

Ana Sofia Tavares Pedro

ESTUDO DE COMPOSTOS COM PROPRIEDADES
FUNCIONAIS EM FLOR DE CARDO SUBMETIDA A
DIFERENTES TRATAMENTOS DE SECAGEM

Dissertação

Mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar



Junho, 2013

Ana Sofia Tavares Pedro

ESTUDO DE COMPOSTOS COM PROPRIEDADES
FUNCIONAIS EM FLOR DE CARDO SUBMETIDA A
DIFERENTES TRATAMENTOS DE SECAGEM

Dissertação

Mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar

Trabalho efetuado sob orientação de
Prof. Doutora Raquel Guiné

Trabalho co-orientado por
Prof. Doutor Fernando Gonçalves (ESAV)
Mestre Paulo Barracosa (ESAV)

Junho, 2013



As doutrinas expressas neste trabalho são
da exclusiva responsabilidade do autor.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho de investigação resulta do esforço de um conjunto de pessoas, que pelos mais diversos motivos se viram envolvidos direta ou indiretamente no projeto.

Assim, quero agradecer à Professora Doutora Raquel Guiné, bem como aos co-orientadores, Professor Doutor Fernando Gonçalves e Professor Mestre Paulo Barracosa, pela motivação, ensinamentos e permanente disponibilidade mostrada, ao longo de todo este processo. Com as suas observações críticas e conselhos foi possível desenvolver o presente trabalho.

Não posso deixar de agradecer à ANCOSE (Associação Nacional de Criadores de Ovinos da Serra da Estrela) por ter-se disponibilizado para fornecer flor de cardo, pois sem esta preciosa ajuda não teria conseguido as amostras para analisar.

Quero também deixar o meu agradecimento ao técnico do laboratório Engenheiro Rui Coutinho, pela disponibilidade que teve para comigo durante a execução do procedimento experimental.

Por fim agradeço ao enorme contributo prestado pela minha família e amigos que sempre me apoiaram e acompanharam ao longo desta etapa.

RESUMO

O cardo é uma planta que encontra-se associada ao fabrico de queijo, pois é responsável pelo fenómeno da coagulação do leite. No entanto, têm aumentado o número de estudos realizados nesta planta, relacionados com a composição química, de forma a perceber os benefícios para a saúde.

O objetivo desta dissertação foi caracterizar a flor de cardo relativamente à sua atividade antioxidante, composição em compostos fenólicos e avaliar a sua estabilidade ao longo do trato digestivo. Para tal, foram estudadas amostras de flor de cardo da espécie *C. cardunculus spp flavescens*, após liofilização e secagem em estufa com convecção forçada a diferentes temperaturas (40°C, 50°C e 60°C). Após cada tratamento, efetuaram-se duas extrações sucessivas com soluções de metanol (98% v/v) e de acetona (60% v/v). Os extratos obtidos foram depois utilizados para quantificar os teores em compostos fenólicos totais, em orto-difenois e em flavonóides. A atividade antioxidante foi determinada utilizando os métodos DPPH e ABTS. Por fim, procedeu-se à avaliação da bioacessibilidade dos compostos presentes submetendo os vários extratos a condições simulantes do trato digestivo.

Pela análise dos resultados obtidos foi possível constatar que a quantidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante na flor de cardo varia consoante a temperatura de secagem, ocorrendo a diminuição à medida que se aumenta a temperatura.

Os resultados obtidos para a bioacessibilidade mostraram um comportamento distinto dos extratos de metanol e de acetona. No entanto, em ambos os casos ocorreu uma diminuição na quantidade de compostos disponíveis para absorção intestinal.

Palavras-chave: Flor de cardo, secagem, compostos fenólicos, atividade antioxidante, bioacessibilidade.

ABSTRACT

The thistle is a plant usually associated to the making of cheese, because it's responsible for the phenomenon of the coagulation of milk. However, the number of studies of the quimical composition on this plant has risen, to understand the health benefits.

The objective of this thesis is to characterize the thistle flower in relation to its antioxidant activity, the composition of phenolic compounds and evaluate its stability along the digestive tract. To this end, samples of thistle flower species *C. Cardunculus spp flavescens* were studied, after freeze-drying and oven drying with forced convection at various temperatures (40°C, 50°C and 60°C). After each treatment two successive extractions with solutions of methanol (98% v/v) and acetone (60% v/v) were carried out. The extracts obtained were then used to quantify the levels of total phenolic compounds in ortodifenois and flavonoids. The antioxidant activity was determined using the DPPH and ABTS methods. Finally I proceeded to the evaluation of the bioaccessibility of the compounds present, subjecting the various extracts to stimulants conditions of the digestive tract.

Through the analysis of the results it was found that the amount of phenolic compounds and antioxidant activity on thistle flower varies depending on the drying temperature, leading to the degradation as the temperature is raised.

The results for bioaccessibility showed a distinct behavior of methanol and acetone extracts. However, in both cases there was a decrease in the amounts of compounds available for intestinal absorption.

