VANESSA BARREIROS BORREGO

A ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ALIMENTOS FUNCIONAIS DA DIETA MEDITERRÂNICA

Orientadora: Professora Doutora Tânia Santos de Almeida

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa
2018

VANESSA BARREIROS BORREGO

A ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ALIMENTOS FUNCIONAIS DA DIETA MEDITERRÂNICA

Dissertação defendida em prova pública na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 18/07/2018, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação Nº 239/2018 de 27 de Junho, com a seguinte composição:

Presidente: Professor Doutor Luís Monteiro Rodrigues
Arguente: Professora Doutora Marisa Nicolai
Orientadora: Professora Doutora Tânia Santos de Almeida
Vogais: Professora Ana Mirco (Especialista ULHT)
Professora Maria Dulce Santos (Especialista ULHT)

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa
2018

Agradecimentos

A presente dissertação de mestrado é o resultado de muitas horas de trabalho / pesquisas sendo importante exprimir os meus sinceros agradecimentos a algumas pessoas que me acompanharam ao longo deste percurso para finalizar esta última etapa do Mestrado.

Em primeiro lugar, agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Tânia Santos de Almeida, por toda a paciência, empenho e dedicação que teve comigo na orientação deste trabalho. Muito obrigado por me ter corrigido em todas as fases do mesmo.

Desejo igualmente agradecer à minha professora e delegada de turma do ensino secundário, Professora Ana Paula Alpalhão, por toda a paciência, empenho, dedicação e ajuda que sempre teve com a minha dissertação. Muito obrigado por me acompanhar neste processo final de Mestrado e pelas suas sugestões e conselhos que me prestou.

Aos meus amigos: de infância Marta Ruxa; de Universidade, Mónica Ciriaco e Laboral Professora Mestre Ana Rita Quintela, Mestre Sandra Figueiredo e Mestre Catarina Roxo, pelo apoio, pela leitura, aconselhamento e sobretudo pela amizade que está sempre presente em todos os momentos da minha vida.

Por último, e não menos importante, quero agradecer à minha família todo o apoio incondicional que me deram, especialmente ao meu pai Joaquim Borrego, à minha mãe São Borrego e ao meu irmão Nuno Miguel Borrego pelas revisões incansáveis ao longo da elaboração deste trabalho.

Resumo

Actualmente tem havido uma crescente preocupação por parte da população em geral na escolha dos alimentos a consumir, com o intuito de que esta escolha possa conduzir a efeitos benéficos para a saúde, principalmente na possível prevenção de várias doenças. Muitas das características preventivas atribuídas a alguns alimentos, são referidas como sendo consequência das suas propriedades antioxidantes, ou mais concretamente do seu conteúdo em compostos antioxidantes.

Assim, a procura de alimentos denominados como alimentos funcionais, ou seja, aqueles que trazem benefício à saúde, tem sido crescente.

A dieta mediterrânica tem sido uma das dietas mais referidas como benéfica para a saúde e a avaliação das propriedades antioxidantes dos alimentos incluídos nesta dieta tem sido alvo de alguma análise pela comunidade científica.

Nesta dissertação pretende-se conhecer os principais alimentos contidos na dieta mediterrânica e os diversos constituintes desses alimentos, principalmente os responsáveis pelas suas propriedades antioxidantes. Adicionalmente, e uma vez que para efectuar uma análise mais robusta da actividade antioxidante é necessário avaliar diferentes mecanismos de acção, serão ainda abordados os dois principais mecanismos de acção dos antioxidantes, por transferência de átomos de hidrogénio ou por transferência de um electrão. As diversas técnicas incluídas em cada um desses mecanismos gerais serão também abordadas.

É possível compreender com esta dissertação que efectivamente alguns alimentos da dieta mediterrânica têm elevado conteúdo em antioxidantes e que este conteúdo pode ser relevante no que diz respeito à protecção e prevenção da saúde da população. No entanto, este não pode ser o único factor considerado para efectuar uma afirmação objectiva de protecção para a saúde, sendo necessária a execução de mais estudos robustos que considerem a actividade antioxidante, bem como outras propriedades destes alimentos relevantes para a caracterização dos seus efeitos na saúde.

Palavras-Chave: Actividade Antioxidante, Dieta Mediterrânica, Espécies Reactivas, Radicais Livres, Mecanismos de Acção Antioxidante

Abstract

Currently there has been a growing concern among the general population to choose foods that may lead to benefic health effects, particularly to prevent various diseases. Many of the preventive characteristics attributed to some foods are referred to as being a consequence of their antioxidant properties, or more specifically of their content in antioxidant compounds.

Thus, there has been a growing interest in finding foods denominated as functional foods, that is, those that bring health benefits.

The Mediterranean diet has been one of the most referred diets as beneficial to health and the evaluation of the antioxidant properties of foods included in this diet has been the subject of some analysis by the scientific community.

This dissertation addresses the main foods contained in the Mediterranean diet and the various constituents of these foods, especially those responsible for their antioxidant properties. Additionally, to perform a more robust analysis of the antioxidant activity, it is necessary to evaluate different mechanisms of action. The two main mechanisms of action of antioxidants, either by transfer of hydrogen atoms or by transfer of an electron, will be discussed. The various techniques included in each of these general mechanisms will also be addressed.

With this dissertation, it is possible to understand that indeed some foods of the Mediterranean diet have high content in antioxidants and this may be relevant in terms of health protection and prevention for the population. However, this should not be the only factor considered to make an objective statement about health protection, and it is necessary to perform more robust studies that consider, not only, the antioxidant activity of these foods, but also other properties relevant for the characterization of their effects in the Health.

Keywords: Antioxidant Activity, Mediterranean Diet, Reactive Species, Free Radicals, Mechanisms of Antioxidant Action.

Abreviaturas

AA = Actividade Antioxidante

AAPH = Dicloridrato de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano)

ABAP = Cloridrato de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano)

ABTS = Ácido 2,2-Azinobi-(3-etilbenzotioazo-6-sulfato)

ACF = Focos Cripto Aberrantes

ADN = Ácido Desoxirribonucleico

AGPI = Ácidos Gordos Poli-Insaturados

AH = Radical Iniciador

ATP =Trifosfato de Adenina

AUC = Área sob a Curva

CA = Capacidade Antioxidante

CUPRAC = Capacidade Antioxidante de Redução do Cobre

DMPD = *N*,*N*-dimetil-*p*-fenilenodiamina

DPOC = Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica

DPPH = 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EC_{50} = Concentração efetiva em que se atinge metade do efeito máximo

FCR = Reagente Folin-Ciocalteau

FRAP = Poder Antioxidante da Redução do Ferro

HAT = Transferência de Átomos de Hidrogénio

HDL = Lipoproteína de Alta Densidade

IC_{50} = Concentração Inibitória 50

LDL = Lipoproteína de Baixa Densidade

MDA = Malondialdeído

mRNA = Ácido Ribonucleico Mensageiro

NAC = N-acetilcisteína

NBT = Tetrazólio Nitroazul

NO = Óxido Nitríco

NRLS = Espécies Não Radicais Livres

ORAC = Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigénio

RL = Radicais Livres

RNS = Espécies Reactivas de Azoto

ROS = Espécies Reactivas de Oxigénio

SCN = Tiocianato

SET = Transferência de Electrões

SIDA = Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

TBA = Ácido Tiobarbitúrico

TBARS = Substância Reactiva do Ácido Tiobarbitúrico

TEAC = Capacidade Antioxidante em Equivalentes de Trolox

TPTZ = Complexo Férrico 2,4,6-tripiridil-*s*-triazina

TRAP = Parâmetro Antioxidante de Retenção de Radicais Totais

TROLOX = Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

Índice

Agradecimentos i
Resumo ii
Abstract iii
Abreviaturas iv
Índice vi
Índice de Figuras vii
Índice de Tabelas viii
Introdução 1
Radicais Livres 3
Antioxidantes 5
A Dieta Mediterrânea e a sua Relevância 16
O Azeite 19
Os Espinafres 20
O Mirtilo 22
A Romã 24
O Vinho 25
Técnicas para a Determinação da Actividade Antioxidante 29
Capacidade de absorção de radicais de oxigénio (ORAC) 31
Potencial reactivo antioxidante total (TRAP) 33
Substância reactiva do ácido tiobarbitúrico 33
Sistema Beta-Caroteno / Ácido Linoléico 34
Método de ABTS 34
Capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox (TEAC) 35
Método de DPPH 36
Poder antioxidante da redução do ferro (FRAP) 37
Método de Folin-Denis 37
Capacidade antioxidante de redução do cobre (CUPRAC) 38
Método de Folin-Ciocalteau 38
Método de Ferrocianeto 39
Outros Métodos 39
Conclusão 41
Referências Bibliográficas 42

Índice de Figuras

Figura 1: Diferença entre uma célula lesada e uma célula saudável 3
Figura 2: Estrutura Química do β-Caroteno 6
Figura 3: Estrutura Química do α-Tocoferol 9
Figura 4: Estrutura Química do Ácido Ascórbico 9
Figura 5: Estrutura Química dos Flavonóides 11
Figura 6: Estrutura Química da Antocianina……...…15

Índice de Tabelas

Tabela 1: Espécies Reactivas de Oxigénio (ROS), Espécies Reactivas de Azoto (RNS) e Espécies não Radicais Livres (NRLS) 4
Tabela 2: Classe de Flavonóides e Substituições Estruturais. 11
Tabela 3: Flavonóides Antioxidantes versus Flavonóides Pró-Oxidantes 12
Tabela 4: Exemplos de Ácidos Fenólicos 14
Tabela 5: Antocianidinas mais comummente encontradas na natureza e a sua respectiva coloração. 15
Tabela 6: Composição por cada 100 gramas de parte comestível crua de espinafres. ... 21
Tabela 7: Composição por cada 100 gramas de parte comestível crua de mirtilo. 22
Tabela 8: Composição por cada 100 gramas de parte comestível crua de romã. 25

Introdução

Actualmente os consumidores têm mostrado um interesse crescente na escolha de alimentos com propriedades preventivas e / ou curativas, sendo que muitas destas propriedades estão relacionadas com a actividade antioxidante (AA). Neste âmbito, o termo alimento funcional tem sido cada vez mais utilizado, referindo-se ao alimento comum consumido como parte da dieta e que possui algum benefício de saúde (Roger, 2002). Os alimentos podem funcionar como uma forma de auxílio na protecção das células e tecidos contra as espécies reactivas de oxigénio (ROS) e as espécies reactivas de azoto (RNS), podendo assim contribuir para a prevenção de várias doenças (Gulçin, 2011).

O nosso organismo por ter meios endógenos de protecção contra factores nocivos activa o sistema de defesa (Kaur & Kapoor, 2001) no qual os antioxidantes endógenos se encarregam de protege-lo através da inibição da produção e da neutralização de ROS ou RNS, da capacidade redutora, da capacidade de quelar metais, da actividade da enzima antioxidante e da inibição de enzimas oxidativas (Magalhães, Segundo, Reis & Lima, 2008), tais como a catalase, o superóxido dismutase, o fosfato de glucose desidrogenase, o glutatião, a albumina e a transferrina e como compostos não enzimáticos o ácido úrico e a bilirrubina (Medina, 2010). A actividade antioxidante natural vai reduzir: danos no ADN, a mutagénese, a carcinogénese e o crescimento bacteriano patogénico (Roginsky & Lissi, 2005; Gulçin, 2011).

No que diz respeito aos antioxidantes exógenos, estes provêm de diversas fontes externas como a nossa dieta alimentar, nomeadamente das frutas e vegetais (Kanner, German & Kinsella, 1987; Antolovich, Prenzler, Patsalides, McDonald & McDonald, 2001). Neste último caso, temos como exemplo de alguns componentes alimentares com capacidade antioxidante, o ácido ascórbico ou vitamina C, a vitamina A, a vitamina E, os carotenóides, os polifenóis e os flavonoides (Soares, 2002; Rocha, 2009).

De uma forma generalizada a reacção de oxidação das células, ocorre com base na ineficácia das reacções redox, ou seja, numa reacção na qual a redução se refere ao ganho de electrões e a oxidação à perda de electrões. Assim, um redutor é uma substância doadora de electrões que irá conduzir à obtenção de uma espécie reduzida, enquanto que um oxidante é uma substância aceitadora de electrões que leva à obtenção

de uma espécie oxidada. Na reacção redox estes processos ocorrem simultaneamente, pelo que em caso deste facto não ocorrer desta forma, iremos ter de intervir através de uma acção endógena e exógena na produção de antioxidantes (Gulçin, 2011).

Os antioxidantes são compostos que ajudam no controlo dos danos causados pelas espécies reactivas (RS). Este processo ocorre através da neutralização dos radicais livres (RL), já que estes são ricos em electrões, impedindo assim o dano oxidativo (Lady, 2012).

A formação excessiva de RL leva à sobrecarga das enzimas protectoras (superóxido dismutase, catalase e glutationa peroxidase), que irão ser destruídas ou causar efeitos letais celulares, como é o caso da apoptose e da oxidação das membranas lipídicas (Gulçin, 2011).

Assim, tem sido crescente o interesse nas fontes de compostos antioxidantes de origem exógena, nomeadamente nos que advém da alimentação. No que diz respeito aos alimentos, um antioxidante tem sido definido como uma substância que, quando presente em baixas concentrações, em comparação com a de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação de substratos, podendo proteger o corpo humano de radicais livres e espécies oxidantes reactivas (Gulçin, 2011). Adicionalmente e apesar de existirem várias definições para o termo antioxidante, a que se encontra mais ajustada ao contexto desta dissertação, foi descrita pela US National Academy of Sciences em 2000 e é a seguinte: "toda a substância da dieta alimentar capaz de reduzir significativamente os efeitos adversos produzidos por espécies reactivas, como aquelas de oxigénio (ROS) e azoto (RNS), pode ser considerado um antioxidante eficaz (Sies, 1993; Rocha, 2009).

Neste âmbito, a dieta mediterrânica tem tido algum destaque sendo referida como muito rica em compostos antioxidantes que lhe podem conferir propriedades benéficas à saúde (Gulçin, 2011). Assim, é relevante compreender como é constituída a dieta mediterrânica, quais os principais antioxidantes que a constituem, a relevância da actividade antioxidante (AA) desses componentes e as principais técnicas utilizadas para avaliar essas propriedades antioxidantes. Para este efeito é fundamental compreender conceitos básicos como o de RL.

Radicais Livres

Os radicais livres (RL) caracterizam-se por serem espécies químicas capazes de existir de uma forma independente e que apresenta um ou mais electrões desemparelhados, tornando-se moléculas altamente reactivas capazes de reagir com compostos na sua proximidade e tendo um papel de oxidante na reacção (Halliwel & Gutteridge, 1999).

Estas espécies são agentes oxidantes nocivos que actuam sobre o nosso organismo, sendo moléculas agressivas e altamente reactivas (Gulçin, 2011), mas com capacidade de subsistência suficiente para causar dano químico às nossas próprias células. Estas espécies provêm de contaminantes que invadem o nosso meio ambiente, nomeadamente a partir do fumo do tabaco, da poluição atmosférica, da exposição solar, de solventes orgânicos e de pesticidas (Halliwel & Gutteridge, 1999), podendo originar invasão de organismos hospedeiros ou lesões (*National Parkinson Foundation*, 2014). As espécies pró-oxidantes são substâncias indutoras de danos oxidativos em vários alvos biológicos, como ácidos nucleicos, lípidos ou até mesmo proteínas (Gulçin, 2011). Como exemplo de pro-oxidantes contidos na dieta alimentar, temos as quinonas (Gulçin, 2011). Assim, através da diversos factores externos são fornecidas ao nosso organismo diversas espécies oxidantes e pró-oxidantes que podem causar danos. Até mesmo alguns tipos de stress físico ou psíquico (tensão nervosa) (Roger, 2002), podem conduzir ao stress oxidativo (**Figura 1)**.

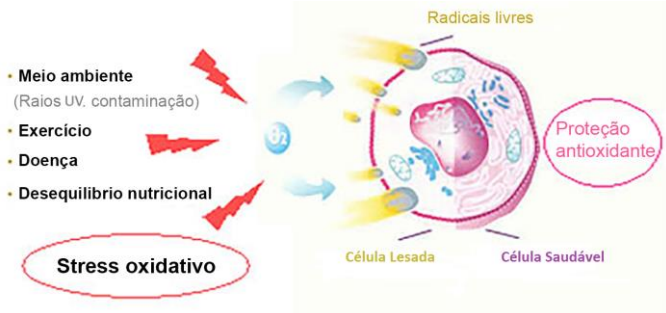


Figura 1: Diferença entre uma célula lesada e uma célula saudável (adaptado de Viviendo Sanos, Esther, 2008)

Para o bom funcionamento do organismo é necessário que não existam elevadas concentrações de RL. A capacidade do radical actuar como agente oxidante é determinada pelos seguintes factores: reactividade, especificidade, selectividade, potencial redox de cada espécie e difusibilidade. A sua acção causa estragos oxidativos em macromoléculas biológicas como os lípidos, os hidratos de carbono, as proteínas e

até mesmo alguns genes do nosso ADN. O dano oxidativo causado pelos RL é referido em muitos estudos como tendo um papel relevante no envelhecimento prematuro do nosso organismo, e em várias doenças degenerativas como na diabetes, em disfunções cognitivas, em patologias cardiovasculares, em processos reumáticos, em patologias gastroentéricas, no agravamento de infecções broncopulmonares e em processos neurodegenerativos (Alzheimer) (Alho & Leinonen, 1999; Duh, 1998; Hertog, Feskens, Hollman, Katan & Kromhout, 1993; Tanizawa, et al., 1992; Gulçin, 2011; Rocha, 2009), embora os mecanismos ainda se encontrem elucidados.

Segundo Gulçin (2011) as espécies reactivas podem ser divididas em ROS, RNS ou NRLS, conforme o composto que lhe deu origem, conduzindo a diversas espécies oxidantes (**Tabela 1)**.

Tabela 1: Espécies Reactivas de Oxigénio (ROS), Espécies Reactivas de Azoto (RNS) e Espécies não Radicais Livres (NRLS) (adaptado de Gulçin, 2012)

ROS		RNS		NRLS	
Radical Hidroperoxilo	$HOO^{\bullet}$	Óxido Nitríco	$NO^{\bullet}$	Peróxido de Hidrogénio	H_2O_2
Radical Hidroxilo	$HO^{\bullet}$	Dióxido de Nitrogénio	$NO_2^{\bullet}$	Ozono	O_3
Radical Superóxido	$O_2^{\bullet -}$			Oxigénio singleto	$^1O_2$
Radical Peroxil	$ROO^{\bullet}$			Hipoclorito	HOCl
Radical Peroxil Lípido	$LOO^{\bullet}$			Hidroperóxido Lípido	LOOH
Radical Alcoxil Lípido	$LO^{\bullet}$			Peroxinitrato	$ONOO^-$
				Trióxido de Dinitrogénio	N_2O_3
				Ácido Peroxinitroso	ONOOH
				Nitroxilo	NO^-
				Clorito de Nitrilo	NO_2Cl
				Nitrosilo	NO^+
				Ácido Nitroso	HNO_2
				Óxido Nitroso	N_2O

Os radicais $O_2^{\bullet -}$, $ROO^{\bullet}$, $NO^{\bullet}$ são considerados pouco reactivos, já o $OH^{\bullet}$ e $RO^{\bullet}$ são considerados muito reactivos (Ames, Shigenaga & Hagen, 1993; Pietta, 2000; Apak, et al., 2013; Gulçin, 2011).

