

Efeito da adubação azotada na composição química e propriedades antioxidantes de sementes de colza da cultivar Hydromel

Dina Raquel Luís da Costa

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

Orientado por

Prof. Doutora Clementina Maria Moreira dos Santos

Prof. Doutor Manuel Ângelo Rodrigues

**Bragança
2012**

Este trabalho teve o apoio financeiro de:

Projeto POCTEP – “Acción integrada para la promoción e implantación de eficiencia energética y energías renovables como factor de competitividad”.

Código 0128_PROBIOENER_2_E.



União Europeia
FEDER
Investimos no seu futuro



PROJETO
0128_PROBIONER_2_E

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

É com enorme prazer e satisfação, que ao finalizar este trabalho, agradeço a todos aqueles que, de uma forma ou doutra, contribuíram na sua realização e conclusão.

Em primeiro lugar, agradeço à Professora Doutora Clementina Santos, orientadora deste trabalho, por toda a ajuda, apoio e incentivo prestados na realização do trabalho laboratorial e escrito, pelos conhecimentos transmitidos, pela compreensão, pela permanente disponibilidade e acima de tudo pela amizade demonstrada.

Ao Professor Doutor Manuel Ângelo Rodrigues, co-orientador deste trabalho, pela disponibilidade, pelos conhecimentos transmitidos e pelo auxílio prestado.

À Professora Doutora Elsa Ramalhosa pela valiosa colaboração prestada ao longo da realização deste trabalho.

Ao Eng^o. Jorge Sá Morais, pela permanente disponibilidade e pelos conhecimentos transmitidos na área da cromatografia gasosa.

À Eng^a. Ana Pinto pelo apoio prestado na obtenção de algumas análises laboratoriais e pela simpatia.

Ao Professor Doutor José Alberto Pereira e ao Ricardo Malheiro pela cedência e contributo prestado nas extrações em soxhlet.

Ao Professor Doutor Artur Silva do Departamento de Química da Universidade de Aveiro pelo valioso contributo prestado na obtenção e interpretação dos espectros de RMN.

À Anabela e à Céu pelo companheirismo, amizade, incentivo e boa disposição.

Ao André por todo o amor e carinho demonstrado nos bons e maus momentos, pela compreensão e apoio ao longo deste percurso.

Por último, à minha família. Ao meu irmão pelo carinho, apoio e incentivo. Aos meus pais pelo amor sem limites, pelo carinho, dedicação, coragem, força, por nunca me deixarem desistir. Aos dois agradeço do fundo do coração por chegar até aqui.

A todos um Muito Obrigado!

RESUMO

Neste trabalho pretendeu-se avaliar o efeito da adubação azotada na composição química e nas propriedades antioxidantes de sementes de colza da cultivar Hydromel. As amostras de semente de colza foram obtidas num ensaio de campo que decorreu em Bragança, em que a colza foi cultivada em ciclo de outono/inverno, na época de 2009/2010. A denominação das amostras de colza foi definida consoante as doses de azoto aplicadas em cobertura no ensaio de campo, as quais foram 0 (N₀), 50 (N₅₀) e 150 (N₁₅₀) kg de azoto por hectare.

No que diz respeito à composição química determinou-se o teor em humidade, cinzas, proteína, gordura e fibras (NDF e ADF) e procedeu-se à quantificação dos ácidos gordos por cromatografia gasosa (GC/FID). As sementes de colza são maioritariamente constituídas por gordura. A amostra N₀ possuiu o maior teor em gordura (47,36%) e o menor valor foi encontrado na amostra N₁₅₀ (44,62%). O perfil em ácidos gordos é maioritariamente constituído por ácidos gordos monoinsaturados, sendo o ácido oleico o mais abundante (cerca de 60%). A análise dos espectros de ressonância magnética nuclear dos extratos de colza confirma estes dados. O teor em proteína apresentou o seu maior valor na amostra N₁₅₀ (17,08%), a qual possui a fertilização azotada máxima, enquanto o menor teor em proteína foi encontrado na amostra sem fertilização (13,93%). O teor em NDF foi similar em todas as amostras (cerca de 34%). Por outro lado, o aumento da fertilização azotada conduziu a uma diminuição do teor em ADF. O teor em cinzas e em humidade não apresentou variações significativas nas diferentes amostras.

A atividade antioxidante dos extratos das sementes de colza foi avaliada pelos métodos da capacidade redutora total, do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH e do poder redutor. Os extratos de colza obtidos por extração com metanol à temperatura ambiente apresentaram maior eficiência antioxidante do que os obtidos por extração à temperatura de ebulição, considerando as 3 metodologias testadas. Os extratos N₀ e N₅₀ obtidos por extração à temperatura ambiente mostraram ter uma maior eficiência antioxidante (EC₅₀ de 0,93 e 0,92 mg/ml para o DPPH e 0,99 e 1,03 mg/ml para o poder redutor). O extrato N₀ obtido na extração à temperatura ambiente apresentou o maior teor em fenóis totais, sendo de 25,73 mg GAE/g de extrato.

Em suma, variações na fertilização azotada da cultura de colza da cultivar Hydromel induz alterações na composição química e propriedades antioxidantes das

sementes obtidas. E assim sendo, as condições de fertilização da cultura de colza devem ser tidas em conta de forma a maximizar a sua aplicação industrial.

Palavras-chave: Sementes de colza, cultivar Hydromel, adubação azotada, composição química, atividade antioxidante.

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the effect of nitrogen fertilization on chemical composition and the antioxidant properties of rapeseed Hydromel cultivar. Samples were obtained in a field trial held in Bragança, in which rape grown in a cycle of autumn/winter season in 2009/2010. The designation of the samples was defined as rapeseed nitrogen rates applied in the field trial, which were 0 (N_0), 50 (N_{50}) and 150 (N_{150}) kg of nitrogen per hectare.

With respect to chemical composition, it was determined moisture, ash, protein, fat and fiber (NDF and ADF) content, and proceeded to the quantification of fatty acids by gas chromatography (GC/FID). The rapeseed is mainly constituted by fat. The N_0 sample had the highest fat content (47.36%). The fatty acid profile is mainly composed by monounsaturated fatty acids, oleic acid being the most abundant (60%). Through the analysis of the nuclear magnetic resonance spectra it was also found that the major triglyceride was oleic acid. The protein content in the samples varied, the greatest value was found in sample N_{150} (17.08%), which possess the highest nitrogen fertilization, while the lower protein content was found in the sample without fertilization (13.93%). The content of NDF was similar in all samples (approximately 34%). Moreover, with increasing nitrogen fertilization, the content of ADF was lower. The ash and moisture content did not vary in the different samples.

The antioxidant activity was evaluated by the total reduction capacity, the blocking effect of free radicals of DPPH and reducing power. The rapeseed extracts obtained from extraction at room temperature showed the highest antioxidant efficiency than those obtained from extraction at boiling temperature, for all methodologies tested. The extracts N_0 e N_{50} obtained from extraction at room temperature proved to have greater antioxidant efficiency (EC_{50} of 0.93 and 0.92 mg/ml for DPPH, 0.99 and 1.03 mg/ml for reducing power). The N_0 extract obtained in the extraction at room temperature showed the highest total phenol content, 25.73 mg of GAE/g extract.

To conclude, it is noteworthy that the chemical composition and antioxidant properties of rapeseed are altered with nitrogen fertilization. Thus, the optimum conditions for growing rape must first be taken into account according to the industrial application of cultures of oilseed rape.

Keywords: Rapeseed, Hydromel cultivar, nitrogen fertilization, chemical composition, antioxidant activity.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADF – Fibra em detergente ácido (*Acid Detergent Fiber*)

ADL – Lenhina em detergente ácido (*Acid Detergent Lignin*)

COSY - Correlação espectroscópica homonuclear, bidimensional, em RMN (*Correlation Spectroscopy*)

CTAB – Brometo de cetilmetilamônio

dd – Duplo duplete

δ – Desvio químico em relação ao tetrametilsilano (em ppm)

DEPT – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*

DPPH – 2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo

EC₅₀ – Concentração de extrato a que corresponde 50% de inibição

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)

FID – Detetor de ionização de chama

GAE – Equivalentes de ácido gálico

GC – Cromatografia gasosa (*gas chromatography*)

HMBC – Correlação espectroscópica heteronuclear a longa distância, bidimensional (deteção inversa), em RMN (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*)

HSQC – Correlação espectroscópica heteronuclear, bidimensional (deteção inversa), em RMN (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*)

J – Constante de acoplamento

m – Multiplete

m.s. – Matéria seca

N₀ – Amostra de sementes de colza da cultivar Hydromel resultantes da ausência da aplicação de fertilização em cobertura no ensaio de campo.

N₅₀ – Amostra de sementes de colza da cultivar Hydromel resultantes da aplicação em cobertura de 50 kg de azoto por hectare no ensaio de campo.

N₁₅₀ – Amostra de sementes de colza da cultivar Hydromel resultantes da aplicação em cobertura de 150 kg de azoto por hectare no ensaio de campo.

NDF – Fibra em detergente neutro (*Neutral Detergent Fiber*)

ppm – Partes por milhão

RMN – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

RMN de ¹³C – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono-13

RMN de ¹H – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton

t.amb. – Temperatura ambiente

t.ebul. – Temperatura de ebulição

ÍNDICE

RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
ÍNDICE.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Colza	1
1.2. Adubação azotada no cultivo de colza.....	4
1.3. Composição físico-química da colza	5
1.4. Atividade antioxidante	8
1.4.1. Capacidade redutora total	9
1.4.2. Efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH	10
1.4.3. Poder redutor	11
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Origem das amostras.....	13
3.2. Preparação das sementes de colza.....	14
3.3. Composição química das sementes de colza	14
3.3.1. Determinação do teor em humidade.....	14
3.3.2. Determinação do teor em cinzas.....	14
3.3.3. Determinação do teor em proteína	15
3.3.4. Determinação do teor em gordura	16
3.3.4.1. Gordura total	16
3.3.4.2. Composição em ácidos gordos por cromatografia gasosa (GC)	17
3.3.4.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	18
3.3.5. Cálculo do teor em hidratos de carbono e do valor energético	19
3.3.6. Determinação do teor em fibra	19

3.3.6.1.	Determinação da fibra em detergente neutro (NDF).....	20
3.3.6.2.	Determinação da fibra em detergente ácido (ADF)	21
3.4.	Avaliação da atividade antioxidante	22
3.4.1.	Otimização das condições de extração das sementes de colza.....	22
3.4.1.1.	Extração com metanol à temperatura ambiente	22
3.4.1.2.	Extração com metanol à temperatura de ebulição em soxhlet	23
3.4.2.	Metodologias aplicadas	24
3.4.2.1.	Avaliação da capacidade redutora total pelo método Folin-Ciocalteu	24
3.4.2.2.	Efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH	24
3.4.2.3.	Determinação do poder redutor	25
3.5.	Apresentação dos resultados	25
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1.	Composição química das sementes de colza	26
4.1.1.	Composição em ácidos gordos por cromatografia gasosa.....	30
4.1.2.	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	35
4.2.	Atividade antioxidante dos extratos de sementes de colza	43
4.2.1.	Rendimentos da otimização das condições de extração	43
4.2.2.	Capacidade redutora total	46
4.2.3.	Efeito bloqueador de radicais livres de DPPH	48
4.2.4.	Poder redutor	51
5.	CONCLUSÃO	54
6.	BIBLIOGRAFIA.....	56

1. INTRODUÇÃO

1.1. Colza

A colza é uma planta oleaginosa da família *Brassicaceae*, em que a principal espécie cultivada é classificada como *Brassica napus*.¹ A sua produção começou, pelo menos, há cerca de 1500 anos atrás, na China e na Índia, onde o seu óleo era usado como combustível para lamparinas. O provável aparecimento e desenvolvimento das culturas de colza na Europa remontam à Idade Média, primeiro na zona do Mediterrâneo, e no século XV, o seu cultivo estendeu-se à Europa Central.² O grande progresso da colza está profundamente ligado à indústria de construção naval, quando se descobriu que o óleo de colza aderiu melhor a superfícies metálicas do que outros óleos vegetais.³ Não é claro quando o óleo de colza se tornou um componente importante na dieta humana como óleo alimentar, ou mesmo na sua utilização como combustível para lamparinas, produção de velas ou sabões.²

A temperatura ótima de crescimento da colza é de cerca de 20 °C, embora o maior teor de gordura seja extraído das sementes quando estas amadureçam a uma temperatura entre os 10-15 °C.² A colza tornou-se portanto uma importante cultura oleaginosa em vários países de clima temperado frio, onde a maioria das outras oleaginosas não cresce.^{2,4} Deste modo, é considerada uma planta muito mais resistente às condições climáticas que outras oleaginosas (girassol, sésamo, milho, entre outras), visto a sua capacidade para resistir às geadas da primavera.⁴ A cultura da colza ocupa, atualmente, o segundo lugar entre as culturas de oleaginosas mais produzidas no mundo, a seguir à soja.⁵ A produtividade média da colza nos países mediterrâneos decresce relativamente aos países da Europa Ocidental e Setentrional devido à reduzida precipitação e temperaturas elevadas a partir da primavera. Assim, o *stress* hídrico apresenta-se como um dos principais constrangimentos ao desenvolvimento destas culturas e o seu cultivo em regiões áridas apresentará maior interesse em ciclo de outono/inverno, para que a cultura possa aproveitar as melhores condições hídricas destas estações.⁶ A planta de colza adapta-se melhor a regiões onde a disponibilidade de água no solo seja elevada durante o período vegetativo, requerendo apenas algum estio durante as fases próximas da colheita. Esta apresenta a vantagem de poder ser cultivada em solos exibindo uma ampla gama de pH. A maior produtividade é obtida em solos com teores moderados de argila.⁷

A colza é uma espécie que teve origem numa região geográfica limitada através de hibridações espontâneas entre os génotipos da nabiça (*B. rapa L.*) e da couve (*B. oleracea L.*), resultando num genoma anfidiplóide compreendendo no cromossoma complementos dos dois progenitores.⁵ Em caracteres morfológicos, as cultivares de colza de verão e de inverno não são muito diferentes, mas relativamente a caracteres fisiológicos revelam-se bastante distintas. Assim, as cultivares de inverno não alcançam a fase reprodutiva (floração) se a cultura não tiver sido exposta a temperaturas abaixo de zero durante um certo período de tempo.⁷ Portanto, as cultivares de inverno e outono são predominantemente cultivadas na Europa e Ásia, respetivamente, enquanto as cultivares de primavera são mais adequadas às condições climáticas do Canadá, Norte da Europa e Austrália. No entanto, a colza de verão é preferencialmente cultivada em climas continentais frios, tais como, os países do Norte da Europa, Canadá, China e Austrália.⁵

Atualmente, a colza é cultivada e comercializada para ração animal, óleo vegetal para consumo humano, biocombustível e lubrificantes. Mais de trinta países nos cinco continentes cultivam diversas variedades de colza, o que se traduziu numa produção mundial de colza na época 2008-2009 de cerca de 50 milhões de toneladas.² Os principais produtores são a China, o Canadá, a Índia e alguns países da Europa (Alemanha, França, Polónia, Reino Unido, Ucrânia), como é demonstrado pelo gráfico 1.

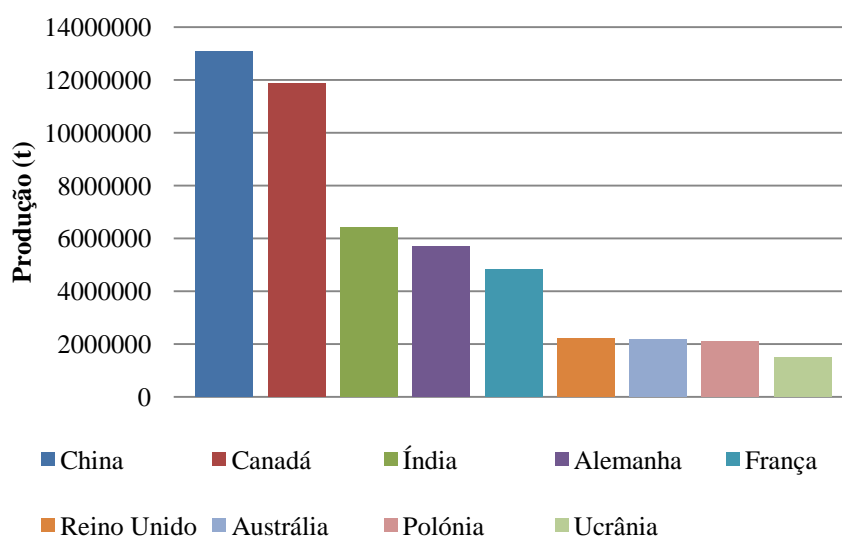


Gráfico 1. Produção total anual dos nove maiores produtores mundiais de colza em 2010 (www.fao.com).

O aumento da procura da colza pelos países da União Europeia, tanto para a indústria da alimentação humana e animal como para os fabricantes de biocombustíveis originou melhorias nas técnicas agronómicas, métodos de processamento, manipulações genéticas e produção de diferentes cultivares.²

Há alguns anos atrás, o óleo de colza não era adequado para a nutrição humana, dado que continha cerca de 30% de ácido erúxico na sua composição. O ácido erúxico é um ácido gordo ómega-9, monoinsaturado, sendo também conhecido como ácido *cis*-13-docosenóico. O seu isómero *trans* é conhecido como ácido brassídico.⁸ Em testes com animais demonstrou-se que o ácido erúxico se depositava no músculo do coração e influenciava negativamente o funcionamento dos rins, baço, timo e tiróide.⁴ Este facto provocou a proibição do uso do óleo de colza para fins alimentares em muitos países, durante os anos 1970 e inícios dos anos 1980.⁷

Os glucosinolatos são β -tioglucosídeos *N*-hidroxissulfatados, com uma cadeia lateral R e ligados por enxofre a uma molécula de β -D-glucopiranosose. Estes compostos conferem o sabor amargo e o aroma sulfuroso quando existe rutura da cadeia lateral.^{5,9,10} Apesar dos glucosinolatos possuírem propriedades antibacterianas, antifúngicas e atividade de quimioprevenção do cancro, os seus efeitos antinutricionais limitaram o uso na alimentação humana e animal.⁵ Na alimentação animal, a presença do alto teor de glucosinolatos no farelo afeta o paladar da proteína provocando a rejeição dos animais.¹¹

O desenvolvimento de novas variedades de colza, mais adequadas para o uso humano e animal, foi realizado na Alemanha e no Canadá, pois o clima destes países era mais apropriado para o cultivo desta oleaginosa. Contudo, foi no Canadá que um fitogeneticista desenvolveu a primeira cultivar de colza com baixos teores em ácido erúxico e glucosinolatos, “*double-zero*”. Esta variedade de *Brassica napus*, designada de “Tower” foi a primeira a preencher todos os requisitos de qualidade, compreendendo baixos teores em ácido erúxico e glucosinolatos.⁴

Atualmente, a colza é referida como tendo aptidão forrageira, usada sobretudo para silagem, inclusive para consumo em verde incluindo em pastoreio no outono.¹² Esta é também considerada um bom precedente cultural para os cereais, deixando elevada fertilidade residual, ou seja, um restolho mais rico em azoto.¹³

A procura crescente do óleo de colza, deve-se sobretudo à melhoria progressiva da qualidade do óleo para fins alimentares e dos bagaços para alimentação animal e,

presentemente, ao facto da colza estar a ser promovida em todo o mundo como cultura energética para o fabrico de biocombustíveis.¹⁴

1.2. Adubação azotada no cultivo de colza

Para as culturas recentemente introduzidas, é necessário avaliar a tecnologia de produção adequada para os diferentes ambientes. Entre outros, os requisitos nutricionais da cultura são considerados o fator mais importante a ter em conta. Assim, o azoto desempenha um papel vital na produção das culturas. Comparando a outros cereais, a colza requer uma maior quantidade de nutrientes e a disponibilidade de azoto frequentemente limita o rendimento das sementes. Alguns autores relatam que a colza requer cerca de 25% mais de azoto que o trigo.¹⁵

A resposta em produtividade da colza para doses crescentes de azoto depende de diversas variáveis, tais como o clima, o tipo de solo, a fertilidade residual (especialmente os nitratos), o teor em água do solo e a cultivar. Muitos estudos têm mostrado que tanto o crescimento, como a produção de colza são promovidos de forma significativa pela aplicação de doses elevadas de azoto. O azoto aumenta a produtividade influenciando uma série de parâmetros de crescimento, tais como o número de ramos e vagens por planta e grãos por vagem, produzindo um crescimento e desenvolvimento mais vigoroso. Alguns autores relataram que o azoto prolonga a vida das folhas, melhora a duração da área foliar após a floração e aumenta a assimilação das culturas em geral, contribuindo assim para o aumento da produção de sementes de sementes.¹⁵ No entanto, o azoto em excesso pode reduzir sensivelmente a produção e a qualidade de sementes. Uma taxa de azoto excessiva ou o inadequado momento de aplicação de azoto pode aumentar o teor de azoto nas sementes, diminuindo o teor de óleo e por consequência, diminuir o seu valor comercial. Além disso, a aplicação excessiva de fertilizantes afeta negativamente a economia do agricultor e do meio ambiente.¹⁶

A dose correta, a forma de azoto aplicada e o momento da aplicação do fertilizante são aspetos importantes para uma produção de colza bem sucedida. O tipo de fertilizantes aplicados, raramente levado em consideração por pesquisas e na prática, é ainda um fator ambíguo. Apesar dos efeitos bem reconhecidos dos componentes principais do fertilizante de azoto, ou seja, fontes de azoto e/ou outros nutrientes, como componentes secundários sobre o solo e as plantas, e o terceiro fator do azoto, ou seja, a

composição química dos fertilizantes de azoto aplicados, raramente é tratado como um fator importante no sistema de produção da colza.¹⁵

1.3. Composição físico-química da colza

Atualmente, os genótipos cultivados de colza podem atingir uma altura entre 80 e 150 cm, em que as suas vagens têm um comprimento entre 5 e 10 cm e são preenchidas com 15 a 40 sementes. As figuras 1, 2 e 3 mostram, respetivamente, a planta de colza em floração, a planta pronta para debulha e as sementes de colza.⁴



Figura 1. Planta de colza em floração.

