todos os meus amigos que me apoiaram ao longo de todo o processo, aceitando as minhas constantes ausências. À Cátia pela sua incansável amizade a qualquer hora e a qualquer momento, por estar sempre presente.

A vós Mãe, Pai e Irmã por todo o amor e dedicação e por me fazerem acreditar que não há impossíveis e que eu sou capaz.

Ao meu namorado por todo o amor e encorajamento que sempre me deu, nunca me deixando desistir. Obrigado por toda a paciência e compreensão.

A todos os amigos que me apoiaram mesmo sem estarem tão presentes, mas que sempre me deram forças e carinho para continuar.

Um muito obrigado a todos!

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	2
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABELAS	6
ABREVIATURAS	7
RESUMO	9
ABSTRACT	10
I. INTRODUÇÃO	11
1.1. Consumo de espigos e grelos no Norte de Portugal	11
1.2. Alimentos funcionais	12
1.3. Antioxidantes em vegetais	14
1.3.1. Stresse oxidativo	14
1.3.2. Antioxidantes hidrossolúveis	17
1.3.3. Antioxidantes lipossolúveis	22
1.4. Enquadramento do estudo e objetivos	25
II. MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1. Amostras	26
2.2. Padrões e Reagentes	27
2.3. Valor Nutricional	27
2.3.1. Macronutrientes	27
2.3.2. Açúcares livres	28
2.3.3. Ácidos Gordos	29
2.4. Antioxidantes Lipossolúveis	29
2.4.1. Tocoferóis	29
2.4.2. Carotenoides e clorofilas	30
2.5. Antioxidantes hidrossolúveis	31
2.5.1. Vitamina C	31
2.5.2. Fenóis e flavonoides	31
2.6. Avaliação in vitro das propriedades antioxidantes	32
2.6.1. Geral	32
2.6.2. Atividade captadora de radicais DPPH	32

2.6.3. Poder redutor	33
2.6.4. Inibição da descoloração do β -caroteno	33
2.6.5. Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)	34
2.7. Análise estatística	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
3.1. Valor Nutricional	36
3.2. Antioxidantes lipossolúveis e hidrossolúveis	40
3.3. Propriedades antioxidantes in vitro	43
3.3.1. Efeito captador de radicais DPPH	44
3.3.2. Poder Redutor	46
3.3.3. Inibição da descoloração do β -caroteno	47
3.3.4. Inibição da formação de TBARS	49
4. CONCLUSÕES	51
5. BIBLIOGRAFIA	53
ANEXOS	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Principais causas e consequências da acção dos radicais livres (Ferreira et al., 2009).	15
Figura 2: Estrutura química do ácido ascórbico.	17
Figura 3: Benefícios na saúde que advêm de uma dieta rica em polifenóis (Pandey et al., 2009).	19
Figura 4: Estrutura base dos flavonoides (Gomes et al., 2008).	20
Figura 5: Estrutura química do α - tocoferol.	22
Figura 6: Estrutura química do β -caroteno.	24
Figura 7: Atividade captadora de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) de inflorescências de duas espécies do género Brassica (média \pm SD, n = 9).	44
Figura 8: Poder redutor de inflorescências de duas espécies do género Brassica (média \pm SD, n = 9).	46
Figura 9: Inibição da descoloração do β -caroteno de inflorescências de duas espécies do género Brassica (média \pm SD, n = 9).	48
Figura 10: Inibição da peroxidação lipídica através do ensaio de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) de inflorescências de duas espécies do género Brassica (média \pm SD, n = 9).	49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Humidade (g/100 g de massa fresca), nutrientes (g/100 g de massa seca) e valor energético (kcal/100 g de massa seca) de inflorescências de duas espécies do género Brassica (média \pm SD, n = 9). Em cada linha, letras diferentes significam, diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). ----- 36

Tabela 2: Composição em ácidos gordos (percentagem relativa de inflorescências de duas espécies do género Brassica (média \pm SD, n = 9). Em cada linha, letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). ----- 39

Tabela 3: Composição em antioxidantes lipossolúveis e hidrossolúveis (mg/100 g de massa seca) de inflorescências de duas espécies do género Brassica (média \pm SD, n = 9). Em cada linha, letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). ----- 41

Tabela 4: Rendimentos de extração e atividade antioxidante (valores de EC_{50} valores, mg/mL) das inflorescências de duas espécies do género Brassica (média \pm SD, n = 9). Em cada linha, letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). ----- 43

ABREVIATURAS

A-Absorvância

ACR - Atividade captadora de radicais livres

ANOVA - Análise de variância

AsH⁻ - Ião ascorbato

AOAC -Association of Official Analytical Chemist

BHT - 2,6-Di-*t*-butil-4-metilfenol

BRESA- Herbário da Escola Superior Agrária de Bragança

CAT -Catalase

DCV - Doenças cardiovasculares

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DP- Desvio padrão

DPPH- 2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo

EC₅₀- Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor

FAME- Ésteres metílicos de ácidos gordos

FID - Detetor de ionização de chama

GAE - Equivalentes de ácido gálico

GPx - Glutathione peroxidase

GC- Cromatografia Gasosa

HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

L[•]- Radical lipídico

LH - Radical alquilo reduzido

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade

LO[•]- Radical alcoxilo

LOO[•]- Radical peroxilo

LOOH- Hidroperóxido lipídico

MUFA - Ácidos gordos monoinsaturados

m/v - Relação massa/volume

NADH- Nicotinamida adenina dinucleótido na forma reduzida

NAD - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

MDA- Malondialdeído

MDA-TBA- Complexo malonaldeído-ácido tiobarbitúrico

PI- Padrão interno

PUFA- Ácidos gordos polinsaturados

RI- Detetor de índice de refração

RNS - Espécies reativas de azoto

ROOH - Radical hidroperóxido reduzido

ROS- Espécies reativas de oxigénio

rpm - Rotações por minuto

SD - Desvio padrão

SFA- Ácidos gordos saturados

SOD -Superóxido dismutase

TBA - Ácido tiobarbitúrico

TBARS - Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico

TO[•] - Radical tocoferoxilo

TOH- Tocoferol

UE - União Europeia

UV- Radiação Ultravioleta

v/v – Relação volume/volume

Vis – Visível

RESUMO

Neste trabalho, estudaram-se duas das hortaliças cultivadas e tradicionalmente consumidas nas regiões do Norte de Portugal: espigos e grelos, designações que correspondem às inflorescências de couve-nabo (*Brassica napus* var *napus*) e de couve-tronchuda ou couve-Portuguesa (*Brassica oleracea* var *costata*), respetivamente. Determinou-se a sua composição química, o perfil nutricional e as suas propriedades antioxidantes, avaliadas *in vitro* utilizando quatro ensaios diferentes: atividade captadora de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), poder redutor, inibição da descoloração do β -caroteno e inibição da peroxidação lipídica pela diminuição da formação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homogeneizados de células cerebrais.

As amostras estudadas revelaram ser vegetais nutricionalmente equilibrados, em particular os espigos que mostraram conter teores mais elevados de humidade, proteínas, energia, lípidos, β -caroteno e vitamina C. Os grelos revelaram maiores teores de cinzas, glúcidos, açúcares (incluindo frutose, glucose, sacarose e rafinose), ácido gordo n-3 essencial, ácido α -linolénico, as melhores razões PUFA/SFA e ácidos gordos n-6/n-3, tocoferóis, licopeno, clorofilas, fenóis, flavonoides, apresentando também mais propriedades antioxidantes.

Os benefícios para a saúde inerentes ao consumo destas duas espécies estão associados às suas propriedades antioxidantes, reforçando desta forma, a sua inclusão em dietas saudáveis e equilibradas. Este trabalho enfatiza o interesse do consumo de espécies tradicionais, validando a sua utilização empírica, mas também conferindo valor acrescentado a estes produtos regionais já utilizados há vários anos.

ABSTRACT

Two traditional cultivated vegetables highly consumed among Northern Portuguese regions were tested for their chemical composition, nutritional profile and *in vitro* antioxidant properties using four assays: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals scavenging activity, reducing power, inhibition of β -carotene bleaching and inhibition of lipid peroxidation by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay. The studied varieties of two *Brassica* species, locally known as “grelos” (rape) and “espigos” (“tronchuda” cabbage) are nutritionally well-balanced vegetables; particularly “tronchuda” cabbage revealed the highest levels of moisture, proteins, fat, energy, β -carotene and vitamin C; rape gave the highest contents of ash, carbohydrates, sugars (including fructose, glucose, sucrose and raffinose), essential n-3 fatty acid α -linolenic acid, and the best ratios of PUFA/SFA and n-6/n-3 fatty acids, tocopherols, lycopene, chlorophylls, phenolics, flavonoids, and also the highest antioxidant properties. The health benefits associated to the antioxidant properties reinforce their contribution to a healthy and balanced diet, highlight the interest of their consumption, validate the empirical use and add new values to traditional/regional products which have been used for a long time.

I. INTRODUÇÃO

1.1. Consumo de espigos e grelos no Norte de Portugal

Na Península Ibérica, as verduras silvestres e cultivadas assumem um papel particularmente importante como alimentos básicos já desde a antiguidade.

Os padrões alimentares e o conhecimento sobre a alimentação local fazem parte da herança cultural do Mediterrâneo que, infelizmente, está a mudar e a desaparecer rapidamente, principalmente em virtude do êxodo rural e do abandono das práticas tradicionais/regionais da agricultura, mas também devido aos estilos de vida globais que têm sido introduzidos nas sociedades rurais.

No entanto, a descoberta do conceito de nutracêuticos e alimentos funcionais, tornaram-se questões essenciais para a dieta e comportamentos nutricionais. Assim, o potencial nutricional de vegetais locais (silvestres e cultivados há séculos) e os seus potenciais benefícios para a saúde, têm sido reconhecidos como importantes domínios de investigação.

Os espigos, inflorescências de couve-tronchuda ou couve-Portuguesa (*Brassica oleracea* L. var *costata* DC) e os grelos, inflorescências de couve-nabo (*Brassica napus* L. var *napus*), são exemplos de vegetais amplamente cultivados e tradicionalmente consumidos pelas comunidades rurais do Norte de Portugal. Algumas variedades regionais muito antigas, cultivadas no Outono/Inverno e resistentes às baixas temperaturas, são aproveitadas para diversas finalidades, sendo por isso consideradas cultivos de uso múltiplo. Proporcionam raízes tuberosas (nabos), caules, folhas e inflorescências, que são empregues tanto na alimentação animal como humana. A matéria vegetal sobrante que fica no terreno é reciclada e incorporada no solo. Algumas plantas são deixadas propositadamente nas parcelas até à maturação do fruto e deiscência dos frutos para a produção de semente (Carvalho, 2010).

De acordo com inventários etnobotânicos realizados na região, vários consumidores consideram que estes produtos alimentares obtidos nos meses de frio

são mais saborosos e nutritivos, já que a ocorrência de geadas contribui para uma melhoria das suas propriedades organoléticas e da digestibilidade (Carvalho, 2010).

Das espécies estudadas consomem-se as folhas e também as raízes tuberosas, no caso da couve-nabo, durante o Outono e Inverno. Estas verduras são frequentemente utilizadas como acompanhamento de pratos de peixe e carne e são ingredientes importantes da tradicional feijoada, em particular da feijoada Transmontana. As inflorescências que se formam nos ramos terminais no final do Inverno e início da Primavera são muito apreciados em sopas, arroz e como acompanhamento de enchidos (Carvalho, 2010).

