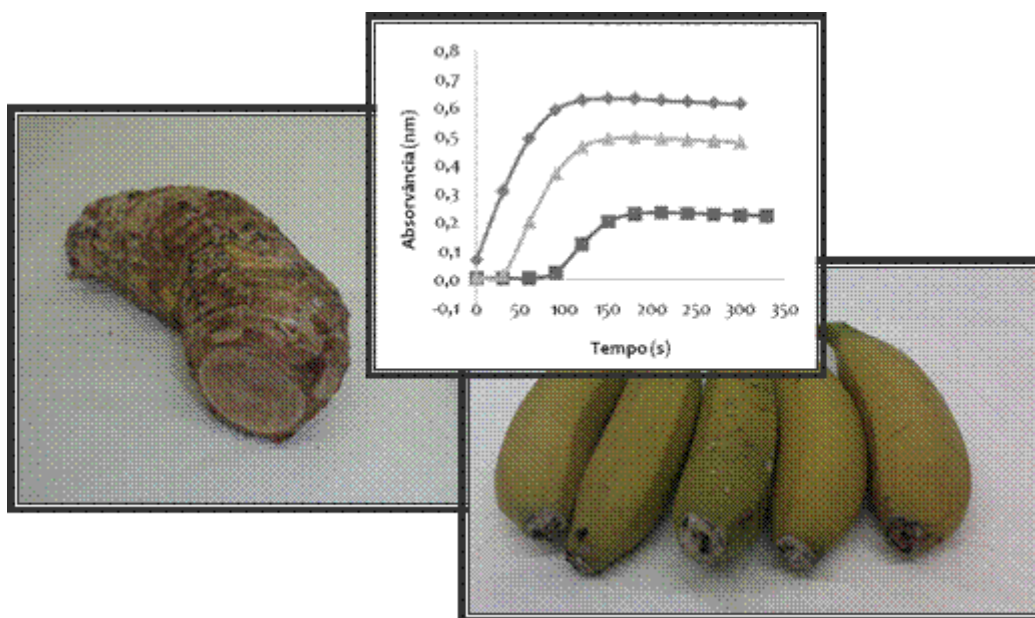




Universidade dos Açores
Departamento de Biologia

ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES HORTOFRUTÍCOLAS DA ILHA TERCEIRA



Dissertação do Mestrado em Ciências Biomédicas

Realizada por:

Cátia Alexandra Mendes Dias

Orientada por:

Maria da Graça Silveira

Ponta Delgada, 2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para a realização desta tese, nomeadamente:

À minha orientadora Prof. Doutora Maria da Graça Silveira, pela orientação e dedicação fornecida ao longo deste trabalho.

Á FRUTER e à Mónica Melo que gentilmente me cederam as amostras e transportaram-nas até ao laboratório, para a realização deste trabalho.

Á Prof. Doutora Adelaide Lobo e à Prof. doutora Sofia Mendes que se dispuseram em ajudar-me, transmitindo os seus conhecimentos e que gentilmente me cederam o laboratório de química para a realização de uma parte do meu trabalho.

Á Prof. Doutora Célia Silva e à Prof. doutora Marina Domingos que se dispuseram em ajudar-me e que me cederam o laboratório de Bioquímica para a realização de uma parte do meu trabalho.

Às minhas colegas de trabalho Lucrecia Silva e Susana Vieira, pelo companheirismo, boa disposição e ajuda.

Às técnicas do Laboratório de Tecnologia Alimentar, Sílvia Mendonça, Leovegilda Rodrigues pela disponibilidade e ajuda.

Às estagiárias Kerey Silva, Ana Rocha e Jéssica Charramba pela disponibilidade em ajudar.

A todos o meu muito obrigado.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha família e amigos.

De uma forma gratificante ao meu pai, António Dias, que sempre me apoiou e fez com que fosse possível este mestrado,

Ao meu namorado, Pedro Corvelo, pelo apoio dado e compreensão ao longo da realização desta e de toda a minha vida académica.

E de uma maneira muito especial à minha mãe, Ana Dias, a título póstumo.

RESUMO

Os efeitos protectores dos produtos naturais, como frutas e vegetais, na saúde estão na sua maioria relacionados com os compostos fenólicos e antioxidantes (Chun et al., 2005). Neste sentido, foi-se determinar a actividade antioxidante de diferentes variedades de batata-doce, inhame, banana e maçã da ilha Terceira. Uma vez que tanto a batata-doce como o inhame não são consumidos crus, testou-se o efeito que os diferentes tratamentos térmicos tinham na actividade antioxidante avaliada pela regeneração da peroxidase (HPR), expressa em % da sua inibição. Verificou-se que processamento térmico da batata-doce aumentou a sua actividade antioxidante, sendo este tanto maior se a batata fosse cozida com casca. Ao contrário, o tratamento térmico não afectou a actividade antioxidante do inhame, no entanto a sua idade no momento da colheita afectou claramente a actividade antioxidante, tendo-se verificado que quanto mais tempo deixados na terra maior seria esta actividade. A actividade antioxidante exibida tanto pela batata-doce como pelo inhame não se relacionaram com a cor da polpa. Na banana testou-se a actividade antioxidantes em três estados de maturação (verde, intermédia e madura), tendo-se observado maior actividade antioxidante no estado verde, seguido surpreendentemente do maduro e só depois pelo intermédio. Foi-se avaliar qual a influência que os polifenóis poderiam ter na actividade antioxidante, tendo-se determinado os polifenóis totais e livres pelo método Folin-Ciocalteu e os flavonóides pelo método DMACA. Verificou-se que as bananas verdes apresentaram as concentrações mais elevadas, as quais diminuíram ao longo do processo de maturação, excepto no caso dos polifenóis livres que praticamente não sofreram alteração. A maçã foi das quatro espécies analisadas a que apresentou maior actividade antioxidante, tendo-se verificado que a casca não afectou esta actividade. No entanto, os polifenóis totais e livres foram significativamente ($\alpha=0.05$) maiores nas amostras em que a casca foi analisada em conjunto com a polpa, ao contrário os flavonóides não apresentaram diferenças. A partir dos resultados obtidos no presente trabalho podemos concluir que as variedades de produtos hortofrutícolas da ilha Terceira tem a capacidade de prevenir ou minimizar os danos provocados pelas espécies reactivas do oxigénio pelo que são candidatos muito interessantes a nutracêuticos. Além disso, consideramos que os resultados obtidos no presente trabalho poderão ser úteis na definição das estratégias adoptadas para o melhoramento e selecção das culturas açorianas.

Abstract

The health protective effect of natural products such as fruits and vegetables is mostly related to their antioxidants and phenolic compounds (Chun et al., 2005). In this sense, the main purpose of this work was to determine the antioxidant activity of different varieties of sweet potatoes, taro roots, bananas and apples of Terceira Island. Since both sweet potatoes and taro roots are not eaten raw, we tested the effect of different heat treatments on the antioxidant activity was evaluated by the scavenging activity against H₂O₂ assessed by the horseradish peroxidase (HRP) assay. It was found that heat processing of sweet potato increased its antioxidant activity, which is much higher if the potatoes were cooked unpeeled. Instead, the heat treatment did not affect the antioxidant activity of taro root, but their age at the time of harvest clearly affected the antioxidant activity, i.e. taro roots harvested older showed much higher scavenging activity. The antioxidant activities exhibited by both sweet potato and taro root varieties were not related with flesh colour. The antioxidant properties of banana at different stages of ripening were investigated and it was observed higher antioxidant activity in the green state, followed by the mature and surprisingly only then by the intermediate state. Moreover, in order to evaluate the influence that the polyphenols would have on the antioxidant activity, the total and free polyphenols and flavonoids were assessed by the Folin-Ciocalteu and DMACA methods, respectively. It was found that green bananas had the highest concentrations, which decreased throughout the ripening process, except for free polyphenols which almost didn't change. From all samples analysed, apples were the ones which displayed the highest antioxidant activity. Moreover we observed that the peel did not affect the scavenging activity. However, total and free polyphenols were significantly ($\alpha = 0.05$) higher in unpeeled apples, unlike flavonoids showed no differences. Our results strongly support that varieties of fruit and vegetable produce from the island of Terceira have the ability to prevent or minimize damage caused by reactive oxygen species and consequently, making them interesting candidate to nutraceuticals. Moreover, we believe that information obtained in the present work will be helpful for breeding strategies designed for Azorean crops.

Índice

1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Alimentos promotores de saúde	3
2.2. Stress Oxidativo	4
2.2.1. Oxidação dos lípidos	7
2.2.2. Oxidação das proteínas	7
2.2.3. Modificações e quebra de ligações no DNA	8
2.3. Mecanismos para combater o Stress Oxidativo	9
2.4. Antioxidantes Nutracêuticos	11
2.4.1. Dadores de hidrogénio	11
2.4.2. Metais quelantes	13
2.4.3. Supressores do oxigénio sigleto	13
2.5. Fitoquímicos com actividade antioxidantes	14
2.5.1. Tocoferol e tocotrienol	14
2.5.2. Ácido Ascórbico	15
2.5.3. Carotenóides	16
2.5.4. Ácido Lipóico	16
2.5.5. Polifenóis	17
2.6. Biodisponibilidade dos antioxidantes	19
2.7. Alimentos Ricos em Antioxidantes	20
3. Material e Métodos	23
3.1. Caracterização das amostras	23
3.1.1. Batata-doce	23
3.1.2. Inhame	23
3.1.3. Banana	24
3.1.4. Maçã	24
3.2. Tratamento das amostras	25
3.2.1. Batata-doce	25
3.2.2. Inhame	26
3.2.3. Banana	26
3.2.4. Maça	26
3.3. Preparação dos extractos	27
3.3.1. Para o teste da Peroxidase	27
3.3.2. Para o teste do DPPH	27
3.3.3. Para a determinação dos diferentes polifenóis	27
3.4. Teste da Peroxidase	28
3.4.1. Procedimento	28
3.5. Teste do DPPH	29

3.5.1.Procedimento	30
3.6. Determinação dos polifenóis totais e livres	30
3.6.1. Procedimento	30
3.7. Determinação dos flavonóides totais	31
3.7.1.Procedimento	31
3.8. Tratamento estatístico	31
4. Apresentação e discussão dos resultados	33
4.1.Actividade Antioxidante da Batata-doce	33
4.1.1. Diferentes variedades	33
4.1.2. Tratamento culinário	35
4.2. Actividade Antioxidante do Inhame	36
4.2.1. Diferentes variedades	36
4.2.2. Tempo na terra	38
4.3. Actividade Antioxidante da Banana	39
4.3.1. Diferentes variedades	39
4.3.2. Contribuição dos polifenóis totais, livres e flavonóides totais	43
4.4. Actividade Antioxidante da Maçã	46
4.4.1. Diferentes variedades	46
4.4.2. Contribuição dos polifenóis totais, livres e flavonóides totais	46
5. Conclusão	49
6. Bibliografia	50
7. Anexos	57

1. INTRODUÇÃO

O fenómeno de envelhecimento é o resultado da acumulação de lesões moleculares provocadas pelas reacções dos radicais livres (RL) nos componentes celulares ao longo da vida, que conduzem à perda de funcionalidade e à doença com o aumento da idade, conduzindo à morte (Harman, 1956). Os RL existem em abundância na natureza, porém, aqueles que devido à sua elevada toxicidade biológica adquiriram maior importância são os radicais livres de oxigénio (RLO). Foram, entretanto, sendo progressivamente identificadas outras moléculas derivadas dos RL de oxigénio, também reactivas e tóxicas apesar de não serem RL, nomeadamente o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) denominando-se espécies reactivas de oxigénio (ERO). O aumento de doenças envolvendo a formação de ERO, tais como, superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH^-), tem despertado um interesse crescente uma vez que, estas desempenham um papel importante no processo degenerativo de várias doenças, como sejam o cancro, a doença coronária, Alzheimer, doenças neurodegenerativas, arteriosclerose e cataratas (Huang *et al.*, 2006).

As ERO geradas no organismo humano através da respiração aeróbica podem ser removidas, em pessoas saudáveis, por antioxidantes naturais, pelo que uma dieta rica em frutas e verduras, ajudará o corpo a neutralizar estes radicais livres, reduzindo os efeitos nocivos do stress oxidativo (Teow *et al.*, 2007). Recentes estudos epidemiológicos têm demonstrado que dietas ricas em frutos e vegetais estão associadas a uma redução do risco de doenças tais como, cancro, doenças cardiovasculares, hipertensão e AVC (Kano, *et al.*, 2005). Os seus benefícios têm sido atribuídos essencialmente à presença de numerosos fitoquímicos, muito em particular de compostos polifenólicos, que possuem actividade antioxidante, imunomoduladora e efeitos antígenotóxicos (Chen *et al.*, 2005).

Os fitoquímicos são substâncias que se encontram nos alimentos de origem vegetal, biologicamente activas, que não são nutrientes essenciais para a vida (pelo menos em curto prazo), mas tem efeitos positivos na saúde. O seu papel tem vindo a ganhar muita popularidade tanto nos países desenvolvidos como em

desenvolvimento especialmente como “alternativas” contra as doenças crónicas que requerem tratamentos a longo prazo, pois embora as drogas sintéticas sejam necessárias para o alívio imediato, o uso prolongado desses fármacos não só provoca efeitos colaterais como náuseas, alergias, e imunossupressão, como o metabolismo dessas drogas gera radicais livres (Nayaka *et al.*, 2010).

No entanto, a exploração dos efeitos benéficos dos fitoquímicos implica o conhecimento do seu comportamento nas diferentes fases da cadeia alimentar. Sabe-se que a composição fitoquímica pode variar consideravelmente em função de factores como a cultivar, o grau de maturação, a composição do solo, práticas de cultivo, a parte da planta utilizada, o maneio pós-colheita e o tipo de processamento (Gartner *et al.*, 1997; Mithen *et al.*, 2000; Schneeman, 2000).

Assim o presente trabalho teve por principal objectivo avaliar a possível interacção dos fitoquímicos presentes em diferentes espécies hortofrutícolas da ilha Terceira com os ERO, no sentido de determinar a sua capacidade de prevenir ou minimizar os danos provocados pelos RL. Neste sentido foi-se avaliar a actividade antioxidante de diferentes variedades de batata-doce (*Ipomoea batatas*), inhame (*Colocasia esculenta*), maçã (*Malus domestica*) e banana (*Musa acuminata*) da ilha Terceira, cultivadas por vários produtores pertencentes à Associação de Produtores de Frutas, de Produtos Hortícolas e Florícolas da Ilha Terceira (FRUTER). Pretendeu-se ainda investigar o efeito que o tratamento térmico, o tempo de permanência na terra e o estado de maturação podem ter na actividade antioxidante destes hortofrutícolas. Finalmente, este trabalho teve também como objectivo verificar qual a contribuição do conteúdo em polifenóis totais, livres e flavonóides na actividade antioxidante nas duas frutas analisadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A alimentação saudável como um meio de promover a saúde tem despertado um interesse crescente tanto por parte dos consumidores como dos investigadores. Estudos recentes têm demonstrado que uma dieta rica em frutos e vegetais está associada a uma redução do risco de doenças tais como, cancro, doenças cardiovasculares, hipertensão e Acidentes Vasculares Cerebrais (AVC) (Kano, *et al.*, 2005). Os seus benefícios têm sido atribuídos essencialmente à presença de numerosos compostos polifenólicos, que possuem actividade antioxidante (Chen *et al.*, 2005).

2.1. Alimentos promotores de saúde

O alimento é toda a substância complexa usada para nutrir os seres vivos, indispensável à vida e que o organismo não pode sintetizar pelo que tem que ser ingerido (Saldanha, 1999). No entanto, hoje, é reconhecido que os alimentos não só proporcionam nutrição, mas também podem prevenir doenças e garantir uma boa saúde e longevidade. Este conceito não é novo para algumas culturas orientais, que sempre acreditaram que determinados alimentos são benéficos para a saúde e alguns até mesmo terapêuticos.

Vários termos têm sido usados indistintamente para designar alimentos promotores da saúde. A expressão alimentos adaptados, criada em 1989, é usada para descrever alimentos que contenham ou sejam enriquecidos com componentes químicos de plantas biologicamente activos, não-nutritivos, que são eficazes na redução do risco de cancro (Caragay, 1992). O termo nutracêuticos foi introduzido também em 1989 pela Fundação EUA para a Inovação na Medicina para se referir a "qualquer substância que é um alimento ou parte de um alimento e proporciona benefícios médicos ou de saúde, incluindo a prevenção e o tratamento da doença" (DeFelice, 1995). Em 1994, o Conselho do Instituto Americano de Medicina de Alimentos e Nutrição definiu alimentos funcionais como "qualquer alimento ou ingrediente alimentar que possa proporcionar um benefício à saúde além dos nutrientes tradicionais que ele contém" (Thomas & Earl, 1994). Nutracêuticos são também conhecidos como alimentos terapêuticos, alimentos medicinais, suplementos nutricionais e suplementos dietéticos (Badaró *et al.*, 2008).

Vários factores como os avanços científicos, a procura dos consumidores, aumento com os custos dos cuidados de saúde, o envelhecimento da população, os avanços técnicos na indústria alimentar e mudanças do ambiente regulador,

estimularam o desenvolvimento de alimentos funcionais (Hasler, 1996). Vários estudos de investigação demonstraram cientificamente o papel crucial da dieta na promoção da saúde e bem-estar. Numa revisão bibliográfica realizada por Block *et al.* (1992) com cerca de 200 estudos epidemiológicos sobre a relação entre o consumo de fruta e hortaliças e a incidência de diversos tipos de cancro, verificou-se existir uma relação inversa entre ambos.

Diversos estudos epidemiológicos têm indicado haver uma relação entre a dieta e as diferentes patologias, em especial, as doenças coronárias e o cancro, estando normalmente os efeitos protectores da alimentação sobre essas patologias, associados ao consumo de frutos e legume. Dentro deste contexto a organização mundial de saúde recomenda a ingestão de cinco porções de fruta e vegetais por dia para uma alimentação saudável (Aprikian *et al.*, 2001).

A incidência de morte provocada por cancro, AVC, aterosclerose, entre outros, pode ser minimizada por meio de bons hábitos alimentares (Badaró *et al.*, 2008), como uma alimentação rica em fibras, vitamina C, beta-caroteno, vitamina E e outros compostos, sendo que o consumo diário de frutas e vegetais frescos se associa a um risco menor de desenvolver diferentes tipos de doenças crónicas (Baron *et al.*, 2005).

A mudança de estilo de vida, incluindo a mudança de hábitos alimentares é muito importante na prevenção de diversas doenças, e para isto as recomendações dos grupos de pesquisas estão voltadas para a educação participativa de como construir uma dieta equilibrada não só para prevenção de doenças, mas também para promover a saúde. Para tal, é necessário que se motive a população desde cedo, assim, as crianças e adolescentes constituem um importante grupo a ser trabalhado (Baron *et al.*, 2005).

2.2. Stress Oxidativo

As teorias sobre envelhecimento são inúmeras e muitas delas estão obsoletas, mas a que melhor ilustra o mecanismo de envelhecimento é a teoria do stress oxidativo. Esta foi inicialmente proposta por Harman em 1966, relacionando os radicais livres (RL) no fenómeno do envelhecimento, considerando que este resultava da acumulação de lesões moleculares devido às reacções dos RL nos componentes celulares ao longo da vida (Harman, 1956), a qual dificulta a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (Huang *et al.*, 2005).

Os RL são átomos ou moléculas instáveis produzidos naturalmente no organismo humano, que contêm um ou mais electrões desemparelhados na sua

orbital externa, o que lhes confere uma grande instabilidade química (fig.2.1). Devido à sua elevada toxicidade biológica adquiriram maior importância os RL de oxigênio, tais como o superóxido ($O_2^{\cdot -}$), o hidroxilo (HO^{\cdot}) e o oxigênio singlete ($1/2O_2$). No entanto, foram sendo progressivamente identificadas outras moléculas derivadas dos RL de oxigênio, também reactivas e tóxicas para o organismo, que, por não conterem electrões desemparelhados, não podem ser designadas de RL. São exemplos desses compostos o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso ($HOCl$). A característica comum a todas estas espécies é a potencialidade para reagir com outros compostos gerando RL (Bast *et al.*, 1991; Halliwell, 1991; Pryor, 1986). Tendo em conta esta característica, são frequentemente designadas de espécies reactivas de oxigénio (ERO), incluindo na mesma categoria os RL de oxigénio e outras moléculas altamente reactivas, sem electrões desemparelhados, mas que são potencialmente geradoras de RL (Bast *et al.*, 1991; Halliwell, 1991).

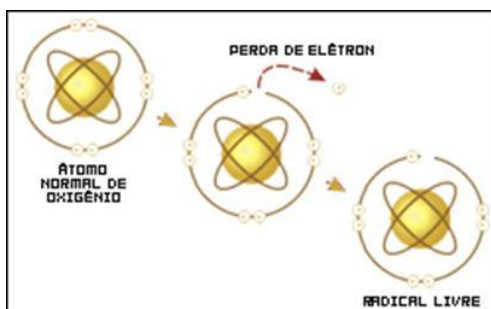


Figura 2.1. Formação de um radical livre (Fonte: <http://www.infoescola.com/bioquimica/radicaiss-livres/>)

O metabolismo celular basal está continuamente a produzir ERO através da redução da molécula de oxigénio (Morel & Barouki, 1999; Pérez & Muguercia 2000). Estas são produzidas por diversos organelos celulares, tais como, a mitocôndria, o retículo endoplasmático, os lisossomas, as membranas, os peroxissomas e o citosol, sendo a mitocôndria a maior fonte de produção de ERO (fig.2.3), uma vez que esta consome 90% do oxigénio utilizado pelo organismo, durante o processo de respiração celular (Lee *et al.*, 2004). A incidência de doenças relacionadas a processos cancerígenos no organismo, envolvendo a formação de ERO, tais como, peróxido de hidrogénio e o radical hidroxilo, tem despertado alguma atenção (Júnior *et al.*, 2001).

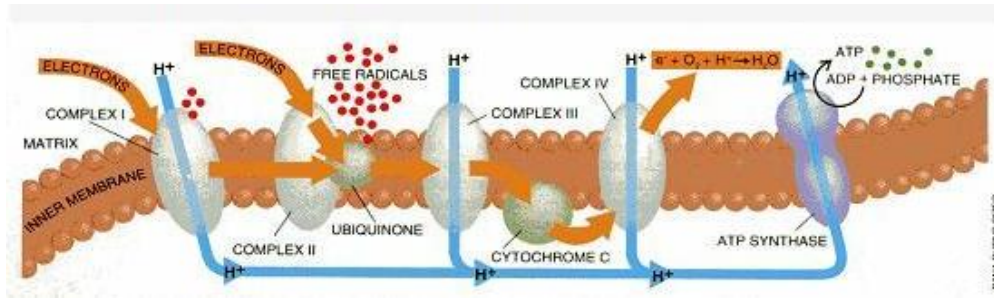


Figura 2.2. Transporte de electrões ao longo da membrana celular. Fonte: Yu, 1993.

Por definição, o stress oxidativo consiste num desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, sendo o desequilíbrio a favor dos primeiros (Frei, 1999; Sies 1985 e 1997). A reacção de um radical com outra molécula produz um radical diferente, que pode ser mais ou menos reactiva do que a espécie original. Este processo tende a repetir-se continuamente terminando, apenas, quando a extremidade radical que contém o electrão desemparelhado formar uma ligação covalente com o electrão desemparelhado de outro radical (Chang, 1994). Caso este processo não seja inibido inicialmente por enzimas ou moléculas antioxidantes, vai ocorrer danos nas macromoléculas biológicas, acumulando-se nas células e tecidos, devido ao aumento de produção de ERO, ou da diminuição da capacidade antioxidantes ou ainda devido à diminuição da velocidade de remoção e reparação de ERO. Esta terá sido a base da “Teoria do Stress Oxidativo” (Agarwal *et al.*, 1994; Beckman *et al.*, 1998; Dargel, 1992; Sohal, 1993 e 1994; Squier & Bigelow, 2000).

