



**Caracterização da Eficiência Anti-radicalar e do Teor em
Compostos Fenólicos do Espinafre da Nova-Zelândia (*Tetragonia
tetragonioides*).**

“Characterization of the Antiradical Efficiency and Phenolic Compounds in New
Zealand Spinach (*Tetragonia tetragonioides*).”

Luís Filipe Cordeiro Gouveia Morais Amaro

Sob orientação de: Prof.^a Doutora Olívia Pinho

Co-orientado por: Prof.^a Doutora Isabel Ferreira

Dedicatória

Para os meus pais.

Agradecimentos

Este trabalho contou com a preciosa colaboração das seguintes pessoas, a quem gostaria de expressar a minha mais sentida gratidão:

Prof.^a Doutora Olívia Pinho: incansável desde o primeiro dia, foi um exemplo de rigor, espírito científico, orientação e colaboração, mas, sobretudo, disciplina aliada a uma boa disposição que alegra até o espírito mais desgastado, atenuando muitas preocupações e dúvidas acerca da realização do trabalho. Sem o seu acompanhamento, este trabalho teria, com certeza, um parto bem mais moroso;

Prof.^a. Doutora Isabel Ferreira: pelo seu exemplo de trabalho e dedicação à Ciência, pelo acolhimento no Serviço de Bromatologia e por todo o apoio na realização deste trabalho;

Prof.^a Doutora Isabel Almeida: por todos os ensinamentos transmitidos, quer técnicos, quer de ética de trabalho e espírito científico, e pelo acompanhamento incansável do desenvolvimento de todos os componentes do trabalho;

Armindo e Cristina: pela preciosa ajuda no trabalho de laboratório, pelo companheirismo e amizade.

Catarina: pela amizade, desde o meu primeiro dia na FCNAUP, renovada nesta fase, pela preocupação, pelas conversas e pelas ideias para o trabalho;

Olga: pela partilha de um imenso espírito de curiosidade, pelas “pesquisas dispersivas”, pela amizade e preocupação;

Margarida: pela companhia e espírito nas viagens de recolha, que se tornaram numa experiência inesquecível. Só teria sido possível contigo, maninha;

Teresa Chuva, António Rosa, Vasco Pinto, Silvério Branco, Jorge, Zé, Amélia Arantes: pelas amostras, pelas conversas, pelas fortes convicções, pela esperança de conseguirmos um mundo preocupado com a sustentabilidade ambiental;

Susana: pelas amostras dos Açores e pela amizade ao longo dos anos do curso;

Índice

Dedicatória	i
Agradecimentos	ii
Lista de Abreviaturas	vi
Resumo	viii
Palavras-chave	ix
Abstract	x
Keywords	x
1. Introdução	1
2. Objectivos	15
3. Material e métodos	16
3.1. Reagentes e equipamento	16
3.2. Amostragem:	16
3.2.1. <i>Estudo da variabilidade entre os tipos de agricultura</i>	16
3.2.2. <i>Estudo do efeito do processamento térmico na eficiência anti-radicalar e no teor em compostos fenólicos totais</i>	17
3.3. Metodologias	18
3.3.1. <i>Avaliação da composição centesimal utilizando metodologias normalizadas em Portugal (NP)</i>	18
3.3.2. <i>Avaliação da eficiência anti-radicalar e quantificação do teor em compostos fenólicos totais</i>	18
4. Resultados e discussão	21
4.1. Composição centesimal do espinafre da Nova-Zelândia	21
4.2. Avaliação da actividade anti-radicalar pelo método de captação do radical DPPH e do teor em compostos fenólicos totais no espinafre da Nova-Zelândia.....	23
4.2.1. <i>Optimização do método de captação do radical DPPH e do solvente extractivo</i>	23
4.2.2. <i>Preparação da curva de calibração de ácido gálgico</i>	25
4.3. Avaliação da actividade anti-radicalar e do teor em compostos fenólicos totais de espinafre da Nova-Zelândia selvagem, de agricultura biológica e convencional.....	26
4.4. Avaliação da actividade anti-radicalar e do teor em compostos fenólicos totais de espinafre da Nova-Zelândia de agricultura convencional, cozinhado em água à temperatura de ebulição durante tempos diferentes.	32

5. Conclusões	35
Referências	36

Lista de Abreviaturas

a.C.: antes de Cristo

ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ANOVA: *Analysis of Variance*

Cat.: Categoria

DPPH: 1,1'-difenil'-2-picrilhidrazilo

EAG: Equivalentes de ácido gálgico

EtOH: Etanol

Fe III: Ferro férrico

FRAP: *Ferric reducing ability of plasma*

HC: Hidratos de carbono

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência (*High performance liquid chromatography*)

IC₅₀: Concentração de captação de 50% do radical DPPH

INSA: Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

MeOH: Metanol

m/m: massa/massa

MS: Espectrometria de massa (*Mass spectrometry*)

m/v: massa/volume

n.c.: não calculado

n.d.: não disponível

n.º: número

NP: Norma Portuguesa

OMS: Organização Mundial de Saúde

ORAC: *Oxygen radical absorbance capacity*

Ref.: Referência

rpm: rotações por minuto

SA: Sociedade Anônima

SPSS: *Statistical package for social sciences*

TBARS: *Thiobarbituric acid reactive substances*

TEAC: *Trolox equivalent antioxidant capacity*

TC₅₀: Tempo decorrido até obtenção de leituras estáveis de absorvência

USDA: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (*United States Department of Agriculture*)

Resumo

O consumo de fruta e hortícolas, que contêm compostos com acção antioxidante, tem sido associado à redução do risco de incidência de doenças crónicas, causados por estados de *stresse* oxidativo.

O espinafre (*Spinacea oleracea*) é um hortícola muito consumido em todo o mundo. Esta planta apresenta dificuldade em se desenvolver a temperaturas superiores a 20 °C, por isso, tem sido comercializado outra espécie, o espinafre da Nova-Zelândia (*Tetragonia tetragonioides*), muito consumido em Portugal

Neste trabalho, procurou determinar-se a composição centesimal do espinafre da Nova-Zelândia, a actividade e eficiência anti-radicalar com o DPPH (expressa em IC₅₀) e o teor em compostos fenólicos totais (expressos em mg EAG/ g de extracto) de extractos metanólicos de espinafres da Nova-Zelândia provenientes de diversas zonas do país e produzidos com recurso a diferentes tipos de produção: agricultura biológica e convencional e plantas selvagens. Avaliou-se também a influência do tempo de cozedura na actividade anti-radicalar e no teor em compostos fenólicos totais em extractos metanólicos de espinafres de agricultura convencional.

Os valores de IC₅₀ dos extractos metanólicos de espinafre cru situaram-se entre 155 e 319 µg/ml. Os teores em compostos fenólicos totais variaram entre 27,98 e 42,55 mg EAG/g de extracto. Não foram encontradas diferenças significativas entre os modos de produção, no que respeita a estes parâmetros.

Registaram-se perdas significativas de actividade anti-radicalar nos primeiros 5 minutos de cozedura, para os espinafres da Nova-Zelândia estudados, após esse período verificou-se estabilização. Não se verificaram diferenças significativas no teor de fenólicos totais.

Palavras-chave

Espinafre da Nova-Zelândia, *Tetragonia tetragonioides*, actividade anti-radicalar, compostos fenólicos totais, agricultura biológica, DPPH.

Abstract

The consumption of fruits and vegetables antioxidant rich has been associated with reduction of the incidence of several chronic diseases, caused by oxidative stress.

Spinach (*Spinacea oleracea*) is a leafy vegetable consumed world-wide. This specie scarcely grows at temperatures above 20 °C, for that reason another specie named New Zealand spinach is being commercialized (*Tetragonia tetragonioides*), it is very consumed in Portugal.

In this study, macronutrient composition, antiradical activity (IC₅₀) and efficiency with DPPH, and total phenolic content (expressed as mgEAG/g of methanolic extract) of New Zealand spinach were determined in leaves from different regions of the country and produced with different techniques: organic and conventional agriculture, and wild plants. The influence of cooking time on the antiradical activity and total phenolic content of methanolic extracts of New Zealand spinach leaves produced conventionally was also studied.

The IC₅₀ values of the methanolic extracts of raw spinach range between 155 and 319 µg/ml. Total phenolic content ranged between 27,98 and 42,55 mg EAG/g of extract. No significant differences were found between the production methods, concerning IC₅₀ values and total phenolic content. Losses of antiradical activity were found until 5 min of cooking time, after that period stabilization was observed. Concerning total phenolic content no significant changes were observed.

Keywords

New Zealand spinach, *Tetragonia tetragonioides*, antiradical activity, total phenolic content, organic agriculture, DPPH

1. Introdução

O espinafre (*Spinacea oleracea* L.) é uma planta herbácea pertencente à família *Chenopodiaceae*. A designação *Spinacea* deriva da forma latina *spina* (espinha) e refere-se ao aspecto espinhoso do fruto; o epíteto latino *oleracea*, por sua vez, significa “para cultivo”, ou “adequado para a alimentação” ⁽¹⁾.

Admite-se que o espinafre é originário da Pérsia, das regiões que actualmente constituem o Tajiquistão e o Afeganistão ⁽²⁾. Os Chineses foram os primeiros a descrever a espécie como proveniente do Nepal, no ano 647 a.C., referindo-se a ela como a “erva da Pérsia”. Desconhecida pelas culturas Grega e Romana, o seu cultivo na Europa iniciou-se na Península Ibérica através da expansão do Império Islâmico para esta região. A introdução de novas espécies, juntamente com novas técnicas de irrigação e selecção de sementes, provenientes dos três continentes onde se registou a presença Islâmica, contribuiu para o enriquecimento da dieta dos povos mediterrânicos ^(1, 3).

As primeiras variedades de espinafre tinham frutos espinhosos, descritos também na Alemanha em 1280. As variedades de fruto liso são mais tardias, resultantes de processos de selecção agrícola. Por volta do ano 1500, era já uma espécie bastante comum nos jardins e hortas em Inglaterra e França, sendo cultivado principalmente em mosteiros. Foi uma das espécies que os colonos americanos levaram consigo no século XV, e em 1806 cultivavam-se pelo menos três variedades diferentes de espinafre quer na Europa quer na América do Norte. Entre o final do século XIX até metade do século XX foram desenvolvidas inúmeras variedades, com folhas de diversos formatos (rugoso, liso) e adaptadas às diferentes condições dos locais de cultivo ⁽¹⁾.

Este hortícola é consumido normalmente cozido, em sopas ou no prato, podendo também ser utilizado cru, na preparação de saladas ⁽⁴⁾. O consumo de espinafre sempre foi pouco apreciado, especialmente pelas crianças devido ao seu odor característico e sabor ligeiramente amargo e alcalino, que se devem à formação dos compostos dimetilsulfito, metanotiol, metional e 2-acetil-1-pirrolina quando as folhas são cozinhadas ^(2, 4).