Atualmente, estes vegetais são incluídos em muitos menus gastronómicos e eventos gourmet nacionais. Para além deste interesse renovado nas verduras tradicionais, os potenciais benefícios para a saúde e a recuperação de hábitos e alimentos populares, podem contribuir para a revitalização do consumo e, consequentemente, para o incentivo do cultivo e comercialização a preços justos para produtores e consumidores.

1.2. Alimentos funcionais

Os vegetais são considerados alimentos funcionais, que contêm substâncias ou mesmo nutrientes que fornecem benefícios à saúde, seja como forma de prevenção ou mesmo como tratamento de doenças. De uma forma geral, os alimentos funcionais são considerados promotores de saúde. Isto ocorre porque na sua composição são encontrados compostos bioativos, capazes de atuar como moduladores de processos metabólicos, que desta forma previnem o aparecimento precoce de doenças degenerativas. Desta forma, está cada vez mais claro que existe uma relação estreita entre os alimentos que consumimos e a nossa saúde.

Contudo, é necessário que o consumo destes alimentos seja regular a fim de que os seus benefícios sejam alcançados. Daí dever existir um maior consumo de vegetais e fruta, pois parte dos componentes ativos estudados estão contidos nesses alimentos.

Sabe-se que as plantas possuem açúcares livres, ácidos orgânicos, aminoácidos (livres e incorporados em proteínas), lípidos e minerais que são componentes naturais de muitas frutas e vegetais, e que desempenham um papel importante na manutenção da sua qualidade, sendo ainda determinantes para o seu valor nutritivo na dieta humana (Ayaz et al., 2006; Belitz e Grosch, 2006). Além disso, diversos estudos epidemiológicos têm indicado que uma elevada ingestão de produtos vegetais está associada a um risco reduzido de uma série de doenças crónicas, nomeadamente aterosclerose e cancro (Farag e Motaal, 2010; Gosslau e Chen, 2004; Gundgaard et al., 2003; Kris-Etherton et al., 2002). Estes efeitos benéficos têm sido parcialmente atribuídos a compostos com atividade antioxidante.

A fruta e os vegetais, além do seu elevado poder em antioxidantes, tem inúmeros nutrientes e compostos conhecidos e desconhecidos, que de certa forma podem interagir de uma maneira específica de forma a afetar positivamente a saúde humana (Kubo et al., 2008).

De acordo com ensaios clínicos e estudos epidemiológicos existe uma correlação inversa entre a ingestão de fruta e produtos hortícolas e a ocorrência de doença cardiovascular (DCV), síndromas inflamatórios, cancro e doenças relacionadas com o envelhecimento, levando de certa forma a uma menor mortalidade (Prior et al., 2000). Este facto deve-se principalmente à presença de vários antioxidantes na fruta e nos legumes, nomeadamente vitamina C, vitamina E, polifenóis e carotenoides (Kondo et al., 2009).

Os alimentos funcionais e os nutracêuticos não curam doenças, apresentam princípios ativos capazes de prevenir ou reduzir os seus riscos. Entre as doenças mais investigadas estão as cardiovasculares, cancro, hipertensão, diabetes, doenças inflamatórias e intestinais, algumas infeções reumáticas e doença de Alzheimer. No entanto, esses alimentos só funcionam se fizerem parte de uma dieta equilibrada, acompanhada de exercício físico.

Além de tudo isto, os vegetais contêm um reduzido valor calórico. Neste sentido é aceite que a dieta de restrição calórica diminui a incidência de tumores quimicamente induzidos e aumenta a esperança média de vida, daí levando a reduzir o

dano oxidativo e alterando as taxas de divisão celular e/ou apoptose. Este facto não só leva a atenuar a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) nas mitocôndrias do fígado, como também afeta a cadeia transportadora de eletrões (Jiménez- Monreal et al., 2009).

De certa forma, um regime alimentar com fontes ricas de antioxidantes, incluindo compostos polifenólicos, vitamina E, vitamina C e carotenoides, parece ser eficaz na prevenção das doenças relacionadas com o stresse oxidativo (Huang et al., 2005).

1.3. Antioxidantes em vegetais

1.3.1. Stresse oxidativo

Nos organismos aeróbios, os radicais livres são produzidos durante o funcionamento normal da célula, na maior parte sob a forma de ROS, sendo posteriormente removidos por espécies antioxidantes presentes na célula (Ferreira et al., 2007; Valko et al., 2007). Por sua vez, os antioxidantes são moléculas naturais que previnem a formação descontrolada de radicais livres e ROS ou que inibem a sua reação com as estruturas biológicas, interrompendo as reações em cadeia e formando radicais com baixa reatividade que são facilmente removidos do organismo.

Uma vez produzidos, a maior parte dos radicais livres são removidos pelas defesas antioxidantes da célula que incluem enzimas e moléculas não enzimáticas.

A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes são uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo (Ferreira et al., 2007; Valko et al., 2007). No entanto, há situações em que o equilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes pode ser destruído devido a uma produção excessiva de ROS, ou porque existe uma deficiência nas defesas antioxidantes da célula (Ferreira et al., 2007; Machlin et al., 1987). Assim, a este desequilíbrio chamamos stresse oxidativo e nestas situações as ROS em excesso podem oxidar e danificar lípidos celulares, proteínas e DNA, levando à sua modificação

e frequentemente à inutilização, inibindo a sua função normal (Ferreira et al. 2007; Fu et al., 1998; Ridnour et al., 2005; Valko et al., 2007).

A este desequilíbrio corresponde o stresse oxidativo, que pode ser definido como o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes.

Devido à vida atual, os antioxidantes do organismo parecem não ser suficientes para neutralizar todos os radicais livres produzidos. Assim, aconselha-se o aumento da ingestão de alimentos ricos em antioxidantes (Patel, 2008).

O stresse oxidativo pode ter causas naturais, como o que ocorre em situações de exercício físico extremo, ou em processos de inflamação; mas pode também ter causas não naturais como a presença de xenobióticos no organismo (Figura 1). A produção não controlada de radicais livres foi associada com múltiplas doenças tais como: cancro, diabetes, cirrose, doenças cardiovasculares, desordens do foro neurológico e também com o processo de envelhecimento e processos inflamatórios (Ferreira et al., 2007; Halliwell et al., 1984; Halliwell, 1996; Valko et al., 2007; Wang et al., 2007).

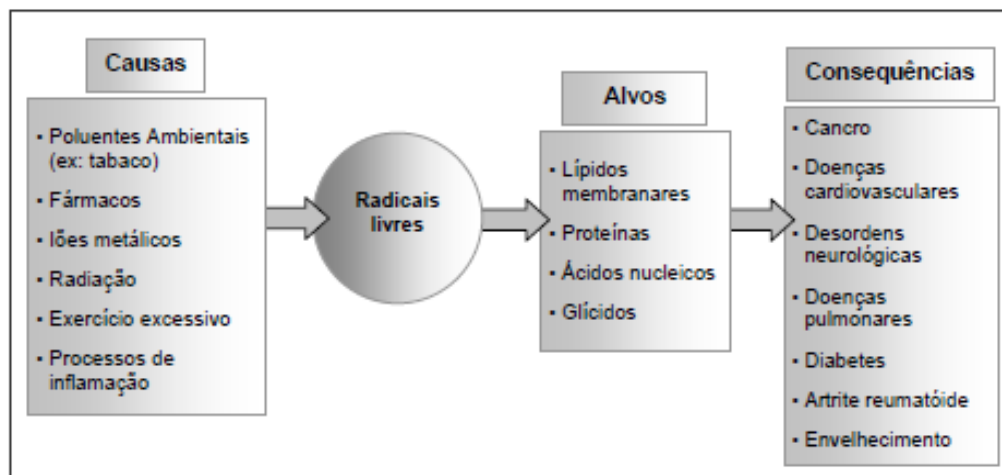


Figura 1: Principais causas e consequências da ação dos radicais livres (Ferreira et al., 2009).

A forma de controlo da produção excessiva de ROS, pode ser conseguida de forma a assegurar os níveis adequados de antioxidantes e quelantes de radicais livres; quer melhorando a qualidade da dieta (maior consumo de vegetais, leguminosas e

frutos), quer evitando comportamentos que levem a uma maior produção de radicais livres e ROS como o tabaco, o álcool, a exposição excessiva a poluentes ambientais e xenobióticos (Ferreira et al., 2007; Lachance et al., 2001).

Os mecanismos de ação dos antioxidantes incluem atuações como:

i) Barreiras físicas, para impedir a produção de ROS e o acesso a locais biológicos importantes (por exemplo filtros UV e membranas celulares); ii) Mecanismos químicos, que "captam" a energia e os eletrões, eliminando os ROS; os carotenoides, e as antocianidinas são exemplos deste tipo de antioxidantes; iii) Sistema catalítico, que neutralizam ou deslocam os ROS; são exemplo, as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a GPx (glutathione peroxidase); iv) Inativação/ligação de iões metálicos, para evitar produção de ROS; a ferritina, ceruloplasmina, catequinas são exemplos deste tipo de antioxidantes; v) Antioxidantes de quebra de cadeia, que captam e destroem os ROS; são exemplos deste tipo de antioxidantes o ácido ascórbico (vitamina C), tocoferóis (Vitamina E), ácido úrico, glutathione, flavonoides (Karadag et al., 2009).

O papel e os efeitos benéficos dos antioxidantes contra várias desordens e doenças induzidas pelo stresse oxidativo têm sido alvo de grande atenção.

A exposição do organismo a radicais livres, provenientes de diversas fontes, levou o organismo a desenvolver mecanismos de defesa (defesas endógenas) para eliminar estes radicais livres (Cadenas 1997; Ferreira et al. 2007). Estas defesas endógenas podem ser enzimáticas ou não enzimáticas. As defesas antioxidantes enzimáticas são em grande número e encontram-se espalhadas por todo o organismo, tanto no meio intracelular como no meio extracelular.

Os antioxidantes enzimáticos incluem as principais enzimas antioxidantes, nomeadamente catalase e glutathione peroxidase. Alguns exemplos de antioxidantes não enzimáticos incluem a vitamina C e os compostos fenólicos hidrossolúveis e lipossolúveis (vitamina E e carotenoides) (Ndhlala et al., 2010; Ratnam et al., 2006).

Os antioxidantes mais abundantes nos vegetais são as vitaminas C e E, os carotenoides e os compostos fenólicos, especialmente flavonoides (Podsędek, 2007).

Estes antioxidantes podem atuar em conjunto na neutralização de ROS, de forma mais eficaz do que um único antioxidante dietético, devido a efeitos sinérgicos

que se observam. Além disso, uma mistura que contenha antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis tem a possibilidade de captar radicais livres em fases aquosa e lipídica (Podsędek, 2007).

1.3.2. Antioxidantes hidrossolúveis

1.3.2.1. Vitamina C

O ácido ascórbico ou vitamina C (Figura 2) é um antioxidante hidrossolúvel, facilmente absorvido, mas que não é armazenada no organismo (Naidu, 2003). A 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). Contudo, além de ser um forte antioxidante, é importante para a absorção de ferro, é essencial pela sua atividade na biossíntese do colagénio e neurotransmissores e parece ter ação imunoestimuladora (Teixeira, 2010). Porém, apresenta diversos problemas de estabilidade, nomeadamente na presença de luz, oxigénio e altas temperaturas.