(<http://www.pbase.com/mardoli/colza>)



Figura 2. Plantas de colza prontas para debulha.

(<http://mbrudna.wordpress.com/category/canola>)



Figura 3. Sementes de colza.

(<http://www.sensationelie.com.br/p/essencias-extratos-e-sementes.html>)

As plantas de colza originam sementes esféricas com tonalidades entre o preto e o avermelhado, em que os seus diâmetros variam entre 1,5 a 3,2 mm e o seu peso entre 2,5 a 6,5 mg. As cascas das sementes de colza exibem uma estrutura em camadas que consistem numa percentagem de peso da semente de colza entre 12 a 16%. As sementes contêm uma proporção de proteína de 15 a 18%. Além do seu conteúdo em óleo e proteína, as sementes de colza são constituídas por fibra bruta, em que esta constitui 31 a 34% do peso da semente. Uma grande percentagem da fibra bruta está localizada nas paredes celulares espessas, em que 35% consiste em lenhina. As sementes de colza das cultivares de inverno atingem um teor em óleo entre 42 a 50%. Por outro lado, as cultivares de verão atingem um teor em óleo entre 37 a 47%. O peso específico do óleo de colza é 0,911-0,917 (a 15 °C), o seu índice de refração é 1,472-1,476, o seu valor de saponificação é 167-180, e o seu valor de iodo varia entre 94 a 106.7

As cultivares de colza com níveis reduzidos em ácido erúico e glucosinolatos originam um óleo saudável para consumo humano devido à sua composição em ácidos gordos.¹⁷ A composição em ácidos gordos varia de acordo com o tipo de cultivar e com as condições ambientais em que esta está inserida.¹⁸ O óleo extraído das sementes de colza compreende baixos níveis de ácidos gordos saturados (5-10%), mas por outro lado, apresenta quantidades significativas de ácidos gordos monoinsaturados (44-75%), e de ácidos polinsaturados (22-35%), em que esta contém uma fração significativa de ácido linolénico ómega-6 (9-13%) e ácido linoleico ómega-3 (18-22%).¹⁷ Assim, a proporção atualmente aceite de ácidos gordos ómega-3 e ómega-6 (2:1) benéfica para a saúde, ocorre nativamente no óleo de colza. O ácido linoleico ómega-3 é reconhecido por proporcionar proteção contra doenças cardiovasculares, contrariando as trombozes.⁵

A peculiar composição em ácidos gordos do óleo de colza diferencia-o de outros óleos vegetais.¹⁹ Como forma de exemplificar as diferenças na composição em ácidos gordos em diferentes espécies vegetais apresenta-se a tabela 1, na qual consta a percentagem de ácidos gordos em soja, girassol, milho e na própria espécie estudada. Analisando a tabela 1 verifica-se que os ácidos gordos mais abundantes nas diferentes espécies vegetais são o ácido oleico (C18:1) e linoleico (C18:2). A colza apresenta-se como a espécie vegetal que possui maior teor em ácido oleico, com valores entre 50-65%, o que por si só demonstra que é a espécie que detém maior conteúdo em ácidos gordos monoinsaturados. Por outro lado, a espécie que apresenta maior teor em ácido linoleico é o girassol, com valores entre 50-72%. A colza apresenta-se como a espécie que detém o menor teor neste ácido (15-30%) relativamente às outras espécies vegetais

mencionadas na tabela. O ácido linolénico apresenta-se em maior quantidade na colza (6-14%) e na soja (5-10%). Nas diferentes espécies vegetais, o ácido gordo saturado que se apresenta em maior quantidade é o ácido palmítico, sendo no milho o seu maior teor (9-17%). O teor em ácido esteárico apresenta-se similar no milho e na colza (1-3%), e ligeiramente superior na soja e no girassol (3-7%). Os ácidos cáprico, láurico, palmitoléico, araquídico e beénico aparecem como os ácidos com menor relevância na composição em ácidos gordos nas diferentes espécies vegetais apresentadas na tabela 1. O ácido eicosenóico surge de forma residual na composição em ácidos gordos do girassol (0,3%), e na colza pode encontrar-se em valores inferiores a 4,5%, não tendo sido detetados na soja e no milho. O ácido erúcico e lenhocérico apenas surgem na composição em ácidos gordos da colza, com valores de $\leq 5\%$ e $\leq 0,2\%$, respetivamente.

Tabela 1. Composição em ácidos gordos (%) em diferentes espécies vegetais.²⁰

Ácido Gordo	Estrutura	Soja	Girassol	Milho	Colza
Cáprico	C12:0	$\leq 0,1$	$\leq 0,1$	$\leq 0,1$	$\leq 0,1$
Láurico	C14:0	$\leq 0,1$	$\leq 0,1$	$\leq 0,1$	$\leq 0,1$
Palmítico	C16:0	7-12	$\leq 3,5-8$	9-17	2-7
Palmitoléico	C16:1	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 0,2$	≤ 1
Esteárico	C18:0	2-6	3-7	1-3	1-3
Oleico	C18:1	20-35	15-85	22-40	50-65
Linoleico	C18:2	45-60	50-72	45-65	15-30
Linolénico	C18:3	5-10	$\leq 0,2$	$\leq 1,5$	6-14
Araquídico	C20:0	≤ 1	$\leq 0,6$	≤ 1	$\leq 1,5$
Eicosenóico	C20:1	-	0,3	-	$\leq 4,5$
Beénico	C22:0	$\leq 0,5$	≤ 1	$\leq 0,1$	$\leq 0,5$
Erúcico	C22:1	-	-	-	$\leq 5,0$
Lenhocérico	C24:0	-	-	-	$\leq 0,2$

1.4. Atividade antioxidante

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis ou limitar as reações radicalares (formação de radicais livres) em cadeia através da inibição ou atraso das etapas de iniciação ou de propagação, o que leva ao término da reação ou ao retardamento nas reações de degradação. Podem ainda atuar como substâncias captadores de oxigénio e como agentes quelantes, nomeadamente de iões metálicos.^{21,22}

Atualmente tem aumentado o interesse na caracterização e identificação de antioxidantes que ocorrem naturalmente nas plantas, dado que os antioxidantes sintéticos apresentam algumas desvantagens importantes, porque são altamente voláteis e instáveis a temperaturas elevadas, limitados por regras legislativas e, acima de tudo, são suspeitos de terem algumas propriedades tóxicas, sendo implicados na manifestação de carcinogénese. Assim sendo, a indústria tem optado pela utilização de antioxidantes naturais para a estabilização de gorduras e óleos contra a rancificação.²³ Os antioxidantes naturais como o ácido rosemarínico, catequinas, tocoferóis, carotenóides, ácido ascórbico e vários extratos fenólicos de diferentes plantas têm sido amplamente utilizados em alimentos processados.²³

A colza surge como uma planta que contém uma elevada quantidade de compostos fenólicos, relativamente a outras plantas oleaginosas.²⁴ Os compostos fenólicos da planta de colza incluem ácidos fenólicos esterificados e livres. Estes compostos, sendo antioxidantes naturais, possuem importantes propriedades biológicas tais como a cedência de átomos de hidrogénio na presença de certos metais e a capacidade de bloquear espécies reativas de oxigénio e electrófilos.²⁵ As sementes de colza e os seus produtos (óleo vegetal) destacam-se igualmente pelo elevado conteúdo em compostos bioativos, tais como ácidos fenólicos, fitoesteróis, tocoferóis, flavonóides, entre outros. Estes compostos demonstraram possuir atividade antirradicalar, a qual tem sido associada a uma menor incidência de doenças relacionadas com o *stress* oxidativo.¹⁷ Revelam-se também importantes na prevenção e no tratamento de doenças coronárias, cancro, diabetes, hipertensão, doenças degenerativas (Alzheimer e Parkinson) e doenças autoimunes.^{5,19}

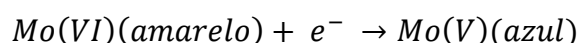
Neste âmbito, os compostos da colza têm sido utilizados como antioxidantes naturais em várias indústrias tais como a alimentar, a cosmética e a farmacêutica. Os compostos fenólicos da colza, principalmente o ácido sinapílico, demonstrou ser ativo

na inibição da oxidação de emulsões. Outros autores demonstraram que extratos de colza podem atuar em sistemas modelo de β -caroteno e linoleato e em sistemas modelo de lipoproteínas de baixa densidade (LDL).²⁶

Vários são os métodos utilizados para quantificar a atividade antioxidante de produtos alimentares de origem vegetal. As metodologias aplicadas no presente trabalho incluem a capacidade redutora total, a capacidade de bloquear radicais livres e capacidade de reduzir iões metálicos e serão sucintamente descritas de seguida.

1.4.1. Capacidade redutora total

A capacidade redutora total, comumente conhecida como ensaio de fenóis totais, foi avaliada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como padrão de referência. O reagente de molibdotungstato oxida compostos fenólicos e origina um produto colorido com uma absorvância máxima entre 745 e 750 nm. Assim, o ensaio dos fenóis totais avalia a capacidade de redução da amostra.²⁷⁻²⁹ Sob condições alcalinas, o reagente Folin-Ciocalteu reage com compostos fenólicos e, conseqüentemente, forma o anião fenolato, pela dissociação de um próton fenólico. Este será oxidado podendo ceder um ou dois eletrões levando à formação de produtos de coloração azul. Pensa-se que a reação de transferência do eletrão dos agentes redutores para Mo(VI) reduzem o molibdénio, traduzindo-se na reação



em que Mo(VI) representa a forma oxidada do molibdénio, e^{-} um eletrão e Mo(V) representa a forma reduzida do molibdénio.³⁰

Este ensaio tornou-se rotineiro no estudo de antioxidantes fenólicos devido à sua sensibilidade e simplicidade. Contudo, são nomeadas algumas críticas para esta metodologia. O reagente de Folin-Ciocalteu reage com algumas substâncias nomeadamente hidratos de carbono, aminas aromáticas, ácido ascórbico, entre outros, sendo desta forma quantificados como fenóis.³¹

1.4.2. Efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH

O método da atividade bloqueadora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) é usado regularmente para avaliar a capacidade das espécies antioxidantes para sequestrar radicais livres. O radical DPPH é um composto comercialmente disponível e que apresenta cor púrpura.³² É um radical azotado orgânico estável, que na presença da substância (antioxidante) que pode doar um átomo de hidrogénio (AH), pode ser reduzido em meio alcoólico, dando origem à forma reduzida do radical - molécula de 2,2-difenil-1-picril-hidrazina.³³

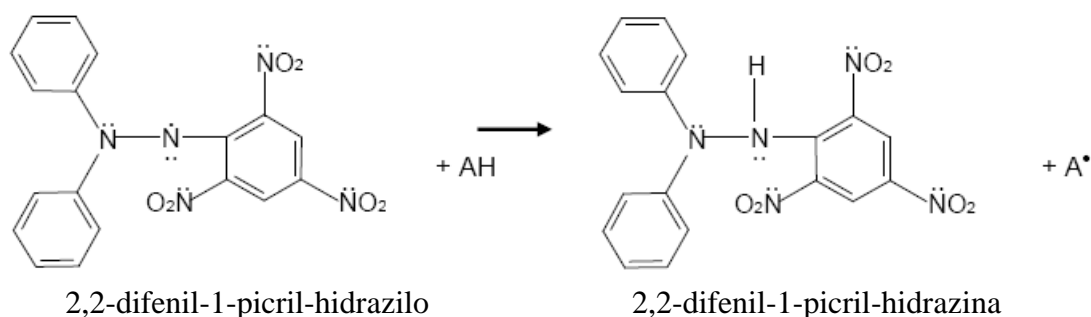


Figura 4. Mecanismo da redução do radical livre de DPPH.

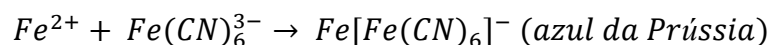
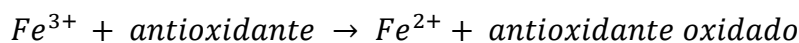
Após a redução, a cor da solução do radical DPPH desvanece para amarelo, podendo esta alteração ser monitorizada no máximo de absorção entre 517-520 nm.²⁸ Assim, quanto mais rápido decrescer a absorvância, maior será a atividade antioxidante do extrato em estudo, ou seja, os compostos testados com elevada atividade antioxidante induzem num rápido declínio da absorvância do radical DPPH.^{34,35}

O método do DPPH é um método rápido, de baixo custo por utilizar reagentes acessíveis e por não necessitar de equipamentos sofisticados.²⁹ Além disso, o ensaio é efetuado à temperatura ambiente, eliminando o risco de degradação térmica de algumas substâncias analisadas. Em contraste, o radical DPPH só pode ser dissolvido em solventes orgânicos, especialmente em etanol, o que acarreta uma importante limitação ao interpretar o papel dos antioxidantes hidrofílicos.³⁶⁻³⁸

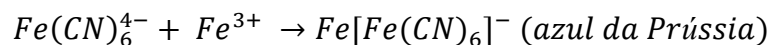
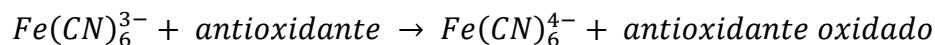
1.4.3. Poder redutor

No método do poder redutor, a presença de agentes redutores (antioxidantes) provoca a redução do complexo Fe^{3+} /ferricianeto ($FeCl_3/K_3Fe(CN)_6$) a uma forma ferrosa (Fe^{2+}). Dessa forma, a formação de tonalidades de verde ou azul, medida espectrofotometricamente a 700 nm, pode ser usada para monitorizar a concentração de Fe^{2+} .^{23,39,40}

Com ambas as espécies oxidantes, Fe^{3+} ou $Fe(CN)_6^{3-}$ (na composição do reagente ferricianeto), o produto de redução com o antioxidante, Fe^{2+} ou $Fe(CN)_6^{4-}$, respetivamente, reagem com o outro componente do reagente desenvolvendo a coloração azul da Prússia, $KFe[Fe(CN)_6]$.⁴¹



ou



Neste ensaio, um aumento da absorvância implica um aumento do poder redutor. Este é considerado um método de fácil execução, embora seja necessária a preparação substancial de soluções antes de iniciar o ensaio, tais como, fosfato de sódio, ferricianeto de potássio, ácido tricloroacético e cloreto férrico.³⁵

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo principal o estudo do efeito da adubação azotada na composição química e na atividade antioxidante de sementes de colza da cultivar Hydromel.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- i) Proceder à caracterização nutricional, determinando os teores em humidade, cinzas, gordura bruta, proteína, hidratos de carbono, fibras em detergente neutro e em detergente ácido de cada uma das amostras de colza da cultivar Hydromel com diferentes doses de azoto, bem como proceder ao cálculo dos seus respetivos valores energéticos;
- ii) Caracterização da fração lipídica através da determinação do perfil em ácidos gordos por GC/FID;
- iii) Identificação dos ácidos gordos contidos na fração lipídica das sementes de colza através da espectroscopia de ressonância magnética nuclear;
- iv) Avaliação do potencial antioxidante dos extratos metanólicos das diferentes amostras de colza com diferentes doses de adubação azotada através de vários métodos analíticos, tais como a capacidade redutora total pelo método de Folin-Ciocalteu, o efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH e o poder redutor.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem das amostras

As amostras de semente de colza da cultivar Hydromel utilizadas neste trabalho foram obtidas num ensaio de campo que decorreu em Bragança, em que a colza foi cultivada em ciclo outono/inverno, na estação de crescimento de 2009/2010. Na sementeira foi utilizada um semeador de linhas adequado para sementes miúdas, tendo sido utilizados 4,3 kg de semente por hectare. A sementeira ocorreu em 21 de setembro de 2009. Em pré-sementeira aplicou-se um herbicida de ação residual à base de napropamida, de marca comercial Devrinol, que foi imediatamente incorporado no solo com escarificador. Foram ensaiadas várias doses de azoto, das quais foram usadas neste trabalho as correspondentes a 0 (N_0), 50 (N_{50}) e 150 (N_{150}) kg de azoto por hectare, aplicadas em cobertura a 13 de março de 2010. As diferentes doses de azoto foram instaladas em macro-talhões de 630 m², com sementeira mecânica, tendo as repetições de campo sido efetuadas dentro de cada macro-talhão. De cada macro-talhão foram recolhidas três amostras distintas de sementes de colza de locais diferentes do terreno (micro-talhões). Assim, N_0 , N_{50} e N_{150} apresentam três amostras distintas de sementes, respetivamente. No laboratório foram feitos duplicados de cada uma dessas amostras, ou seja, N_0 , N_{50} e N_{150} apresentam seis amostras. Como forma de exemplificar o descrito, apresenta-se a figura 5.

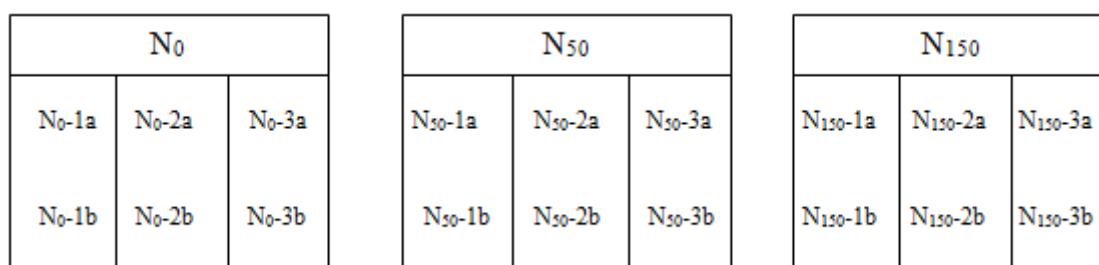


Figura 5. Representação exemplificativa dos macro-talhões e das respetivas amostras recolhidas com diferentes doses de azoto, N_0 , N_{50} e N_{150} .

O delineamento experimental completo e os resultados agronómicos obtidos podem ser consultados em Rodrigues *et al.*⁴²

3.2. Preparação das sementes de colza

As sementes de colza da cultivar Hydromel foram previamente limpas dos vestígios da planta e de sujidades. As sementes que não se apresentavam nas melhores condições morfológicas foram excluídas.