O seu alto teor em Ferro, descrito inicialmente pelo Dr. E. Von Wolf em 1870, foi a primeira referência à sua riqueza nutricional. Contudo, este facto viria a revelar-se um erro, devido à colocação do ponto decimal um algarismo à direita, o que levou à publicação de um valor dez vezes maior do que o que tinha sido verdadeiramente quantificado. A rectificação foi feita por investigadores alemães, em 1930, mas não impediu a propagação de um mito que atingiu o seu auge com os desenhos animados do marinheiro Popeye, que comia espinafre enlatado para aumentar a sua força e vencer os seus inimigos. Gerou-se, assim, uma célebre frase na cultura Norte-Americana: *“America’s strong to finish, ‘cos they eat their spinach”*, bem reveladora do sucesso alcançado pela espécie nesse país. Na cidade de Crystal City, no Texas, considerada a “capital mundial do espinafre”, ergueu-se, em 1937, uma estátua ao famoso marinheiro, considerado por Hamblin (1981) o principal estimulador de um aumento de 33% no consumo de espinafre, verificado após o início da transmissão dos desenhos animados ^(5, 6). O mito foi também aproveitado para a elaboração de propaganda durante a Segunda Guerra Mundial, em que se verificou grande escassez de carnes vermelhas e se apresentava o espinafre como um substituto perfeito, de forma a garantir uma ingestão adequada de Ferro pelas populações ⁽⁶⁾. Na verdade, o espinafre apresenta quantidades de Ferro superiores às da maioria dos vegetais

folhosos, contudo, encontra-se na forma não-heme, que apresenta baixa biodisponibilidade. Cook, em 2001 referiu um aumento na absorção de Ferro não-heme através da ingestão concomitante de alimentos com níveis elevados de vitamina C, apesar deste efeito ser menos pronunciado em dietas completas quando comparadas com refeições únicas ⁽⁷⁾.

A espécie *Spinacea oleracea* é característica de climas temperados e cresce preferencialmente no Outono e no Inverno, sendo intolerante a temperaturas acima dos 20 °C. Existe uma outra espécie, *Tetragonia tetragonioides*, conhecida como espinafre da Nova-Zelândia, que é comercializada como substituto da *Spinacea oleracea* nas épocas mais quentes do ano, em que não é possível o cultivo deste último ⁽¹⁾.

O espinafre da Nova-Zelândia é uma planta herbácea perene, endémica de regiões costeiras do Pacífico, como a Nova-Zelândia, Austrália, China e Japão. A sua primeira utilização foi documentada pelo capitão Cook, como anti-escorbútico durante as suas viagens ⁽⁹⁾. Esta espécie foi introduzida na Europa no século XVIII, pelo naturalista britânico Sir Joseph Banks, no Kews Garden, o primeiro Jardim Botânico do mundo, situado em Londres ⁽²⁾. O seu cultivo nunca foi massificado, apesar de ser uma espécie bastante popular em hortas domésticas um pouco por todo o mundo. Assim, as variedades existentes actualmente são geneticamente semelhantes às ancestrais, pois as pressões selectivas feitas para a melhoria das culturas agrícolas não foram exercidas sobre esta espécie ⁽¹⁰⁾. A capacidade de resistir a pragas e a altas temperaturas fazem do espinafre da Nova-Zelândia uma espécie interessante do ponto de vista agrícola, uma vez que não requer grandes cuidados no seu cultivo e produz folhas que podem ser colhidas para consumo após cinco a seis semanas da germinação e,

subsequentemente, de duas em duas semanas, estimulando assim a formação de novas folhas ⁽²⁾. A etapa mais exigente no seu ciclo de vida é o processo de germinação das sementes, normalmente irregular e sensível à qualidade do solo, preferindo os que são ligeiramente salinos e com alta percentagem de matéria orgânica ⁽¹⁰⁾. Devido à sua grande sensibilidade a baixas temperaturas, em regiões temperadas observa-se o início do seu crescimento na Primavera e o desaparecimento das plantas durante as primeiras geadas de Inverno ⁽²⁾. No entanto, a espécie volta a crescer no mesmo local sem ser necessário proceder a nova sementeira, uma vez que as sementes se encontram contidas dentro do fruto que, ao secar, endurece, formando uma protecção eficaz contra condições adversas. A disseminação das sementes é facilitada pela sua leveza e pelas pequenas espinhas existentes no fruto, que aderem facilmente a animais ⁽¹⁰⁾.

Na Tabela 1 é possível observar e comparar alguns valores relativos à composição nutricional das duas espécies de espinafres atrás referidas, *Spinacea oleracea* e *Tetragonia tetragonioides*, apresentados nas tabelas de referência do Departamento da Agricultura dos Estados Unidos (USDA) e do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) ^(11, 12). Os valores referentes à composição do *Spinacea oleracea* são semelhantes nas duas fontes para a maioria dos parâmetros. Os valores dos carotenos (5626 µg e 3300 µg), vitamina C (28,1 e 35 mg), folatos (194 e 150 µg), Potássio (558 e 471 mg), Cálcio (99 e 104 mg), Ferro (2,7 e 2,4 mg) e Sódio (79 e 173 mg) apresentam diferenças com alguma relevância, o que pode ser justificado pelas diferenças quer nos métodos analíticos utilizados, quer nas condições de produção e armazenamento das amostras, entre outros.

	<i>Spinacea oleracea</i> L.		<i>Tetragonia tetragonioides</i>	
	USDA	INSA	USDA	INSA
Humidade (%)	91,40	91,8	94	n.d.
Valor Energético (kcal)	23	22	14	n.d.
Proteína (g)	2,86	2,6	1,5	n.d.
Gordura (g)	0,39	0,9	0,2	n.d.
Hidratos de Carbono (g)	3,63*	0,8	2,5*	n.d.
Vitamina A (equivalentes de retinol)	469	550	220	n.d.
Vitamina C (mg)	28,1	35	30	n.d.
Carotenos (µg)	5626	3300	n.d.	n.d.
Niacina (mg)	0,724	0,40	0,50	n.d.
Folatos (µg)	194	150	15	n.d.
Cinza (g)	1,72	1,30	1,8	n.d.
Ferro (mg)	2,71	2,4	0,8	n.d.
Fósforo (mg)	49	45	28	n.d.
Potássio (mg)	558	471	130	n.d.
Cálcio (mg)	99	104	58	n.d.
Sódio (mg)	79	173	130	n.d.

Tabela 1: Composição nutricional do espinafre comum (*Spinacea oleracea*) e do espinafre da Nova Zelândia (*Tetragonia tetragonioides*). Adaptada de ^(11, 12)
* valores calculados por diferença

O espinafre da Nova-Zelândia não pode ser comparado entre as duas fontes uma vez que a tabela portuguesa não contém dados relativos à sua composição nutricional. Contudo, na base de dados do USDA encontram-se valores referentes a esta espécie, sendo de destacar o Sódio, presente em quantidade ligeiramente mais elevada que na *Spinacea oleracea*. Os restantes nutrientes encontram-se em quantidades inferiores na *Tetragonia tetragonioides*, à excepção da humidade, sendo, contudo, semelhantes aos verificados noutros hortícolas folhosos, quando comparados nas mesmas tabelas de referência, o que o torna num alimento potencialmente benéfico para a saúde. Foram já referidos efeitos anti-ulcerogénicos e anti-inflamatórios atribuídos a cerebrosídeos e polissacarídeos presentes nesta espécie ⁽¹³⁾. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o consumo diário de, pelo menos, 400 g ou cinco porções de

fruta e hortícolas. O consumo de fruta e hortícolas tem sido associado à redução do risco e da mortalidade ligados às doenças cardiovasculares, à obesidade e a algumas neoplasias ^(14, 15).

O metabolismo produz, normalmente, quantidades significativas de radicais livres, que possuem efeitos antagónicos no organismo. Os efeitos benéficos ocorrem quando estes compostos se apresentam em baixas concentrações, ligados a diversos sistemas de sinalização e à resposta a agentes infecciosos, promovendo também a resposta mitogénica. Contudo, os radicais livres são os principais promotores de estados de stresse oxidativo quando produzidos em excesso, causando modificações da estrutura de membranas e biomoléculas como os lípidos, ADN ou proteínas. Estes desequilíbrios encontram-se implicados na génese de doenças cardiovasculares, neoplasias, patologias neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, bem como em complicações de diversas doenças crónicas ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. Apesar de os mecanismos protectores associados ao consumo de fruta e hortícolas não estarem desvendados na totalidade, admite-se que estes são devidos à presença de fibras solúveis, oligoelementos e compostos com actividade antioxidante presentes nestes alimentos ⁽¹⁹⁾.

Segundo a Directiva 95/2/CE do Parlamento Europeu, antioxidante alimentar é uma “substância que prolonga a durabilidade dos géneros alimentícios, protegendo-os contra a deterioração causada pela oxidação, tal como a rancidez das gorduras e as alterações de cor”. Em sistemas biológicos, esta definição foi ampliada por diversos autores para “qualquer substância que, presente em pequenas concentrações, comparada com as de um substrato oxidável, atrasa ou previne a sua oxidação” ^(20, 21). Os antioxidantes podem ser

classificados de acordo com o seu mecanismo de acção, seja por eliminação de radicais livres, quelatação de iões metálicos que catalisam a peroxidação lipídica, ou pela reacção com oxigénio em sistemas fechados ⁽²²⁾. O papel dos compostos com actividade antioxidante tem despertado particular interesse, existindo numerosos estudos acerca do efeito protector de compostos isolados, como as vitaminas C e E, β - caroteno, e diversos polifenóis, como o resveratrol e vários flavonóides ⁽²³⁻²⁸⁾. Admite-se, ainda, que o efeito sinérgico das diferentes combinações de antioxidantes presentes nos alimentos e na dieta será mais significativo do que a acção isolada de um determinado composto ⁽²⁹⁾.

Os polifenóis são metabolitos secundários das plantas, constituídos por um ou mais anéis aromáticos com diversos grupos hidroxilo ligados directamente ao anel fenólico ⁽³⁰⁾. Podem ser classificados de acordo com o número de anéis aromáticos que possuem ou em função dos elementos que os ligam. Assim, podem distinguir-se em ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e lignanos. Os flavonóides podem ainda ser subdivididos em seis classes: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianinas e flavanóis ⁽³¹⁾. A sua presença é ubiqüitária nas plantas, que os sintetizam para protecção contra diversas fontes de stresse, contribuindo para processos de reparação celular em áreas lesionadas. A sua concentração também aumenta após infecções, o que sugere que possuam actividade antimicrobiana. Os factores ambientais a que as plantas estão sujeitas, (solo, exposição à luz e chuva), bem como diversos factores de índole agrícola, (tipo de cultura, quantidade de frutos ou folhas produzidos pela planta), ou o grau de maturação das estruturas onde se acumulam influenciam significativamente a sua formação ⁽³²⁾.

Os efeitos protectores dos polifenóis têm despertado particular atenção em estudos recentes, devido principalmente ao denominado “paradoxo francês”. Esta hipótese defende que os baixos índices de mortalidade por doença cardiovascular verificados na população francesa se devem ao consumo regular de quantidades moderadas de vinho tinto, que apresenta na sua composição quantidades elevadas de polifenóis, apesar da alta ingestão de gorduras saturadas ⁽³³⁾. Quando vários estudos confirmaram a actividade antioxidante dos compostos fenólicos presentes no vinho, a pesquisa destes compostos expandiu-se às plantas medicinais, ervas aromáticas, especiarias e alimentos, e tem suscitado grande interesse nos últimos anos ⁽³⁴⁾.