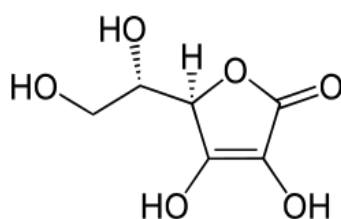


Figura 2: Estrutura química do ácido ascórbico.

Determinados cientistas consideram esta vitamina como uma “universal panacea” devido às suas características bioquímicas e funções gerais farmacológicas (Yi et al., 2009). O ácido ascórbico parece exercer um papel protetor contra algumas

doenças relacionadas com o stresse oxidativo, nomeadamente cancro e doenças cardiovasculares (Lehninger et al., 2008).

A vitamina C tem capacidade de captar e neutralizar ROS; o ascorbato é eficaz contra o radical superóxido, peróxido de hidrogénio, radical hidroxilo (HO•), radical peróxido (ROO•) e singletos de oxigénio (¹O₂). Também capta e neutraliza espécies reativas de azoto (RNS), prevenindo a nitrosação das moléculas alvo. Pode desta forma proteger as biomembranas contra os danos da peroxidação lipídica, eliminando os radicais peróxido na fase aquosa, antes que este possa iniciar a peroxidação lipídica (; Ferreira et al., 2009; Naidu, 2003). A vitamina C tem ainda a capacidade de regenerar os tocoferóis e tocotrienóis.

É de notar que o organismo não consegue distinguir a vitamina C natural da sintética.

As principais proveniências da vitamina C são frutos (laranja, limão, morangos, mirtilos, tomate) e produtos hortícolas (pimentão verde, batatas, brócolos, vegetais de folhas verdes, repolho, couve-flor) (Naidu, 2003).

1.3.2.2. Compostos Fenólicos

No que diz respeito aos compostos fenólicos, efetivamente as plantas contêm vários dos quais são reconhecidos como excelentes antioxidantes devido à sua capacidade para captar radicais livres por transferência de um único eletrão e às excelentes propriedades redox dos seus grupos hidroxilos fenólicos (Bors et al., 1987).

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 ou compostos altamente polimerizados. Estes compostos são originados a partir das vias do xiquimato e do acetato-malonato (Silva et al., 2007).

Além de propriedades antioxidantes, que retardam a oxidação de vários compostos "importantes para a vida" (Amarowicz et al., 2010), a sua presença contribui ainda para a parte sensorial dos alimentos, como a cor, o sabor e o aroma.

Os compostos fenólicos podem formar compostos de coordenação com o ferro, pelo que são muito estudados para o tratamento e prevenção de condições associadas a ROS originados por ferro e stresse oxidativo. O ferro é uma das principais causas de ROS *in vivo*, explicada pela reação de redução do Fe^{3+} por moléculas redutoras (NADH) que regeneram o ferro para a reação com o H_2O_2 numa reação de Fenton, que conduz a lesões no DNA e morte celular (Barreira, 2010).

Há evidência de que os compostos fenólicos atuam como antioxidantes, prevenindo doenças associadas ao stresse oxidativo como a oxidação das LDL, agregação plaquetária, danos nas células sanguíneas, DCV, cancro, inflamação (Gharras, 2009; Scalbert et al., 2000) e doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer (Niki, 2010) (Figura 3).

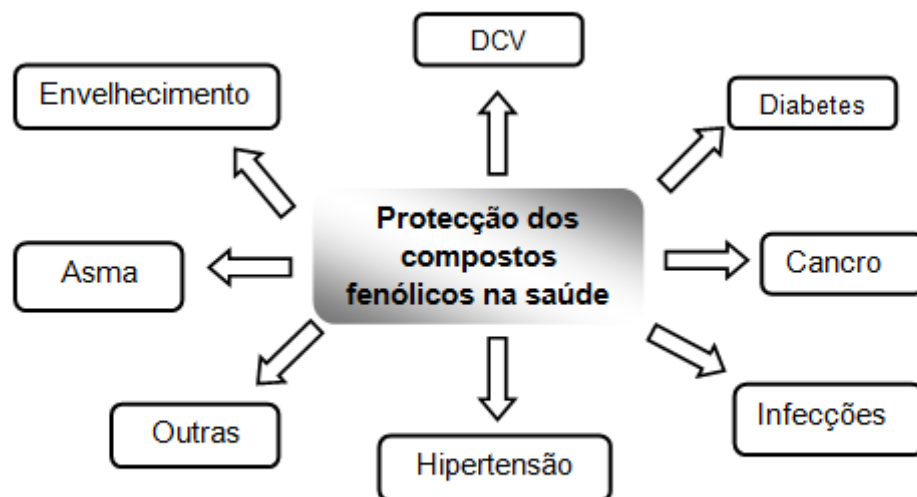


Figura 3: Benefícios na saúde que advêm de uma dieta rica em polifenóis (Pandey et al., 2009).

Os compostos polifenólicos desempenham funções anti-histamínicas, anti-inflamatórias, antibacterianas e antivirais.

A atividade antioxidante de extratos ricos em compostos fenólicos é normalmente correlacionada com o teor de fenóis totais e estes podem ser quantificados segundo o ensaio de Folin-Ciocalteu (Palácios et al., 2011).

1.3.2.3. Flavonoides

Os flavonoides são a maior família de fitoquímicos presentes em frutos e vegetais (legumes, cacau, chá, vinho) pelo que, uma dieta rica em flavonoides tem sido considerada vantajosa para a saúde humana. Contudo, os flavonoides não podem ser sintetizados por humanos e animais (Neves et al., 2010).

São compostos naturais, presentes em todas as plantas vasculares, sendo reconhecidos como os pigmentos responsáveis pelas cores das folhas no Outono e as várias tonalidades de amarelo, laranja e vermelho das flores e dos géneros alimentícios.

A atividade bioquímica dos flavonoides e dos seus metabolitos depende da sua estrutura química (Figura 4) e da orientação relativa dos grupos nos diferentes anéis (Neves et al., 2010).

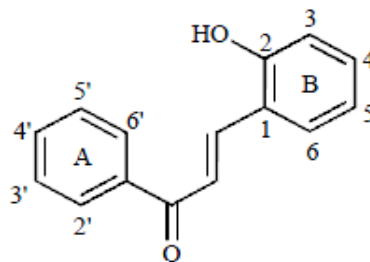


Figura 4: Estrutura base dos flavonoides (Gomes et al., 2008).

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

nas plantas são os flavonóis, os flavan-3-óis e as antocianinas (Robards e Antolovich, 1997).

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 eletrões- π conjugados cedem muito facilmente hidrogénio às ROS e RNS (Milbury et al., 2006). Assim, os flavonoides apresentam uma grande bioatividade 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 atividade antidepressiva e melhorar a função cognitiva (Samman et al., 2003).

Para a determinação dos flavonoides 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 flavonoide-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 flavonoides 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 exato, fornecendo, geralmente, valores ligeiramente inferiores relativamente à quantidade de flavonoides totais presente na amostra (Chang et al., 2002).

1.3.3. Antioxidantes lipossolúveis

1.3.3.1. Vitamina E

Vitamina E (Figura 5) é um termo muito usado para designar uma família de compostos quimicamente relacionados, ou seja, tocoferóis e tocotrienóis, com uma estrutura comum: grupo cromanol e cadeia lateral isoprénica.

O α -tocoferol é o mais comum e o mais ativo biologicamente destas formas de ocorrência natural de vitamina E.

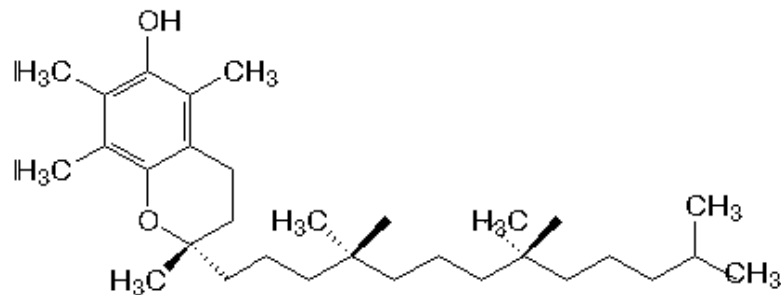


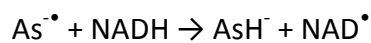
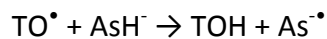
Figura 5: Estrutura química do α - tocoferol.

A vitamina E é um poderoso antioxidante lipossolúvel, presente nas membranas, prevenindo mais facilmente a peroxidação lipídica. É um composto essencial das membranas celulares e tem atividade biológica específica na regulação da expressão génica, sinalização, proliferação celular e reprodução (Mamede, 2011).

É constituída por 8 formas diferentes: 4 tocoferóis (α , β , γ , e δ) e 4 tocotrienóis (α , β , γ , e δ) (Ferreira et al., 2007; Mamede, 2011).

A vitamina E (tocoferóis), como antioxidante lipofílico pode interagir com componentes lipídicos das membranas celulares ou com lipoproteínas de baixa densidade, protegendo-os de danos oxidativos. Face a esta interação, resulta uma oxidação dos tocoferóis que são transformados em radicais tocoferoxilo reativos que, por sua vez, podem reagir com lípidos insaturados ($TO^{\bullet} + LH \rightarrow TOH + L^{\bullet}$) ou hidroxiperoxídeos lipídicos ($TO^{\bullet} + LOOH \rightarrow TOH + LOO^{\bullet}$), iniciando a oxidação lipídica

(efeito pró-oxidante). Para evitar este efeito, a vitamina E oxidada pode ser novamente reduzida à sua forma antioxidante através de substâncias redutoras em fase aquosa como o ácido ascórbico. Posteriormente o ácido ascórbico (ião ascorbato, AsH^-) reage rapidamente com o radical tocoferoxilo formando o radical ascorbato (semidesidroascorbato) que regenera o ião ascorbato numa reação catalisada pela semidesidroascorbato redutase (Li e Schellhorn, 2007; Nagaoka et al., 2007).



Por outro lado, o ascorbato pode sequestrar no plasma radicais aquosos antes destes poderem oxidar a Vitamina E da fase lipídica. As interações entre estes antioxidantes são muito importantes na proteção das células, uma vez que a concentração individual de cada antioxidante pode não ser suficiente para proteger de forma efetiva as células da peroxidação lipídica (Chew, 1995; Ferreira, 2011).

Devido ao seu papel como agente captador de radicais livres, a vitamina E protege contra doenças degenerativas, nomeadamente cancro e DCV (Ferreira et al., 2009), uma vez que inibe a oxidação. Intervém ainda no processo anti-inflamatório, na inibição da agregação plaquetária e melhora a resposta imune (Dennehy et al., 2010).

Os mecanismos pelos quais a vitamina E pode garantir essa proteção ocorrem também nos alimentos, especialmente nos alimentos ricos em ácidos gordos polinsaturados como nozes, sementes, óleos vegetais, vegetais de folhas verdes e cereais fortificados.

1.3.3.2. Carotenoides

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

Os carotenoides exercem diferentes ações benéficas, incluindo atividade antioxidante, reforço imunitário, inibição da mutagénese e inibição de lesões pré-malignas, doenças cardiovasculares e osteoporose (Rao e Rao, 2007).

1.4. Enquadramento do estudo e objetivos

Existem na literatura alguns estudos das propriedades antioxidantes e da composição fenólica e em ácidos orgânicos de inflorescências (Sousa et al., 2008), folhas (Vrchovská et al., 2006) e sementes (Ferrerres et al., 2007) de couve-tronchuda (*Brassica oleracea* L. var *costata* DC.). No entanto, parece não haver estudos acerca do seu valor nutricional e da caracterização detalhada em açúcares, ácidos gordos, vitamina C, vitamina E e carotenoides.