O excesso de $NO^{\bullet}$ no organismo é considerado citotóxico quando acumulado em elevadas concentrações.

Já o radical $ROO^{\bullet}$, obtido pelo processo de peroxidação lipídica através da remoção do átomo de hidrogénio dos ácidos gordos polinsaturados (AGPI), e o H_2O_2, agente oxidante que na presença de oxigénio (O_2) e de iões metálicos de transição leva à produção de $OH^{\bullet}$, resultam da reacção de Fenton (Halliwel & Gutteridge, 1999; Gulçin, 2011).

O LOOH sofre a catálise dos iões metálicos de transição, tal como ocorre com o H_2O_2, ocorrendo assim a produção do $LOO^{\bullet}$ e do $LO^{\bullet}$ (Antolovich, Prenzler, Patsalides, McDonald & McDonald, 2001).

Assim, estes RL podem ter acções nocivas no nosso organismo e as formas endógenas de os bloquear podem não ser suficientes, podendo este processo ser auxiliado pela presença de outros antioxidantes, como a vitamina A, a vitamina E, a vitamina C, flavonóides, entre outros. Neste âmbito, a dieta alimentar pode representar uma importante fonte destes compostos antioxidantes (Almajano, 2009), de onde se tem vindo a destacar a dieta Mediterrânica (Gulçin I. , 2011).

Antioxidantes

Como já foi referido, os antioxidantes são moléculas que têm a capacidade de inibir a oxidação de outras moléculas que podem existir na nossa alimentação ou mesmo ao nosso redor e que nos podem causar a oxidação celular no nosso organismo (Buthler & Miranda, 2000).

As acções nefastas provocadas pelas espécies reactivas, devido ao stress oxidativo, levam à destruição celular que pode originar e/ou acelerar displasias, envelhecimento, aterosclerose, lesão isquémica, inflamação e doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer). As vitaminas antioxidantes e as enzimas, podem ser aliadas ajudando o sistema de defesa antioxidante total do organismo (Buthler & Miranda, 2000). A provitamina A, a vitamina C, a vitamina E e os flavonóides são considerados alguns dos melhores antioxidantes naturais, que podem ser ingeridos quer sobre a forma de suplementos quer integrados em diferentes alimentos como as frutas, hortaliças e frutos secos (Roger, 2002).

A acção desencadeada pelo antioxidante pode atrasar ou inibir a oxidação das moléculas do organismo que possibilitam as etapas de iniciação ou de eliminação de RL. Caso esta acção ocorra na fase de iniciação, ela impede a etapa de propagação da oxidação, através de um processo de transferência de átomos de hidrogénio a estas moléculas (Soares, 2002). Deste modo, um antioxidante é “qualquer substância capaz de atrasar ou inibir a oxidação do substrato oxidável de maneira eficaz” (Sies & Shatl, 1995). A acção desencadeada pelos antioxidantes no combate aos radicais livres é feita através da redução de espécies reactivas. Esta acção poderá auxiliar na prevenção de

várias doenças, tais como a arteriosclerose, o cancro, o enfarte do miocárdio e a imunodepressão (Roger, 2002).

A AA destas substâncias depende de vários factores, como da sua estrutura, da reactividade química, da sua concentração, da temperatura, do tipo de substrato, e até mesmo do estado físico do sistema. Para efectuar a avaliação da actividade antioxidante, podem ser utilizados vários ensaios *in vitro*, sendo que estes diferem entre si relativamente aos mecanismos de reacção, da espécie alvo e das condições reaccionais. Adicionalmente, a separação e quantificação dos antioxidantes, tanto nos alimentos como em outras matrizes biológicas, é também relevante, embora não seja possível uma linearidade no que se refere ao poder antioxidante e a sua quantificação devido à sua diversidade bioquímica na natureza (Apak, et al., 2013).

Dentro da classe de antioxidantes, nomeadamente nos contidos em alimentos, são de salientar os carotenóides, como o beta-caroteno, precursor da vitamina A (**Figura 2**), os tocoferóis, a vitamina E, a vitamina C, o selénio, o zinco, o cobre, (Esther, 2008), os flavonóides ou bioflavonóides, os ácidos fenólicos (Gulçin, 2011), as antocianinas ou proantocianidinas, clorofila, a N-acetilcisteína e a coenzima Q_{10} ou ubiquinona (Medina, 2010).

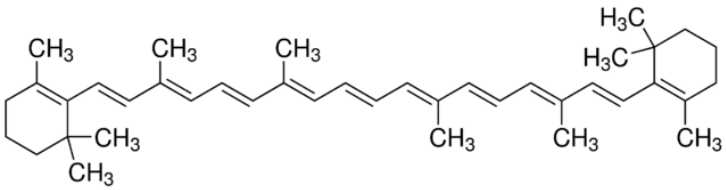


Figura 2: Estrutura Química do β-Caroteno

Os carotenóides são compostos naturais liposolúveis (carácter hidrofóbico) com reconhecida elevada actividade antioxidante (Gulçin I., 2011). Caracterizam-se por serem compostos isoprenóides, nos quais a biossíntese se processa através da ligação entre as caudas de duas moléculas de difosfato de geranilgeranil (C_{20}), dando origem ao esqueleto de carbono C_{40} do qual derivam todos os outros subprodutos. No caso de possuírem um ou mais átomos de O_2 são denominados por xantofilas (Dutta, Chaudhuri & Chakraborty, 2005).

Os carotenóides presentes nos alimentos conferem a cor amarela, laranja ou vermelha, dependendo do estado de maturação em que os frutos, vegetais ou legumes se encontrem. No entanto, para que os carotenóides apresentarem cor, é necessário que

existam no mínimo sete ligações duplas conjugadas (Dutta, Chaudhuri & Chakraborty, 2005). Os principais carotenos em alimentos são, o β-caroteno, um hidrocarboneto isoprenóide formado a partir do pirofosfato de geranilgeranil caracterizando-se como um tetraterpeno de oito unidades de isopreno (Gulçin, 2011); o licopeno, que dá a cor vermelha aos tomates e às frutas vermelhas como a melancia, o mamão, a goiaba rosa e a toranja rosa; a luteína, que surge naturalmente na natureza na forma de xantofila e encontra-se normalmente em vegetais de folhas verdes como os espinafres e a couve (Gulçin, 2011); a β-criptoxantina, um pigmento natural isolado de diversas fontes como a papaia, a gema do ovo e maçãs (Krishnadev, Meleth & Chew, 2010; Gulçin I., 2011); e a astaxantina que é um pigmento colorido lipossolúvel, dando a cor vermelha aos crustáceos, às lagostas, aos camarões, às microalgas, ao fermento, aos salmões e às trutas (Riccioni, 2009; Gulçin, 2011).

O β-caroteno é um pigmento de cor amarela ou alaranjada que se encontra em muitas frutas e verduras e que se transforma em vitamina A no intestino ou no fígado. Esta fonte de pró-vitamina A (carotenos e carotenóides) é extraída de todos os vegetais coloridos, especialmente da cenoura, do espinafre (luteína e zeaxantina) e do pimento, tendo como principal função a de antioxidante e protector do coração e das artérias (Roger, 2002). Através de estudos foi referenciado que o β-caroteno poderia agir auxiliando no processo de apoio à protecção imunitária, auxiliando em casos de doenças infecciosas como, por exemplo, o sarampo (West, Howard & Sommer, 1989; Dutta, Chaudhuri & Chakraborty, 2005), ou como adjuvante nos tratamentos de supressão do Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) (Garewal, Ampel, Watson, Prabhala & Dols, 1992).

Por sua vez o licopeno, em alguns estudos demonstrou actuar na redução de episódios de displasia da próstata (Cristoni, Di Pierro & Bombardelli, 2000). O seu efeito preventivo está em parte associado à capacidade de captação de radicais livres por parte da sua actividade antioxidante.

Tem sido também descrita em artigos uma proporcionalidade directa entre a coloração da fruta ou legumes e o seu conteúdo total em carotenóides, ou seja, concedendo uma previsão da quantidade de pigmentos carotenóides existentes nos

alimentos (Pacheco, Alvarado, Salas & Trujillo, 1999; Ruiz, Egea, Tomás-Barberán & Gil, 2005; Jatunov, Quesada, Diaz & Murillo, 2010).

Através de vários estudos, é possível concluir que o conteúdo total e individual em carotenóides é diferente conforme a variedade de fruta ou vegetal que se analisa (Pacheco, Alvarado, Salas & Trujillo, 1999; Hart & Scott, 1995; Rodríguez, Kimura, Godoy & Amaya, 2008). Este facto deve-se à sua estrutura conformacional, com base em ligações duplas conjugadas num rearranjo linear, em que estes antioxidantes poderosos efectuam um papel protector do corpo humano contra eventuais doenças que se possam desenvolver devido ao stress oxidativo que se ocasiona por oxidações no corpo (Meléndez-Martínez, Vicario & Heredia, 2004; Tapiero, Townsend & Tew, 2004; Jatunov, Quesada, Diaz & Murillo, 2010).

Uma das constatações verificadas em alguns estudos é que os carotenóides se apresentam em maior quantidade nos vegetais e legumes cozinhados comparativamente com os crus (Jatunov, Quesada, Diaz & Murillo, 2010). Encontra-se descrito que no processo de cozinhar os alimentos ocorre a libertação dos carotenóides da matriz, por acção do calor. Sendo referido que mesmo ocorrendo o aumento da presença de um tipo de carotenóides e a diminuição de outros tipos de carotenóides, no total vai existir um equilíbrio antioxidante (Jatunov, Quesada, Diaz & Murillo, 2010).

O β-caroteno, oriundo dos vegetais, apresenta menor absorção do que o β-caroteno purificado. No caso dos vegetais de folha verde esta variação ronda os 3 %, já no caso das cenouras ronda os 15 % e nos brócolos ronda os 2 % (Brown, et al., 1989; Micozzi, et al., 1992; De Pee, West, Muhilal & Hautvast, 1995; Torronen, Lehmusaho, Hakkinen, Hanninen & Mykkanen, 1996; Castenmiller, West, Linssen, Van Het Hof & Voragen, 1999; Van Het Hof, Tijburg, Pietrzik & Weststrate, 1999). Estes factos podem dever-se a diferenças na localização intracelular, por exemplo, no caso das folhas o local de produção é nos cloroplastos e nas frutas é nos cromoplastos, pelo que vai haver uma maior produção nestes (Dutta, Chaudhuri & Chakraborty, 2005).

A classe dos tocoferóis e dos tocotrienóis também são conhecidos pela sua actividade antioxidante. A constituição destes consiste num anel cromanol, com um grupo hidroxilo que pode doar um átomo H para a redução de radicais livres, e uma

cadeia lateral hidrofóbica, que permite a penetração nas membranas biológicas (Burton & Ingold, 1981; Gulçin, 2011).

A baixa quantidade em tocoferóis tem sido descrita como originando problemas neurológicos, tais como a ataxia espinocerebral e as miopatias (Brigelius-Flohé & Traber, 1999; Gulçin, 2011).

Nesta classe, o α-tocoferol (**Figura 3**), isómero da vitamina E, é um dos antioxidantes mais reconhecidos e tem demonstrado um efeito protector na doença de Parkinson.

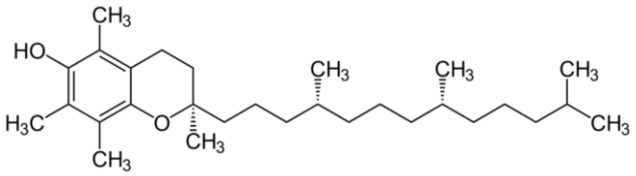


Figura 3: Estrutura Química do α-Tocoferol

As vitaminas E e C, estão entre as mais reconhecidas pela população em geral como tendo propriedades benéficas ao organismo e a sua ingestão diária ronda as 70 mg. Já o consumo de carotenóides varia entre 2 a 3 mg (Buthler & Miranda, 2000).

Em particular a vitamina C, ou ácido ascórbico, evita a oxidação de inúmeras moléculas e a sua transformação em radicais livres, podendo assim o seu consumo ser útil na prevenção do envelhecimento celular, deterioração do ADN e cancro (Roger, 2002).

Acredita-se que o ácido ascórbico (**Figura 4**) seja o antioxidante natural mais consumido e menos tóxico para o organismo (Bendich, Machlin, Scandurra, Burton & Wayner, 1986; Weber, Bendich & Schalch, 1996). É solúvel em água, existe em elevadas concentrações em vários alimentos (citrinos, kiwi, cereja, melão, tomate, verduras, brócolos, couve-flor, couve de Bruxelas e repolho), e transfere um único electrão, tornando-se assim um redutor eficaz. O seu grupo hidroxilo é altamente ácido, em comparação com os existentes em outros compostos, por isso é um enol e na sua forma desprotonada é um enolato estabilizado (Gulçin, 2011).

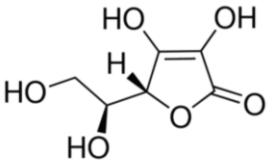


Figura 4: Estrutura Química do Ácido Ascórbico

Por outro lado, a vitamina E actua impedindo a oxidação das gorduras, evitando assim a arteriosclerose e a deterioração das membranas das células, e a sua acção é potenciada pela sua conjugação com a vitamina C, beta-carotenos e selénio, ocorrendo então a protecção da integridade das células e o prolongamento da sua vida (Roger, 2002).

O selénio é um oligoelemento com características antioxidantes que estimula as defesas e protege contra o cancro. O nosso organismo apenas necessita deste em baixíssimas quantidades, cerca de 400 microgramas para propiciar estímulo imunitário, contribuindo assim para a formação de anticorpos contra agentes infecciosos (Roger, 2002).

Os flavonóides fenólicos ou polifenóis são pigmentos (corantes naturais) existentes em vários vegetais e muitos deles têm sido descritos como tendo um efeito notável como antioxidante, anti-viral, anti-alérgico, anti-inflamatório, diurético (Roger, 2002). São ainda moduladores da actividade enzimática (cicloxigenase, lipoxigenase, fosfatase A_2, hialuronidase), inibem a acção da angiotensina convertase, mieloperoxidase, xantioxidase, inibem a peroxidação lipídica e a captação dos radicais livres hidroxilo, superóxido e alcoxilo. Protegem os pequenos vasos capilares, potenciam a acção da vitamina C existente em vegetais e caracterizam-se como sendo componentes não nutritivos dos alimentos. Têm como principais funções benéficas as de protecção contra o cancro, o processo degenerativo da arteriosclerose, o enfarte e o envelhecimento celular. Actuam também na prevenção de tromboses e outros acidentes vasculares, devido à eficácia como inibidor da agregação plaquetária, na activação das enzimas de destoxificação (Mazza, 2000; Medina, 2010) e na oxidação das LDL (Roger, 2002). Como exemplos, temos a quercitina e a catequina (presentes por exemplo em cebolas e maçãs), a rutina (contida em laranjas e outros citrinos). A ingestão destes compostos, advém de alimentos como as uvas, bem como do mosto não fermentado e, em menor intensidade, do vinho tinto.

Os flavonóides (**Figura 5**) são um dos maiores grupos de antioxidantes existentes na natureza. Estes compostos são divididos, de acordo com a sua estrutura química, em flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, catequinas, antocianidinas e chalconas, podendo a dose total variar entre os 50 e 800 mg (Buthler & Miranda, 2000).

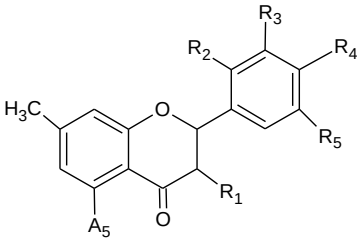


Figura 5: Estrutura Química dos Flavonóides

Da estrutura dos flavonóides fazem parte um núcleo flavano que contem 15 átomos de carbono repartidos por três anéis C_6-C_3-C_6 (Gulçin, 2011).

As diferentes classes de flavonóides (**Tabela 2**) são diferenciadas pelo nível de oxidação e pelo nível de substituição dos diferentes substituintes presentes. Quanto aos compostos individuais da classe, estes são diferenciados pelo nível de padrão de substituição dos C_6-C_3- e encontram-se ligados pela cadeia alifática, dando origem ao anel furano (Harborne, Cody & Middleton, 1986; Gulçin, 2011).

Tabela 2: Classe de Flavonóides e Substituições Estruturais (adaptado de Arch Toxicol., Gulçin, 2012).

Classes	Nomes	Substituições						
		R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	A_5	A_7
Flavonas	Apigenina	H	H	H	OH	H		
	Crisina	H	H	H	H	H		
	Luteolina	H	H	OH	OH	H		
Flavonóis	Datiscetina	OH	H	OH	OH	H		
	Quercetina	OH	H	OH	OH	H		
	Miricetina	OH	H	OH	OH	OH		
	Morina	OH	OH	H	OH	H		
	Campferol	OH	H	H	OH	H		
Flavanonas	Hesperetina	H	H	OH	OCH_3	H		
	Naringenina	H	H	H	OH	H		
Flavanonol	Taxifolina	OH	H	OH	OH	H		
Isoflavonas	Genisteína				OH		OH	OH
	Genistina				OH		OH	Oglc
	Daidzeína				OH		H	OH
	Daidzina				OH		H	Oglc
	Biochanina A				OCH_3		OH	OH
	Formononetina				OCH_3		H	OH

Em termos das propriedades destes flavonóides, temos como inibidores da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), a procianidina, a proantocianidina, a quercetina e a catequina, todos eles polifenóis que ajudam na prevenção da aterosclerose, da doença arterial coronária, do acidente vascular cerebral, da doença vascular periférica e alguns tipos de displasias (Opie & Lecour, 2007; Mamede & Pastore, 2004; Vaccari, Soccol & Ide, 2009).

As procianidinas são polifenóis de elevado peso molecular que se podem encontrar nas sementes das uvas e no vinho tinto (Masquelier, 1992). Estudos mostram

que estas procianidinas ajudam a impedir a ligação dos vírus, para evitar que estes entrem nas células e se multipliquem causando infecções. Esta inactivação dos vírus ocorre tanto no caso do herpes vírus simplex tipo I, como no poliovirus I, no echovirus, no coxsachie B5, em bactérias Gram positivas tais como *Stafilococcus*, *Streptococcus* e *Pneumococcus* e em bactérias Gram negativas como por exemplo *Shigella*, *Salmonella*, *Colibacilos* e *Proteus sp*. (Kinsella, Frankel, German & Kanner, 1993; Vaccari, Soccol & Ide, 2009).

Existem dois tipos de estruturas de taninos, as condensadas não hidrolisáveis, que se formam a partir de produtos com núcleos flavonóides e as condensadas hidrolisáveis (Bobbio & Bobbio, 1995), que são oligomeros ou polímeros de flavonóides com capacidade de interagir com proteínas e polissacáridos, e podendo vir a libertar as antocianidinas em meio ácido com o aumento da temperatura, rompendo-se as uniões intermonoméricas (passando assim a ser denominadas de proantocianidinas) (Flanzy, 2000; Vaccari, Soccol & Ide, 2009).

