



UNIVERSIDADE DOS AÇORES
Departamento de Ciências Agrárias

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTI-OXIDANTE DE VEGETAIS
EM PRODUÇÃO AQUAPÓNICA**

Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar

Hugo Miguel Valadão Rico

Orientadora: Professora Doutora Célia Silva

Co-orientador: Professor Doutor Paulo Monjardino

ANGRA DO HEROÍSMO

2015

Agradecimentos

Agradeço a todos que de modo direto ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação, com um especial agradecimento:

À minha orientadora Doutora Célia Silva pela orientação, disponibilidade e apoio prestado ao longo deste trabalho.

Ao Doutor Paulo Monjardinho pelo apoio e orientação na realização deste trabalho.

Aos meus pais e ao meu irmão, pelo apoio e incentivo demonstrado ao longo deste mestrado.

Ao meu empregador, Laboratório de Análises Clínicas Dr. Adelino Noronha, pelo apoio e disponibilidade necessária despendida para a realização deste trabalho e aos meus colegas de Trabalho pelo companheirismo e incentivo.

Lista de abreviaturas

$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxilo
$^1\text{O}_2^*$	Oxigénio singlete
$^3\text{S}^*$	Sensibilizador excitado tripleto
5-HMdU	5-Hidroximetil-2'-Desoxyuridine
8-epiPGF _{2α}	Prostaglandin F2-Alfa-8 isoprostane
8-OHdG	8-Hidroxy-2'-Deoxyguanosine
AA	Atividade antioxidante
Ac	Absorvância do controlo
ADP	Adenosina difosfato
AG	Ácido gálico
As	Absorvância da amostra
ATP	Adenosina trifosfato
BHT	Hidroxitolueno butilado
CAT	Catalase
DNA	Desoxyribonucleic acid
DPPH	1,1 -difeníl-2-picrilhidrazil
DPPH-H	2,2-difenilpicril-hidrazina
DSB	Double strand break
EC	Electrical conductivity
EDDHA	Ethylenediamine-N,N'-bis(2-hydroxyphenylacetic acid
FADH ₂	Dinucleótido de flavina e adenina
GAE/mg	Equivalentes de ácido gálico por miligrama
GPH-Px	Glutathione peroxidase
GPH-R	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
GSNO	S-nitrosoglutathione
GS-SG	glutathione disulfide
L \cdot	Radical lipídico
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LDL-ox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LH	Lípidos membranares
LOH	Álcoois
LOO \cdot	Radical peróxilo
LOOH	Lípido hidroperóxido
MDA	Malondialdeído
mS	millisiemens
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
NFT	Nutrient film technique
NO \cdot	Radical óxido nítrico
NRE	Nitrogen reactive species
O ₂ $^{\cdot-}$	Anião superóxido
OH \cdot	Radical hidróxido
R	Não radical
R \cdot	Radical

RD	Rácio de degradação
RFC	Reagente de Folin-Ciocalteu
RO [•]	Radical alcoxila
ROO [•]	Radical alquilperoxila
ROS	Reactive oxygen species
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SOD	Superóxido dismutase
SSB	Single strand break
STD	Sólidos totais dissolvidos
t	Tempo
TBARS	Thiobarbituric reactive acid substances
UV	Radiações ultra violeta
UV-A	Radiações ultravioleta A
UV-B	Radiações ultravioleta B
Vit. C [•]	Radical de vitamina C,
Vit. E [•]	Radical de vitamina E
Vit.C	Vitamina C
Vit.E	Vitamina E

Resumo

O oxigénio molecular (O_2) obtido na atmosfera é vital para a maioria dos sistemas biológicos, contudo a sua utilização leva ao aparecimento intercelular de espécies reativas, denominadas de espécies reativas de oxigénio (ou “reactive oxygen species” ROS). Estas ameaçam a integridade celular por meio da oxidação das biomoléculas, podendo comprometer processos biológicos importantes. As ROS incluem os radicais livres e outros compostos químicos que embora não possuam eletrões desemparelhados, são muito instáveis e por sua vez muito reativos. A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e a sua remoção pelas defesas antioxidantes celulares é um processo essencial para o funcionamento normal do organismo. Vários estudos têm demonstrado que uma dieta rica em antioxidantes favorece uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que ocorrem naturalmente no organismo. Doenças como o cancro, aterosclerose, diabetes, artrite, malária e doenças cardiovasculares podem estar ligadas às lesões causadas pelas ROS. Os vegetais são uma fonte rica de antioxidantes naturais, contudo a sua disponibilidade é amplamente influenciada por fatores genéticos, condições ambientais, nutricionais, grau de maturação, cultivar e tipo de cultivo. Os vegetais da família Brassicaceae são uma fonte abundante de substâncias promotoras da saúde que reduzem o risco de doenças, pois possuem antioxidantes hidrófilos (ácido ascórbico, polifenóis) e hidrofóbicos (carotenóides, vitamina E) que podem neutralizar as ROS e reduzir os radicais livres.