3.3. Composição química das sementes de colza

3.3.1. Determinação do teor em humidade

O teor em humidade foi determinado pelo método da AOAC 925.10.⁴³

As cápsulas utilizadas na determinação do teor em humidade foram previamente colocadas na mufla a uma temperatura de 550 °C, arrefecidas e posteriormente pesadas, imediatamente antes do ensaio, com a precisão de 0,0001 g.

A amostra foi triturada com recurso a um almofariz. Introduziu-se na cápsula cerca de 1 g de amostra preparada, pesou-se rapidamente com a precisão de 0,0001 g e colocou-se a cápsula na estufa previamente aquecida a uma temperatura de 105 °C durante 12 horas. Após este período, retirou-se a cápsula da estufa para arrefecimento no exsiccador e pesou-se. O peso final só foi admitido quando o peso se apresentou constante.

A percentagem do teor em humidade da amostra foi determinada através da seguinte fórmula:

$$\text{Teor em humidade (\%)} = 100 - \left(\frac{P_{\text{cápsula+amostra seca}} - P_{\text{cápsula}}}{\text{toma}} \times 100 \right)$$

3.3.2. Determinação do teor em cinzas

A determinação do teor em cinzas foi efetuada segundo o método da AOAC 923.03.⁴⁴

Para a determinação do teor em cinzas foi utilizada a cápsula com a matéria seca proveniente do ensaio de determinação do teor em humidade. Esta foi introduzida na mufla previamente aquecida à temperatura de 550 °C durante um período de 3 horas, para incineração completa da matéria orgânica. Após este período, retirou-se a cápsula

da mufla para arrefecimento no exsiccador e pesou-se. O peso final só foi admitido quando o peso se apresentou constante.

A percentagem do teor em cinzas da amostra foi determinada através da seguinte fórmula:

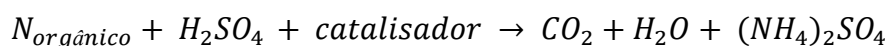
$$\text{Teor em cinzas (\%)} = \frac{P_{\text{cápsula+cinzas}} - P_{\text{cápsula}}}{\text{toma}} \times 100$$

3.3.3. Determinação do teor em proteína

Os ensaios para a determinação do teor em proteína foram efetuados recorrendo ao método de Kjeldahl, descrito pela AOAC, método 960.52.⁴⁵

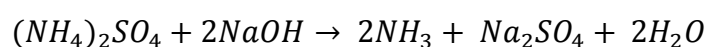
As amostras foram previamente moídas utilizando para o efeito um moinho elétrico.

Pesou-se rigorosamente 1 g de cada amostra moída para cada um dos tubos, com a precisão de 0,0001 g, adicionou-se duas pastilhas de catalisador de selénio e 15 ml de ácido sulfúrico concentrado. Colocaram-se os tubos na hotte e a digestão ácida da proteína ocorreu à temperatura de 400 °C durante 1 hora. Esta etapa foi responsável pela redução do azoto orgânico a amónio, o qual foi retido em solução, na forma de sulfato de amónio:

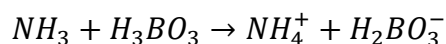


Após a digestão, o arrefecimento dos tubos ocorreu à temperatura ambiente, sendo posteriormente colocados no aparelho “UDK 152 Distillation & Titration Unit”, em que ocorreram uma série de reações químicas que são sucintamente referidas de seguida.

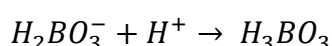
Primeiramente ocorreu a diluição da amostra digerida com água, e a neutralização do ácido sulfúrico com uma solução de hidróxido de sódio. Estequiometricamente:



A solução resultante, contendo amoníaco (NH₃), foi destilada por vapor, que arrastou consigo o NH₃, sendo este recolhido numa solução de ácido bórico contendo indicadores de azul de metileno e vermelho de metilo:



O ião borato (quantidade proporcional à de azoto) foi titulado com uma solução padrão de HCl, permitindo calcular a quantidade molar de azoto na amostra, o qual se mostra igual à quantidade molar de NH₃, e por sua vez igual à de HCl.⁴⁶



O aparelho “*UDK 152 Distillation & Titration Unit*” fez a leitura da proteína e respetiva conversão em percentagem de azoto.

A conversão de percentagem de azoto em percentagem de proteína é calculada com a utilização de um fator de conversão específico. Como a maioria das proteínas contém 16% de azoto, normalmente esse fator é de 6,25 (100/16=6,25).

$$\% \text{ proteína bruta} = \% \text{ de azoto} \times 6,25$$

em que 6,25 é o fator de conversão específico para cereais e oleaginosas.

3.3.4. Determinação do teor em gordura

3.3.4.1. Gordura total

O teor em gordura total foi determinado segundo método da AOAC 948.22.⁴⁷

Para a determinação do teor em gordura total nas sementes de colza variedade Hydromel procedeu-se à pesagem de 5 g de amostra, com a precisão de 0,0001 g, para um vidro de relógio e posterior trituração em almofariz. Para ajudar na trituração das sementes foi utilizado 1 a 2 colheres de sulfato de sódio anidro.

Transferiu-se a amostra triturada para o cartucho de extração com a ajuda de algodão que é igualmente colocado dentro do cartucho para que não se verificasse perda de amostra.

O cartucho foi colocado no extrator soxhlet e o balão de fundo redondo colocado na sua extremidade, iniciando-se deste modo a extração com éter de petróleo durante 24 horas. O balão de fundo redondo foi previamente seco, pesado e identificado de acordo com a codificação da amostra. Após este período, retirou-se o balão do soxhlet e colocou-se em estufa a 40 °C até peso constante.

O teor em gordura total foi determinado através da seguinte fórmula:

$$\text{Teor em gordura (\%)} = \frac{(P_{\text{balão+extrato}} - P_{\text{balão}})}{\text{toma}} \times 100$$

3.3.4.2. *Composição em ácidos gordos por cromatografia gasosa (GC)*

A determinação do perfil em ácidos gordos foi realizada após extração da gordura total em soxhlet, e posterior transesterificação dos seus ácidos gordos para análise por cromatografia gasosa. Para o efeito colocou-se 2 ml de n-heptano num porta-amostras, adicionou-se 100 µl de amostra conseguida na extração do soxhlet e adicionou-se 200 µl de uma solução de hidróxido de potássio a 2M em metanol. Esta solução foi homogeneizada no vortéx, seguida de centrifugação a 3000 rpm durante 2 minutos. Retirou-se cerca de 1 ml de sobrenadante para uma seringa com filtro de 0,2 µm e injetou-se num porta-amostras com septo.

O perfil dos ácidos gordos foi determinado com o uso do cromatógrafo gasoso marca Dani e modelo GC 1000 equipado com injetor split-splitless, detetor FID e coluna de sílica fundida da marca Macherey-Nagel, modelo Optima 225 com 30 m de comprimento e 0,32 mm de diâmetro interno, tendo a fase estacionária 0,25 µm. O hidrogénio foi utilizado como gás de arraste, tendo um fluxo de 3,7 ml/min a 50 °C. As temperaturas do detetor e do injetor foram 260 °C e 250 °C, respetivamente. O volume injetado de amostra foi de 1 µl e a razão de separação foi de 1:40. O detetor utilizou como gases de combustão azoto a 0,65 bar, ar reconstituído a 0,90 bar e hidrogénio a 0,65 bar. Na sua constituição, a fase estacionária continha 50% de cianopropilmetilpolisiloxano e 50% de fenilmetilpolisiloxano. Os resultados foram expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo, calculado pela normalização interna da área do pico cromatográfico.

3.3.4.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C das amostras de colza com diferentes níveis de fertilização foram adquiridos em soluções de clorofórmio deuterado. Após análise dos espectros de RMN de próton (^1H) verificou-se que o perfil era idêntico nas três tomas consideradas pelo que a caracterização por RMN de carbono-13 (^{13}C) foi realizado apenas para uma, em que se tomou como exemplo a amostra com o nível de fertilização superior (N_{150}). Assim, os espectros de RMN foram obtidos num aparelho Bruker Avance 300 (300,13 MHz para ^1H e 75,47 MHz para ^{13}C), utilizando tetrametilsilano como padrão interno. Na caracterização efetuada por RMN de ^1H indica-se, além do desvio químico (δ , ppm), a multiplicidade dos sinais e as correspondentes constantes de acoplamento (J , Hz). Para auxiliar na caracterização por RMN de ^{13}C efetuou-se o espectro de DEPT-135 (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer with flip angle of 135°*). Esta experiência permite identificar a multiplicidade dos diferentes tipos de átomos de carbono substituídos com hidrogénios. Assim, os sinais correspondentes à ressonância de prótons metilénicos (CH_2) são negativos enquanto os sinais correspondente às ressonâncias de prótons metínicos (CH) e metílicos (CH_3) são positivos e os carbonos quaternários não surgem neste espectro.

Os assinalamentos inequívocos das ressonâncias dos prótons e carbonos foram efetuados com recurso às técnicas bidimensionais de COSY, HSQC e HMBC.⁴⁸ A técnica de COSY (correlação espectroscópica homonuclear, bidimensional) permite obter correlações estabelecidas em prótons vizinhos, que distam em geral duas a três ligações entre si. A técnica de HSQC [correlação espectroscópica heteronuclear, bidimensional (deteção inversa)] permite identificar núcleos de heteroátomos diretamente ligados entre si, por exemplo ^1H - ^{13}C que distam uma ligação (1J). Finalmente, a técnica de HMBC [correlação espectroscópica heteronuclear a longa distância, bidimensional (deteção inversa)] permite identificar núcleos de heteroátomos que distam entre si várias ligações (2J ou 3J), por exemplo ^1H - ^{13}C . Estas experiências de correlação heteronuclear foram otimizadas para constantes de acoplamento J C/H a uma ligação e a longa distância de 145 e 7 Hz, respetivamente.

3.3.5. Cálculo do teor em hidratos de carbono e do valor energético

O teor em hidratos de carbono foi calculado pela diferença com as restantes componentes: humidade, cinzas, proteína e gordura, utilizando a fórmula abaixo mencionada.

$$\begin{aligned} & \% \text{ Hidratos de carbono} \\ & = 100 \% - (\% \text{ humidade} + \% \text{ cinzas} + \% \text{ proteína} + \% \text{ gordura}) \end{aligned}$$

O valor energético, expresso em quilocalorias, foi calculado utilizando os fatores mencionados na Legislação Portuguesa, utilizando a seguinte fórmula:⁴⁹

$$\text{Energia (kcal)} = 4 \times (g \text{ proteína} + g \text{ hidratos de carbono}) + 9 \times (g \text{ gordura})$$

3.3.6. Determinação do teor em fibra

A determinação do teor em fibra baseou-se no método de Van Soest, também designado por sistema detergente, onde se obtém a fibra em detergente neutro (NDF) e a fibra em detergente ácido (ADF). Estes métodos são oficialmente aceites pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) por oferecerem uma boa estimativa tanto dos componentes totais da parede celular como dos componentes mais indigestíveis da fibra.⁵⁰

A determinação da fibra em detergente neutro permite quantificar celulose, hemicelulose e lenhina, contaminada com alguma proteína, pectina, minerais e amido. Este método utiliza uma solução de sulfato láurico de sódio e EDTA a pH 7 em ebulição para extrair o conteúdo celular, permitindo deste modo, determinar os compostos da parede celular. A fibra em detergente neutro indica a quantidade total de fibra insolúvel do alimento, e constitui o parâmetro mais usado para o balanceamento das dietas animais uma vez que interfere nas mesmas. Assim, a quantidade de NDF nos alimentos é inversamente proporcional com o consumo dos ruminantes, ou seja, quanto menor o nível de NDF, maior o consumo da matéria seca. Os níveis de NDF variam conforme a espécie vegetal e o estágio vegetativo em que esta se encontra.^{51,52}

Por seu lado, a fibra em detergente ácido isola principalmente celulose e lenhina, com alguma contaminação por pectina, minerais e compostos nitrogenados

(principalmente produtos de reação de escurecimento não enzimático – reações de Maillard). O método da fibra em detergente ácido utiliza ácido sulfúrico 1 N (para solubilizar hidratos de carbono, amidos, hemiceluloses e algumas pectinas) e detergente de brometo de cetilmetilamónio (CTAB) para remover as proteínas. A fibra em detergente ácido contém a maior proporção de lenhina, ou seja, a quantidade de fibra indigestível, o que indica a digestibilidade. A ADF indica o valor energético da silagem, logo quanto menor a ADF, maior o valor energético.⁵¹

Em suma, a quantificação do teor em fibra é amplamente utilizada para avaliar a qualidade das forragens, uma vez que a fibra em detergente neutro tem correlação com o consumo, enquanto a fibra em detergente ácido tem elevada correlação com a digestibilidade.

3.3.6.1. Determinação da fibra em detergente neutro (NDF)

A determinação da fibra em detergente neutro foi efetuado de acordo com o método da AOAC 992.16.⁵³

Na determinação dos componentes da parede celular pesou-se 0,5 g de amostra moída e colocou-se em copo Berzilius de 600 ml. Adicionou-se 50 ml de solução de detergente neutro à temperatura ambiente e colocou-se no aparelho digestor de fibra para ebulição constante durante 1 hora. Após a ebulição, retirou-se o copo do aparelho e deixou-se repousar 5 minutos.

O cadinho filtrante de porosidade 1 foi entretanto pesado (p1) para se proceder à filtração da amostra no mesmo, utilizando uma sucção fraca. O cadinho foi lavado com 2 porções de água quase fervente e depois 2 vezes com acetona.

O cadinho foi levado à estufa a 105 °C durante 8 horas, sendo após este período arrefecido em exsiccador durante 20 minutos e pesado, obtendo-se o peso do cadinho+NDF (p2).

Posteriormente, o cadinho foi colocado na mufla a 550 °C durante 3 horas e depois transferido para a estufa a 105 °C durante 1 hora. Após arrefecimento em exsiccador durante 20 minutos e pesagem, obteve-se o peso do cadinho+cinzas (p3).

As fórmulas utilizadas para a determinação dos componentes da parede celular foram as abaixo mencionadas:

$$\text{NDF} = \frac{p2 - p1}{\text{toma} \times \% \text{ m. s.}} \times 100$$

$$\text{NDF sem cinzas} = \frac{p2 - p3}{\text{toma} \times \% \text{ m. s.}} \times 100$$

em que % m.s. é a percentagem de matéria seca.

3.3.6.2. *Determinação da fibra em detergente ácido (ADF)*

A fibra em detergente ácido foi determinada através do método da AOAC 973.18.⁵⁴

Para um copo de 600 ml de forma alta e sem bico (copos Berzilius) pesou-se 1 g de amostra previamente moída, e adicionou-se 100 ml de solução de detergente ácido. Os copos foram colocados no aparelho digestor de fibra para fervura durante 1 hora, mantendo-se sempre em ebulição.

O copo foi retirado do aparelho depois do período determinado, e o seu conteúdo foi filtrado através de um cadinho filtrante com a ajuda de uma bomba de sucção. Este cadinho filtrante de porosidade 1 foi previamente seco na estufa, arrefecido em exsiccador, pesado (p1) e numerado. Utilizou-se água destilada quase fervente para lavar o copo, bem como para limpar a amostra contida no cadinho. Adicionalmente, utilizou-se acetona para remover eventuais resíduos deixados pela amostra nas paredes do cadinho.

Após este procedimento, o cadinho foi colocado na estufa a 105 °C durante 8 horas, arrefecido em exsiccador e pesado, obtendo-se o peso do cadinho+ADF (p2).

Este cadinho filtrante foi colocado em cápsula de porcelana e foi-lhe adicionado ácido sulfúrico a 72% até que o ácido submergisse totalmente o resíduo, durante 3 horas. Após este período, filtrou-se o cadinho com bastante água destilada quase fervente, de modo a que o filtrado ficasse isento de ácido (controlo efetuado com o auxílio de fita colorimétrica indicadora de pH).

O cadinho foi colocado novamente na estufa a 105 °C durante 8 horas. Depois de arrefecido em exsiccador, procedeu-se à sua pesagem, alcançando o peso do cadinho+ADL (p3), em que ADL é a lenhina em detergente ácido.

Para finalizar, o cadinho foi levado à mufla a 550 °C durante 3 horas, seguidamente transferido para a estufa a 105 °C durante 1 hora, e arrefecido em exsiccador, tendo-se alcançado o peso do cadinho+cinzas (p4).

Quanto à fórmula utilizada para a determinação da fibra ácida detergente foi a seguinte:

$$ADF = \frac{p2 - p1}{toma \times \% \text{ m. s.}} \times 100$$

em que % m.s. é a percentagem de matéria seca.

Relativamente à fórmula para a determinação da quantidade de lenhina foi utilizada a seguinte fórmula:

$$ADL = \frac{p3 - p4}{toma \times \% \text{ m. s.}} \times 100$$

em que % m.s. é a percentagem de matéria seca.

O teor de celulose presente nas amostras foi conseguido através da diferença da fibra em detergente ácido e da quantidade de lenhina.

$$\text{Celulose} = ADF - ADL$$

O teor de hemicelulose presente nas amostras foi calculado através da diferença da fibra em detergente neutro e da fibra em detergente ácido.

$$\text{Hemicelulose} = NDF - ADF$$

3.4. Avaliação da atividade antioxidante

3.4.1. Otimização das condições de extração das sementes de colza

3.4.1.1. Extração com metanol à temperatura ambiente

Para a otimização das condições de extração com metanol à temperatura ambiente foram efetuados três ensaios com tempos distintos de extração. Os tempos utilizados foram 24 horas, 24 + 24 horas e por fim, 24 + 24 + 24 horas. Descreve-se de seguida o procedimento efetuado para o tempo de extração mais longo (24 + 24 + 24 horas). Para as 24 horas de extração procede-se apenas à primeira etapa do procedimento experimental e para as 24 + 24 horas procede-se às duas primeiras etapas.

Pesou-se com precisão 5 g de amostra para um almofariz, com a precisão de 0,0001 g, e procedeu-se à sua trituração. Transferiu-se a amostra triturada para um copo de forma alta e adicionou-se 100 ml de metanol, utilizando esta quantidade para recuperar os retidos de amostra no pilão e no almofariz. A mistura foi colocada sobre placa magnética a 150 rpm, à temperatura ambiente durante 24 horas.

Após este período, filtrou-se a amostra através de papel de filtro e recolheu-se o solvente num frasco. Lavou-se o papel de filtro com um pouco de metanol para remover todos os resíduos da amostra para o copo. Depois da operação de limpeza, fez-se uma nova extração da amostra com mais 100 ml de metanol para o respetivo copo e colocou-se este novamente sobre a placa magnética à mesma rotação durante mais 24 horas.

Após este período repetiu-se o processo referido: filtração, a limpeza do filtro, adição de mais 100 ml de metanol ao copo, e colocou-se novamente este sobre a placa magnética por mais 24 horas.

Os filtrados das 3 extrações foram transferidos para um balão de fundo redondo, previamente seco, pesado e identificado consoante a amostra. O solvente foi evaporado no evaporador rotativo a uma temperatura de 40 °C.

$$\% \text{ Rendimento de extração} = \frac{P_{\text{balão+extrato}} - P_{\text{balão}}}{\text{toma}} \times 100$$

3.4.1.2. Extração com metanol à temperatura de ebulição em soxhlet

A otimização das condições de extração com metanol à temperatura de ebulição foi efetuada no soxhlet recorrendo a dois ensaios. No primeiro ensaio, o tempo de extração foi de 8 horas. Quanto ao segundo ensaio, o tempo de extração foi de 16 horas consecutivas.

Pesou-se 5 g de amostra com precisão de 0,0001 g, triturou-se em almofariz com 1 a 2 colheres de sulfato de sódio anidro, sendo depois colocada em cartucho de extração com ajuda de algodão.

O balão de fundo redondo previamente seco e pesado foi inserido na extremidade do extrator soxhlet e o cartucho colocado no extrator. Em seguida adicionou-se metanol ao circuito e o processo de extração decorreu em refluxo durante 8 ou 16 horas, de acordo com o ensaio.