Os flavonóides têm propriedades antioxidantes (**Tabela 3**), anti-inflamatórias, anti-alérgicas, anti-hemorrágicas e anti-cancerigenas (Soto, Rodríguez & Castañeda-Ovando, 2008). Sendo de salientar nas propriedades anti-cancerígenas dos compostos fenólicos, a activação inibitória carcinogénica, catalisada por enzimas do citocromo P_{450}, a indução de enzimas de fase II, que facilitem a eliminação de certos agentes cancerígenos ou de seus metabolitos reactivos, a inibição do metabolismo do ácido araquidónico, que leva à produção de metabolitos pró-inflamatórios ou mitogénicos, a modulação oncogénica, de genes supressores de tumores e vias de transdução de sinal que levam à inibição da proliferação celular, transformação, angiogénese e indução da apoptose, e por fim, à extinção ou prevenção da formação de espécies de oxigénio ou azoto reactivos (Yang et al., 2001; Aurelio, 2012; Hashim, Gill, McGlynn & Rowland, 2005).

Tabela 3: Flavonóides Antioxidantes versus Flavonóides Pró-Oxidantes (adaptado de The Linus Pauling Institute, Buthler & Miranda, 2000)

Flavonóides Antioxidantes	Flavonóides Pró-Oxidantes
Quercetina (Flavonol existente em Vegetais, nas Cascas de Frutas e em Cebolas)	Chalconaringenina (Chalcona não Prenilada em Frutas Cítricas)
Xantohumol (Chalcona Prenilada em Lúpulo e na Cerveja)	
Isoxantohumol (Flavonona Prenilada em Lúpulo e na Cerveja)	Naringenina (Flavanona não Prenilada em Frutas Cítricas)
Genisteína (Isoflavona na Soja)	

Através de estudos epidemiológicos verificou-se que uma maior ingestão de alimentos contendo polifenóis, como frutas, verduras e algumas bebidas tais como o

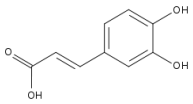
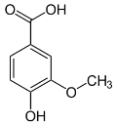
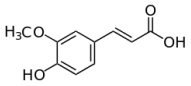
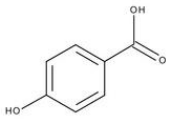
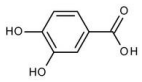
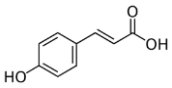
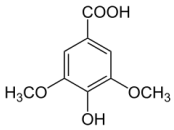
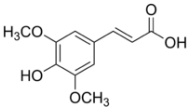
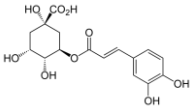
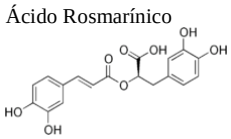
vinho tinto, o chá e a cerveja, era decrescente à mortalidade por doença cardíaca coronária e à incidência de ataques cardíacos (Buthler & Miranda, 2000).

Uma das definições dadas aos compostos fenólicos é que são substâncias que têm anel aromático com vários substituintes dos ácidos carboxilícos aromáticos hidroxílicos (Bianchi & Antunes, 1999; Malacrida & Motta, 2006) que, por sua vez, surgem a partir de ácidos benzóicos ou de ácidos cinâmicos (Gulçin, 2011). Uma das características destes compostos é a captação de radicais livres, tendo assim um importante papel na eliminação e desactivação desses radicais (Bianchi & Antunes, 1999; Degáspari & Waszczynskyj, 2004; Rocha, 2009). Nesta classe, alguns polifenóis têm-se destacado como o resveratrol, que em alguns estudos demonstrou ter efeitos protectores contra doenças cardíacas e neurodegenerativas como, por exemplo, no caso da Doença de Alzheimer (Opie & Lecour, 2007). Também foi demonstrada a sua utilidade na eliminação dos fungos (*Tricophyton sp.*, *Epidermophyton floccosum* e *Microscoporum gypseum*), responsáveis pelo aparecimento de micoses cutâneas (Chan, 2002), no bloqueio da COX-1 e da COX-2 em processos inflamatórios (De Groot & Rauen, 1998) e na diminuição das ocitocinas inflamatórias dos macrófagos alveolares frequentes no caso de doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) (Culpitt, et al., 2003; Vaccari, Soccol, & Ide, 2009).

Os compostos fenólicos actuam como doadores de hidrogénio ou de electrões. Ocorre o corte do ciclo de produção de novos radicais livres, sendo assim antecipadas as reacções terminais o que leva à acção de anti-radicais, levando à produção do radical fenoxil (o menos reactivo no processo oxidativo porque se estabiliza por ressonância com os electrões ω do anel aromático) (Almajano, 2009).

Os ácidos fenólicos (**Tabela 4**) ajudam na protecção contra as doenças cardíacas coronárias consequência de arteriosclerose, acidentes vasculares cerebrais, cancro (Gulçin, Bursal, Sehitoglu, Bilsel & Goren, 2010) e doenças oculares (Çoban, Beydemir, Gulçin & Ekinci, 2007; Ozturk, Gulçin & Supuran, 2010; Ozturk, Topal, Senturk, Gulçin & Supuran, 2011; Innocenti, Gulçin, Scozzafava & Supuran, 2010; Innocenti, Ozuturk, Gulçin & Supuran, 2010; Senturk, Gulçin, Beydemir, Kufrevioglu & Supuran, 2011; Gulçin, 2011).

Tabela 4: Exemplos de Ácidos Fenólicos (adaptado de Chem. Biol. Drug Design, Ozturk., Galçin & Supuran, 2010)

Nome e sua Estrutura Química				
Ácido Cafeíco ou Ácido 3,4-dihidroxicinâmico 	Ácido vanílico ou Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico 	Ácido Ferúlico ou Ácido 3-metoxi-4-hidroxicinâmico 	Ácido p-hidroxibenzóico 	Ácido 3,4-dihidroxibenzóico 
Ácido p-cumárico 	Ácido Siríngico ou Ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico 	Ácido Sinápico ou Ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico 	Ácido clorogénico ou Ácido 3-(3,4-dihidroxicinamoil) quínico 	Ácido Rosmarínico 

Os compostos fenólicos inibem a oxidação das LDL (Eberhardt, Lee & Liu, 2000; Paganga, Miller & Rice-Evans, 1999).

A palavra antocianinas deriva do grego *anthos* que significa flor e do grego *kyanos* que significa azul (Manhita, Teixeira & Costa, 2006). São um grupo de pigmentos vegetais hidrossolúveis (Degáspari & Waszczynskyj, 2004) com compostos fenólicos (**Tabela 5**). São responsáveis pela coloração de frutas, flores, folhas de diferentes espécies vegetais (Cooper-Driver, 2001) principalmente nos tons de azul e de vermelho pertencentes às antocianinas e de amarelo pertencentes às antoxantinas (Bobbio & Bobbio, 1995; Vaccari, Soccol & Ide, 2009). Na sua estrutura existe um esqueleto C_{15} no qual um anel aromático se liga a um segundo anel na posição C_2 sendo completada por uma ou mais moléculas de açúcar ligadas em diferentes posições hidroxiladas da estrutura básica (Delgado-Vargas & Paredes-López, 2003), diferindo entre elas pelo número de grupos hidroxilo, número e natureza dos açúcares unidos à molécula, posição desse açúcar e número e natureza dos ácidos alifáticos ou aromáticos (Kong, Chia, Goh, Chia & Brouillard, 2003; Rocha, 2009).

Tabela 5: Antocianidinas mais comummente encontradas na natureza e a sua respectiva coloração (adaptado de Kong, Chia, Goh, Chia & Brouillard, 2003; Rocha, 2009).

Nome	Abreviatura	Substituições							Coloração
		3	5	6	7	3'	4'	5'	
Apigeninidina	Ap	H	OH	H	OH	H	OH	H	Laranja
Aurantinidina	Au	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	Laranja
Capensinidina	Cp	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	Azul-Vermelho
Cianidina	Cy	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Laranja-Vermelho
Delfinidina	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Azul-Vermelho
Europinidina	Eu	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	Azul-Vermelho
Hirsutidina	Hs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	Azul- Vermelho
6-Hidroxicianidina	6-OHCy	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H	Vermelho
Luteolinidina	Lt	H	OH	H	OH	OH	OH	H	Laranja
Malvidina	Mv	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	Azul-Vermelho
5-Metilcianidina	5-MCy	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	Laranja-Vermelho
Pelargonidina	Pg	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Laranja
Peonidina	Pn	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Laranja-Vermelho
Petunidina	Pt	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Azul-Vermelho
Pulchelidina	PI	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	Azul-Vermelho
Rosinidina	Rs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	Vermelho
Tricetinidina	Tr	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Vermelho

As antocianinas (**Figura 6**) são pigmentos de cor vermelha escura ou arroxeada que se encontram em muitas bagas como a uva preta, os morangos, as amoras, a romã, os mirtilos e as groselhas. A sua acção antioxidante / redutora pode influenciar a síntese de colesterol no fígado, sendo cardioprotectores, tonificantes da circulação venosa, regeneradores dos pigmentos da retina e anti-sépticos urinários (Roger, 2002).

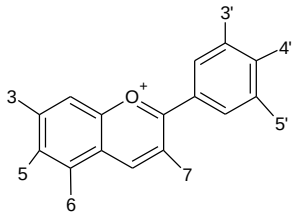


Figura 6: Estrutura Química das Antocianinas

As antocianinas diferenciam-se entre elas através dos níveis de hidroxilação e metilação dos diferentes compostos, dependendo da natureza, do número de ácidos, da posição das "oses" unidas à molécula que esterificam seus açúcares (Flanzy, 2000; Vaccari, Soccol & Ide, 2009). Um inconveniente das antocianinas é a sua baixa estabilidade em contacto com a luz, variações de pH, alterações de temperatura, tipo de solvente (Lima, Mélo & Lima, 2002; Rocha, 2009).

A clorofila nas plantas tem como principal função a conversão da energia da luz em energia química para a síntese de hidratos de carbono, sendo um potente antioxidante, e encontrando-se nos legumes (Roger, 2002).

A n-acetilcisteína ou NAC é um precursor do aminoácido não essencial cisteína, que normalmente actua como mucolítico, estimulante das defesas e antioxidante por

aumento dos níveis de glutationa nos linfócitos e outras células defensoras (Roger, 2002).

A ubiquinona é uma substância lipossolúvel produzida em todas as células, tanto vegetais como animais, tem acção antioxidante que intervém na produção de energia sob a forma de ATP nas células (Roger, 2002).

Assim, é possível reconhecer que uma das fontes mais relevantes destes antioxidantes é a dieta alimentar, onde a dieta mediterrânea tem sido muito evidenciada e sendo por isso útil, no âmbito desta dissertação, conhecer um pouco melhor os principais alimentos destacados nesta dieta.

A Dieta Mediterrânea e a sua Relevância

É da alimentação que surgem os aportes nutricionais com as substâncias antioxidantes necessárias ao metabolismo humano. No entanto, da alimentação também surgem outras espécies, como RL, com características reactivas e oxidantes, causadoras de efeitos nefastos ao corpo humano (Almajano, 2009) e algumas dietas alimentares poderão ser mais benéficas que outras.

A dieta mediterrânea rege-se em função da ingestão abundante de cereais, frutas frescas, legumes, verduras, hortaliças, frutos secos, mel, pães, carne vermelha, sementes, peixe e de vinho durante as refeições principais (Bach, et al., 2006; Roman, Carta, Martínez-González & Serra-Majem, 2008) e que conduzirá a uma boa absorção dos princípios activos que proporcionam a protecção do organismo através de diferentes mecanismos fisiológicos (Vaccari, Soccol & Ide, 2009).

Nesta dieta destacam-se os pratos preparados com base em alimentos crus, tais como as saladas e as sobremesas de frutas frescas, bem como o uso de azeite (principal fonte de lípidos), de alho e de limão como condimentos principais. Esta dieta conta ainda com o uso de leite, bem como de produtos lácteos (queijo e iogurte) e, em média quatro ovos por semana. Deste modo, é considerada uma forma eficaz para a conservação da saúde, impedindo assim o desenvolvimento das doenças displásicas e cardíacas cada vez mais comuns em Portugal (Roger, 2002).

Uma das principais características desta dieta é a ingestão de frutas no final da refeição, sendo que estas são ricas em fibras e têm uma elevada quantidade de vitaminas

na sua constituição, sendo também comum a ingestão das mesmas ao lanche. Os sumos de frutas naturais, também têm uma elevada quantidade de celulose, fonte essencial de fibras, sendo os sumos com bagas e uvas os mais benéficos, já que estes têm baixas calorias. Os de frutos vermelhos contêm ainda elevadas quantidades de polifenóis, assim como o vinho tinto, fonte considerada benéfica para o bem-estar cardíaco (Aurelio, 2012). Conferem uma acção ansiolítica e anti-inflamatória, um controlo da tensão arterial e da glicose no sangue. No que diz respeito aos vegetais, é de salientar que os antioxidantes mais activos são os fenólicos, principalmente os flavonóides, uma vez que têm uma elevada capacidade de captar RL (Nassif, 2011 / 2012). A ingestão de peixe, como por exemplo o salmão rico em ácidos gordos e fonte de omega-3, também faz parte da dieta mediterrânica (Spears, 2014).

Uma das particularidades mais enaltecidas de alguns dos alimentos pertencentes à dieta mediterrânica, é o seu conteúdo em antioxidantes, dos quais se salientam a elevada concentração em vitaminas A, C, E, em beta-carotenos, minerais, como o selénio ou o zinco, aminoácidos, como a cisteína ou a glutationa e bioflavonóides (Vasilopoulou & Trichopoulou, 2009).

A laranja, o kiwi e o morango são ricos em vitamina C, o azeite em vitamina E, a cenoura, a couve, o espinafre e o mamão em beta-caroteno, as frutas vermelhas como a ameixa e os mirtilos, os brócolos e a salsa são ricos em flavonóides, o chá verde em catequinas, o vinho tinto em quercetinas, o tomate em licopeno, a romã em ácido elágico, o caril em curcumina, a noz em vários polifenóis, os espinafres em clorofilina e o repolho em taninos (Roman, Carta, Martínez-González & Serra-Majem, 2008).

Assim, estes alimentos são considerados excelentes fontes de antioxidantes e através do seu consumo poderão contribuir para a prevenção do desenvolvimento do envelhecimento celular, da evolução de doenças cardiovasculares, da aterosclerose, do cancro, da doença de Alzheimer e das doenças pulmonares (Rocha, 2009).

O conteúdo destes alimentos nesses antioxidantes é muitas vezes responsável pelas diferentes cores, sabores e texturas dos alimentos, como referido anteriormente. Por exemplo, a cor vermelha característica das romãs, deve-se à presença de antocianinas, enquanto que a cor laranja das cenouras se deve a seu conteúdo em beta-caroteno (Lady, 2012; Soto, Rodríguez & Castañeda-Ovando, 2008).

Outro facto interessante, relativamente à relevância da alimentação na saúde, passa pelo facto de que alguns alimentos naturais consumidos têm uma bioactividade superior após o seu processamento, quando comparados com a sua forma natural (crua) (Gorinstein, et al., 2009; Jastrzebski, et al., 2007; Apak, et al., 2013).

Lorgeril et al. (1999), realizaram um estudo com a duração de quatro anos, que revelou efeitos protectores da dieta mediterrânica em alguns tipos de cancros. Este estudo também permitiu concluir que a adesão a esta dieta permitiu melhorias nas condições da depressão mental, como consequência do envelhecimento com declínio cognitivo e com doença de Alzheimer (Roman, Carta, Martínez-González & Serra-Majem, 2008).

Verificou-se ainda, em estudos epidemiológicos observacionais e randomizados, que os cuidados na dieta alimentar, com a introdução de verduras ou frutas, reduziam a mortalidade em geral e aumentavam a esperança média de vida (Sofi, Cesari, Abbate, Gensini & Casini, 2008). Estes resultados estão descritos como sendo consequência da acção de micronutrientes específicos, tais como a vitamina A, os beta-carotenos, a vitamina C, a vitamina E, a vitamina D e o ácido fólico (Hunt, 2008), respeitando sempre os princípios base de uma dieta equilibrada (Vasilopoulou & Trichopoulou, 2009).

Uma dieta equilibrada e variada tem como base a ingestão de alimentos pertencentes a todas as categorias da roda dos alimentos. Deve proceder-se à incorporação nas refeições de legumes, frutas, carne, cereais integrais, produtos lácteos, peixe, muita água. De salientar que estes elementos fazem parte da descrita dieta mediterrânica. Esta harmonização fará com que o nosso organismo tenha as suas necessidades nutricionais totalmente restabelecidas (Spears, 2014).

Adicionalmente, com base em estudos, relativos ao papel da dieta mediterrânica na população, uma das conclusões retiradas é de esta poder ter uma acção cardioprotectora (Martínez-González & Sánchez-Villegas, 2004). Nos ensaios clínicos efectuados, são ainda relatados os benefícios desta dieta, através de diferentes factores e aspectos de incidência ou prognóstico da doença cardiovascular, em indivíduos de risco, tais como os diabéticos, que têm uma ingestão livre de sal e de gorduras (Rodriguez,

Pérez-Heras, Mercadé, Casals & Ros, 2004; Antonopoulou, et al., 2006; Roman, Carta, Martínez-González & Serra-Majem, 2008).

No que diz respeito aos diversos alimentos que constituem a dieta mediterrânica, alguns são peça essencial, como o azeite, os espinafres, o mirtilo, a romã e o vinho, tornando-se relevante o seu conhecimento mais pormenorizado.

O Azeite

Este alimento tem na sua constituição triglicéridos, formados por glicerina e diversos ácidos gordos cis (predominantemente o ácido oleico, um monoinsaturado) já no que se refere aos ácidos gordos *trans* estes encontram-se ausentes da sua constituição. O azeite contém também vitamina E (um antioxidante importante no tecido adiposo) (Vasilopoulou & Trichopoulou, 2009) e ferro. As suas características organolépticas de destaque são o seu aroma e sabor acentuados. No seu processo de elaboração não se recorre à refinação, nem ao uso de solventes.

Os componentes do azeite têm sido divididos como a) **saponificável**, dos quais fazem parte os ácidos gordos e os triglicéridos, e b) **não saponificável**, dos quais fazem parte os hidrocarbonetos (esqualeno e carotenóides), a clorofila, os tocoferóis, o ácido oleíco, os álcoois alifáticos, os esteróis, os compostos fenólicos e os compostos orgânicos voláteis (Alarcón , Barranco, Motilva & Herrerias, 2001; Hashim, Gill, McGlynn & Rowland, 2005).

O esqualeno tem uma acção inibitória por redução do risco da actividade hidroximetil-glutaril-coenzima A-redutase em células da mucosa do cólon, o que leva à supressão da indução azoximetano dos focos de criptas aberrantes (ACF) do cólon (Rao, Newmark & Reddy, 1998; Hashim, Gill, McGlynn & Rowland, 2005).

Os compostos fenólicos que pertencem à constituição do azeite são os fenóis simples (hidroxitirosol e tirosol), os polifenóis (glucosido de oleuropeína) ambos com maior destaque devido ao seu alto teor antioxidante natural (Montedoro & Cantarelli, 1969; Gulçin, Elias, Gepdiremen & Boyer, 2006; Gulçin, 2011), os secoiridoides (dialdeidico de oleuropeína e ligstrosido) e os lignanos ((+)-pinoresinol e (+)-1-acetoxipinoresinol) (Owen, et al., 2000). Estes compostos auxiliam na prevenção da disfunção endotelial, na diminuição da expressão de moléculas de adesão celular (Carluccio, et al., 2003), no aumento da produção de óxido nítrico (NO), na agregação

plaquetária (Petroni, et al., 1995), no aumento da transcrição do mRNA do antioxidante da enzima peroxidase glutationa (Masella, et al., 2004), na actividade anti-inflamatória e na quimioprevenção (Beauchamp, et al., 2005; Owen, et al., 2000; Fitó, et al., 2007).