No presente trabalho pretendeu-se estudar efeito de diferentes sistemas de cultivo de repolhos no seu conteúdo em antioxidantes. Foram medidos o conteúdo em polifenóis, bem como as atividades antioxidantes dos extratos obtidos de repolho (*Brassica oleracea* cultivar Gloria Enkhuizen), produzidos em três sistemas diferentes de cultivo: sistema aquapónico, hidroponia e cultivo convencional (em terra). A capacidade antioxidante foi avaliada *in vitro*, em extratos de vegetais frescos e cozidos, através da medição da quantidade de polifenóis totais pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, da capacidade

de redução do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH); e da utilização do método de branqueamento do β -caroteno. Os extratos avaliados demonstraram uma elevada capacidade antioxidante, porém com variação na intensidade do efeito dependendo do tipo de cultivo e processamento aplicado. O tipo de cultivo afetou significativamente ($P < 0,001$) o peso, o conteúdo em polifenóis e a atividade antioxidante nos repolhos. O sistema convencional produziu espécimes mais pesados ($P < 0,001$) em comparação com os outros sistemas de cultivo. Contudo, o conteúdo em polifenóis foi mais elevado ($P < 0,05$) nos repolhos cultivados em hidroponia, embora não se tenha refletido numa maior atividade antioxidante destes vegetais em relação aos outros modos de cultivo. Observou-se uma pequena redução da atividade antioxidante total nos repolhos cultivados pelo método convencional ($P < 0,05$) e uma pequena diminuição na capacidade de sequestro de radicais livres ($P < 0,05$) nos repolhos produzidos em hidroponia. Embora reduzindo a quantidade de polifenóis para cerca de metade, o cozimento dos repolhos em água não afetou significativamente ($P > 0,05$) a atividade antioxidante destes vegetais. Observou-se ainda uma correlação positiva significativa ($P < 0,05$; $R = 0,633$) entre o conteúdo em polifenóis totais e a atividade antioxidante nos extratos dos vegetais cozidos, ao contrário dos vegetais crus, onde não houve qualquer correlação ($P > 0,05$).

Apesar de se só ter estudado o potencial antioxidante de um cultivar de repolho, os resultados apresentados parecem favorecer os efeitos benéficos associados ao seu consumo, destacando-se as plantas provenientes de cultivo aquapónico. Apesar de apresentarem resultados semelhantes aos do cultivo convencional, as plantas provenientes de cultivo aquapónico aparentam ser as mais saudáveis, não só pelos resultados aqui demonstrados, mas também por não apresentarem resíduos de pesticidas, nem utilizarem fertilizantes artificiais, como aqueles geralmente utilizados nos vegetais provenientes de agriculturas convencional e hidropónicas.

Palavras-chave: *Brassica oleracea*, antioxidantes, radicais livres, polifenóis, aquaponia, hidroponia

Abstract

The molecular oxygen (O₂) obtained in the atmosphere is vital for most biological systems, but its use leads to the formation of intercellular reactive species, called reactive oxygen species (ROS). These ROS threaten cellular integrity through the oxidation of biomolecules that can compromise important biological processes. ROS includes free radicals and other chemical compounds that even if they have not any unpaired electrons, are very unstable and reactive. Maintaining the balance between the production of free radicals and their removal by cellular antioxidant defenses is an essential process for normal body function. Several studies have shown that a diet of antioxidant-rich food promotes an effective protection against oxidative stress that occurs naturally in the body. Diseases such as cancer, atherosclerosis, diabetes, arthritis, malaria and heart disease may be linked to injuries caused by ROS. Vegetables are a rich source of natural antioxidants, but their availability is largely influenced by several causes such as genetic factors, environmental conditions, the degree of maturity, plant cultivar and crop variety . Brassicaceae family vegetables are a rich source of health-promoting substances that reduce the risk of disease. It has both hydrophilic antioxidants (ascorbic acid, polyphenols) and hydrophobic (carotenoids, vitamin E) which can neutralize ROS and reduce free radicals.