As acções dos polifenóis no organismo dependem essencialmente da sua biodisponibilidade e de processos de biotransformação. A biodisponibilidade dos polifenóis é afectada pelo conteúdo de gorduras e proteínas ingeridos em simultâneo e pelo tipo e número de glucosídeos a que os compostos se encontram associados, sendo geralmente muito baixa. Apenas 1% dos polifenóis ingeridos são absorvidos, a nível do tracto gastro-intestinal, atingindo a concentração máxima no plasma entre 15 e 30 minutos após o seu consumo ⁽³⁵⁾. Antes de serem absorvidos, a maioria dos polifenóis sofre hidrólise por enzimas intestinais como as β -glucosidases, ou pela flora intestinal ⁽³⁶⁾. No último caso, a eficiência da absorção pode ser reduzida, pois os microrganismos entéricos degradam as agliconas produzidas após hidrólise, formando ácidos aromáticos simples, que não são absorvidos ⁽³¹⁾. É também aceite, por este facto, que os polifenóis exerçam efeitos protectores mais significativos directamente no tracto gastrointestinal. Os processos de biotransformação sofridos pelos polifenóis dão-se principalmente a nível hepático, formando glucoronatos. Alguns deles são

metabolizados a derivados sulfonados ou sofrem metilação, sendo estas as principais formas encontradas na urina ⁽³⁷⁾. Estudos realizados em modelos animais reportaram que os polifenóis têm tendência a acumular-se em certos tecidos-alvo, como o intestino e o fígado, enquanto que na circulação se encontram ligados à albumina ⁽³⁸⁾. A excreção dos metabolitos com alto peso molecular é feita através da bile, enquanto que os compostos de baixo peso molecular são excretados preferencialmente na urina ⁽³⁶⁾. A grande complexidade dos polifenóis no seu estado nativo, e os extensos e variados processos de metabolização a que são sujeitos, torna difícil a identificação dos seus metabolitos e o estudo da sua actividade *in vivo* ⁽³¹⁾.

A actividade antioxidante dos polifenóis deve-se aos seus grupos hidroxilo, que sequestram radicais livres provenientes do metabolismo ou impedem a sua formação, através de inibição enzimática ou da quelatação de metais necessários para a génese das espécies reactivas. Os polifenóis actuam também na redução ou inibição da agregação plaquetária ^(31, 33). No entanto, existem estudos que documentam acções que ultrapassam o modelo da acção antioxidante, referindo acções indirectas nos mecanismos de oxidação e reparação celular, através da modulação de sistemas enzimáticos responsáveis pela neutralização de radicais livres e da indução directa da apoptose em células isoladas de tumores. Alguns estudos efectuados em modelos animais registaram um aumento do crescimento de tumores mamários e uterinos, bem como actividade pró-oxidante, que pode ser resultante das concentrações de polifenóis usadas nos ensaios, significativamente mais elevadas que as existentes numa dieta normal, que podem provocar o desequilíbrio das células usadas, induzindo estados de oxidação. Contudo, este

facto também pode explicar os efeitos antioxidantes que os polifenóis apresentam em diversos estudos com modelos celulares *in vitro* ⁽³⁸⁾.

Existem múltiplos métodos de avaliação da actividade antioxidante, baseados nas propriedades dos compostos de interesse, tendo sido aplicados a diversas matrizes como frutos, hortícolas, plantas medicinais ou ervas aromáticas, bem como em plasma sanguíneo. As principais abordagens *in vitro* incluem modelos de peroxidação lipídica ⁽³⁹⁻⁴¹⁾, quelatação de metais ^(39, 40, 42-44) e actividade radicalar usando radicais estáveis. O ensaio do radical estável 1,1'-difeníl-2-picrilhidrazilo (DPPH) é bastante popular, devido à sua facilidade de execução e alta sensibilidade. Através deste ensaio, avalia-se a actividade de compostos com capacidade dadora de hidrogénio e electrões, sendo por isso um bom indicador da actividade antioxidante para a maioria dos polifenóis ⁽³⁴⁾. Contudo, a acção antioxidante registada *in vitro* com o uso deste radical poderá não ter correspondência em *in vivo*, uma vez que os polifenóis sofrem extensas transformações antes de atingirem as células, e o DPPH é um radical sintético, que não ocorre naturalmente ⁽³⁸⁾.

As tendências de consumo têm revelado que existem cada vez mais consumidores a optar por alimentos de produção biológica. Este modo de produção é caracterizado pelo recurso a técnicas de cultivo ancestrais e por não admitir a utilização de fertilizantes sintéticos, pesticidas ou herbicidas, assentando em práticas que visam a sustentabilidade ambiental. Em Portugal, o número de agricultores biológicos tem vindo a crescer consideravelmente nos últimos anos, bem como a área orgânica cultivável ⁽⁴⁵⁾. As razões que levam os consumidores a optar por alimentos provenientes de sistemas de produção biológica variam consoante o país, mas são referidas mais frequentemente questões ligadas à

saúde e ao ambiente. Contudo, também se encontram referidas diversas razões para os consumidores não adquirirem produtos de agricultura biológica, como o preço elevado, a pouca disponibilidade e falta de tempo para encontrar vendedores, baixa qualidade (relacionada com a aparência dos produtos), a satisfação com as suas escolhas actuais, e o facto de não estarem familiarizados com o termo “biológico” nem com os sistemas de certificação ⁽⁴⁶⁾. Os estudos publicados que comparam alimentos produzidos com técnicas convencionais ou de agricultura biológica são poucos, e os seus resultados são controversos, estando referidas diferenças ao nível da acumulação de determinados compostos, como pesticidas ou nitratos ^(46, 47). A informação relativa ao valor nutricional e actividade antioxidante também não é conclusiva ⁽⁴⁷⁻⁵³⁾.

Na Tabela 2 apresentam-se de uma forma resumida, vários estudos aplicados a diversos vegetais, nos quais se inclui o espinafre comum, com o objectivo de avaliar a sua actividade antioxidante e o seu conteúdo em polifenóis, bem como os métodos analíticos usados. No que se refere ao espinafre da Nova-Zelândia os estudos são escassos, como evidenciado na Tabela 3, onde são referidos apenas dois estudos, nos quais foram doseados os carotenóides e dois flavonóides presentes nesta espécie. O facto de haver níveis de consumo significativos, principalmente no norte do país, justifica um estudo mais aprofundado do espinafre da Nova-Zelândia. Assim, com este trabalho pretendeu-se estudar as diferenças na actividade anti-radicalar e no teor em compostos fenólicos totais do espinafre da Nova-Zelândia de produção biológica e convencional, e explorar as alterações provocadas pelo processamento térmico nestes dois parâmetros.

Objectivos	Métodos	Conclusões	Ref.
<ul style="list-style-type: none"> - Avaliação da actividade antioxidante em extractos metanólicos após hidrólise ácida; - Quantificação de flavonóides 	<p>Actividade antioxidante: DPPH, captação de aniões superóxido, actividade sobre o radical hidroxilo, poder redutor, actividade antioxidante num sistema de ácido linoleico</p> <p>Quantificação de flavonóides: HPLC</p>	<p>- Espinafre:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Actividade contra radicais: Hidroxilo: 63,35% Superóxido: 77,16% DPPH: 90,64% - Poder redutor (absorvência a 700 nm): 0,19; - Inibição da peroxidação lipídica: 47,48%. 	(42)
<ul style="list-style-type: none"> - Avaliação da actividade antioxidante e teor em ácido ascórbico em fracções lipídicas e aquosas de extractos de vegetais; - Efeito do congelamento e processamento culinário. 	<p>Actividade antioxidante: FRAP (ensaios realizados na fracção aquosa e lipídica dos extractos), quantificação de ascorbato.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Vegetais congelados não apresentam diferenças na actividade antioxidante quando comparados com vegetais frescos - Fracção aquosa: aumento ligeiro da actividade antioxidante nas amostras cozinhadas em microondas; perdas de actividade antioxidante quando cozinhado em água quente; - Fracção lipídica: aumento da actividade antioxidante em todos os métodos culinários; - Ácido ascórbico: perdas em todos os métodos. 	(54)
<ul style="list-style-type: none"> - Avaliação do potencial antioxidante de extractos metanólicos; - Relação entre conteúdo fenólico e vitamina C com os valores de actividade antioxidante. 	<p>Actividade antioxidante: TEAC, FRAP, ORAC</p> <p>Compostos fenólicos: Identificação e quantificação por HPLC</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Frutas e horticolas ricos em antocianinas demonstraram os valores mais altos de actividade antioxidante, seguidos pelas amostras ricas em flavanonas e flavonóis - Valores de actividade antioxidante altamente correlacionados com o teor de compostos fenólicos totais e vitamina C. 	(55)
<ul style="list-style-type: none"> - Determinação da actividade antioxidante de extractos metanólicos de vegetais folhosos - Avaliação das alterações devido a processamento culinário. 	<p>Actividade antioxidante: TBARS, sequestro do anião superóxido, quelação de Ferro II</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Grande variabilidade entre espécies; - Redução da actividade antioxidante e perdas de vitamina C e E após processamento culinário 	(43)

Tabela 2. Actividade antioxidante e conteúdo polifenólico de vegetais.

Objectivos	Métodos	Conclusões	Ref.
- Avaliação da actividade antioxidante e conteúdo fenólico total em extractos metanólicos - Efeito de diferentes métodos culinários	Actividade antioxidante: DPPH Compostos fenólicos: Reagente de Folin-Ciocalteu	- Espinafre apresentou o segundo maior teor em compostos fenólicos totais e a terceira actividade antioxidante mais elevada; - Compostos fenólicos e actividade antioxidante aumentaram após tratamento culinário, com diferenças significativas para os valores de actividade antioxidante.	(56)
- Determinação da actividade antioxidante e compostos fenólicos em diversos vegetais cultivados no Colorado (EUA)	Actividade antioxidante: ABTS, DPPH, anião Superóxido, ORAC, queilação de Ferro II Compostos fenólicos: Reagente de Folin-Ciocalteu	- Espinafre revelou valores elevados de actividade antioxidante, com variabilidade entre métodos usados; - O conteúdo fenólico do espinafre situou-se entre os 9,3 e 13 mg equivalentes de ácido galico/g de matéria seca.	(44)
- Comparação da capacidade antioxidante e compostos fenólicos em extractos metanólicos de espinafre; - Avaliação das diferenças entre variedades comerciais e variedades provenientes de linhas genéticas de selecção avançada; - Avaliação das diferenças entre folhas em diferentes estados de maturação.	Actividade antioxidante: ORAC Compostos fenólicos: Reagente de Folin-Ciocalteu Identificação e quantificação de flavonóides: HPLC	- Variedades provenientes de linhas genéticas avançadas apresentaram valores mais altos em todos os parâmetros relativamente às comerciais; - Folhas em estado de maturação médio apresentaram os valores mais elevados relativamente às folhas imaturas e adultas. - ORAC apresentou correlação alta com o teor em compostos fenólicos	(57)
- Comparação de actividade antioxidante e eficiência anti-radicalar entre vegetais folhosos	Actividade antioxidante: Auto-oxidação de β -caroteno, sistema de ácido linoleico, DPPH, redução de Fe III Conteúdo fenólico: Reagente de Folin-Ciocalteu, HPLC, MS	- Folhas do espinafre apresentaram valores mais elevados de actividade antioxidante e eficiência anti-radicalar em relação às sementes; - Tratamento térmico provocou a redução de todos os parâmetros analisados.	(39)
- Avaliação da capacidade antioxidante de hortícolas	Actividade antioxidante: DPPH, sistema modelo β -caroteno/ácido linoleico Compostos fenólicos: Reagente de Folin-Ciocalteu	- O espinafre apresentou um dos valores mais elevados de compostos fenólicos e de actividade antioxidante de todos os vegetais analisados;	(40)

Tabela 2. Actividade antioxidante e conteúdo polifenólico de vegetais (continuação).