A acção do azeite não é tanto na redução do colesterol total. Na realidade este vai actuar na redução da lipoproteína da baixa densidade (LDL), o referido como "mau colesterol", aumentando ao mesmo tempo os níveis da lipoproteína de elevada densidade (HDL) "bom colesterol" e o seu consumo vai permitir proteger contra a arteriosclerose e as doenças coronárias (angina e enfarte) devido ao facto de, reduzir a pressão arterial (Spears, 2014), evitar a oxidação das lipoproteínas e reduzir o fibrinogénio do sangue (factor de coagulação) (Roger, 2002).

Através de estudos com modelos *in vitro* e *ex vivo* verificaram-se as suas propriedades antioxidantes sobre as peroxidases dos lipidos na doença coronária em doentes estáveis (Fitó, et al., 2005) e a oxidação do ADN em mulheres pós-menopausa (Owen, et al., 2000; Fitó, et al., 2000; Masella, et al., 2004; De la Puerta, Ruiz & Hoult, 1999; Salvini, et al., 2006), havendo um equilíbrio das reacções pró-oxidantes e antioxidantes na regulação do organismo humano (Fitó, et al., 2007), ajudando nos processos de inibição do desenvolvimento da aterosclerose pós-menopausa.

Ao conter poucos ácidos gordos polinsaturados e ter na sua constituição o *o*-difenol (Antolovich, Prenzler, Patsalides, McDonald & McDonald, 2001), o azeite apresentar um nível de estabilidade elevado, ou seja, demora mais tempo a produzir peróxidos perigosos e gosto desagradável, que se caracteriza pela presença de um odor forte, sabor amargo e acre e alteração da consistência do alimento, como resultado da reacção do oxigénio com os lipidos.

Os Espinafres

A palavra espinafre provém do latim *Spinacia oleracea L.* e é uma planta herbácea da família das Quenopodiáceas. O seu habitat natural é a Ásia Ocidental. Não são cultivados nos Trópicos, mas actualmente encontram-se por toda a Europa, sendo os seus principais cultivadores os Estados Unidos, a Alemanha, a França e a Itália (Roger, 2002).

Os espinafres fazem parte do grupo das verduras e têm na sua constituição (**Tabela 6**) uma elevada concentração em vitaminas A e C, são uma excelente fonte de proteínas, e contêm muito potássio, mas pouco sódio (esta proporção ajuda no controlo da pressão arterial). Contêm ainda vitamina K (que ajuda nos processos anti-inflamatórios), fósforo (essencial para os ossos), luteína e zeaxantina (pigmentos vegetais da família dos carotenóides, embora não se convertam em vitamina A como no caso do β-caroteno que demonstrou uma elevada capacidade antioxidante (Esther, 2008; Roger, 2002) e o ferro e cálcio. Os espinafres contêm antioxidantes responsáveis pela estimulação das actividades mentais dos seres humanos. Pelo que o cérebro, ao consumir muita energia para funcionar, dá lugar à obtenção de resíduos químicos oxidativos nocivos em excesso, as substâncias antioxidantes como a vitamina K, a luteína e o ácido fólico funcionam como aliadas na eliminação destes pelo cérebro. Os espinafres podem também ajudar na prevenção do envelhecimento prematuro da pele, protegendo as células contra o seu crescimento anormal (como, por exemplo, no cancro da próstata, da mama, do estômago e claro da pele), e na digestão evita a prisão de ventre e protege o estômago das úlceras, bem como ajuda a libertar toxinas do cólon. Nos diabéticos esta verdura também tem uma acção benéfica devido ao seu conteúdo em fibras, que ajudam no metabolismo do açúcar, bem como em crómio que vai potenciar os efeitos da insulina na entrada da glucose para as células (Roger, 2002) através das proteínas transportadoras Glut 1 e Glut 7.

Tabela 6: Composição por cada 100 gramas de parte comestível crua de espinafres (adaptado de A Saúde pela Alimentação, Roger, 2002).

Energia	22,0 Kcal	Vitamina B_6	0,195 mg	Ferro	2,71 mg
Proteínas	2,86 g	Folatos	194 µg	Potássio	558 mg
Hidratos de Carbono	0,800 g	Vitamina B_{12}	-	Zinco	0,530 mg
Fibra	2,70 g	Vitamina C	28,1 mg	Sódio	79,0 mg
Vitamina A	672 µg	Vitamina E	1,89 mg	Gordura Saturada	0,056 g
Vitamina B_1	0,078 mg	Cálcio	99,0 mg	Gordura Total	0,350 g
Vitamina B_2	0,189 mg	Fósforo	49,0 mg	Colesterol	-
Niacina	1,37 mg	Magnésio	79,0 mg		

Os espinafres na sua constituição contêm minerais e oligoelementos que favorecem a produção de glóbulos vermelhos na medula óssea, também ajudam a impedir a absorção do colesterol e dos ácidos biliares, devido à sua riqueza em ácido fólico ou folato, irão ajudar na prevenção de algumas malformações nervosas no feto durante a gravidez já que tem um elevado poder anti-anémico (Roger, 2002).

Uma das advertências efectuadas na ingestão de espinafres é não os acompanhar com leite ou produtos lácteos, devido ao facto de o ácido oxálico impedir a absorção do cálcio (Roger, 2002).

O Mirtilo

Outro alimento muito popular na dieta mediterrânica, é o mirtilo, ou em latim *Vaccinium myrtillus L* (**Tabela 7**). Esta é uma fruta característica de regiões com climas temperados, tais como os Estados Unidos, a Ásia e o Centro e Norte da Europa. Cresce em estado silvestre em terrenos montanhosos e siliciosos. Na Península Ibérica, pode ser encontrado nos bosques pirenaicos e cantábricos, e nas serras portuguesas do Marão e do Gerês (Roger, 2002). Pertence à família das Ericaceae, sendo uma fonte rica em pigmentos naturais, e são de salientar as antocianinas, existentes em maior quantidade na casca do mirtilo. As características do fruto são o seu pequeno tamanho, cerca de 1 centímetro de diâmetro, com um peso aproximado de 1,5 gramas, uma cor azulada, um formato achatado. No seu cálice encontram-se coroas com lóbulos e a sua polpa tem uma cor branca, sumarenta, aromática e um sabor doce-ácido (Kluge, Hoffmann & Bilhalva, 1994). Esta fruta apresenta uma elevada quantidade de polifenóis, tanto na casca como na polpa, tendo como função a protecção das paredes celulares (Kaur & Kapoor, 2001). No seu interior existe um grande número de sementes de pequeno tamanho, também é considerado uma das frutas com maior riqueza em antioxidantes (Rocha, 2009).

Tabela 7: Composição por cada 100 gramas de parte comestível crua de mirtilo (adaptado de A Saúde pela Alimentação, Roger, 2002).

Energia	56,0 Kcal	Vitamina B_6	0,036 mg	Ferro	0,170 mg
Proteínas	0,670 g	Folatos	6,40 µg	Potássio	89,0 mg
Hidratos de Carbono	11,4 g	Vitamina B_{12}	-	Zinco	0,110 mg
Fibra	2,70 g	Vitamina C	13,0 mg	Gordura Total	0,380 g
Vitamina A	10,0 µg	Vitamina E	1,00 mg	Gordura Saturada	0,032 g
Vitamina B_1	0,048 mg	Cálcio	6,00 mg	Colesterol	-
Vitamina B_2	0,050 mg	Fósforo	10,0 mg	Sódio	6,00 mg
Niacina	0,409 mg	Magnésio	5,00 mg		

A árvore da qual é proveniente produz frutos em forma de bagas (que contêm um elevado teor em compostos fenólicos) (Esther, 2008).

A cera epicuticular confere a tonalidade azul ao mirtilo, enquanto que a cor da polpa depende das antocianinas, que se encontram no interior dos vacúolos das células

da epiderme do fruto, dissolvidas em meio aquoso ácido (Sousa, et al., 2007; Rocha, 2009).

No que respeita à composição fenólica do mirtilo esta é variável tanto ao nível qualitativo como quantitativo, este facto se deve a factores intrínsecos como o tipo ou genótipo, variedade, acidez, teor de sólidos, teor de humidade, sabor dos frutos, tamanho das bagas, número de sementes (Raseira & Antunes, 2004) e locais de cultivo, ou como aos factores extrínsecos, tais como as condições ambientais, a manipulação e o armazenamento (Wang, Chen, Sciarappa, Wang & Camp, 2008; Giovanelli & Buratti, 2009). Estas variações podem estar relacionadas com a complexidade dos compostos fenólicos e com os métodos de extracção e quantificação (Rocha, 2009).

As propriedades medicinais do mirtilo devem-se aos componentes não nutritivos, como os ácidos orgânicos, os taninos, a mirtilina e as antocianinas (a casca e a polpa mostraram conter uma combinação de cinco a seis pigmentos diferentes) que, em conjunto, conferem a acção anti-séptica e protectora vascular (Rocha, 2009).

A suplementação com extractos de mirtilo tem sido referida como útil na prevenção da doença de Alzheimer, tal como de outras desordens neurodegenerativas e na diminuição do risco de desenvolver neoplasias (Wolfe, et al., 2008), causadas pelo stress oxidativo nas células, ou inflamações (Duffy, et al., 2008; Rocha, 2009).

Foram feitos vários estudos para a verificação das propriedades de extractos de mirtilo, nos quais se avaliaram a capacidade inibitória da proliferação de células tumorais na cavidade oral, na mama, no cólon e na próstata. Sob acção dose-dependente a diferentes níveis de potência entre os tipos de células em avaliação. Constatando-se também um aumento da apoptose em culturas de células cancerígenas do cólon (Seeram, Adams, Zhang, Sand & Heber, 2006). Num outro estudo, executado por Boivin D., et al., (2007), avaliou-se os efeitos do sumo de mirtilo na morte celular e na interrupção do ciclo celular de células humanas cancerígenas do estômago, da mama, da próstata e do intestino, tendo-se obtido resultados que demonstraram uma elevada capacidade na inibição do crescimento celular. Neste estudo, realizado em porcos, constatou-se a redução dos níveis de colesterol total, do LDL e HDL. Assim seria importante relacionar esta tendência para os humanos, avaliando se o consumo de

mirtilos pode ajudar na redução de um dos maiores factores de risco existente na população Portuguesa, os acidentes cardiovasculares (Kalt, et al., 2008; Rocha, 2009).

Os mirtilos têm ainda sido referidos como alimentos ideais no combate a infecções urinárias, na melhoria da circulação venosa nas pernas (Roger, 2002) e no decréscimo da tensão arterial (Nassif, 2011 / 2012).

A Romã

A Romã deriva do latim *Punica granatum, L.*, e a árvore de onde provém tem folhas perenes da família das Punicáceas, podendo atingir uma altura até 4 metros. O fruto é formado por numerosas vesículas cheias de uma polpa muito sumarenta, de cor rosada ou avermelhada e no interior dessas vesículas encontram-se as sementes (Roger, 2002). Para o desenvolvimento da árvore Romãzeira é necessário o ambiente ser árido, sendo efectuada a sua produção nos meses de Setembro a Fevereiro (Martins, 1995). O seu sumo é rico em compostos fenólicos tais como as antocianinas (delfinidina, cianidina e pelargonidina), a quercetina, os ácidos fenólicos (cafeíco, catequínico, clorogénico, orto-cumárico, para-cumárico, elágico, gálico e quínico) e taninos (punicalagina) (Artik, Murakami & Mori, 1998; Noda, Kaneyuki, Mori & Packer, 2002; Poyrazoglu, Gokmen & Artik, 2002; Seeram, et al., 2005). Tem sido descrito que estes antioxidantes podem actuar na atenuação de factores aterogéneos (Aviran, et al., 2000; Aviran & Dornfeld; Artik, 2001), na modulação das respostas anti-inflamatórias (Ross, Selvasubramanian & Jayasundar, 2001) e nas enzimas do sistema de defesa antioxidante endógeno (através da superóxido dismutase, da catalase e da glutationa peroxidase) (Ajaikumar, Asheef, Babu & Padikkala, 2005) e em compostos flavonóides que têm actividade inibidora das enzimas oxidantes, como ciclo-oxigenases e lipo-oxigenases (Schubert, Lanski & Neeman, 1999; Jardini & Fialho, 2007).

Nas propriedades nutricionais da romã (**Tabela 8**) é de salientar as antocianinas pertencente ao grupo dos flavonóides, actuando como anti-sépticos no tubo digestivo, como poderosos antioxidantes nas células, e nos processos de envelhecimento e degeneração displásica, havendo também uma acção diurética (Roger, 2002).

Tabela 8: Composição por cada 100 gramas de parte comestível crua de romã (adaptado de A Saúde pela Alimentação, Roger, 2002).

Energia	68,0 Kcal	Vitamina B_6	0,105 mg	Ferro	0,300 mg
Proteínas	0,950 g	Folatos	6,00 µg	Potássio	259 mg
Hidratos de Carbono	16,6 g	Vitamina B_{12}	-	Zinco	0,120 mg
Fibra	0,600 g	Vitamina C	6,10 mg	Gordura Total	0,300 g
Vitamina A	-	Vitamina E	0,550 mg	Gordura Saturada	0,038 g
Vitamina B_1	0,030 mg	Cálcio	3,00 mg	Colesterol	-
Vitamina B_2	0,030 mg	Fósforo	8,00 mg	Sódio	3,00 mg
Niacina	0,300 mg	Magnésio	3,00 mg		

Devido à natureza rica em flavonóides e em vitaminas antioxidantes (C e D), as romãs estão descritas como agindo na redução dos efeitos do processo de envelhecimento arterial, podendo ser muito favorável a sua ingestão para a acção preventiva em enfartes e na alimentação em geral (Roger, 2002).

Na determinação da capacidade redutora, feita recorrendo ao ensaio com o reagente de Folin-Ciocalteau, constatou-se um elevado valor de compostos redutores no seu sumo, obtido através de processos industriais de extracção. Este valor também advém da sua casca e também do albedo, parte branca da romã onde se verifica um elevado sabor adstringente provavelmente pela sua elevada riqueza em taninos e em compostos fenólicos altamente hidróxilados, os quais não são removidos no restante processo. No entanto, esta elevada concentração de compostos redutores também pode estar relacionada com outros factores, tais como o grau de maturação, a região de cultivo, a diferença entre estirpes de fruta e a presença de algumas vitaminas como a vitamina C ou de alguns açúcares redutores (Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventós, 1999; Moure, et al., 2001; Jardini & Fialho, 2007). Assim, a romã parece ser outro alimento, pertencente à dieta mediterrânica, com elevada capacidade antioxidante e por isso com grande potencial como um alimento benéfico para a saúde.

O Vinho

O vinho tem sido uma das bebidas mais referidas como benéficas para a saúde (quando consumido em quantidade moderada) pelo seu elevado conteúdo em compostos fenólicos. São a uva e a sua pele que dão a cor avermelhada ao vinho tinto. É constituído por flavonóides e outros compostos fenólicos, sendo estes responsáveis por impedir a oxidação das lipoproteínas e o depósito de colesterol nas artérias ou arteriosclerose (Roger, 2002).

O vinho tinto define-se como bebida alcoólica obtida por fermentação do mosto completo da uva e na sua constituição o componente maioritário é a água, seguido de álcool etílico (que pode variar entre os 7 e os 17 % de volume). A produção vinícola é maioritariamente efectuada em França, em Itália, em Espanha, na Argentina, nos Estados Unidos da América, na Roménia e em Portugal, sendo de salientar que no nosso país as regiões com maior produção são no Dão, Minho, Alentejo, Bairrada e Ribatejo (Caixinhas, 1987).

Esta bebida contém ainda ácidos orgânicos (málico, tartárico, cítrico, acético e carbónico), polifenóis (taninos e corantes autociânicos), glicerina, glúcidos (glucose, frutose e pentose), substâncias nitrogenadas (aminoácidos, proteínas e aminas), sais minerais (fostatos, sulfatos, cloretos, potássio e cálcio) e substâncias voláteis (aldeídos, acetonas e ésteres) (Caixinhas, 1987).

As antocianidinas encontram-se na película (epiderme), normalmente nas primeiras 3 a 4 camadas de células da hipoderme, dando origem à coloração dos cultivares tintos jovens (Flanzy, 2000; Vaccari, Soccol & Ide, 2009).

Alguns dos efeitos benéficos da ingestão moderada do vinho são o aumento dos níveis sanguíneos de HDL, a diminuição do LDL, o aumento da elasticidade dos vasos e a diminuição da formação de coágulos (Castelli, et al., 1977; Vaccari, Soccol & Ide, 2009).

Foi demonstrado, pela existência dos compostos fenólicos e do etanol, que existe um elevado efeito do vinho na prevenção de doenças cardiovasculares (Brand-Miller, et al., 2007; Opie & Lecour, 2007) isquémicas (principalmente nos casos de enfarte do miocárdio), devido à acção que este tem na redução do teor de endotelina-1, ou seja, o péptido produzido nas células das artérias com acção vasoconstritora que ocasiona a oclusão das artérias portadoras das placas de gordura que levam ao episódio de enfarte (Corder, et al., 2001). Estes compostos também têm uma acção estabilizadora de radicais livres, quer os que se obtêm a partir do sistema aquoso por radiólise (Bors, 1990) quer pelo sistema lipofílico (peroxidação lipídica) (Vaccari, Soccol & Ide, 2009).

No caso de diabéticos tipo II, a ingestão moderada do vinho aumenta a sensibilidade das células à acção da insulina, ocorrendo uma absorção dos açúcares nas células, o que evita a sua acumulação nas vias sanguíneas. Porém, com a diminuição da insulina circulante provocada pelo consumo moderado de vinho, irão ser desencadeadas reacções metabólicas que se por um lado provocam o aumento de peso, por outro podem ajudar à redução da ingestão de medicamentos para controlo da glicemia e à diminuição da hemoglobina glicosilada (Gin, 1992). Um outro efeito da sua ingestão é a destruição dos adipócitos, por inibição de enzimas metabolizadoras da gordura como, por exemplo, a lípase pancreática, a lípase lipoprotéica e a glicerofosfato desidrogenase (Yoshikawa, Shimoda, Takada & Mtsuda, 2002;Vaccari, Soccol & Ide, 2009).

Nos idosos os polifenóis reduzem cerca de 20 % a probabilidade de desenvolverem cegueira devido à degeneração macular (Obisesan, Hirsch, Kosoko, Carlson & Parrott, 1998), pois bloqueiam a acção da colagenase e da elastase ficando a pele mais elástica, consistente, hidratada e com uma melhor microcirculação (Vaccari, Soccol & Ide, 2009).

O vinho é rico em 200 polifenóis diferentes, já que se utilizam as cascas das uvas na integra, local onde se encontram estes antioxidantes em quantidades elevadas (Scalbert & Williamson, 2000). Os polifenóis causam uma diminuição dos movimentos peristálticos do intestino delgado e do intestino grosso, ou seja, ocorre uma diminuição do trânsito intestinal e um aumento do tempo de permanência dos alimentos no tubo digestivo (Arabbi, Genovese & Lajolo, 2004; Vaccari, Soccol & Ide, 2009), que levará a um processo de inchaço e obstipação do organismo.