Após este período desligou-se o aquecimento e deixou-se o sistema arrefecer até atingir a temperatura ambiente. O balão foi retirado do soxhlet e levado ao evaporador rotativo a uma temperatura de 40 °C, para eliminação do solvente do extrato. Depois deste procedimento, o balão foi colocado em estufa a 40 °C até peso constante.

$$\% \text{ Rendimento de extração} = \frac{P_{\text{balão+extrato}} - P_{\text{balão}}}{\text{toma}} \times 100$$

3.4.2. Metodologias aplicadas

3.4.2.1. Avaliação da capacidade redutora total pelo método Folin-Ciocalteu

A avaliação da capacidade redutora total, método utilizado por muitos autores para avaliar o teor em fenóis totais, foi determinada com base no procedimento descrito por Singleton e Rossi, com algumas modificações.⁵⁵

Adicionou-se 1 ml das várias concentrações de extrato metanólico de cada amostra com 1 ml de reagente de Folin-Ciocalteu, em que a concentração da solução mãe de extrato metanólico foi de 50 mg/ml. Após 3 minutos, adicionou-se 1 ml de solução saturada de carbonato de sódio, e perfez-se o volume de 10 ml com água destilada. A mistura foi mantida no escuro durante 90 minutos, após os quais se leu a absorvância a 725 nm (Espectrofotômetro Nanocolor UV/Vis, marca Macherey-Nagel). O ácido gálico foi usado como referência para traçar a reta de calibração (0,01-0,4 mM), sendo os resultados expressos em miligramas de ácido gálico por grama de extrato.

3.4.2.2. Efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH

A capacidade para bloquear os radicais livres de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi determinada com base no descrito por Hatano *et al.*⁵⁶ Para o efeito misturaram-se 0,3 ml das várias concentrações de extrato de cada amostra com 2,7 ml de uma solução metanólica contendo radicais de DPPH (6×10^{-5} M). A concentração da solução mãe de extrato metanólico foi de 50 mg/ml. A mistura foi agitada vigorosamente no vortéx e deixada em repouso no escuro durante 60 minutos até se obterem valores de absorvância estáveis. A redução do radical de DPPH foi medida pela

monitorização contínua do decréscimo da absorvância a 517 nm. O efeito bloqueador do DPPH foi calculado como uma percentagem da descoloração do DPPH, usando a seguinte equação:

$$\% \text{ Efeito bloqueador} = \frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{A}}}{A_{\text{DPPH}}} \times 100$$

em que A_{A} corresponde à absorvância da solução com extrato de amostra e A_{DPPH} à absorvância da solução de DPPH. A concentração de extrato a que corresponde 50% de inibição (EC_{50}) foi calculada a partir da representação gráfica da percentagem do efeito bloqueador em função da concentração de extrato.

3.4.2.3. Determinação do poder redutor

O poder redutor foi determinado de acordo com o método descrito por Oyaizu, com algumas modificações.⁵⁷ Assim, 1 ml das diferentes concentrações de extrato metanólico de cada amostra foi adicionado a 2,5 ml de solução de fosfato de sódio pH 6,6 e 2,5 ml de ferricianeto de potássio a 1%. A concentração da solução mãe de extrato metanólico foi de 50 mg/ml. A mistura foi agitada vigorosamente e incubada a 50 °C durante 20 minutos. Após este período, foram adicionados 2,5 ml de ácido tricloroacético a 10%, levando-se de novo a agitar. Desta mistura retiraram-se 2,5 ml de sobrenadante, sendo estes misturados com 2,5 ml de água destilada e 0,5 ml de cloreto férrico a 0,1%. As absorvâncias foram lidas a 700 nm, após um período de 2 minutos.

A concentração de extrato correspondente a 0,5 de absorvância e denominada por EC_{50} foi calculada a partir da representação gráfica da absorvância registada a 700 nm em função da concentração de extrato correspondente.

3.5. Apresentação dos resultados

Todos os ensaios relativos à caracterização físico-química das sementes de colza da cultivar Hydromel foram realizados em duplicado, assim como as extrações que conduziram à obtenção dos extratos utilizados nos ensaios da atividade antioxidante. Relativamente às metodologias utilizadas para a avaliação da atividade antioxidante, estas foram realizadas em triplicado.

Os resultados apresentam-se em termos de média e desvio padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Composição química das sementes de colza

A fim de caracterizar os efeitos exercidos pelas diferentes doses de adubação azotada na composição química das sementes de colza da cultivar Hydromel, foram estudados os seguintes parâmetros: humidade, proteína, cinzas, gordura e fibras: fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido. Já os hidratos de carbono e o valor energético das amostras de colza foram calculados com base nos resultados obtidos nos parâmetros descritos anteriormente. Os resultados obtidos para as diferentes doses de adubação azotada são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Composição química das sementes de colza da cultivar Hydromel para as diferentes doses de adubação azotada (média \pm desvio padrão).

	N ₀	N ₅₀	N ₁₅₀
Humidade (%)	4,64 \pm 0,04	4,78 \pm 0,09	4,54 \pm 0,25
Cinzas (%)	4,10 \pm 0,10	4,21 \pm 0,10	3,95 \pm 0,05
Proteína (%)	13,93 \pm 0,42	15,74 \pm 0,15	17,08 \pm 0,65
Gordura (%)	47,36 \pm 0,61	45,78 \pm 0,51	44,62 \pm 0,89
Hidratos de carbono (%)	29,97 \pm 1,83	29,49 \pm 1,34	29,81 \pm 2,78
Energia (kcal/ 100g de sementes)	601,8	592,9	589,1
NDF (% m.s.)	34,81 \pm 1,68	34,47 \pm 1,69	34,06 \pm 1,08
ADF (% m.s.)	31,08 \pm 3,76	27,38 \pm 2,81	25,45 \pm 2,84
ADL (% m.s.)	18,01 \pm 3,37	16,57 \pm 1,44	13,24 \pm 1,76
Celulose (% m.s)	13,07	10,81	12,21
Hemicelulose (% m.s.)	3,73	7,09	8,61

Analisando a tabela 2, podemos verificar que os valores do teor em humidade foram muito similares em todas as amostras, variando entre 4,54 e 4,78 %, respetivamente, na amostra N₁₅₀ e na amostra N₅₀. Um estudo efetuado a sete cultivares

de colza de inverno de *Brassica napus* evidenciaram teores em humidade superiores (6,6-8,5%) relativamente à cultivar em estudo neste trabalho.⁵ De acordo com a literatura, o teor em humidade da cultivar canadiana Tower e das cultivares germânicas Egra e Erglu, apresentam valores superiores (4,88-5,60%) à cultivar Hydromel.⁵⁸

O teor em cinzas também não apresentou variações significativas nas amostras testadas, de 3,95 a 4,21 %. Tendo em conta a literatura referida anteriormente, verifica-se que o teor em cinzas da cultivar canadiana Tower e das cultivares germânicas Egra e Erglu apresentam valores inferiores (3,29-3,62%) à cultivar Hydromel.⁵⁸

A proteína é um dos constituintes maioritários e o seu teor variou nas diferentes amostras estudadas. A amostra N₀ apresentou o valor mais baixo de proteína (13,93%), seguindo-se da amostra N₅₀ (15,74%) e por fim, a amostra N₁₅₀ (17,08%), apresentou o valor mais elevado de proteína na sua constituição. Este facto deve-se sobretudo à diferente dose de fertilização azotada efetuada nas diferentes amostras, tendo em conta que a amostra N₀ não teve fertilização, a amostra N₅₀ usufruiu de uma fertilização de 50 kg de azoto por hectare e por fim, a amostra N₁₅₀ teve uma fertilização máxima de 150 kg de azoto por hectare. Deste modo, verifica-se que à medida que a dose de fertilização azotada aumentou nas amostras, maior foi o seu teor em proteína. Com base num estudo efectuado a duas variedades de colza de verão, Tower e Lirawell, verificou-se que os teores em proteína aumentam à medida que a fertilização azotada aumentou, corroborando os resultados obtidos no presente estudo.¹⁶ Um estudo envolvendo diferentes cultivares de colza (*Brassica napus*), relatou teores de proteína superiores para todas as cultivares estudadas (21,43-27,01%) relativamente à cultivar Hydromel.⁵⁹

A gordura é o componente maioritário em todas as amostras de colza da cultivar Hydromel. A amostra N₀ apresentou na sua composição a maior quantidade de gordura com 47,36%, seguido da amostra N₅₀ (45,78%) e por fim, a amostra N₁₅₀ (44,62%). Sendo a colza uma planta oleaginosa é importante comparar os resultados obtidos relativos ao teor de gordura com outro tipo de oleaginosas, tais como: soja, girassol e milho. Com base num estudo efetuado a três amostras de soja (*Glycine max* (L) Merr) verificou-se que estas apresentaram valores para o teor de gordura entre 19,5-22,3%.⁶⁰ Por sua vez, a literatura estudada aponta valores para o teor de gordura entre 22,8-39,5% para culturas de girassol (*Helianthus petiolaris*) cultivadas no Canadá e nos

Estados Unidos da América.⁶¹ Um outro estudo realizado a variedades híbridas de milho apresentou valores para o teor de gordura entre 2,40-5,14%.⁶² Tendo em conta os valores obtidos para o teor de gordura nos diferentes estudos para outras oleaginosas (soja, girassol e milho) verifica-se que a colza contém maior teor em gordura que estas oleaginosas, demonstrando ser uma mais-valia para a produção de óleo. Tendo em conta a diferente dose de fertilização das amostras verifica-se que quanto maior a dose aplicada de fertilização azotada, menor teor de gordura apresenta a amostra. Este facto é corroborado com um estudo efetuado a duas cultivares de colza de verão, Tower e Lirawell, que demonstraram ter o mesmo comportamento que a cultivar em estudo quando sujeitas a diferentes doses de fertilização azotada, ou seja, à medida que a fertilização azotada aumenta, o teor de gordura extraído das amostras é menor.¹⁶ Por outro lado, um outro estudo efetuado a uma variedade de colza de inverno (*Honk*) revela resultados contraditórios com os resultados alcançados no nosso estudo, dado que evidencia que à medida que a dose de fertilização aumenta, o teor de gordura extraído é maior até uma fertilização de 100 kg de azoto por hectare.¹⁵ Outro estudo realizado em diferentes tipos de colza revelou que o teor em gordura varia consoante a cultivar. A cultivar Hydromel relativamente a estas demonstrou um teor em gordura superior às cultivares estudadas no referente estudo, tanto para as amostras sem fertilização, como para as amostras com uma fertilização de 50 kg de azoto por hectare.⁵⁹

Analisando os valores obtidos para os teores de gordura e de proteína, verifica-se que quanto maior o nível de fertilização, menor o teor em gordura e maior o teor em proteína. Tendo em conta estes dados e sabendo ainda que a produtividade de sementes em termos de matéria seca aumenta à medida que o nível de fertilização aumenta (2059 kg/ha para N₀, 2931 kg/ha para N₅₀ e 4534 kg/ha para N₁₅₀),⁴² podemos concluir que o aumento de produtividade com o aumento do nível de fertilização leva a que haja um aumento generalizado dos teores de proteína e de gordura, fatores importantes a ter em consideração na produção agrícola em grande escala.

Os valores do teor em hidratos de carbono de todas as amostras N₀, N₅₀ e N₁₅₀ foram semelhantes, variando entre 29,49-29,97%.

Os valores energéticos obtidos para as amostras N₀, N₅₀ e N₁₅₀ foram 601,8 kcal, 592,9 kcal e 589,1 kcal, respetivamente. Observando os resultados obtidos verifica-se

que a amostra com maior valor energético foi a amostra N₀, a qual tem na sua composição um maior teor em gordura.

A fibra em detergente neutro e a fibra em detergente ácido foram calculados tendo em conta a percentagem em matéria seca nas respetivas amostras.

Os valores obtidos para a fibra em detergente neutro nas diferentes amostras foram muito similares (34,06-34,81%). De acordo com um estudo elaborado a vários alimentos, incluindo a casca de colza, esta apresentou valores de fibra em detergente neutro de 30,66%.⁵⁰ Tendo em conta este facto, pode-se referir que a maior quantidade de fibra em detergente neutro apresenta-se na casca, visto que a nossa amostra era constituída pela semente inteira, e esta apresentou apenas mais cerca de 4% de fibra em detergente neutro do que na casca. Sabendo que a NDF tem correlação com o consumo, e que quanto menor a NDF, maior o consumo da matéria seca, verifica-se que todas as amostras de colza têm valores idênticos para este parâmetro, logo não se pode concluir que as diferentes doses de azoto aplicadas interfiram no consumo da matéria seca.

Os valores relativos à fibra em detergente ácido variaram nas diferentes amostras N₀, N₅₀ e N₁₅₀ e foram, respetivamente, 31,08%, 27,38% e 25,45%. Analisando os resultados verifica-se que à medida que a dose de fertilização aumenta, menores são os valores obtidos para este tipo de fibra. De acordo com o estudo referido anteriormente, o valor obtido para a fibra em detergente ácido foi de 28,75%, sendo este um valor intermédio ao obtido para as amostras com uma fertilização de 0 kg (N₀) e 50 kg (N₅₀) de azoto por hectare.⁵⁰ Tendo em conta que a ADF indica o valor energético da silagem, ou seja, quanto menor a ADF maior o valor energético, verifica-se que a amostra N₁₅₀ apresenta o menor valor de ADF o que indica que apresenta o maior valor energético comparativamente às restantes amostras. Por outro lado, a amostra N₀ apresenta o maior valor de ADF, logo tem o menor valor energético. Em suma, verificou-se que com o aumento da adubação azotada nas amostras, menor é o valor de ADF e consequentemente maior é o valor energético que, por sua vez, indica maior digestibilidade.

A quantidade de lenhina em detergente ácido variou nas diferentes amostras. A amostra N₀ apresentou a maior quantidade de lenhina com 18,01%, seguida da amostra

N₅₀ (16,57%), e por fim, a amostra N₁₅₀ (13,24%). Analisando os resultados obtidos verifica-se que à medida que a adubação azotada aumenta, menor é o teor de lenhina nas amostras. A lenhina surge como a fracção da fibra menos digestível do alimento, ou seja, quanto menor o teor de lenhina no alimento mais digestível este se torna. Portanto, a amostra N₁₅₀ apresenta o menor valor de lenhina, logo é a amostra mais digestível. Este resultado complementa a conclusão alcançada no parâmetro anterior (fibra em detergente ácida), ou seja, quanto menor a ADF e ADL mais digestível é o alimento.

A quantidade de celulose nas amostras N₀, N₅₀ e N₁₅₀ foi de 13,07%, 10,81% e 12,21%, respetivamente.

Os valores de hemicelulose foram de 3,73%, 7,09% e 8,61%, respetivamente, para a amostra N₀, N₅₀ e N₁₅₀.

4.1.1. Composição em ácidos gordos por cromatografia gasosa

A composição em ácidos gordos das amostras de colza (N₀, N₅₀ e N₁₅₀) da cultivar Hydromel foi analisada e os respetivos perfis são apresentados na tabela 3.

Com a análise do perfil em ácidos gordos das diferentes amostras de colza observa-se que estas são constituídas maioritariamente pelo ácido gordo oleico (C18:1). A amostra N₀ surge com o valor mais elevado em ácido oleico (59,76%), seguindo-se a amostra N₅₀ (58,82%) e, por fim, a amostra N₁₅₀ (57,75%). O ácido linoleico (C18:2) surge como o segundo maior constituinte no perfil em ácidos gordos das amostras de colza, seguindo-se o ácido linolénico (C18:3). Os valores encontrados para o ácido gordo linoleico (C18:2) nas amostras de colza situam-se entre os 22,18% para a amostra N₀ e os 23,28% para a amostra N₁₅₀, revelando valores um pouco acima dos referidos na literatura para óleos de colza (18-22%).⁵ Já os valores obtidos para o ácido gordo linolénico encontram-se de acordo com a literatura (9-13%), dado que as amostras N₀, N₅₀ e N₁₅₀ apresentaram valores de 9,14%, 10,07% e 10,88%, respetivamente.⁵ A amostra N₁₅₀ apresenta maior quantidade de ácido gordo linoleico (C18:2) e linolénico (C18:3), respetivamente, 23,28% e 10,88%, quando comparado com os teores obtidos para as amostras N₀ e N₅₀. Já, por outro lado, a amostra N₀ apresentou o teor mais elevado de ácido oleico, sendo seguida da amostra N₅₀ e, por fim, a amostra N₁₅₀.

Tabela 3. Composição em ácidos gordos das sementes de colza da cultivar Hydromel com diferentes doses de adubação azotada (média \pm desvio padrão).

Ácido Gordo	Estrutura	N₀	N₅₀	N₁₅₀
Cáprico	C10:0	0,01 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00
Láurico	C12:0	0,01 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00
Mirístico	C14:0	0,04 \pm 0,00	0,04 \pm 0,00	0,04 \pm 0,00
Pentadecanóico	C15:0	0,02 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00
Palmítico	C16:0	4,40 \pm 0,22	4,54 \pm 0,03	4,50 \pm 0,03
Palmitoléico	C16:1	0,15 \pm 0,01	0,17 \pm 0,00	0,18 \pm 0,01
Margárico	C17:0	0,04 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00
Esteárico	C18:0	1,35 \pm 0,15	1,38 \pm 0,01	1,30 \pm 0,02
Oleico	C18:1 (c+t)	59,76 \pm 0,52	58,82 \pm 0,25	57,75 \pm 0,44
Linoleico	C18:2	22,18 \pm 0,63	22,97 \pm 0,10	23,28 \pm 0,23
Linolénico	C18:3	9,14 \pm 0,12	10,07 \pm 0,24	10,88 \pm 0,18
Araquídico	C20:0	0,52 \pm 0,07	0,45 \pm 0,00	0,45 \pm 0,01
Eicosenóico (gadoleico)	C20:1	1,21 \pm 0,16	0,99 \pm 0,01	1,02 \pm 0,03
Eicosadienóico	C20:2	0,06 \pm 0,01	0,06 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00
Behénico	C22:0	0,32 \pm 0,08	0,25 \pm 0,01	0,26 \pm 0,01
Erúcido	C22:1	0,58 \pm 0,22	0,01 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00
Lignocérico	C24:0	0,11 \pm 0,04	0,09 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01
Nervónico (tetracosenoico)	C24:1	0,11 \pm 0,03	0,08 \pm 0,00	0,09 \pm 0,00
AG saturados		6,82 \pm 0,29	6,83 \pm 0,04	6,73 \pm 0,06
AG monoinsaturados		61,81 \pm 0,59	60,07 \pm 0,35	59,05 \pm 0,62
AG polinsaturados		31,37 \pm 0,64	33,10 \pm 0,37	34,22 \pm 0,41

Tendo em conta estes resultados verifica-se que à medida que a dose de adubação azotada aumenta, o teor em ácido oleico diminui, enquanto o teor em ácido linoleico e linolénico aumenta. Segundo a literatura, a proporção atualmente aceite de ácido gordo linoleico ómega-6 (18-22%) e ácido gordo linolénico ómega-3 (9-13%) benéfica para a saúde ocorre na proporção de 2:1 acontecendo nativamente na colza, este facto confirmou-se nas amostras de colza estudadas.⁵

O teor de ácido cáprico (C10:0), láurico (C12:0), mirístico (C14:0), pentadecanóico (C15:0), margárico (C17:0) e eicosadienóico (C20:2) apresenta-se residual nas diferentes amostras (N₀, N₅₀ e N₁₅₀), em que os valores destes ácidos gordos estão compreendidos entre 0,01% para o ácido cáprico e láurico e 0,06% para o ácido eicosadienóico.

Por outro lado, o teor em ácido gordo erúico apresenta um valor de 0,01% na amostra N₅₀ e N₁₅₀, enquanto na amostra N₀ apresenta um valor de 0,58%, sendo este 50 vezes superior ao valor encontrado nas restantes amostras. Dado tal discrepância de valor, no decorrer do trabalho laboratorial decidiu-se proceder à repetição dos ensaios relativos à amostra N₀, ou seja, realizou-se uma nova extração, em que se utilizou os novos extratos para fazer novas transesterificações dos ácidos gordos para posterior análise no cromatógrafo gasoso. Os resultados obtidos para o perfil em ácidos gordos da amostra N₀ relativos a estes novos ensaios foram em tudo semelhantes aos resultados obtidos nos primeiros ensaios efetuados. Por este facto, pode-se concluir que a amostra N₀ apresenta na sua constituição maior teor em ácido gordo erúico relativamente à amostra N₅₀ e N₁₅₀. Parece que a fertilização azotada reduz o teor em ácido erúico, eventualmente por este aparecer em maior concentração em situações de *stress* nutritivo (limitação do nutriente).