Objectivos	Métodos	Conclusões	Ref.
<ul style="list-style-type: none"> - Avaliação da actividade antioxidante e teor de compostos fenólicos em vegetais - Efeito de diferentes métodos culinários na actividade antioxidante e compostos fenólicos 	<p>Actividade antioxidante: Sistema de ácido linoleico, redução de Fe III</p> <p>Compostos fenólicos: Reagente de Folin-Ciocalteu</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Tratamento com microondas resultou na redução mais significativa de compostos fenólicos; - Poder redutor aumentou após fritura e diminuiu após cozedura em água quente e tratamento com microondas; - Espinafre apresentou quantidades elevadas de compostos fenólicos. 	(41)
<ul style="list-style-type: none"> - Avaliação do conteúdo fenólico e da actividade antioxidante e anti-proliferativa de fracções aquosas de vegetais; - Estudo do efeito de tratamento térmico 	<p>Actividade antioxidante: DPPH, ensaio da desoxirribose</p> <p>Compostos fenólicos: Reagente de Folin-Ciocalteu</p> <p>Actividade anti-proliferativa: Avaliação das percentagens de crescimento de culturas de células HL-60 (linha celular de leucemia)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - O espinafre apresentou os valores mais elevados de compostos fenólicos e actividade contra o radical hidroxilo no ensaio da desoxirribose; - A actividade do espinafre contra o radical DPPH foi a segunda mais elevada dos vegetais em estudo; - Todos os extractos exibiram actividade anti-proliferativa, com diferenças significativas; - Temperaturas normalmente usadas em métodos culinários reduziram significativamente a actividade antioxidante e o teor em compostos fenólicos em todas as amostras; - O aquecimento das amostras a temperaturas mais baixas que nos processos culinários não provocou alterações nos compostos fenólicos e na actividade antioxidante e anti-proliferativa. 	(58)

Tabela 2. Actividade antioxidante e conteúdo polifenólico de vegetais (continuação).

Objectivos	Métodos	Conclusões	Ref.
<ul style="list-style-type: none"> - Identificação e quantificação de carotenóides - Efeito do estado de maturação, processamento mínimo e da estação do ano no teor de carotenóides 	<p>Identificação e quantificação de carotenóides: HPLC</p>	<ul style="list-style-type: none"> - As folhas jovens continham maiores quantidades de carotenóides que as folhas adultas; - As amostras colhidas no Verão apresentavam maiores concentrações dos compostos identificados; - O armazenamento em ambiente refrigerado (máximo de 5 dias) provocou perdas significativas de todos os compostos analisados. 	(59)
<ul style="list-style-type: none"> - Determinação de flavonóis e flavonas de vegetais brasileiros 	<p>Identificação dos compostos: HPLC</p>	<ul style="list-style-type: none"> - O espinafre da Nova-Zelândia apresentou quantidades elevadas de campferol e baixos níveis de quercetina; - As folhas recolhidas no Verão apresentaram níveis mais elevados de ambos os compostos relativamente a folhas obtidas no Inverno. 	(60)

Tabela 3. Identificação de carotenóides e polifenóis no espinafre da Nova-Zelândia.

2. Objectivos

1. Conhecer o valor centesimal do espinafre da Nova-Zelândia (*Tetragonia tetragonioides*);

(i) determinar composição centesimal do espinafre da Nova-Zelândia; (ii)

Identificar diferenças na composição centesimal entre espinafres selvagens e cultivados em agricultura biológica e convencional.

2. Avaliar a eficiência anti-radicalar pelo método de captação do radical estável DPPH e o teor em compostos fenólicos totais através de um ensaio colorimétrico usando o reagente de Folin-Ciocalteu, de extractos metanólicos de amostras cruas de espinafre da Nova-Zelândia selvagens e provenientes de agricultura biológica e convencional;

(i) Optimizar o método de captação do radical estável DPPH para aplicação na avaliação da eficiência anti-radicalar dos extractos em estudo; (ii) elaborar

uma curva de calibração com ácido gálgico para expressão dos resultados do ensaio de avaliação dos teores de compostos fenólicos totais em EAG; (iii)

Avaliar a eficiência anti-radicalar e do teor em compostos fenólicos totais dos extractos metanólicos dos espinafres crus; (iv) Avaliar o teor em compostos fenólicos totais dos extractos metanólicos dos espinafres crus;

3. Avaliar a influência do tempo de cozedura na eficiência anti-radicalar pelo método de captação do radical estável DPPH e no teor em compostos fenólicos totais através de um ensaio colorimétrico usando o reagente de Folin-Ciocalteu, de amostras de espinafre da Nova-Zelândia, provenientes de agricultura convencional.

3. Material e métodos

3.1. Reagentes e equipamento

Metanol, 1,1'-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), Rutina, reagente de Folin-Ciocalteu da Sigma-Aldrich[®]; sulfato de sódio anidro, pastilhas de Kjeldahl, NaOH, ácido ascórbico, carbonato de Sódio da Merck[®]; éter de petróleo, ácido sulfúrico da Pronalab e ácido gálico da Fluka[®]. Todos os reagentes usados são de grau analítico.

Para a determinação da composição centesimal: Humidade: Balança equipada com lâmpada de infra-vermelhos Scaltec[®] SMO 01; Proteínas: Destilador Büchi[®] B-321; Gordura: mantas eléctricas e extractor de Soxhlet da Büchi[®].

Para a obtenção de extractos metanólicos: evaporador rotativo Büchi[®] Rotavapor RE 111 equipado com banho de água Büchi[®] 461 e bomba de vácuo Büchi[®] Vac V-500; Liofilizador Telstar[®] Cryodos – 80 equipado com bomba de vácuo Varian[®] DS 102; filtros de borossilicato Robu[®] 3.3, 30 ml, poro 4.

Para determinar a eficiência anti-radicalar:; Banho de ultrassons Bandelin[®] Sonorex RK 100 H; microplacas de 96 poços Orange Scientific[®] Cat. n.º 5530100; Balança Mettler Toledo[®] AG 245; leitor de microplacas Biotek[®] ELX808

Para quantificação dos compostos fenólicos totais: espectrofotómetro Jasco[®] V-650.

3.2. Amostragem:

3.2.1. Estudo da variabilidade entre os tipos de agricultura

Foram recolhidas dez amostras, nove de espinafre da Nova-Zelândia (*Tetragonia tetragonioides*) e uma de espinafre variedade Folha Larga (*Spinacea oleracea*), colhidas entre 27 de Fevereiro e 9 de Março de 2009, com

aproximadamente 1,5 kg cada. Seis amostras de espinafre da Nova-Zelândia provenientes de produtores certificados de agricultura biológica foram obtidas em S. Pedro do Sul (Vasco Pinto), Aguada de Baixo (Quinta Biológica de Aguada de Baixo), Brejos de Azeitão (Silvério Branco), Aljezur (Bioalcagoita), Ponte de Lima (Biodiversus) e Roriz (Biocelos) e foram designadas de B1 a B6, respectivamente. Duas amostras de espinafre da Nova-Zelândia provenientes de agricultura convencional foram obtidas no Cartaxo (Fernando Marques Gouveia, Lda) e na Póvoa de Varzim (PAM, SA) e foram designadas de T1 e T2. Uma amostra selvagem foi recolhida na Ilha do Pico e foi designada de S1. Uma amostra de espinafre comum, variedade Folha Larga (*Spinacea oleracea*) foi obtida em S. Pedro do Sul (Vasco Pinto) e foi designada de O. Todas as amostras foram colhidas e transportadas para o laboratório em ambiente refrigerado no mesmo dia, com exceção da amostra proveniente dos Açores, que foi colhida em terreno situado à beira-mar, transportada de avião em ambiente refrigerado e entregue dois dias após a colheita.

As amostras, depois de recolhidas e transportadas para o laboratório, foram lavadas em água da rede pública, eliminando-se o excesso de água por agitação e com papel absorvente. Seguidamente, as folhas foram separadas dos caules, armazenaram-se em sacos de polietileno de baixa densidade e congelaram-se a -15°C.

3.2.2. Estudo do efeito do processamento térmico na eficiência anti-radicalar e no teor em compostos fenólicos totais

Os espinafres da Nova Zelândia utilizados para estudar o efeito do processamento térmico na eficiência anti-radicalar e no teor em polifenóis foram recolhidos em Oliveira de Azeméis, provenientes de agricultura convencional.

Os lotes foram submetidos a diferentes tratamentos térmicos, nas seguintes condições: aqueceram-se 2 litros de água da rede pública a 100°C numa panela, colocaram-se as folhas na água em ebulição, tapando de seguida.

Um dos lotes foi designado por E1 e não sofreu qualquer tratamento térmico, tendo sido usado como controlo. Os restantes lotes foram imersos em água sujeita a ebulição durante 1 minuto (branqueamento), 2 minutos e 30 segundos (mal cozidos); 5 minutos (cozidos) e 10 minutos (demasiado cozidos), e designados respectivamente por E2, E3, E4 e E5. No final do processamento de cada lote, a água da cozedura foi rejeitada, escorreram-se as folhas, que foram arrefecidas em banho de gelo durante 5 minutos e, posteriormente, submetidas a liofilização durante 36 horas, no mínimo.

3.3. Metodologias

3.3.1. Avaliação da composição centesimal utilizando metodologias normalizadas em Portugal (NP)

No sentido de se determinar o valor nutricional das amostras de espinafre da Nova-Zelândia em estudo, procedeu-se à caracterização dos constituintes maioritários: Humidade – NP – 1614 (1979); Cinzas – NP – 1615 (1979); Proteína – NP -1612 (1979); Matéria Gorda – NP 1613 (1979).

3.3.2. Avaliação da eficiência anti-radicalar e quantificação do teor em compostos fenólicos totais

Para avaliar a eficiência anti-radicalar e o teor de compostos fenólicos totais, foi necessária a preparação de extractos metanólicos a partir das folhas dos espinafres.

Preparação dos extractos metanólicos: Aproximadamente 60 g de folhas de cada amostra foram liofilizadas. Seguidamente, reduziram-se a pó com um

tritador. O pó foi tamisado por tamis de abertura de malha de 500 μm e armazenado à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

A extracção foi feita adicionando 100 ml de MeOH a 4 g de pó. A mistura foi mantida em agitação constante a 500 rpm durante 15 min em agitador magnético. Seguidamente, a mistura foi filtrada sob pressão em kitasato, com filtro de borosilicato. O processo foi repetido três vezes para melhorar a eficácia da extracção. Reuniram-se as soluções extractivas e o MeOH foi evaporado em evaporador rotativo a 40 °C e a mistura resultante foi liofilizada, e armazenada dentro de frascos de vidro âmbar em exsiccador. As amostras não estiveram em contacto directo com luz ao longo de todos os processos.