No caso da ingestão de vinho tinto por parte das mulheres, tem sido referido que o antioxidante resveratrol, contido nesta bebida, irá ter efeitos sobre o aumento da fertilidade (Tolstrup, et al., 2003), já que funcionalmente este é semelhante aos estrogénios, sendo por este motivo considerado um fitoestrogénio (Calabrese, 1999). Mas aparentemente não acabam aqui os efeitos benéficos desta ingestão, pois também existem estudos que afirmam que há uma redução, em cerca de 50 %, na probabilidade de desenvolvimento de cancro nos ovários (Webb, Purdi, Bain & Green, 2004). Adicionalmente também tem sido referido que alguns componentes do vinho, normalmente o álcool e a quercetina terão um efeito sobre o aumento da massa óssea e

da protecção ao desenvolvimento de osteoporose, aumentando a acção dos osteoblastos e inibindo a acção dos osteoclastos (Arabbi, Genovese & Lajolo, 2004; Ganry, Baudoin & Fardellone, 2000; Vaccari, Soccol & Ide, 2009).

O *trans*-resveratrol é um composto não-flavonóide existente no vinho tinto, mas a sua concentração é sempre muito variável (entre 1,3 e 7,0 mg/L) dependendo das tecnologias de vinificação usadas. Esta substância antioxidante localiza-se nas células da película da uva (Friedman & Klatsky, 1993; Vaccari, Soccol & Ide, 2009).

A ingestão moderada de bebidas alcoólicas às refeições pode ter uma acção bactericida, por redução da proliferação da *Helicobacter pylori*, o que ajuda na prevenção do desenvolvimento de úlceras pépticas (Tutel'ian, et al., 2003; Vaccari, Soccol & Ide, 2009).

Assim, é possível verificar que são vários os alimentos, pertencentes à dieta mediterrânica cujo o consumo poderá ser benéfico à saúde. Muito deste potencial benéfico é atribuído ao seu conteúdo em compostos com propriedades antioxidantes, sendo por isso fundamental compreender mais sobre a avaliação destes parâmetros.

A actividade dos antioxidantes depende das suas características estruturais, da sua reactividade química, das concentrações em que estão presentes, entre outras (Gulçin, 2011).

Uma das possíveis divisões para a classificação dos antioxidantes é como primários, de quebra de cadeia, (temos como exemplo os compostos fenólicos, α-tocoferol) ou como secundários, preventivos, (a sua actividade apenas se verifica na presença de um segundo componente), pelo que estes podem actuar por diversos mecanismos, dos quais se destacam a ligação a iões metálicos, a eliminação de ROS (Frankel & Meyer, 2000), a transformação de hidroperóxidos em NRLS, a absorção de radiação UV e a desactivação do O_2 (Gulçin, 2011; Apak, et al., 2013).

Os antioxidantes primários retardam ou inibem a etapa de iniciação por reacção com o radical lipídico e inibe a etapa de propagação por reacção com os radicais peróxilo ou alcóxilo (Jadhav, Nimbalkar, Kulkarni & Madhavi, 1996; Antolovich, Prenzler, Patsalides, McDonald & McDonald, 2001).

Adicionalmente, existem dois mecanismos de actuação dos antioxidantes sobre os radicais livres podendo ser por transferência de átomo de hidrogénio (HAT) e o de transferência de electrões (SET) (Wright & et al, 2001).

Roger et al. (2002) refere que para efectuar a avaliação das propriedades antioxidantes dos alimentos, é necessário determinar AA existentes em cada 100 gramas do alimento seleccionado, através de diferentes técnicas *in vitro*. Para isso, é necessário compreender as diversas técnicas existentes para proceder a esta avaliação e reconhecer os diferentes mecanismos em que estas se baseiam. Sendo também determinante reconhecer que para efectuar uma avaliação da AA mais abrangente e que considere diferentes mecanismos de acção, é fundamental considerar os resultados obtidos a partir de diferentes métodos (Gulçin, 2011).

Técnicas para a Determinação da Actividade Antioxidante

A determinação da actividade antioxidante é efectuada através da visualização da inibição de radicais livres após a adição de um antioxidante, utilizando diferentes técnicas experimentais. As principais vantagens da maioria dessas técnicas é o fácil procedimento, a existência de um mecanismo químico nítido, a reacção estudada ter um ponto final bem definido, a fácil reprodutibilidade e ser adaptável quer a substâncias com carácter hidrofílico quer de carácter lipofílico. Temos uma determinação que se define como directa, na qual o RL vai ser usado como factor de quantificação pela produção de um sinal analítico em que, quando se adiciona o antioxidante ocorre uma diminuição do sinal. A outra determinação que se considera como indirecta, tem como base a produção ou eliminação de um reactivo derivado dos RL, também devido à adição do antioxidante (Medina, 2010).

Para se proceder à determinação da AA pode recorrer-se a diferentes técnicas. Estas dividem-se em função do tipo de reacção, nomeadamente como ensaios baseados na transferência de átomos de hidrogénio (HAT) ou na transferência de electrão (SET) (Parsons, 2017). Dentro do primeiro temos incluídos os ensaios da Capacidade de absorção de radicais de oxigénio (ORAC), do Potencial reactivo antioxidante total (TRAP), de Substância reactiva do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e o ensaio de sistema β-caroteno/ácido linoleíco e no segundo temos incluídos os ensaios do método do Ácido

2,2-azinobi-(3-etilbenzotioazo-6-sulfato) (ABTS), da Capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox (TEAC), do método de 2,2-difenil-1- picrilhidrazil (DPPH), do Poder antioxidante da redução do ferro (FRAP), da capacidade antioxidante de redução do cobre (CUPRAC), Folin-Ciocalteau (FCR) e Ferricianeto. Estes mecanismos reaccionais ocorrem quase em paralelo em todos os ensaios, mas por vezes um mecanismo antioxidante predomina sobre outro, podendo esta predominância dever-se à estrutura do antioxidante, à sua acessibilidade química, à solubilidade, ao coeficiente de partição, ao solvente usado ou às suas propriedades antioxidantes. E como tal, os resultados não são comparáveis, já que os seus mecanismos de acção são diferentes (Apak, et al., 2013), devendo por isso proceder-se à execução de mais do que uma técnica de determinação AA.

Os ensaios HAT têm como base a medição da capacidade do antioxidante na eliminação de RL, tais como o peróxilo, por doação do átomo de hidrogénio. Mas nem todas estas reacções irão depender dos solventes nem do pH, dependendo apenas do seu mecanismo reaccional e a sua conclusão ocorre entre segundos a minutos (Gulçin, 2011), resumindo-se à seguinte reacção:

$$ROO^{\bullet} + AH / ArOH \rightarrow ROOH + A^{\bullet} / ArO^{\bullet},$$

em que o mecanismo de acção se baseia na transferência do átomo de hidrogénio do fenol (ArOH) para o radical ($ROO^{\bullet}$), ficando o radical ariloxilo ($ArO^{\bullet}$) estabilizado por ressonância (Apak, et al., 2013).

Nos ensaios SET existe uma acção antioxidante medida com uma sonda redox fluorescente ou colorimétrica com um agente de oxidação de potencial pré-definido (Apak, et al., 2013). Ocorrendo a detecção da capacidade antioxidante baseada na transferência de electrões na redução de metais, carbonílos e radicais e sendo esta verificada por alteração de cor, aquando da redução do oxidante (Huang, Ou & Prior, 2005; Gulçin, 2011).

Os ensaios usados para a redução dos catiões radicalares são o N,N-dimetil-p-fenilenodiamina (DMPD), o 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e a Capacidade

Antioxidante em Equivalentes de Trolox (TEAC). No que se refere aos iões de metais quelantes temos a técnica de FRAP (Apak, et al., 2013).

A quantificação da actividade antioxidante de polifenóis e flavonóides pode ser efectuada pelo método de Folin-Ciocalteau, a captura de radicais livres pelo método TEAC e a quantificação de flavonóides pelo método ORAC (Almajano, 2009).

A extracção dos compostos antioxidantes é feita usando diferentes solventes, com polaridades distintas para que seja possível a quantificação quer de compostos com carácter hidrofílico quer de carácter lipofílico. Para compostos lipofílicos utiliza-se normalmente o hexano e para compostos hidrofílicos utiliza-se muitas vezes o metanol. Em meio ácido usa-se uma mistura de metanol / água, seguido de acetona / água e em meio pouco ácido apenas difere o segundo passo já que este é substituído por água / acetonitrilo (Medina, 2010).

A espectrofotómetria tem como base a medição da absorvância de determinados compostos numa amostra. Este método serve para medir a quantidade de luz que uma substância quimica absorve por meio da medição da intensidade luminosa de um feixe de luz que passa através da solução amostra. Pode ser usado qualitativamente para confirmação da identidade de um composto, ou quantitativamente para a identificação da concentração de uma amostra, já que cada substância irá refletir e absorver a luz de forma diferente, pelo que se usa para a detecção da variação de cor das amostras nas reacções redox (Minolta, 1998; Rocha, 2009).

Deste modo, compreende-se que são várias as técnicas disponíveis e diversos os mecanismos avaliados, pelo que facilmente se percebe que é essencial avaliar diferentes mecanismos de reacção, sendo para isso necessário compreender um pouco melhor algumas das técnicas mais utilizadas na avaliação da actividade antioxidante, nomeadamente de alimentos.

Capacidade de absorção de radicais de oxigénio (ORAC)

O método ORAC baseia-se na inibição do radical peróxido oxidativo, induzido por compostos azo. Em que se avalia a combinação do tempo de reacção e o grau de inibição da acção de RL, pela quantidade de antioxidante pré-determinada numa só

dose. Esta técnica usa o composto fluorescente 3,6-dihidroxi-spiro(isobenxofuran-1-(3H),9-(9H)-xanten)-3-ona), ocorrendo a HAT do oxidante para o radical livre. A redução da fluorescência indica a extensão da oxidação com o radical peróxilo.

$ROO^{\bullet}$ + A-H (radical iniciador) → ROOH + $A^{\bullet}$ (Almajano, 2009)

$ROO^{\bullet}$ + F-H (composto fluorescente) → ROOH + $F^{\bullet}$ (Almajano, 2009)

$ROO^{\bullet}$ + A-OH (antioxidante) → ROOH + A-$O^{\bullet}$ (Almajano, 2009)

Na presença de um antioxidante este processo de diminuição da fluorescência vai ser reduzido porque a acção do radical peróxilo é diminuída ou até mesmo inibida (Almajano, 2009; Apak, et al., 2013).

A grande vantagem deste método, em relação aos restantes, é que se pode utilizar em alimentos com ingredientes complexos, ou da acção rápida ou lenta dos antioxidantes. Os radicais peróxilo reagem com a sonda fluorescente (pode ser usada por exemplo a β-ficoeritrina ou a fluoresceína), originando um composto não-fluorescente por decomposição térmica do iniciador bis azida, dicloridrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) determinado em meio tampão aquoso e por fluorescência (Gulçin, 2011). Os compostos antioxidantes vão bloquear os radicais livres, havendo uma perda de fluorescência através da doação do átomo de hidrogénio.

Esta determinação da protecção efectuada pelo antioxidante é medida com base na área sob a curva (AUC) da amostra em comparação com a AUC do branco (ausência de antioxidante), a fórmula utilizada é: X + AH → XH + $A^{\bullet}$ (Lady, 2012)

$$AUC = \left(0{,}5 + \left(\sum_{i=1}^{i=31} \frac{f_i}{f_1}\right)\right) x\ CT \qquad ORAC\ (U\ /\ \mathrm{mL}) = \left(\frac{AUC_{Amostra} - AUC_{Branco}}{AUC_{Trolox} - AUC_{Branco}}\right) x\ \frac{M_{Trolox}}{M_{Amostra}}$$

Legenda: AUC = área sob a curva

i = número de ciclos

f = valor de fluorescência

CT = tempo de cada ciclo em minutos (Almajano, 2009)

M = Concentração Molar (mol/L) (Apak, et al., 2013)

O ORAC mede a capacidade da substância antioxidante de neutralizar RL. Quanto maior for o valor obtido maior será o poder antioxidante do alimento (Lady, 2012).

Potencial reactivo antioxidante total (TRAP)

A técnica TRAP deriva da ORAC, mas nesta é empregue uma maior diversidade de iniciadores, sondas e medições do ponto final, semelhantes às usadas em ORAC e TEAC. Os radicais iniciadores são produzidos a partir de azidas como AAPH (Wayner, Burton, Ingold & Locke, 1985; Wayner D. M., Burton, Ingold & Locke, 1987; Wayner D. D., 1987), de enzimas como a peróxidase de rábano (Whitehead, Thorpe & Maxwell), o peróxido de hidrogénio-hemina (Bastos, Romoff, Eckert & Baader, 2003), o $NO^{\bullet}$ (Kojima, et al., 1999) e o $O_2^{\bullet -}$ (Tanaka, et al., 2001). As sondas usadas são de diacetato de diclorofluoresceína (Valkonen & Kuusi, 1997), de fluorescência (Tanaka, et al., 2001), de ficoeritrina (DeLange & Glazer, 1989; Ghiselli, Serafini, Maiani, Azzini & Ferro-Luzzi, 1995), de luminol (Whitehead, Thorpe & Maxwell, 1992) e ABTS (Bartosz, Janaszewska, Ertel & Bartosz, 1998; Apak, et al., 2013).

A TRAP controla a capacidade dos compostos antioxidantes que interagem na reacção do $ROO^{\bullet}$ (obtido a partir do AAPH) com a sonda fluorescente (Prior, Wu & Schaich, 2005; Wayner, Burton, Ingold & Locke, 1985; Niki, 1990). A base desta técnica é o consumo de oxigénio durante a reacção de peroxidação lipídica induzida por decomposição térmica do composto azo e a quantificação é efectuada pela duração da fase de retardamento da oxidação exercida pelos antioxidantes (Gulçin, 2011).

Substância reactiva do ácido tiobarbitúrico

O método TBARS é efectuado em duas etapas. Na primeira o substrato é oxidado com a adição dos metais de transição (iões de cobre ou ferro) ou de radicais livres (AAPH) e na segunda fase é verificado o grau de oxidação por junção de ácido tiobarbitúrico (TBA) à mistura, com posterior medição espectrofotométrica. Mas a oxidação pode ser inibida caso exista na mistura um antioxidante que irá reduzir o agente a oxidar, podendo-se verificar uma diminuição do valor lido de absorvância da amostra. Estes resultados são obtidos (Du & Bramlage, 1992) sob comparação com a curva de calibração feita com um padrão de malondialdeído bi-dimetilacetal ou malondialdeído bi-dietilacetal (compostos que derivam do MDA) ou pela percentagem de inibição da oxidação (Colbert & Decker, 1991; Antolovich, Prenzler, Patsalides, McDonald & McDonald, 2001), dependendo apenas da composição da amostra, já que

o padrão que deriva da MDA usa-se no caso dos compostos conterem interferências, pelo que este meio de comparação vai ser mais efectivo nos resultados obtidos.

Sistema Beta-Caroteno / Ácido Linoléico

No método da co-oxidação do β-caroteno / ácido linoléico ocorre a determinação do poder de inibição da oxidação por descoloração do sistema, o qual mostra uma diminuição da absorvância ao λ = 470 nm em comparação com um controlo (sem antioxidante) (Marco, 1968), seguindo a equação:

$$\%\ Inibitória = 100 - \left(\frac{A_i - A_f}{C_i - C_f}\ x\ 100\right)$$

Legenda: A_i = Absorvância da amostra inicial

A_f = Absorvância da amostra final

C_i = Absorvância do controlo inicial

C_f = Absorvância do controlo final (Rodrigues, et al., 2011)

Método de ABTS

No método ABTS o radical catiónico obtido a partir do ácido 2,2-azinobi-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) apresenta uma cor verde-azulada, tem uma elevada solubilidade em água (Arnao, Cano, Hernández-Ruiz, García-Cánovas & Acosta, 1996; Miller N. J., 1996; Antolovich, Prenzler, Patsalides, McDonald & McDonald, 2001), é estável quimicamente e o seu espectro de absorção encontra-se na zona do ultravioleta-visível. Neste método, o ponto final da reacção é efectuado pela substância antioxidante usada que causa a inibição da formação do catião radical ABTS (Rice-Evans & Miller, 1994) e é com base neste processo que se vão verificar as diferenças nos tempos de reacção, sendo um inconveniente nos processos de determinação da actividade antioxidante de frutas, verduras e bebidas estimulantes, já que nestas amostras o leque de compostos desconhecidos é elevado. Mas, apesar disso, é um método muito usado já que permite tanto ensaios com substâncias hidrossolúveis como lipossolúveis (Gulçin, 2011), optando-se depois pelo solvente mais apropriado. A produção do radical ABTS pode ser efectuada pelos seguintes processos: electroquimicamente, enzimaticamente (derivando da mioglobulina) e quimicamente

(derivando do dióxido de magnésio ou do persulfato de potássio ou de radicais peróxidos) (Medina, 2010).

Pela seguinte reacção: $ABTS^{\bullet+} + ArOH \rightarrow ABTS + ArO^{\bullet} + H^{+}$ (Apak, et al., 2013)

O $ABTS^{\bullet+}$ pode ser obtido a partir de agentes oxidantes, como o perssulfato de potássio (que tem um maior rendimento em $ABTS^{\bullet+}$ e que demonstrou uma inércia superior em relação ao radical versus antioxidante) (Re R. , et al., 1999), o dióxido de manganês (Miller, Sampson, Candeias, Rice-Evans & Bramley, 1996; Benavente-García, Castillo, Lorente, Ortuño & Del Rio, 2000), a lactase (Cantarella, Galli & Gentili, 2003), o radical bromo ($Br_2^{\bullet-}$) (Wolfenden & Willson, 1982), peroxidase de hémica + peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Arnao, Cano, Hernández-Ruiz, García-Cánovas & Acosta, 1996) (Kadnikova & Kostic, 2002) e o radical peroxilo (Campos & Lissi, 1997; Apak, et al., 2013).

Através de uma investigação constatou-se que esta técnica poderia incluir a activação da metamioglobina na forma de peroxidase sob reacção com H_2O_2 para a formação do radical ferrilmioglobina que reagirá com o ABTS, formando assim o radical catião $ABTS^{\bullet+}$ (Re R. , et al., 1999) que não é afectado pela força iónica e é solúvel tanto em solventes aquosos como orgânicos. Esta reacção é lida a 734 nm (Re, et al., 1999; Rodrigues, et al., 2011; Gulçin, 2011).

Capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox (TEAC)

O método TEAC consiste na quantificação da capacidade anti-radical dos compostos antioxidantes ou pela captação dos radicais livres. Este processo baseia-se na produção de um radical livre positivo e estável, em que se empregam radicais de catiões intensamente corados de ABTS que juntamente com o perssulfato de potássio irão originar reacção. Quando se adiciona o antioxidante em estudo, comprova-se a diminuição redox da absorvância já que o ABTS possui um grupo cromóforo com a absorção, aos 734 nm, ou seja, apenas se avalia a diminuição da inibição (Almajano, 2009).

Pela seguinte reacção: $ABTS + K_2S_2O_8 \rightarrow ABTS^{\bullet+}$ (Apak, et al., 2013)

Método de DPPH

O ensaio do DPPH (2,2-difenil-1- picrilhidrazil) é uma das técnicas mais utilizadas na avaliação da AA pela simplicidade da sua execução. O DPPH é considerado um radical estável, mas quando reage com outros radicais, compostos ou agentes redutores irá perder a sua tonalidade (Papariello & Janish, 1966; Blois, 1958). O $DPPH^{\bullet}$ reage de uma forma um pouco lenta (Barclay, Edwards & Vinqvist, 1999; Litwinienko & Ingold, 2003; Apak, et al., 2013).