Key-words: Thistle flower, drying, phenolic compounds, antioxidant activity, bioaccessibility.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	I
Resumo.....	II
Abstract	III
Índice Geral	IV
Índice de Figuras	VI
Índice de tabelas	VIII
1. Introdução.....	1
2.Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Definição do Cardo	4
2.2. Funcionalidades da flor do cardo	6
2.2.1.Propriedades coagulantes do cardo.....	7
2.3. Tratamentos Térmicos	9
2.3.1. Tratamentos de Secagem.....	9
2.3.2. Tratamentos de secagem utilizando a liofilização	10
2.4.Queijo	12
2.4.1.Queijo Serra da Estrela	12
2.5. Compostos Fenólicos	14
2.5.1. Compostos não flavonóides	15
2.5.2. Compostos Flavonóides	19
2.6. Atividade antioxidante.....	23
2.7. Bioacessibilidade.....	25
3. Objetivos	27

4. Parte Prática.....	29
4.1. Metodologia experimental	30
4.1.1. Amostras.....	30
4.1.2. Processamento	30
4.1.3. Extração dos compostos fenólicos.....	31
4.1.4. Determinação dos compostos Fenólicos	31
4.1.4.3. Determinação do teor em Flavonóides	32
4.1.5. Determinação da atividade antioxidante	33
4.1.6. Simulação in vitro das condições do trato digestivo	34
5. Apresentação e discussão dos resultados	36
5.1. Otimização do processo de extração	37
5.2. Composição Fenólica	38
5.3. Composição em Flavonóides	40
5.4. Composição em orto-difenóis	42
5.5. Atividade antioxidante.....	44
5.5.1. ABTS.....	44
5.5.2. DPPH.....	46
5.6. Avaliação da Bioacessibilidade	48
5.6.1. Composição Fenólica.....	48
6. Conclusões.....	50
7. BIBLIOGRAFIA	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Cardo - <i>Cynara Cardunculus</i> L.....	1
Figura 2: <i>Cynara Cardunculus</i> L. localizando as diferentes estruturas.	4
Figura 3: Mapa dos concelhos produtores de queijo "Serra da Estrela"	12
Figura 4: Queijo "Serra da Estrela".	13
Figura 5: Classificação geral dos compostos fenólicos.....	14
Figura 6: Estrutura química dos ácidos benzóicos.....	15
Figura 7: Estrutura química dos ácidos cinâmicos.....	16
Figura 8: Estrutura química das cumarinas e ácido cumárico.	17
Figura 9: Estrutura básica dos estilbenos.....	18
Figura 10: Estrutura química básica dos flavonóides.....	20
Figura 11: Estrutura química de alguns flavonóides de ocorrência em plantas ..	20
Figura 12: Estrutura da antocianinas monoglucosiladas (G-glucose).....	21
Figura 13: Processo de extração.....	31
Figura 14: Concentração dos compostos fenólicos nas diferentes amostras de cardo.....	38
Figura 15: Concentração de flavonóides em cada extrato das diferentes amostras de cardo.	40
Figura 16: Concentração de orto-difenóis em cada solvente, relativa a cada amostra.	42
Figura 17: Atividade antioxidante das diferentes amostras de cardo, utilizando o método ABTS.....	44
Figura 18: Atividade antioxidante das diferentes amostras de cardo, utilizando o método DPPH.....	46

Figura 19: Composição fenólica nos extratos de metanol ao longo do trato digestivo.....	48
Figura 20: Composição fenólica nos extratos de acetona ao longo do trato digestivo.....	49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Estrutura química dos ácidos benzoicos.....	16
Tabela 2: Estrutura química dos ácidos cinâmicos.	17
Tabela 3: Diferentes compostos de estilbenos de acordo com o grupo de substituição.....	18
Tabela 4: Percentagem de compostos presentes em cada extração.....	37

1. INTRODUÇÃO



Introdução

De acordo com a classificação científica o cardo pertence à família das Asteraceae, tendo uma variedade de géneros, incluindo *Cirsium*, *Cynara* *Silybum*.

De acordo com Wiklund (1992), o género *Cynara* L. é constituído por oito espécies: *C. cardunculus* L., *C. syriaca* Boiss., *C. auranitica* Post, *C. cornigera* Lindley, *C. algarbiensis* Cosson, *C. baetica* (Spreng.) Pau, *C. cyrenaica* Maire et Weiller, e *C. humilis* L.. A espécie *C. tournefortii* Boiss. et Reuter foi posicionada num novo género tendo sido reincluída em *Cynara* por Robba *et al.*, (2005).

O cardo da espécie *cynara cardunculus* L. (Figura 1) pode atingir mais de um metro de altura, possui folhas peninérveas com espinhos e recortes a ultrapassar metade da distância entre a margem e a nervura central, o involúcro do capítulo globuloso ou elíptico apresenta espinhos mais ou menos desenvolvidos e corola lilacínea.



Figura 1: Cardo - *Cynara Cardunculus* L.