Determinação da eficiência anti-radicalar: O DPPH (1,1'-difeníl-2-picrilhidrazilo) é um radical estável, centrado no átomo de Azoto, cujo pico de absorvência máximo se situa nos 517 nm. Na presença de antioxidantes dadores de hidrogénio ou de electrões, o radical DPPH é reduzido originando um produto incolor, a hidrazina, com o conseqüente decréscimo de absorvência. O grau de descoloração do radical DPPH constitui assim uma medida de capacidade antioxidante. Esta metodologia foi inicialmente desenvolvida por Blois ⁽⁶¹⁾, sendo posteriormente adaptada a microplacas.

Soluções etanólicas (EtOH 70%) dos extractos, com concentrações entre 15,53 – 1000 $\mu\text{g/ml}$, foram adicionadas a uma solução etanólica (EtOH 70%) de DPPH (190 μM) preparada extemporaneamente e a absorvência foi lida em 515 nm após 3 h em leitor de microplacas. O ácido ascórbico e a rutina foram usados como controlos positivos. Cada ensaio efectuou-se em duplicado e foi repetido quatro vezes.

O efeito captador de DPPH foi expresso sob a forma de percentagem de redução do DPPH, de acordo com a fórmula:

$$\text{Efeito captador de DPPH (\%)} = 100 - \left(\frac{A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco1}}}{A_{\text{controlo}} - A_{\text{branco2}}} \times 100 \right)$$

sendo A_{amostra} o valor de absorvência do ensaio realizado na presença do extracto em estudo, A_{controlo} o valor de absorvência do ensaio realizado na ausência de extracto, A_{branco1} o valor de absorvência do ensaio realizado na ausência de DPPH e A_{branco2} o valor de absorvência do ensaio realizado na ausência de extracto e DPPH.

Sánchez-Moreno e colaboradores propuseram uma nova medida de actividade contra o DPPH, a eficiência anti-radicalar, que tem em conta o tempo necessário para ser obtida uma leitura de absorvência estável e é dada pela fórmula:

$$\text{Eficiência anti-radicalar} = \frac{1}{IC_{50} \times TC_{50}}$$

em que TC_{50} representa o tempo decorrido até que as leituras de absorvência sejam constantes para uma concentração próxima do IC_{50} ⁽²²⁾.

Quantificação dos compostos fenólicos totais: A determinação dos compostos fenólicos totais baseia-se na reacção dos grupos hidroxilo fenólicos com o reagente de Folin-Ciocalteu. Este método envolve uma reacção de oxidação-redução, em meio alcalino, na qual o ião fenolato é oxidado e o composto fosfotúngstico-fosfomolibdénico existente no reagente é reduzido a uma mistura de óxidos de tungsténio e molibdénio com cor azul, que apresenta o máximo de absorção entre 725 e 750 nm.

Adicionaram-se 300 μ l de cada solução hidroalcoólica (EtOH 70%) dos extractos (2 mg/ml) a 1 ml de reagente de Folin-Ciocalteu e em seguida 5 ml de

solução de carbonato de Sódio a 20% (m/v), agitando-se vigorosamente. Completou-se o volume de 10 ml com água desionizada e, após 20 min, a absorvência foi lida em 735 nm contra a água.

O teor de compostos fenólicos totais exprimiu-se em miligramas de equivalentes de ácido gálgico (EAG), presentes em 1 g de extracto liofilizado calculado através de uma curva de calibração elaborada para o ácido gálgico (30-175 µg/ml). Cada ensaio foi efectuado em duplicado e repetido duas vezes.

Tratamento de dados: os dados obtidos foram sujeitos a tratamento estatístico através da análise de variâncias (ANOVA), utilizando o teste de Duncan (nível de significância igual a 0,05), com o software SPSS, versão 17.0.

4. Resultados e discussão

4.1. Composição centesimal do espinafre da Nova-Zelândia

No sentido de se conhecer a composição centesimal das amostras em estudo, procedeu-se à caracterização dos macronutrientes como a humidade, a proteína, a gordura e os hidratos de carbono, que se encontram sumarizados na Tabela 4.

Relativamente à humidade, não se encontram diferenças relevantes entre as amostras de espinafre da Nova Zelândia; os valores encontram-se entre 88,92 e 94,51% para todas as amostras. No entanto, a amostra S1 e o espinafre comum (amostra O) apresentaram valores mais baixos que as restantes amostras. A média dos valores da humidade do espinafre da Nova Zelândia é igual a 92,7% para n=9. Este valor corresponde ao encontrado na tabela da USDA ⁽¹¹⁾ para a mesma espécie, como evidenciado na Tabela 1.

Amostra	Humidade (%)	Proteína (g)	Gordura (g)	HC (g)	Cinza (g)
B1	91,24±0,59	1,87±0,10	0,12±0,04	5,26*	1,51±0,08
B2	93,19±0,27	1,79±0,11	0,05±0,03	3,57*	1,40±0,00
B3	94,69±0,10	1,16±0,08	0,20±0,04	2,58*	1,37±0,00
B4	93,80±0,03	1,21±0,15	0,32±0,03	3,20*	1,47±0,02
B5	94,22±0,12	1,76±0,12	0,10±0,01	2,48*	1,43±0,05
B6	91,44±0,71	1,94±0,05	0,21±0,07	5,52*	1,19±0,09
S1	90,45±0,48	1,62±0,12	0,20±0,05	6,06*	1,66±0,08
T1	91,34±0,27	1,35±0,05	0,15±0,02	5,59*	1,57±0,06
T2	94,51±0,36	1,68±0,09	0,19±0,03	1,77*	1,85±0,01
O	88,92±0,36	2,91±0,12	0,19±0,04	6,06*	1,92±0,03

Tabela 4. Composição centesimal das amostras de espinafre da Nova-Zelândia e espinafre comum. * valores calculados por diferença.

Os valores de proteína nos espinafres da Nova-Zelândia não apresentam diferenças significativas no que se refere ao tipo de agricultura, mas comparando o espinafre da Nova-Zelândia com o espinafre comum (1,60 e 2,91 g de proteína/100 g de alimento, respectivamente), encontram-se diferenças significativas entre as duas espécies, para $p < 0,05$. Estes resultados estão de acordo com os dados recolhidos na Tabela Americana (1,5 e 2,86 g/100g para o espinafre da Nova-Zelândia e para o espinafre comum, respectivamente), como podemos observar na Tabela 1. Relativamente aos teores de gordura, também não se encontram diferenças significativas, quer entre tipos de agricultura, quer entre as espécies de espinafre em estudo. Os valores dos hidratos de carbono foram calculados por diferença, o que pode justificar algum erro analítico, devido às discrepâncias notadas em relação aos valores de referência. No que se refere às cinzas, obtiveram-se valores entre 1,19 e 1,92 g/100 g de alimento, que vão ao encontro dos valores encontrados nas tabelas de referência ^(11, 12).

Os elevados níveis de consumo do espinafre da Nova-Zelândia ao longo de todo o ano, principalmente no Norte do país, bem como as diferenças encontradas relativamente ao espinafre comum, justificam a necessidade da

inclusão da primeira espécie na Tabela da Composição dos Alimentos do INSA, à semelhança do que acontece na Tabela da USDA.

4.2. Avaliação da actividade anti-radicalar pelo método de captação do radical DPPH e do teor em compostos fenólicos totais no espinafre da Nova-Zelândia

4.2.1. Optimização do método de captação do radical DPPH e do solvente extractivo

O controlo positivo do método foi efectuado com soluções de ácido ascórbico e rutina dissolvidos em EtOH 70%, com concentrações compreendidas entre 1,5625 e 25 µg/ml. As absorvências foram lidas em intervalos de um minuto, ao longo de 20 minutos, para conhecer a cinética da reacção. Calculou-se o valor do IC₅₀ para cada ensaio por regressão linear (Microsoft® Excel®). Os valores do IC₅₀ para os dois padrões podem ser analisados na Tabela 5.

Ensaio	Teste		Extractos Liofilizados		Extractos Secos	
	Ácido Ascórbico	Rutina	MeOH	MeOH/H ₂ O	MeOH	MeOH/H ₂ O
1	7,75	15,63	523,45	n.c.	334,27	625,23
2	7,79	17,37	479,69	897,74	235,30	530,94
3	7,34	18,45	488,40		199,12	
4	6,47	18,20				

Tabela 5. Actividade anti-radicalar das soluções de ácido ascórbico, rutina e amostras de teste com o DPPH. Valores expressos em IC₅₀ (µg/ml). n.c.: IC₅₀ não calculado; extractos não captaram 50% do radical DPPH.

As médias dos resultados obtidos para as soluções hidroalcoólicas de ácido ascórbico e rutina foram de 7,41 e 17,34 µg/ml para o ácido ascórbico e para a rutina, respectivamente. Após elaborar um gráfico com as percentagens de inibição para todas as concentrações das soluções de ácido ascórbico e rutina estudadas, verificou-se que o ácido ascórbico apresenta uma actividade anti-radicalar superior à da rutina, verificado quer pelo menor IC₅₀, quer pela maior percentagem de inibição de DPPH ao fim de 20 minutos, indo de encontro aos dados de Sánchez-Moreno e colaboradores.⁽²²⁾

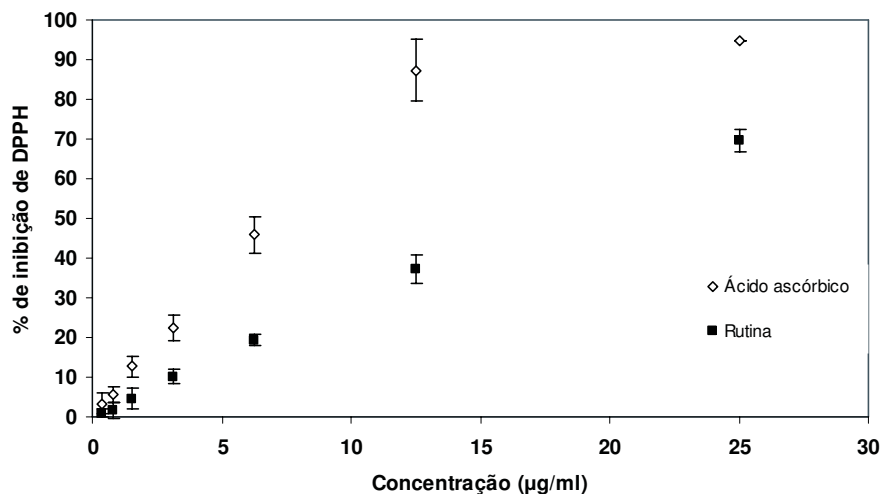


Figura 1. Actividade das soluções de teste com o DPPH.

Para testar os solventes de extracção mais apropriados, seguiu-se o organigrama apresentado na Figura 2.