In the present study, we intended to evaluate the effect of different production systems of cabbage on their antioxidant content. The polyphenol content and the antioxidant capacity from cabbage (*Brassica oleracea* cultivar Gloria Enkhuizen) extracts produced in aquaponic system, hydroponics and in the conventional culture were measured. The antioxidant activity was evaluated *in vitro* by chemical methods, in boiled and fresh plant extracts by measuring the amount of polyphenol, by the colorimetric method of Folin-Ciocalteu, the capacity of reducing the free radical 1,1-difenil-2-picrylhydrazyl (DPPH), and the total antioxidant activity by using the bleaching method of β -carotene. The extracts demonstrated a high antioxidant activity but with variations in the intensity of the effect depending on the type of cultivation and processing applied. The cultivation type significantly ($P < 0.001$) affected the weight, the polyphenol content and the

antioxidant activity of cabbages. The conventional culture produced heavier cabbages ($P < 0.001$) than all the other cultivation systems. However, the polyphenol content was higher ($P < 0.05$) in cabbages produced with hydroponics although no differences were found in antioxidant activity compared to other production systems. A small reduction of antioxidant activity was observed in the cabbage produced by the conventional method ($p < 0.05$) and a small decrease in the capacity to capture free radicals was also observed in the cabbage produced by hydroponics ($p < 0.05$). While reducing the amount of polyphenols to about half, the cooking of the cabbages in water did not significantly affect ($P > 0.05$) the antioxidant activity of these vegetables. There was also a significant positive correlation ($P < 0,05$; $R = 0,633$) between the polyphenol content and the antioxidant activity of cooked vegetables. In opposition, no correlation was observed ($P > 0.05$) between polyphenol content and the antioxidant activity of raw cabbage.

Although we only have studied the antioxidant potential of a cultivar of cabbage, the results seem to favor the beneficial effects associated with its consumption, especially those from aquaponic cultivation. Despite showing similar results to the conventional cultivation, aquaponic culture appear to produce the healthiest cabbages, not only demonstrated by the present results, but also for not having residues of pesticides nor artificial fertilizers, such as those commonly used in vegetables from conventional and hydroponic cultures.

Keywords: Brassica oleracea, antioxidants, free radicals, aquaponic, hydroponic

Índice

1. Introdução	10
2. Revisão Bibliográfica	12
2.1 Espécies Reativas de Oxigénio (ROS)	14
2.2 Stresse oxidativo	17
2.2.1 Peroxidação dos lípidos da membrana celular:	19
2.2.2 Oxidação de proteínas	20
2.2.3 Oxidação do DNA	20
2.3 Mecanismos de defesa contra as ROS	21
2.3.1 Defesas enzimáticas	22
2.3.2 Antioxidantes intracelulares	23
2.4 Compostos naturais como fonte de antioxidantes:	25
2.4.1 Vegetais como fonte de antioxidantes.	27
2.5 Contributo dos antioxidantes vegetais para a saúde humana.	28
2.6 Efeito da Radiação Ultravioleta nos antioxidantes vegetais	29
2.7 Efeito dos fertilizantes nos antioxidantes vegetais.	30
2.8 Diferentes tipos de cultivo de vegetais	31
2.9 Hidroponia	32
2.10 A Aquaponia	33
2.10.1 Ciclo do Azoto	38
2.10.2 Fonte de nutrientes da aquaponia	39
2.11 Determinação da capacidade antioxidante dos vegetais	41
2.11.1 Conteúdo total de polifenóis método Folin-Ciocalteu	42
2.11.2 Capacidade antioxidante do radical DPPH'	43
2.11.3 Capacidade antioxidante total	43
3. Objetivos	44
3.1 Objetivos específicos	44
4. Materiais e Métodos	45
4.1 Sistemas de Cultivo	45
4.1.1 Convencional	45
4.1.2 Hidroponia em agregado sólido com solução nutritiva de Hoagland	46
4.1.3 Aquaponia	48
4.2 Material vegetal	51
4.2.1 Preparação dos Extratos Alcoólicos:	51
4.2.1.1 Repolhos em cru	51
4.2.1.2 Repolhos Cozidos	52