O período de germinação inicia-se em Setembro, no mês de julho dá-se a maturação dos aquénios, sendo que as flores apenas são produzidas por plantas com mais de dois anos de idade (Lee, 2002).

O habitat desta planta localiza-se em sítios rochosos, sobretudo em terrenos barrentos, podendo ser encontrada quer na forma selvagem quer em terrenos de cultivo.

O género *Cynara* L. é utilizado para tratamentos medicinais, pois é uma fonte rica em compostos fenólicos, o que lhe confere atividade antioxidante, assumindo importância no tratamento de doenças hepáticas, diabetes, redução do colesterol e glicemia, problemas digestivos, urinários, reumáticos, distúrbios abdominais e intestinais, etc (Kim, 2008). Também é muito utilizado na medicina estética, em tratamentos de combate à celulite, bem como em cremes que combatem o envelhecimento da pele. Normalmente, para o tratamentos destes problemas o órgão mais utilizado é as folhas, devido ao elevado número de compostos fenólicos que possuem (Detaillé *et al.*, 2008). Após um processo de secagem a flor do cardo é muito utilizada em Portugal, como agente coagulante do leite, no fabrico de queijo. A espécie utilizada é a *C. cardunculus* L do género *Cynara*.

A secagem é um processo bastante complexo, onde ocorrem simultaneamente fenómenos de transferência de massa e de calor por vezes difíceis, se não impossíveis de descrever na sua totalidade (Guiné *et al.*, 2009). Para além das alterações estruturais, ocorrem alterações físicas e químicas nos produtos, durante o processo de secagem. (Sacilik, 2007). A análise dos processos de secagem permite a sua compreensão e eventualmente o estabelecimento de condições operatórias adequadas a cada processo e cada produto alimentar (Baini e Langrish, 2007).

O presente trabalho teve como objetivo a quantificação de compostos fenólicos e da atividade antioxidante da flor de cardo da espécie *C. cardunculus* L, submetida a diferentes tratamentos de secagem.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



2.1. Definição do Cardo

A palavra Cardo deriva do latim *carduus*, que significa "*fazer sinal com a cabeça*", devido à forma ovóide da flor apoiada no caule oscilante. Quanto à sua classificação científica, o cardo pertence à família das Asteraceae, tendo uma variedade de géneros, incluindo para além do género *Cynara*, os géneros *Carduus*, *Cirsium* e *Silybum*.

O cardo cresce em locais rochosos, sobretudo em terrenos barrentos, apresentando um caule lanoso e varas entre 20 a 100cm, as folhas são verdes na página superior e brancas na inferior, podendo ter dimensões até 35cm. É composto por brácteas ovadas terminadas num espinho com 10 a 50 por 2 a 3mm, e a corola é violeta. No entanto, algumas destas características podem variar consoante a espécie de cardo, por exemplo:

- *Cynara cardunculus* L., apresenta variedades espinhosas ou não espinhosas (figura 2 c, d), em geral caracterizam-se por plantas de médio-grande porte, mais de um metro (figura 2 a, b), folhas mais ou menos recortadas (Figura 2 f) e bastantes inflorescências (figura 2 e).



Figura 2: *Cynara Cardunculus* L. localizando as diferentes estruturas.

(Godinho *et al.*, 2006).

O cardo devido à sua adaptação a ambientes hostis, não necessita de ser cultivada, pois cresce sob a forma selvagem, resistindo a condições de elevado stress abiótico e clima desfavorável, sendo assim pode ser encontrada ao longo da bacia mediterrânea (Portis *et al.*, 2005).

O cardo selvagem é uma espécie alogâmica, propagada por sementes (aquénios). A maioria das sementes cai junto à planta progenitora e acaba por germinar após as primeiras chuvas outonais, contudo a germinação pode ocorrer ao longo do ano sob condições favoráveis. O período de crescimento decorre de Setembro (emergência) a Julho (maturidade dos aquénios) e as flores são normalmente produzidas por plantas com mais de dois anos de idade.

Cada planta produz inflorescências pequenas, médias e grandes, sendo as maiores aquelas que são formadas nos ápices dos rebentos ao longo do caule central. As inflorescências mais pequenas desenvolvem-se nos ramos laterais.

2.2. Funcionalidades da flor do cardo

Relatos afirmam que os gregos foram um dos primeiros povos a utilizar o cardo na culinária, descobrindo posteriormente as suas propriedades terapêuticas. Atualmente é utilizado como produto medicinal e culinário um pouco por todo o mundo; a Argentina é um bom exemplo da aplicação do caule do cardo para fins alimentares, sendo consumido cozido ou frito à milanesa. No entanto, esta planta é muito utilizada no nosso país devido às propriedades coagulantes da flor, esta é utilizada para fazer diversos tipos queijos, nomeadamente o queijo Serra da Estrela, Azeitão, Serpa, Castelo Branco, Nisa, Évora, etc.