Os ácidos gordos podem ser classificados em saturados, monoinsaturados e polinsaturados, correspondendo a diferentes frações nutricionais dos ácidos gordos. A fração ácidos gordos mais abundante nas amostras de colza foi a fração dos ácidos gordos monoinsaturados, em que as amostras N₀, N₅₀ e N₁₅₀ obtiveram valores de 61,81%, 60,07% e 59,05%, respetivamente. De entre os ácidos gordos monoinsaturados, aquele que predominou em todas as amostras foi o ácido oleico (C18:1), como já tinha sido referido anteriormente. Por outro lado, o ácido erúico (C22:1) foi o ácido gordo monoinsaturado que apresentou menor quantidade nas amostras (0,01%), exceto na amostra N₀ em que o seu valor foi de 0,58%.

As amostras de colza apresentaram baixo teor em ácidos gordos saturados (6,73-6,83%), enquanto os ácidos gordos polinsaturados apresentaram valores superiores entre 31,37±0,64% (amostra N₀) e 34,22±0,41% (amostra N₁₅₀). Entre os ácidos gordos saturados, o ácido gordo que apresentou maior percentagem em todas as amostras foi o ácido palmítico (C16:0), enquanto o ácido cáprico (C10:0) e láurico (C12:0) apresentaram menor percentagem nos ácidos saturados. Quanto aos ácidos gordos polinsaturados, o ácido gordo que predominou neste grupo foi o ácido linoleico (C18:2). Por outro lado, o ácido eicosadienóico (C20:2) foi o ácido gordo polinsaturado que apresentou menor quantidade nas amostras. Relativamente ao conteúdo em ácidos gordos saturados e monoinsaturados foi decrescente da amostra N₀ até à amostra N₁₅₀. Já o conteúdo em ácidos gordos polinsaturados apresentou o inverso, em que a amostra N₁₅₀ teve a maior quantidade, seguindo-se da amostra N₅₀ e por fim, a amostra N₀.

Estudos da literatura sobre *Brassicacae* indicam que os valores de ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) e linolénico (C18:3) variam da seguinte forma: 10,7-72,0%, 12,0-29,0% e 2,4-18,3%, respetivamente.¹⁷ Assim, os valores obtidos neste trabalho sobre a colza da cultivar Hydromel encontram-se de acordo com o referido na literatura.

Outros autores referem que a quantidade de ácidos gordos monoinsaturados diminui se a quantidade em ácido erúico aumentar. A cultivar estudada (Hydromel) neste trabalho contém baixas quantidades de ácido erúico (0,01-0,58%), assim, o seu conteúdo em ácidos gordos monoinsaturados é relativamente alto (59-60%).¹⁷

Segundo um estudo elaborado a diferentes cultivares de colza, as percentagens de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados obtidas foram de 4,54-5,95%, 64,62-72,53% e 22,12-28,94%, respetivamente.⁵⁹ Analisando estes valores verifica-se que a cultivar Hydromel apresenta valores superiores de ácidos gordos saturados (6,73-6,83%) e ácidos gordos polinsaturados (31,37-34,22%), mas por outro lado, apresenta menores valores de ácidos gordos monoinsaturados (59,05-61,81%). Um estudo sobre as variações da composição em ácidos gordos de 5 cultivares de colza demonstrou que o ácido oleico predomina em maior quantidade em todas as cultivares, embora com percentagens diferentes (entre 56-58%). Comparando com a cultivar Hydromel, apenas a amostra N₀ apresentou um teor em ácido oleico superior às cultivares referidas nesse estudo (59,76%). Por outro lado, o ácido linoleico nas diferentes cultivares do estudo apresenta teores muito inferiores (10-13%) relativamente à cultivar Hydromel (22-23%). Já o ácido esteárico apresenta teores superiores nas 5

cultivares (11-14%) comparativamente cultivar por nós ensaiada (1,30-1,38%). O ácido erúxico varia de 0,15-0,91% nas 5 cultivares desse estudo, apenas a amostra N₀ está entre estes valores (0,58%), enquanto a amostra N₅₀ e N₁₅₀ apresentam teores muito inferiores (0,01%).¹¹

Como já foi referido anteriormente, a literatura refere que a composição em ácidos gordos varia com o tipo de cultivar e com as condições ambientais em que esta está inserida, sendo comprovado igualmente pela cultivar em estudo.¹⁸

Diferentes estudos elaborados a outras plantas oleaginosas, tais como girassol, milho e sésamo, apresentaram teores em ácido oleico de 15-33%, 18,7-35,2% e 37-42%, respetivamente. Os resultados obtidos para estas plantas oleaginosas evidenciam que a cultivar de colza em estudo tem maior teor em ácido oleico (57,75-59,76%).⁶¹⁻⁶³

A título exemplificativo, abaixo é apresentado o perfil em ácidos gordos da amostra de colza com nível de fertilização N₁₅₀ (figura 6).

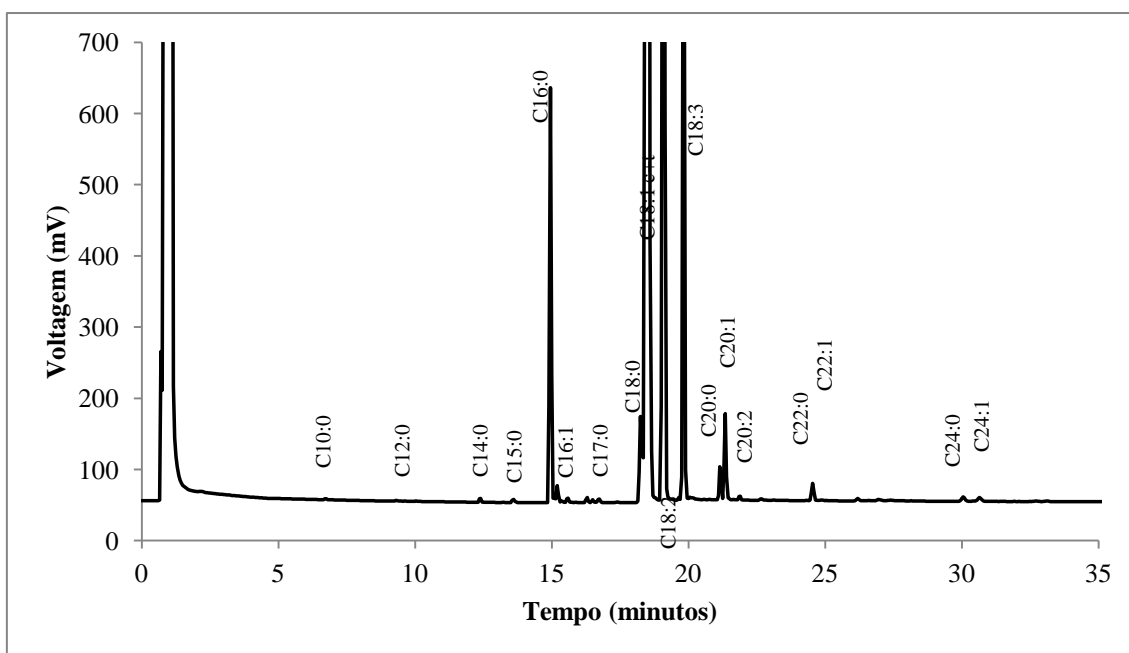


Figura 6. Perfil em ácidos gordos da amostra de colza com nível de fertilização N₁₅₀ obtido por GC/FID.

4.1.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Uma análise cuidadosa e exaustiva de todos os espectros mono e bidimensionais das amostras de colza permitiu concluir que estas são constituídas maioritariamente pelo triglicerídeo representado na estrutura seguinte, havendo no entanto outros picos correspondentes a compostos minoritários.

Analisando a figura 7 podemos verificar que os ácidos gordos predominantes na amostra são o ácido gordo oleico e linoleico, em que existem dois resíduos de ácido oleico por cada resíduo de ácido linoleico. Assim, os dados obtidos por GC são corroborados pelo RMN.

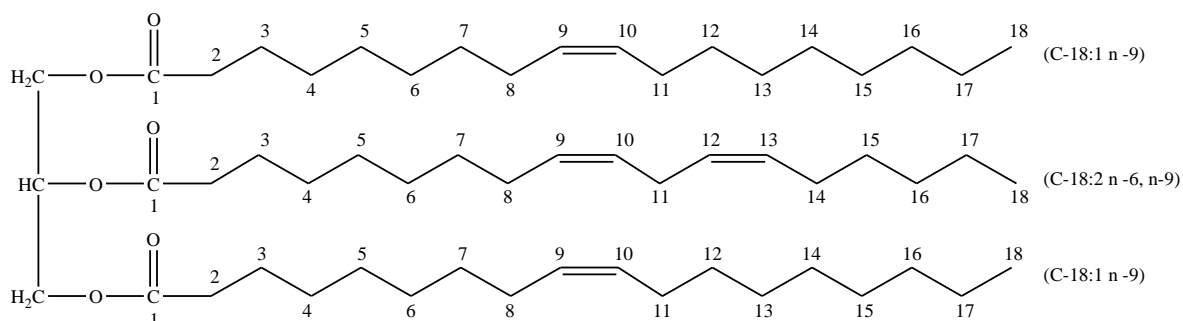


Figura 7. Estrutura do triglicerídeo maioritário presente nas amostras de colza.

Faz-se de seguida a caracterização por RMN de ¹H (figuras 8 e 9) da amostra de colza com o nível de fertilização superior (N₁₅₀).

RMN de ¹H: δ = 0,86-0,91 (m, 9H, H-18); 1,26-1,30 [m, 54H, 2x (H-4,5,6,7,12,13,14,15,16,17 dos ácidos oleicos) e H-4,5,6,7,15,16,17 do ácido linoleico]; 1,57-1,65 (m, 6H, H-3); 1,98-2,10 [m, 12H, 2x (H-8 e H-11 dos ácidos oleicos) e H-8,14 do ácido linoleico]; 2,28-2,33 (m, 6H, H-2); 2,75-2,82 (m, 2H, H-11 do ácido linoleico); 4,14 (dd, 2H, *J* 11,9 e 5,9 Hz, CH₂ do glicerol); 4,30 (dd, 2H, *J* 11,9 e 4,3 Hz, CH₂ do glicerol); 5,25-5,41 (m, 9H, CH do glicerol e 4x CH=CH).

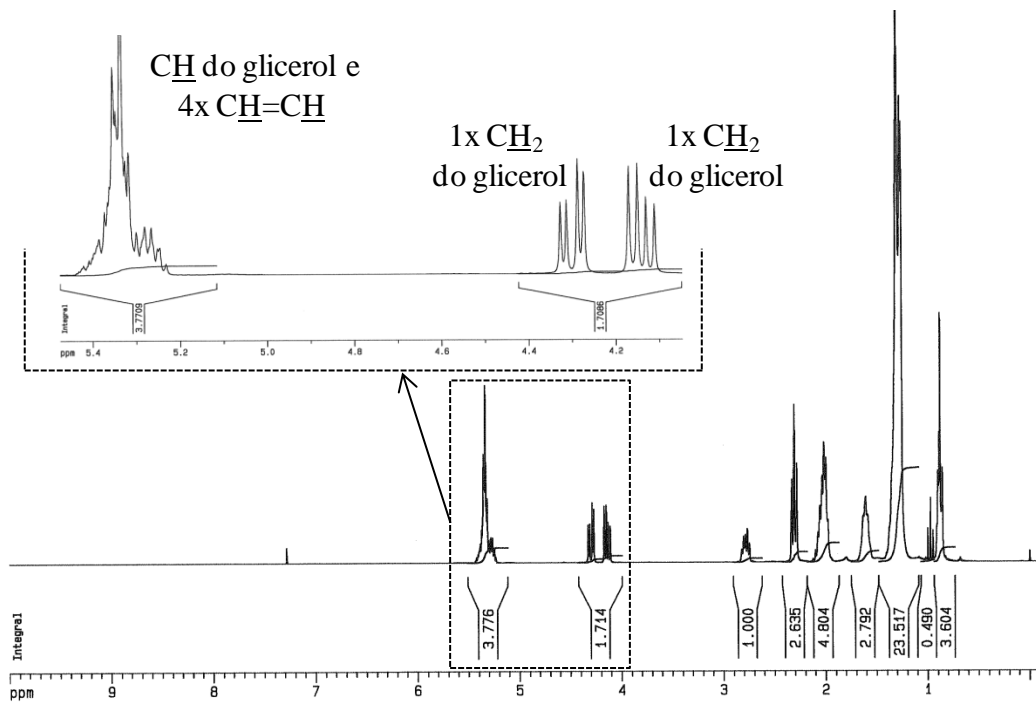


Figura 8. Espectro de RMN de ^1H da amostra de colza com nível de fertilização N_{150} .

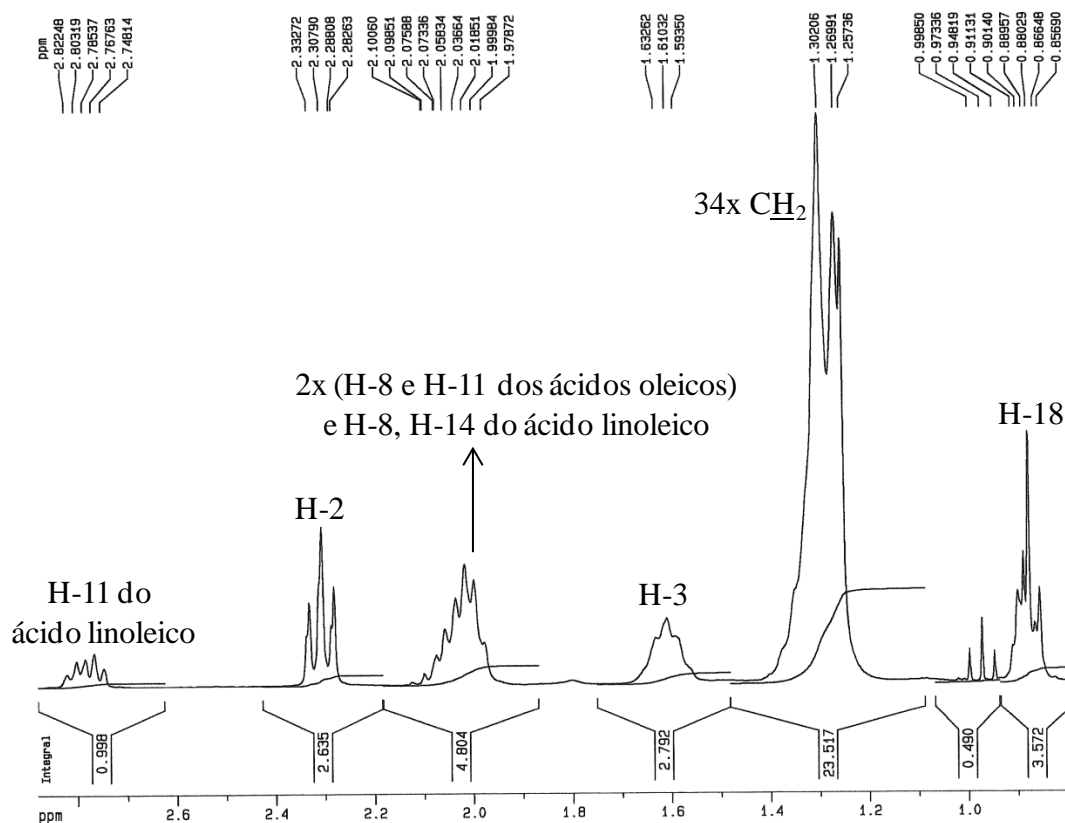


Figura 9. Expansão da parte alifática (0-3 ppm) do espectro de RMN de ^1H da amostra de colza com o nível de fertilização N_{150} .

A caracterização por RMN de ^{13}C (figuras 10 e 11) apresenta as seguintes ressonâncias:

RMN de ^{13}C : $\delta = 14,0$ (3x C-18); 22,5 (C-17 do ácido linoleico); 22,6 (2x C-17 dos ácidos oleico); 24,74 (2x C-3 dos ácidos oleicos); 24,77 (C-3 do ácido linoleico); 25,5 (C-11 do ácido linoleico); 27,07 e 27,12 (C-8 e C-11 dos ácidos oleicos e C-8 e C-14 do ácido linoleico); 28,95; 28,99; 29,02; 29,09; 29,24; 29,45; 29,53; 29,6 e 29,7 (2x C-4,5,6,7,12,13,14,15 dos ácidos oleicos) e C-4,5,6,7,15 do ácido linoleico); 31,4 (C-16 do ácido linoleico), 31,8 (2x C-16 dos ácidos oleicos), 33,9 (2x C-2 dos ácidos oleicos); 34,1 (C-2 do ácido linoleico); 62,0 (2x CH_2 do glicerol); 68,8 (CH do glicerol); 129,55; 129,58; 129,8; 129,9; 130,1 (4x $\text{CH}=\text{CH}$); 172,7 (C=O do ácido linoleico); 173,1 (2x C=O dos ácidos oleicos).

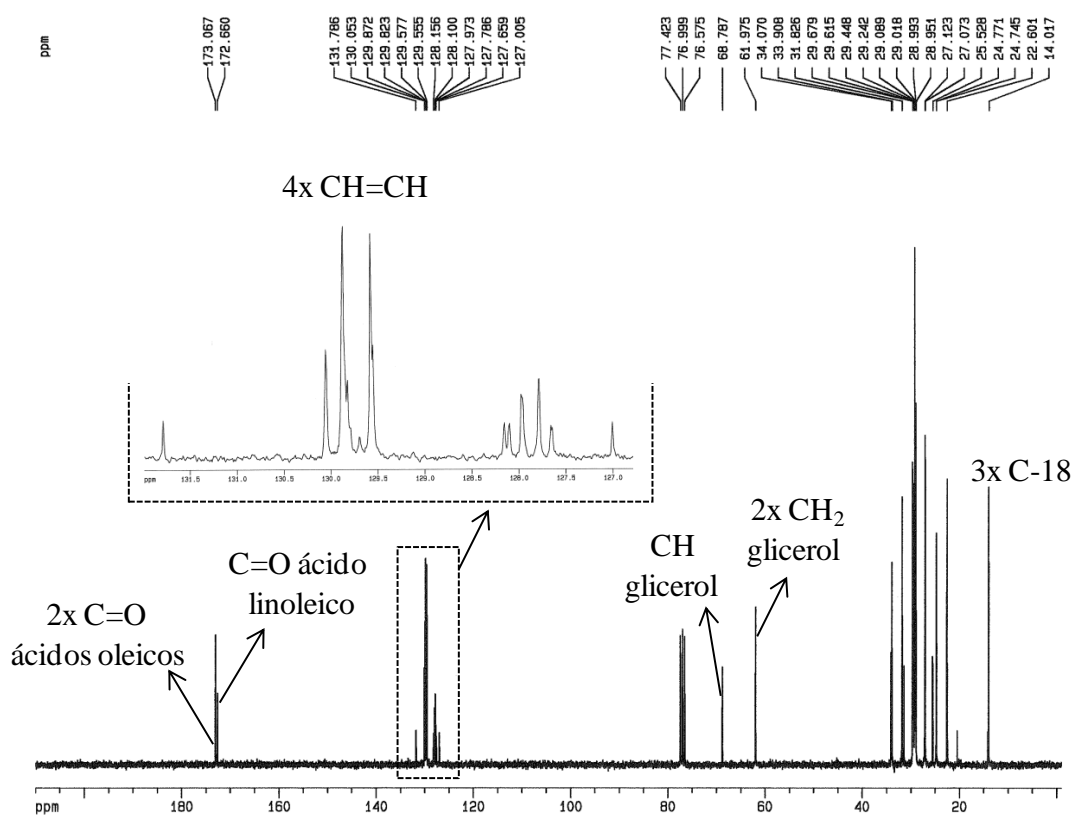


Figura 10. Espectro de RMN de ^{13}C da amostra de colza com o nível de fertilização N_{150} .