O aumento do stress oxidativo pode activar os factores de transcrição sensíveis às ERO, induzindo um aumento da síntese de enzimas intervenientes nos processos de defesa e na remoção de moléculas lesadas ou produtos resultantes da sua oxidação. Todos os factores que induzem um aumento da formação de ERO poderão perturbar a homeostasia mitocondrial, contribuindo para o aumento de lesões e mutações neste organelo celular, com implicações ao nível da produção de energia e manutenção das funções vitais da célula (Barja *et al.*, 1994 e 2000; Esteve *et al.*, 1999; Lal *et al.*, 2001; Sohal *et al.*, 1994).

Os danos do stress oxidativo estão associados a um aumento do risco de mutações e doenças degenerativas e cardiovasculares, além de exercer um papel importante no processo de envelhecimento. Os agentes antioxidantes parecem ter a capacidade de prevenir danos oxidativos, reduzindo o risco de ocorrências de tais doenças, além de retardar o envelhecimento celular (Gutteridge, 1993; Lindley, 1998), uma vez que as ERO estão associadas a várias doenças degenerativas, estando estas por sua vez associadas ao envelhecimento (Packer & Weber, 2001).

Os RL ou as ERO são capazes de causar a oxidação dos lípidos e das proteínas, a quebra de ligações do DNA, modificações das bases e modulação na expressão do gene (Lee *et al.*, 2004).

2.2.1. Oxidação dos lípidos

A oxidação dos lípidos é uma reacção em cadeia de um RL e de uma ERO que pode acelerar a sua própria oxidação, estando as membranas celulares envolvidas neste processo (Girotti, 1998). As cadeias longas de lípidos são, também, altamente susceptíveis de ser lesadas pelas ERO, podendo ocorrer reacções de peroxidação lipídica em cadeia. Um dos produtos da oxidação dos lípidos, malonaldeído, reage com os fosfolípidos e os ácidos nucleicos sofrem uma modificação estrutural que induz disfunções no sistema imunitário. Os compostos não radicais, formados durante a degradação dos ácidos gordos, podem, ainda, ter um efeito lesivo nas estruturas biológicas, uma vez que são menos reactivos, conseguem atingir biomoléculas distantes do seu local de origem, com as quais estabelecem ligações covalentes. Os produtos da oxidação dos lípidos foram encontrados em doenças como a diabetes, arteriosclerose e doença do fígado. As lipoproteínas de baixa densidade são estruturas complexas e as modificações oxidativas destas estão envolvidas no desenvolvimento da arteriosclerose e doenças cardiovasculares. (Frei, 1995).

2.2.2. Oxidação das proteínas

As ERO podem atacar proteínas produzindo o grupo carbonilo e outras modificações nos aminoácidos. As modificações das proteínas são iniciadas pelo radical hidroxil levando à oxidação de cadeias de aminoácido, proteína-proteína “*cross linkage*” e fragmentação protéica (fig.2.3a) (Berlett & Stadtman, 1997; Stadtman, 2000). A disponibilidade do oxigénio, do anião superóxido e a sua forma protonada (HO_2^-) determinam a via do processo de oxidação das proteínas. (Lee *et al.*, 2004).

A indução do 3-clorotirosina em tirosina pela acção do ácido hipoclorídrico, a oxidação da histidina em 2-oxohistidina no local de ligação do metal à proteína, a oxidação dos grupos triol e a geração de derivados de carbono dos aminoácidos são alguns exemplos de modificações protéicas (Berlett & Stadtman, 1997). O 4-hidroxil-2-nomenal da oxidação dos lípidos pode reagir com resíduos de lisina, histidina e cisteína levando à formação da proteína carbonilo dos aldeídos (fig.2.3b). O malonaldeído também da oxidação dos lípidos reage com grupos de proteínas

causando a oxidação destas. A nitrotirosina, produto das espécies reactivas de nitrogénio na tirosina, foi detectada em lesões arterioscleróticas, urina e fluidos corporais em pacientes com doenças inflamatórias crónicas (Virag *et al.*, 2003).

A oxidação das proteínas afecta as alterações nos mecanismos de transdução do sinal, sistemas de transporte, actividades enzimáticas e aterosclerose (Stadtman, 1992; Berlett & Stadtman, 1997).

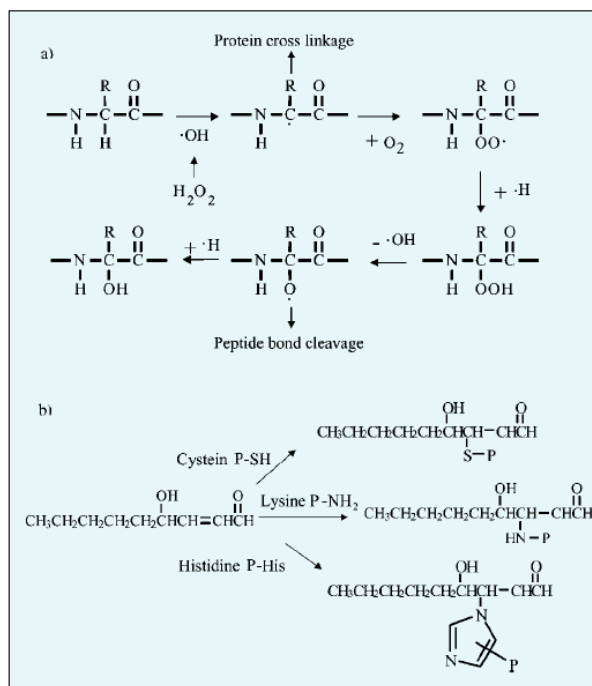


Figura 2.3 Mecanismos de oxidação das proteínas (a) e formação da proteína carbonilo dos aldeídos (b). Fonte: Lee *et al.*, 2004.

2.2.3. Modificações e quebra de ligações no DNA

A hipótese da lesão oxidativa do DNA no fenómeno de envelhecimento é sustentada por evidências experimentais. As mitocôndrias e o núcleo possuem o seu próprio DNA, sendo que o DNA mitocondrial é muito sensível a danos oxidativos devido à falta de proteínas protectoras, histonas, e locais fechados a sistemas produtores de espécies reactivas de oxigénio. O radical hidroxil oxida a guanina ou timina em 8-hidroxil-2-desoxiguanina e glico timina, respectivamente, modificando o DNA, ocorrendo a mutagenese e a carcinogenese (Ames *et al.*, 1993).

O aumento do stress oxidativo mitocondrial pode desencadear uma série de reacções em cadeia que terão como resultado o termo da vida da célula, possivelmente por apoptose ou autólise (Nicholls *et al.*, 2000). A lesão oxidativa do DNA, leva a um declínio na função celular que poderá contribuir decisivamente para o fenómeno de envelhecimento e doenças degenerativas associados aos processos

envelhecimento secundário, como o cancro (Ames & Gold, 1991; Lezza *et al.*, 1999; Sohal *et al.*, 1993). Um baixo nível de danos oxidativos de bases no DNA foi encontrado em pessoas saudáveis, sendo que o contrário foi encontrado em pessoa com doenças inflamatórias crónicas com a artrite reumatóide (Halliwell, 1997).

É necessário ter consciência de uma inter-relação entre os factores que influenciam o envelhecimento, ou que são dele consequência, de modo a compreender o processo de envelhecimento (Mota *et al.*, 2004).

2.3. Mecanismos para combater o Stress Oxidativo

O nível de lesão celular causada pelas ERO depende, no entanto, da capacidade de defesa dos antioxidantes, assim como, da capacidade de reparação celular. Isto é, os organismos aeróbios possuem sistemas de defesa orgânicos para proteger as suas células dos efeitos nocivos dos produtos do metabolismo oxidativo, transformando-os noutros produtos menos tóxicos ou não tóxicos (Lawler & Powers, 1999). Um antioxidante é, por definição, qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações relativamente às concentrações dos substratos oxidáveis, atrasa significativamente, ou inibe, a oxidação desses substratos por ERO (Sies, 1997). Os antioxidantes compreendem sistemas enzimáticos e não enzimáticos, podendo a neutralização das ERO ser complementada por diversos antioxidantes (Goldfarb, 1999). Neste sentido, para confrontar as reacções potencialmente nefastas iniciadas pelo metabolismo oxidativo, os organismos possuem uma grande diversidade de mecanismos de defesa, que incluem a prevenção, a intercepção e a reparação (Laires *et al.*, 2001).

Os mecanismos de prevenção actuam de modo a evitar a formação de ERO. Neste grupo estão incluídas enzimas e moléculas que previnem a formação de compostos reactivos de oxigénio. São exemplos, as enzimas da cadeia respiratória que catalisam a redução do oxigénio a água sem que ocorra a formação de radicais livres de oxigénio, assim como as moléculas que ligam iões metálicos (ex. o ferro ligado à hemoglobina) e que impedem a participação livre destes iões em reacções do tipo Haber-Weiss (Laires *et al.*, 2001). É possível que danos provocados nas enzimas implicadas nos processos de prevenção possam ser responsáveis pelo aumento da produção de ERO. Considerando, como exemplo, as enzimas da cadeia respiratória, é possível que erros na síntese destas enzimas contribuam para o aumento dos níveis de ERO formadas pela célula (Shadel & Clayton, 1997).

O aumento de ERO pode induzir, em situações extremas, à morte celular. Contudo, há sempre a possibilidade destes compostos reactivos serem

interceptados por enzimas e moléculas antioxidantes. A intercepção das ERO é efectuada pelos mecanismos antioxidantes que protegem as células e tecidos dos efeitos negativos das ERO (Sen, 2001). Os antioxidantes biológicos são um pré-requisito para a sobrevivência das células e incluem: 1) compostos enzimáticos, tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx); 2), moléculas que neutralizam os radicais hidrofílicos como o ascorbato, o urato, e a glutathione reduzida (GSH); 3) moléculas que neutralizam radicais lipofílicos como os tocoferóis, flavonóides, carotenóides e ubiquinol; 4) enzimas envolvidas na redução de formas oxidadas de pequenos antioxidantes moleculares (glutathione redutase, dehidroascorbato redutase) ou responsáveis pela manutenção dos grupos tiol das proteínas (tioredoxina redutase); e 5) os mecanismos celulares que mantêm um meio reduzido (por exemplo, glucose-6-fosfato desidrogenase, que regenera o NADPH -fosfato de dinucleótido de adenina nicotinamida) (Beckman e Ames, 1998).

As principais enzimas antioxidantes presentes nos sistemas biológicos são a SOD, a GPx e a CAT (Halliwell, 1991). Em situações de stress oxidativo intenso, estas enzimas são capazes de produzir espécies menos reactivas ou de neutralizar metabolitos do oxigénio reactivo (Powers & Leeuwenburgh, 1999). A SOD catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogénio e oxigénio (Fig. 2.4). A CAT converte o H₂O₂ em água e oxigénio. A GPx catalisa a redução do H₂O₂ e outros hidroperóxidos (ROOH), utilizando a glutathione reduzida (GSH) como dador de electrões, formando glutathione oxidada (GSSG) (Yu, 1994). Uma vez que a funcionalidade da GPx está dependente da GSH como dador de electrões as células possuem a enzima glutathione redutase (GR) capaz de regenerar a GSH a partir da GSSG (Wang e Ballatori, 1998).

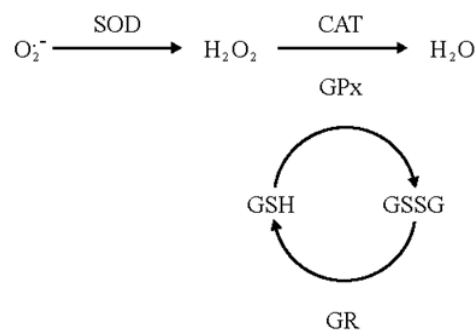


Figura 2.4. Enzimas antioxidantes. Fonte: Luchese, 2009.

Para além das enzimas antioxidantes, os organismos aeróbios possuem, também, mecanismos não enzimáticos antioxidantes, lipofílicos (vitamina E, β -carotenos, ubiquinona e ubiquinol e flavonóides) e hidrofílicos (vitamina C e glutatona), que (i) previnem a formação de radicais, (ii) neutralizam as ERO ou convertem-nas em espécies menos activas, (iii) participam na reparação dos danos iniciados pelos radicais e (iv) participam, em conjunto com outros agentes, na manutenção do equilíbrio do estado redox da célula (Goldfarb, 1999). Na sua grande maioria, os antioxidantes não enzimáticos são exógenos, pelo que tem que ser veiculados pelos alimentos.

2.4. Antioxidantes Nutracêuticos

Entende-se por antioxidante nutracêutico um alimento ou parte deste que promove benefícios médicos como a prevenção ou tratamento de doenças. Os antioxidantes nutracêuticos podem inibir ou diminuir a formação de RL, interrompendo a reacção em cadeia destes na propagação da oxidação dos lípidos. Os nutracêuticos podem ser agrupados de diferentes maneiras, dependendo da fonte de alimentação, do modo de acção, e da estrutura química (Wildman, 2001). Podem ser enzimas, compostos doadores de hidrogénio, metais quelantes, e supressores do oxigénio singlete (Lee *et al.*, 2004).

2.4.1. Dadores de hidrogénio

Os antioxidantes que são capazes de doar um átomo de hidrogénio aos RL, são capazes de convertê-los em radicais estáveis e produtos não radicais, prevenindo a oxidação dos lípidos. A etapa da propagação na oxidação dos lípidos é lenta e a concentração do radical peroxil leva a cabo a formação um dos maiores radicais de ácidos gordos (Frankel 1985). Os “scavengers” dos radicais livres, que reagem com o radical peroxil antes dos ácidos gordos polinsaturados (PUFA), previnem a oxidação dos lípidos. Os antioxidantes de cadeira-quebrada doam átomos de hidrogénio ao radical peroxil e convertem-no num produto estável e não radical. (tab.1) (Decker 1998; Decker *et al.*, 1999). Os radicais antioxidantes formados por antioxidantes doadores de hidrogénio podem reagir com a alquila, com o alcoxil, com o radical peroxil dos PUFA e com os compostos estáveis gerais não radicais (tab.1).

Tabela 1. Reacção dos antioxidantes doadores de hidrogénio com os radicais. Fonte: Lee *et al.*, 2004.

R·	+	AH	→	RH	+	A·
RO·	+	AH	→	ROH	+	A·
ROO·	+	AH	→	ROOH	+	A·
R·	+	A·	→	RA		
RO·	+	A·	→	ROA		
ROO·	+	A·	→	ROOA		
Antioxidant	+	O ₂	→	Oxidized antioxidant		

Quando os compostos actuam como antioxidantes ou pro-oxidantes podem ser determinados pelo potencial de redução standard de 1 electrão. (tab.2). Os potenciais de redução standard de 1 electrão da alquila, do alcoxil e o do radical peroxil dos PUFA são 600, 1000 e 1600 mV, respectivamente (tab.2) (Buettner 1993). Para funcionarem como antioxidantes e prevenirem a oxidação dos lípidos o potencial de redução do “scavenger” dos radicais livres tem de ser inferior a 600 mV, uma vez que este corresponde ao potencial de redução dos PUFA (Buettner 1993).

Tabela 2. Potências de redução standard de 1 electrão (mV) a pH 7 para a selecção de radicais pares. Fonte: Lee *et al.*, 2004.

HO·, H+ / H ₂ O	2310
RO·, H+ / ROH	1600
ROO·, H+ / ROOH	1000
GS-/GS ⁻ (glutathione)	920
PUFA·, H+ / PUFA	600
Catechol·, H+ / Catechol	530
α-Tocopheroxyl·, H+ / α-Tocopherol	480
H ₂ O ₂ , H+ / H ₂ O, HO·	320
Ascorbate ⁻ , H+ / Ascorbate	282
O ₂ /O ₂ ⁻ ·	-330
RSSR/ RSSR ⁻ (GSH)	-1500
H ₂ O / e ⁻ _{aq}	-2870

^aGSH = reduced glutathione; PUFA = polyunsaturated fatty acids.

Os radicais livres recém-formados a partir dos antioxidantes nutracêuticos devem ser estáveis o suficiente para não participar de outras reacções em cadeia de oxidação lipídica. Os radicais de compostos fenólicos podem ser estabilizados por meio da formação estruturas de ressonância (Fig.2.5).

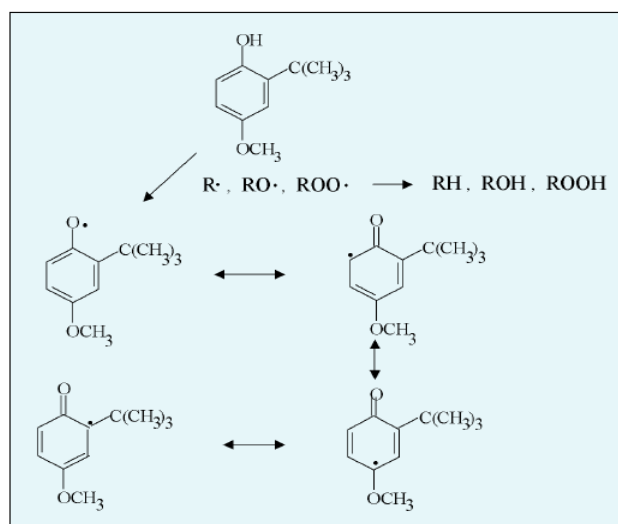


Figura 2.5. Estruturas de ressonância na estabilização dos radicais antioxidantes fenólicos. Fonte: Lee et al., 2004.

2.4.2. Metais quelantes

Os metais de transição como ferro e cobre desempenham papéis importantes em etapas de iniciação e propagação da oxidação lipídica. No início da etapa de oxidação do oxigênio é necessário haver a remoção de um átomo de hidrogênio e a presença de um metal pode acelerar a etapa de iniciação da oxidação lipídica. Os metais podem decompor o hidroperóxido para formar um radical peróxido e o alcóxil, acelerando também a oxidação lipídica (Min, 1998; Papas, 1999). Estes também estão envolvidos na formação do oxigênio singlete e se o peróxido de hidrogênio reagir com um íon metálico de transição é capaz de formar o radical hidroxilo (Lee et al, 2004).

Os metais quelantes formam íons complexos ou compostos com metais, ocupando todos os sítios de coordenação do metal, prevenindo a oxidação cíclica do metal. Estes são capazes de prevenir a interação entre metais e intermediários lipídicos. Exemplo destes são o ácido ascórbico, ácido cítrico e alguns aminoácidos (Decker 1995; Halliwell et al., 1995; Ramon & Gonzalo, 2002).

2.4.3. Supressores do oxigênio singlete

Existem 2 mecanismos (físicos e químicos), o mecanismo físico consiste na conversão do oxigênio sigleto num trio de oxigênio por transferência de energia ou transferência de cargas, sem quaisquer intermediários. No mecanismo químico envolve vários intermediários, como a oxidação dos produtos. Os supressores do oxigênio sigleto devem possuir uma estrutura rica em elétrons, tais como moléculas com ligações duplas para reagirem com o oxigênio singlete. Os

carotenóides são uns bons supressores do oxigénio sigleto, uma vez que possuem varias ligações duplas na sua constituição (Boff & Min, 2002). O ácido úrico tem sido considerado um bom eliminador do oxigénio sigleto (Halliwell, 1996), sendo que a tirodoxina tem sido indicada como boa supressora do oxigénio sigleto, bem como do radical hidroxil, que actua independentemente do seu potencial redox (Kumuda & Chandan, 2000).

2.5. Fitoquímicos com Actividade Antioxidante

2.5.1. Tocoferol e Tocotrienol

O tocotrienol é o análogo insaturado do tocoferol (vitamina E). Estes apenas diferem na sua estrutura de três ligações duplas na posição 3, 7 e 11 da cadeia lateral do tocotrienol (Fig.2.6). Estes são muito apolares e existem na fase lipídica. Os tocoferóis são constituintes naturais das membranas biológicas, sendo que os tocotrienóis são encontrados principalmente no óleo de palma, grãos, cereais e couve (Watkins *et al.*, 1999).

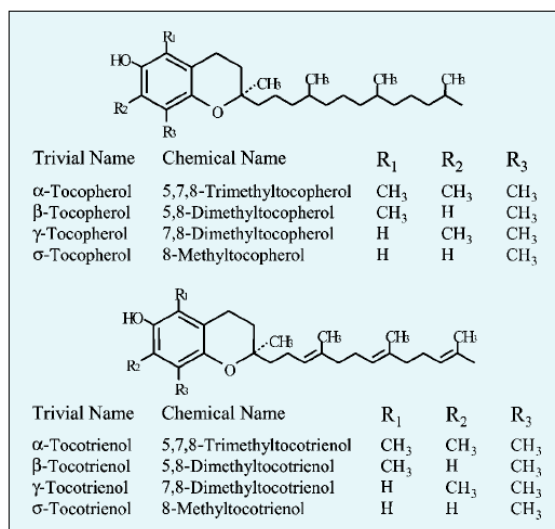


Figura 2.6. - Estrutura do Tocoferol e o tocotrienol. Fonte: Lee *et al.*, 2004.

O tocoferol é um típico e importante antioxidante nos humanos. Este inibe a proliferação de células musculares lisas e a actividade da proteína quinase C, tendo sido associado à redução de doenças cardíacas, à progressão da doença de Alzheimer e na prevenção do cancro (Meydani, 2000).

O tocotrienol tem demonstrado possuir actividade anticancerígena e capacidade de redução do colesterol, havendo estudos *in vitro* que demonstram que estes possuem maior capacidade de inibição da oxidação do LDL (Watkins *et al.*, 1999), uma vez que este possui capacidade de inibir a hidroximetilglutaril-CoA

(HMG-CoA) redutase, uma enzima limitante na via de síntese do colesterol (Rodriguez *et al.*, 2006).

O tocoferol e o tocotrienol são potenciais nutracêuticos, uma vez que ambos possuem os mesmos mecanismos antioxidantes, apesar do tocotrienol possuir maior facilidade de mobilidade no interior da membrana biológica, maior capacidade de reciclagem e de inibição da oxidação do fígado do que o tocoferol (Watkins *et al.*, 1999).

2.5.2. Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel, também conhecida por vitamina C, sendo este considerado um nutriente essencial para o homem, pois este não é capaz de sintetizá-lo (Burns, 1959). Este desempenha papéis essenciais no metabolismo mineral, nas funções antioxidantes intracelulares e na protecção das células de plantas e insectos, contra as ERO (Huang *et al.*, 2007).

O ácido ascórbico é oxidado duas perdas sucessivas de electrões simples, sendo primeiro transformado o ácido semi-dehidroascórbico, e de seguida o radical ácido semi-dehidroascórbico que após perder outro electrão forma o ácido dehidroascórbico (fig.2.7). A oxidação do ácido ascórbico pode ser influenciada pelo calor, exposição solar, pH, concentração do oxigénio e actividade da água (Gregory, 1996).

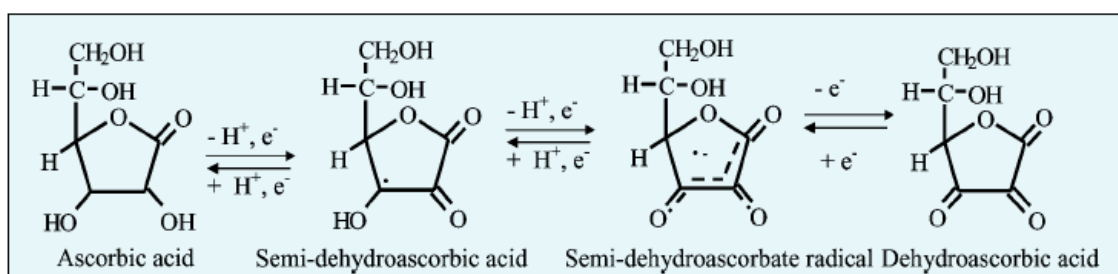


Figura 2.7. Transformação do ácido ascórbico. Fonte: Lee *et al.*, 2004.

O ácido ascórbico está associado na prevenção de certos cancros, doenças cardíacas e gripes comuns (Kaur & Kapoor, 2001).

Os mecanismos antioxidantes do ácido ascórbico são baseados na doação de átomos de hidrogénio aos radicais lipídicos, supressão de oxigénio singlete e na remoção de oxigénio molecular (Rumsey *et al.*, 1999). O ácido ascórbico é um excelente doador de electrões devido ao seu baixo potencial de redução standard de 1 electrão (282 mV), a geração do ácido semi-dehidroascórbico é relativamente estável e de fácil conversão de ácido ascórbico para ácido dehidroascórbico (Rumsey *et al.*, 1999).