Por outro lado, este parece também ser o primeiro estudo sobre as propriedades nutricionais e antioxidantes de grelos (inflorescências de couve-nabo, *Brassica napus* L. var. *napus*).

A determinação da composição química de espigos e grelos torna-se importante, devido ao enorme consumo destas hortaliças no norte de Portugal.

Os objetivos deste trabalho foram:

- i) aumentar o conhecimento sobre os açúcares livres, ácidos gordos e antioxidantes lipossolúveis (vitamina E e carotenoides) e hidrossolúveis (ácido ascórbico, fenóis e flavonoides) presentes em materiais vegetais, neste caso espigos e grelos;
- ii) apresentar o perfil nutricional das plantas e as suas propriedades antioxidantes, a fim de avaliar a sua importância na dieta das pessoas que os consomem;
- iii) aumentar o valor dos produtos alimentares locais, que têm sido utilizados ao longo de muitas gerações.

II. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

Com base em inventários etnobotânicos realizados em Trás-os-Montes (Carvalho, 2010), foram selecionados dois tipos de hortaliça conhecidos localmente por grelos e espigos. Os materiais vegetais analisados correspondem assim às partes floridas de variedades de duas espécies da família botânica Brassicaceae, *Brassica napus* L. e *Brassica oleracea* L.

Tradicionalmente os “grelos”, referem-se às partes aéreas com flores amarelas de *Brassica napus* L. var. *napus*, e os “espigos”, aos caules terminais de flores brancas de *Brassica oleracea* L. var. *costata* DC. (nomenclatura de acordo com Castroviejo et al, 2003).

No final do Inverno e início da primavera os produtores iniciam a colheita faseada de espigos e grelos que comercializam em molhos nos mercados locais. As amostras empregues neste estudo foram constituídas a partir de material vegetal adquirido a pequenos agricultores no mercado local em 2009. Para a sua preparação usaram-se vários molhos de grelos e espigos, de aproximadamente 1kg, e destacaram-se os 30 cm de caules terminais floridos, formados por caules tenros e folhas alternas, eixos das inflorescências (caules finos que suportam brácteas e flores), brácteas florais (peças semelhantes a pequenas folhas que protegem as flores) e flores. A seleção da matéria vegetal a incluir e a respetiva preparação tiveram em conta os critérios e preferências dos consumidores locais, registados em inventários etnobotânicos (Carvalho, 2010).

Para cada espécie, a matéria vegetal selecionada foi previamente misturada e homogeneizada, tendo de seguida sido retiradas as várias amostras para análise.

A identificação e caracterização do material vegetal respeitou os descritores da Flora Ibérica. A nomenclatura utilizada para designar as espécies estudadas segue também as indicações da Flora Ibérica (Castroviejo, 2003).

Exemplares secos e prensados 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. Padrões e Reagentes

Os solventes acetonitrilo 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 e os padrões utilizados nos ensaios de atividade antioxidante: trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), ácido gálico, 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).

2.3. Valor Nutricional

2.3.1. Macronutrientes

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 600 ± 15 °C. Os glúcidos calcularam-se por

diferença (100 – (g proteínas + g lípidos + g cinzas)) e a energia total foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Energia (kcal)} = 4 \times (\text{g proteínas} + \text{g glúcidos}) + 9 \times (\text{g lípidos}).$$

2.3.2. Açúcares livres

Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), conforme descrito por Barros et al. (2010a), utilizando melezitose como padrão interno (PI, 5 mg/mL). A amostra liofilizada (1 g) foi enriquecida com o PI e extraída com 40 mL de etanol a 80% durante 30 min 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 e filtrados através de filtros de nylon 0,2 mM da Whatman.

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 detetor de RI (Knauer Smartline 2300).

Os dados foram analisados usando o software Clarity 2.4 (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, utilizando o método do padrão interno e usando curvas de calibração obtidas de padrões de cada composto (frutose, glucose, sacarose, trealose e rafinose; 0,18- 0,24 mg/mL) e os resultados foram expressos em g por 100 g de massa seca.

2.3.3. Ácidos Gordos

O método utilizado na determinação de ácidos gordos, após trans-esterificação, foi a cromatografia gasosa com deteção por ionização de chama (GC-FID)/ coluna capilar, como descrito por Barros et al. (2010a). A massa obtida após extração em Soxhlet foi misturada com 5 mL 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 objetivo de separar as diferentes fases. Recuperou-se a FAME com 3 mL de éter agitando em vortex, removeu-se a água presente através de uma microcoluna com sulfato de sódio anidro e, por fim, recolheu-se a amostra para um *vial* utilizando um filtro de nylon 0,2 µm da Whatman.

A análise de ácidos gordos foi feita com a ajuda de um sistema GC modelo DANI 1000 equipado com um injetor *split/splitless*, detetor 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 10 °C/min até 240 °C que foi mantida por 11 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. Para a realização de cada análise injetou-se no GC 1mL de amostra. 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.

2.4. Antioxidantes Lipossolúveis

2.4.1. Tocoferóis

O teor de tocoferóis foi determinado segundo um procedimento previamente otimizado e descrito por Barros et al. (2010b). A 500 mg de amostra liofilizada foram

adicionados 100 μ L de BHT (10 mg/mL) e 400 μ L de tocol (50 μ g/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, 4000g). 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 extrato foi redissolvido em 2 mL de hexano e desidratado com sulfato de sódio anidro, filtrado através de um filtro descartável LC de nylon 0,22 μ m da Whatman, transferido para um *vial* de injeção *ambar* e analisado no sistema de HPLC acima descrito, acoplado a um detetor 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 \times 4.6 nm) YMC Waters (Japão) operando a 30 $^{\circ}$ C. Utilizou-se uma mistura de hexano e acetato de etilo (7:3, v/v) como fase móvel, a um fluxo de 1 mL/min, e o volume de injeção foi de 20 μ L. A quantificação foi baseada na resposta do sinal de fluorescência, usando o método do padrão interno e por comparação cromatográfica com padrões. Utilizaram-se curvas de calibração obtidas a partir de padrões comerciais de cada composto (α , β -, γ -e δ -tocoferol; 0,25-16,00 μ g/ml). Os resultados foram expressos em mg por 100 g de massa seca.

2.4.2. Carotenoides e clorofilas

Os compostos β -caroteno, licopeno e clorofilas a e b foram determinados de acordo com o método do Nagata e Yamashita (1992), medindo a absorvância a 453, 505, 645 e 663 nm num espectrofotómetro AnalytikJena 200. 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:

$$\beta\text{-caroteno (mg/100 mL)} = 0.216 \times A_{663} - 1.220 \times A_{645} - 0.304 \times A_{505} + 0.452 \times A_{453};$$

$$\text{Licopeno (mg/100 mL)} = -0.0458 \times A_{663} + 0.204 \times A_{645} - 0.304 \times A_{505} + 0.452 \times A_{453};$$

$$\text{Clorofila a (mg/100 mL)} = 0.999 \times A_{663} - 0.0989 \times A_{645};$$

$$\text{Clorofila b (mg/100 mL)} = -0.328 \times A_{663} + 1.77 \times A_{645}.$$

Os resultados foram expressos em mg por 100 g de massa seca.

2.5. Antioxidantes hidrossolúveis

2.5.1. Vitamina C

A vitamina C foi determinada de acordo com o método de Klein e Perry (1982). A amostra (500 mg) foi extraída com ácido metafosfórico (1%, 10 mL) durante 45 min à temperatura ambiente e filtrada através de filtros Whatman Nº 4. O filtrado (1 mL) foi misturado com 2,6-dicloroindofenol (9 mL) e a absorvância foi medida, após 30 min, a 515 nm contra um branco.

O teor de vitamina C foi calculado com base na curva de calibração de ácido L-ascórbico (0,034-5,68 mM), e os resultados foram expressos em mg por 100 g de massa seca.

2.5.2. Fenóis e flavonoides

As amostras (1 g) foram submetidas a uma extração líquido-sólido, com 50 mL de metanol durante 1 h (25°C a 150 rpm) e filtradas com papel Whatman nº 4. O resíduo foi posteriormente extraído com 50 mL de metanol. Os extratos metanólicos combinados foram evaporados a 35°C sob pressão reduzida (evaporador rotativo Büchi R-210); o resíduo foi novamente dissolvido em metanol de modo a atingir-se uma concentração conhecida.

Os fenóis totais foram estimados com base em procedimentos descritos por Wolfe et al. (2003) com algumas modificações. Uma alíquota da solução de extrato (1 mL) foi misturada com o reagente de Folin-Ciocalteu (5 mL, previamente diluído em água 1:10 v/v) e carbonato de sódio (75 g/L, 4 mL). Os tubos foram levados ao vórtex durante 15 s, e deixaram-se repousar durante 30 min a 40°C para se poder observar o desenvolvimento da cor. A absorvância foi então medida a 765 nm. O ácido gálico foi utilizado para obter a curva padrão (0,050-0,80 mM), e os resultados foram expressos como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de extrato.

Na quantificação de flavonoides, a solução de extrato (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 curva padrão (0,016-1,0 mM) e os resultados foram expressos em mg equivalentes de (+)-catequina (EC) por grama de extrato.

2.6. Avaliação *in vitro* das propriedades antioxidantes

2.6.1. Geral

Foram aplicados quatro ensaios, realizados *in vitro*, para avaliar a atividade antioxidante das amostras (Martins et al., 2010). Foram utilizadas soluções dos extratos com diferentes concentrações (0,63-20,00 mg/mL) para encontrar os valores de EC₅₀.

2.6.2. Atividade 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

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

2.6.3. Poder redutor

A metodologia aplicada a esta análise requereu a utilização do Leitor de Microplacas acima mencionado. Às diferentes concentrações de extrato (0,5 mL) foram adicionados 0,5 mL de solução tampão de fosfato de sódio (pH 6,6; 200 mM) e 0,5 mL de ferricianeto de potássio (1%, w/v, 0,5 mL). A mistura foi incubada a 50 $^{\circ}\text{C}$ 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, 0,8 mL 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 extrato com 0,5 de absorvância (EC_{50}) calculada a partir do gráfico de absorvância a 690 nm em função da concentração do extrato. O padrão utilizado foi o trolox.

2.6.4. 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 extratos, leu-se a absorvância a 470nm, 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: $(\text{Absorvância após 2 h de ensaio}/\text{Absorvância inicial}) \times 100$. A concentração de extrato que origina 50% de atividade 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 extrato. Utilizou-se, como padrão, trolox.

2.6.5. Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas 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 extrato (0,2mL), ácido ascórbico (0,1 mM; 0,1 mL), sulfato de ferro (10 μ M, 0,1 mL) e sobrenadante do homogeneizado cerebral (0,1 mL), e incubou-se durante 1 hora a 37 °C. Adicionou-se então, ácido tricloroacético (28% w/v; 500 μ L) com o objetivo de interromper a reação, e TBA (2%, w/v; 0,38 mL), colocando-se novamente a incubar a 80 °C durante 20 min. Centrifugou-se a 3000g durante 10 min com o intuito de remover as proteínas precipitadas, e leu-se a intensidade da cor do complexo malondialdeído (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 extrato, respetivamente. A concentração de extrato 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 extrato. O padrão utilizado foi o trolox.