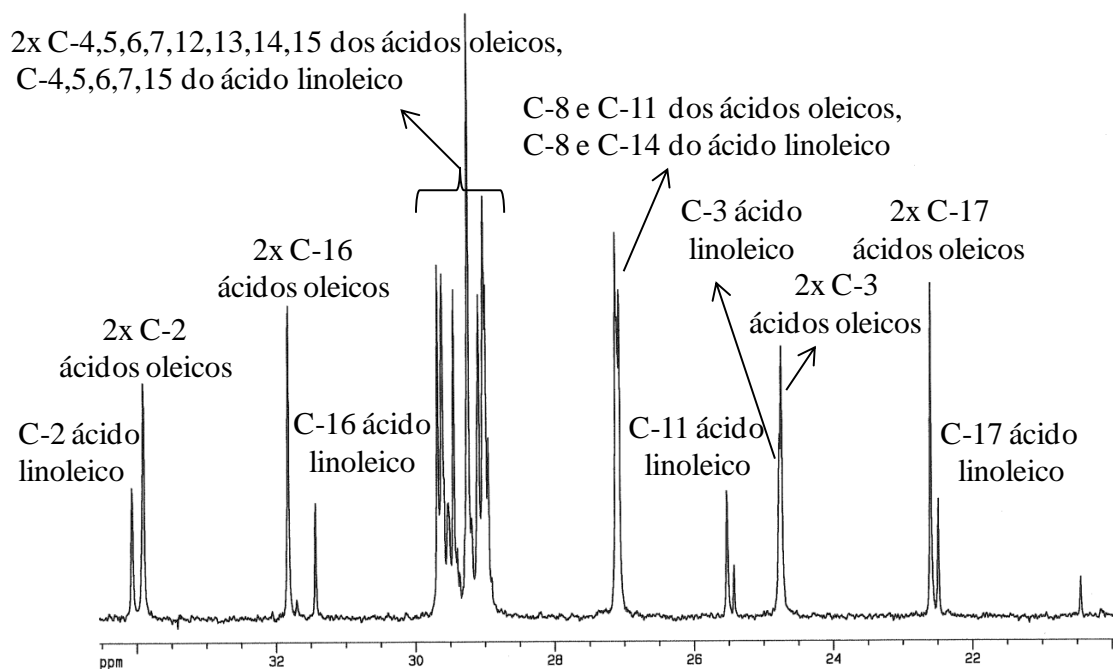


Figura 11. Expansão da parte alifática (20-35 ppm) do espectro de RMN de ^{13}C da amostra de colza com o nível de fertilização N_{150} .

Para completar a discussão da caracterização por RMN faz-se uma breve descrição de como as diferentes técnicas mono e bidimensionais auxiliaram na identificação da estrutura do triglicerídeo maioritário.

Através do espectro de RMN de ^{13}C é possível identificar inequivocamente a presença de pelo menos 2 carbonos carbonílicos, a $\delta = 172,7$ e $173,1$ ppm. Pela análise do espectro que HMBC (figura 12) pode-se verificar a correlação dos carbonos carbonílicos com 5 tipos de prótons diferentes sendo os mais importantes para o esclarecimento da estrutura os dois sinais em forma de duplos dupletos a $\delta = 4,14$ e $4,30$ ppm e de multiplete a cerca de $2,3$ ppm, indicativo de prótons metilénicos (CH_2) adjacentes ao carbono carbonílico.

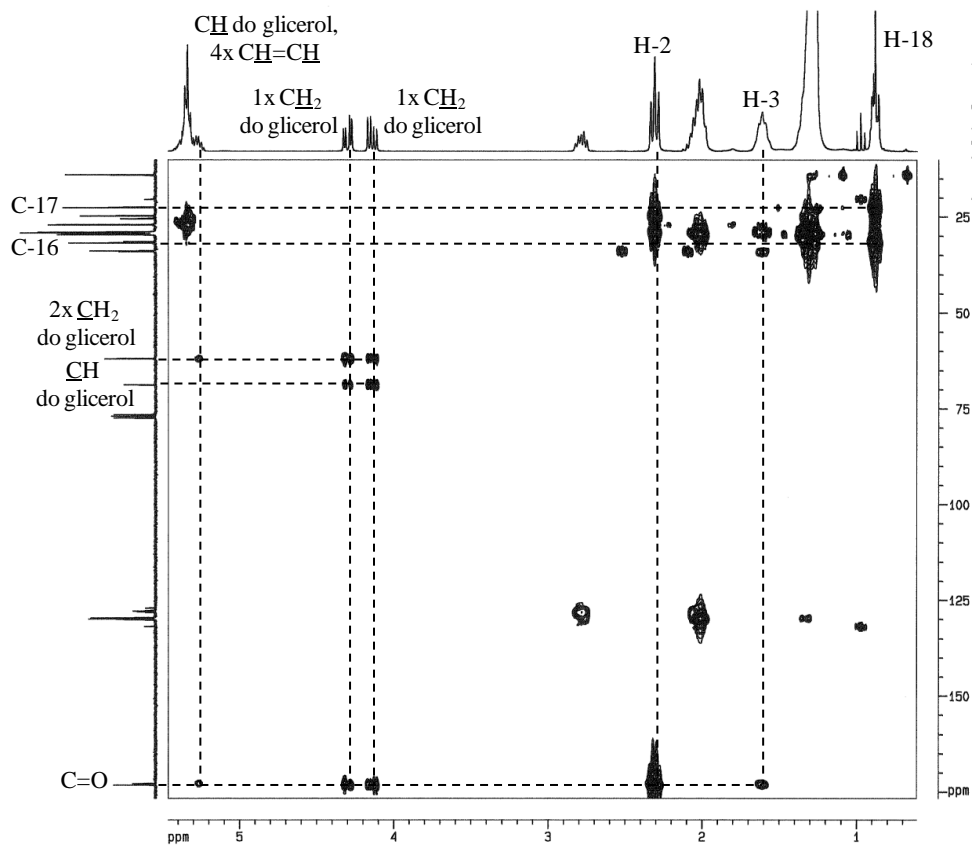


Figura 12. Espectro de HMBC da amostra de colza com o nível de fertilização N₁₅₀.

Seguidamente através do espectro de HSQC (figura 13) verifica-se que os dois sinais em forma de duplos dupletos correlacionam-se com a ressonância de apenas 1 carbono, indicativo que estes prótons estão ligados ao mesmo carbono.

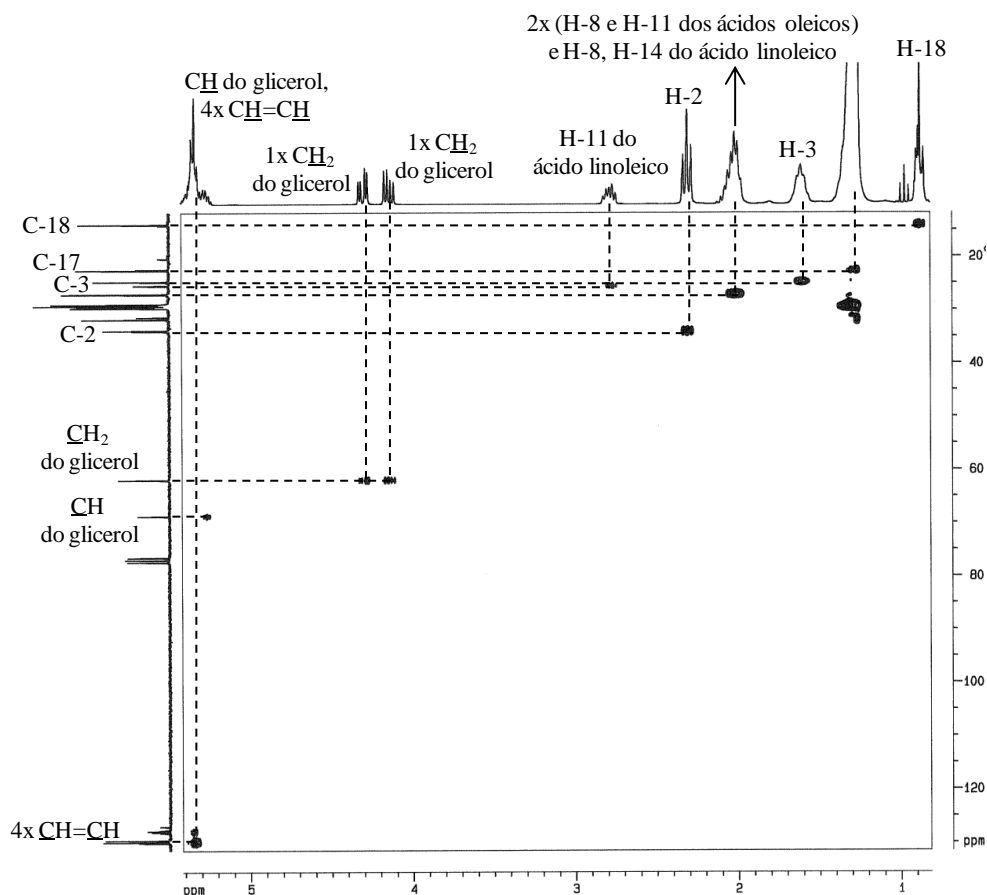


Figura 13. Espectro de HSQC da amostra de colza com o nível de fertilização N₁₅₀.

Analisando o espectro de COSY (figura 14) verifica-se a correlação dos dois dupletos com o sinal dos prótons que surge a cerca de 5 ppm e que estes prótons também apresentam correlação no espectro de HMBC com os carbonos carbonílicos, o que sugere a presença de uma molécula de glicerol esterificada com 3 ácidos gordos. Com estes dados e com o espectro de DEPT-135 (figura 15) consegue-se então identificar inequivocamente o sinal correspondente à ressonância dos carbonos metilénicos (CH₂) do glicerol a $\delta = 62,0$ ppm (sinal negativo no espectro de DEPT-135) e o sinal correspondente à ressonância do carbono metínico (CH) do glicerol a $\delta = 68,8$ ppm (sinal positivo no espectro de DEPT-135). Assim, novamente no espectro de HSQC identifica-se as ressonâncias dos 2 prótons metilénicos (CH₂) do glicerol a $\delta = 4,14$ e $4,30$ ppm e a ressonância do próton metínico (CH) do glicerol a cerca de $5,3$ ppm.

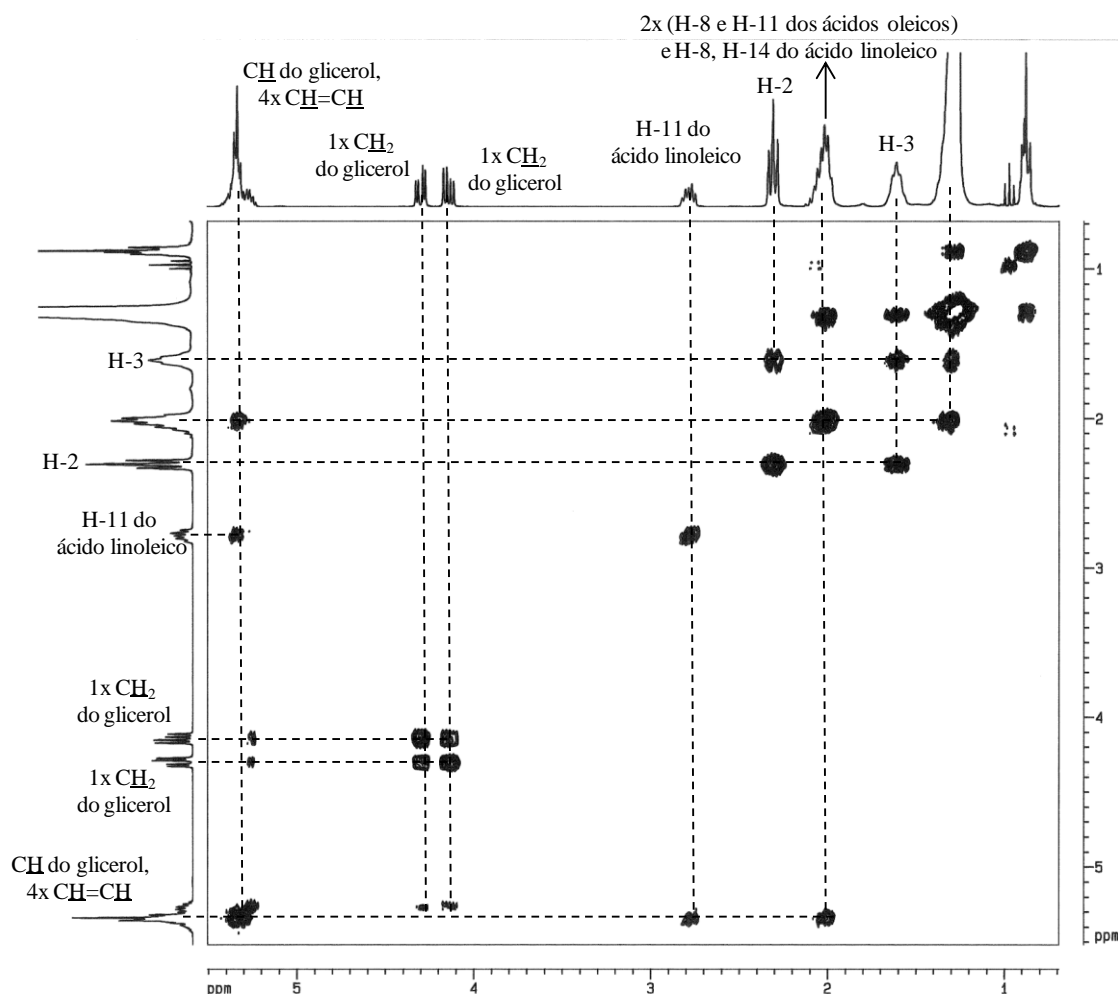


Figura 14. Espectro de COSY da amostra de colza com o nível de fertilização N_{150} .

No espectro de HMBC verifica-se ainda a correlação dos carbonos carbonílicos com o multiplete a cerca de 1,6 ppm o que leva a concluir que se trata da ressonância dos restantes prótons que distam 2 a 3 ligações destes carbonos, ou seja, os prótons da posição 3 dos ácidos gordos.

No espectro de DEPT-135 identifica-se ainda inequivocamente a mais baixos valores de frequência, a ressonância dos carbonos metílicos (CH_3) terminais dos ácidos gordos a $\delta = 14,0$ ppm (sinal positivo no espectro de DEPT-135) e com o auxílio do espectro de HSQC identifica-se a ressonância destes prótons, também a mais baixos valores de frequência ($\delta \approx 0,9$ ppm). No espectro de HMBC e através das correlações dos prótons dos grupos metilos terminais é possível identificar as ressonâncias dos carbonos C-17 {22,5 ppm (C-17 do ácido linoleico), 22,6 ppm (2xC-17 dos ácidos

oleicos)] e C-16 [31,4 ppm (C-16 do ácido linoleico), 31,8 ppm (2xC-16 dos ácidos oleicos)].

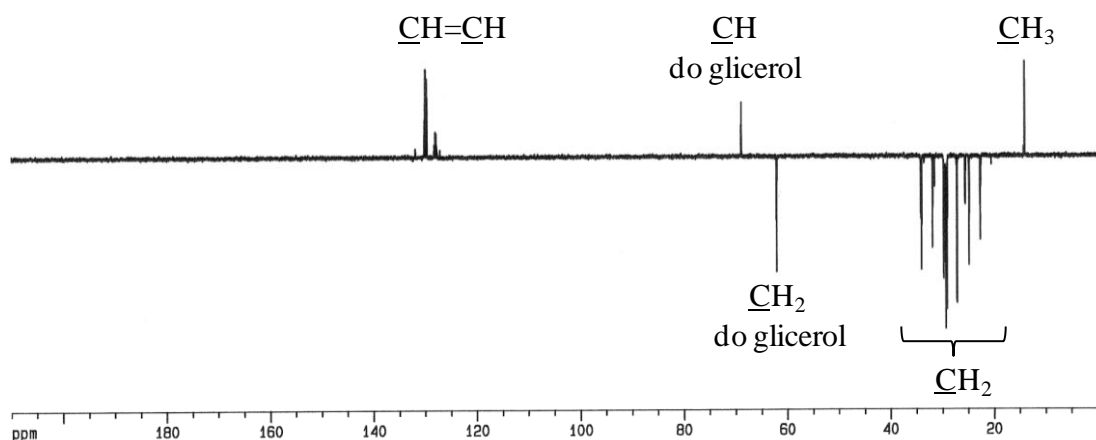


Figura 15. Espectro de DEPT-135 da amostra de colza com o nível de fertilização N₁₅₀.

Através do espectro de RMN de ¹³C pode-se verificar a existência de picos de ressonância a valores entre 127 e 132 ppm, zona onde aparecem os picos correspondentes à ressonância de carbonos vinílicos (carbonos ligados por duplas ligações). Estes assinalamentos foram corroborados pela análise do espectro de DEPT-135 que apresentam sinais positivos nesta região do espectro levando-nos a pensar que os ácidos gordos possuem duplas ligações. No espectro de HSQC verifica-se a correlação dos sinais destes carbonos com o do multipletto a cerca de 5,4 ppm e que correspondem à ressonância de 8 prótons o que leva a concluir que o triglicerídeo possuiu 4 ligações duplas.

Analisando o espectro de COSY observa-se a correlação dos sinais dos prótons das duplas ligações com os dos multipletos a $\delta = 2,0$ ppm correspondente à ressonância de 12 prótons e a $\delta = 2,8$ ppm correspondente a 2 prótons. Estes sinais em forma de multipletos apresentam também correlação no espectro de HMBC com os sinais correspondentes às ressonâncias dos carbonos das ligações duplas, o que indica que estes prótons se encontram ligados a carbonos adjacentes aos carbonos das duplas ligações. Considerando estes dados pode admitir-se que o sinal em forma de multipletto a $\delta = 2,8$ ppm correspondente a 2 prótons é um sinal de um grupo metilénico (CH₂) rodeado de duas duplas ligações e tendo em conta que existem apenas 4 duplas ligações conclui-se que se está na presença de um ácido gordo com duas duplas ligações e dois ácidos gordos com uma dupla ligação.

Sabendo que o teor em ácidos gordos em amostras de colza é constituído essencialmente pelos ácidos oleico (com uma dupla ligação) e linoleico (com duas duplas ligações), concluí-se que a estrutura deste triglicerídeo possui dois resíduos de ácido oleico e um de ácido linoleico. Assim, o multiplete a $\delta = 2,8$ ppm correspondente a 2 protões corresponde à ressonância dos protões CH_2 da posição 11 do ácido linoleico e que o multiplete com 12 protões corresponde à ressonância dos 6 protões CH_2 das posições C-8 dos três ácidos gordos, dos 4 protões CH_2 da posição C-11 dos dois ácidos oleicos e os restantes 2 protões CH_2 da posição C-14 do ácido linoleico.

É de referir que grande parte dos sinais de posições similares foi identificada atendendo à sua intensidade; uma vez que existem 2 resíduos de ácido oleico e dois de ácido linoleico.

Finalmente, os assinalamentos dos restantes protões e carbonos foram efetuados recorrendo às técnicas mono e bidimensionais anteriormente referidas.

4.2. Atividade antioxidante dos extratos de sementes de colza

As condições de extração foram definidas com base a se obter um máximo rendimento de extração, conjugando a temperatura (ambiente ou ebulição) e o tempo que é necessário para alcançar a quantidade máxima de extrato para aplicar as várias metodologias da atividade antioxidante.

As propriedades antioxidantes dos extratos de colza da cultivar Hydromel com diferentes doses de adubação azotada foram avaliadas por diferentes metodologias, designadamente a capacidade redutora total dos extratos pelo método de Folin-Ciocalteu, o método do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH e pelo método do poder redutor.

4.2.1. Rendimentos da otimização das condições de extração

Para a otimização das condições de extração foi utilizada a amostra N₁₅₀, dado que esta amostra se encontrava disponível em maior quantidade em comparação às amostras restantes. Os rendimentos obtidos na otimização das condições de extração com metanol são apresentados nas tabelas 4 e 5.