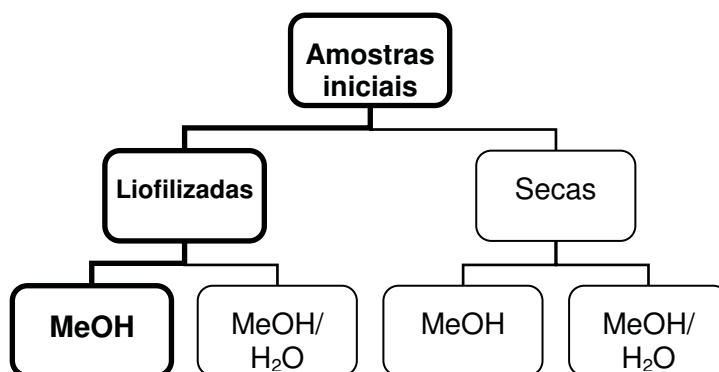


Figura 2. Organigrama representativo dos processos utilizados para estudar a eficiência da extracção. Os elementos em realce representam os passos escolhidos para a elaboração do protocolo.

Dividiram-se as amostras de teste em dois grupos: o primeiro foi liofilizado, o segundo foi seco ao ar e ao abrigo da luz. Cada um destes grupos foi, por sua vez, dividido em dois. Um deles foi sujeito a extracção com MeOH e o outro a uma extracção com solução MeOH:H₂O (50:50). Seguidamente, efectuou-se um teste de solubilidade com EtOH 70% e EtOH 96%, em que se concluiu que os extractos apresentavam maior solubilidade em EtOH 70%, permitindo a utilização de concentrações mais elevadas das amostras em estudo. Após testar os extractos com o DPPH, verificou-se que os extractos

obtidos com MeOH apresentaram valores de IC₅₀ mais baixos que os extractos obtidos com MeOH:H₂O (497,18±23,16 e 898 µg/ml, respectivamente). Em relação às amostras secas, foi confirmada a melhor eficiência de extracção com o MeOH. Verificou-se que os valores de IC₅₀ para extractos secos e solubilizados em EtOH 70% são os mais baixos, revelando maior actividade anti-radicalar. No entanto, neste trabalho, optou-se por amostras liofilizadas pelo facto de se obterem extractos mais rapidamente.

Posteriormente, estudou-se a cinética das absorvências para os extractos testados, concluindo-se que para as leituras de absorvência apresentarem valores constantes para a maioria das concentrações em estudo era necessário prolongar o tempo de leitura para 3 horas. A literatura aponta para ensaios com duração média de cerca de uma hora⁽³⁹⁻⁴¹⁾. Contudo, as concentrações referidas nesses estudos são consideravelmente mais elevadas do que as usadas no presente trabalho.

Como resultado destes ensaios de optimização do método para determinar a eficiência anti-radicalar, foram seleccionados o MeOH para o processo de extracção e o EtOH 70% para solubilizar os extractos, e um tempo de reacção de 3 horas. Vários autores de estudos semelhantes efectuados em hortícolas, entre os quais o espinafre comum, seleccionaram os mesmos solventes^(40-43, 55-57).

4.2.2. Preparação da curva de calibração de ácido gálgico

Foram preparadas 3 soluções-mãe de ácido gálgico, utilizado como padrão, com concentração de 2 mg/ml, realizadas em três dias diferentes. De cada solução-mãe, foram feitas sete diluições compreendidas entre 30 e 175 µg/ml.

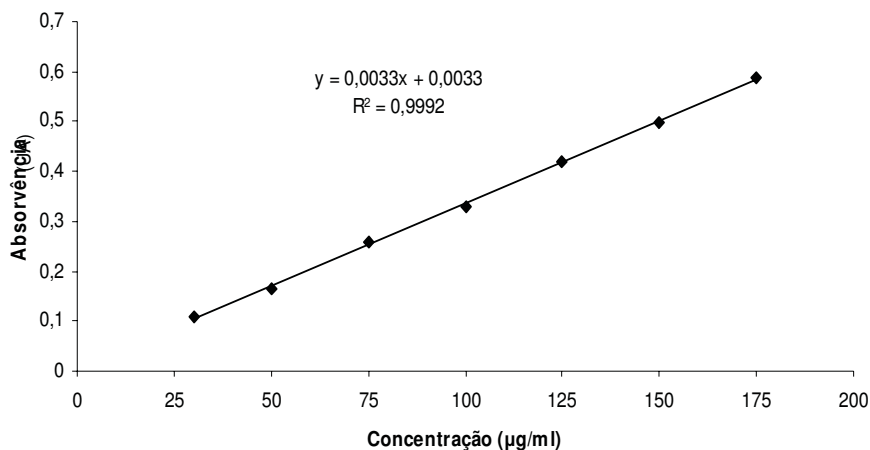


Figura 3. Curva de calibração para o ácido gálico (n=6)

Após execução do ensaio com o reagente de Folin-Ciocalteu, obtiveram-se 6 leituras de absorvência para cada concentração, uma vez que cada ensaio foi efectuado em duplicado. Traçou-se uma curva de calibração com os valores médios dos ensaios, apresentada na Figura 3.

Os valores de absorvência encontram-se situados entre 0,1704 e 0,5893 (UA) e correspondem às concentrações de 30 e 175 µg/ml de ácido gálico, respectivamente, e abrangem os valores encontrados nas amostras dos extractos. A equação obtida graficamente foi utilizada para o cálculo do teor em compostos fenólicos totais das amostras em estudo, expresso em mg EAG / g de extracto.

4.3. Avaliação da actividade anti-radicalar e do teor em compostos fenólicos totais de espinafre da Nova-Zelândia selvagem, de agricultura biológica e convencional

A actividade anti-radicalar dos extractos foi avaliada através da concentração de extracto necessária para reduzir 50% do radical DPPH, designada por IC₅₀, e que se expressa em µg/ml.

Os valores do IC₅₀ das amostras em estudo encontram-se resumidos na Tabela 6, onde se pode verificar que o extracto que apresentou IC₅₀ mais baixo (logo actividade anti-radicalar mais elevada) foi a amostra B4 com o valor de

155,8 µg/ml, proveniente de agricultura biológica (Aljezur) e o extracto que apresentou o valor de IC₅₀ mais elevado foi a amostra O com o valor de 460,9 µg/ml, proveniente de agricultura biológica (S. Pedro do Sul).

A análise estatística mostrou que, quando se compararam todas as amostras, as únicas que apresentaram diferenças significativas para $p < 0,05$ foram a B2 e a O, com valores de IC₅₀ de 319,17 e 460,98 µg/ml, respectivamente.

Esta diferença pode ser explicada pelo facto de as folhas da amostra B2 estarem num estado de maturação mais jovem que as restantes, verificado no momento da recolha, o que pode ser interpretado à luz do trabalho de Pandjaitan e colaboradores, que referem que o estado de crescimento das folhas influencia os valores da actividade antioxidante ⁽⁵⁷⁾.

A amostra de *Spinacea oleracea* (O) apresenta os valores de actividade e eficiência anti-radicalar mais baixos, com diferenças significativas relativamente a todas as outras amostras. Pandjaitan e colaboradores, ao comparar espinafres comuns de variedades comerciais e provenientes de linhas avançadas de selecção genética, concluíram que a actividade antioxidante é influenciada pela variedade da espécie, o que pode justificar pequenas variações dos valores obtidos neste trabalho relativamente a outros estudos publicados ⁽⁵⁷⁾

Ao comparar os valores de IC₅₀ das amostras de espinafre da Nova-Zelândia relativamente ao método de cultivo, verificou-se que as amostras selvagens e provenientes de agricultura biológica e convencional não apresentaram diferenças significativas. No entanto, comparando as amostras de espinafre da Nova-Zelândia com a de espinafre comum (O) encontraram-se diferenças significativas entre as duas espécies para $p < 0,05$. O valor do IC₅₀

para a espécie *Spinacea oleracea* (amostra O), apesar de ser uma amostra representativa de apenas uma localização, encontra-se de acordo com estudos publicados por diferentes autores ^(39, 40, 42, 44, 56).

Amostra	IC ₅₀ (µg/ml)	Eficiência anti-radicalar ($\times 10^{-3}$)	Compostos fenólicos totais (mg EAG/g de extracto)
B1	224±32 ^{abc}	0,025	33,28±1,25 ^{bc}
B2	319±36 ^d	0,017	27,98±1,68 ^a
B3	176±7 ^{ab}	0,032	40,89±1,36 ^d
B4	155±32 ^a	0,036	41,86±1,42 ^d
B5	242±27 ^c	0,023	39,94±2,12 ^d
B6	190±38 ^{ac}	0,029	42,55±2,86 ^d
S1	229±48 ^{abc}	0,024	32,41±2,20 ^b
T1	169±23 ^{ab}	0,033	35±4,40 ^c
T2	204±18 ^{abc}	0,027	40,92±1,37 ^d
O	460±58 ^e	0,012	32,95±1,02 ^{bc}

Tabela 6. Actividade e eficiência anti-radicalar, e teor em compostos fenólicos das amostras de espinafre da Nova Zelândia e espinafre comum. Médias em colunas sem letras comuns (^{a-d}) apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$; $n=4$).

A eficiência anti-radicalar dos extractos foi calculada a partir do IC₅₀ e do TC₅₀. Os valores de eficiência apresentados na Tabela 6 sugerem que os compostos com actividade anti-radicalar presentes nos extractos são caracterizados por uma reacção lenta com o radical DPPH.

A eficiência anti-radicalar obtida para os extractos é baixa, quando comparada com valores obtidos por Sánchez-Moreno utilizando compostos isolados, o que pode ser justificado pelas concentrações mais elevadas das soluções usadas pela autora, quando comparadas com as que foram determinadas no presente trabalho, bem como pelo tipo de polifenóis presentes nos extractos metanólicos analisados ⁽²²⁾. Huber e colaboradores identificaram dois flavonóides no espinafre da Nova-Zelândia, a quercetina e o campferol, e registaram menores acumulações destes quando o cultivo era feito a temperaturas mais baixas ⁽⁶⁰⁾. No presente estudo, o cultivo decorreu entre Dezembro e Fevereiro, meses em que as temperaturas médias são mais baixas

em todas as regiões onde se recolheram amostras. Pela análise dos resultados obtidos nas amostras em estudo, justifica-se a necessidade de repetir esta análise com amostras recolhidas no Verão, controlando rigorosamente as condições ambientais durante o cultivo, de modo a estudar possíveis diferenças sazonais para a actividade anti-radicalar e para o teor em compostos fenólicos totais. No espinafre comum, foram identificados por Bajpai e colaboradores, o ácido cafeico, o ácido ferúlico e o ácido protocatecuico através de MS (Espectrometria de massa) ⁽³⁹⁾. Sánchez-Moreno classificou a actividade anti-radicalar da quercetina e do ácido ferúlico como baixa, e a do ácido cafeico como alta ⁽²²⁾.

Na Tabela 6, estão apresentadas as quantidades totais de compostos fenólicos quantificados nos extractos metanólicos das amostras de espinafre em estudo, expressos em miligramas EAG (Equivalentes de Ácido Gálico) / grama de extracto. Após a análise estatística, verificou-se mais uma vez que a amostra B2 apresentou diferenças com significado estatístico, que poderão ser devidas ao estado de maturação das folhas, como referido por Pandjatin e colaboradores ⁽⁵⁷⁾. À semelhança do que foi encontrado para a actividade anti-radicalar, as amostras não apresentam diferenças significativas quanto ao tipo de agricultura.