Metodologia mais conhecida que usa o DPPH, consiste na avaliação da capacidade de captar o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil - $DPPH^{\bullet}$ (Gulçin, 2011), de cor roxa e com uma absorção aos 515 nm. No caso dos alimentos, esta reacção dá-se nos extractos dos alimentos (A-OH) ou de uma espécie radicalar ($R^{\bullet}$) que desactiva o $DPPH^{\bullet}$ (Kim, Lee, Lee & Lee, 2002; Rodrigues, et al., 2011) numa solução alcoólica e altera assim a cor para o amarelo pálido (Duarte-Almeida, Santos, Genovese & Lajolo, 2006; Blois, 1958; Elmastas, et al., 2006), reduzindo a sua absorção. Sendo, por este motivo, um método que utiliza a absorvância como monitorização da reacção redox. A partir dos valores obtidos determina-se a percentagem de actividade antioxidante ou de captação de RL, podendo-se também calcular a percentagem de $DPPH^{\bullet}$ remanescente do meio reaccional (Brand-Williams, Cuvelier & Berset, 1995; Sánchez-Moreno, Larrauri & Saura-Calixto, 1998; Rocha, 2009).

Pela seguinte reacção: $DPPH^{\bullet} + ArOH \rightarrow DPPH + ArO^{\bullet}\ H^{+}$ (Apak, et al., 2013)

$$\% \text{ Actividade antioxidante} = [(A_C - A_S) / A_C] \times 100$$

A_C e As são os valores da absorvância do controlo e das amostras, respectivamente.

A actividade antioxidante é determinada com base na quantidade de DPPH que é consumida pela amostra em função do tempo pré-estabelecido. À quantidade de antioxidante necessário para diminuir a concentração inicial de DPPH para 50 % dá-se o nome de concentração efectiva em que se atinge metade do efeito máximo (EC_{50}). Constatou-se que quanto maior for o consumo de DPPH por amostra, menor será o EC_{50} e maior é a actividade antioxidante (Sousa, et al., 2007; Rocha, 2009).

Como no método DPPH a reacção ocorre sob condições fortemente dependentes das características químicas inatas dos compostos a analisar, considera-se que não é o ensaio mais apropriado para rastrear a actividade antioxidante dos extractos de composição e concentração desconhecidas ou para comparação com antioxidantes de diferentes classes estruturais, já que neste tipo de ensaio se salientam mais os pequenos compostos reactivos do que as grandes moléculas antioxidantes (Apak, et al., 2013), pelo que seria difícil de definir os compostos analisados.

Poder antioxidante da redução do ferro (FRAP)

O método FRAP é uma técnica indirecta para determinação da capacidade antioxidante. Tem como base o poder de redução das substâncias antioxidantes sobre o ferro. Ocorre a redução, a pH de 3,6 (em meio ácido) (Benzie & Strain, 1996; Rodrigues, et al., 2011), de Fe^{3+} para Fe^{2+} (tem menor capacidade antioxidante) do complexo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) que é incolor para o complexo ferroso que é azul intenso (Benzie & Strain, 1996; Benzie & Strain, 1999; Gulçin, 2011). Por isso, recorre-se à medição espectrofotométrica que realça os resultados através de uma leitura superior de absorvância com $\lambda_{máx}$ = 595 nm e o seu resultado é descrito por comparação com um antioxidante padrão (composto conhecido) (Antolovich, Prenzler, Patsalides, McDonald & McDonald, 2001). Como o mecanismo utilizado na técnica de FRAP é o de transferência de electrões pode ser usado para distinguir diferentes tipos de antioxidantes, tal como ser usado em conjunto com outros métodos de determinação da capacidade antioxidante, como por exemplo o ABTS (Medina, 2010).

A reacção descrita anteriormente, baseia-se na conversão de:

$$Fe(TPTZ)_2^{3+} + ArOH \rightarrow Fe(TPTZ)_2^{2+} + ArO^{\bullet} + H^{+}$$ (Apak, et al., 2013)

Método de Folin-Denis

Na quantificação de polifenóis totais em vegetais com elevado número de antioxidantes e bebidas estimulantes, o melhor método é o de Folin-Denis já que não sofre de interferências por parte de proteínas e açúcares da sua constituição, ou seja, vão-se obter resultados mais exactos. Este método tem como base a redução do reagente

Ácido Fomolibídico-Fosfotungstico para um complexo de cor azul em solução alcalina, pelos compostos fenólicos (Rocha, 2009).

Capacidade antioxidante de redução do cobre (CUPRAC)

O ensaio CUPRAC tem como base a medição da absorvância do cromóforo CUPRAC. Dá origem ao quelato Cobre I – Neocuproine [Cu (I) – NC] de cor laranja amarelado por reacção entre o antioxidante e o reagente catião bis (neocuproína) de cobre II [Cu (II) - NC] (Apak, et al., 2013), ou seja, vai ocorrer uma redução do Cu^{2+} a Cu^{+} sob acção sinérgica do conjunto de antioxidantes polifenólicos ou por redução em meio aquoso-etanólico, a pH 7,0 e na presença da neocuproína (agente quelante e composto orgânico heterocíclico) ou 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina (Gulçin I., 2008; Lee, Rossi, Coichev & Moya, 2011). Esta reacção é seguida a 450 nm (Tutem, Apak & Baykut, 1991; Gulçin, 2011).

Pela seguinte equação: $nCu(Nc)_2^{2+} + Ar(OH)_n \rightarrow nCu(Nc)_2^{+} + Ar(=O)_n + nH^{+}$ (Apak, et al., 2013)

Esta metodologia tanto pode ser empregue em antioxidantes hidrófilos como em lipófilos (Apak, Guçlu, Ozyurek & Çelik, 2008; Gulçin, 2011).

Método de Folin-Ciocalteau

O método Folin-Ciocalteau (FCR) é muito usado para quantificar a presença de compostos fenólicos totais em produtos alimentares e tem como base uma reacção redox. Este método sofreu uma adaptação por Singleton e Rossi em 1965 de um método que se utilizava na altura, mas na determinação da tirosina (tem como base a oxidação dos fenóis com molibdênio e tungstênio reactivos). A alteração consiste no uso do heteropoliano fosfórico de molibdénio e tungsténio que oxida os fenóis com maior especificidade:

A transferência de electrões dos compostos fenólicos ocorre em meio alcalino (Singleton & Rossi, 1965; Ca, Luo, Sun & Corke, 2004; Song, et al., 2010), daí ocorre a formação de $O_2^{\bullet -}$ que ao reagir com o molibdato origina o óxido de molibdénio ou MoO^{4+} (Gulçin, 2011). Assistindo-se à passagem da cor amarela para a cor azul

(Medina, 2010) aos 765 nm. Vários autores, descrevem o método como sensível e preciso. Tal como nas outras técnicas os flavonóides são separados e quantificados por espectrofotometria ultravioleta – visível (UV) (Almajano, 2009).

Pela seguinte equação:

$$Mo\ (VI) + e^- \rightarrow Mo\ (V) \qquad \text{(Apak, et al., 2013)}$$

O método FCR, o Reagente Folin Fenol e o Reagente Folin-Denis também podem ser denominados de método de ácido gálico equivalente (GAE), já que todos vão utilizar o ácido gálico como padrão de referência na espectrofotometria (Gulçin, 2011).

Método de Ferrocianeto

Este método mede a capacidade de redução do composto bioactivo na redução directa do $Fe([CN]_6)_3$ de cor amarela a $Fe([CN]_6)_2$. A adição do $FeCl_3$ na forma ferrosa (Fe^{2+}) leva à formação do complexo $Fe_4(Fe[CN^-]_6)_3$ de cor azul arroxeada intensa com uma absorvância aos 700 nm (Bursal & Gulçin, 2011), sendo que a verificação do aumento da absorvância na amostra indica a formação do complexo (Gulçin, 2011).

Sendo este processo descrito pela seguinte equação:

$$Fe(CN)_6^{3-} + ArOH \rightarrow Fe(CN)_6^{4-} + ArO^{\bullet} + H \text{ (Apak, et al., 2013)}$$

Outros Métodos

Na quantificação do $O_2^{\bullet-}$ ocorre a redução do NBT^{2+} de coloração amarela para o formazano de coloração azul, a pH 7,4 e a leitura da absorvância será feita aos 560 nm (Aruoma, Murcia, Butler & Halliwell, 1993; Gulçin, 2011).

O $NO^{\bullet}$ é identificado e quantificado pela formação de uma coloração rosa avermelhada após adição de nitrito (NO_2^-) à amostra com reagente de Griess, sendo feita a leitura num comprimento de onda de 548 nm (Gulçin, 2011).

Também ocorre uma auto-oxidação NO ou uma acidificação NO_2 na reacção com a sulfanilamida para a obtenção do derivado diazónico, ou seja, ocorre a formação do agente de nitrosação trióxido de diazoto (N_2O_3) (Gulçin, 2011).

O método do Tiocianato mede a quantidade de peróxido na fase inicial da oxidação dos lípidos, ocorrendo uma reacção com o Fe^{2+} que leva à formação do Fe^{3+} e estes ao reagirem com o Tiocianato (SCN^{-}) formam um complexo com absorvância máxima aos 500 nm (Gulçin, 2011).

Estas são as várias técnicas para a determinação da actividade antioxidante, devendo sempre ser utilizadas mais do que uma, para a verificação e contextualização de resultados dos alimentos constituintes da dieta mediterrânica em todos os laboratórios.

Assim, com esta dissertação foi possível conhecer alguns dos principais constituintes da dieta mediterrânica, bem como conhecer algumas das suas mais referenciadas propriedades, benéficas para a saúde, nomeadamente no que diz respeito ao seu conteúdo em compostos com propriedades antioxidantes. De salientar, que para a avaliação destas propriedades é essencial fazer uso de diferentes técnicas para a determinação da AA destes alimentos. Adicionalmente, estes alimentos ao serem de fácil acesso podem ser incluídos nas refeições diárias das famílias podendo por isso o seu consumo ser bastante útil no que diz respeito à prevenção de algumas patologias.

Conclusão

Em resumo, a dieta mediterrânea consiste num baixo consumo de gordura, carnes e seus derivados, um consumo moderado de álcool, de leite e de outros produtos lácteos e num elevado consumo de legumes, cereais, frutas e vegetais, que na sua constituição vão conter os antioxidantes naturais.

Actualmente, a preocupação por parte da população em geral, em realizar uma alimentação equilibrada e em compreender as suas eventuais propriedades preventivas para a saúde, tem vindo a aumentar. As "guidelines" dietéticas para a prevenção de algumas doenças crónicas, como a doença coronária, aconselha um aumento da ingestão de alimentos de origem vegetal, já que estes são ricos em antioxidantes na sua constituição (Chang, Lin, Chang & Liu, 2006; Pinela, Barros, Carvalho & Ferreira). Assim, o interesse pela dieta mediterrânica tem vindo a aumentar e muitas das propriedades benéficas para a saúde dos alimentos pertencentes a esta dieta são referidas como consequência do seu conteúdo em compostos antioxidantes. Assim, avaliar a actividade antioxidante (AA) destes alimentos é essencial, nomeadamente através da execução de diferentes testes de avaliação da AA (Jardini & Fialho, 2007).

No que diz respeito a essa avaliação, cada ensaio avalia mecanismos distintos, potenciais redox ou até mesmo meios de reacção diferentes, difíceis de comparar. Assim, é fundamental utilizar vários métodos de avaliação da actividade antioxidante para uma avaliação mais robusta das propriedades antioxidantes desses alimentos (Hengs, Werner, Muller, Frohlich & Bohm, 2009; Apak, et al., 2013).

A avaliação da AA de alimentos funcionais, nomeadamente os da dieta mediterrânica descrita nesta dissertação, e a transmissão dessa informação aos utentes, é um bom exemplo de uma das possíveis tarefas de aconselhamento a serem desempenhadas pelo farmacêutico. Com o conhecimento das propriedades antioxidantes dos alimentos, o farmacêutico poderá agir em benefício da saúde, dando conselhos sobre os alimentos mais adequados na possível prevenção de algumas doenças actualmente prevalentes na população portuguesa, tais como a hipertensão, a depressão, a inflamação, a diabetes ou até mesmo para a saúde da população nos estados de desenvolvimento de carcinoma ou na doença de Alzheimer.

Referências Bibliográficas

Ajaikumar, K. B., Asheef, M., Babu, B. H. & Padikkala, J., (2005), The Inhibition of Gastric Mucosal Injury by Punica granatum L. (Pomegranate) Methanolic Extract., *J. Ethnopharmacol, 96*(1 - 2), 171 - 176.

Almajano, M. P., (2009), Determinación de la Actividad Antioxidante de las Bayas de Goji, *Consorci Escola Industrial de Barcelona,* Obtido de http://www.google.pt/url?url=http://www.nutricioncelular.es/articulos/descargar_articulo/57&rct=j&frm=1&q=&esrc=s&sa=U&ei=D3OyU47rNfKY0QXayoA4&ved=0CDEQFjAF&usg=AFQjCNF0-vKKYstJTBdzj7zvtaWJGK_Ypw

Ames, B. N., Shigenaga, M. K. & Hagen, T. M., (1993), Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90*, 7915 - 7922.

Spears, Chauncey, (2014), Antioxidants: Vitamin C and E, Mediterranean Diet, *National Parkinson Foundation,* Obtido de http://www.parkinson.org/Parkinson-s-Disease/Treatment/Complementary-Treatment/Antioxidants--Vitamin-C-and-E,-Mediterranean-Diet

Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S. & McDonald, R. K., (2001), Methods for Testing Antioxidant Activity, *The Analyst*, *127*, 183 – 198.

Antonopoulou, S., Fragopoulou, E., Karantonis, H. C., Mitsou, E., Sitara, M., Rementzis, J.,Phenekos, C., (2006), Effect of Traditional Greek Mediterranean Meals on Platelet Aggregation in Normal Subjects and in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus, *J Medical Food, 9*(3), 356 - 362.

Apak, R., Gorinstein, S., Bohm, V., Schaich, K. M., Ozyurek, M. & Guçlu, K., (2013), Methods of Measurement and Evaluation of Natural Antioxidant Capacity / Activity (IUPAC Technical Report), *Pure and Applied Chemistry, 85*, 957 – 998.

Arabbi, P. R., Genovese, M. I. & Lajolo, F. M., (2004), Flavonoids in Vegetable Commonly Consumed in Brazil and Estimated Ingestion by the Brazilian Population, *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*, 1124 - 1131.

Arnao, M. B., Cano, A., Hernández-Ruiz, J., García-Cánovas, F. & Acosta, M., (1996), Inhibition by L-Ascorbic Acid and Other Antioxidants of the 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic Acid) Oxidation Catalyzed by Peroxidase: A New Approach for Determining Total Antioxidant Status of Foods, *Analytical Biochemistry, 236*(2), 255 - 261.

Artik, N., Murakami, H. & Mori, T., (1998), Determination of Phenolic Compounds in Pomegranate Juice by using HPLC, *Fruit Process., Oberhonnefeld-Gierend, 12*, 492 - 499.

Aruoma, O. I., Murcia, A., Butler, J. & Halliwell, B., (1993), Evaluation of the Antioxidant and Pro-Antioxidant Actions of Gallic Acid and its Derivatives, *J. Agric. Food Chem., 41*, 1880 - 1885.

Aurelio, A., (2012), Ideal Drinks for a Mediterranean Style Diet, *Mediterranean Diet For All,* Obtido de http://www.mediterraneandietforall.com/ideal-drinks-for-a-mediterranean-style-diet/

Aviran, M. & Dornfeld, L., (2001), Pomegranate Juice Consumption Inhibits Serum Angiotensin Converting Enzyme Activity and Reduce Systolic Blood Pressure, *Atherosclerosis, 158*(1), 195 - 198.

Aviran, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkava, N., Kaplan, M., Coleman, R., Fuhrman, B., (2000), Pomegranate Juice Consumption Reduces Oxidative Stress, Atherogenic Modifications to LDL, and Platelet Aggregation: Studies in Humans and in Atherosclerotic Apolipoprotein E – Deficient Mice, *Am. J. Clin. Nutr., 71*(5), 1062 - 1076.

Barclay, L. C., Edwards, C. E. & Vinqvist, M. R., (1999), Media Effects on Antioxidant Activities of Phenols and Catechols, *Jornal of the American Chemical Society, 121*(26), 6226 - 6231.

Bartosz, G., Janaszewska, A., Ertel, D. & Bartosz, M., (1998), Simple Determination of Peroxyl Radical-Trapping Capcity, *Biochem. Mol. Biol. Int., 46*(3), 519 - 528.

Bastos, E. L., Romoff, P., Eckert, C. R. & Baader, W. J., (2003), Evaluation of Antiradical Capacity by H_2O_2-Hemin-Induced Luminol Chemiluminescence, *J. Agric. Food Chem., 51*(25), 7481 - 7488.

Beauchamp, G. K., Keast, R. S., Morel, D., Lin, J., Pika, J., Han, Q., Preslin, P. A., (2005), Ibuprofen-Like Activity in Extra-Virgin Olive Oil, *Nature, 437*, 45 - 46.

Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A. & Del Rio, J. A., (2000), Antioxidant Activity of Phenolics Extracted from Olea europaea L. Leaves, *Food Chemistry, 68*(4), 457 - 462.

Bendich, A., Machlin, L. J., Scandurra, O., Burton, G. W. & Wayner, D. M., (1986), The Antioxidant Role of Vitamin C, *Free Radical Bio Med., 2*, 419-444.

Benzie, I. F. & Strain, J. J., (1996), The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry, 239*, 70 - 76.

Benzie, I. F. & Strain, J. J., (1999), Ferric Reducing / Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activityof Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration, *Method Enzymol., 299*, 15 - 27.

Bianchi, M. P. & Antunes, L. G., (1999), Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta, *Revista de Nutrição, 12*, 123 - 130.

Blois, M. S., (1958), Antioxidant Determinations by Use of a Stable Free Radical, *Nature, 181*(4617), 1199 - 1200.

Bobbio, F. O. & Bobbio, P. A., (1995), Introdução à Química dos Alimentos. *Varela*, 232.

Bobbio, F. O. & Bobbio, P. A., (1995), Química do Processamento de Alimentos, *Varela*, 151.

Boivin, D., Blanchette, M., Barrette, S., Moghrabi, A. & Beliveau, R., (2007), Inhibition of Cancer Cell Proliferation and Suppression of TNF Induced Activation of NFkappaB by Edible Berry Juice, *Anticancer Research, 27*, 937 - 948.

Bors, W., (1990), Flavonoids as Antioxidants: Determination of Radical Scavenging Efficiencies, *Methods Enzymology, 186*, 343 - 355.

Brand-Miller, J. C., Fatemia, K., Middlemiss, C., Bare, M., Liu, V., Atkinson, F. & Petocz, P., (2007), Effect of Alcoolic Beverages on Postprandial Glycemia and Insulinemia in Lean, Young, Healthy Adults, *American Journal of Clinical Nutrition, 85*(6), 1545 - 1551.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C., (1995), Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, *Lebensm Wiss Technology, 28*, 25.

Brigelius-Flohé, R. & Traber, M. G., (1999), Vitamin E: Function and Metabolism, *FASEB J., 13*, 1145-1155.

Brown, E. D., Micozzi, M. S., Craft, N. E., Bieri, J. G., Beecher, G. G., Edwards, B. K., Smith, J. C., (1989), Plasma Carotenoids in Normal After a Single Ingestion of Vegetables or Purified β-Carotene, *Am. J. Clin. Nutr., 48*, 1258 - 1265.

Bursal, E. & Gulçin, I., (2011), Polyphenol Contents and in vitro Antioxidant Activities of Lyophilised Aqueous Extract of Kiwi Fruit (Actinidia deliciosa), *Food Res. Int., 44*, 1482 - 1489.