A regeneração dos radicais tocoferol em tocoferol através do ácido ascórbico foi conhecida em 1940. Este processo ocorre devido à diferença do potencial de redução standard de 1 electrão entre estes. O grupo de fenol do tocoferol está localizado perto da interface da membrana biológica, sendo assim o ácido ascórbico pode aceder facilmente ao sítio activo do antioxidante dos tocoferóis e regenerar tocoferóis dos radicais tocoferol (Buettner & Jurkiewicz, 1996).

2.5.3. Carotenóides

Os carotenóides são um grupo de tetraterpenóides, responsáveis pela cor amarela, laranja e vermelho de vários frutos e vegetais, sendo sintetizados por plantas, algas, fungos, leveduras e bactérias. O carotenóide é constituído por unidades isoprenóides formados ou pelo cabeça-cauda ou cauda-cauda. Existem basicamente duas classes de carotenóides: os carotenos e as xantofilas (deMan, 1999).

Os principais carotenóides encontrados no sangue humano e que foram investigados em termos de benefícios para a saúde foram o β e α -caroteno, luteína e o licopeno, sendo estes também os mais encontrados nos alimentos (Rodriguez *et al.*, 2006).

O potencial antioxidante dos carotenóides tem sido associado na prevenção de doenças iniciadas por RL, tais como arterosclerose, cataratas e esclerose múltipla, sendo que o consumo de tomate, devido ao licopeno, está associado a vários benefícios para a saúde, bem como a prevenção de vários tipos de cancros e de doenças coronárias (Weisburger, 1999).

Os carotenóides são os maiores supressores do oxigénio singlete no sistema biológico (Foote, 1976). Esta afinidade varia consoante ligações duplas conjugadas, o tipo e o número de grupos funcionais na estrutura do anel das moléculas (Beutner *et al.*, 2000). Em relação à doação de átomos de hidrogénio na actividade antioxidante dos carotenóides existe uma controversa, uma vez que o catião radical β -caroteno pode doar átomos de hidrogénio (Liebler, 1993; Mortensen *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003) e por outro lado consegue doar electrões (Edge *et al.*, 1997).

2.5.4. Ácido lipóico

O ácido lipóico está presente no fígado, na carne e no coração. Este é capaz de prevenir os danos oxidativos das proteínas e actividade antioxidante deste ajuda

a reduzir as complicações da diabetes, uma vez que este desempenha um papel importante na redução da concentração da glucose no sangue. Este possui ainda a capacidade de regenerar a glutathione no fígado, rins e nos pulmões e ainda as vitaminas C e E (Bast & Haenen, 2001).

O ácido lipóico pode melhorar declínio da memória e da função cognitiva, com o aumento da idade, bem como doenças do cérebro, incluindo Alzheimer e Parkinson (Kramer & Packer, 2001). Este é considerado um excelente antioxidante uma vez que possui capacidade sequestradora de RL, de metal quelante, de interação com outros antioxidantes, regeneração metabólica e regulação de genes (Bast & Haenen, 2001).

2.5.5. Polifenóis

Os compostos fenólicos ou polifenóis são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso são capazes de formarem-se em condições de stress, como, infecções, ferimentos, radiações UV, entre outros (Naczk & Shahidi, 2004). Estes são definidos, quimicamente, como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo os seus grupos funcionais. Possuem uma estrutura variável sendo considerados por tal como multifuncionais. Existem cerca de cinco mil fenóis, entre eles, os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (Shahidi & Naczk, 1995).

Estes têm despertado interesses nos últimos anos devido a vários estudos onde estes compostos foram identificados por trazem algum benefício a saúde, desde da prevenção da cárie até ao cancro, devido ao seu poder antioxidante. Apresentam diversas características como, anti-carcinogênicas, anti-aterogênicas, anti-trombóticas, anti-microbianas, vasodilatadora e analgésica (Wollgast & Anklan, 2000).

Os flavonóides são compostos largamente distribuídos no reino vegetal, encontram-se presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos ou agliconas (Harborne *et al.*, 1999). São compostos de baixo peso molecular, consistindo em 15 átomos de carbono, organizados na configuração C6–C3–C6. A estrutura química dos flavonóides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (Fig.2. 8) (Merken & Beecher, 2000).

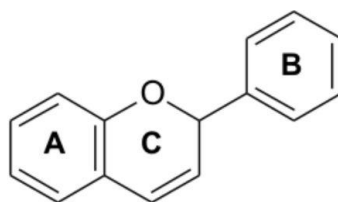


Figura 2.8. Estrutura química dos flavonóides. Fonte: Angelo & Jorge, 2007.

Variações em substituição do anel C padrão resultam em importantes classes de flavonóides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas (fig.2.9). Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonóides. Estas substituições podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfação (Hollman & Katan, 1999).

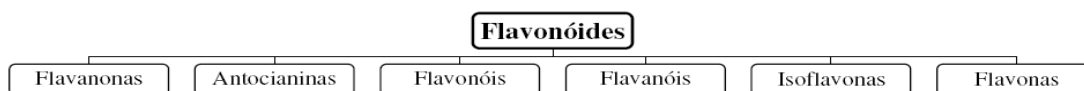


Figura 2.9. Classe de flavonóides. Fonte: Marque, 2008.

De uma maneira geral, estes compostos fenólicos, também designados de fitoquímicos, que constituem as plantas têm vindo despertar interesse entre os cientistas, produtores e consumidores com o intuito da manutenção da saúde humana (Mahan *et al.*, 2002). Estão associados à protecção da saúde humana, reduzindo o risco contra doenças (Júnior *et al.*, 2001) como o caso, do cancro, doença coronária, Alzheimer, doenças neurodegenerativas, arteriosclerose e cataratas (Huang *et al.*, 2006). Os maiores fitoquímicos estão presentes nos frutos e vegetais e têm demonstrando que os polifenóis, como os flavonóides, possuem actividade antioxidante, imunomoduladora e efeitos antígenotóxicos (Chen *et al.*, 2005).

Os antioxidantes fenólicos interagem, preferencialmente, com o radical peróxido por ser este mais prevalente na etapa da autooxidação e por possuir menor energia do que outros radicais, facto que favorece a abstracção do seu hidrogénio (Decker, 1998). O radical fenoxil resultante, embora relativamente estável, pode interferir na reacção de propagação ao reagir com um radical peróxido, via interacção entre radicais. O composto formado, por acção da luz ultravioleta e temperaturas elevadas, poderá originar novos radicais, comprometendo a eficiência do antioxidante, que é determinada pelos grupos funcionais presentes e pela posição que ocupam no anel aromático, bem como, pelo tamanho da cadeia desses grupos (Shahidi *et al.*, 1992; Jadhav *et al.*, 1995).

Este mecanismo de acção dos antioxidantes, presentes em extractos de plantas, possui um papel importante na redução da oxidação lipídica em tecidos, vegetal e animal, pois quando incorporado na alimentação humana não conserva apenas a qualidade do alimento, mas também reduz o risco de desenvolvimento de patologias, como arteriosclerose e cancro (Namiki, 1990; Ramarathnam et al., 1995).

2.6. Biodisponibilidade dos Antioxidantes

A definição de biodisponibilidade é a quantidade ou o percentual de um nutriente ingerido que é absorvida e, portanto, à disposição do corpo para uso metabólico. Biodisponibilidade dos nutracêuticos antioxidante é influenciado por muitos factores, incluindo os tipos de nutracêuticos, isómeros geométricos, métodos de processamento, e matrizes em torno dos compostos (Papas, 1999).

Os tocoferóis e tocotrienóis no sangue e nos tecidos humanos estão na sua forma livre e não esterificado. A esterificação de tocoferóis, que bloqueia o grupo 6-hidroxi de tocoferóis, torna-os mais estáveis para os agentes oxidantes, tais como ar, luz, e metais, sendo utilizado para fortificar alimentos ou suplementos vitamínicos. Os ésteres dos tocoferóis são hidrolisados por lipases e são absorvidos na sua forma livre, não esterificado, sendo este preferencialmente secretado pelo fígado (Papas, 1999). Apesar de os tocotrienóis terem uma maior actividade sequestradora de RL do que os tocoferóis, eles são menos biodisponíveis após a ingestão oral (Parcker et al., 2001).

O ácido ascórbico nos alimentos é principalmente (80% a 90%) na forma reduzida e é absorvido no intestino humano por um sistema de transporte activo dependente de sódio. Nos humanos, este é melhor absorvido do que o ácido dehidroascórbico (Gregory, 1996).

O processamento de alguns alimentos pode afectar a biodisponibilidade. É o caso da absorção do licopeno, a partir de tomates frescos, e do β -caroteno das cenouras frescas que é significativamente menor do que no suco de tomate ou cenoura cozida. O calor do processamento quebra os complexos proteicos dos carotenóides e converte-os na forma *cis* para *trans* β -caroteno, o que podem afectar a biodisponibilidade (Lee et al., 2004).

Verificou-se num estudo Clinton et al., (1996) que a forma *cis* do licopeno representa aproximadamente 50% do total do licopeno no sangue e mais de 80% nos tecidos da próstata, sugerindo assim que o isómero *cis* do licopeno encontra-se mais disponível do que o isómero *trans*, apesar de estes mecanismos de isomerização ainda se encontrarem pouco estudados.

2.7. Alimentos Ricos em Antioxidantes

Os frutos, os vegetais, as especiarias, as ervas e bebidas como o chá e o vinho são alimentos típicos que contêm vários antioxidantes nutracêuticos (Lee *et al.*, 2004). A batata-doce e o inhame são uns bons exemplos de espécies hortícolas, assim como a banana e maçã em termos de espécies frutícolas com antioxidantes nutracêuticos.

A batata-doce (*Ipomoea batatas*) é um vegetal que pertence à família das convolvulaceae do tipo dicotiledônea (Kotecha *et al.*, 1998). Esta é considerada como sendo originária dos trópicos Americanos, mas actualmente encontra-se distribuída por todo o mundo (Oki *et al.*, 2002). Existem diversas variedades às quais se distinguem pelo tamanho, forma, sabor, textura e pela cor do tubérculo. A sua composição e o conteúdo de nutrientes nas diferentes variedades podem variar muito, dependendo da genética e dos factores ambientais (Wu *et al.*, 2008). A quantidade de antioxidantes varia consoante a cor da batata-doce, podendo esta ser desde creme, amarelo vivo, laranja e roxo (Teow *et al.*, 2007). Este vegetal é rico em pro-vitamina A, ácido ascórbico, tiamina, riboflavina, fósforo, ferro e cálcio (Picha, 1985), fibra, minerais, vitaminas e antioxidantes, como é o caso dos ácidos fenólicos, antocianinas, tocoferol e β -caroteno (Woolfe, 1993), cuja sua eficácia antioxidante deverá fornecer vários benefícios para a saúde (Takenaka *et al.*, 2006).

A batata-doce é o único alimento que contém praticamente todos os nutrientes necessários para a saúde, contendo apenas um traço de gordura. Devido à sua constituição, em particular os flavonóides, esta possui capacidade de combate à produção de RL (Chen *et al.*, 2005).

As antocianinas, existentes na batata-doce, possuem propriedades anticarcinogênicas, anti-inflamatórias e anti-alérgicas (Mahan *et al.*, 2002). Recentemente, os interesses nestes pigmentos foram intensificados devido ao seu potencial benefício para a saúde, tais como, actividade antiproliferativa, vasoprotectores e anti-inflamatórios. O pigmento de antocianina tem actividade antimicrobiana e antiviral, pois este possui capacidade antioxidante capaz de neutralizar os RL produzidos pelos danos das biomoléculas (Cho *et al.*, 2003).

Os inhames (*Colocasia esculenta*) são membros da família Aracea (Fernades & Carvalho, 2003). Dependendo da variedade do inhame, a sua polpa pode ser de diferentes cores, branco, marfim, amarelo, vermelho ou roxo, e a sua pele espessa pode adquirir tonalidades brancas, rosa ou castanho.

É um alimento muito rico em amido, cálcio, fósforo, ferro, vitaminas B1, B2, fibras solúveis. (Huang *et al.*, 2006) e boa fonte de potássio, sendo que possui mais do que 50% de proteínas e mais do triplo de amido do que a batata-doce, considerando-se maior fonte de energia do que esta. O inhame possui poder depurativo e desintoxicante, pois este auxilia a eliminação das toxinas do sangue por meio da excreção dessas substâncias através da pele, dos rins e do intestino, sendo recomendado no tratamento de diversas doenças, como reumatismo, artrite, inflamações, infecções e foi durante muito tempo empregado no tratamento contra a sífilis (Leite *et al.*, 2006).

A maçã (*Malus domestica*) pertence à família das *Rosaceae* é importante para a dieta humana uma vez que possui na sua constituição açúcares, ácidos e vários compostos biologicamente activos, como é o caso dos compostos fenólicos, responsáveis pela actividade antioxidante nos frutos (Vieira *et al.*, 2009). Esta é pobre em tocoferol e carotenos, mas em contrapartida é rica em vitamina C (Aprikian *et al.*, 2001). É ideal para a fase do crescimento e deve ser consumida madura, pois esta é antidiarreica, depurativa, protectora da mucosa do aparelho digestivo. Contém diversas vitaminas e minerais, variando um pouco nos valores consoante a variedade, sendo que todas elas possuem vitamina C, encontrando-se em maior quantidade na casca, apesar de algumas não possuem vitamina B1 nem B2 (Santos, 1980).

Estudos recentes têm demonstrado que a cultivar de maçã também pode influenciar substancialmente a actividade antioxidante total e outros aspectos físico-químicos, tais como cor, matéria seca, pH e teor de sólidos solúveis, açúcares totais, ácidos, fenóis e antocianinas. Estes parâmetros podem fornecer informações importantes ao consumidor em termos de reconhecimento um fruto mais nutritivo (Vieira *et al.*, 2009).

A banana (*Musa acuminata*) é uma planta tropical que possui protecção própria contra o stress oxidativo causado pelo sol e pelas elevadas temperaturas, produzindo antioxidantes. Esta é muito rica em minerais, tais como o cálcio e potássio, possuindo em grande quantidade ferro e algumas vitaminas como, A, C e B, sendo considerada um bom antioxidante natural, devido ao seu alto teor de polifenóis (Mokbel & Hashinaga, 2005).

A banana verde e os seus produtos derivados têm demonstrado diversos benefícios, uma vez que estes são ricos em amido resistente e fibra alimentar que após a sua ingestão provoca um aumento da glicemia pós-prandial, caso seja após a uma refeição e quando ingeridos antes de alimentos, com alto índice glicêmico,

também são capazes de diminuir a quantidade de glicose circulante, sendo um factor importante na diminuição de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (Cardenette. 2006).

O consumo regular de frutas e hortaliças reduz o risco de doenças cardiovasculares, certos tipos de cancro, e outras doenças crónicas. Estes efeitos benéficos das frutas e hortaliças têm sido atribuídos, em parte, ao seu alto teor de flavonóides, sendo que o seu consumo está inversamente relacionado com a incidência de muitas doenças crónicas. (Lotito & Frei, 2004).

Os benefícios para a saúde do consumo de frutas e legumes estão relacionados com o seu conteúdo nutricional. Baixo valor energético, riqueza em fibras, vitaminas, minerais e antioxidantes. Estão comprovados os efeitos benéficos de algumas destas substâncias, nomeadamente carotenos, antocianinas e outros antioxidantes na prevenção do cancro e das doenças cardiovasculares (Cadenas e Packer, 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Caracterização da amostra

No presente trabalho foram analisadas amostras de diferentes variedades de batata-doce, inhame, banana e maçã, as quais foram fornecidas pela Associação de Produtores de Frutas, de Produtos Hortícolas e Florícolas da Ilha Terceira (FRUTER).

3.1.1. Batata-doce

Foram analisadas as seguintes variedades: vermelha, branca, americana, roxa, madeira, salmão e roxa com folha recortada, provenientes de Santa Bárbara, Fontinhas, Biscoitos e Ribeirinha. A fim de comparar as características das batatas-doces da Terceira com as do Continente, utilizou-se uma amostra proveniente do Continente, comprada no hipermercado, da variedade vermelha.

As amostras apresentavam polpas de diferentes cores como laranja, amarelada, branca e salmão, sendo que as cascas também apresentavam diferentes tonalidades, desde vermelha, roxa e acastanhada (fig.3.1). Todas as amostras apresentavam seis meses de cultivo.

As amostras foram transportadas para o laboratório após a colheita de todas as amostras para um local escuro e arejado até ao dia seguinte onde se realizou as diferentes técnicas.



Figura.3.1. Aspecto de algumas das variedades de batata-doce, utilizadas no estudo.

3.1.2. Inhames

Foram analisadas as seguintes variedades: Branco, mulato, roxo e vermelho, com proveniência de Santa Bárbara, Agualva, São Pedro, São Mateus e Fontinhas. A fim de comparar as características dos inhames da Terceira utilizou-se uma amostra proveniente do Continente, comprada no hipermercado.

As amostras apresentavam polpas de diferentes cores como branca, vermelha e roxa. Em relação à casca esta era idêntica nas diferentes amostras,

tonalidade cinza (fig.3.2). As amostras apresentavam entre seis meses, um, um ano e meio e dois anos de cultivo.

As amostras foram transportadas para o laboratório após a colheita de todas as amostras para um local escuro e arejado até ao dia seguinte onde se realizou as diferentes técnicas.



Figura 3.2. Algumas variedades de inhame da ilha Terceira.

3.1.3. Banana

A variedade estudada foi a pequena anã (variedade regional) proveniente de produtores do Porto Judeu, São Sebastião, São Bento, Fonte Bastardo, Terra-chã e Sé. Como comparação utilizou-se a variedade brier (variedade importada), cultivada no Porto judeu.

As amostras apresentavam tamanhos distintos entre as diferentes localidades e apresentavam 18 meses de cultivo. Foram transportadas para o laboratório as amostras verdes e intermédias, sendo analisadas no próprio dia. As amostras maduras foram amadurecendo no laboratório num local escuro e arejado, sendo posteriormente analisadas.

3.1.4. Maçã

Foram seleccionadas variedades que tinham sido submetidas anteriormente a uma prova organoléptica e sido consideradas como pelo menos boas nos diferentes critérios utilizados (actividade, aroma, firmeza da polpa, textura, teor em sumo, doçura, acidez, aspecto global e a preferência entre gostar e comer). De entre estas, foram escolhidas as variedades que tinham genótipos diferentes (Foroni *et al.*, 2010). As variedades estudadas foram: branca, doce, desconhecida, calhau, rabogil, pêro branco, são João, pêro amarelo e pêro branco chocalha a pevide. Estas eram provenientes de um campo de colecção instalado nos Serviços de Desenvolvimento Agrário da Terceira, na Vinha Brava (SDAT), excepto a variedade maçã branca que foi colhida na freguesia da Casa da Ribeira. Este campo

surgiu no âmbito do projecto “Germobanco Agrícola da Macaronesia” que teve início em 2002 nos Açores e na Madeira com cerca de 100 cultivares locais de maçãs, pêra, ameixa, castanha, batata-doce e inhame já inventariados nos Açores (Froni *et al.*, 2010) com o intuito de não perder esses cultivares. As macieiras tinham como origem as freguesias de São Sebastião, Terra-chã, Agualva, Casa da Ribeira, Biscoitos, Fonte Bastardo e São Mateus, tendo sido retiradas desses locais e enxertadas no campo de colecção do SDAT, em Março de 2005 onde se encontra até à actualidade.

As amostras apresentavam diferentes tonalidades de casca, vermelha, verde, amarela e bicolor. As árvores de onde foram colhidas apresentavam 5 anos e 6 meses.

Foram transportadas para o laboratório após a colheita de todas as amostras para um local escuro e arejado até ao dia seguinte onde se realizou as diferentes técnicas.

3.2. Tratamento das amostras

3.2.1. Batata-doce

- **Crua** – Foi lavada com água corrente e descascada.
- **Cozida sem casca** - Foi lavada com água corrente, descascada e colocada num tacho, adicionando-se 500 ml de água, para uma amostra e colocou-se ao lume. Após a água começar a ferver, retirou-se a amostra após 30 minutos.
- **Cozida com casca** - Foi lavada com água corrente e colocada num tacho, adicionou-se 500 ml de água, para uma amostra e colocou-se ao lume. Após a água começar a ferver, retirou-se a amostra após 30 minutos.
- **Escaldão** – Foi lavada com água corrente e colocada em 500 ml de água a ferver durante 2 minutos.
- **Assada** - A batata-doce foi lavada com água corrente e foi ao forno durante 30 minutos.

-
- **Cozida ao vapor com casca** - A batata-doce foi lavada com água corrente e foi colocada na bimby durante 30 minutos. No reservatório de água da bimby foi colocado 1L de água.
 - **Cozida ao vapor sem casca** - A batata-doce foi lavada com água corrente, descascada e foi colocada na bimby durante 30 minutos. No reservatório de água da bimby foi colocado 1L de água.

Cada amostra foi preparada apenas uma vez e desta foi realizado três ensaios.

3.2.2. Inhame

- **Cru** – Lavou-se bem o inhame com água corrente e descascou-se.
- **Cozido com casca** – Lavou-se um inhame com água corrente e colocou-se num tacho com 500 ml de água a cozer durante 30 minutos.

Cada amostra foi preparada apenas uma vez e desta foi realizado três ensaios.

3.2.3. Banana

Utilizaram-se unicamente amostras cruas, analisando-se apenas a polpa, tendo-se analisado bananas em três estados de maturação distintos: verde, intermédia (inchada) e madura (Fig. 3.3).



Figura 3.3. Diferentes estados de maturação

3.2.4. Maçã

Utilizaram-se unicamente amostras cruas, tendo-se analisado polpa e polpa com a casca. Partiu-se a maçã a meio e uma das metades foi utilizada para a análise da polpa e a outra metade da polpa com a casca. Realizaram-se três repetições para cada amostra, utilizando para o efeito diferentes maçãs da mesma árvore.

3.3. Preparação dos extractos

3.3.1. Para o teste da Peroxidase

Os extractos foram preparados segundo a metodologia descrita por Teow *et al.* (2007), com algumas modificações. Cada amostra a analisar foi cortada em pequenos pedaços e pesados 20 g dos mesmos, os quais foram imediatamente colocados num blender (press to go, flama), aos quais se adicionou 20 ml de água destilada e triturou 3 vezes. Filtrou-se com papel de filtro (Ahlstrom de 150 mm) directamente para um tubo de centrífuga (VWR), com o auxílio de um funil de vidro, e colocou-se em gelo.

3.3.2. Para o teste da DPPH

Os extractos foram preparados do mesmo modo como para o teste da peroxidase, excepto que em vez de água destilada utilizou-se metanol (Melo *et al.*, 2009; Pyo *et al.*, 2004).

3.3.3. Para a determinação dos diferentes polifenóis

As amostras a analisar foram cortadas em cubos e trituradas num blender (press to go, flama). Pesou-se 2g do triturado para um tubo de centrífuga (VWR) ao qual se adicionou 40 ml de 7 metanol/6 água/7 acetona, ficando sob agitação durante 4 horas. Após o tempo de extracção, centrifugou-se a 4000 rpm durante 30 minutos numa centrífuga (Heraeus Megafuge 1.0 R), colectou-se o sobrenadante e acertou-se o volume para 40 ml com acetona, sendo congelado no prazo máximo de uma semana, para quantificação de polifenóis totais e de flavonóides (Nayaka *et al.*, 2010). Para a determinação de polifenóis livres o sobrenadante em vez de ser congelado foi colocado num rotavapor (Büchi) a 30 °C, a fim de evaporar a acetona e o metanol. O extracto aquoso foi acidificado com HCl a 10 M para pH=2, medido num potenciómetro Inolab level 1, sendo realizada de seguida uma extracção do tipo líquido-líquido descontínua com éter etílico como descrito por Nayaka *et al.* (2010) com algumas modificações. Numa ampola de decantação colocou-se o extracto acidificado e adicionou-se 10 ml de éter etílico (VWR), tapou-se a ampola e agitou-se cinco vezes abrindo sempre a torneira entre cada agitação para a libertação dos vapores. Seguidamente, deixou-se a ampola em repouso e aberta,

até haver a separação das duas fases. A fase orgânica é recolhida para um balão e a fase inorgânica foi sujeita a uma nova extracção, sendo este processo repetido seis vezes. No final das seis extracções as várias fases orgânicas colectadas foram colocadas no rotavapor (Büchi) a 30 °C até à evaporação total, sendo o extracto seco obtido dissolvido em 2 ml de metanol e congelado durante uma semana para posterior quantificação dos polifenóis livres.