Na tabela 4 são apresentados os rendimentos obtidos na extração com metanol à temperatura ambiente, com diferentes tempos de extração (24 horas, 24+24 horas e

24+24+24 horas). Analisando os rendimentos obtidos nos diferentes tempos de extração verificou-se que à medida que o tempo de extração aumentava, maior era o rendimento obtido. Optou-se então por o tempo de extração de 24+24+24 horas (rendimento cerca de 21%) e estas condições foram extrapoladas para todas as amostras de colza, obtendo-se assim extrato suficiente para avaliar a sua atividade antioxidante.

Tabela 4. Rendimentos (%) obtidos na otimização da extração com metanol à temperatura ambiente para a amostra N₁₅₀.

Rendimento (%)	
Tempo de extração	N₁₅₀
24 horas	13,02±1,90
24+24 horas	16,04±0,58
24+24+24 horas	21,20±0,29

A tabela 5 traduz os rendimentos alcançados na extração com metanol à temperatura de ebulição, com tempos de extração de 8 e 16 horas. Observando os rendimentos obtidos para ambos os tempos de extração verificou-se que as 8 horas de extração eram suficientes para se obter um rendimento de extrato considerável (cerca de 27%). Com a utilização das 16 horas verificou-se que o rendimento de extração diminuía. O elevado tempo da amostra à temperatura de ebulição do metanol pode ser uma possível explicação para este acontecimento, originando eventuais perdas por evaporação de substâncias do extrato ou por polimerização do mesmo, o que acarretou uma diminuição do rendimento de extração nestas condições. Assim sendo as extrações decorreram por um período de 8 horas com metanol à temperatura de ebulição, para todas as amostras de colza.

Tabela 5. Rendimentos (%) obtidos na otimização da extração com metanol à temperatura de ebulição para a amostra N₁₅₀.

Rendimento (%)	
Tempo de extração	N₁₅₀
8 horas	26,91±0,87
16 horas	17,30±0,28

Na tabela 6 são apresentados os rendimentos obtidos nas extrações com metanol à temperatura ambiente e à temperatura de ebulição das amostras de colza estudadas (N_0 , N_{50} e N_{150}). Nas extrações com metanol à temperatura ambiente, os rendimentos para as amostras N_0 , N_{50} e N_{150} foram de 15,99%, 18,435% e 20,11%, respetivamente. Observando estes resultados verifica-se que os rendimentos de extração aumentam progressivamente da amostra sem fertilização (N_0) para a amostra com fertilização máxima de 150 kg de azoto por hectare (N_{150}). Os rendimentos obtidos na extração com metanol à temperatura de ebulição foram de 27,38%, 26,05% e 24,22% para a amostra N_0 , N_{50} e N_{150} , respetivamente. Analisando os presentes resultados verifica-se que à medida que a dose de adubação azotada aumenta nas amostras, menor é o rendimento de extração obtido. Deste modo, enquanto na extração com metanol à temperatura ambiente, o rendimento de extração aumenta com o aumento da dose de adubação azotada aplicada nas amostras, na extração com metanol à temperatura de ebulição verifica-se o contrário.

Comparando os rendimentos obtidos em ambas as extrações verifica-se que na extração com metanol à temperatura de ebulição se obtém valores mais elevados de rendimento, sendo na amostra N_0 que se alcança o maior valor (27,38%). Já na extração com metanol à temperatura ambiente é a amostra N_{150} que apresenta o maior valor de rendimento (20,11%).

Tabela 6. Rendimentos (%) obtidos nas extrações com metanol à temperatura ambiente e à temperatura de ebulição das amostras de colza da cultivar Hydromel (média \pm desvio padrão).

Amostra	Rendimento (%)	
	t.amb.	t.ebul.
N_0	15,99 \pm 1,00	27,38 \pm 0,93
N_{50}	18,35 \pm 1,32	26,05 \pm 2,88
N_{150}	20,11 \pm 2,31	24,22 \pm 2,98

4.2.2. Capacidade redutora total

A capacidade redutora total foi avaliada pelo método de Folin-Ciocalteu. Este método tem sido vulgarmente usado para avaliar o teor em fenóis totais em diferentes extratos de origem vegetal. O método é rotineiramente utilizado por ser simples, sensível e preciso. Numerosas publicações referem as correlações lineares excelentes entre os fenóis totais determinados pelo presente método e a capacidade antioxidante.²⁸

O teor em fenóis totais é expresso em termos de equivalentes de ácido gálico (GAE). Para ser possível quantificar o teor de fenóis para cada extrato recorreu-se à utilização de retas de calibração elaboradas com diferentes concentrações de ácido gálico (0,01-0,4 mmol/dm³). Apresenta-se de seguida uma reta de calibração de ácido gálico utilizada para o cálculo do teor de fenóis totais num dado extrato (gráfico 2).

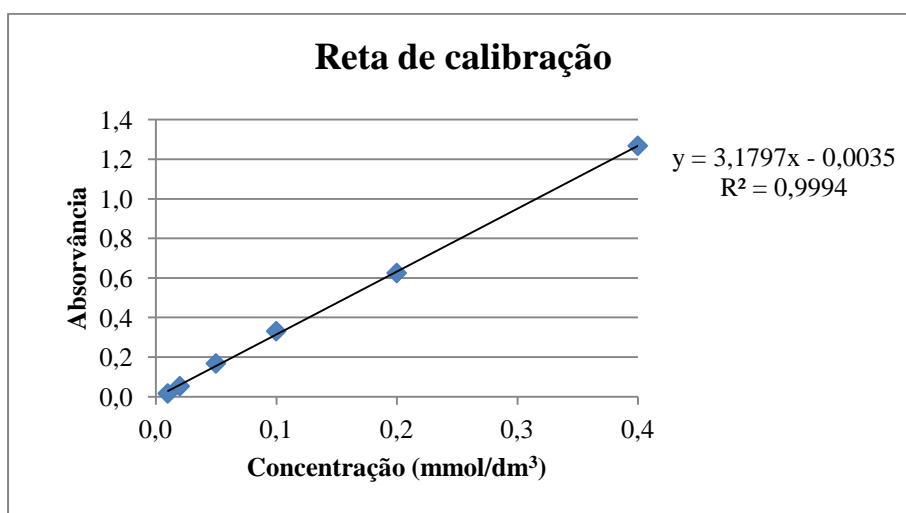
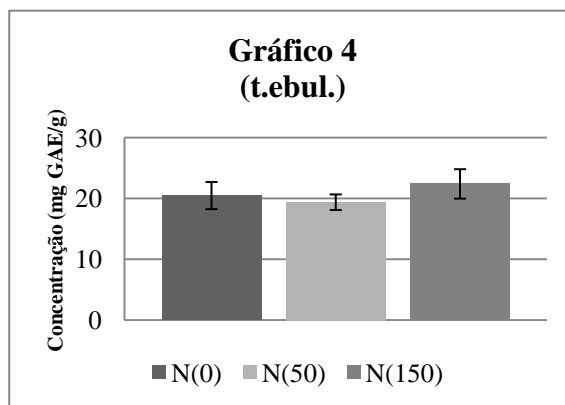
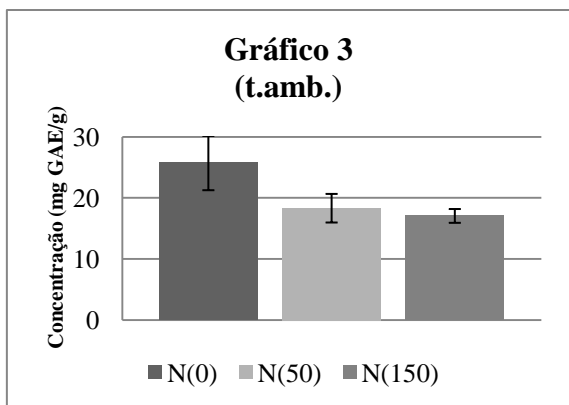


Gráfico 2. Reta de calibração.

Os resultados obtidos em termos médios para a capacidade redutora total na extração à temperatura ambiente (t.amb.) e na extração à temperatura de ebulição (t.ebul.) apresentaram-se nos gráficos 3 e 4, respetivamente.



<p>Gráfico 3. Capacidade redutora total dos extratos de colza, na extração à temperatura ambiente, expressa em média \pm desvio padrão de mg GAE/g de extrato.</p>	<p>Gráfico 4. Capacidade redutora total dos extratos de colza, na extração à temperatura ambiente, expressa em média \pm desvio padrão de mg GAE/g de extrato.</p>
--	--

Na extração à temperatura ambiente, os extratos N₀, N₅₀ e N₁₅₀ apresentaram um teor em fenóis totais de 25,73 mg, 18,34 mg e 17,07 mg GAE/g de extrato, respectivamente. Deste modo verificou-se que existe um decréscimo do teor em fenóis totais à medida que a dose de adubação azotada aumenta.

Na extração à temperatura de ebulição, os valores obtidos para os extratos N₀, N₅₀ e N₁₅₀, não apresentaram tendência linear para as diferentes doses de adubação azotada aplicada, sendo que o extrato N₁₅₀ apresentou um valor de 22,40 mg GAE/g de extrato, enquanto o extrato N₀ (20,48 mg GAE/g de extrato) foi superior ao extrato N₅₀ (19,39 mg GAE/g de extrato).

Tendo em consideração as diferentes temperaturas de extração, os teores de fenóis totais variaram nos diferentes extratos. Assim, na extração à temperatura ambiente, o extrato N₀ apresentou um valor superior de fenóis totais (25,73 mg GAE/g de extrato) quando comparado com o extrato N₀ da extração à temperatura de ebulição (20,48 mg GAE/g de extrato). Quanto aos extratos N₅₀ e N₁₅₀ apresentaram valores superiores na extração à temperatura de ebulição comparativamente aos resultantes alcançados à temperatura ambiente.

Segundo um estudo sobre atividade antioxidante efetuado a diferentes sementes de oleaginosas, incluindo sementes de colza (*Brassica napus*) verificou-se que a quantidade de fenóis totais varia com o tipo de solvente que é usado. Assim, a colza apresentou maior teor em fenóis totais quando o solvente usado foi a água (21,3 mg

GAE/g de extrato). No entanto, quando foi usado metanol a 70%, o teor em fenóis totais decresceu consideravelmente, obtendo-se um valor de 6,3 mg GAE/g de extrato. Deste modo verifica-se que o valor em fenóis totais obtido quando o solvente foi a água é similar aos valores encontrados na nossa cultivar embora o solvente utilizado no presente estudo fosse o metanol. Por outro lado, verifica-se que quando se utiliza metanol puro relativamente a metanol a 70%, os resultados obtidos para o teor em fenóis totais são notavelmente melhores.²²

Num estudo elaborado a 5 cultivares de colza (Pactol, Silvo, Topas, Serw 4 e Serw 6) foi determinado o teor em fenóis totais dessas cultivares. Os teores de fenóis totais nessas cultivares variaram entre os 28,0-35,4 mg GAE/g de extrato. Comparando os resultados obtidos para as diferentes cultivares nesse estudo com a cultivar Hydromel verifica-se que a cultivar do presente estudo apresenta teores em fenóis totais inferiores tanto nos extratos metanólicos obtidos à temperatura ambiente como nos obtidos à temperatura de ebulição.¹¹

4.2.3. Efeito bloqueador de radicais livres de DPPH

O método do efeito bloqueador de radicais livres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) é recomendado para avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais, por fornecer resultados reprodutíveis e confiáveis de uma forma rápida e fácil.³⁸

Este método é considerado uma ferramenta essencial para se obter o potencial antioxidante, mais especificamente, a atividade antirradicalar dos extratos.⁶⁴ A eficácia antioxidante é determinada pela concentração de antioxidante necessária para diminuir 50% da concentração inicial do DPPH (EC₅₀). Assim, quanto mais eficaz for o antioxidante menor será o valor do parâmetro EC₅₀.⁶⁵

Os extratos de colza analisados no presente trabalho indicaram possuir uma atividade sequestrante dependente da concentração. Esta dependência pode ser observada nos gráficos 5 e 6 em que o efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH dos extratos de colza aumenta proporcionalmente à medida que a concentração de extrato aumenta.

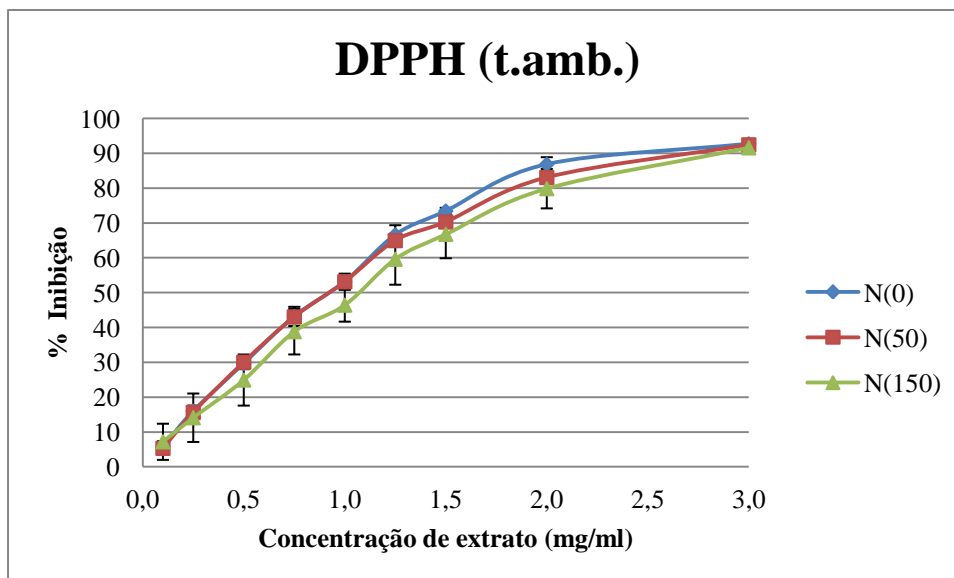


Gráfico 5. Efeito bloqueador de radicais de DPPH dos extratos de colza obtidos em extração à temperatura ambiente. Os valores expressam a média \pm desvio padrão.

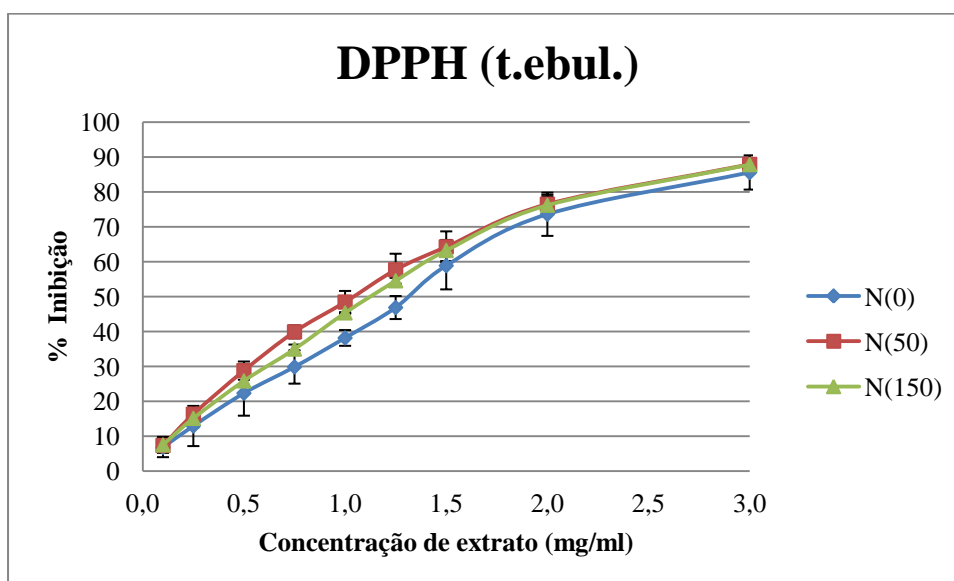


Gráfico 6. Efeito bloqueador de radicais de DPPH dos extratos de colza obtidos em extração à temperatura de ebulição. Os valores expressam a média \pm desvio padrão.

Na extração à temperatura ambiente (gráfico 5), o extrato N_0 apresentou valores superiores de percentagem de inibição nas concentrações 1,25, 2 e 3 mg/ml, em comparação ao extrato N_{50} . Por outro lado, o extrato N_{150} manifestou valores inferiores de percentagem de inibição em todas as concentrações, exceto na concentração de 0,1 mg/ml. Na concentração de extrato 3 mg/ml, aos valores de percentagem de inibição

alcançados pelos extratos N₀, N₅₀ e N₁₅₀ foram respetivamente, 92,73%, 92,45% e 91,59%, sendo estes similares para esta concentração. Apesar dos diferentes valores de percentagem de inibição nos diferentes extratos, as curvas referentes ao efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH ostentaram um comportamento semelhante, evidenciado no gráfico 5.

Relativamente à extração à temperatura de ebulição (gráfico 6), o extrato N₀ apresentou valores de percentagem de inibição inferiores ao extrato N₅₀ e N₁₅₀ em todas as concentrações. O extrato N₅₀ foi o que apresentou os valores mais elevados de percentagem de inibição, para todas as concentrações testadas.

Tabela 7. Valores de EC₅₀ (mg/ml) do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH obtidos nos extratos de colza na extração à temperatura ambiente e na extração à temperatura de ebulição (média ± desvio padrão).

Extrato	EC ₅₀ (mg/ml)	
	Extração t.amb.	Extração t.ebul.
N ₀	0,93±0,05	1,34±0,02
N ₅₀	0,92±0,01	1,07±0,06
N ₁₅₀	1,07±0,03	1,13±0,04

Na extração à temperatura ambiente, os extratos que demonstraram maior efeito bloqueador foram os extratos N₀ e N₅₀, registando valores de EC₅₀ similares, 0,93 e 0,92 mg/ml, respetivamente. Assim, os baixos valores de EC₅₀ registados para estas amostras indicam um maior efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, nestas condições de extração. Por sua vez, o extrato N₁₅₀ apresentou o menor valor de efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, registando o valor de EC₅₀ mais elevado (1,07 mg/ml).

Na extração à temperatura de ebulição, o extrato que demonstrou maior efeito bloqueador foi o extrato N₅₀, tendo um valor de EC₅₀ de 1,07 mg/ml. Já o extrato que apresentou o menor efeito bloqueador foi o extrato N₀ com um valor de EC₅₀ de 1,34 mg/ml, tendo o extrato N₁₅₀ um valor intermédio de EC₅₀ (1,13 mg/ml).

Comparando os resultados obtidos nas diferentes condições de extração, o extrato que apresentou maior efeito bloqueador de radicais livres de DPPH foi o extrato N₅₀ tanto à temperatura ambiente como à temperatura de ebulição. Por outro lado, na

extração à temperatura ambiente, o extrato com menor efeito bloqueador foi o extrato N₁₅₀, enquanto na extração à temperatura de ebulição foi o extrato N₀.

De acordo com um estudo alusivo à atividade antioxidante de várias oleaginosas foi demonstrado que os extratos de colza obtidos por extração com 70% de metanol e 70% de etanol obtiveram valores de EC₅₀ de 0,5 mg/ml. Comparativamente aos resultados obtidos para o parâmetro EC₅₀ da cultivar Hydromel verificou-se que os valores de EC₅₀ foram superiores, logo apresentam menor efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH. No entanto, deve-se ter em conta o facto do solvente usado neste trabalho ser metanol puro, ao contrário do estudo que foi referido, podendo influenciar significativamente os valores obtidos.²²

4.2.4. Poder redutor

O poder redutor das amostras em estudo foi determinado avaliando a conversão do complexo Fe³⁺/ferricianeto para a forma ferrosa. A transformação do Fe³⁺ para Fe²⁺ é a medida para determinar a capacidade do poder de redução.²³

O ensaio do poder redutor é considerado um método sensível para a determinação semi-quantitativa de concentrações diluídas de polifenóis, que participam em reações redox.³⁵

Nos gráficos 7 e 8, encontram-se representados os resultados obtidos para os diferentes extratos de colza, sujeitos ao método para quantificação do poder redutor.