2.7. Análise estatística

Para cada uma das espécies foram usadas três amostras e todos os ensaios foram efetuados 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.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Valor Nutricional

Os resultados obtidos na avaliação da composição em nutrientes e valor energético (expressos em relação à massa seca) das amostras de inflorescências das Brassicáceas estudadas (espigos e grelos) apresentam-se na Tabela 1.

Tabela 1: Humidade (g/100 g de massa fresca), nutrientes (g/100 g de massa seca) e valor energético (kcal/100 g de massa seca) de inflorescências de duas espécies do género *Brassica* (média \pm SD, n = 9). Em cada linha, letras diferentes significam, diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

	<i>Brassica oleraceae</i> var <i>costata</i> (espigos)	<i>Brassica napus</i> var <i>napus</i> (grelos)
Humidade	85,96 \pm 0,14 b	87,34 \pm 0,34 a
Cinzas	7,98 \pm 0,01 a	7,79 \pm 0,07 b
Proteínas	4,19 \pm 0,00 b	4,40 \pm 0,08 a
Lípidos	3,01 \pm 0,32 b	3,92 \pm 0,60 a
Glúcidos	84,82 \pm 0,22 a	83,88 \pm 0,52 b
Energia	383,14 \pm 1,15 b	388,48 \pm 1,93 a
Frutose	3,26 \pm 0,11 b	4,02 \pm 0,18 a
Glucose	2,97 \pm 0,10 b	4,75 \pm 0,35 a
Sacarose	0,41 \pm 0,09 a	0,33 \pm 0,05 a
Trealose	0,20 \pm 0,02 a	0,05 \pm 0,00 b
Rafinose	0,29 \pm 0,02 b	0,20 \pm 0,01 a
Açúcares Totais	7,13 \pm 0,30 b	9,35 \pm 0,61 a

A amostra de grelos (inflorescências de couve-nabo, *Brassica napus* var *napus*) revelou maior teor de humidade (87,34 g/100 g) do que a amostra de espigos (inflorescências de couve-tronchuda ou couve-Portuguesa, *Brassica oleraceae* var *costata*) (85,96 g/100 g). Os glúcidos, calculados por diferença, foram o

macronutriente mais abundante, apresentando valores mais elevados a amostra de espigos (84,82 g/100 g). Na verdade, os espigos além de inflorescências, incluem também pequenas folhas mais fibrosas do que os grelos.

A mesma amostra apresentou um maior teor em cinzas (7,98 g/100 g), mas menores valores de proteínas (4,40 g/100g), lípidos (3,92 g/100 g) e energia (388,48 kcal/100 g) do que a amostra de grelos que, consistentemente, apresenta um maior número de botões florais. De acordo com os consumidores habituais, a textura particular de cada material é bem adaptada às receitas regionais; sendo os grelos principalmente consumidos salteados ou com arroz suculento, enquanto os espigos são, maioritariamente, cozidos ou temperados com azeite (Carvalho, 2010).

O teor de lípidos encontrado na amostra de espigos (couve-tronchuda), foi superior à registada em couve-galega (*Brassica oleraceae*, grupo acephala): 2,3 g/100g de massa seca; Almazan e Adeyeye, 1998). Ao contrário da couve-galega, que tem crescimento indeterminado e por isso não forma cabeça, a couve-tronchuda apresenta um núcleo coeso de caules e folhas que no final do ciclo de desenvolvimento contribuem para a formação de maior número de inflorescências em relação ao que acontece noutro tipo de couves.

Ambas as inflorescências apresentaram frutose, glucose, sacarose, trealose e rafinose como principais açúcares (Tabela 1). Os açúcares são apenas uma pequena parte dos glúcidos presentes nas amostras (Tabela 1), que também incluem polissacáridos, como amido e celulose.

Os monossacáridos frutose e glucose foram os açúcares mais abundantes nas amostras de espigos e grelos, respetivamente. Os grelos revelaram o teor mais elevado de açúcares totais (9,35 g/100 g), com os níveis mais elevados de todos os açúcares, a exceto do dissacárido trealose.

O valor de açúcares totais encontrado na amostra de espigos (7,13 g/100 g) foi maior do que a concentração encontrada em folhas de couve-galega (3,96 g/100 g, *Brassica oleraceae* L., var *acephala* DC.; Ayaz et al., 2006). Além disso, não foram encontrados nessa amostra os oligossacáridos trealose e rafinose.

Os lípidos são, em parte, responsáveis pelas propriedades físicas e químicas dos alimentos e aqueles que apresentam maior interesse nutricional são os ésteres de ácidos gordos. Muitas propriedades de lipídios nos alimentos são explicadas em termos de sua composição em ácidos gordos (Ayaz et al., 2006).

Os resultados da composição individual em ácidos gordos, total de ácidos gordos saturados (SFA), ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), ácidos gordos polinsaturados (PUFA) e as razões PUFA/SFA e n-6/n-3 das inflorescências das Brassica estudadas são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Composição em ácidos gordos (percentagem relativa de inflorescências de duas espécies do género *Brassica* (média \pm SD, n = 9). Em cada linha, letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

	<i>Brassica oleraceae</i> var <i>costata</i> (ESPIGOS)	<i>Brassica napus</i> var <i>napus</i> (GRELOS)
C6:0	0,71 \pm 0,10	0,25 \pm 0,05
C8:0	0,04 \pm 0,00	0,07 \pm 0,01
C10:0	0,11 \pm 0,01	0,11 \pm 0,02
C12:0	0,30 \pm 0,04	0,15 \pm 0,04
C14:0	0,68 \pm 0,14	0,43 \pm 0,02
C14:1	0,16 \pm 0,01	0,11 \pm 0,00
C15:0	0,36 \pm 0,06	0,24 \pm 0,03
C16:0	10,87 \pm 1,02	10,41 \pm 0,03
C16:1	0,24 \pm 0,02	0,26 \pm 0,01
C17:0	0,20 \pm 0,01	0,16 \pm 0,02
C18:0	2,17 \pm 0,23	2,71 \pm 0,15
C18:1n9	1,48 \pm 0,14	2,26 \pm 0,01
C18:2n6	19,60 \pm 0,86	10,30 \pm 0,14
C18:3n3	60,56 \pm 2,76	70,02 \pm 0,13
C20:0	0,49 \pm 0,06	0,43 \pm 0,00
C20:2	0,21 \pm 0,01	0,25 \pm 0,02
C20:4n6	0,32 \pm 0,03	0,24 \pm 0,03
C20:3n3+C21:0	0,10 \pm 0,00	0,16 \pm 0,00
C22:0	0,18 \pm 0,03	0,65 \pm 0,05
C22:1n9	0,14 \pm 0,04	0,53 \pm 0,02
C24:0	1,02 \pm 0,00	0,19 \pm 0,01
C24:1	0,07 \pm 0,01	0,08 \pm 0,00
SFA	17,13 \pm 1,70 a	15,79 \pm 0,03 a
MUFA	2,09 \pm 0,22 b	3,24 \pm 0,00 a
PUFA	80,78 \pm 1,91 a	80,97 \pm 0,03 a
PUFA/SFA	4,75 \pm 0,58 a	5,13 \pm 0,01 a
n-6/n-3	0,33 \pm 0,03 a	0,15 \pm 0,00 b

Ácido caproico (C6:0); Ácido caprílico (C8:0); Ácido cáprico (C10:0); Ácido laurico (C12:0); Ácido mirístico (C14:0); Ácido miristoleico (C14:1); Ácido pentadecanóico (C15:0); Ácido palmítico (C16:0); Ácido palmitoleico (C16:1); Ácido heptadecanóico (C17:0); Ácido esteárico (C18:0); Ácido oleico (C18:1n9c); Ácido linoleico (C18:2n6c); Ácido α -linoléico (C18:3n3); Ácido araquídico (C20:0); Ácido *cis*-11,14-eicosadienóico (C20:2c); Ácido araquidónico (C20:4n6); Ácido *cis*-11, 14, 17-eicosatrienóico e Ácido heneicosanóico (C20:3n3 + C21:0); Ácido beénico (C22:0); Ácido erucíco (C22:1n9); Ácido lignocérico (C24:0); Ácido nervónico (C24:1). SFA- Ácidos gordos saturados; MUFA- Ácidos gordos moninsaturados; PUFA- Ácidos gordos plinsaturados.

Observou-se uma prevalência do ácido α -linolénico (C18:3n3) nas amostras de espigos e grelos (61 e 70%, respetivamente). O ácido linoleico (C18: 2n6) foi também um ácido gordo abundante em ambas as amostras e, portanto, PUFA predominaram sobre MUFA e SFA.

O valor nutricional dos ácidos gordos n-3 e n-6 é muito apreciado pelos seus efeitos benéficos para a Saúde (Guil et al., 1996).

O perfil de ácidos gordos obtido para a amostra de espigos foi semelhante à observada em folhas de couve (*Brassica oleraceae* L., var. *acephala* DC.) (Ayaz et al., 2006). O ácido palmítico foi o SFA mais abundante em ambas as amostras (~10%).

Foram identificados e quantificados vinte e dois ácidos gordos.

Ambas as amostras revelaram razões PUFA/SFA superiores a 0,45 e razões n-6/n-3 inferiores a 4,0 (**Tabela 2**), tal como recomendado para uma boa qualidade nutricional (Guil et al., 1996); os melhores valores foram obtidos nas inflorescências de grelos (5,13 e 0,15, respetivamente).

3.2 Antioxidantes lipossolúveis e hidrossolúveis

Foram determinados antioxidantes lipossolúveis (tocoferóis, carotenoides e clorofilas) e hidrossolúveis (vitamina C, fenóis e flavonoides), e os valores obtidos são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Composição em antioxidantes lipossolúveis e hidrossolúveis (mg/100 g de massa seca) de inflorescências de duas espécies do género *Brassica* (média \pm SD, n = 9). Em cada linha, letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

	<i>Brassica oleraceae</i> var <i>costata</i> (espigos)	<i>Brassica napus</i> var <i>napus</i> (grelos)
α -tocoferol	12,43 \pm 1,94 b	48,22 \pm 1,02 a
β -tocoferol	0,92 \pm 0,15 a	0,68 \pm 0,05 b
γ -tocoferol	2,86 \pm 0,53 b	6,96 \pm 0,04 a
δ -tocoferol	0,26 \pm 0,03 b	0,63 \pm 0,06 a
Tocoferóis totais	16,47 \pm 2,65 b	56,49 \pm 1,20 a
β -caroteno	23,0 \pm 0,41 a	13,34 \pm 1,13 b
Licopeno	1,06 \pm 0,07 b	3,53 \pm 0,20 a
Clorofila a	28,26 \pm 0,01 b	43,09 \pm 0,00 a
Clorofila b	16,50 \pm 0,00 b	16,84 \pm 0,02 a
Vitamina C	126,39 \pm 12,92 a	63,73 \pm 3,82 b
Fenóis	1585,29 \pm 170,22 b	1745,74 \pm 52,14 a
Flavonoides	222,57 \pm 23,90 a	221,01 \pm 6,60 a

Foram detetadas as quatro isoformas de tocoferóis, sendo o α -tocoferol o principal composto em ambas as espécies.

A amostra de grelos apresentou os teores mais elevados de tocoferóis (59,49 mg/100 g de massa seca), com os níveis mais altos de todas as isoformas, exceto β -tocoferol. β -Caroteno, licopeno e clorofilas a e b foram também quantificados em ambas as amostras, sendo o primeiro pigmento o mais elevada na amostra de espigos (23,00 mg/100 g de massa seca, Tabela 3), enquanto que os outros pigmentos predominaram na amostra de grelos (3,53, 43,09 e 16,84 mg/100 g, respetivamente; Tabela 3).