A espécie de cardo tradicionalmente utilizada no queijo é o *Cynara cardunculus L.*, devido às proteínases aspárticas. Estas enzimas possuem uma estrutura tridimensional semelhante, encontram-se na natureza e assumem grande importância na regulação de sistemas biológicos, como precursores de proteínas, regulação sanguínea e na hidrólise e armazenamento de proteínas intracelulares. As duas enzimas coagulantes são a cardosina A, responsável por coagular o leite e a cardosina B por fragmentar a caseína em pedaços cada vez mais pequenos durante a maturação do queijo, o que contribui para um queijo amanteigado (Rodrigues *et al.*, 2000). Estas enzimas apresentam atividade com pH entre 2 e 7, atingindo uma atividade máxima a pH 5,5, e a temperatura de 60°C, apresentando instabilidade a temperaturas elevadas. As proteínas aspárticas, nomeadamente as cardosinas clivam preferencialmente os péptidos em bandas, entre resíduos hidrofóbicos. Entre as cardosinas, a B apresenta maior especificidade que a cardosina A.

Nas misturas comerciais de flor de cardo pode conter outras espécies além do *Cynara cardunculus L.*, isto deve-se a falta de homogeneidade dos lotes de flores comercializados. Este fato origina queijos com características diferentes, por exemplo caso o lote de cardo contenha a espécie *Cynara humilis L.*, que apenas contém a cardosina A, não conferindo ao queijo a característica tão apreciada, o “amanteigado” (Rodrigues *et al.*, 2000).

As folhas do cardo são muito utilizadas como produtos medicinais, devido ao seu potencial terapêutico como agentes diuréticos, ou no combate a doenças hepáticas, cancro diabetes, prisão de ventre, reumatismo, anemia, etc (Falleh *et al*, 2008).

2.2.1. Propriedades coagulantes do cardo

O leite tem na sua composição proteínas com propriedades diferentes, sendo as mais importantes derivadas do seu comportamento relativamente ao coalho, aos ácidos e ao calor. Essas substâncias proteicas são a caseína, a lactoalbumina e a lactoglobulina. Qualquer delas agrupa, por sua vez, substâncias que, embora com grandes afinidades físico-químicas entre si, não são absolutamente iguais, pois têm pesos moleculares diferentes, devido às suas propriedades (Sá e Barbosa, 1990).

A caseína, a lactoalbumina e a lactoglobulina encontram-se no leite dispersas sob a forma de suspensão coloidal. A primeira desempenha um efeito protetor contra a ação do calor (coloide protetor) em relação às outras proteínas, evitando a sua precipitação, ou seja, a sua floculação. Assim sendo quando o leite é aquecido a uma temperatura elevada (de 60 a 100°C), a precipitação/floculação dessas duas proteínas é relativamente pequena. Por outro lado, a caseína, em presença do coalho ou de um ácido precipita/coagula e isola-se dos restantes constituintes, originando dois produtos: a coalhada e o soro. Nestas condições, o soro contém a quase totalidade da lactoalbumina e lactoglobulina do leite. Estas proteínas, uma vez desprotegidas pela caseína coagulam pelo calor nas proximidades das temperaturas de ebulição do soro (Sá e Barbosa, 1990).

Na segunda parte da coagulação, é necessário distinguir a coagulação enzimática da coagulação láctica, pois são dois fenómenos perfeitamente distintos. Em relação à coagulação enzimática o importante é considerar o facto de este fenómeno só acontecer na presença dos sais de cálcio. A caseína encontra-se no leite sob a forma de fosfocaseinato de cálcio e, a coagulação pelo

coalho só se realiza por via do íão cálcio que, tendo uma função ácida livre vai por meio dessa função ligar-se a outra molécula igual, provocando a coagulação. O fosfocaseinato de cálcio transforma-se, pela ação da enzima coagulante, em fosfoparacaseinato de cálcio. O resultado da coagulação não significa, portanto, o isolamento da caseína pura, mas sim de um composto de caseína chamado fosfoparacaseinato de cálcio (Sá e Barbosa, 1990).

2.3. Tratamentos Térmicos

2.3.1. Tratamentos de Secagem

O processo de secagem de alimentos é uma prática ancestral que surgiu, inicialmente, pela necessidade de alargar o período de conservação dos alimentos, devido à remoção de humidade (água) ou outro solvente de um sistema sólido ou semi-sólido.

A secagem de plantas é um processo crucial que visa levá-las a baixos teores de humidade, permitindo a conservação adequada das mesmas, mantendo a qualidade física e química por mais tempo (Radünz *et al.*, 2002). Caso o teor de humidade residual esteja acima de 10%, pode favorecer o desenvolvimento de fungos e bactérias, bem como possibilitar a atividade hidrolítica de diversas enzimas presentes nas células vegetais, levando a reações de oxidação e degradação dos princípios ativos (Schulz, 2002), podendo desta forma, influenciar a sua atividade. Sendo assim, é necessário a aplicação de metodologias de secagem apropriadas para cada espécie, visando assegurar os teores de substâncias ativas (Corrêa *et al.*, 2004).