Quando se compararam os teores em compostos fenólicos totais dos espinafres entre espécies, não foram encontradas diferenças significativas; no entanto, os valores de actividade anti-radicalar apresentaram diferenças significativas, para $p < 0,05$, entre as mesmas amostras,. Resultados semelhantes foram obtidos por vários autores, em que ao identificar os compostos fenólicos verificaram que as diferenças podem estar de acordo com o tipo e a eficácia dos

compostos identificados ^(39, 42, 55, 57). Ao analisar os resultados, verificou-se que as amostras B1 e O, recolhidas na mesma exploração agrícola se agruparam relativamente ao teor em compostos fenólicos totais, que pode ser devido a uma forte influência dos factores ambientais na sua acumulação nas plantas, como referido por diversos autores ^(48, 51, 53, 59, 62).

Segundo alguns estudos, a correlação dos valores de IC₅₀ com o teor em compostos fenólicos totais é forte, parecendo indicar que a quantidade de compostos fenólicos nos extractos é determinante da actividade anti-radicalar, enquanto outros autores referem correlações fracas. No presente trabalho encontrou-se uma forte correlação entre os valores de IC₅₀ e teor em compostos fenólicos totais. No entanto, para o caso da amostra O, que apresenta uma baixa actividade anti-radicalar, o teor em compostos fenólicos totais é semelhante ao das amostras B1 e S1, sugerindo mais uma vez a existência de diferenças qualitativas dos compostos presentes nas amostras.

É necessário, após esta caracterização inicial, identificar e quantificar os compostos fenólicos no espinafre da Nova-Zelândia usando técnicas analíticas como o HPLC ou MS, bem como avaliar a sua eficiência anti-radicalar.

Os estudos comparativos entre vegetais provenientes de agricultura biológica e convencional são escassos e os seus resultados são controversos. Alguns trabalhos encontraram diferenças significativas, registando valores mais elevados de actividade antioxidante e teor em compostos fenólicos totais em alimentos como brócolos e tomate produzidos em agricultura biológica. Por outro lado, outros estudos demonstraram que as amostras provenientes de agricultura convencional apresentavam melhores índices de actividade antioxidante, enquanto outros não registaram diferenças significativas. Existem múltiplos

factores que influenciam os resultados deste tipo de estudo, como a localização das explorações agrícolas, que determina o tipo de solo e o clima em que as culturas são efectuadas, a estação do ano em que as amostras são plantadas, a data de colheita e o processamento pós-colheita.

Para contornar esta multiplicidade de factores, várias abordagens têm sido delineadas, embora todas elas apresentem limitações próprias:

- *Estudos que utilizam amostras provenientes do comércio*: são os que existem em menor número, e, apesar de se referirem ao produto nas condições em que chega ao consumidor e de serem fáceis de executar, raramente apresentam conclusões relativamente ao método de produção, uma vez que os factores pós-colheita, como a exposição à luz ou as condições de armazenamento enviesam os resultados de forma significativa ^(47, 54, 63). No presente estudo, procurou-se contrariar este tipo de factores através do controlo do momento da colheita recolhendo as amostras directamente dos produtores e assegurando as mesmas condições pós-colheita para todas as amostras;

- *Estudos desenvolvidos directamente em explorações agrícolas*: nesta abordagem, todo o ciclo da produção é monitorizado e o controlo de factores ambientais e do tipo de solo é assegurado através da comparação entre explorações vizinhas com modos de produção diferentes. Nestes casos, as maiores dificuldades emergem na escolha de explorações que reflectam os sistemas de produção. Barrett e colaboradores encontraram diferenças significativas no teor em compostos fenólicos totais em tomates provenientes de sistemas de produção biológicos e convencionais. Contudo, os resultados foram inconsistentes, pois em algumas explorações, as amostras provenientes de agricultura biológica apresentavam maiores quantidades de compostos fenólicos

totais, e noutras localizações eram as amostras cultivadas no modo convencional que continham maiores quantidades, sugerindo uma maior influência de factores ambientais e da qualidade do solo na sua formação e acumulação ⁽⁴⁸⁾;

- *Estudos de cultivo*: neste tipo de abordagem, o investigador estuda a influência dos factores de interesse, controlando todas as condições e modulando apenas os factores em estudo, através do cultivo do mesmo tipo de amostra, em vasos com o mesmo tipo de solo e expostos às mesmas condições ambientais. São estes os estudos que reflectem mais precisamente as diferenças encontradas relativamente ao modo de produção, em que é possível identificar claramente os factores que influenciam as diferenças entre os parâmetros analisados ⁽⁵⁰⁾.

No presente trabalho, não foi possível seguir as metodologias descritas para os dois últimos tipos de estudo, devido a limitações de tempo.

4.4. Avaliação da actividade anti-radicalar e do teor em compostos fenólicos totais de espinafre da Nova-Zelândia de agricultura convencional, cozinhado em água à temperatura de ebulição durante tempos diferentes

Os valores de actividade anti-radicalar das amostras de espinafre da Nova-Zelândia sujeitas a processamento térmico encontram-se resumidos na Tabela 7. O grupo de controlo (E1), espinafres crus, apresenta o melhor valor de actividade anti-radicalar, com um IC₅₀ igual a 97,52 µg/ml.

As amostras sujeitas a processamento térmico durante 1 minuto, 2,5 minutos, 5 e 10 minutos apresentaram diferenças significativas para $p < 0,05$, em relação à amostra controlo, revelando valores de IC₅₀ menos eficazes situados entre 140,62 e 257,52 µg/ml.

Tempo de cozedura (min)	Amostra	IC ₅₀ (µg/ml)	Eficiência anti-radicalar ($\times 10^{-3}$)	Compostos fenólicos totais (mg EAG/g de extracto)
0	E1	97,52±10.87 ^a	0,057	58,21±2,46 ^a
1	E2	140,62±8.66 ^b	0,040	55,44±3,12 ^a
2,5	E3	189,39±15.65 ^c	0,029	57,73±2,52 ^a
5	E4	257,16±15.11 ^d	0,022	59,19±7,31 ^a
10	E5	257,52±20.78 ^d	0,022	59,26±6,19 ^a

Tabela 7. Actividade anti-radicalar, e teor em compostos fenólicos das amostras de espinafre da Nova Zelândia sujeitas a diferentes tempos de cozedura em água em ebulição. Médias sem letras em comum (^{a-d}) apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$; $n=4$).

Observaram-se ainda diferenças significativas entre os grupos sujeitos a diferentes tempos de processamento térmico, com excepção dos extractos E4 e E5, que apresentaram valores de IC₅₀ muito próximos. Ao analisar os resultados dos valores de IC₅₀ ao longo de 10 minutos, a eficiência anti-radicalar dos extractos metanólicos das folhas de espinafre da Nova-Zelândia diminuiu linearmente até aos 5 minutos de cozedura (amostra E4), como pode ser observado na Figura 4.

As amostras E4 e E5 não apresentaram diferenças significativas entre si, sugerindo que as perdas de actividade anti-radicalar e do teor em compostos fenólicos totais se estabilizem, após determinado tempo de cozedura.

O teor em compostos fenólicos totais dos diversos grupos não variou significativamente, apesar da perda da actividade anti-radicalar. Estes resultados podem dever-se à perda de elementos, incluindo os compostos fenólicos, para a água da cozedura, ou destruição dos mesmos, levando a que os valores expressos em concentração fossem semelhantes para todas as amostras. Ismail e colaboradores referiram perdas significativas de compostos fenólicos em folhas de espinafre comum após 1 minuto de cozedura ⁽⁶⁴⁾. Na Tabela 7 observa-se

uma tendência semelhante entre valores médios dos grupos E1 e E2, embora sem significado estatístico.

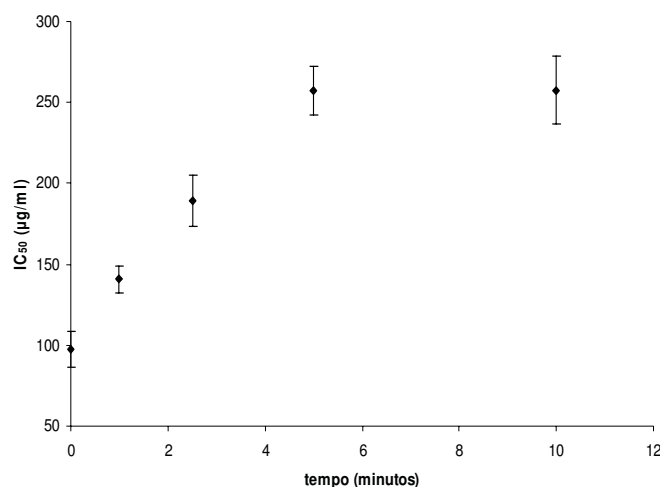


Figura 4. Actividade anti-radicalar de extractos metanólicos de espinafre da Nova-Zelândia sujeitos a diferentes tempos de cozedura.

A diferença entre a actividade anti-radicalar das amostras de espinafre da Nova-Zelândia analisadas na secção anterior (B1 a B6, S1, T1 e T2) e da amostra E1 pode ser devida a diferenças no tempo de congelação antes da liofilização. Assim, a amostra E1 foi imediatamente processada para liofilizar, enquanto os outros lotes estiveram cerca de 70 dias armazenados a -15°C .

Hunter e colaboradores, utilizando o método ORAC, referiram perdas de actividade antioxidante decorrentes do congelamento de folhas de espinafre comum, atribuindo-as às perdas de ácido ascórbico ⁽⁵⁴⁾. Este efeito poderá ter-se verificado no presente estudo, pois as folhas do espinafre comum e do espinafre da Nova-Zelândia partilham características matriciais, apesar de pertencerem a espécies diferentes, e poderão sofrer modificações estruturais semelhantes após congelação ou cozedura, observadas em alguns trabalhos relativos a condições de armazenamento e processamento culinário, onde foram registados comportamentos semelhantes em folhas de espécies diferentes na análise de

diversos compostos como polifenóis, vitamina C, nitratos, nitritos, oxalatos, clorofila, chumbo, e cádmio ^(39, 58, 65-67).

5. Conclusões

O espinafre da Nova-Zelândia apresentou actividade anti-radicalar significativamente mais elevada do que o espinafre comum, o que o torna num alimento com maiores potencialidades benéficas relativamente a efeitos protectores atribuídos a compostos com acção antioxidante. Os valores de actividade anti-radicalar encontrados correlacionaram-se com os teores em compostos fenólicos totais das amostras.

Não foram encontradas diferenças significativas quer na actividade anti-radicalar quer no teor em compostos fenólicos totais entre as amostras de agricultura biológica, convencional ou selvagem, quanto ao modo de produção. As poucas diferenças encontradas sugerem a maior influência dos factores ambientais e de crescimento na acumulação de compostos fenólicos pelo espinafre da Nova-Zelândia.

O tempo de cozedura até 5 minutos reduziu significativamente a actividade anti-radicalar do espinafre da Nova-Zelândia. Após 5 minutos, não há alterações significativas deste parâmetro.