3.4. Teste da peroxidase

Esta técnica baseia-se no estado de oxidação da enzima peroxidase pelo peróxido de hidrogénio (H₂O₂). A reoxidação da enzima é feita pelo guaiacol, o qual quando oxidado, devido ao electrão desemparelhado, torna-se fortemente corado de castanho, com absorção 436nm. Quando é adicionado um antioxidante à reacção, este vai competir com o guaiacol pela doação dos electrões, havendo a formação de uma menor quantidade de composto castanho o que se reflecte numa menor absorvância a 436nm (fig. 3.4.).

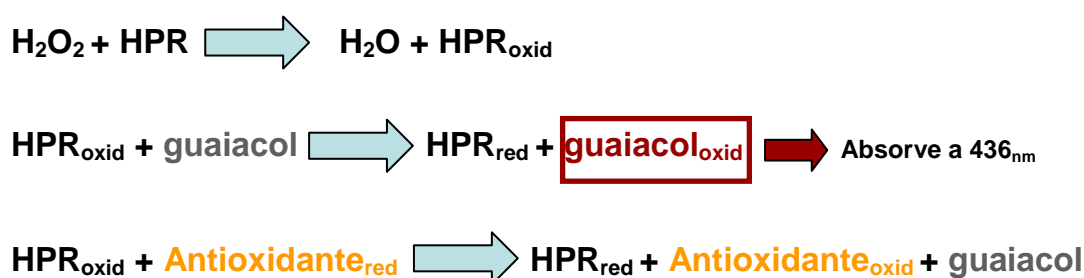


Figura 3.4. Ilustração da reacção do teste da peroxidase. Modificado de Antwerpen & Neves (2004).

3.4.1. Procedimento

Seguiu-se a metodologia descrita inicialmente por Aruoma *et al.* (1989) e modificada por Antwerpen & Nèves (2004). Foram adicionados os seguintes reagentes nas referidas concentrações finais, a uma cuvette descartável cujo volume final de reacção foi 3 ml: tampão KH₂PO₄/KOH 20 mmol/l a pH 7,4, guaiacol a 0,01% (v/v) a enzima *horseradish peroxidase* (HRP) tamponizada a 0,05% (w/v) e o extracto da amostra a analisar (66.7 mg/ml). Incubou-se a 25°C durante 20 minutos, e adicionou-se o H₂O₂ (0.5 mM, Merck) imediatamente antes de começar a ler a absorvância a 436 nm no espectrofotómetro (Thermo Scientific – Genesys 10 Bio). A

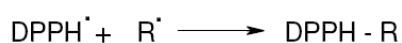
absorvância foi lida em intervalos de 10 segundos durante durante 5 minutos. Este procedimento foi realizado em triplicado. Validou-se a metodologia utilizando uma molécula com a actividade antioxidante conhecida o ácido ascórbico (Anexo 1).

3.5. Teste do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazol)

Um dos papéis mais importantes dos antioxidantes é a sua actividade anti-radical, por essa razão utiliza-se frequentemente esta propriedade para avaliar a capacidade antioxidante. O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) é um radical livre estável que é capaz de aceitar um electrão ou um átomo de hidrogénio tornando-se num não radical que dificilmente se oxida. Apesar do DPPH ser um radical sem importância biológica, é vulgarmente utilizado em trabalhos para avaliar a actividade antioxidante em extractos de plantas (Blois, 1958).

Devido ao electrão desemparelhado, o DPPH apresenta-se fortemente corado de violeta, com absorção a 517 nm. Se este electrão emparelhar essa coloração desaparece numa estequiometria proporcional ao número de electrões captados, resultando numa descoloração da solução de violeta para amarelo (Blois, 1958).

Equação da reacção:



Deste modo, a absorção a 517 nm é proporcional à quantidade de DPPH residual, após a reacção com um antioxidante (AH) ou outro radical (R.) (Blois, 1958).

O método do DPPH é rápido, simples, sensível e reprodutível e não requer equipamentos especiais. Embora não seja discriminativo em relação a um determinado grupo de radicais dá uma ideia geral acerca da capacidade antioxidante de um extracto (Marques, 2008).

3.5.1. Procedimento:

Este método foi baseado no Brand-Williams et al., 1995, com algumas modificações. Foram adicionados os seguintes reagentes nas referidas concentrações finais, a uma cuvette descartável cujo volume final de reacção foi de 2,25 ml: o extracto da amostra a analisar a 330 mg/ml e o DPPH da Sigma a 50 mg/L. Após 30 minutos de incubação e ao abrigo da luz, realizou-se a leitura das absorvâncias no espectrofotómetro (Thermo Scientific – Genesys 10 Bio) a 517 nm e em triplicado. O cálculo do poder antioxidante foi feito através da seguinte equação (Melo et al., 2009):

$$AA (\%) = \frac{Abs_{\text{controlo}} - Abs_{\text{amostra}}}{Abs_{\text{controlo}}} \times 100$$

3.6. Determinação dos polifenóis totais (PT) e livres

O método utilizado para a determinação dos polifenóis totais e livres foi o método modificado do Folin-Ciocalteu (Qiu et al, 2010). O reagente Folin-Ciocalteu é composto por tungstato de sódio (W^{6+}), molibdato de sódio (Mo^{6+}), ácido fosfórico e ácido clorídrico. A sua redução ocorre através da perda de entre 1 e 3 átomos de oxigénio a partir do tungstato ou molibdato que apresenta uma cor azul característica que é medida por espectrofotometria a 750 nm (Curvelo-Garcia, 1987).

3.6.1. Procedimento

Foram adicionados os seguintes reagentes nas referidas concentrações finais, a uma cuvette descartável cujo volume final de reacção foi 3,8 ml: extracto da amostra a analisar a 52,63 mg/ml, reagente Folin-Ciocalteu da Sigma a 2 N diluído 10 vezes e carbonato de sódio (Na_2CO_3) da Merck a uma concentração de 60g/L. Após a adição de todos os componentes agitou-se suavemente e deixou-se repousar durante 90 minutos, ao abrigo da luz. A leitura das absorvâncias é efectuada no espectrofotómetro (Thermo Scientific – Genesys 10 Bio) a 725 nm e em triplicado (Qiu et al, 2010). O reagente Folin-Ciocalteu apresenta cor amarela intensa, que após a reacção tornar-se azul de diversas tonalidades consoante a quantidade de polifenóis, sendo que quanto maior for a quantidade de polifenóis mais intensa se

torna a cor. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por 100 g de amostra.

3.7. Determinação dos flavonóides totais (FT)

O método utilizado para a determinação dos flavonóides totais foi o método β -dimetilaminocinamaldeído (DMACA), segundo Arnous *et al.*, (2002), com algumas alterações em relação à preparação da amostra, como foi descrito anteriormente.

3.7.1. Procedimento

Foram adicionados os seguintes reagentes nas referidas concentrações finais, a uma cuvette descartável cujo volume final de reacção foi de 1,2 ml: extracto da amostra a analisar a 166,7 mg/ml e DMACA a 0,1% em HCl a 1N em metanol da Sigma. Agitou-se suavemente e deixou-se repousar à temperatura ambiente durante 10 minutos. De seguida, realizou-se a leitura das absorvâncias no espectrofotómetro (Thermo Scientific – Genesys 10 Bio) a 640 nm (Arnous *et al.*, 2002). Inicialmente o reagente apresenta cor laranja e após ocorrer a reacção com as amostras este altera-se para cor esverdeada ou verde intenso consoante a quantidade de flavonóides. Os resultados foram expressos em mg de catequina por 100 g da amostra.

3.8 Tratamento estatístico

A distribuição dos dados obtidos para a actividade antioxidante tanto pelo método de inibição da HPR como do DPPH não apresentaram uma distribuição normal, pois para se verificar a normalidade do erro no gráfico PP deve-se obter uma recta de declive aproximadamente 1, que não se verificou em ambos os casos. Assim para avaliar se os valores da actividade antioxidante se correlacionavam com o teor em polifenóis utilizou-se um não paramétrico de ranks, Kendall's W, pois como compara ordens de dados a forma como estes se distribuem é irrelevante. Os valores foram calculados no programa Microsoft Office Excel 2003, a partir das fórmulas deduzidas por Legendre (2005). O coeficiente de concordância de Kendall (W), é calculado pela equação 3.1:

$$W=12S/p^2(n^3-n) \quad (\text{Eq. 3.1})$$

Onde n é o número de observações e p o número de variáveis. S é calculado a partir da soma marginal das linhas dos ranks R_i , pela equação 3.2:

$$S = \sum (R_i - R)^2 \quad (\text{Eq. 3.2})$$

S é a soma dos quadrados da diferença entre a soma dos ranks R_i e a média dos valores de R_i , R . O valor do Chi-quadrado que nos permite avaliar a significância do valor de W é nos dado pela equação 3.3.:

$$\chi^2 = p(n-1)W \quad (\text{Eq. 3.3})$$

Os valores dos polifenóis totais, livres e flavonóides foram comparados por análise de variância simples (ANOVA) e pelo teste T-student, para comparar médias entre amostras com variâncias diferentes.

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1. Actividade Antioxidante Batata Doce

4.1.1. Diferentes Variedades

Das diferentes variedades de batata-doce analisadas a que apresentou maior actividade antioxidante foi a batata-doce proveniente da freguesia das Fontinhas (52,04% de inibição da HRP) (Fig. 4.1.), cuja polpa era salmão (Quadro.4.1). Apesar da tonalidade da polpa ser um bom indicativo de actividade antioxidante, ou seja, quanto mais intensa for a cor maior será a actividade antioxidantes (Teow *et al.*, 2007), no presente trabalho a actividade antioxidante das diferentes variedades não se relacionou com a cor da polpa, pois por exemplo, a variedade de polpa alaranjada (Quadro.4.1) apresentou um valor bastante baixo (14% de inibição HPR), enquanto que uma das variedades de polpa branca apresentou um valor bastante elevado (32,5% de inibição HPR).

Variedade	Cor da polpa	Cor da casca	Local de cultivo
Vermelha	Branca	Vermelha	Continente
Branca	Branca	Acastanhada	Fontinhas
Branca	Branca	Acastanhada	Fontinhas
Branca	Branca	Acastanhada	Fontinhas
Madeira	Branca	Castanha	Ribeirinha
Vermelha	Branca	Vermelha	Fontinhas
Vermelha	Branca	Vermelha	Fontinhas
Roxa	Amarela	Roxa	Santa Bárbara
Roxa	Amarela	Roxa	Santa Bárbara
Roxa	Amarela	Roxa	Santa Bárbara
Roxa c/ folha recortada	Amarela	Roxa	Fontinhas
Americana	Laranja	Acastanhada	Biscoitos
Salmão	Salmão	Acastanhada	Fontinhas

Quadro 4.1. Caracterização das diferentes amostras de batata-doce analisadas.

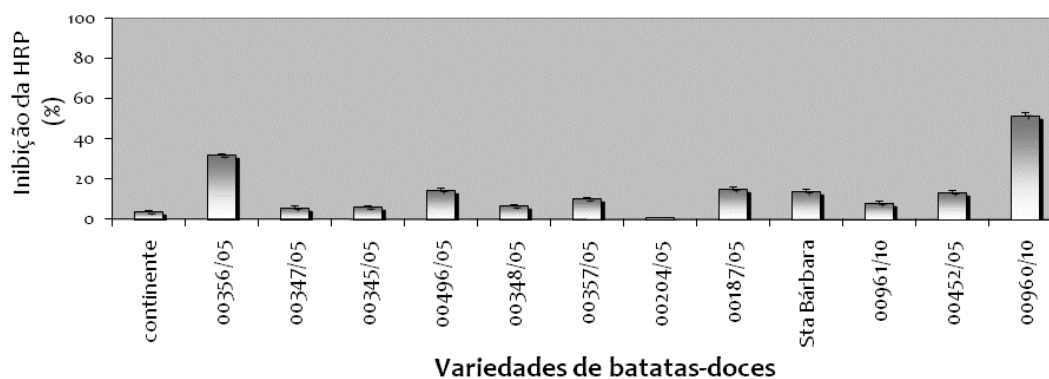


Figura 4.1 Actividade antioxidante de diferentes variedades de batatas-doces da ilha Terceira. Esta actividade foi avaliada pela inibição da HRP e continha 66,7 mg/ml de amostra.

Por outro lado os nossos resultados sugerem a actividade antioxidante da batata-doce é fortemente influenciada pelas práticas de manejo cultivo, uma vez que se verificou que amostras da mesma variedade, provenientes da mesma freguesia mas de produtores diferentes, apresentavam actividades antioxidantes muito distintas: variedade de casca branca (6,03 e 32,52% de inibição de HRP) e de casca roxa (0,90 e 15,58% de inibição de HRP), oriundas das Fontinhas e Santa Bárbara, respectivamente (Fig.4.1).

Quando comparando a amostra proveniente do Continente com as restantes, verificou-se esta foi a que apresentou menor actividade antioxidante (4,27% de inibição da HRP), excepto quando comparada com uma amostra de casca roxa proveniente da freguesia de Santa Bárbara (0,90% de inibição da HRP).

A batata-doce possui uma proteína de reserva, da classe das globulinas, a esporamina, que representa cerca de 60 a 80% do total de proteínas solúveis (Hattori *et al.*, 1990). Esta proteína possui actividade dehidroascorbato (DHA) redutase, a qual recicla o ácido ascórbico, nas plantas, através da DHA (Hossain *et al.*, 1984), desempenhando um papel fundamental no combate ao stress oxidativo (Hung *et al.*, 2005). É pois provável que na batata-doce existam outras moléculas, para além dos polifenóis responsáveis pela cor da polpa, para a actividade antioxidante.

4.1.2. Tratamento culinário

Uma vez que a batata-doce não é consumida crua, testou-se o efeito que os diferentes tratamentos culinários (cozimento em água, em vapor e no forno) poderiam ter na actividade antioxidante. Observou-se que todos os processos aumentaram a actividade antioxidante quando comparadas com a amostra crua (fig. 4.2.), tendo sido obtido o valor mais elevado para a batata-doce cozida que sofreu um escaldão (73,7% de inibição de HRP).

Os tratamentos térmicos provavelmente aumentam a actividade antioxidante uma vez que inactivam enzimas (Fellows, 1988) responsáveis por fenómenos de oxidação, nomeadamente a polifenol oxidase e peroxidase. Sabe-se que o processamento de alguns fitoquímicos é necessário para transformá-los na sua forma activa, tal como já foi demonstrado com os caratenóides, o processamento aumenta a sua biodisponibilidade uma vez que facilita a libertação dos compostos bioactivos da matriz do alimento (Gartner *et al.*, 1997; Rock *et al.*, 1998). Neste sentido, o processamento deve ser tal que evita perdas significativas de fitoquímicos ao mesmo tempo que aumente a sua biodisponibilidade.

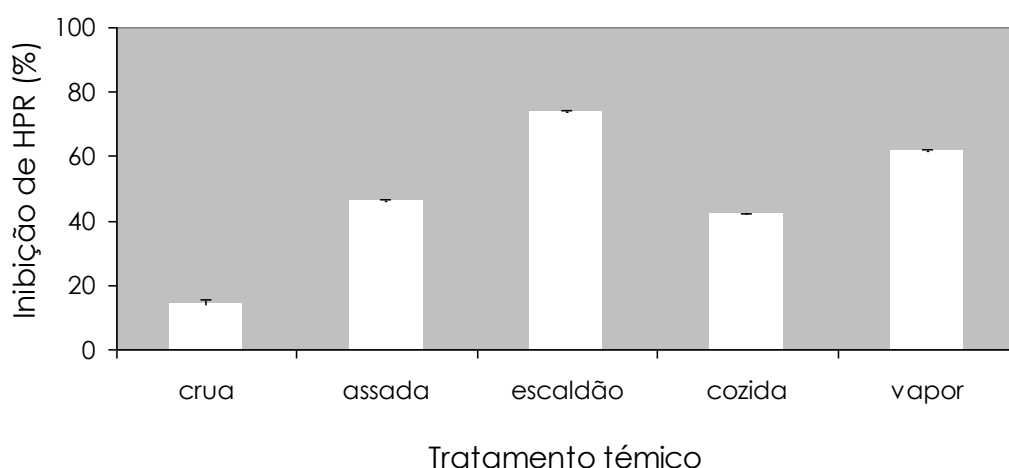


Figura 4.2. Efeito do tratamento térmico na actividade antioxidante da batata-doce de casca roxa. Esta era oriunda da freguesia de Santa Bárbara e a actividade foi avaliada pela inibição da HRP, com 66,7 mg/g de amostra.

Por outro lado, o escaldão como é muito rápido evita que ocorram perdas de fitoquímicos, quer por destruição térmica quer por lixiviação, que possuam

actividade antioxidante, o que justificaria o valor mais elevado. O facto das amostras cozidas em vapor apresentarem uma actividade antioxidante superior às cozidas em água suporta esta hipótese explicativa.

Neste sentido, avaliou-se a actividade antioxidante da polpa de batatas que tinham sido cozidas com e sem casca (fig. 4.3.) e verificou-se que as amostras cozidas com cascas (tanto em água como vapor) obtivera maior actividade antioxidante do que sem casca. Curiosamente, não houve diferenças entre as amostras de batata-doce cozida em água e em vapor quando estas foram cozidas com casca (90% de inibição HPR). Estes resultados sugerem que efectivamente a casca tem uma função de barreira impedindo a lixiviação de compostos responsáveis pela actividade antioxidante observada, pelo que quando as batatas são cozidas com casca as diferenças observadas entre a cozedura em água e vapor deixam de se observar.

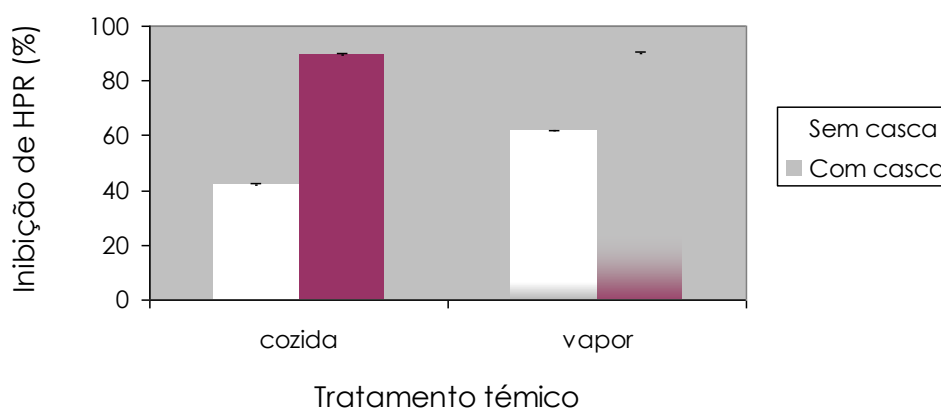


Figura 4.3. Efeito da presença de casca durante o tratamento térmico na actividade antioxidante da batata-doce de casca roxa. Esta era oriunda da freguesia de Santa Bárbara e a actividade foi avaliada pela inibição da HRP, com 66,7 mg/g de amostra.

4.2. Actividade Antioxidante do Inhame

4.2.1. Diferentes Variedades

Como se pode observar na figura 4.4. das diferentes variedades de inhame da ilha Terceira analisadas, a que apresentou maior actividade foi o inhame vermelho das Fontinhas (38,4% de inibição HPR). Verificou-se que algumas das amostras apresentavam valores de inibição da HRP negativos, ou seja, que apresentavam valores de absorvância a superiores aos do controle. Pensou-se que esta observação se deveria ao facto da peroxidase da própria amostra apresentar

uma actividade muito elevada. No entanto, ao compararmos a mesma amostra crua e cozida (fig. 4.5.) verificou-se que a actividade antioxidante em termos de inibição de HRP era praticamente a mesma, pelo que esta hipótese foi posta de lado, uma vez que o tratamento térmico destrói a peroxidase da amostra (Turkmen, *et al.*, 2005,).

Verificou-se que os valores de actividade antioxidante observados nas diferentes variedades de inhame foram inferiores aos valores da batata-doce, os quais estão de acordo com os observados num estudo realizado por Lako *et al.*, (2007) onde se comparavam diferentes vegetais.

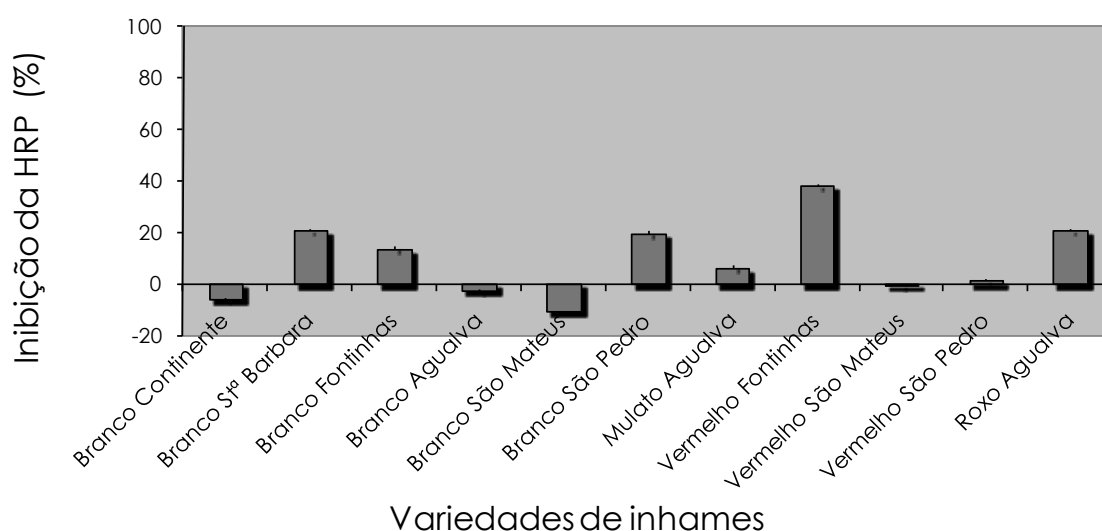


Figura 4.4. Actividade antioxidante de diferentes variedades de inhames da ilha Terceira. Esta actividade foi avaliada em termos de percentagem de inibição da HRP e continha 66,7 mg/g de amostra.

Apesar de que a variedade de inhame que apresentou maior actividade possuir uma polpa avermelhada, tal como se verificou para a batata-doce, não se obteve uma relação entre a cor da polpa e a actividade antioxidante, pois por exemplo a variedade de polpa avermelhada de São Pedro foi o que apresentou menor actividade antioxidante (1,73% de inibição da HRP), enquanto que uma das variedades brancas (de S. Pedro) demonstrou uma actividade muito semelhante à única variedade de polpa arroxeadada (20% de inibição HRP).

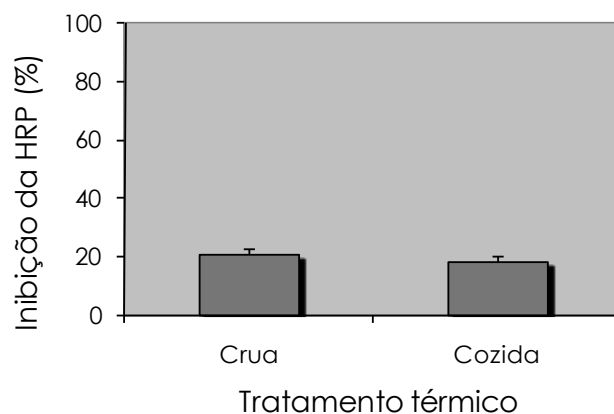


Figura 4.5. Efeito do tratamento culinário na actividade antioxidante do inhame branco. Este era proveniente da freguesia de Santa Bárbara e a actividade foi avaliada pela inibição da HRP, com 66,7 mg/g de amostra.