Tradicionalmente, o método escolhido é o da secagem por exposição direta ao sol (Doymaz, 2005; Ferreira e Candeias, 2005; Karathanos e Belessiotis, 1997). Este processo revela, contudo, alguns problemas, quer pela permanência excessiva às condições meteorológicas oscilantes, quer devido à fauna presente, nomeadamente insetos, podendo resultar danos significativos ao nível do produto final (Ferreira e Candeias, 2005; Sharma *et al.*, 2009).

Com o intuito de minimizar estes efeitos indesejáveis foram surgindo nos últimos anos algumas alternativas, nomeadamente secadores solares, designados de sistemas diretos, ou os indiretos que consistem em juntar à câmara de secagem um coletor solar. Estes sistemas de secagem, embora sejam uma clara evolução, não permitem, contudo, a independência das condições meteorológicas. Desta forma a secagem por convecção forçada em túnel surge como alternativa, permitindo um total controlo do processo e das condições impostas ao mesmo,

sem limitações das condições meteorológicas (Ferreira & Candeias, 2005; Karathanos e Belessiotis, 1997).

A secagem da flor do cardo para a produção de queijo é feita à sombra, num local fresco e arejado. A flor é espalhada em tabuleiros, devendo ser mexida periodicamente. Quando a flor está seca, mantendo a cor violácea, coloca-se dentro de sacos de pano que se manterão pendurados (Rodrigues *et al*, 2000).

A utilização dos diversos sistemas referidos e principalmente a melhoria das técnicas de secagem assume uma importância cada vez maior, não só como método de conservação de alimentos, mas também como forma de obtenção de novos produtos de qualidade e excelência.

2.3.2. Tratamentos de secagem utilizando a liofilização

O conceito da liofilização pensa-se ter surgido nos polos árticos para a conservação de peixe, utilizando os ventos secos característicos desta zona. Este processo é muito utilizado em produtos ligados à área da medicina (preservação de sangue e tecidos humanos) e na alimentação (Marques, 2008). Assim, a liofilização começou a ganhar importância nos mercados, pois é um processo vantajoso, devido ao aumento da durabilidade dos alimentos e por manter as condições organolépticas.

A liofilização consiste em congelar o produto de forma rápida, utilizando temperaturas entre os 40 a 80°C abaixo de zero, depois é colocado numa câmara de vácuo, onde, por ação da baixa pressão, ocorre a sublimação do gelo, ou seja, há a passagem direta do estado sólido ao estado gasoso.

O facto de trabalhar com baixas temperaturas e sob vácuo, é recomendado para produtos termosensíveis; biológicos (fungos enzimas, tecidos, sangue); farmacêuticos (antibióticos, vacinas, soros); alimentos (sumos, carnes, legumes, frutas) e produtos químicos (Pitombo, 1989).

Apesar do elevado custo do processo, inflacionando assim o do produto final, a liofilização é amplamente difundida e utilizada por diversas indústrias, nomeadamente a farmacêutica, alimentícias, etc (Marques, 2008).

2.4. Queijo

A laboração do queijo é uma prática que vem desde os tempos mais remotos. As inúmeras citações que se encontram em documentos mais antigos deixados pelo Homem, em todas as épocas da sua evolução histórica, demonstram com a maior clareza e, sem deixar lugar a qualquer dúvida, que o queijo foi em todos os tempos, um dos alimentos mais apetecidos.

2.4.1. Queijo Serra da Estrela

O queijo “Serra da Estrela” é um produto tradicional da Beira Alta, produzido em 18 concelhos de quatro distritos: Aguiar da Beira, Celorico da Beira, Fornos de Algodres, Gouveia, Guarda, Manteigas, Seia, Trancoso (distrito da Guarda), Covilhã (distrito de castelo Branco), Arganil, Oliveira do Hospital, Tábua (distrito de Coimbra), Carregal do Sal, Mangualde, Nelas, Penalva do Castelo, Tondela e Viseu (distrito de Viseu) (Figura 3) (Rodrigues *et al*, 2000).



Figura 3: Mapa dos concelhos produtores de queijo "Serra da Estrela"

A origem deste queijo remonta ao tempo dos Romanos aquando a sua ocupação na Península Ibérica. Mantendo-se ao longo dos séculos as técnicas de fabrico, bem como a zona de produção, que há muito consagrou a sua tipicidade e elevada qualidade (Rodrigues *et al*, 2000).

Foi o primeiro queijo de ovelha a conquistar o título de Denominação de Origem Protegida – DOP (Despacho 6/94, de 2 de Janeiro) (Rodrigues *et al*, 2000).

“O queijo “Serra da Estrela” está definido legalmente como um queijo de ovelha curado, de pasta semi-mole, amanteigada, branca ou ligeiramente amarelada, com poucos ou nenhuns “olhos”, obtidos por dessoramento lento da coalhada, depois da coagulação do leite de ovelha cru e estreme pelo cardo (*Cynara cardunculus L.*) (figura 4), de fabrico artesanal e proveniente da região demarcada / Área Geográfica de Produção “Serra da Estrela (Dec. Regul. 42/85, de 05.07 e Desp. 6/94, de 26.01)” (Figura3) (Rodrigues *et al*, 2000).