Num estudo com vegetais do género *Brassica* (bróculos, couve de bruxelas, repolho branco, repolho roxo, couve e couve-flor), Podsędek (2007) indicou a couve *Brassica oleraceae* L., var. *Acephala* DC. como a melhor fonte de antioxidantes lipossolúveis incluindo carotenóides (β -caroteno 9,23 mg/100 g de massa fresca e luteína + zeaxantina-39,55 mg/100 g de massa fresca) e tocoferóis (α e γ -tocoferóis;

2,15 mg/100 g de massa fresca). As amostras analisadas no presente estudo, revelaram maiores teores de tocoferóis (2,31 e 7,17 mg/100 g de massa fresca para espigos e grelos, respetivamente), mas valores mais baixos de β -caroteno (3,23 e 1,69 mg/100 g de massa fresca para espigos e grelos, respetivamente).

A vitamina C, que inclui o ácido ascórbico e o seu produto da oxidação, o ácido desidroascórbico, é um nutriente importante nos vegetais e foi quantificado em ambas as amostras, sendo mais abundante na amostra de espigos (126,39 mg/100 g de massa seca; Tabela 3).

Outros autores descreveram o conteúdo de ácido ascórbico em folhas de couve "tranchuda" (1734,3 mg/100 g de extrato liofilizado; Vrchovská et al., 2006) e em sementes (854,6 mg/100 g de massa seca; Ferreres et al., 2007). No entanto, o nosso estudo é o primeiro em inflorescências. Uma outra variedade de *Brassica oleracea*, mostrou uma concentração de ácido ascórbico de 92,6 mg/100 g de massa fresca (Podsędek, 2007). Não só o processo de cozimento de espécies do género *Brassica* mas também a sua manipulação (por exemplo, congelação), pode afetar a retenção de ácido ascórbico nos tecidos, devido ao seu elevado grau de solubilidade em água e baixa estabilidade, resultando numa grande perda de vitamina C (Francisco et al., 2010).

Os fenóis foram os componentes antioxidantes principais, apresentando a amostra de grelos maior teor (1745,74 mg/100 g de massa seca), um valor ligeiramente inferior à concentração descrita por Sousa et al. (2008) (1957 mg/100 g).

As amostras estudadas apresentaram teores semelhantes de flavonoides (~220 mg/100 g de massa seca; Tabela 3). Sousa et al. (2008) descreveram que as inflorescências (espigos) de couve tronchuda (*B. oleracea* var. *costata*) e couve-galega (*B. oleracea* L. var. *acephala*) apresentavam uma composição fenólica semelhante, com vários derivados de kaempferol e de ácido 3-*p*-cumaroilquínico, enquanto que o nabo (*B. rapa* var. *rapa*) apresentava derivados glucósidos de kaempferol e isoramnetina e de vários ácidos fenólicos.

Os principais antioxidantes identificados neste estudo (fenóis, flavonoides, vitaminas C e E, e carotenoides) captam radicais livres e inibem o início das suas reações em cadeia ou interrompem a sua propagação (segunda linha de defesa). A vitamina E e os carotenoides também contribuem para a primeira linha de defesa contra o stresse oxidativo uma vez que sequestram o oxigénio singuleto. Os flavonoides, bem como a vitamina C, mostraram ainda uma atividade protetora do α -tocoferol em lipoproteínas de baixa densidade (LDL), e podem também regenerar a vitamina E, a partir do radical α -cromanoxilo (Podsdek, 2007).

3.3. Propriedades antioxidantes *in vitro*

Para avaliar a atividade antioxidante destas inflorescências, realizaram-se quatro ensaios diferentes: efeito captador de radicais DPPH, poder redutor, inibição da descoloração do β -caroteno e inibição da peroxidação lipídica através da diminuição da formação de TBARS.

A amostra de grelos apresentou maior atividade antioxidante do que a amostra de espigos, revelando valores de EC_{50} mais baixos em todos os ensaios efetuados (Tabela 4).

Tabela 4: Rendimentos de extração e atividade antioxidante (valores de EC_{50} valores, mg/mL) das inflorescências de espécies do género *Brassica* (média \pm SD, n = 9). Em cada linha, letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

	<i>Brassica oleraceae</i> var <i>costata</i> (espigos)	<i>Brassica napus</i> var <i>napus</i> (grelos)
Rendimento de extração (%)	47,19 \pm 3,78	41,56 \pm 5,33
Atividade captadora de DPPH	3,46 \pm 0,23 a	3,22 \pm 0,15 b
Poder redutor	2,11 \pm 0,01 a	1,02 \pm 0,04 b
Inibição da descoloração β -caroteno	0,96 \pm 0,07 a	0,88 \pm 0,04 b
Inibição de TBARS	1,93 \pm 0,12 a	1,59 \pm 0,06 b

Estes resultados estão de acordo com o maior teor de fenóis e flavonoides encontrados na amostra de grelos (Tabela 3).

3.3.1. Efeito captador de radicais DPPH

O primeiro ensaio de avaliação de atividade antioxidante foi a avaliação de efeitos de captação de radicais DPPH sendo os resultados expressos em função da diminuição da absorvância do radical DPPH a 515 nm, na presença de captadores de radicais.

Os efeitos captadores dos extratos sobre os radicais DPPH aumentaram com a concentração de extrato (Figura 7).

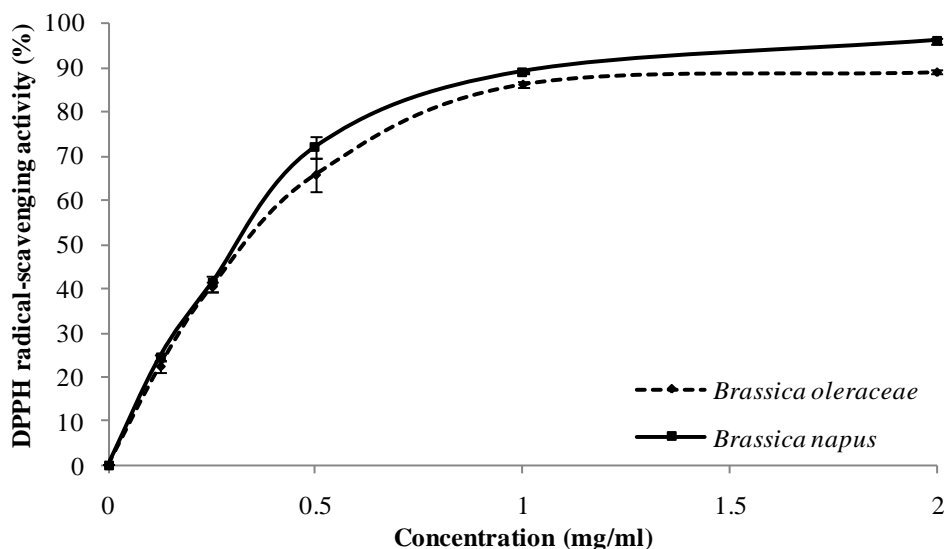


Figura 7: Atividade captadora de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) de inflorescências de espécies do género *Brassica* (média \pm SD, n = 9).

A atividade captadora de radicais DPPH de ambas as amostras foi maior do que a descrita por Sousa et al. (2008) em inflorescências de couve tronchuda

(0,754 mg/mL), couve-galega (0,565 mg/mL) e nabo (0,774 mg/mL), e também por Farag e Motaal (2010) para folhas de nabo (1 mg/mL).

O ensaio da capacidade de captação de radicais livres é determinado através do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), e é um dos mais amplamente utilizados para avaliar a atividade antioxidante em plantas (Ndhlala et al., 2010).

O DPPH é um radical de azoto estável, disponível comercialmente e que tem uma cor púrpura intensa, que reage com compostos que podem doar um átomo de hidrogénio. Este método baseia-se na captação do DPPH[•] através da adição de uma espécie ou um radical antioxidante que descolora a solução de DPPH (Krishnaiah et al., 2010).

Forma-se a correspondente hidrazina que apresenta uma cor amarela pálido, com diminuição da absorvância a 517 nm (Ferreira et al., 2007). O ensaio do DPPH é tecnicamente simples, necessitando apenas de recorrer a um leitor de microplacas ou um espectrofotómetro para realizar as leituras, o que provavelmente explica a sua utilização generalizada (Prior et al., 2005). É rápido e dá resultados reprodutíveis, para além do DPPH ser um radical livre razoavelmente estável (Ndhlala et al., 2010).

Embora este método seja frequentemente utilizado para a determinação da capacidade antioxidante de géneros alimentícios, a alteração da absorvância do DPPH[•], pode ser devida à ação da luz, do oxigénio, e do tipo de solvente (Magalhães et al., 2008). Também a inexistência de qualquer similaridade do DPPH[•] com os radicais peróxido (ROO[•]) altamente reativos e transitórios envolvidos na peroxidação lipídica, é outra limitação apontada a este método. Os antioxidantes que reagem rapidamente com os ROO[•] podem reagir lentamente ou podem nem reagir com DPPH[•] (Karadag et al., 2009; Kaur et al., 2006). Além disso, as medições espectrofotométricas podem ser afetadas por compostos que absorvem no comprimento de onda da determinação, por exemplo os carotenóides, assim como pela falta de transparência da amostra (Prior et al., 2005).

3.3.2. Poder Redutor

O segundo ensaio avaliou o poder redutor das amostras através da conversão de Fe^{3+} /complexo de ferricianeto a Fe^{2+} . O poder redutor das amostras aumentou com o aumento da concentração de extrato (Figura 8). Um valor elevado de absorvância a 690 nm corresponde a um elevado poder redutor.

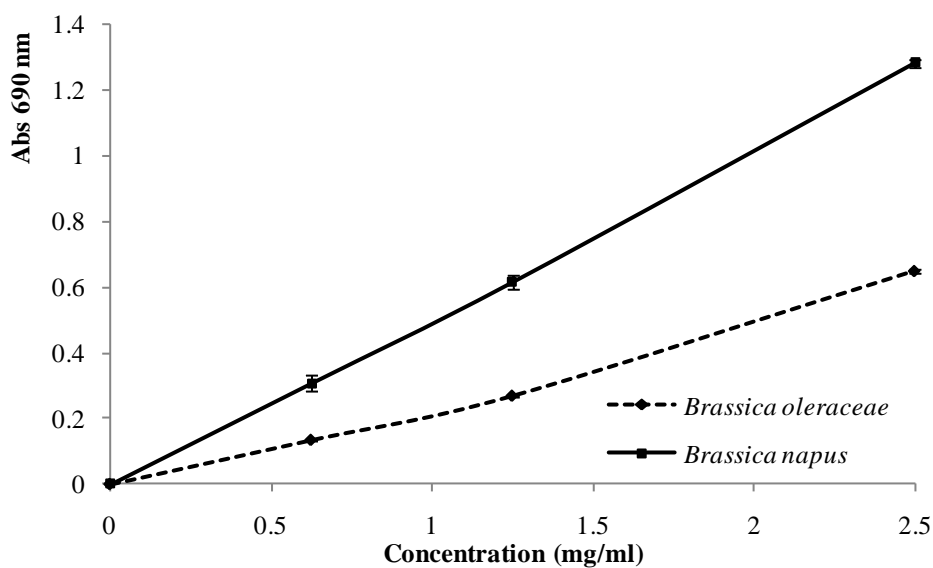


Figura 8: Poder redutor de inflorescências de espécies do género Brassica (média \pm SD, n = 9).