4.2.2. Tempo na terra

Uma vez que a maioria dos pequenos agricultores de subsistência deixa no solo os inhames que não consomem ou vendem de imediato, como uma estratégia de armazenamento, foi-te testar se o tempo que estes são deixados na terra teria alguma influência na actividade antioxidante, tendo-se observado que os inhames colhidos mais velhos apresentaram actividades muito mais elevadas (Fig. 4.6). Verificou-se quando os inhames eram colhidos com 1 ano apresentavam uma actividade de 19.8% de inibição de HPR, enquanto que com 1 ano e meio e 2 anos apresentavam uma actividade muito superior, de 35.02 e 53.6%, respectivamente.

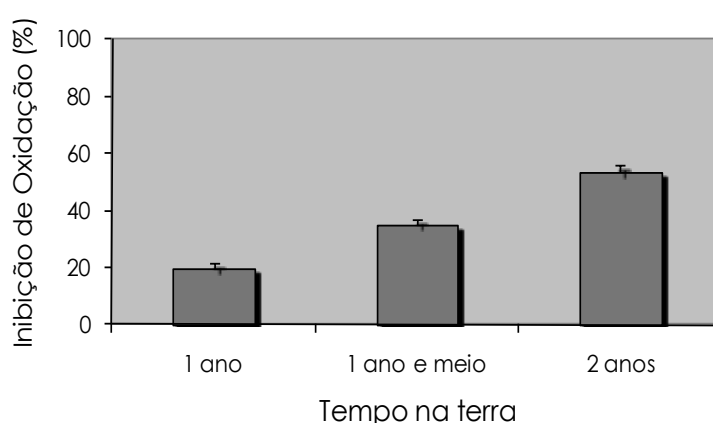


Figura 4.6. Efeito do tempo na terra na actividade antioxidante da variedade de inhame branco. Este era proveniente da freguesia de São Pedro e a actividade antioxidante foi avaliada pela inibição da HRP, com 66,7 mg/g de amostra.

Com base nestes resultados foi-se analisar a informação que possuímos sobre as diferentes amostras e verificou-se que as variedades de polpa branca que possuíam uma actividade antioxidante mais elevada eram proveniente de inhames que tinham sido mantidos na terra por pelo menos 1 ano. Estes resultados sugerem que durante o processo de envelhecimento do inhame na terra forma-se compostos com actividade antioxidante e/ou são degradados compostos com actividade prooxidante.

4.3. Actividade Antioxidante da Banana

4.3.1. Diferentes Variedades

Foram analisadas 10 bananas da variedade Pequena Anã, cultivadas por diferentes produtores em locais distintos da ilha e uma variedade do continente (Brier) cultivada no Porto Judeu, tendo-se verificado que a que apresentou maior actividade antioxidante no estado verde, avaliada pelo teste da peroxidase, foi a banana cultivada na Quinta Bicas na freguesia da Terra-Chã (88,04 % de inibição da HRP) (fig. 4.7.), seguida da cultivada no Arrabalde na freguesia de São Sebastião. A amostra que apresentou menor actividade antioxidante no estado verde foi a banana cultivada na Salga (24,23 % de inibição da HRP). No entanto, no que se refere às amostras maduras a que apresentou uma maior actividade antioxidante, corresponde a uma das que apresentou menor actividade enquanto verde, a cultivada na Canada Ponta em São Sebastião (31,24 % de inibição da HRP).

Quando comparando os três estados de maturação testados, as amostras verdes foram as que apresentaram maior actividade antioxidante para todas amostras analisadas. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Mokbel & Hashinaga (2005), no entanto, surpreendentemente as amostras maduras apresentaram sempre actividades antioxidantes superiores às de estado de maturação intermédia.

Quando comparámos os valores obtidos para a actividade antioxidante avaliada pela inibição da HPR com um dos métodos mais utilizados para avaliar actividade antioxidante (Sharma & Bhat, 2009), que se baseia na compensação do electrão desemparelhado do radical livre do 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH),

verificou-se que os resultados eram bastante diferentes, sendo estes últimos bastante mais elevados e independentes da variedade e do estado de maturação (fig. 4.8.). A comparação dos resultados obtidos por correlação revelou que os dados tanto obtidos pela HPR como pelo DPPH não possuíam uma distribuição normal (Anexo 9), pelo que se aplicou um método não paramétrico que permite correlacionar k variáveis dependentes (Kendall W), tendo-se verificado que os métodos não se correlacionavam uma vez que o valor de Chi-quadrado calculado (44.535) era inferior ao valor da tabela (46.194) para um $\alpha=0.05$ (Anexo 10.1).

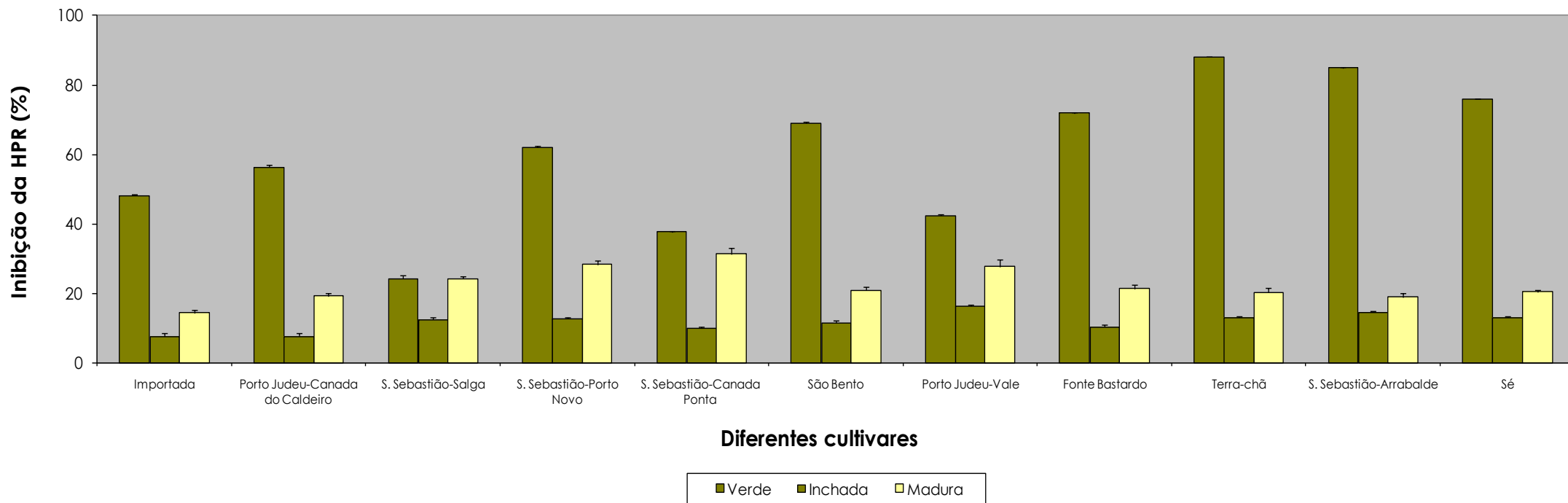


Fig. 4.7 Actividade antioxidante da banana avaliada pela inibição da HRP. A banana importada é da variedade Brier e foi cultivada no Porto Judeu, sendo as restantes da variedade Pequena Anã, cultivadas em diferentes locais da ilha Terceira. Foram testados três estados de maturação em extractos de polpa de banana com uma concentração final 66,7 mg/ml.

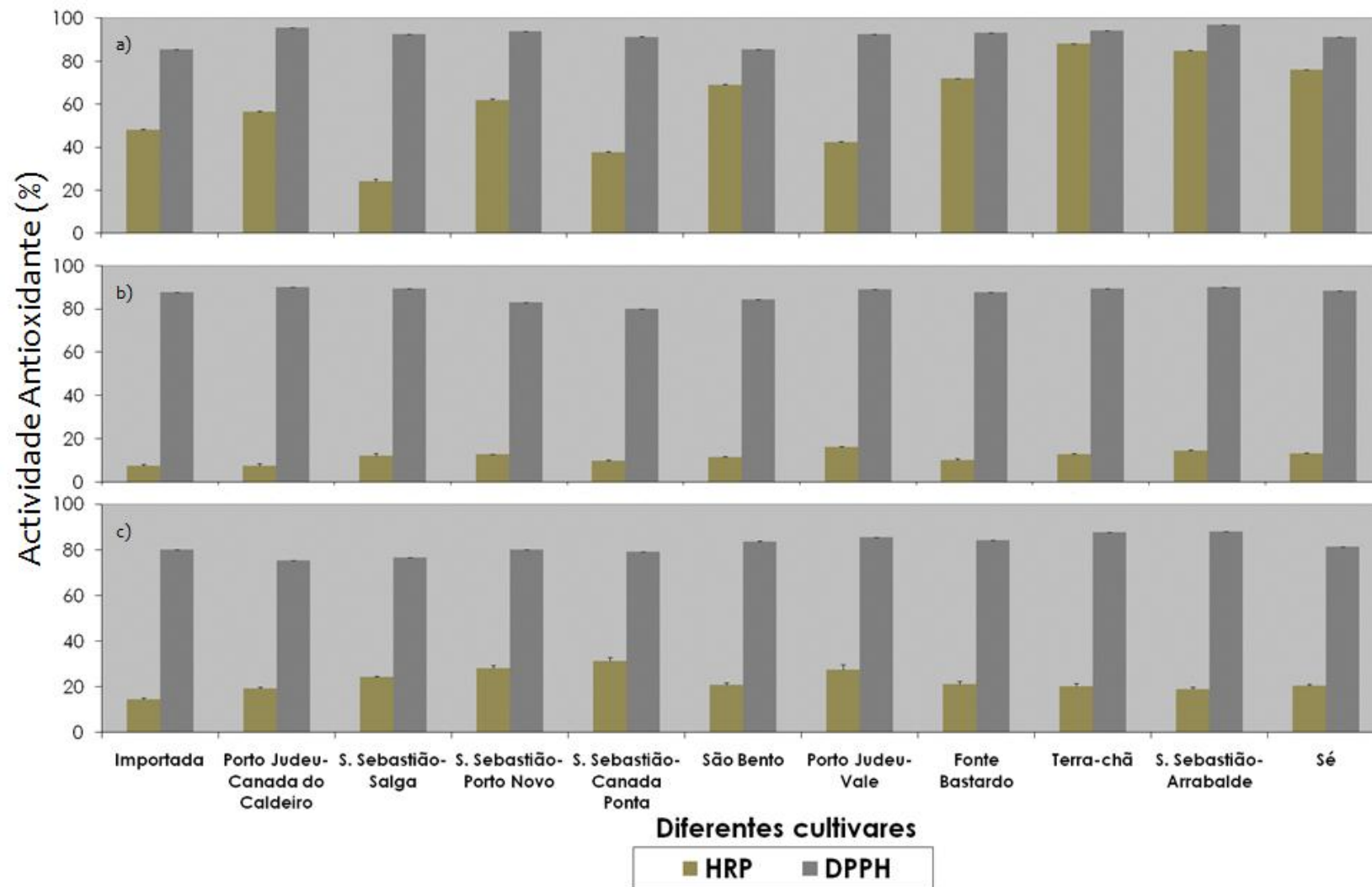


Figura. 4.8 Actividade antioxidante avaliada em termos de percentagem de inibição da HRP e da redução do DPPH, em banana da ilha Terceira no estado de maturação verde(a), intermédio (b) e maduro (c).

4.3.3. Contribuição dos polifenóis totais, livres e flavonóides totais

Verificou-se de um modo geral, que o estado de maturação verde apresentava maior quantidade de polifenóis totais, livres e flavonóides totais do que os outros estados (Fig. 4.9). A variedade brier foi a que apresentou menor quantidade de polifenóis totais (0,53 mg/100g de amostra) no estado de maturação verde. Das amostras da variedade pequena anã e no estado de maturação verde, as bananas cultivadas na Quinta Bicas, Terra-chã foi a que apresentou maior conteúdo em polifenóis totais (1,59 mg/100g), seguida da cultivada na Avenida de São Bento (1,49 mg/100g), sendo coincidentemente do mesmo produtor. A que apresentou menor quantidade de polifenóis totais foi a banana da Salga, São Sebastião (0,58 mg/100g).

A passagem do estado verde ao estado de maturação intermédia (banana “inchada”) verificou-se um decréscimo acentuado tanto dos polifenóis totais (fig. 4.9.a) como dos flavonóides (fig. 4.9.c). Estes resultados estão de acordo como o estudo Arancibia-Avila *et al.*, (2008), onde tanto os polifenóis totais como os flavonóides apresentavam diminuição da concentração ao longo da maturação, sendo mais acentuado na passagem para o estado intermédio. Ao contrário os polifenóis livres praticamente não sofreram alteração com esta mudança de estado, excepto para as amostras da Canada do caldeiro-Porto Judeu, de São bento e Sé fig. 4.9.b). Apesar da diferença entre os polifenóis livres das amostras verdes ser significativamente diferente do estado intermédio ($\alpha=0.05$, Anexo 11), o mesmo não se verificou entre este e o estado maduro.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por tratamento estatístico, em que a actividade antioxidante avaliada por inibição de HPR se correlacionou com o conteúdo em polifenóis totais e flavanóides, mas não com o polifenóis livres, pois os Chi-quadrado calculados para os primeiros foram 48.4 e 46.9, respectivamente, ambos superiores ao valor da tabela (46.2) para um $\alpha =0.05$, enquanto que para os polifenóis livres o valor do Chi-quadrado calculado foi inferior 39.97 (Anexo 10.1). Uma possível justificação para os polifenóis livres não se correlacionarem-se com a actividade antioxidante, pode ser devido ao método de extracção destes, uma vez que se realiza seis extracções sucessivas (Nayaka *et al.*, 2010), para a possível

quantificação, podendo haver uma perda de amostra em cada uma dessas extracções.

Nas bananas maduras, a quantidade de polifenóis totais foi claramente inferior (fig. 4.9.a), sendo a seu teor mais homogéneo nas diferentes amostras analisadas. Verificou-se ainda que no estado maduro os polifenóis eram praticamente todos iguais, uma vez que os valores dos polifenóis livres eram praticamente iguais aos polifenóis totais (fig. 4.9.a e b) e o flavonóides (fig. 4.9.c).

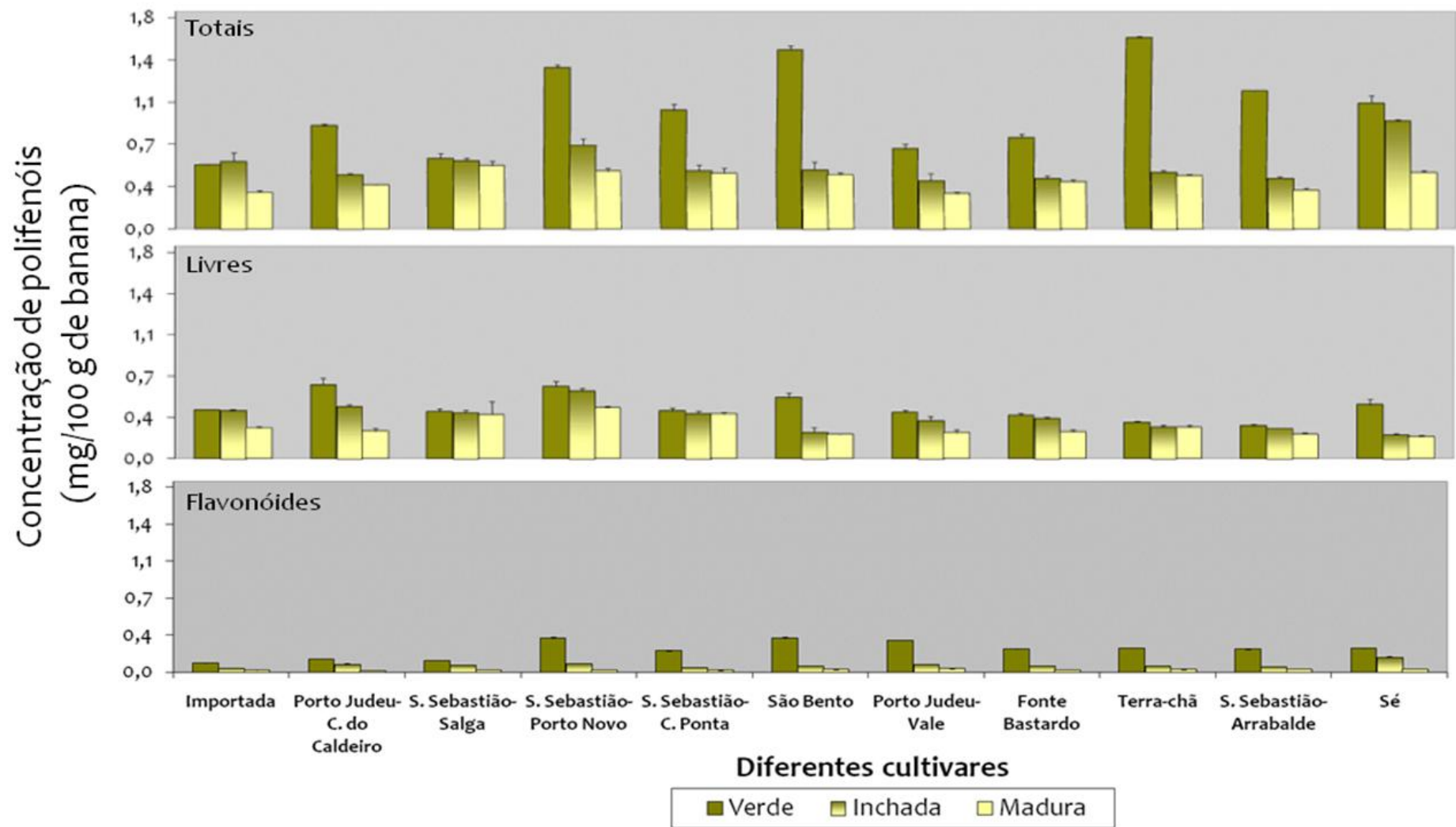


Figura 4.9. Distribuição dos polifenóis totais (a), livres (b) e flavonóides totais (c) nas diferentes variedades da banana da ilha Terceira e diferentes locais de cultivo nos três estados de maturação.

4.4. Actividade Antioxidante da Maçã

4.4.1. Diferentes Variedades

As diferentes variedades de maçãs analisadas apresentaram uma actividade antioxidante bastante elevada tanto avaliada pela inibição da HPR como pelo DPPH (fig. 4.10), sendo os valores mais baixos da ordem dos 70% de inibição da HRP e do DPPH, respectivamente, apesar de não ter havido relação entre estes para um $\alpha = 0.05$ (Anexo 10.3).

A actividade antioxidante foi testada na polpa e na polpa em conjunto com a casca não se tendo verificado diferença entre estas (Anexo 6), ao contrário do que se observou noutros estudos em que a casca apresentou maior actividade do que a polpa (Drogoudi *et al.*, 2008).

4.4.2. Contribuição dos polifenóis totais, livres e flavonóides totais

A maçã de São João foi a que apresentou maior quantidade dos polifenóis totais, tanto na polpa (1,49 mg/ 100g de amostra) como na polpa em conjunto com a casca (1,81 mg/ 100g de amostra), no entanto a variedade doce apresentou menor quantidade de polifenóis totais na polpa (0,76 mg/ 100g de amostra), seguida do pêro amarelo e do pêro branco “chocalha a pevide”.

Ao contrário do que se verificou com a actividade antioxidante os polifenóis totais e livres, já se observou diferenças significativas ($\alpha = 0.05$, anexo 11.4 e 11.5) entre a polpa e a polpa em conjunto com a casca, tendo-se verificado que a esta última possuía concentrações superiores (Fig. 4.11). No entanto, no que se refere aos flavonóides não se observaram diferenças significativas ($\alpha = 0.05$, anexo 11.6) entre a polpa e a casca, o que poderá justificar os resultados obtidos para a actividade antioxidante, uma vez que vários estudos demonstram que estes são de entre os polifenóis os que apresentam maior contributo para esta actividade (Cao & Prior, 2000).

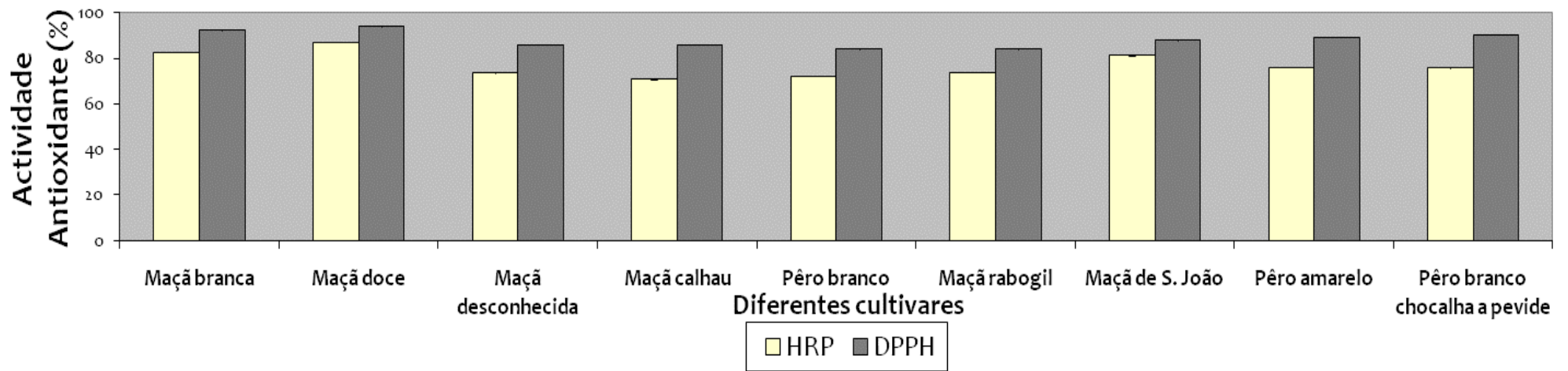


Figura 4.10. Actividade antioxidante avaliada em termos de percentagem de inibição da HRP e da redução do DPPH, em diferentes variedades de maçã da ilha Terceira.

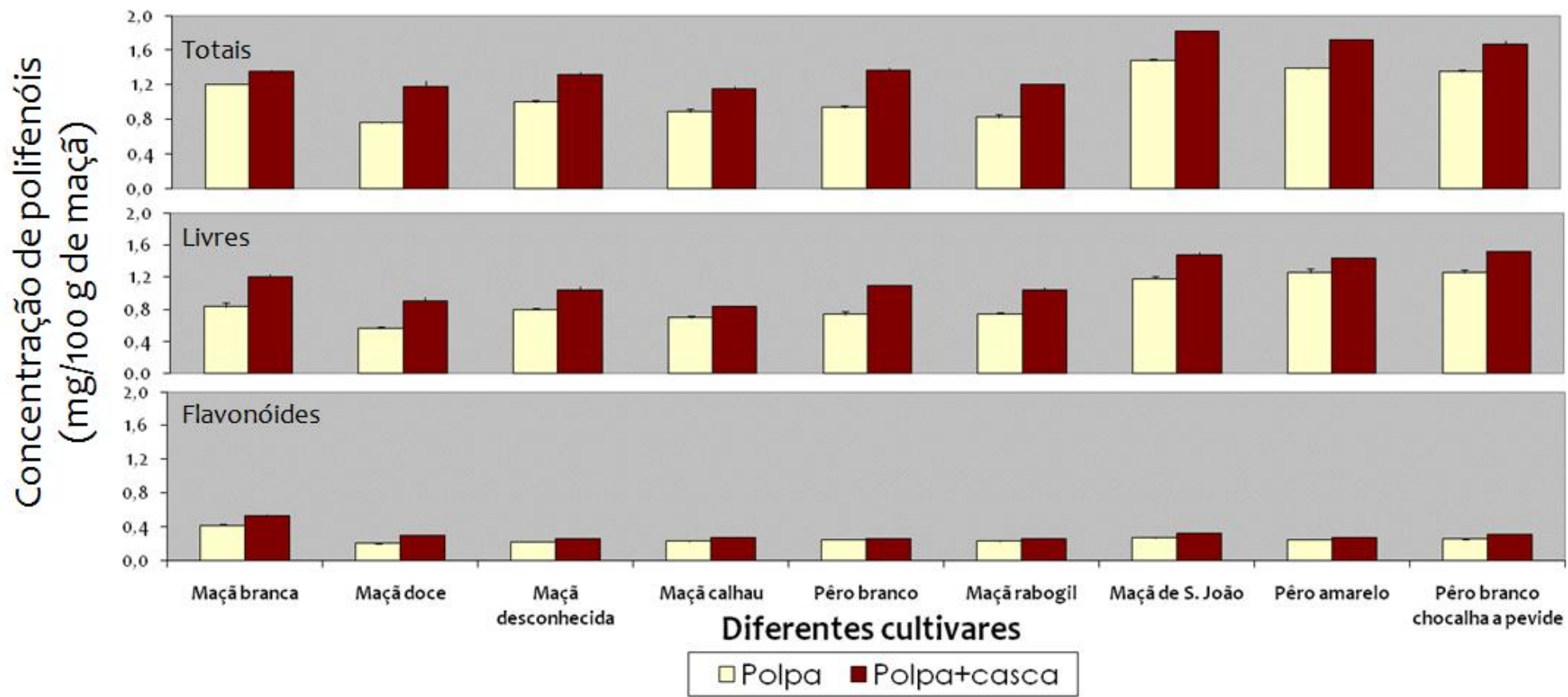


Figura 4.11. Distribuição dos polifenóis totais (a), livres (b) e flavonóides totais (c) nas diferentes cultivares de maçã da ilha Terceira.