No entanto, para este queijo ser reconhecido “Serra da Estrela” tem de cumprir uma série de exigências, nomeadamente:

- a utilização de leite cru de ovelha, que segundo o caderno de especificações tem de ser de raças locais, como Bordaleira Serra da Estrela e Churra Mondegueira;
- coagulação pelo flor do cardo;
- obtenção do queijo por dessoramento lento da coalhada;
- fabrico artesanal do queijo.



Figura 4: Queijo "Serra da Estrela".

2.5. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos estão muito presentes no reino vegetal, podendo apresentar estruturas simples ou bastante complexas, são essenciais no crescimento e reprodução das plantas, além de serem responsáveis por mecanismos de defesa e contribuírem na pigmentação (Ângelo & Jorge, 2006). Estes compostos sendo antioxidantes, combatem o envelhecimento celular (radicais livres) (Giada; Mancini-Filho, 2006), previnem doenças cardíacas, cancro (Simões *et al.*, 1999), inibem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos e também intervêm em processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma em diversos alimentos (Peleg *et al.*, 1998).

Os fenóis vegetais são numerosos e variados, e estão representados em quase todas as classes de metabolitos secundários (Smith, 1976). Na classificação de Waterman e Mole (1994) são descritos fenóis simples (com um único anel aromático), metabolitos mais complexos baseados no esqueleto C_6C_3 , metabolitos com o esqueleto carbónico $C_6C_3-2C_6$, metabolitos com o esqueleto $C_6C_3C_6$, quinonas, benzofenonas e substâncias afins, alcalóides, terpenos. Devido à sua estrutura variável são considerados compostos multifuncionais, pois podem efetuar uma grande variedade de combinações (King e Young, 1999). Este complexo grupo de moléculas pode ser dividido em não-flavonóides e flavonóides (figura 5).

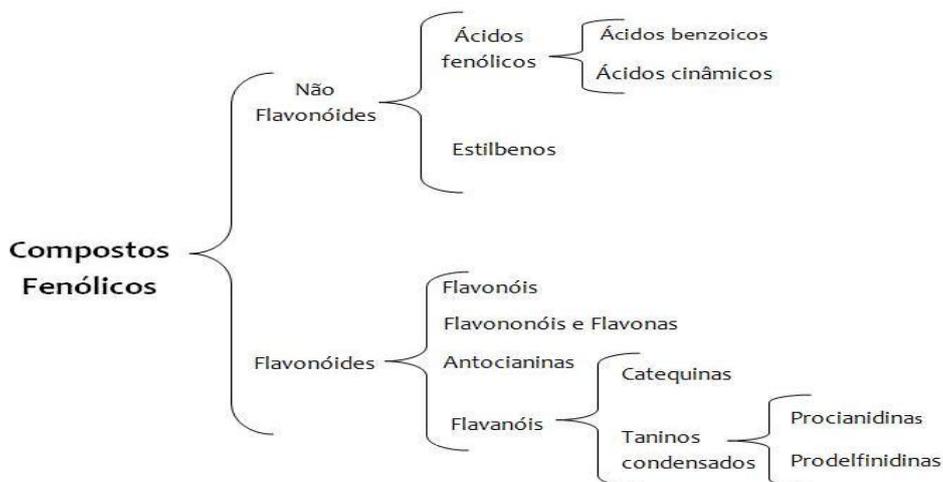


Figura 5: Classificação geral dos compostos fenólicos.

(Zamora *et al.*, 2003)

2.5.1. Compostos não flavonóides

No grupo dos compostos não flavonóides encontram-se os estilbenos e os ácidos fenólicos (ácidos benzoicos e ácidos cinâmicos)

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzoico, um grupo carboxílico e um ou mais grupos hidroxílicos e ou metoxílicos na molécula (Huang *et al.*, 2005) Estes ácidos para além de se apresentarem sob forma natural também podem ligar-se entre si, ou com outros compostos. Assim os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos. O primeiro é composto pelos ácidos benzoicos (figura 6, tabela 1), que possuem sete átomos de carbono (C₆-C₁) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza.

Os ácidos benzoicos estão presentes nos alimentos e muitas vezes são componentes de uma estrutura complexa, associados a taninos hidrolisáveis, a açúcares ou linhina (Shahidi e Naczki, 2004). Os derivados do ácido benzoico são produzidos através da hidroxilação ou metoxilação do ácido hidroxibenzóico, fazendo parte deste grupo os ácidos *p*-hidroxibenzóico, protocatequínico, gálico, vanílico, sirínico, salicílico e gentísico, sendo o mais abundante o ácido gálico que se encontra sob a forma de éster de flavanóis, e os ácidos vanílico, sirínico, e salicílico, que aparecem ligados às paredes celulares. Os ácidos protocatequénio, gentísico e *p*-hidroxibenzóico existem em menores quantidades, podendo encontrar-se sob a forma livre ou combinada (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1972).