Após esta análise inicial, será importante identificar e quantificar os polifenóis existentes no espinafre da Nova-Zelândia, bem como a realização de um estudo da sua actividade antioxidante integrando várias metodologias de avaliação, incluindo ensaios de captação de espécies reactivas fisiológicas, e usando amostras recolhidas em diferentes alturas do ano, de forma a obter uma caracterização mais aprofundada dos compostos fenólicos presentes nesta espécie.

Referências

1. Nonnecke IL. Vegetable Production. 1st ed. New York: Springer; 1989. p. 476-83.
2. Munro DB, Small E. Les Légumes du Canada. NRC Research Press; 1997. p. 372-74.
3. Pilcher JM. Food in World History. 1st ed. New York: Rutledge; 2006. p. 24-25.
4. Belitz H-D, Grosch W. Food Chemistry. 3rd ed. Berlin Heidelberg New York: Springer; 1987. p. 774-91.
5. Cox M. Popeye. John Troesser ed. Fayetteville; 2003. Disponível em: <http://www.texasescapes.com/MikeCoxTexasTales/146PopeyeComesToTexas.htm>.
6. Hamblin T. Fake! British Medical Journal 1981; 283(6307):1671-74.
7. Cook JD, Reddy MB. Effect of ascorbic acid intake on nonheme-iron absorption from a complete diet. American Journal of Clinical Nutrition. 2001; 73(1):93-98.
8. Tsao S-JJ, Lo H-F. Vegetables: Types and Biology. In: Hui YH, Ghazala S, Graham DM, Murrell KD, Nip W-K, editores. Handbook of Vegetable Preservation and Processing. New York: Marcel Dekker, Inc; 2004.
9. Brooker SG, Cambie RC, Cooper RC. Economic Native Plants of New Zealand. Economic Botany. 1988; 43(1):79-106.
10. PROTA 2: Vegetables. G J H Grubben; O A Denton ed.: Backhuys Publishers; 2004. p. 527-29.
11. Tabela da Composição de Alimentos. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Centro de Segurança Alimentar e Nutrição; 2006. p. 90, 91.

12. . USDA 2008. National Nutrient Database for Standard Reference. Disponível em: http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl.
13. Cambie RC, Ferguson LR. Potential functional foods in the tradicional Maori diet. Mutation Research Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2003; 523-524:109-17.
14. Hoefkens C, Sioen I, Henauw SD, Vandekinderen I, Baert K, Meulenaer BD, et al. Development of vegetable composition databases based on available data for probabilistic nutrient and contaminant intake assessments. Food Chemistry. 2009; 113(3):799-803.
15. Ruxton CHS, Gardner EJ, Walker D. Can pure fruit and vegetable juices protect against cancer and cardiovascular disease too? A review of the evidence. International Journal of Food Science and Nutrition. 2006; 57(3/4):249-72.
16. Demirkol O, Cagri-Mehmetoglu A. Biologically important thiols in various organically and conventionally grown vegetables. Journal of Food and Nutrition Research. 2008; 47(2):77-84.
17. Pincemail J, Degrune F, Vousuure S, Malherbe C, Paquot N, Defraigne J-O. Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et marqueurs des dommages oxydatifs. Nutrition Clinique et Métabolisme. 2007; 21(2):66-75.
18. Stanner SA, Hughes J, Kelly CNM, Buttriss J. A review of the epidemiological evidence for the "antioxidant hypothesis". Public Health Nutrition. 2003; 7(3):407-22.
19. Bes-Rastrollo M, Martínez-González MA, Sánchez-Villegas A, Arrillaga CdIF, Martínez JA. Association of fibre intake and fruit and vegetable consumption with wight gain in a Mediteranean population. Nutrition. 2006; 22(5):504-11.

20. Chipault JR. Antioxidants for use in foods. In: WO L, editor. Autooxidation and antioxidants. New York: Interscience; 1962. II, p. 477-562.
21. Frankel EN. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000; 80(13):1925-41.
22. Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1995; 76(2):270-76.
23. Bub A, Watzl B, Abrahamse L, Delincée H, Adam S, Wever J, et al. Moderate Intervention with carotenoid-rich vegetables products reduces lipid peroxidation in men. *The Journal of Nutrition*. 2000; 130(9):2200-06.
24. Cao G, Russell RM, Lischner N, Prior RL. Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *The Journal of Nutrition*. 1998; 128(12):2383-90.
25. Duthie GG, Duthie SJ, Kyle JAM. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as natural antioxidants. *Nutrition Research Reviews*. 2000; 13(1):79-106.
26. Halliwell B, Rafter J, Jenner A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *American Journal of Clinical Nutrition*. 2005; 81(suppl)(1):268S-76S.
27. Tang G, Qin J, Dolnikowski GG, Russel RM, Grusak MA. Spinach or carrots can supply significant amounts of vitamin A as assessed by feeding with intrinsically deuterated vegetables. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2005; 82(4):821.28.

28. Vinson JA, Jang J, Dabbagh YA, Serry MM, Cai S. Plant Polyphenols Exhibit Lipoprotein-Bound Antioxidant Activity Using an in Vitro Oxidation Model for Heart Disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1995; 43(11):2798-99.
29. Boivin D, Lamy S, Lord-Dufour S, Jackson J, Beaulieu E, Côte M, et al. Antiproliferative and antioxidant activities of common vegetables: A comparative study. *Food Chemistry*. 2009; 112(2):374-80.
30. Stevenson DE, Hurst RD. Polyphenolic phytochemicals - just antioxidants or much more? *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007; 64(22):2900-16.
31. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004; 79(5):727-47.
32. Parr AJ, Bolwell G. Phenols in plant and man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenol content or profile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 80:985-1012.
33. Sato M, Maulik N, Das DK. Cardioprotection with alcohol and polyphenolic antioxidants. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002; 957(Alcohol and wine in health and disease.):122-35.
34. Moon J-K, Shibamoto T. Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009; 57(5):1655-66.
35. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2005; 81(Suppl 1):230S-42S.

36. D'Archivio M, Filesi C, Benedetto RD, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*. 2007; 43(4):348-61.
37. Miniati E. Assessment of phenolic compounds on biological samples. *Ann Ist Super Sanità*. 2007; 43(4):362-68.
38. Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, Manach C, et al. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004; 80(1):15-21.
39. Bajpai M, Mishra A, Prakash D. Antioxidant and free radical scavenging activities of some leafy vegetables. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2005; 56(7):473-81.
40. Melo EA, Maciel MIS, Lima VLAG, Leal FLL, Caetano ACS, Nascimento RJ. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2006; 26(3):639-44.
41. Sultana B, Anwar F, Iqbal S. Effect of different cooking methods on the antioxidant activity of some vegetables from Pakistan. *International Journal of Food Science and Technology*. 2008; 43(3):560-67.
42. Chu Y-H, Chang C-L, Hsu H-F. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000; 80(5):561-66.
43. Tarwadi K, Agte V. Potential of commonly consumed green leafy vegetables for their antioxidant capacity and its linkage with the micronutrient profile. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 2003; 54(6):417-25.

44. Zhou K, Yu L. Total phenolic contents and antioxidant properties of commonly consumed vegetables grown in Colorado. *LWT - Food Science and Technology*. 2006; 39(10):1155-62.
45. . Eurostat; 2009. Number of registered organic operators. Disponível em: http://nui.epp.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=food_act2&lang=en.
46. Bourn D, Prescott J. A comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2002; 42(1):1-34.
47. Magkos F, Arvaniti F, Zampelas A. Organic food: buying more safety or just peace of mind? A review of the literature. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2006; 46(1):23-56.
48. Barrett DM, Weakley C, Diaz JV, Watnik M. Qualitative and nutritional differences in processing tomatoes grown under commercial organic and conventional production systems. *Journal of Food Science*. 2007; 72(9):C441-C51.
49. Juroszek P, Lumpkin HM, Yang R-Y, Ledesma DR, Ma C-H. Fruit quality and bioactive compounds with antioxidant activity of tomatoes grown on-farm: comparison of organic and conventional management systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009; 57(4):1188-94.
50. Magkos F, Arvaniti F, Zampelas A. Organic food: nutritious food or food for thought? A review of the evidence. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2003; 54(5):357-71.
51. Valavanidis A, Vlachogianni T, Psomas A, Zovolli A, Siatis V. Polyphenolic profile and antioxidant activity of five apple cultivars grown under organic and

conventional agricultural practices. *International Journal of Food Science and Technology*. 2009; 44(6):1167-75.

52. Villaño D, Fernández-Pachón MS, Troncoso AM, García-Parrilla MC. Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines. *Food Chemistry*. 2006; 95(3):394-404.

53. Wunderlich SM, Feldman C, Kane S, Hazhin T. Nutritional quality of organic, conventional, and seasonally grown broccoli using vitamin C as a marker. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 2008; 59(1):34-45.

54. Hunter KJ, Fletcher JM. The antioxidant activity and composition of fresh, frozen, jarred and canned vegetables. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2002; 3(4):399-406.

55. Proteggente AR, Pannala AS, Paganga G, Buren Lv, Wagner E, Wiseman S, et al. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radicals Research*. 2002; 36(2):217-33.

56. Turkmen N, Sari F, Velioglu YS. The effect of cooking methods and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry*. 2005; 93(4):713-18.

57. Pandjaitan N, Howard LR, Morelock T, Gil MI. Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53(22):8618-23.

58. Roy MK, Takenada M, Isobe S, Tsushida T. Antioxidant potential, anti-proliferative activities, and phenolic content in water soluble fractions of some commonly consumed vegetables: Effects of thermal treatment. *Food Chemistry*. 2007; 103(1):106-14.

59. Azevedo-Meleiro CHd, Rodriguez-Amaya DB. Carotenoids of endive and New Zealand Spinach as affected by maturity, season and minimal processing. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2005; 18(8):845-55.
60. Huber LS, Hoffmann-Ribani R, Rodriguez-Amaya DB. Quantitative variation in Brazilian vegetable sources of flavonols and flavones. *Food Chemistry*. 113(4):1278-82.
61. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958; 181(4617):1199-200.
62. Rossi F, Godani F, Bertuzzi T, MarcoTrevisan, FedericoFerrari, Gatti S. Health-promoting substances and heavy metal content in tomatoes grown with different farming techniques. *European Journal of Nutrition*. 2008; 47(5):266-72.
63. Ninfali P, Bacchiocca M. Polyphenols and antioxidant capacity of vegetables under fresh and frozen conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51(8):2222-26.
64. Ismail A, Marjan ZM, Foong CW. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry*. 2004; 87(4):581-86.
65. Jaworska G. Nitrates, nitrites, and oxalates in products of spinach and New Zealand spinach. Effect of technological measures and storage time on the level of nitrates, nitrites, and oxalates in frozen and canned products of spinach and New Zealand spinach. *Food Chemistry*. 2005; 93(3):395-401.
66. Lisiewska Z, Gebczynski P, Kmiecik W, Skoczen-Slupska R. Effect of vegetable freezing and preparation of frozen products for consumption on the content of Lead and Cadmium. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2007; 16(4):579-85.

67. Yadav SK, Sehgal S. Effect of domestic processing and cooking on selected antinutrient contents of some green leafy vegetables. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2003; 58(3):1-11.