5. CONCLUSÃO

Através deste estudo foi possível concluir que a batata-doce apresentou maior actividade antioxidante do que o inhame, no entanto, em nenhum dos casos se verificou uma relação entre a cor da polpa e a actividade antioxidante.

A batata-doce deve ser cozida com casca uma vez que foi o tratamento culinário para o qual a actividade antioxidante foi maior, no entanto, se for cozinhada sem casca deve fazer-se a vapor pois a actividade neste caso é superior à observada quando cozida em água. Ao contrário, no inhame a cozedura não afectou a actividade antioxidante

Os nossos resultados demonstram que os inhames colhidos mais tardiamente possuíam maior actividade antioxidante, pelo que se sugere que estes devem ser deixados na terra até ao momento do seu consumo, como se fazia na agricultura de subsistência.

O estado de maturação da banana onde se observou maior actividade antioxidante foi o verde, seguido do maduro e por último do intermédio, pelo que se conclui que a banana deve ser consumida preferencialmente madura. Os nossos resultados demonstraram que tanto os polifenóis totais como os flavonóides se correlacionaram significativamente ($\alpha=0.05$) com actividade antioxidante.

Podemos concluir que a maçã foi de todas as espécies analisadas a que apresentou maior actividade antioxidante e que a casca não afectou esta actividade. No entanto, os polifenóis totais e livres foram significativamente ($\alpha=0.05$) maiores nas amostras em que a casca foi analisada em conjunto com a polpa, ao contrário os flavonóides não apresentaram diferenças quando a casca foi analisada em conjunto com a polpa, sugerindo que estes podem ser mais determinantes na actividade antioxidante observada.

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho podemos concluir que as variedades de produtos hortofrutícolas da ilha Terceira tem a capacidade de prevenir ou minimizar os danos provocados pelos radicais livres pelo que são candidatos muito interessantes a nutracêuticos. Além disso, consideramos que os resultados obtidos no presente trabalho poderão ser úteis na definição das estratégias adoptadas para o melhoramento e selecção das culturas açorianas.

6. BIBLIOGRAFIA

- Bast A, Haenen GRMM. 2001. Lipoic acid: a multifunctional nutraceutical. In: Kramer K, Hoppe PP, Packer L, editors. *Nutraceuticals in health and disease prevention*. New York: Marcel Dekker, Inc. p 113–28.
- Buettner GR, Jurkiewicz BA. 1996. *Chemistry and biochemistry of ascorbic acid*. In: Cadenas E, Packer L, editors. *Handbook of antioxidants*. New York: Marcel Dekker. p 91–115.
- Cadenas, Enrique; Packer, Lester. 2002. *Handbook of Antioxidants*. Second Edition, Revised and Expanded. Copyright.
- Chang, R. 1994. *Química*. Lisboa: McGraw-Hill.
- Curvelo-Garcia, A.S. 1987. *Controlo de qualidade dos vinho-Química Enológica, Métodos Analíticos*. Instituto da Vinha e do Vinho.
- deMan JM. 1999. *Principles of food chemistry*. Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers. p 239–62.
- Fellows, P.J. *Food processing technology: principles and practice*. New York: Ellis Horwood, 1988. 505 p.
- Fernandes, Francisca; Carvalho, Luisa. 2003. *Portugal Botânico de A a Z – Plantas Portuguesas e Exóticas*. Editora Lidel.
- Foote C. 1976. *Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems*. In: Pryor WA, editor. *Free radicals in biology*. New York: Academic Press. p 85–133.
- Gregory III JF. 1996. *Vitamins*. In: Fennema OR, editor. *Food chemistry*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker. p 431–530.
- Halliwell B. 1996. Uric acid: an example of antioxidant evaluation. In: Cadenas E, Packer L. editors. *Handbook of antioxidants*. New York: Marcel Dekker. p 243–56.
- Harborne JB, Baxter H, Moss GP, editores. 1999. *Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants*. 2nd ed. London: Taylor & Francis.
- Jadhav SJ, Nimbalkar SS, Kulkarni AD, Madhavi DL. Lipid oxidation in biological and foods systems. 1995. In: Madhavi DL, Deshpande SS, Salunkhe DK, editores. *Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives*. New York: Marcel Dekker; p. 5-62.
- Kotecha, P.M.; Kadam, S.S. 1998. Mahatma Phule Agricultural Univ., Rahuri, India. *Food Sci. Technol. (NY)*. 86 (*Handbook of Vegetable Science*) 71-97 (Eng), Marcel Dekker, Inc.
- Kramer K, Packer L. 2001. R- α -lipoic acid. In: Kramer K, Hoppe PP, Packer L, editors. *Nutraceuticals in health and disease prevention*. New York: Marcel Dekker. p: 29–64.
- Liebler DC. 1993. *Antioxidant reactions of carotenoids*. *Ann N Y Acad Sci* 691 : 20–31.
- Mahan, L.; Stump, Sylvia. 2002. *Alimentos, Nutrição e dietoterapia*. 10ª Edição. São Paulo, editora Roca Ltda.
- Min DB. 1998. *Lipid oxidation of edible oil* In: Min DB, editor, *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. New York: Marcel Dekker. p. 283–96.
- Packer, L.; Weber, SU. 2001. *The role of vitamin E in the emerging field of nutraceuticals*. In: Kramer, K.; Hoppe, PP.; Packer, L. editors. *Nutraceuticals in health and disease prevention*. New York: Marcel Dekker. p. 27-43
- Papas AM. 1999. *Diet and antioxidant status*. In: Papas AM, editor. *Antioxidant status, diet, nutrition, and health*. Boca Raton, Fla: CRC Press. p 89–105.
- Rumsey SC, Wang Y, Levine M. 1999. *Vitamin C*. In: Papas AM, editor. *Antioxidant status, diet, nutrition, and health*. Boca Raton, Fla.: CRC Press. p 479–96.
- Saldanha, Helena. 1999. *Nutrição Clínica*. Lidel - Edições técnicas, Lda.
- Santos, J. 1980. *A saúde pelas frutas*, edição do autor COOPAG, S. C. A.R.L./Porto.
- Sies, H. 1985. *Oxidative Stress: Introductory Remarks*. In H. Sies (Ed.) *Oxidative Stress*. Londres: Academic Press, 1-8, consultado em Mota, Paula M.; Figueiredo, Pedro A.; Duarte, José A. 2004. *Teorias biológicas do envelhecimento*. *Revista Portuguesa de Ciência do Desporto*. Volume 4, nº 1, p. 81-110.
- Watkins TR, Bierenbaum ML, Giampalolo A. 1999. *Tocotrienols: Biological and health effects*. In: Papas AM, editor. *Antioxidant status, diet, nutrition, and health*. Boca Raton, Fla.: CRC Press. p 479–96.
- Wildman REC. 2001. *Classifying nutraceuticals*. In: Wildman REC, editor, *Handbook of nutraceuticals and functional foods*, Boca Raton, Fla.: CRC Press. p.13-30.

- Woolfe, J. 1993. *Sweet potato: An untapped food resource*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Agarwal, S., Sohal, R.S. 1994. DNA oxidative damage and life expectancy in houseflies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 12332-12335.
- Aherne SA, O'Brien NM. 2002. Dietary flavonols: Chemistry, food content and metabolism. *Nutr*. 18:75-81.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci* 90:79, 15-22.
- Ames, B.N., Gold, L.S. 1991. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat. Res*. 250: 3-16.
- Angelo, Priscila M.; Jorge, Neuza. 2007. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Revista Inst. Adolfo Lutz*, 66 (1): 232-240.
- Antwerpen, Van Pierre; Néve, Jean. 2004. *In vitro* comparative assessment of scavenging activity against three reactive oxygen species of non-steroidal anti-inflammatory drugs from the oxicam and sulfoanilide families. *European Journal of Pharmacology*. 496: 55-61.
- Aprikian, Olivier; Levrat-Verny, Marie-Anne; Besson, Catherine; Busserolles, Jérôme, Rémésy, Christian; Demigné, Christian. 2001. Apple favourably affects parameters of cholesterol metabolism and of anti-oxidative protection in cholesterol-fed rats. *Food Chemistry* 75: 445-452.
- Arancibia-Avila, P.; Toledo, F.; Park, Y.; Jung, S.; Kang, S.; Heo, B.; Lee, S.; Sajewicz, M.; Kowalska, T.; Gorinstein, S. 2008. Antioxidant properties of durian fruit as influenced by ripening. *Food Science and Technology* 41: 2118-2125.
- Arnous, Anis; Makris, Dimitris; Kefalas, Panagiotis. 2002. Correlation of Pigment and Flavanol Content with Antioxidant Properties in Selected Aged Regional Wines from Greece. *Journal of Food Composition and Analysis* 15, 655-665.
- Badaró, Andréa; Guttierrez, Ana; Rezende, Ana; Stringheta, Paulo. 2008. Alimentos probióticos: Aplicações como promotores da saúde humana- parte 1. *Revista Digital de Nutrição*, V.2- N.3.
- Barja, G., Cadenas, S., Rojas, S., Perez-Campo, R., Lopez-Torres, M. 1994. Low mitochondrial free radical production per unit O₂ consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds. *Free Radical Research*, 21: 317-327.
- Barja, G., Herrero, A. 2000. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB J*. 14: 312-318
- Baron, Ticiane; Silva, Rafaela; Oliveira, Ana. 2005. Alimentação como fator promotor da saúde. *EXTENSIO – Revista Eletrônica de Extensão*, Número 2.
- Bast, A., Haenen, G.R., Doelman, C.J. 1991. Oxidants and antioxidants: State of the art. *American J. Med.* 91 (suppl 3C): 3C-2S – 3C-13S.
- Beckman, K.B., Ames, B.N. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78 (2): 547-581.
- Berlett BS, Stadtman ER. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272:20313-6.
- Beutner S, Bloedorn B, Hoffmann T, Martin HD. 2000. Synthetic singlet oxygen quenchers. *Methods Enzymol* 319: 226-41.
- Block, G.; Patterson, B.; Subar, A. 1992. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer*, v.18, p.1-29.
- Blois, M. S., 1958. Antioxidant Determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 4617, 26, consultado em Marques, Olinda C.P. 2008. *Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais de Uncaria tomentosa com atividade antioxidante*. Tese de Mestrado, Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra.
- Boff J, Min DB. 2002. Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comp Rev Food Sci Saf* 1:58-72.
- Buettner GR. 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, a-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 300:535-43.
- Burns, J. J. 1959. Biosynthesis of L-ascorbic acid: basic defect in scurvy. *Am. J. Med.* 26, 740 – 748.

- Cao, G. and Prior, R. L. 2000. Red wine in moderation: potential health benefits independent of alcohol. *Nutr. Clin. Care* 3: 76–82.
- Caragay AB. 1992. Cancer preventive foods and ingredients. *Food Technol.* 46:65-8.
- Chen, Chiao-Ming; Li, Sing-Chung; Lin, Ya-Ling; Hsu, Ching-Yun; Shieh, Ming-Jer; Liu, Jen-Fang. 2005. Consumption of purple sweet potato leaves modulates human immune response: T-lymphocyte functions, lytic activity of natural killer cell and antibody production. *World Journal of Gastroenterology.* 11(37): 5777-5781.
- Cho, Jungsook; Seong Kang, Jong; Hoai Long, Pham; Jing, Jhang; Back, Yiho; Chung, Kyeong-Soo. 2003. Antioxidant and Memory Enhancing Effects of Purple Sweet Potato Anthocyanin and Cordyceps Mushroom Extract. *Archives Pharmacal Reserarch.* Vol 26, No 10, 821-825.
- Chun, O. K., Kim, D.-O., Smith, N., Schroeder, D., Han, J. T., & Lee, C. Y. 2005. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1715e1724.
- Clinton SK, Emenhiser C, Schwartz SJ, Bostwich DG, Williams AW, Moore BJ, Erdman JW. 1996. Cis-trans lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human prostate. *Cancer Epidemiol Biomark Prevent* 5:823–33.
- Dargel, R. 1992. Lipid peroxidation – a common pathogenetic mechanism? *Exp Toxic Pathol*, 44: 169-181.
- Decker EA. 1995. The role of phenolics, conjugated linoleic acid, carnosine, and pyrroloquinoline quinone as nonessential dietary antioxidants. *Nutr Rev* 53:49–58.
- Decker EA. 1998. Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of food to maximize oxidative stability. *Trends Food Sci Technol*; 9 (6): 241-8.
- Decker M, Verkerk R, Van Der Sluis AA, Khokhar SJ. 1999. Analysing the antioxidant activity of food products: processing and matrix effects. *Toxicol Vitro* 13:797–9.
- DeFelice S.L. 1995. The nutraceutical revolution: its impact on food and industry R & D. *Trends Food Sci Technol.*6:59-61.
- Drogoudi, Pavlina; Michailidis, Zisis; Pantelidis, George. 2008. Peel and flesh antioxidant content and harvest quality characteristics of seven Apple cultivars. *Scientia Horticulturae.* 115: 149-153.
- Edge R, Garvey MC, Truscott TG. 1997. The carotenoids as antioxidants—a review. *J Photochem Photobiol B Biol* 41(3):189–200.
- Esteve, J.M., Mompo, J., Asuncion, J.G., Sastre, J., Asensi, M., Boix, J., Viña, J.R., Viña, J., Pallardó, F.V. 1999. Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro. *FASEB J.*, 13: 1055-1064.
- Foroni, Iris; Baptista, Claudio; Monteiro, Lisandra; Lopes, Maria; Mendonça Duarte; Melo, Mónica; Carvalho, Conceição; Monjardino, Paulo; Lopes, David; Machado, Artur. 2010. The use of microsatellites to analyze relationships and to decipher homonyms and synonyms in Azorean apples (*Malus x domestica* Borkh.). *Genetic Resources and Crop Evolution.* Volume 57.
- Frankel EN. 1985. Chemistry of autoxidation: mechanism, products and flavor significance. *AOCS Monogr* 15: 1–37, consultado em Lee, J.; Koo, N.; Min, D.B. 2004. Reactive Oxygen Species, Aging and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* Volume 3.
- Frei B. 1995. Cardiovascular disease and nutrient antioxidants: role of low-density lipoprotein oxidation. *Crit Rev Food Sci Nutr* 35:83–98.
- Frei, B. 1999. Molecular and biological mechanisms of antioxidant action. *FASEB J.* 13: 963-964.
- Gartner C, Stahl W, Sies H. 1997. Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *Am J Clin Nutr.* 66:116-22.
- Girotti A. 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 39:15 29–42.
- Goldfarb, A.H. 1999. Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. *Can. J. Appl. Physiol.* 24 (3): 249-266.
- Gutteridge, J.M. 1993. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radical Research Communications*, v.19, p.141-158.

- Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. 1995. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Crit Rev Food Sci Nutr* 35:7–20.
- Halliwell B. 1997. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev* 55:S44–9.
- Halliwell, B. 1991. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and the role in human disease. *American J. Med.* 91 (suppl 3C): 3C-14S –3C-22S.
- Harman, D. 1956. Aging: a theory based on the free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11: 298-300, consultado em Mota, Paula M.; Figueiredo, Pedro A.; Duarte, José A. 2004. Teorias biológicas do envelhecimento. *Revista Portuguesa de Ciência do Desporto.* Volume 4, nº 1, p. 81-110.
- Myllylä, R., Kuutti-Savolainen, E. R., and Kiririkko, K. I. 1978. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83, 441-448.
- Hasler CM. 1996. Functional foods: The Western perspective. *Nutr Rev.* 54:S6-S10.
- Hattori, T.; Nakagawa, T.; Nakamura, K. 1990. High-level expression of tuberous root storage protein genes of sweet potato in stems of plantlets grown *in vitro* on sucrose medium. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 14, n. 3, p. 595-604.
- Hollman PCH, Katan MB. 1999. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol*; 37 (9/10): 937-42.
- Hossain, M.A., Y. Nakano, and K. Asada. 1984. Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. *Plant Cell Physiol.* 25: 385-395.
- Huang, Chien-Chun; Chen, Woan-Ching; Wang, Chiun-C.R. 2006. Comparison of Taiwan paddy- and upland-cultivated taro (*Colocasia esculenta* L.) cultivars for nutritive values. *Food Chemistry* 102: 250-256.
- Huang, D. et al. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, v. 56, n. 53, p. 1841-185.
- Huang, Dong-Jiann; Chen, Hsien-Jung; Hou, Wen-chi; Lin, Chun-Der; Lin, Yaw-Huei; 2006. Sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam “Tainong 57”) storage root mucilage with antioxidant activities *in vitro*. *Food Chemistry* 98 (774-781).
- Hung, S.H., C.W. Yu, and C.H. Lin. 2005. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46: 1-10.
- Júnior, Laércio; Höehr, Nelci; Vellasco, Adriana. 2001. Sistema Antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova*, Vol.24, No.1, 112-119.
- Kano, Mitsuyoshi; Takayanagi, Tomomi; Harada, Katsuhisa; Makino, Kumiko; Ishikawa, Fumiyasu. 2005. Antioxidative Activity of Anthocyanins from Purple Sweet Potato, *Ipomoea batatas* Cultivar Ayamurasaki. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69 (5), 979-988.
- Kaur C, Kapoor HC. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's health. *Intl J Food Sci Tech* 36:703–25.
- Kumuda DC, Chandan DK. 2000. Thioredoxin, a singlet oxygen quencher and hydroxyl radical scavenger: redox independent function. *Biochem Biophys Res Com* 277:443–7.
- Laires, M.J., Monteiro, C.P., Ferreira, A.M. 2001. Stress oxidativo: papel dos micronutrientes antioxidantes. *Rev. Port. Med. Desp.* 19: 43-62.
- Lako, J.; Trenerry, V. C.; Wahlqvist, M.; Wattanapenapaiboon, N.; Sotheeswaran, S.; Premier, R. 2007. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruits, vegetables and other readily available foods. *Food Chemistry.* 101: 1727-1741.
- Lal, S.B., Ramsey, J.J., Monemdjou, S., Weindruch, R., Harper, M. 2001. Effects of caloric restriction on skeletal muscle mitochondrial proton leak in aging rats. *J. Gerontology (Biol. Sci.)*, 56A (3): B116-B122.
- Lawler, J., Powers, S. 1999. Oxidative stress, antioxidant status, and the contracting diaphragm. *Can. J. Appl. Physiol.* 2 (1): 23-55.
- Lee JH, Ozcelik B, Min DB. 2003. Electron donation mechanisms of β -carotene as a free radical scavenger. *J Food Sci* 68(3):861–5.

- Lee, J.; Koo, N.; Min, D.B. 2004. Reactive Oxygen Species, Aging and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Volume 3.
- Legendre, P. 2005. Species Associations: The Kendall Coefficient of Concordance Revisited. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics*, Volume 10, Number 2, Pages 226–245.
- Lezza, A.M., Mecocci, P., Cormio, A., Beal, M.F., Cherubini, A., Cantatore, P., Senin, U., Gadaleta, M.N. 1999. Mitochondrial DNA 4977 bp deletion and OH8dG levels correlate in the brain of aged subjects but not Alzheimer's disease patients. *FASEB J.* 13: 1083-1088.
- Lindley, M.G. 1998. The impact of food processing on antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetables. *Trends in Food Science and Technology*, v.9, p.336-340.
- Lotito, Silvina B.; Frei, Balz. 2004. The increase in human plasma antioxidant capacity after Apple consumption is due to the metabolic effect of fructose on urate, not Apple-derived antioxidant flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 37, No. 2, pp. 251 – 258.
- Melo, E. A.; Maciel, M. I. S.; Lima, V. L. A. G.; Santana, A. P. M. 2009. Antioxidant capacity of vegetables submitted to thermal treatment. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. = J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, São Paulo, SP, v. 34, n. 1, p. 85-95.
- Merken HM, Beecher GR. 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *J Agric Food Chem*; 48 (3): 577-99.
- Meydani M. 2000. Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. *Am J Clin Nutr* 71:1665S–8S.
- Mithen RF, Dekker M, Verkerk R, Rabot S, Johnson IT. 2000. The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *J Sci Food Agric.* 80:967-84.
- Mokbel, Matook; Hashinaga, Fumio; 2005. Antibacterial and Antioxidant Activities of Banana (Musa AAA cv. Cavendish) Fruits Peel. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 1 (3): 125-131.
- Morel, Y.; Barouki, R. 1999. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochemistry Journal*, 342: 481-496.
- Mortensen A, Skibsted LH, Truscott TG. 2001. The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Arch Biochem Biophys* 385(1):13–9.
- Mota, Paula M.; Figueiredo, Pedro A.; Duarte, José A. 2004. Teorias biológicas do envelhecimento. *Revista Portuguesa de Ciência do Desporto*. Volume 4, nº 1, p. 81-110.
- Naczki M, Shahidi F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A*. 1054 (1/2): 95-111.
- Namiki, M. 1990. Antioxidants/antimutagens in food. *Crit Rev Food Sci Nutr.*; 29 (4): 273-300.
- Nayaka, M.A.Harish; Sathisha, U.V.; Dharmesh, Shylaja. 2010. Cytoprotective and antioxidant activity of free, conjugated and insoluble-bound phenolic acids from swallow root (*Decalepis hamiltonii*). *Food Chemistry* 119:1307-1312.
- Nicholls, D.G., Budd, S.L. 2000. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol. Rev.* 83: 315-360.
- Nicoli, M. C.; Anese, M.; Parpinel, M. 1999. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 10, n. 3, p. 94-100.
- Oki, T.; Masuda, M.; Furuta, S. 2002. *J. Food Science*, 67(5), 1752-1756.
- Packer L, Weber SU, Rimbach G. 2001. Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *J Nutr* 131(2):369S–73S.
- Pérez, D., Muguercia, H. 2000. Medicina Crítica y Estrés Oxidativo. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, 19, 3: 196-198.
- Picha, D.H.1985. *J. Food Sci*, 50, 1768, consultado em: Melo, Ricardo. 2004. *As antocianinas da Batata Doce (Ipomoea batata (L.)Lam.) e as propriedades antioxidantes e antimutagénicas*. Monografia. Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciência e Tecnologia.
- Powers, S.K., Ji, L.L., Leeuwenburgh, C. 1999. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med. Sci. Sports Exerc.* 31 (7): 987-997.
- Prior RL, Cao G. 2000. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: Diet and health implications. *Hort Sci.* 35:588-92.
- Pryor, W.A. 1986. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Ann. Rev. Physiol.* 48:657, consultado em Mota, Paula M.; Figueiredo, Pedro A.; Duarte, José

- A. 2004. Teorias biológicas do envelhecimento. *Revista Portuguesa de Ciência do Desporto*. Volume 4, nº 1, p. 81-110.
- Pyo, Young-Hee; Lee, Tung-Ching; Logendra, L.; Rosen, R. T. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*) extracts. *Food Chemistry* 85:19–26.
 - Ramarathnam N, Osawa T, Ochi H, Kawakishi S. 1995. The contribution of plant food antioxidants to humans health. *Trends Food Sci Nutr*. 6 (3): 75-82.
 - Ramon R, Gonzalo R. 2002. Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. *Free Rad Biol Med* 33:409–22.
 - Rock CL, Loyalvo JL, Emehiser C, Ruffin MT, Flatt SW & Schwart SJ. 1998. Bioavailability of β -carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women. *J Nutr.*; 128:913-6.
 - Rodriguez, Evelyn; Flavier, Maxima; Rodriguez-Amaya, Delia; Farfán, Jaime. 2006. Phytochemicals and functional foods. Current situation and prospect for developing countries. *Segurança Alimentar e nutricional*, 13(1):1-22.
 - Schneeman BO. 2000. Linking agricultural production and human nutrition. *J Sci Food Agric*. 81:3-9.
 - Sen, C.K. 2001. Antioxidants in exercise nutrition. *Sports Med.*, 31 (13): 891-908.
 - Shadel, G.S., Clayton, D.A. 1997. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 409-435.
 - Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD. 1992. Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 32 (1): 67-103.
 - Shahidi F, Naczk M. 1995. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. *Lancaster: Technomic*.
 - Sharma, O.; Bhat, T. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* 113: 1202-1205.
 - Sies, H. 1997. Physiological society symposium: impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. *Oxidative Stress: Oxidants and antioxidants. Experimental Physiology*. 82: 291-295.
 - Sohal, R.S. 1993. The free radical hypothesis of aging: Na appraisal of the current status. *Aging Clin. Exp. Res.* 5: 3-17.
 - Sohal, R.S., Agarwal, S., Dubey, A., Orr, W.C. 1993. Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 7255-7259.
 - Sohal, R.S., Dubey, A. 1994. Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release, and aging. *Free Rad. Biol. Med.* 16. 5: 621-626.
 - Squier, T.C., Bigelow, D.J. 2000. Protein oxidation and age-dependent alterations in calcium homeostasis. *Frontiers in Biosciences*, 5: D504-D526.
 - Stadtman ER. 2000. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 928:22–38.
 - Takenaka, Makiko; Nanayama, Kazuko; Isobe, Seijchiro; Murata, Masatsume. 2006. Changes in Caffeic Acid Derivatives in Sweet Potato (*Ipomoea batata* L.) during Cooking and Processing. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70 (1) 172-177.
 - Teow, C.C.; Truong, V.; McFeeters, R. F.; Thompson, R. L.; Pecota, K. V.; Yencho, G. C. 2007. Antioxidant activities, phenolic and β -carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chemistry*. 103: 829-838.
 - Thomas PR, Earl, R (editors). 1994. Enhancing the food supply. In: Opportunities in the nutrition and food sciences. Washington, DC: National Academy Press; p. 98-142.
 - Turkmen, N.; Sari, F.; Velioglu, Y. S. 2005. The effect of cooking methods on phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chem.*, v. 93, n. 4, p. 713-718.
 - Vieira, Francilene; Borges, Graciele; Copetti, Cristiane; Amboni, Renata; Denardi, Frederico; Fett, Roseane. 2009. Physico-chemical and antioxidant properties of six apple cultivars (*Malus domestica* Borkh) grown in southern Brazil. *Scientia Horticulturae*. 122: 421–425.
 - Virag L, Szabo E, Gergely P, Szabo C. 2003. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett* 140/141:113–24.
 - Wang, W., Ballatori, N. 1998. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol. Rev.* 50 (3): 335-356.