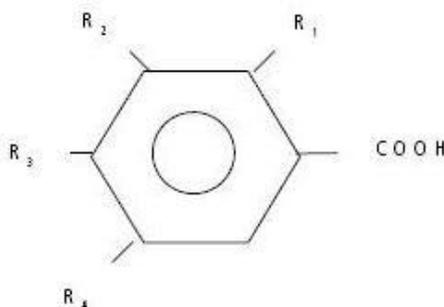


Figura 6: Estrutura química dos ácidos benzóicos.

(Soares , 2002)

Tabela 1: Estrutura química dos ácidos benzoicos.

Ácidos benzoicos	R1	R2	R3	R4
Ácido salicílico	OH	H	H	H
Ácido gentísico	OH	H	H	OH
Ácido p-hidroxibenzoico	H	H	OH	H
Ácido protocatequínico	OH	H	H	H
Ácido vanílico	H	OCH ₃	OH	H
Ácido gálico	H	OH	OH	OH
Ácido sirínico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

Os ácidos cinâmicos pertencem ao grupo dos ácidos fenólicos (figura 7), que possuem na sua constituição nove átomos de carbono (C₆-C₃), sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal.

No grupo do ácido cinâmico fazem parte o ácido p-cumárico, o-cumárico, m-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico e clorogénico. Estes ácidos estão envolvidos nas reações de oxidação enzimática e acastanhamento (tabela 2).

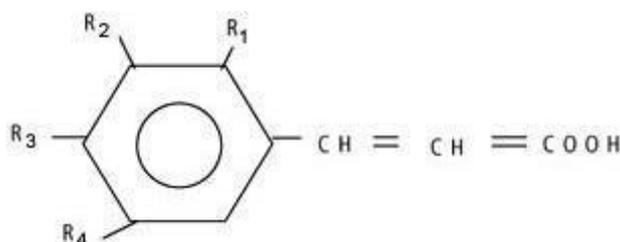


Figura 7: Estrutura química dos ácidos cinâmicos.

Tabela 2: Estrutura química dos ácidos cinâmicos.

Ácidos cinâmicos	R1	R2	R3	R4
Ácido cinâmico	H	H	H	H
Ácido o-cumárico	OH	H	H	H
Ácido m-cumárico	H	OH	H	H
Ácido p-cumárico	H	H	OH	H
Ácido caféico	H	OH	OH	H
Ácido ferúlico	H	OCH ₃	OH	H
Ácido sinápico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

Os ácidos cinâmicos podem originar outros compostos tais como as cumarinas, através da ciclização da cadeia lateral do ácido cumárico, como representa a figura 8.

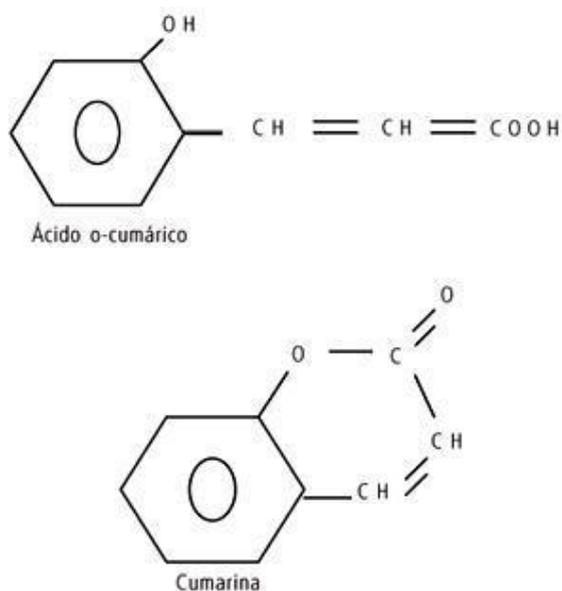


Figura 8: Estrutura química das cumarinas e ácido cumárico.
(Soares, 2002)

Quanto ao grupo dos estilbenos o resveratrol é o composto mais abundante. Estes são compostos por um anel A substituído por dois grupos hidroxilo em posição meta, ligado a uma anel aromático B (figura 9, tabela 3) por uma cadeia insaturada de dois carbonos, podendo ser chamados por 1,2-diariletenos. As diferentes combinações de grupos hidroxilo e metoxilo como substituintes do anel B dão origem aos diferentes compostos dos estilbenos.

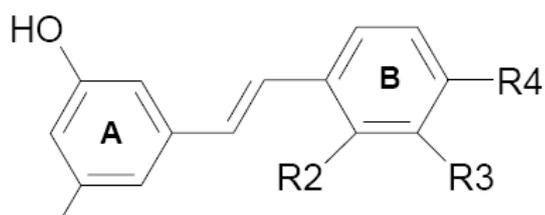


Figura 9: Estrutura básica dos estilbenos.