4.3 Determinação total de polifenóis	53
4.4 Determinação da atividade Antioxidante Total.....	54
4.5 Teste de sequestro de radicais pelo DPPH	55
4.6 Análise estatística	55
5. Resultados e Discussão	56
5.1 Medições da qualidade da água dos Sistemas aquapónicos.....	56
5.1.1 Amónia	56
5.1.3 Sólidos Totais Dissolvidos	58
5.2 Repolhos.....	59
5.3 Polifenóis totais	63
5.4 Atividade Antioxidante total	65
5.5 Sequestro de radicais livres pelo DPPH.....	69
6. Conclusão.....	73
7. Anexos:.....	74

1. Introdução

Os consumidores atuais estão cada vez mais conscientes sobre os potenciais benefícios dos alimentos na saúde, incluindo questões como a segurança alimentar e o efeito no ambiente. É cada vez mais importante que os principais sistemas de produção alimentar adotem tecnologias e hábitos saudáveis que otimizem o uso de recursos naturais, tornando-os cada vez mais autossustentáveis, que reduzam a dependência dos recursos não renováveis e a redução na utilização de fertilizantes químicos e pesticidas nas culturas. Com a utilização de adubos químicos e pesticidas é possível obter um elevado rendimento e controle das colheitas agrícolas, de modo a satisfazer quantitativamente as crescentes necessidades do homem, mas por outro lado, a qualidade nutricional desses alimentos e a sua segurança tornaram-se duvidosas. Por isso os consumidores procuram cada vez mais produtos provenientes de produções naturais e biológicas. Segundo a Associação Portuguesa de Agricultura Biológica, a agricultura biológica representa apenas cerca de 6,5% da superfície agrícola útil do país, registando a adesão de dois mil agricultores e cerca de 20 milhões de euros de comercialização de produtos, sendo um sector em crescimento.

Diariamente somos expostos a uma grande oferta do mercado e ao apelo para o consumo de alimentos ou suplementos alimentares como fonte de antioxidantes. Os antioxidantes captam os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque destes sobre os lípidos, proteínas e as bases do DNA, evitando assim o aparecimento de lesões e perda da integridade celular. Vários estudos têm demonstrado que uma dieta rica em antioxidantes favorece uma ação protetora contra certas doenças como o cancro, aterosclerose, diabetes, artrite, malária, SIDA, doenças do coração e envelhecimento celular ^[1,2].

Um exemplo de vegetais ricos em antioxidantes são os vegetais da família Brassicaceae, como por exemplo o repolho (*Brassica oleracea*), que é um dos vegetais mais cultivados e importantes a nível mundial. Nesta família também se incluem os brócolos, couve-flor, as couves de folhas, nabo e rabanete. A presença de antioxidantes nos vegetais é influenciada por fatores genéticos,

condições ambientais, cultivar da planta, composição do solo, tipo de cultivo, as pragas, entre outros aspetos [3,4].

A aquaponia é um método de produção vegetal, não muito divulgado e utilizado, mas que existe já há muitos anos, e que combina a produção vegetal em hidroponia com a criação de peixes em aquacultura. Este é um método de produção que tem apresentado um enorme potencial produtivo vegetal e aquícola por todo o mundo, combinando o melhor das duas ciências [5,6].

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo testar a qualidade nutricional de repolhos, avaliada pela atividade anti-oxidante e presença de antioxidantes, comparando diferentes métodos de cultivo, como a aquaponia, a hidroponia e o método convencional.

A estrutura global desta dissertação divide-se em quatro partes. Na primeira parte é feita uma revisão bibliográfica e enquadramento do estudo. A segunda parte é constituída pelos materiais e métodos, onde são descritas as metodologias aplicadas ao longo do trabalho experimental. Na terceira parte são apresentados os resultados, fazendo-se uma análise e discussão para cada um dos parâmetros e resultados obtidos. Na quarta e última parte são apresentadas as conclusões gerais do trabalho e sugestões para futuros estudos.