Burton, G. W. & Ingold, K. U., (1981), Autoxidation of Biological Molecules: Antioxidant Activity of Vitamin E and Related Chain-Breaking Phenolic Antioxidants in vitro, *J. Am. Chem. Soc., 103*, 6472-6477.

Buthler, D. R. & Miranda, C., (2000), Antioxidant Activities of Flavonoids, Obtido de http://supplemen.blogspot.com/2008/04/antioxidant-activities-of-flavonoids.html

Ca, Y. Z., Luo, Q., Sun, M. & Corke, H., (2004), Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of 112 Traditional Chinese Medicinal Plants Associated with Anticancer, *Life Sci., 74*, 2157 - 2184.

Caixinhas, L., (1987), *Lexicoteca Moderna Enciclopédia Universal,* (1629 ed., Vol. Vários Volumes), (Círculo de Leitores), Lisboa.

Calabrese, G., (1999), Nonalcoholic Compounds of Wine: The Phytoestrogen Resveratrol and Moderate Red Wine Consumption During Menopause, *Drugs Experimental Clinical Research, 25*, 111 - 114.

Campos, A. M. & Lissi, E. A., (1997), Kinetics of the Reactions Between 2,2´-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Derived Radical Cations and Phenols, *International Journal of Chemical Kinetics, 29*(3), 219 - 224.

Cantarella, G., Galli, C. & Gentili, P., (2003), Free Radical versus Electron-Transfer Routes of Oxidation of Hydrocarbons by Laccase / Mediator Systems: Catalytic or Stoichiometric Procedures, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,, 22*(3 - 4), 135 - 144.

Carluccio, M. A., Siculella, L., Ancora, M. A., Massaro, M., Scoditti, E., Storelli, C., De Caterina, R., (2003), Olive Oil and Red Wine Antioxidant Polyphenols Inhibit Endothelial Activation: Antiatherogenic Properties of the Mediterranean Diet Phytochemicals, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 23*, 622 - 629.

Castelli, W. P., Doyle, J. T., Gordon, T., Hames, C. G., Hjortland, M. C., Hulley, S. B., Zukel, W. J., (1977), Alcohol and Blood Lipids. The Cooperative Lipoprotein Phenotyping Study, *Lancet, 2*, 153 - 155.

Castenmiller, J. M., West, C. E., Linssen, J. H., Van Het Hof, K. H. & Voragen, A. J., (1999), The Food Matrix of Spinach is a Limiting Factor in Determining the Bio-Availability of β-Carotene and to a Lesser Extent of Lutein in Humans, *J. Nutr., 129*, 349 - 355.

Chan, M. M., (2002), Antimicrobial Effect of Resveratrol on Dermatophytes and Bacterial Pathogens of the Skin, *Biochemistry Pharmacology, 63*, 99 - 104.

Chang, C. H., Lin, H. Y., Chang, C. Y. & Liu, Y. C., (2006), Comparisons on the Antioxidant Properties of Fresh, Freeze-Dried and Hot-Air-Dried Tomatoes, *Journal Food Eng., 77*, 478 - 485.

Çoban, T. A., Beydemir, S., Gulçin, I. & Ekinci, D., (2007), Morphine Inhibits Erythrocyte Carbonic Anhydrase in vitro and in vivo, *Biol. Pharm. Bull., 30*, 2257 - 2261.

Colbert, L. B. & Decker, E. A., (1991), Antioxidant Activity of an Utrafiltration Permeate from Acid Whey, *Journal of Food Science, 56*(5), 1248 - 1250.

Cooper-Driver, G. A., (2001), Cojtributions of Jeffrey Harborne and Co-Workers to the Study of Anthocyanins, *Phytochemistry, 56*, 29 - 236.

Corder, R., Douthwaite, J. A., Lees, D. M., Khan, N. Q., Viseu dos Santos, A., Wood, E. G. & Carrier, M. J, (2001), Health: Endothelin-1 Synthesis Reduced by Red Wine, *Nature, 414*, 863 - 864.

Cristoni, A., Di Pierro, F. & Bombardelli, E., (2000), Botanical Derivatives for the Prostate, *Fitoterapia, 71*, 21 - 28.

Culpitt, S. V., Rogers, D. F., Fenwick, P. S., Shah, P., De Matos, C., Russell, R. E., Donnelly, L. E., (2003), Inhibition by Red Wine Extract, Resveratrol, of Cytokine Release by Alveolar Macrophages in COPD, *Trorax, 58*(11), 942 - 946.

De Groot, H., & Rauen, U. (1998). Tissue Injury by Reactive Oxygen Species and the Protective Effects of Flavonoids. *Fundamental Clinical Pharmacology, 12*, 249 - 255.

De la Puerta, R., Ruiz, G. V. & Hoult, J. R., (1999), Inhibition of Leukocyte 5-Lipooxigenase by Phenolics from Virgin Olive Oil, *Biochem. Pharmacol., 157*, 445 - 449.

De Pee, S., West, C. E., Muhilal, D. D.& Hautvast, J. A., (1995), Lack of Improvement in Vitamin A Status With Increased Consumption of Dark Green Leafy Vegetables, *Lancet, 346*, 75 - 81.

Degáspari, C. H. & Waszczynskyj, N., (2004), Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos, *Visão Académica, 5*(1), 33 - 40.

DeLange, R. J. & Glazer, A. N., (1989), Phycoerythrin Fluorescence – Based Assay for Peroxy Radicals: A screen for Biologically Relevant Protective Agents, *Analytical Biochemistry, 177*(2), 300 - 306.

Delgado-Vargas, F. & Paredes-López, O., (2003), Anthocyanins and Betalains, *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses, New York: CRC Press.*

Du, Z. & Bramlage, W. J., (1992), Modified Thiobarbituric Acid Assay for Measuring Lipid Oxidation in Sugar-Rich Plant Tissue Extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40*(9), 1566 - 1570.

Duarte-Almeida, J. M., Santos, R. J., Genovese, M. & Lajolo, F. M., (2006), Avaliação da Actividade Antioxidante Utilizando Sistema β–Caroteno / Ácido Linoléico e

Método de Sequestro de Radicais DPPH•, *Ciência e Tecnologia de Alimentos, 26*, 446 - 452.

Duffy, K. B., Spangler, E. L., Devan, B. D., Guo, Z., Bowker, J. L., Hagepanos, A. M., Mouton, P. R., (2008), A Blueberry-Enriched Diet Provides Cellular Protection Against Oxidative Stress and Reduces a Kainate-Induced Learning Impairment in Rats, *Neurobiology of Aging, 29*, 1680 - 1689.

Duh, P. D., (1998), Antioxidant Activity of Burdock (Arctium lappa Linne): Its Scavenging Effect on Free Radical and Active Oxygen, *J. Am. Oil Chem., 75*, 455 - 465.

Dutta, D., Chaudhuri, U. R., & Chakraborty, R., (2005), Structure, Health Benefits, Antioxidant Property and Processing and Storage of Carotenoids, *African Journal of Biotechnology, 4 (13)*, 1510-1520.

Eberhardt, M. V., Lee, C. Y. & Liu, R. H., (2000), Antioxidant Activity of Fresh Apples, *Nature, 405*, 903 - 904.

Elmastas, M., Turkekul, I., Ozturk, L., Gulçin, I., Isildak, O. & Aboul-Enein, H. Y., (2006), The Antioxidant Activity of Two wild Edible Mushrooms (Morchella vulgaris and Morchella esculanta), *Comb. Chem. High T. Scr., 9*, 443 - 448.

Esther, (2008), Alimentación Anti-Radicales Libres, *Viviendo Sanos*, Obtido de http://viviendosanos.com/alimentacion-anti-radicales-libres/

Fitó, M., Cladellas, M., De la Torre, R., Martí, J., Alcántara, M., Pujadas-Bastardes, M., Solos Investigators, (2005), Antioxidant Effect of Virgin Olive Oil in Patients With Stable Coronary Heart Disease: A Randomised, Crossover, Controlled, Clinical Trial, *Atherosclerosis, 181*, 149 - 158.

Fitó, M., Covas, M. I., Lamuela-Raventós, R. M., Vilà, J., De la Torre & Marrugat, J., (2000), Protective Effect of Olive Oil and Its Phenolic Compounds Against Low Density Lipoprotein Oxidation, *Lipids, 35*, 633 - 638.

Fitó, M., Torre, R. D., Farré-Albaladejo, M., Khymenetz, O., Covas, M.-I. & Marrugat, J., (2007), Bioavailability and Antioxidant Effect of Olive Oil Phenolic Compounds in Humans: A Review, *Ann Ist Super Sanità, Vol. 43, No. 4: 375-381; 2, 43*(4), 375 - 381.

Flanzy, C., (2000), Fundementos Científicos y Tecnológicos, *Mundi-Prensa*, 784.

Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G. & Ritieni A., (1999), Method for Measuring Antioxidant Activity and its Application to Monitoring the Antioxidant Capacity of Wines, *J. Agric. Food Chem., 47*, 1035 - 1040.

Frankel, E. N. & Meyer, A. S., (2000), The Problems of Using One-Dimensional Methods to Evaluate Multifunctional Food and Biological Antioxidants, *Journal of the Science Food and Agriculture, 80*(13), 1925-1941.

Friedman, G. D. & Klatsky, A. L., (1993), Is Alcohol Good for your Health?, *New England Journal Medicine, 329*, 1882 - 1883.

Ganry, O., Baudoin, C. & Fardellone, P., (2000), Effect of Alcohol Intake on Bone Mineral Density in Elderly Women: The EPIDOS Study, *American Journal Epidemiology, 15*, 773 - 780.

Garewal, H. S., Ampel, N. M., Watson, R. R., Prabhala, R. H. & Dols, C. L., (1992), A Preliminary Trial of β-Carotene in Subjects Infected with the Human Immunodeficiency Virus, *J. Nutr., 122*, 728-732.

Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E. & Ferro-Luzzi, A., (1995), A Fluorescence – Based Method for Measuring Total Plasma Antioxidant Capability, *Free Radical Biol. Med., 18*(1), 29 - 36.

Gin, H., (1992), Short-Term Effect of Red Wine on Insulin Requirement and Glucose Glucose Tolerance in Diabetic Patients, *Diabetes Care, 15*, 546 - 548.

Giovanelli, G. & Buratti, S., (2009), Comparison of Polyphenolic Composition and Antioxidant Activity of Wild Italian Blueberries and Some Cultivated Varieties, *Food Chesmistry, 112*, 903 - 908.

Gorinstein, S., Jastrzebski, Z., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Namiesnik, J., Najman, K., Bae, J. H., (2009), Comparative Control of the Bioactivity of some Frequently Consumed Vegetables Subjected to Different Processing Conditions, *Food Control, 20*(4), 407 - 413.

Gulçin, I., (2008), Measurement of Antioxidant Ability of Melatonin and Serotonin by the DMPD and CUPRAC Methods as Trolox Equivalent, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 23*, 871 - 876.

Gulçin, I., (2011), Antioxidant Activity of Food Constituints: An Overview, *Archives of Toxicology - Springer - Verlag., 86 (3)*, 345 – 391.

Gulçin, I., Bursal, E., Sehitoglu, H. M., Bilsel, M. & Goren, A. C., (2010), Polyphenol Contents and Antioxidant Activity of Lyophilized Aqueous Extract of Propolis from Erzurum, Turkey, *Food Chem. Toxicol., 48*, 2227 - 2238.

Gulçin, I., Elias, R., Gepdiremen, A., & Boyer, L., (2006), Antioxidant Activity of Lignans from Fringe Tree (Chionanthus virginicus L.), *Eur. Food Res. Technol., 223*, 759 - 767.

Halliwel, B. & Gutteridge, J. C., (1999), Free Radicals in Biology and Medicine, *Clarendon Press*(3ª).

Harborne, J. B., Cody, V. & Middleton, E. J., (1986), Nature, Distribution and Function of Plant Flavonoids, *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationship, 213*, 15 - 24.

Harri, L., Sartori, S., Bacher, L. & Lacerda, M., (2006), Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas (de Consumo in natura), *Instituto Platarum de Estudos da Flora*.

Hart, D. J. & Scott, K. J., (1995), Development and Evaluation of an HPLC Method for the Analysis of Carotenoids in Foods, and the Measurement of the Carotenoid Content of Vegetables and Fruits Commonly Consumed in the UK, *Food Chem., 54*, 101 - 111.

Hashim, Y. H.-Y., Gill, C. R., McGlynn, H. & Rowland, I. R., (2005), Components of olive oil and chemoprevention of colorectal cancer, *Nutrition Reviews, 63*(11), 374 - 386.

Hengs, C., Werner, S., Muller, L., Frohlich, K. & Bohm, V., (2009), Determination of the Antioxidant Capacity: Influence of the Sample Concentration on the Measured Values, *Eur. Food Res. Technol., 230*, 249 - 254.

Hertog, M. L., Feskens, E. M., Hollman, P. H., Katan, M. B. & Kromhout, D., (1993), Dietary Antioxidant Flavonoids and Risk of Coronary Heart Disease: The Zupthen Elderly Study, *Lancet, 342*; 1007-1014.

Holley, A. E. & Cheeseman, K. H., (1993), Measuring Free Radical Reactions in vivo, *Br. Med. Bull., 49*(3), 494 - 505.

Huang, D., Ou, B. & Prior, R. L., (2005), The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays, *J. Agric. Food Chem., 53*, 1841 - 1856.

Hunt, C., (2008), Trace Elements in Human Diets, Nutrition, and Health: Essentiality and Toxicity, *Cell Biology Toxicology, 24*(4 - 5).

Innocenti, A., Ozuturk, S. B., Gulçin, I. & Supuran, C. T., (2010), Carbonic Anhydrase Inhibitors. Inhibition of Mammalian Isoforms I-XIV with a Series of Natural Product Polyphenols and Phenolic Acids, *Bioorg. Med. Chem., 18*, 2159 - 2164.

Jadhav, S. J., Nimbalkar, S. S., Kulkarni, A. D. & Madhavi, D. L., (1996), Lipid Oxidation in Biological and Food Systems, *Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives*, 5 - 64.

Jardini, F. A., & Fialho, J. M., (2007), Antioxidant Activity Evaluation of Different Polarities Extract by pulp and Seeds of Pomegranate (Punica granatum L.), *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 43*(1)

Jastrzebski, Z., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Namiesnik, J., Zachwieja, Z., Barton, H., Gorinstein, S., (2007), The Bioactivity of Processed Garlic (Allium sativum L.) as Shown in vitro and in vivo Studies on Rats, *Food Chem. Toxicol., 45*(9), 1626 - 1633.

Jatunov, S., Quesada, S., Diaz, C. & Murillo, E., (2010), Carotenoid Composition and Antioxidant Activity of the Raw and Boile Fruit Mesocarp of Six Varieties of Bactris gasipaes, *Archivos Latinoamericanos de Nutricion, 60*.

Kadnikova, E. N. & Kostic, N. M., (2002), Oxidation of ABTS by Hydrogen Peroxide Catalyzed by Horseradish Peroxidase Encapsulated Into Sol-Gel Glass.: Effects of Glass Matrix on Reactivity, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 18*(1 - 3), 39 - 48.

Kalt, W., Foote, K., Fillmore, S. E., Lyon, M., Lunen, T. V. & McRae, K. B., (2008), Effect of Blueberry Feeding on Plasma Lipids in Pigs, *British Journal of Nutrition, 100*, 70 - 78.

Kanner, J., German, J. B. & Kinsella, J. E., (1987), Initiation of Lipid Peroxidation in Biological Systems, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 25*(4), 317 - 364.

Kaur, C. & Kapoor, H. C., (2001), Antioxidants in Fruits and Vegetables - The Millennium's Health, *International Journal of Food Science and Technology, 36*, 703 - 725.

Kim, D.-O., Lee, K. W., Lee, H. J. & Lee, C. Y., (2002), Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals, *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*, 3713 - 3717.

Kinsella, J. E., Frankel, E., German, B. & Kanner, J., (1993), Possible Mechanisms for the Protective Role of Antioxidants in Wine and Plant Foods, *Food Technology, 47*, 85 - 89.

Kluge, R. A., Hoffmann, A. & Bilhalva, A. B., (1994), Comportamento de Frutos de Mirtilo (Vaccinium ashei Reade) CV. Powder Blue em Armazenamento Refrigerado, *Ciência Ruaral, 24*, 281 - 285.

Kojima, H., Urano, Y., Kikuchi, K., Higuchi, T., Hirata, Y. & Nagano, T., (1999), Fluoresvent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production, *Angewandte Chemie., 38*(21), 3209 - 3212.

Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F. & Brouillard, F., (2003), Analysis and Biological Activities of Anthocyanins, *Phytochemistry, 64*, 923 - 933.

Krishnadev, N., Meleth, A. D. & Chew, E. Y., (2010), Nutritional Supplements for Age - Related Macular Degeneration, *Curr. Opin. Ophthalmol, 21*, 184-189.

Lady, M. G., (2012), Qué es una Antioxidante? Qué es un Radical Libre? Alimentos Ricos en Antioxidante, Obtido de http://mygreenladylatino.blogspot.pt/2012/01/protege-laintegridad-de-tus-celulas-con.html

Lee, G., Rossi, M. R., Coichev, N. & Moya, H. D., (2011), The Reduction of Cu (II) / Neocuproine Complexes by Some Polyphenols: Total Polyphenols Determination in Wine Samples, *Food Chem., 126*, 679 - 686.

Lima, V. A., Mélo, E. A. & Lima, D. S., (2002), Fenólicos e Carotenóides Totais em Pitanga, *Scientia Agrícola, 59*, 447 - 450.

Litwinienko, G. & Ingold, K. U., (2003), Abnormal Solvent Effects on Hydrogen Atom Abstractions. 1. The Reactions of Phenols with 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH•) in Alcohols, *The Journal of Organic Chemistry, 68*(9), 3433 - 3438.

Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S. & Lima, J. L., (2008), Methodological Aspects about in vitro evaluation of Antioxidant properties, *Analytica Chimica Acta, 613*, 1 - 19.

Malacrida, C. R. & Motta, S., (2006), Antocianinas em Suco de Uva: Composição e Estabilidade, *Boletim CEPPA, 24*(1), 59 - 82.

Mamede, M. E. & Pastore, G. M., (2004), Compostos Fenólicos do Vinho: Estrutura e Acção Antioxidante, *Boletim CEPPA, 22*, 233 - 252.

Manhita, A. C., Teixeira, D. M. & Costa, C. T., (2006), Application of Sample Disruption Methods in the Extraction of Anthocyanins from Solid or Semi-Solid Vegetables Samples, *Journal of Chromatography A, 1129*, 14 - 20.

Marco, G. J., (1968), A Rapid Method for Evaluation of Antioxidants, *Journal of the American Oil Chemists Society, 45*, 594 - 598.

Martínez-González, M. A. & Sánchez-Villegas, A., (2004), The Emerging Role of Mediterranean Diets in Cardiovascular Epidemiology: Monounsaturated Fats, Olive Oil, Red Wine or the Whole Pattern?, *Eur J Epidemiol., 19*(1), 9 - 13.

Martins, E., (1995), Plantas Medicinais, 162 - 163.

Masella, R., Vari, R., D' Archivio, M., Di Benedetto , R., Matarrese, P., Malorni, W., Giovannini, C., (2004), Extra Virgin Olive Oil Biophenols Inhibit Cell-Mediated Oxidation of LDL by Increasing the mRNA Transcription of Glutathione- Related Enzymes, *J. Nutr., 134*(4), 785 - 791.