O ensaio referente ao poder redutor mede a capacidade dos antioxidantes para reduzir o complexo Fe(III)/ferricianeto [$FeCl_3/K_3Fe(CN)_6$] a Fe(II), forma ferrosa, em meio ácido (pH = 3,6) (Magalhães et al., 2008) para manter a solubilidade do ferro (Karadag et al., 2005). A reação em pH baixo diminui o potencial de ionização que impulsiona a transferência de eletrões e aumenta o potencial redox, causando uma mudança no mecanismo de reação (Pior et al., 2005). Esta deteção pode ser feita em soluções hidrofílicas ou lipofílicas (Carlsen et al., 2010).

Assim, dependendo do poder redutor dos compostos, a cor amarela da solução do ensaio altera-se para diferentes tons de verde ou azul, e pode ser medida

espectrofotometricamente, a 700 nm. A química dos ensaios baseados no ferro pode ser resumida pela seguinte equação:



Onde L é o ligando cromogéneo seletivo para o ião ferroso, que produz o complexo corado Fe(II)-L em resultado da reação redox associada (Barreira, 2010).

Este ensaio é simples, rápido, económico, robusto e não requer equipamento especializado. Pode ser realizado automatizado, semiautomático, ou manual (Karadag et al., 2009; Phipps et al., 2007) e pode oferecer um índice da capacidade antioxidante mas com pouca seletividade (Magalhães et al., 2008).

3.3.3. Inibição da descoloração do β -caroteno

A inibição da descoloração do β -caroteno foi outro dos ensaios utilizados, medindo a capacidade das amostras para captar o radical livre linoleato e outros radicais livres formados no sistema, que atacam o β -caroteno altamente saturado. Os resultados são apresentados na Figura 9.

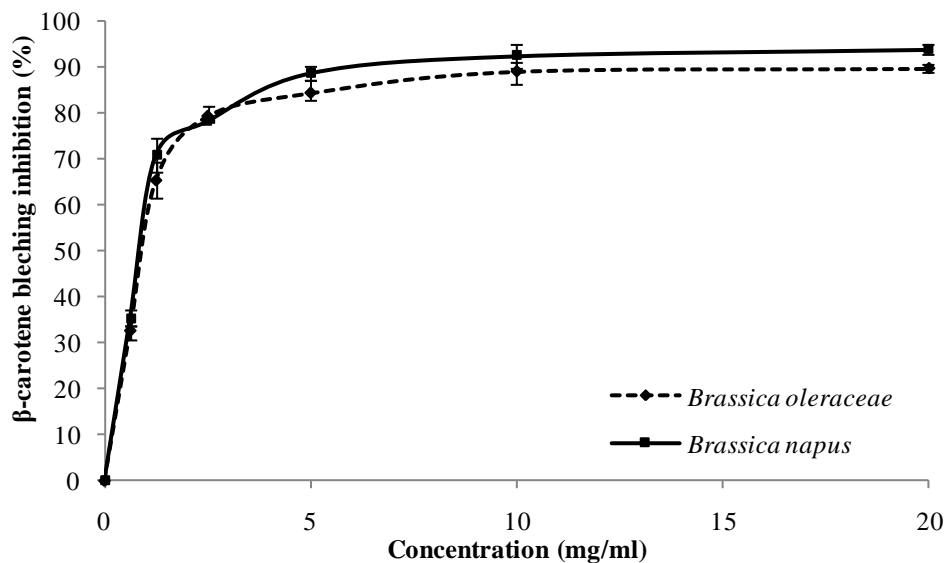
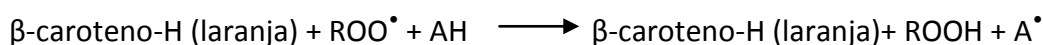
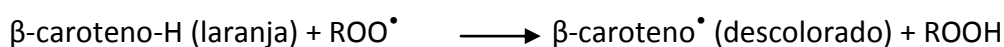


Figura 9: Inibição da descoloração do β -caroteno de inflorescências de duas espécies do género *Brassica* (média \pm SD, n = 9).

Os carotenoides podem sofrer descoloração por auto oxidação, induzida pela luz ou calor, ou oxidação induzida por radicais ROO^\bullet (AAPH ou lípidos oxidantes) (Karadag et al., 2009; Prior et al., 2005).

O ensaio de descoloração do β -caroteno é muito utilizado, e baseia-se em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno e avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (Duarte-Almeida et al., 2006; Kaur et al., 2006); a absorvância é medida a 470 nm (Kaur et al., 2006). O mecanismo de reação envolve a descoloração dos carotenóides através da oxidação induzida pelo calor. Essa descoloração pode ser inibida ou diminuída pela adição de antioxidantes contidos na amostra (Karadag et al., 2009; Ndhlala et al., 2010; Prior et al., 2005; Roginsky et al., 2005), de acordo com as equações seguintes:



Uma enorme vantagem deste método é o facto de ser simples e não necessitar de instrumentação especializada (Karadag et al., 2009). Para ensaios de rotina pode ser adaptada a determinação em microplacas (Roginsky et al., 2005). Outra vantagem associada a este método é a sua aplicabilidade em ambientes lipofílicos e hidrofílicos.

Alem disso, o ensaio de descoloração do β -caroteno pode detetar tanto a ação antioxidante como pro-oxidante de compostos (Ndhlala et al., 2010).

3.3.4. Inibição da formação de TBARS

O último ensaio avaliou a inibição da peroxidação lipídica em homogeneizados de células cerebrais (Figura 10), medindo a intensidade da cor do complexo formado entre o ácido tiobarbitúrico e produtos de peroxidação lipídica, tais como malondialdeído (complexo MDA-TBA).

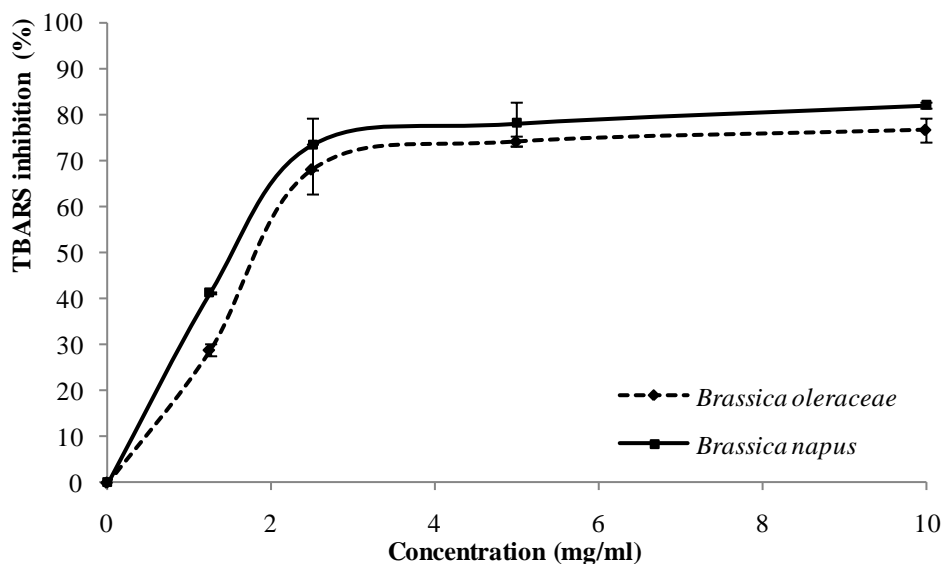


Figura 10: Inibição da peroxidação lipídica através do ensaio de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) de inflorescências de duas espécies do género *Brassica* (média \pm SD, n = 9).

O ácido tiobarbitúrico (TBA) e o malondialdeído (MDA) têm sido utilizados como biomarcadores da peroxidação lipídica há mais de 30 anos (Niki, 2009). A

peroxidação lipídica pode ser determinada pela medição dos produtos de oxidação que reagem com o TBA.

Os danos na membrana são por vezes utilizados como único parâmetro para determinar o nível de destruição de lípidos. Tem sido reconhecido que, durante a peroxidação lipídica, os produtos são formados a partir de precursores polinsaturados que incluem pequenos hidrocarbonetos, tais como fragmentos de cetonas, MDA, e outros compostos relacionados com eles (peróxidos lipídicos, e outros aldeídos de baixo peso molecular). Alguns destes compostos reagem com TBA para formar compostos de cor rosa, genericamente designados como substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), que são medidas por espectrofotometria a 532 nm (Gill et al., 2010; Kaur et al., 2006).

No ensaio TBARS, a deteção é feita por espectrofotometria e o material requerido não é altamente específico. Mas recentemente o complexo MDA-TBA pode ser medido por HPLC com UV/VIS ou deteção de fluorescência, ou por GC-ME, após derivatização (Niki, 2009).

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).

4. CONCLUSÕES

Em geral, a composição nutricional das espécies do género *Brassica* estudadas (espigos e grelos) confirma os benefícios da sua inclusão na gastronomia típica regional e valida o seu consumo prolongado desde há muito tempo. Eles são vegetais nutricionalmente equilibrados, em especial os espigos, que revelaram valores mais altos de humidade, proteínas, energia, lípidos, β -caroteno e vitamina C; os grelos mostraram ter maiores teores de cinzas, glúcidos, açúcares totais (incluindo frutose, glucose, sacarose e rafinose), ácidos gordos essenciais n-3, tal como o ácido α -linolénico, e as melhores razões PUFA/ SFA e ácidos gordos n-6/n-3, tocoferóis (incluindo as isoformas α , γ e δ), licopeno, clorofilas, fenóis e flavonoides; apresentaram ainda maior atividade antioxidante.

O presente estudo descreve a caracterização nutricional de espigos (os estudos disponíveis na literatura focam a sua caracterização fitoquímica) e grelos (tanto quanto sabemos não há estudos deste tipo), mas também a sua composição em antioxidantes lipossolúveis e hidrossolúveis. Além disso, os benefícios para a saúde associados às suas propriedades antioxidantes reforçam a sua importância nas dietas locais e fornecem valor acrescentado a estes produtos regionais consumidos ao largo de muitas gerações. Os resultados obtidos também enfatizam o papel das plantas alimentares silvestres e cultivadas na cozinha regional, como parte da herança cultural de uma região.

Os nossos resultados sublinham a importância da existência de estudos interdisciplinares sobre alimentos tradicionais, devido à perda eminente de conhecimentos sobre plantas, usos e práticas, inerente ao desenvolvimento global e aos atuais estilos de vida dos consumidores. Além disso, a investigação sistemática pode contribuir para a manutenção da utilização de plantas alimentares silvestres ou cultivadas regionalmente há longo tempo, bem como para a descoberta de novos nutracêuticos com potencial interesse na prevenção de doenças relacionadas com o envelhecimento, tal como recomendado internacionalmente (Heinrich et al., 2005).