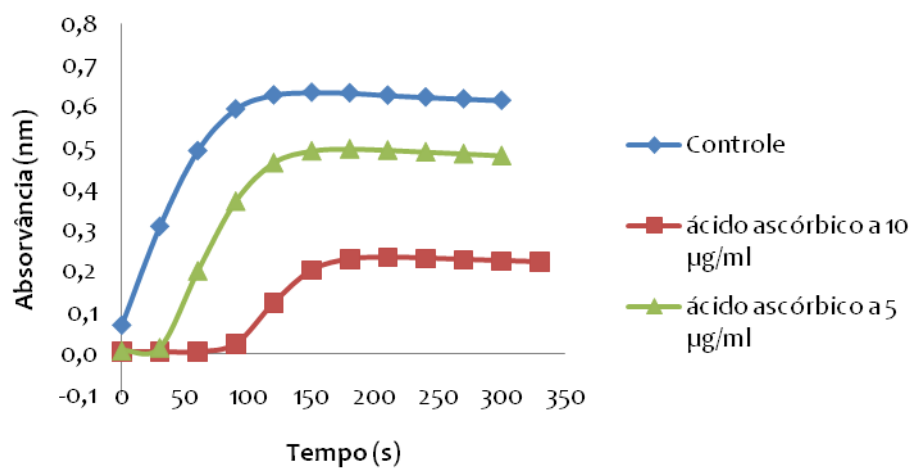
-
- Weisburger JH. 1999. Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. *Food Chem Toxicol* 37(9/10):943–8.
 - Wollgast, John; Anklan, Elke. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? *Food Research International*, n.33, p.449-459, 2000.
 - Wu, Xin; Sun, Chengjun; Yang, Liuhua; Zeng, Guo; Liu, Zuyang; Li, Yumin. 2008. β -carotene content in sweet potato varieties from China and the effect of preparation on β -carotene retention in the Yanshu No. 5. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 581– 586.
 - Yu, B.P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiology Review*, 74: 139-162
 - Cardenette, Giselli. 2006. *Produtos derivados de banana verde (musa spp.) e a sua influência na tolerância à glicose e na fermentação colônica*. Tese de Doutorado, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo.
 - Leite, Roberto; Pereira, Marcia; Aguiar, Michelle, Aguiar; D'Elboux, Yannik. *Inhame tem propriedades depurativas e desintoxicantes*. Homooptimus. Curitiba: Editora Corpo e Mente. 2006, Abril. Pag. 4 – 25.
 - Luchese, Cristiane. 2009. *Mecanismos envolvidos no efeito antioxidante do disseleneto de difenila no dano oxidativo causado pela exposição à fumaça do cigarro em ratos jovens*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.
 - Marques, Olinda C.P. 2008. *Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais de Uncaria tomentosa com actividade antioxidante*. Tese de Mestrado, Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra.

ANEXOS

ANEXO 1.

**Curvas da enzima *horseradish peroxidase* (HRP) no
ensaio do ácido ascórbico.**

Ácido ascórbico



ANEXO 2.

**Curvas da enzima *horseradish peroxidase* (HRP) nos
vários ensaios da batata-doce.**

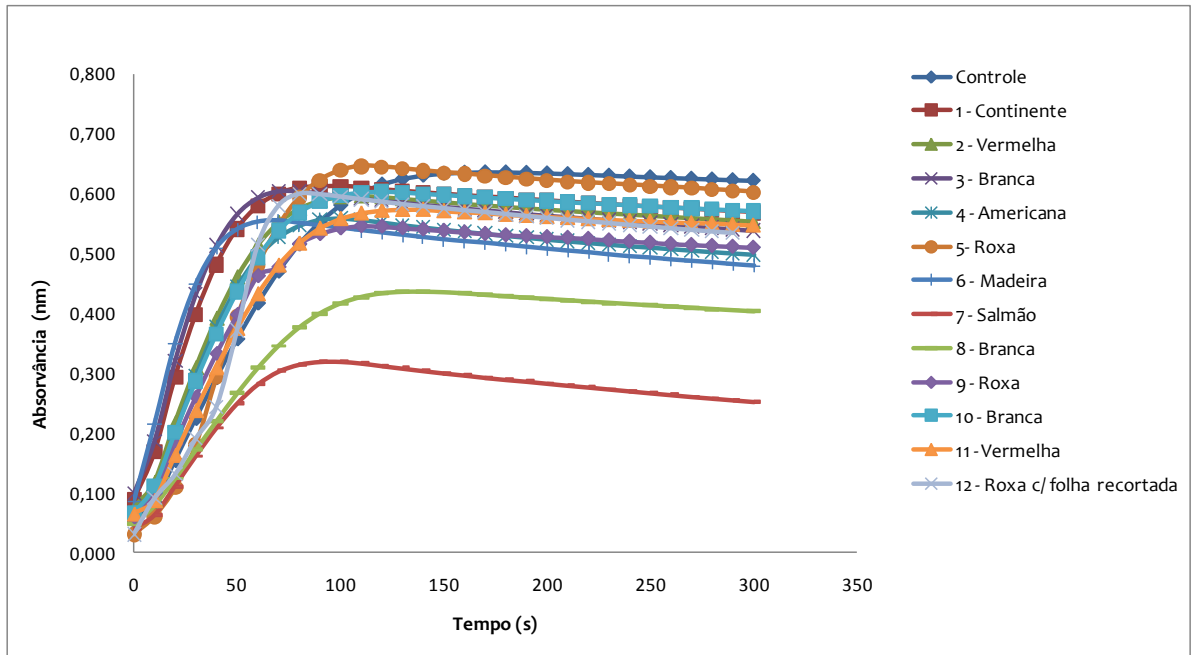


Figura 1. Curvas da enzima HRP nas diferentes variedades de batata-doce, recorrendo ao valor médio de três ensaios.

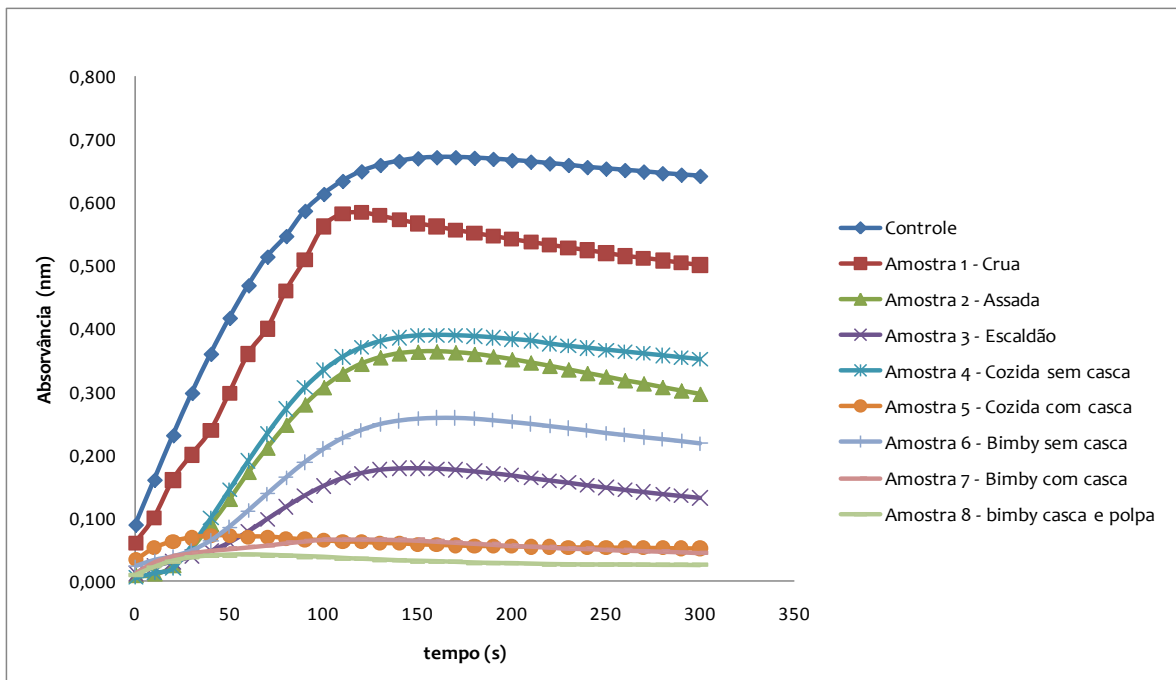


Figura 2. Curvas da enzima HRP na variedade roxa, nos diferentes tratamentos térmicos, recorrendo ao valor médio de três ensaios.

ANEXO 3.

**Curvas da enzima *horseradish peroxidase* (HRP) nos
vários ensaios do iname.**

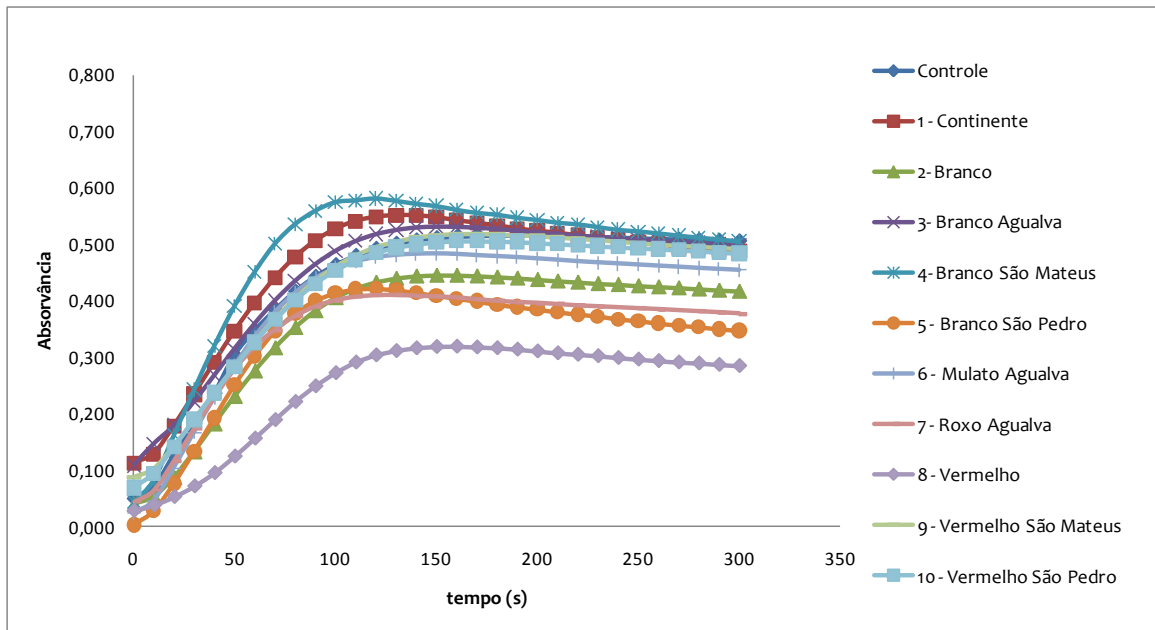


Figura 3. Curvas da enzima HRP nas diferentes variedades de inhame, recorrendo ao valor médio de três ensaios.

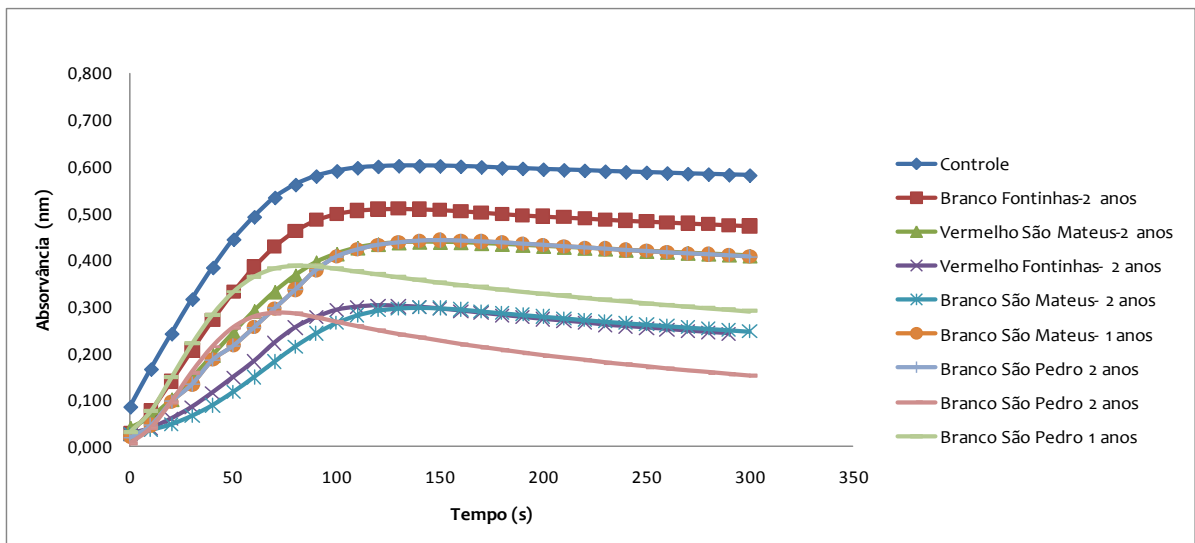


Figura 4. Curvas da enzima HRP nos diferentes anos de terra do inhame, recorrendo ao valor médio de três ensaios.

ANEXO 4.

**Curvas da enzima *horseradish peroxidase* (HRP) nos
vários ensaios da banana.**

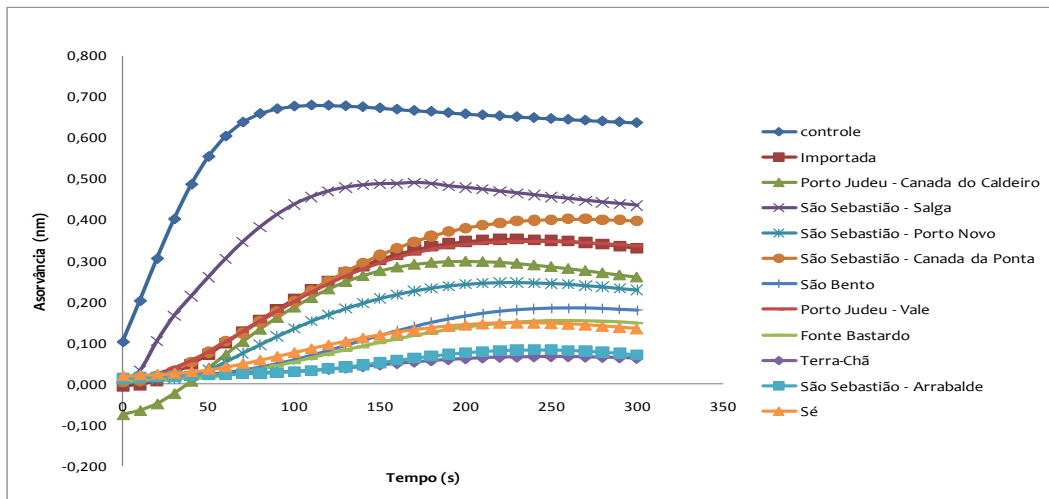


Figura 5. Curvas da enzima HRP nas diferentes variedades e locais de cultivo da banana verde, recorrendo ao valor médio de três ensaios.

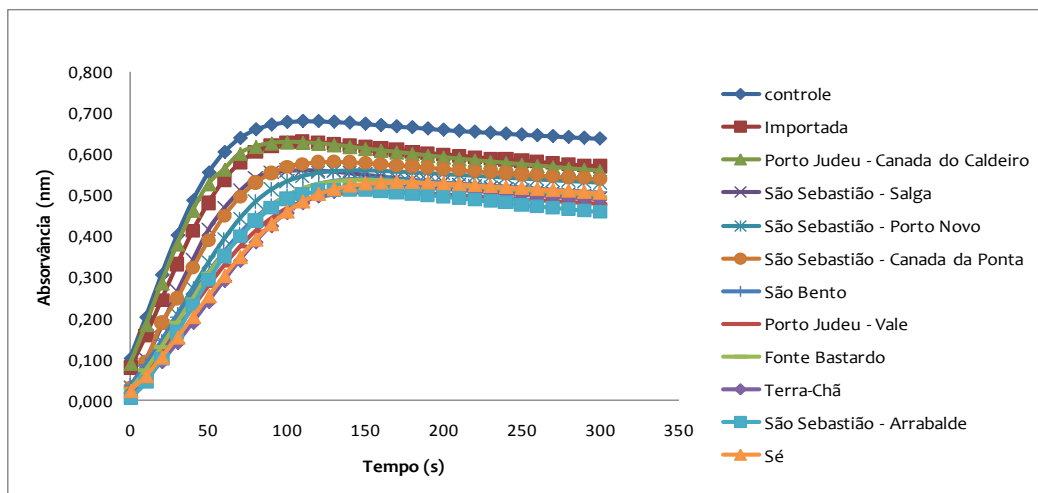


Figura 6. Curvas da enzima HRP nas diferentes variedades e locais de cultivo da banana intermédia, recorrendo ao valor médio de três ensaios.

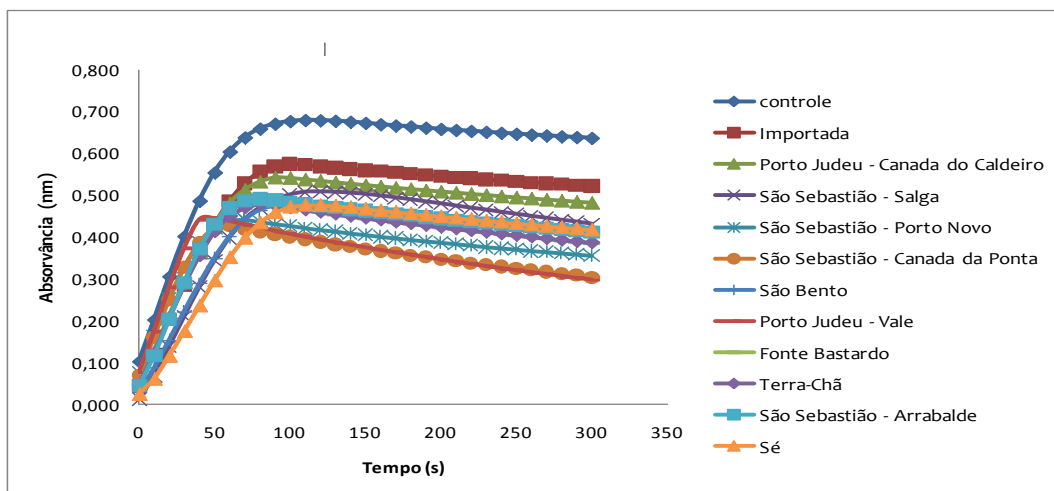


Figura 7. Curvas da enzima HRP nas diferentes variedades e locais de cultivo da banana madura, recorrendo ao valor médio de três ensaios.

ANEXO 5.

**Curvas da enzima *horseradish peroxidase* (HRP) nos
vários ensaios da maçã.**

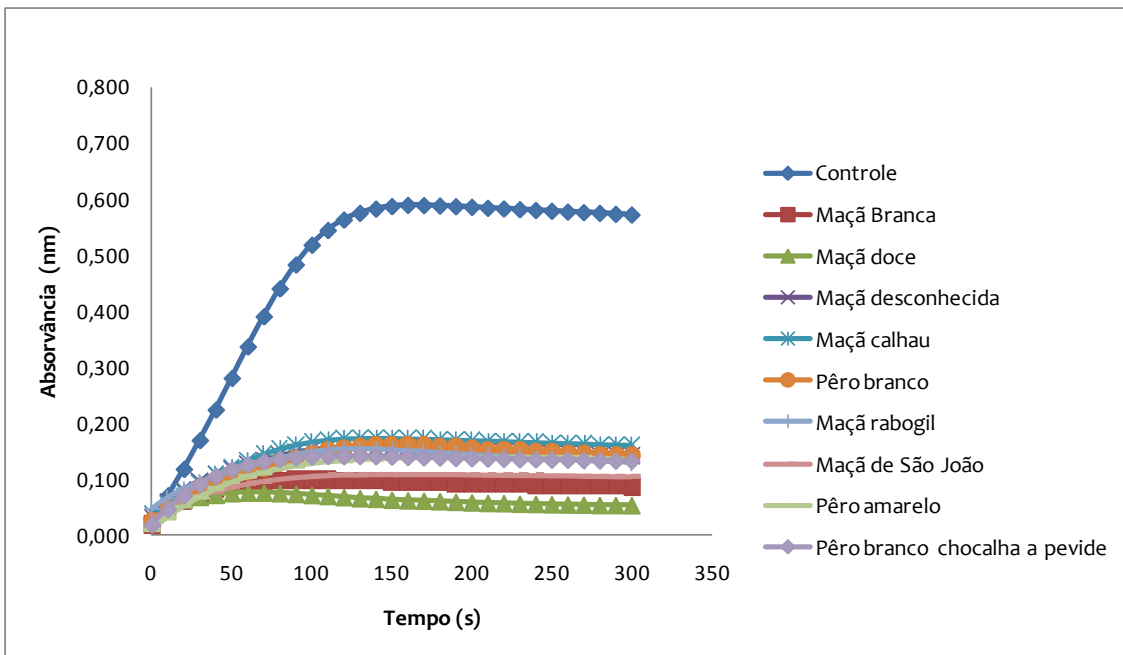


Figura 8. Curvas da enzima HRP nas diferentes variedades da maçã na análise da polpa, recorrendo ao valor médio de três ensaios.