Masquelier, J., (1992), Plante Medicínale – Naissance d'une Thérapeutique, *Bulletin de L'OIV, 65*(733 - 734), 177 - 196.

Mazza, (2000), Aspectos Bioquímicos y de Procesados, *Alimentos Funcionales*.

McDonald, S., Prenzler, P. D., Antolovich, M. & Robards, K., (2001), Phenolic Content and Antioxidant Activity of Olive Extract, *Food Chemistry, 73*(1), 73 - 84.

Medina, L. A., (2010), Técnicas para la Determinación de Compuestos Antioxidante en Alimentos, *Autodidacta - Revista de la Educación en Extremadura*. Obtido de http://www.anpebadajoz.es/autodidacta/autodidacta_archivos_9_archivos/l_a_medina.pdf

Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M. & Heredia, F. J., (2004), Importancia Nutricional de los Pigmentos Carotenoides, *Arch. Latinoamer Nutr., 54*, 149 - 155.

Micozzi, M. S., Brown, E. D., Edwards, B. K., Bieri, J. G., Taylor, P. R., Khachik, F., Smith, J. C., (1992), Plasma Carotenoids Response to Chronic Intake of Selected Foods and β-Carotene Supplements in Men, *Am. J. Clin. Nutr., 55*, 1120-1125.

Milic, B. L., Djilas, S. M. & Canadanovic-Brunet, J. M., (1998), Antioxidative Activity of Phenolic Compounds on the Metal-Ion Breakdown of Lipid Peroxidation System, *Food Chemistry, 61*(4), 443 - 447.

Miller, N. J., (1996), The Ferrylmyoglobin-ABTS•+ Assay for Measuring Total Antioxidant Activity, *Natural Antioxidants and Food Quality in Atherosclerosis and Cancer Prevention*, 69 - 72.

Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Rice-Evans, C. A. & Bramley, P. M., (1996), Antioxidant Activities of Carotenes and Xanthophylls, *Febs Letters, 384*(3), 240 - 242.

Minolta, (1998), Precise Color Communication: Color Control from Perception to Instrumentation, *Minolta Co. Lda*, 58.

Montedoro G. & Cantarelli, C., (1969), Indagini Sulle Sostanze Fenoliche Presenti Negli Oil D'Oliva, *Riv. Ital. Sost. Grasse, 46*, 115 - 124.

Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., Parajó, J. C., (2001), Natural Antioxidants from Residual Sources, *Food Chemistry, 72*(2), 145 - 171.

Nassif, D. D., (2011 / 2012), Atividade Antioxidante e Compostos Fenólicos em Refrigerante de Cola e Guaraná. *UFRGS*, Obtido de http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/56090/000857786.pdf?sequence=1

Niki, E., (1990), Free Radical Initiators as Source of Water- or Lipid- Soluble Peroxyl Radicals, *Methods Enzymol., 186*, 100 - 108.

Noda, Y., Kaneyuki, T., Mori , A. & Packer, L., (2002), Antioxidant Activities of Pomegranate Fruit Extract and Its Anthocyanidins: Delphinidin, Cyaniding and Pelargonidin, *J. Agric. Food Chem., 50*(1), 166 - 171.

Obisesan, T. O., Hirsch , R., Kosoko, O., Carlson, L. & Parrott, M., (1998), Moderate Wine Consumption is Associated With Decreased Odds of Developing Age-Related Macular Degeneration in NHANES-1, *Journal of The American Geriatrics Society, 46*(1), 1 - 7.

Opie, L. H. & Lecour, S., (2007), The Red Wine Hypothesis: From Concepts to Protective Signaling Molecules, *European Heart Journal, 28*, 1683 - 1693.

Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Spigelhalder, B. & Bartsch, H., (2000), The Antioxidant / Anticancer Potential of Phenolic Compounds From Olive Oil, *Eur. J. Cancer, 36*, 1235 - 1247.

Owen, R. W., Mier, W., Giacosa, A., Hule, W. E., Spiegelhalder , B. & Bartsch, H., (2000), Phenolic Compounds and Squalene in Olive Oils: The Concentration and Antioxidant Potential of Total Phenols, Simple Phenols, Secoroids, Lignans and Squalene, *Food Chem. Toxicol., 38*, 647 - 659.

Ozturk, S. B., Gulçin, I. & Supuran, C. T., (2010), Carbonic Anhydrase Inhibitors of Human Erythrocyte Isozymes I and II with a Series of Phenolic Acids, *Chem. Biol. Drug Design, 75*, 515 - 520.

Ozturk, S. B., Topal, F., Senturk, M., Gulçin, I. & Supuran, C. T., (2011), In vitro Inhibition of α-carbonic Anhydrase Isozymes by some phenolic Compounds, *Bioorg. Med. Chem. Lett., 21*, 4259 - 4262.

Pacheco, D. E., Alvarado, A., Salas, R. & Trujillo, A., (1999), Composición Química y Digestibilidad decla Proteína de Veinte Ecotipos de Pijiguao (Bactris gasipaes) del amazonas de Venezuela, *Arch. Latinoamer Nutr., 49*, 384 - 387.

Paganga, G., Miller, N. & Rice-Evans, C. A., (1999), The Polyphenolic Content of Fruits and Vegetables and Their Antioxidant Activities. What does a Serving Constitute?, *Free Radical Res., 30*, 153 - 162.

Papariello, G. J. & Janish, M. M., (1966), Diphenylpicrylhydrazyl as an Organic Analytical Regent in the Spectrophotometric Analysis of Phenols, *Analytical Chemistry, 38*(2), 211 - 214.

Parsons, B. J., (2017), Antioxidants in Food: The Significance of Characterisation, Identification, Chemical and Biological Assays in Determining the Role of Antioxidants in Food, *Foods, 68*(6), 1 - 4.

Petroni, A., Blasevich, M., Salami, M., Papini, N., Montedoro, G. F. & Galli, C., (1995), Inhibition of Platelet Aggregation and Eicosanoid Production by Phenolic Components of Olive Oil, *Thromb. Res., 78*, 151 - 160.

Pietta, P. G., (2000), Flavonoids as Antioxidants, *Journal of Natural Products, 63*, 1035-1042.

Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A. & Ferreira, I. F. (s.d.), Nutritional Composition and Antioxidant Activity of four Tomato (Lycopersicon esculentum L.) Farmer' Varieties in Northeastern Portugal Homegardens, Obtido de https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/7343/3/Pinela_Tomato_FCT%20%20Revised.pdf

Poyrazoglu, E., Gokmen, V. & Artik, N., (2002), Organic Acids and Phenolic Compounds in Pomegranates (Punica granatum L.) Grown in Turkey, *J. Food Comp. Anal., 15*(5), 567 - 575.

Prior, R. L., Wu, X. L. & Schaich, K., (2005), Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *J. Agric. Food Chem., 53*, 4290-4302.

Rao, C. V., Newmark, H. L. & Reddy , B. S., (1998), Chemopreventive Effect of Squalene on Colon Cancer, *Carcinogenesis, 19*, 287 - 290.

Raseira, M. B. & Antunes, L. E., (2004), A Cultura do Mirtilo (Vaccinium sp.), *Pelotas: Embrapa Clima Temperado*, 67.

Riccioni, G., (2009), Carotenoids and Cardiovacular Disease, *Curr. Atheroscler. Rep., 11*, 434-439.

Rice-Evans, C. & Miller, N.J., (1994), Total Antioxidant Status in Plasma and Body Fluids, *Methods Enzymology, 234*, 279 - 293.

Rocha, F. G., (2009), Avaliação da Cor e da Actividade Antioxidante da Polpa e Extracto de Mirtilo (Vaccinium myrtillus) em pó, *Universidade Federal de Viçosa*, Obtido de Rocha Fernanda Izabel Garcia da; Avaliação da Cor e da Atividade antioxidante da Polpa e Extrato de http://alexandria.cpd.ufv.br:8000/teses/ciencia%20e%20tecnologia%20de%20alimentos/2009/226130f.pdf

Rodrigues, E., Poerner, N., Rockenbach, I. I., Gonzaga, L. V., Mendes, C. R. & Fett, R., (2011), Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Blueberry Cultivars Grown in Brazil, *Food Science and Technology (Campinas) - Ciênc. Tecnol. Aliment., 31*(4), 911-917.

Rodríguez, A. B., Kimura, M., Godoy, H. T. & Amaya, F. J., (2008), Updated Brazilian Database on Food Carotenoids: Factors Affecting Carotenoid Composition, *J. Food Comp. Anal., 21*, 445 - 463.

Rodriguez, V. C., Pérez-Heras, A., Mercadé, I., Casals, E. & Ros, E., (2004), Comparison of a High-Carbohydrate and a High-Monounsaturated Fat, Olive Oil-Rich Diet on the Susceptibility of LDL to Oxidative Modification in Subjects With Type 2 Diabetes Mellitus, *Diabet Med., 21*(2), 142 - 149.

Roger, J. P., (2002), *Enciclopédia de Educação e Saúde - A Saúde pela Alimentação*, Granada: Atlântido, S. A.

Roginsky, V. & Lissi, E. A., (2005), Review of methods to determine chain breaking antioxidant activity in food, *Food Chem, 92*, 235 - 254.

Roman, B., Carta, L., Martínez-González , M. Á. & Serra-Majem, L., (2008), Effectiveness of the Mediterranean Diet in the Elderly, *Clinical Interventions in Aging, 3*, 97 - 109.

Ross, R. G., Selvasubramanian, S. & Jayasundar, S., (2001), Imunomodulatory Activity of Punica granatum in Rabbits – a Prelimiary Study, *J. Ethnopharmacol, 78*(1), 85 - 87.

Ruiz, D., Egea, J., Tomás-Barberán, F. A. & Gil, M. I., (2005), Carotenoids from New Apricot (Prumus armeniaca L.) Varieties and Their Relationship With Flesh and Skin Color, *J. Agr. Food Chem., 53*, 6368 - 6374.

Salvini, S., Sera, F., Caruso, D., Giovanelli, L., Visioli, F., Saieva, C., Palli, D., (2006), Daily Consumption of a High-Phenol Extra-Virgin Olive Oil Reduces Oxidative DNA Damage in Postmenopausal Women, *Br. J. Nutr., 95*, 742 - 751.

Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. & Saura-Calixto, F., (1998), A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols, *Journal Science Food Agricultural, 76*, 270.

Scalbert, A. & Williamson, G., (2000), Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols, *Journal of Nutrition, 130*, 2073 - 2085.

Schubert, S. Y., Lanski, E. P. & Neeman, I., (1999), Antioxidant and Eicosanoid Enzyme Inhibition Properties of Pomegranate Seed Oil and Ferment Juice Flavonoids, *J. Ethnopharmacol, 66*(1), 11 - 17.

Seeram, N. P., Adams, L. S., Henning, S. M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M. G. & Heber, D., (2005), In vitro Antiproliferative, Apoptotic and Antioxidant Activities of Punicalagin, Ellagic Acid and a Total Pomegranate Tannin Extract are Enhanced in Combination With Other Polyphenols as Found in Pomegranate Juice, *J. Nutr. Biochem., 16*(6), 360 - 367.

Seeram, N. P., Adams, L. S., Zhang, Y., Sand, D. & Heber, D., (2006), Blackberry, Black Raspberry, Blueberry, Cranberry, Red Raspberry and Strawberry Extracts Inhibit Growth and Stimulate Apoptosis of Human Cancer Cells in vitro, *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54*, 9329 - 9339.

Senturk, M., Gulçin, I., Beydemir, S., Kufrevioglu, O. I. & Supuran, C. T., (2011), In vitro Inhibition of Human Carbonic Anhydrase I and II Isozymes with Natural Phenolic Compounds, *Chem. Biol. Drug Des., 77*, 494 - 499.

Sharma, M. K. & Buettner, G. R., (1993), Interaction of Vitamin C and Vitamin E During Free Radical Stress in Plasma: An ESR Study, *Free Radical Biology Medicine, 14*(6), 649 - 653.

Sies, H., (1993), Strategies of Antioxidant Defense, *Journal of Biochemistry, 215*, 213 - 219.

Sies, H. & Shatl, W., (1995), Vitamins E and C, β-Carotene, and other Carotenoids as Antioxidants, *American Journal of Clinical Nutrition, 62*, 1315-1321.

Singleton, V. L. & Rossi, J. A., (1965), Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic – Phosphotungstic Acid Reagents, *Am. J. Enol. Vitic., 16*, 144 - 158.

Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R. M., (1999), Analysis of Total Phenols and other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciacateau Reagent, *Methods Enzymol., 29*, 152 - 178.

Soares, S. E., (2002), Ácidos Fenólicos como Antioxidantes, *Revista de Nutrição, 15*, 71 - 81.

Sofi, F., Cesari, F., Abbate, R., Gensini, G. F. & Casini, A., (2008), Adherence to Mediterranean Diet and Health Status: Meta-Analysis, *The bmj, 337*, 673-675.

Song, F. L., Gan, R. Y., Zhang, Y., Xiao, Q., Kuang, L. & Li, H. B., (2010), Total Phenolic Contents and Antioxidant Capacitie of Selected Chinese Medicinal Plants, *Int. J. Mol. Sci., 11*, 2362 - 2372.

Soto, A., Rodríguez, J. A. & Castañeda-Ovando, A., (2008), Determinación de la Capacidad Antioxidantede Vinos mediante Análisis de Inyección en Flujo con Detección Amperométrica, *Asociación Mexicana de Química Analítica*, doi:ISBN 978-968-9400-01-1.

Sousa, C. M., Silva, H. R., Vieira, J. G., Ayres, M. C., Costa, C. S., Araújo, D. S., Chaves, M. H., (2007), Fenóis Totais e Actividade antioxidante de Cinco Plantas Medicinais, *Química Nova, 30*(2), 351 - 355.

Tanaka, K., Miura, T., Umezawa, N., Urano, Y., Kikuchi, K., Higuchi, T. & Nagano, T., (2001), Rational Design of Fluorescein – Based Fluorescence Probes. Mechanism –

Based Design of a Maximum Fluorescence Probe for Singlet Oxygen, *J. Am. Chem. Soc.*, *21*(123), 2530 - 2536.

Tanizawa, H., Ohkawa, Y., Takino, Y., Ueno, A., Kageyama, T. & Hara, S., (1992), Studies on Natural Antioxidants in Citrus Species: Determination of Antioxidant Activities of Citrus Fruits, *Chem. Pharm. Bull., 40*, 1940-1942.

Tapiero, H., Townsend, D. M. & Tew, K. D., (2004), The Role of Carotenoids in the Prevention of Human Pathologies, *Biomed. Pharmacother, 58*, 100 - 110.

Tolstrup, J. S., Kjaer, S. K., Holst, C., Sharif, H., Munk, C., Osler, M., Gronbaek, M., (2003), Alcohol Use as Predictor for Infertility in a Representative Population of Danish Women, *Acta Obstetric Gynecology Scand, 82*(8), 744 - 749.

Torronen, R., Lehmusaho, M., Hakkinen, S., Hanninen, O. & Mykkanen, (1996), Serum β-Carotene Response to Supplementation With Raw Carrots, Carrot Juice of Purified β-Carotene in Healthy Non-Smoking Women, *Nutr. Res., 16*, 565 - 575.

Trichopoulou, A., Lagiou, P., Kuper, H. & Trichopoulos, D., (2000), Cancer and Mediterranean Dietary Traditions, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev., 9*(9), 869 - 873.

Tutel'ian, V. A., Vasil'ev, A. V., Kochetkov, A. M., Pogozheva, A. V., Lysikova, S. L., Akol'zina, S. E. & Vorob'eva, L. S., (2003), Clinical Use of Flavonoid Enriched Biologically Active Food Supplements in Patients With Chronic Atrophic Gastritis in Combination With Chronic Cholecystitis or Bile Ducts Dyskinesia, *Vopr Pitan., 72*(1), 30 - 33.

Tutem, E., Apak, R. & Baykut, F., (1991), Spectrophotometric Determination of Trace Amounts of Copper (I) and Reducing Agents with Neocuproine in the Presence of Copper (II), *Analyst, 116*, 89 - 94.

Vaccari, N. D., Soccol, M. H. & Ide, G. M., (2009), Compostos Fenólicos em Vinhos e seus Efeitos Antioxidantes na Prevenção de Doenças, *Revista de Ciências Agroveterinárias, 8*(1), 71 - 83. doi:1676 – 9732.

Valkonen, M. & Kuusi, T., (1997), Spectrophotometric Assay for Total Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Potential in Human Serum, *J. Lipid Res., 38*(4), 823 - 833.

Van Het Hof, K. H., Tijburg, L. M., Pietrzik, K. & Weststrate, J. A., (1999), Bioavailability of Carotenoids and Folate from Dfferent Vegetables. Effects of Disruption of the Vegetable Matrix, *Br. J. Nutr., 82*, 203 - 212.

Vasilopoulou, E. & Trichopoulou, A., (2009), The Micronutrient Content of Tradicional Greek Foods, *Mediterr J Nutr Metab, 2*, 97 - 102.

Wang, S. Y., Chen, C. T., Sciarappa, W., Wang, C. Y. & Camp, M. J., (2008), Fruit Quality, Antioxidant Capacity and Flavonoid Content of Organically and Conventionally Grown Blueberries, *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56*, 5788 - 5794.

Wayner , D. D., (1987), Radical-Trapping Antioxidants in vitro and in vivo, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 18*(1 - 3), 219 - 229.

Wayner, D. M., Burton, G. W., Ingold, K. L. & Locke, S. J., (1987), The Relative Contributions of Vitamin E, Urate, Ascorbate and Proteins to the Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Activity of Human Blood Plasma, *Biochim. Biophys. Acta, 924*, 408 - 419.

Wayner, D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U. & Locke, S., (1985), Quantitative Measurement of the Total, Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Capability of Human Blood Plasma by Controlled Peroxidation. The Important Contribution Made by Plasma Proteins, *Febs Letters, 187*(1), 33 - 37.

Webb, P. M., Purdi, D. M., Bain, C. J. & Green, A. C., (2004), Alcohol, Wine, and Risk of Epithelial Ovarian Cancer, *Cancer Epidemiology Biomarkers Preview, 13*(4), 592 - 599.

West, K. P., Howard, G. R. & Sommer, A., (1989), Vitamin A and Infection: Public Health Implication, *Annual Reviews of Nutrition, 9*, 63 - 86.

Whitehead, T. P., Thorpe, G. G. & Maxwell, S. J., (1992), Enhanced Chemiluminescent Assay for Antioxidant Capacity in Biological Fluids, *Analytica Chimica Acta, 266*(2), 265 - 277.

Wolfe, K. L., Kang, X., He, X., Dong, M., Zhang, Q. & Liu, R. H., (2008), Cellular Antioxidant Activity of Common Fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56*, 8418 - 8426.

Wolfenden, B. S. & Willson, R. L., (1982), Radical – Cations as Reference Chromogens in Kinetic Studies of Ono-Electron Transfer Reactions: Pulse Radiolysis Studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), *Journal of the Chemical Society*(7), 805 - 812.

Wright, J. S. & et al., (2001), Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants, *Journal of American st Society, 123*, 1173 - 1183.

Yoshikawa, M., Shimoda, H., Takada, M. & Mtsuda, H., (2002), Salacia Reticulata and Its Polyphenolic Constituents With Lipase Inhibitory and Lipolytic Activities have Mild Antiobesity Effects in Rats, *Journal of Nutrition, 132*(7), 1819 - 1824.