Os resultados desta dissertação foram divulgados nos documentos em anexo:

Anexo I - Publicação em revista internacional

Anexo II – Comunicações em congressos

5. BIBLIOGRAFIA

- Almazan, A.M., Adeyeye, S.O. **1998**. Fat and fatty acid concentrations in some green vegetables. *J. Food Compos. Anal.* 11, 375-380.
- Amarowicz, R., Estrella, I. Hernandez, T., Robredo, S., Troszynska, A., Kosinska, A., Pegg, R. **2010**. Free radical-scavenging capacity, antioxidant activity, and phenolic composition of green lentil (*Lens culinaris*). *Food Chem.* 121, 705-711.
- 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 Chem.* 84, 551-562.
- Ayaz, F.A., Glew, R.H., Millson, M., Huang, H.S., Chuang, L.T., Sanz, C., Hayırlıoglu-Ayaz, S. **2006**. Nutrient contents of kale (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC.). *Food Chem.* 96, 572–579.
- Barreira, J.C.M. **2010**. Caracterização biológica, química e nutricional de *Castanea sativa* Miller e *Prunus dulcis* (Millier) D.A.Webb. Tese de doutoramento, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- Barros, L., Carvalho, A.M., Morais, J.S., Ferreira, I.C.F.R. **2010a**. Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chem.* 120, 247–254.
- Barros, L., Heleno, S.A., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. **2010b**. Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: Vitamins and phenolics. *LWT* 43, 544–550.
- Belitz, H.-D., Grosch, W. **1999**. Fruits and fruit products. *Food Chem.* 8, 748–757.
- Bors, W., Saran, M. **1987**. Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radic. Res. Commun.* 2, 289-294.
- Cadenas, E. **1997**. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*, 6, 391-397.

- Carlsen, M.H., Halvorsen, B.L., Holte, K., Bøhn, S.K., Dragland, S., Sampson, L., et al. **2010**. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr. J.* 3, 9.
- 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.
- 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 Sci.* 163, 1161-1168.
- Chew, B.P. **1995**. Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. *J. Nutr.* 125, 1804–1808.
- Debier, C., Larondelle, Y. **2005**. Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *British J. Nutr.* 93, 153–174.
- Dennehy, C., Tsourounis, C. **2010**. A review of select vitamins and minerals used by postmenopausal women. *Maturitas* 66, 370–380.
- Duarte-Almeida, J.M., Santos, R.J., Genovenese, M.I., Lajolo, F.M. **2006**. Avaliação da actividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 26, 446-452.
- Farag, M.A., Motaal, A.A. **2010**. Sulforaphane composition, cytotoxic and antioxidant activity of crucifer vegetables. *J. Adv. Res.* 1, 65–70.
- Ferreira, I.C.F.R., Abreu, R.M.V. **2007**. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise* 2, 32-39.
- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Abreu, R.M.V. **2009**. Antioxidants in wild mushrooms. *Cur.Med. Chem.* 16, 1543–1560.
- Ferreira, I.C.F.R. **2011**. Biomoléculas em cogumelos silvestres: Estudo de caso. *Provas de Agregação. Universidade do Minho*, 3-21.

- Ferreres, F., Sousa, C., Valentão, P., Seabra, R.M., Pereira, J.A., Andrade, P.B. **2007**. Tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) seeds: Phytochemical characterization and antioxidant potential. *Food Chem.* 101, 549–558.
- Francisco, M., Velasco, P., Moreno, D.A., García-Viguera, C., Cartea, M.E. **2010**. Cooking methods of *Brassica rapa* affect the preservation of glucosinolates, phenolics and vitamin C. *Food Res. Int.* 43, 1455-1463.
- Fu, S., Davies, M.J., Stocker, R., Dean, R.T. **1998**. Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. *Biochem. J.* 333, 519-25.
- 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 Sci.* 163, 1161-1168.
- Gharras, E.H. **2009**. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. *International J. Food Sci. Technol.* 44, 2512–2518.
- Gill, S.S., Tuteja, N. (**2010**). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909-930.
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L.F.C., Mira, L., Corvo, M. **2008**. Molecular mechanisms of anti-inflammatory activity mediated by flavonoids. *Cur. Med. Chem.* 15, 1586-1605
- Gossiau, A., Chen, K.Y. **2004**. Nutraceuticals, apoptosis, and disease prevention. *Nutrition* 20, 95-102.
- Guil, J.L., Torija, M.E., Giménez, J.J., Rodriguez, I. **1996**. Identification of fatty acids in edible wild plants by gas chromatography. *J. Chromatog. A* 719, 229-235.
- Gundgaard, J., Nielsen, J. N., Olsen, J., Sorensen, J. **2003**. Increased intake of fruit and vegetables: Estimation of impact in terms of life expectancy and healthcare costs. *Public Health Nutr.* 6, 25–30.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. **1984**. Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. *Lancet* 2, 1095.

- Halliwell, B (1996). Antioxidants in human health and disease. *Ann. Rev. Nutr.* 16, 33-50.
- Harborne, J.B., Williams, C.A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504.
- Heinrich, M. Co-ordinator of The Local Food-Nutraceuticals Consortium. 2005. Understanding local Mediterranean diets: A multidisciplinary pharmacological and ethnobotanical approach. *Pharmacol. Res.* 52, 353-366.
- 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 Nrf1 mediates genistein's protection against oxidative endothelial cell injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 851-859.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1841-1856
- Jia, Z., Tang, M., Wu, J. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64, 555-559.
- Jiménez-Monreal, A., García-Diz, L., Matínez-tomé, M., Murcia, M. 2009. Influence of cooking methods on antioxidant activity of vegetables. *J. Food Sci.* 74, 3
- Karadag, A., Ozcelik, B., Saner, S. 2009. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Anal. Method.* 2, 41-60.
- Kaur, I.P., Geetha, T. 2006. Screening methods for antioxidants-A review. *Mini-Rev. Med. Chem.* 6, 305-312.
- Klein, B.P., Perry, A.K. 1982. Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States. *J. Food Sci.* 47, 941-945.
- Kondo, M., Zhang, L., Ji, H., Kou, Y., Ou, B. 2009. Bioavailability and antioxidant effects of a xanthone-rich mangosteen (*Garcinia mangostana*) product in humans. *J. Agric. Food Chem.* 57, 8788-8792.

- Kris-Etherton, P.M., Etherton, T.D., Carlson, J., Gardner, C. **2002**. Recent discoveries in inclusive food-based approaches and dietary patterns for reduction in risk for cardiovascular disease. *Cur. Opin. Lipidol.* 13, 397–407.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. **2010**. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod. Process*, 3, 217-3233.
- Kubo, A., Levin, T. R., Block, G., Rumore, G., Quesenberry, Jr. C., Buffer, P., Corley, D. **2008**. Dietary antioxidants, fruits and vegetables, and the risk of Barrett’s esophagus. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 1614–1624.
- Lachance, P.A., Nakat, Z., Jeong, W.S. **2001**. Antioxidants: an integrative approach. *Nutrition* 17, 835-838.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. Cox, M.M. **2008**. *Principles of Biochemistry*. W.H. Freeman, 5th edition.
- Li, Y., Schellhorn, H.E. **2007**. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J. Nutr.* 137, 2171–2184.
- Lin, T.M., Durance, T.D., Scaman, C.H. **1998**. Characterization of vacuum microwave, air and freeze dried carrot slices. *Food Res. Int.* 31, 111-117.
- Machlin, L.J., Bendich, A. **1987**. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *J. Fed. Am. Soc. Exper. Biol.* 1, 441-445.
- Magalhães, M.L., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C. **2008**. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analyt. Chim. Acta* 613, 1–19.
- Mamede, A.C., Tavares, S.D., Abrantes, A.M., Trindade, J., Maia, J.M., Botelho, M.F. **2011**. The role of vitamins in cancer: A review. *Nutr. Cancer* 63, 479–494.
- Martins, D., Barros, L., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. **2011**. Nutritional and in vitro antioxidant properties of edible wild greens in Iberian Peninsula traditional diet. *Food Chem.* 125, 488-494.
- McCance, R.A., Widdowson, E.M. **1994**. *The composition of food*. 5th ed. Cambridge: Royal Soc. Chem. 462.
- Milbury, P.E., Chen, C.Y., Dolnikowski, G.G., Blumberg, J.B. **2006**. Determination of flavonoids and phenolics and their distribution in almonds. *J. Agric. Food Chem.* 54, 5027-5033.

- Mukhopadhyay, M. **2001**. Natural extracts using supercritical carbon dioxide. CRC Press 8.
- Nagaoka, S., Kakiuchi, T., Ohara, K., Mukai, K. **2007**. Kinetics of the reaction by vitamin E is regenerated which natural by vitamin C. Chem. Phys. Lipid. 146, 26-32.
- Nagata, M., Yamashita, I. **1992**. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish 39, 925–928.
- Naidu, A.K. **2003**. Review - Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. Nutr. J. 2, 7.
- Ndhlala, A., Moyo, M., Van Staden, J. **2010**. Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules? Molecules 15, 6905-6930.
- Neves, P. **2004**. Flavonoids in Food and their health benefits. Plant Food. Hum. Nutr. 59, 113-122.
- Niki, E. **2010**. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. Free Rad. Biol. Med. 49, 503–515.
- Niki, E. **2009**. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. Free Rad. Biol. Med. 47, 469-484.
- Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., D'Arrigo, M., Rostagno, M.A., Martínez, J.A., García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A. (**2011**). Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. Food Chem. 128, 674-678.
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I. **2009**. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxid. Med. Cell. Long. 2, 270-278.
- Patel, J. **2008**. A Review of potential health benefits of flavonoids. Lethbridge Undergraduate Res. J. 3, 2.
- Phipps, S.M., Sharaf, M.H.M., Butterweck, V. **2007**. Assessing antioxidant activity in botanicals and other dietary supplements. Pharmacopeial Forum 33, 34.
- Podsedek, A. **2007**. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. LWT 40, 1–11.

- Prior, R., Cao, G. **2000**. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: A review. *J. AOAC Int.* 83, 950-956.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. **2005**. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4290-4302.
- Rao, A.V., Rao, L.G. **2007**. Carotenoids and human health. *Pharmacol. Res.* 55, 207-216.
- Ratnam, D., Ankola, D., Bhardwaj, V., Sahana, D., Kumar, M. **2006**. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J. Control Release* 113, 2,189-207.
- Ridnour, L.A., Isenberg, J.S., Espey, M.G., Thomas, D.D., Roberts, D.D., Wink, D.A. **2005**. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 102, 13147-13152.
- 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 Chem.* 92, 235–254.
- 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. *J. Nutr.* 133, 2188-2193.
- Scalbert, A., Williamson, G. **2000**. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130, 2073S-2085S.
- 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 Chem.* 101, 1012-1018.
- Souci, S. W., Fachmann, W., Kraut, H. **1986**. Food composition and nutrition tables. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Sousa, C., Taveira, M., Valentão, P., Fernandes, F., Pereira, J.A., Estevinho, L., Bento, A., Ferreres, F., Seabra, R.M., Andrade, P.B. **2008**. Inflorescences of

- Brassicaceae species as source of bioactive compounds: A comparative study. Food Chem. 110, 953-961.
- Teixeira, V.H. **2010**. Vitamina C e constipações: uma controvérsia em idade de reforma. Ver. Med. Desp. *in forma*, 1, 8.
 - Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser J. **2007**. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int. J. Biochem. Cell Biol. 39, 44-84.
 - Vrchovska, V., Sousa, C., Valentão, P., Ferreres, F., Pereira, J.A., Seabra, R.M., Andrade, P.B. **2006**. Antioxidative properties of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) external leaves against DPPH, superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. Food Chem. 98, 416-425.
 - 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 J. Clin. Nutr. 16, 1295-1301.
 - Wolfe, K., Wu, X., Liu, R.H. **2003**. Antioxidant activity of apple peels. J. Agric. Food Chem. 51, 609-614.
 - Yi, W., Wu, X., Cao, R., Song, H., Ma, L. **2009**. Biological evaluations of novel vitamin C esters as mushroom tyrosinase inhibitors and antioxidants. Food Chem. 117, 381-386.

ANEXOS