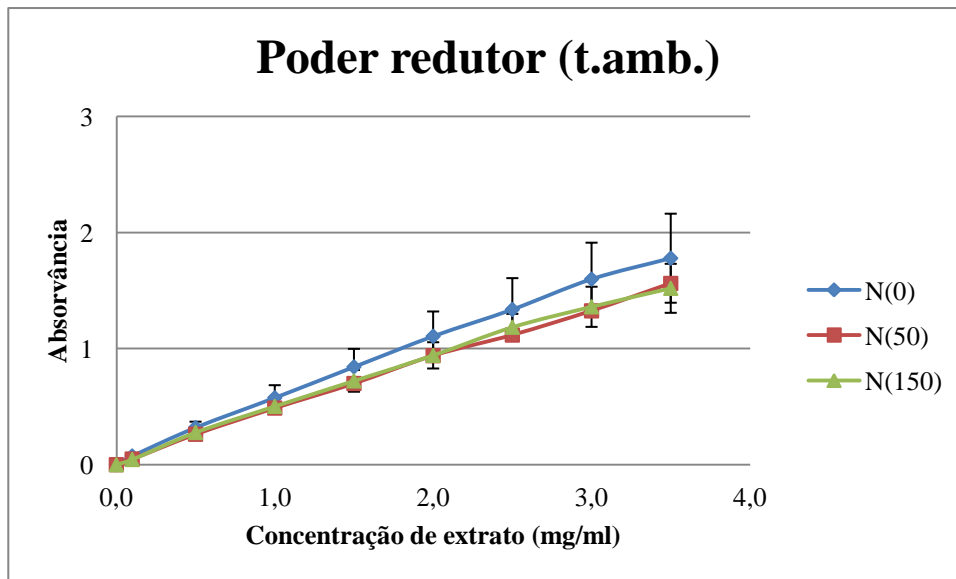


Gráfico 7. Poder redutor dos extratos de colza obtidos em extração à temperatura ambiente. Os valores expressam a média \pm desvio padrão.

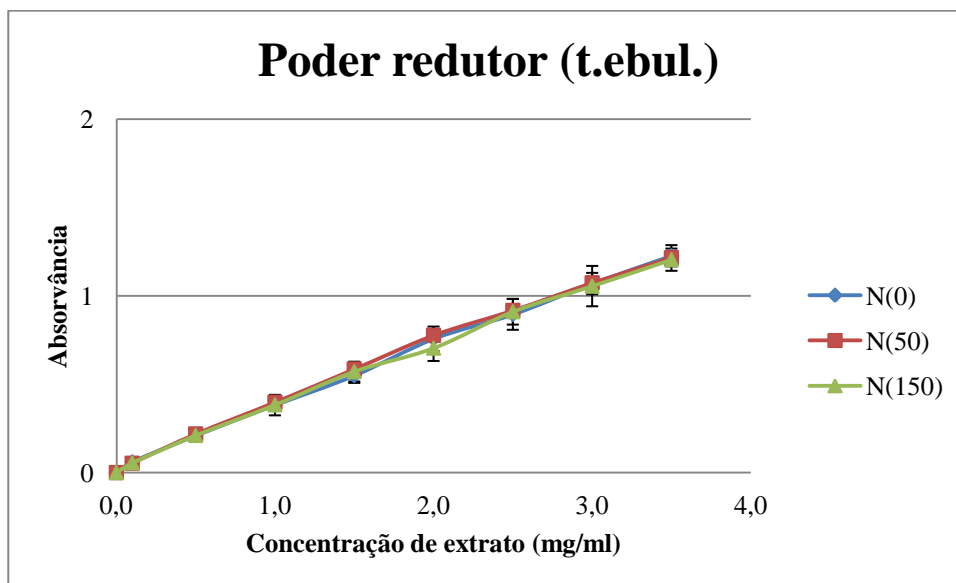


Gráfico 8. Poder redutor dos extratos de colza obtidos em extração à temperatura de ebulição. Os valores expressam a média \pm desvio padrão.

Na extração à temperatura ambiente (gráfico 7), o extrato N_0 apresentou um maior declive comparativamente ao extrato N_{50} e N_{150} . Por seu lado, estes mesmos últimos extratos apresentaram um comportamento semelhante, obtendo-se valores similares de absorvância para as diferentes concentrações testadas.

No que diz respeito à extração à temperatura de ebulição (gráfico 8), o comportamento dos três extratos foi semelhante, havendo um aumento proporcional e constante com a concentração, exceto na concentração de 2 mg/ml, em que o extrato N₁₅₀ apresentou um valor inferior de absorvância em relação aos restantes extratos.

Em ambas as extrações verifica-se que quanto maior a concentração dos extratos de colza, maior é o poder redutor.

Na tabela 8 apresentam-se os valores de EC₅₀ obtidos para os extratos de colza na extração à temperatura ambiente e na extração à temperatura de ebulição.

Tabela 8. Valores de EC₅₀ (mg/ml) da determinação do poder redutor obtidos nos extratos de colza na extração à temperatura ambiente e na extração à temperatura de ebulição (média ± desvio padrão).

Extrato	EC ₅₀ (mg/ml)	
	Extração t.amb.	Extração t.ebul.
N ₀	0,99±0,02	1,36±0,13
N ₅₀	1,03±0,02	1,28±0,07
N ₁₅₀	1,00±0,01	1,33±0,04

Na extração à temperatura ambiente, os valores obtidos de EC₅₀ foram similares, apresentando valores de EC₅₀ que variaram de 0,99 a 1,03 mg/ml.

Na extração à temperatura de ebulição, o extrato N₅₀ apresentou um valor de EC₅₀ mais baixo (1,28 mg/ml), traduzindo-se num valor mais elevado de poder redutor. Pelo contrário, o extrato N₀ originou o valor mais baixo de poder redutor, traduzindo um valor de EC₅₀ mais elevado (1,36 mg/ml).

5. CONCLUSÃO

No presente trabalho avaliou-se a composição química das sementes de colza da cultivar Hydromel com diferentes doses de adubação azotada. O componente maioritário em todas as amostras foi a gordura, variando o teor de acordo com a fertilização a que foi sujeita. Assim, quanto maior a fertilização azotada, menor o teor em gordura nas amostras de colza. A amostra que apresentou o maior teor de gordura foi a amostra N₀, ou seja, a amostra que não apresentou fertilização. Por outro lado, a amostra N₁₅₀ registou o maior teor em proteína, sendo a amostra que teve maior fertilização. Deste modo, verificando-se o aumento do teor de proteína consoante o nível de fertilização de cada amostra. O teor em fibra em detergente ácido nas amostras diminuiu com o aumento da fertilização azotada, sendo a amostra N₁₅₀ a que obteve menor valor, que por sua vez, apontou o maior valor energético. Já o teor em fibra em detergente neutro manteve-se constante nas amostras, não revelando variações com as doses de azoto aplicadas.

O perfil em ácidos gordos das diferentes amostras variou principalmente no seu componente principal, o ácido oleico, apresentando-se em maior quantidade na amostra N₀ e N₅₀. A fração nutricional predominante nas amostras de colza foi a fração dos ácidos gordos monoinsaturados, sendo seguida da fração dos ácidos gordos polinsaturados e por fim, a fração dos ácidos gordos saturados. A análise dos espectros de RMN mono e bidimensionais da fração lipídica das amostras de colza permitiram igualmente identificar o triglicérido maioritário, constituído por duas unidades de ácido oleico e uma de ácido linoleico.

Em termos da atividade antioxidante, todos os extratos de colza da cultivar Hydromel, tanto na extração com metanol à temperatura ambiente como na extração com metanol à temperatura de ebulição, apresentaram capacidade redutora total, atividade bloqueadora de radicais livres de DPPH e poder redutor dependente da concentração dos extratos testados.

Relativamente aos resultados obtidos na atividade antioxidante, os extratos à temperatura ambiente apresentaram maior eficiência antioxidante, ou seja, melhores resultados na capacidade redutora total, na atividade bloqueadora de radicais de DPPH e no poder redutor. Constatou-se que o extrato de colza N₀ e N₅₀ na extração à temperatura ambiente apresentaram os melhores resultados nas três metodologias testadas. Por sua vez, na extração à temperatura de ebulição, o extrato que apresentou

melhores resultados na atividade bloqueadora de radicais de DPPH e no poder redutor foi o extrato N₅₀, embora tenha obtido um menor valor na capacidade redutora total.

Em conclusão, a adubação azotada influencia a composição química das amostras de colza principalmente nos teores em proteína e em gordura, parâmetros importantes para otimização das condições de cultivo de acordo com a aplicação industrial das culturas. A atividade antioxidante das sementes de colza da cultivar Hydromel, testada por os métodos da capacidade redutora total, do efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH e do poder redutor, foi igualmente influenciada pela adubação azotada, diminuindo a eficiência antioxidante das amostras de colza. Por fim, é de realçar que a extração à temperatura ambiente permitiu melhores resultados ao nível da atividade antioxidante das amostras.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Kimber, D.; McGregor, D.I. **1995**. The species and their origin, cultivation and world production. In *Brassica oilseeds. Production and utilization*. Kimber, D.; McGregor, D.I. Eds. Wallingford, UK: Cab International, 1-7.
2. Richter, E.K.; Spangenberg, J.E.; Kreuzer, M.; Leiber, F. **2010**. Characterization of rapeseed (*Brassica napus*) oils by bulk C, O, H, and fatty acid C stable isotope analyses. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 8048-8055.
3. Alonso, J.S.J.; Sastre, J.A.L.; Romero-Ávila, C.; Romero, E.J.L. **2006**. Combustion of rapeseed oil and diesel oil mixtures for use in the production of heat energy. *Fuel Process. Technol.*, 87, 97-102.
4. Bockisch, M. **1998**. Fats and oils handbook. *AOCS PRESS*, 251-260.
5. Szydłowska-Czeraniak, A.; Bartkowiak-Broda, I.; Karlovic, I.; Karlovits, G.; Szlyk, E. **2011**. Antioxidant capacity, total phenolics, glucosinolates and colour parameters of rapeseed cultivars. *Food Chem.*, 127, 556-563.
6. Norouzi, M.; Toorchi, M.; Salekdeh, G.H.; Mohammadi, S.A.; Neyshabouri, M.R.; Aharizad, S. **2008**. Effect of water deficit on growth, grain yield and osmotic adjustment in rapeseed. *J. Food Agric. Environ.*, 6, 312-318.
7. Çulcuoglu, E.; Unay, E.; Karaosmanoglu, F. **2002**. Rapeseed cake as a biomass source. *Energy Sourc.*, 24, 329-336.
8. http://pt.wikipedia.org/wiki/acido_erucico, acesoado a 24 de Maio de 2012.
9. Mailer, R.J.; McFadden, A. **2008**. Anti-nutritional components, fibre, sinapine and glucosinolate content, in Australia canola (*Brassica napus L.*) meal. *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 937-944.

-
10. Clarke, D.B. **2010**. Glucosinolates, structures and analysis in food. *Anal. Method.*, 2, 310-325.
11. El-Beltagi, H.; Mohamed, A.A. **2010**. Variations in fatty acid composition, glucosinolate profile and some phytochemical contents in selected oil seed rape (*Brassica napus L.*) cultivars. *Grasas aceites*, 61, 143-150.
12. Guerrero, A. **1999**. Cultivos herbaceos extensivos. 6^a ed. Madrid: *Ed. Mundi-Prensa*, 751.
13. Marquard, R.; Walker, K.C. **1995**. Environmental impact of rapeseed production. In *Brassica oilseeds. Production and utilization*. Kimber, D.; McGregor, D. I. Eds. Wallingford, UK: Cab International, 353-371.
14. Körbitz, W. **1995**. Utilization of oil as biodiesel fuel. In *Brassica oilseeds. Production and utilization*. Kimber, D.; McGregor, D.I. Eds. Wallingford, UK: Cab International, 195-213.
15. Öztürk, Ö. **2010**. Effects of source and rate of nitrogen fertilizer on yield, yield components and quality of winter rapeseed (*Brassica napus L.*). *Chilean J. Agric. Res.*, 70, 132-141.
16. Ozer, H. **2003**. Sowing date and nitrogen rate effects on growth, yield and yield components of two summer rapeseed cultivars. *Eur. J. Agron.*, 19, 453-463.
17. Skydlowska-Czerniak, A.; Trokowski, K.; Karlovits, G.; Szlyk, E. **2010**. Determination of antioxidant capacity, phenolic acids, and fatty acid composition of rapeseed varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 7502-7509.
18. Bouchereau, A.; Clossais-Besnard, N.; Bensaoud, A.; Leoport, L.; Renard, M. **1996**. Water stress effects on rapeseed quality. *Eur. J. Agron.*, 5, 19-30.

-
19. Wanasundara, U. N.; Shahidi, F. **1994**. Canola extract as an alternative natural antioxidant for canola oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 817-822.
20. Madrid, A.; Cenzano, L.; Vicente, J. M. **1995**. Manual de aceites y grasas comestibles. *AMV ediciones*.
21. Fellows, P. J. **1992**. In *Food processing technology - principles and practice*. Ellis Horwood Limited Ed., London, 424-430.
22. Mathäus, B. **2002**. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3444-3452.
23. Xue, Z.; Yu, W.; Liu, Z.; Wu, M.; Kou, X.; Wang, J. **2009**. Preparation and antioxidative proprieties of a rapeseed (*Brassica napus*) protein hydrolysate and three peptide fractions. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 5287-5293.
24. Spielmeyer, A.; Wagner, A.; Jahreis. **2009**. Influence of thermal treatment of rapeseed on the canolol content. *Food Chem.*, 112, 944-948.
25. Amarowich, R.; Naczk, M.; Shahidi, F. **2000**. Antioxidant activity of crude tannins of canola and rapeseeds hulls. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 957-961.
26. Vuorela, S.; Meyer, A.S.; Heinonen, M. **2004**. Impact of isolation method on the antioxidant activity of rapeseeds meal phenolics. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 8202-8207.
27. Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M. **1999**. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 299, 152-178.
28. Hassas-Roudsari, M.; Chang, P.; Pegg, R.B.; Tyler, R.T. **2009**. Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanolic and hot water extraction. *Food Chem.*, 114, 717-726.

-
29. Viuda-Martos, M.; Navajas, Y.R.; Zapata, E.S.; Fernández-López, J.; Pérez-Álvarez, J.A. **2009**. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour Frag. J.*, 25, 13-19.
30. Prior, R.L.; Wu, X.L.; 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.
31. Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. **2005**. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1841–1856.
32. Ali, S.S.; Kasoju, N.; Luthra, A.; Singh, A.; Sharanabasava, H.; Sahu, A.; Bora, U. **2008**. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Res. Int.*, 41, 1-15.
33. Koleva, I.I.; Van Beek, T.A.; Linssen, J.P.; De Groot, A.; Evstatieva, L.N. **2002**. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem. Anal.*, 13, 8-17.
34. Antolovich, M.; Prenzler, P.D.; Patsalides, E.; McDonald, S.; Robards, K. **2002**. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183-198.
35. 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.
36. Bondet, V.; Brand-Williams, W.; Berset, C. **1997**. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical methods. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 30, 609-615.
37. Hirano, R.; Sasamoto, W.; Matsumoto, A.; Itakura, H.; Igarashi, O.; Kondo, K. **2001**. Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 47, 357-362.

-
38. Molyneux, P. **2004**. The use of the stable radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26, 211-219.
39. Chung, Y.; Chang, C.; Chao, W.; Lin, C.; Chou, S. **2002**. Antioxidative activity and safety of the ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2454-2458.
40. Yen, G.H.; Chen, H.Y. **1995**. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food. Chem.*, 43, 27-32.
41. Berker, K.I.; Guçlu, K.; Tor, I.; Apak, R. **2007**. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, bathophenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP) and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72, 1157-1165.
42. Rodrigues, M.A.; Almeida, A.; Ferreira, J.; Ribeiro, T.; Arrobas, M. **2011**. Response of rapessed to nitrogen fertilisation in a Mediterranean environment. Proc. 4th International Congress on Energy and Environment Engineering and Management. Mérida, Spain, 26/27 May.
43. AOAC. **1999**. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists. 16^a edição, Virginia, E.U.A., volume II, 32-1.
44. AOAC. **1999**. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists. 16^a edição, Virginia, E.U.A., volume II, 32-2.
45. AOAC. **1999**. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists. 16^a edição, Virginia, E.U.A., volume I, 12-7.
46. Nielsen, S. **2009**. Análisis de los alimentos. *Editorial Acribia, S.A.* 158-160.
47. AOAC. **2000**. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists International. 17^a edição, Arlington, E.U.A., volume II, 1-3.

-
- 48 Silva, A.M.S.; Pereira, M.M. **2006**. Ressonância Magnética Nuclear. In *Química – Síntese e estrutura, uma abordagem prática*. Burrows, H.D.; Pereira, M.M. Eds. Escolar Editora, Lisboa. p. 169-215.
49. Oliveira, I.; Sousa, A.; Morais, J.S.; Ferreira, I.C.F.R.; Bento, A.; Estevinho, E.; Pereira, A. **2008**. Chemical composition, and antioxidante and antimicrobial activities of three hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1801-1807.
50. Bortolassi, J.G.; Santos, G.T.; Alcalde, C.R.; Gonçalves, G.D.; Zambom, M.A.; Furlan, A.C. **2000**. Comparação dos métodos convencional e Filter Bag Technique da Ankom (FBT) para determinação de fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido. *Acta Sci.*, 807-811.
51. Macedo Júnior, G.L.; Zanine, A.M.; Borges, I.; Pérez, J.R.O. **2007**. Qualidade da fibra para a dieta de ruminantes. *Ciência Animal*, 17, 7-17.
52. Rodrigues, R.C. **2010**. Métodos de análises bromatológicas de alimentos: métodos físicos, químicos e bromatológicos. *Embrapa Clima Temperado*, 94-106.
53. AOAC. **1999**. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists. 16ª edição, Virginia, E.U.A., volume I, 32-9.
54. AOAC. **1999**. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists. 16ª edição, Virginia, E.U.A., volume I, 4-28A.
55. Singleton, V.L.; Rossi, J.A.; Jr. **1965**. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *J. Enol. Vitic.*, 16, 144-158.
56. Hatano, T.; Kagawa, H.; Yasuhara, T.; Okuda, T. **1988**. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 2090-2097.

-
57. Oyaizu, M. **1986**. Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.*, 44, 307-315.
58. Lajolo, F.M.; Marquez, U.M.L.; Filisetti-Cozzi, T.M.C.C.; McGregor, D.I. **1991**. Chemical composition and toxic compounds in rapeseed (*Brassica napus*, L.) cultivars grown in Brazil. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1933-1937.
59. Haq, I.-u.; Saeed, M.K.; Ahmed, I.; Ashraf, M.; Ejaz, N. **2009**. Chemical analysis and characterization of (*Brassica napus*) Canola oil seed. International Conference on Complex Medical Engineering, 1-4.
60. Giami, S. **2002**. Chemical composition and nutritional attributes of selected newly developed lines of soybean (*Glycine max* (L) Merr). *J. Sci. Food Agric.*, 82, 1735-1739.
61. Perez, E.E.; Careli, A.A.; Crapiste, G.H. **2004**. Chemical characterization of oils and meals from wild sunflower (*Helianthus petiolaris* Nutt). *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 81, 245-249.
62. Reynolds, T.L.; Nemeth, M.A.; Glenn, K.C.; Ridley, W.P.; Astwood, J.D. **2005**. Natural variability of metabolites in maize grain: Differences due to genetic background. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 10061-10067.
63. Nzikou, J.M; Matos, L.; Bouanga-Kalou, G.; Ndangui, C.B.; Pambou-Tobi, N.P.G.; Kimbonguila, A.; Silou, Th.; Linder, M.; Desobry, S. **2009**. Chemical composition on the seeds and oil of sesame (*Sesamum indicum* L.) grown in Congo- Brazzaville. *Adv. J. Food Sci. Technol.*, 1, 6-11.
64. El, S.N.; Karakaya, S. **2004**. Radical scavenging and iron-chelating activities of some greens used as traditional dishes in Mediterranean diet. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 55, 67-74.
65. Qian, H.; Nihorimbere, V. **2004**. Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. *J. Zhejiang Uni. Sci.*, 5, 676-678.