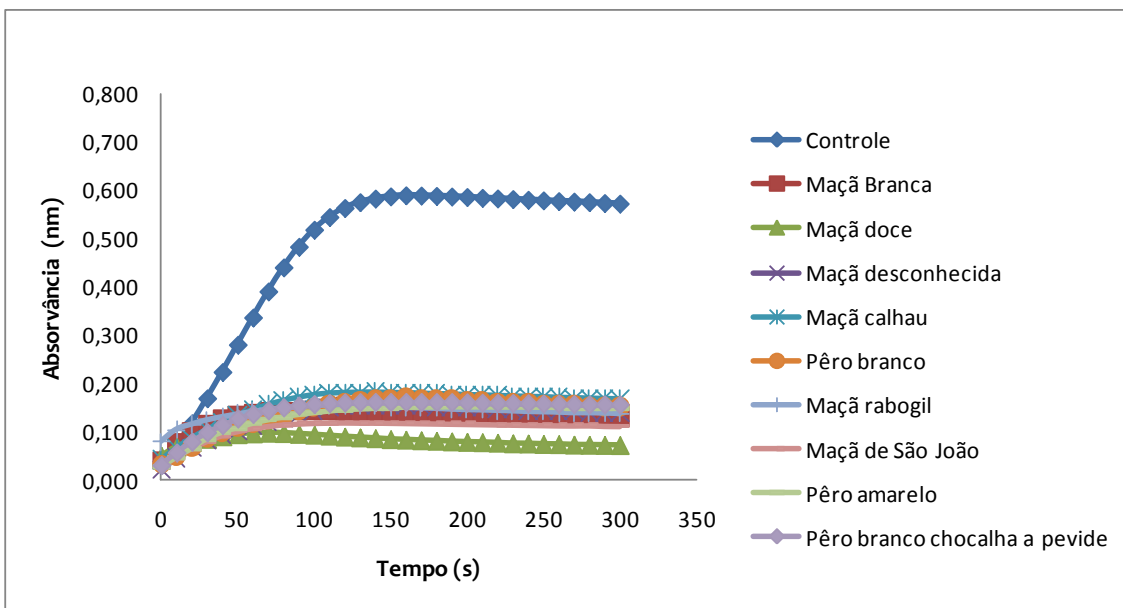


Figura 9. Curvas da enzima HRP nas diferentes variedades da maçã na análise da polpa em conjunto com a casca, recorrendo ao valor médio de três ensaios.

ANEXO 6.

Gráficos da actividade antioxidante nos diferentes cultivares da maçã.

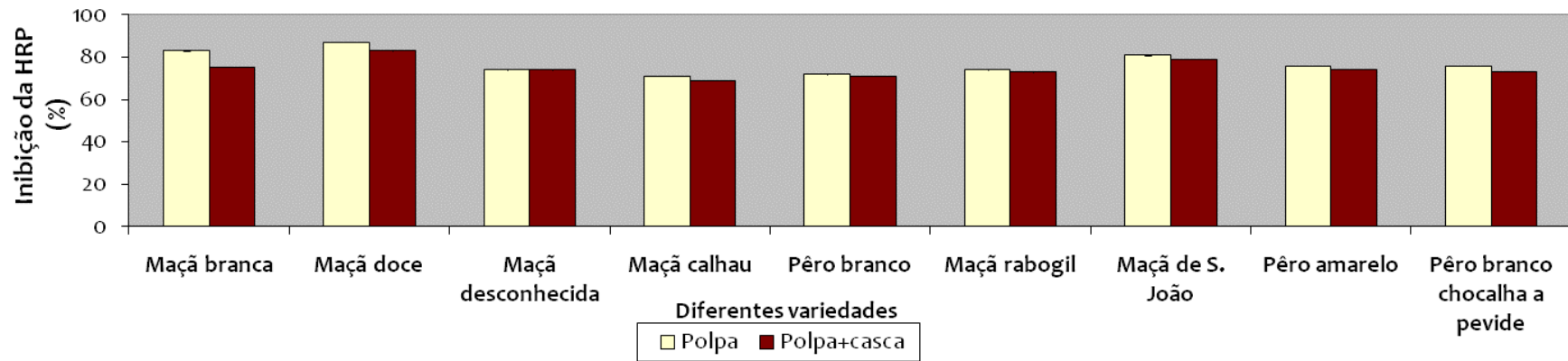


Figura 10. Gráfico da actividade antioxidante nas diferentes variedades da maçã na análise da polpa e polpa em conjunto com a casca, avaliada pela HRP, recorrendo ao valor médio de três ensaios.

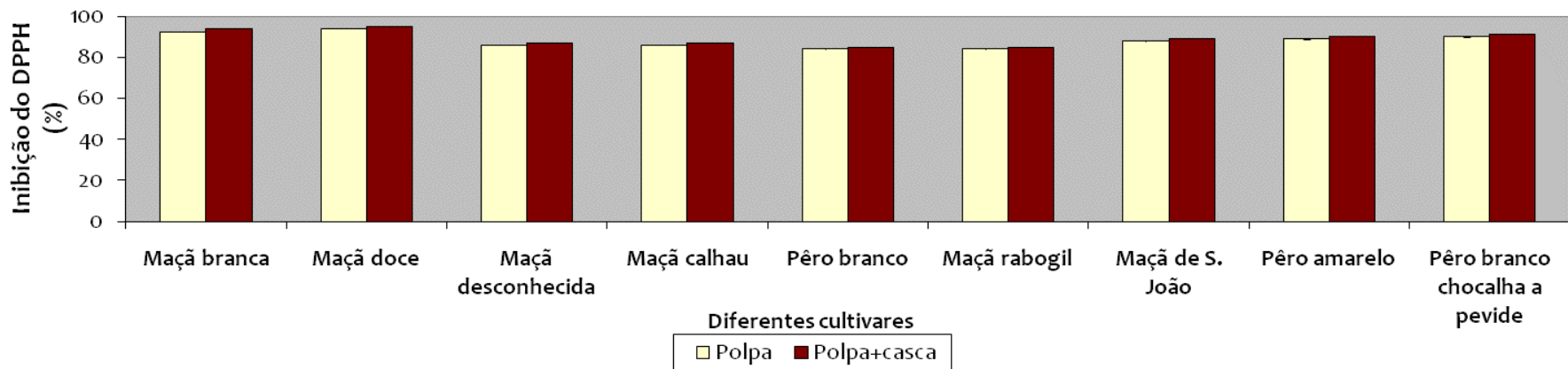


Figura 11. Gráfico da actividade antioxidante nas diferentes variedades da maçã na análise da polpa e polpa em conjunto com a casca, avaliada pelo DPPH, recorrendo ao valor médio de três ensaios.

ANEXO 7.

**Valores dos polifenóis totais, livres e flavonóides da
banana.**

Tabela 1. Valores dos polifenóis totais, livres e flavonóides nas diferentes variedades e locais de cultivo da banana nos três estados de maturação, recorrendo ao valor médio de três ensaios.

Banana	Estado de maturação verde			Estado de maturação intermédio			Estado de maturação maduro		
	Polifenóis totais (mg/100 g)	Polifenóis Livres (mg/100 g)	Flavonóides totais (mg/100g)	Polifenóis totais (mg/100g)	Polifenóis Livres (mg/100g)	Flavonóides totais (mg/100g)	Polifenóis totais (mg/100g)	Polifenóis Livres (mg/100g)	Flavonóides totais (mg/100g)
Importada	0,528 ± 0,003	0,416 ± 0,002	0,085 ± 0,003	0,558 ± 0,075	0,413 ± 0,002	0,085 ± 0,001	0,304 ± 0,014	0,265 ± 0,010	0,018 ± 0,002
Porto Judeu - Canada do Caldeiro	0,855 ± 0,011	0,627 ± 0,054	0,124 ± 0,002	0,448 ± 0,012	0,442 ± 0,017	0,078 ± 0,001	0,363 ± 0,002	0,233 ± 0,027	0,014 ± 0,001
S. Sebastião - Salga	0,583 ± 0,039	0,404 ± 0,020	0,111 ± 0,002	0,562 ± 0,020	0,394 ± 0,017	0,064 ± 0,003	0,521 ± 0,041	0,378 ± 0,106	0,021 ± 0,000
S. Sebastião - Porto Novo	1,338 ± 0,022	0,616 ± 0,038	0,318 ± 0,013	0,697 ± 0,046	0,580 ± 0,018	0,081 ± 0,003	0,477 ± 0,026	0,433 ± 0,010	0,022 ± 0,001
S. Sebastião - Canada Ponta	0,984 ± 0,050	0,407 ± 0,026	0,201 ± 0,001	0,482 ± 0,047	0,385 ± 0,023	0,042 ± 0,002	0,463 ± 0,040	0,379 ± 0,012	0,016 ± 0,001
São Bento	1,485 ± 0,033	0,518 ± 0,037	0,321 ± 0,010	0,488 ± 0,068	0,223 ± 0,044	0,057 ± 0,004	0,447 ± 0,016	0,208 ± 0,007	0,025 ± 0,000
Porto Judeu - Vale	0,662 ± 0,036	0,395 ± 0,014	0,301 ± 0,002	0,396 ± 0,059	0,326 ± 0,030	0,076 ± 0,001	0,291 ± 0,013	0,221 ± 0,026	0,032 ± 0,001
Fonte Bastardo	0,756 ± 0,029	0,369 ± 0,018	0,218 ± 0,004	0,422 ± 0,014	0,343 ± 0,009	0,062 ± 0,001	0,389 ± 0,015	0,228 ± 0,016	0,020 ± 0,000
Terra-chã	1,588 ± 0,007	0,309 ± 0,010	0,226 ± 0,002	0,473 ± 0,009	0,272 ± 0,013	0,061 ± 0,001	0,444 ± 0,009	0,268 ± 0,018	0,025 ± 0,001
S. Sebastião - Arrabalde	1,143 ± 0,002	0,280 ± 0,011	0,217 ± 0,001	0,419 ± 0,011	0,258 ± 0,003	0,054 ± 0,001	0,321 ± 0,014	0,210 ± 0,008	0,028 ± 0,001
Sé	1,045 ± 0,056	0,461 ± 0,044	0,223 ± 0,005	0,895 ± 0,008	0,205 ± 0,006	0,142 ± 0,007	0,469 ± 0,013	0,190 ± 0,005	0,027 ± 0,002

ANEXO 8.

**Valores dos polifenóis totais, livres e flavonóides totais
da maçã.**

Tabela 2. Valores dos polifenóis totais, livres e flavonóides totais nas diferentes variedades da maçã na polpa e na polpa em conjunto com a casca, recorrendo ao valor médio de três ensaios.

Maçã	Polifenóis Totais (mg/100g)		Polifenóis Livres (mg/100g)		Flavonóides (mg/100g)	
	Polpa	Polpa+casca	Polpa	Polpa+casca	Polpa	Polpa+casca
Branca	1,208 ± 0,008	1,354 ± 0,023	0,831 ± 0,052	1,206 ± 0,026	0,417 ± 0,019	0,527 ± 0,016
Doce	0,758 ± 0,011	1,179 ± 0,063	0,568 ± 0,013	0,906 ± 0,039	0,200 ± 0,001	0,298 ± 0,002
Desconhecida	0,999 ± 0,017	1,311 ± 0,033	0,800 ± 0,019	1,037 ± 0,045	0,219 ± 0,002	0,260 ± 0,008
Calhau	0,888 ± 0,037	1,147 ± 0,033	0,692 ± 0,026	0,834 ± 0,010	0,230 ± 0,009	0,266 ± 0,001
Pêro branco	0,937 ± 0,016	1,368 ± 0,024	0,738 ± 0,030	1,096 ± 0,006	0,250 ± 0,006	0,264 ± 0,004
Rabogil	0,821 ± 0,038	1,206 ± 0,006	0,741 ± 0,022	1,043 ± 0,029	0,228 ± 0,009	0,258 ± 0,004
de S. João	1,486 ± 0,009	1,813 ± 0,009	1,181 ± 0,023	1,477 ± 0,026	0,270 ± 0,005	0,326 ± 0,000
Pêro amarelo	1,388 ± 0,016	1,716 ± 0,016	1,256 ± 0,049	1,431 ± 0,006	0,245 ± 0,011	0,267 ± 0,003
Pêro branco chocalha a pevide	1,352 ± 0,024	1,672 ± 0,024	1,255 ± 0,041	1,517 ± 0,008	0,252 ± 0,011	0,312 ± 0,004

ANEXO 9.

Distribuição dos dados da actividade antioxidante

Desenho de probabilidade normal

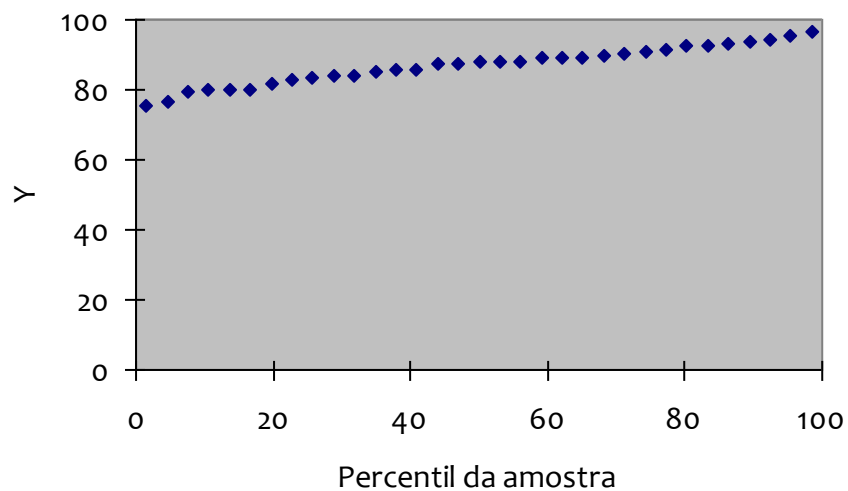


Figura 12. Distribuição dos dados da actividade antioxidante, comparando os valores do DPPH com os polifenóis totais.

Desenho de probabilidade normal

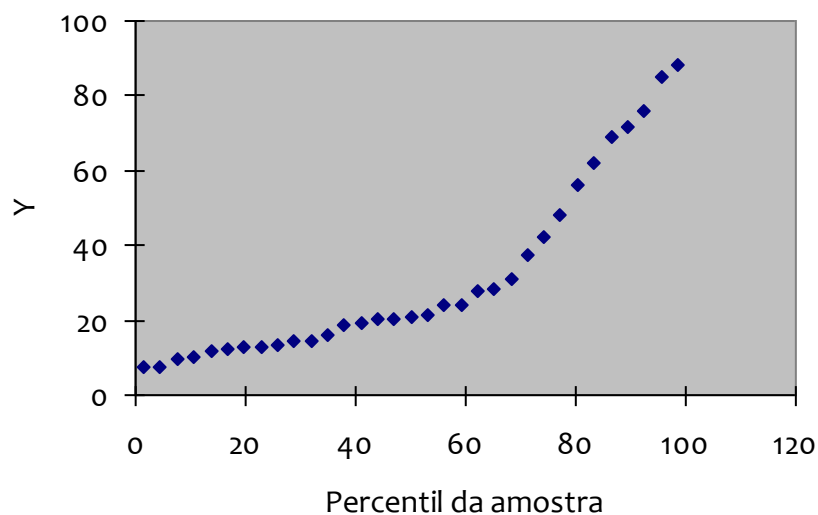


Figura 13. Distribuição dos dados da actividade antioxidante, comparando os valores da HRP com o polifenóis totais.

ANEXO 10.

Testes estatísticos não paramétricos

Anexo 10.1. Tratamento Estatístico da Banana

Kendall's W Test

Ranks (4)	HPR/Totais/Livres/flavanois
N	33
Kendall's W ^a	0.633
Chi-Square	81.091
df	32
Chi-Square (0.05, 32)	46.194

a. Kendall's Coefficient of Concordance

Kendall's W Test

Ranks (2)	HPR/Totais
N	33
Kendall's W ^a	0.756
Chi-Square	48.385
df	32
Chi-Square (0.05, 32)	46.194

Kendall's W Test

Ranks (2)	HPR/Livres
N	33
Kendall's W ^a	0.624
Chi-Square	39.968
df	32
Chi-Square (0.05, 32)	46.194

Kendall's W Test

Ranks (2)	HPR/Flavonóides
N	33
Kendall's W ^a	0.728
Chi-Square	46.599
df	32
Chi-Square (0.05, 32)	46.194

Kendall's W Test

Ranks (2)	HPR/DPPH
N	33
Kendall's W ^a	0.696
Chi-Square	44.535
df	32
Chi-Square (0.05, 32)	46.194

Anexo 10.2. Tratamento Estatístico da Polpa da Maça

Kendall's W Test

Ranks (4)	HPR/Totais/Livres/flavanois
N	9
Kendall's W ^a	0.529
Chi-Square	21.173
df	8
Chi-Square (0.05, 8)	15.507

a. Kendall's Coefficient of Concordance

Kendall's W Test

Ranks (2)	HPR/Totais
N	9
Kendall's W ^a	0.600
Chi-Square	9.600
df	8
Chi-Square (0.05, 8)	15.507

Kendall's W Test

Ranks (2)	HPR/livres
N	9
Kendall's W ^a	0.617
Chi-Square	9.867
df	8
Chi-Square (0.05, 8)	15.507

Kendall's W Test

Ranks (2)	HPR/Flavonóides
N	9
Kendall's W ^a	0.592
Chi-Square	9.467
df	8
Chi-Square (0.05, 8)	15.507

Kendall's W Test

Ranks (2)	HPR/DPPH
N	9
Kendall's W ^a	0.908
Chi-Square	14.533
df	8
Chi-Square (0.05, 8)	15.507

Anexo 10.3. Tratamento Estatístico da Polpa e Casca da Maça

Kendall's W Test

Ranks (4)	HPR/Totais/Livres/flavanois
N	9
Kendall's W ^a	0.631
Chi-Square	20.200
df	8
Chi-Square (0.05, 8)	15.507

a. Kendall's Coefficient of Concordance

Kendall's W Test

Ranks (2)	HPR/Totais
N	9
Kendall's W ^a	0.650
Chi-Square	10.400
df	8
Chi-Square (0.05, 8)	15.507

Kendall's W Test

Ranks (2)	HPR/livres
N	9
Kendall's W ^a	0.625
Chi-Square	10.000
df	8
Chi-Square (0.05, 8)	15.507

Kendall's W Test

Ranks (2)	HPR/Flavonóides
N	9
Kendall's W ^a	0.808
Chi-Square	12.933
df	8
Chi-Square (0.05, 8)	15.507

Kendall's W Test

Ranks (2)	HPR/DPPH
N	9
Kendall's W ^a	0.858
Chi-Square	13.733
df	8
Chi-Square (0.05, 8)	15.507

ANEXO 11.

Análise de variância para os polifenóis.

Anexo 11.1. Totais da banana

Anova: factor único

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Verde	11	10,9684	0,997127	0,130958
Intermédia	11	5,840854	0,530987	0,021903
Madura	11	4,489381	0,408126	0,006168

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	2,124116	2	1,062058	20,03517	2,97719E-06	3,31583
Dentro de grupos	1,590291	30	0,05301			
Total	3,714406	32				

Teste T: duas amostras com variâncias desiguais

	Verde	Intermédia
Média	0,997127	0,530987
Variância	0,130958	0,021903
Observações	11	11
Hipótese de diferença de média	0	
gl	13	
Stat t	3,954257	
P(T<=t) uni-caudal	0,000824	
t crítico uni-caudal	1,770933	
P(T<=t) bi-caudal	0,001648	
t crítico bi-caudal	2,160369	

	Intermédia	Madura
Média	0,530987	0,408126
Variância	0,021903	0,006168
Observações	11	11
Hipótese de diferença de média	0	
gl	15	
Stat t	2,432097	
P(T<=t) uni-caudal	0,014004	
t crítico uni-caudal	1,75305	
P(T<=t) bi-caudal	0,028008	
t crítico bi-caudal	2,13145	

Anexo 11.1. Livres da banana

Anova: factor único

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Verde	11	4,803541	0,436686	0,01253
Intermédia	11	3,841682	0,349244	0,012102
Madura	11	3,012982	0,273907	0,006905

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0,146001	2	0,073	6,944396	0,003323	3,31583
Dentro de grupos	0,315363	30	0,010512			
Total	0,461364	32				

Teste T: duas amostras com variâncias desiguais

	Verde	Intermédia
Média	0,436686	0,349244
Variância	0,01253	0,012102
Observações	11	11
Hipótese de diferença de média	0	
gl	20	
Stat t	1,847857	
P(T<=t) uni-caudal	0,039734	
t crítico uni-caudal	1,724718	
P(T<=t) bi-caudal	0,079468	
t crítico bi-caudal	2,085963	

	Intermédia	Madura
Média	0,349244	0,273907
Variância	0,012102	0,006905
Observações	11	11
Hipótese de diferença de média	0	
gl	19	
Stat t	1,812396	
P(T<=t) uni-caudal	0,042879	
t crítico uni-caudal	1,729133	
P(T<=t) bi-caudal	0,085759	
t crítico bi-caudal	2,093024	

Anexo 11.3. Flavonóides da banana

Anova: factor único

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Verde	11	2,343241	0,213022	0,006557
Intermédia	11	0,754774	0,068616	0,00078
Madura	11	0,248295	0,022572	2,79E-05

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0,217229	2	0,108614	44,24598	1,12586E-09	3,31583
Dentro de grupos	0,073644	30	0,002455			
Total	0,290872	32				

Teste T: duas amostras com variâncias desiguais

	Verde	Intermédia
Média	0,213022	0,068616
Variância	0,006557	0,00078
Observações	11	11
Hipótese de diferença de média	0	
gl	12	
Stat t	5,591638	
P(T<=t) uni-caudal	5,88E-05	
t crítico uni-caudal	1,782288	
P(T<=t) bi-caudal	0,000118	
t crítico bi-caudal	2,178813	

	Intermédia	Madura
Média	0,068616	0,022572
Variância	0,00078	2,79E-05
Observações	11	11
Hipótese de diferença de média	0	
gl	11	
Stat t	5,373006	
P(T<=t) uni-caudal	0,000113	
t crítico uni-caudal	1,795885	
P(T<=t) bi-caudal	0,000226	
t crítico bi-caudal	2,200985	

Anexo 11.4. Totais da maçã

Teste T: duas amostras com variâncias desiguais

	<i>Polpa</i>	<i>Polpa+Casca</i>
Média	1,092928	1,418587133
Variância	0,072928	0,062949593
Observações	9	9
Hipótese de diferença de média	0	
gl	16	
Stat t	-2,650398	
P(T<=t) uni-caudal	0,008728	
t crítico uni-caudal	1,745884	
P(T<=t) bi-caudal	0,017455	
t crítico bi-caudal	2,119905	

Anexo 11.5. Livres da maçã

Teste T: duas amostras com variâncias desiguais

	<i>Polpa</i>	<i>Polpa+Casca</i>
Média	0,895777	1,17179883
Variância	0,068916	0,063264081
Observações	9	9
Hipótese de diferença de média	0	
gl	16	
Stat t	-2,277624	
P(T<=t) uni-caudal	0,018414	
t crítico uni-caudal	1,745884	
P(T<=t) bi-caudal	0,036828	
t crítico bi-caudal	2,119905	

Anexo 11.6. Flavonóides da maçã

Teste T: duas amostras com variâncias desiguais

	<i>Polpa</i>	<i>Polpa+Casca</i>
Média	0,256683	0,308680565
Variância	0,004043	0,007311272
Observações	9	9
Hipótese de diferença de média	0	
gl	15	
Stat t	-1,463926	
P(T<=t) uni-caudal	0,081928	
t crítico uni-caudal	1,75305	
P(T<=t) bi-caudal	0,163855	
t crítico bi-caudal	2,13145	