(Filip *et al.*, 2003)

Tabela 3: Diferentes compostos de estilbenos de acordo com o grupo de substituição.

(Filip *et al.*, 2003)

Estilbenos	R ₂	R ₃	R ₄
Pinisilvina	H	H	H
Resveratrol	H	H	OH
Hidroxi-resveratrol	OH	H	OH
Piceatonal	H	OH	OH
Rapontigenina	H	OH	OCH ₃

2.5.2. Compostos Flavonóides

Os flavonóides estão largamente distribuídos no reino vegetal, no entanto a concentração destes compostos varia consoante diversos fatores de acordo com a fila, ordem e família do vegetal, bem como da variação das espécies.

É importante ressaltar que fatores abióticos naturais como a radiação solar, raios UV, períodos de seca ou chuva, nutrientes e estações do ano influenciam no metabolismo e na produção destes compostos (Catherine e Packer, 2003) e ainda, fatores artificiais, como poluentes, podem interferir também nesse mecanismo (Degáspari e Waszczynskyj, 2004).

Geralmente, os flavonóides encontrados nas folhas podem ser diferentes daqueles presentes nas flores, nos galhos, raízes e frutos. O mesmo composto ainda pode apresentar diferentes concentrações dependendo do órgão vegetal em que se encontra (Simões *et al.*, 2000),

Diversas funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas. Entre elas, pode-se citar a proteção contra a incidência de raios ultravioleta, proteção contra microrganismos patogênicos, ação antioxidante, ação alelopática e inibição enzimática (Simões *et al.*, 2000).

O cardo (*Cynara cardunculus* L.) segundo Falleh *et al.*, (2008), apresenta maior quantidade de compostos fenólicos nas sementes e folhas do que nas flores. No entanto, do total de compostos fenólicos nas flores, 80% são flavonóides, enquanto as folhas contêm 61% e as sementes 68%.

Quimicamente os flavonóides possuem uma estrutura baseada em 2-fenil-benzopirano ($C_6C_3C_6$) (Harbone, 1973), ou seja, são constituídos por dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos formando um anel heterocíclico, denominado anel C (figura 10).

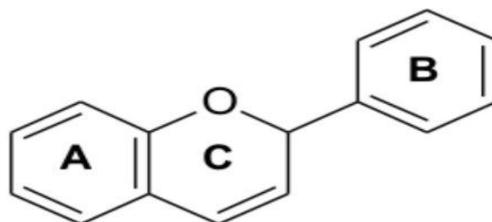


Figura 10: Estrutura química básica dos flavonóides.

(Fonte: Ângelo e Jorge, 2006).

As diferentes classes de flavonóides dependem do grau de oxidação do anel pirano central, resultando os flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis / catequinas, isoflavonas e antocianinas (Pietta *et al.*, 1989). A substituição do anel A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonóides (figura 11). Estas substituições podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfatação (Degáspari e Waszczyński, 2004).

Fórmula estrutural	Flavonóides	substituições				
		5	6	7	3'	4'
Flavanona 	Eriodictiol Hesperitina Narigenina	OH	H	OH	OH	OH
		OH	H	OH	OH	OMe
		OH	H	OH	H	OH
Flavanol 	Catequina Gallocatequina	OH	H	OH	OH	OH
		OH	H	OH	OH	OH
Flavona 	Apigenina Crisina Luteolina	OH	H	OH	H	OH
		H	H	OH	H	H
		OH	H	OH	OH	OH
Flavonol 	Kamferol Miricetina Quercetina	OH	H	OH	H	OH
		OH	H	OH	OH	OH
		OH	H	OH	OH	OH
Flavononol 	Taxifolina	OH	H	OH	OH	OH
Isoflavona 	Daidazina Genisteína Gliciteína	H	H	OH	H	OH
		OH	H	OH	H	OH
		OH	OMe	OH	H	OH

Figura 11: Estrutura química de alguns flavonóides de ocorrência em plantas

(Birt *et al.*, 2001)

As flavonas e flavonóis que aparecem como agliconas ou glicosídeos, possuindo uma dupla ligação entre carbono dois e o carbono três. A diferença estrutural entre estes compostos, é que os flavonóis possuem um grupo hidroxilo na posição três. Dentro de cada classe destes compostos individuais eles podem variar no número e distribuição de grupos hidroxilo bem como o seu grau de alquilação ou glicosilação (Shahidi e Naczki, 2004). Estes compostos encontram-se muito frequentemente nas folhas e cascas de plantas/frutos.

As antocianinas são importantes pigmentos solúveis na água contribuindo para a cor dos alimentos, assumindo assim importância na indústria alimentar. No entanto, esta característica pode variar consoante as estruturas químicas, condições físicas do meio e a presença/ausência de copigmentos (Mazza e Brouillard, 1990).

A maioria das antocianinas aparece como monoglicosídeos e diglicosídeos de pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina como se apresenta na figura 9.

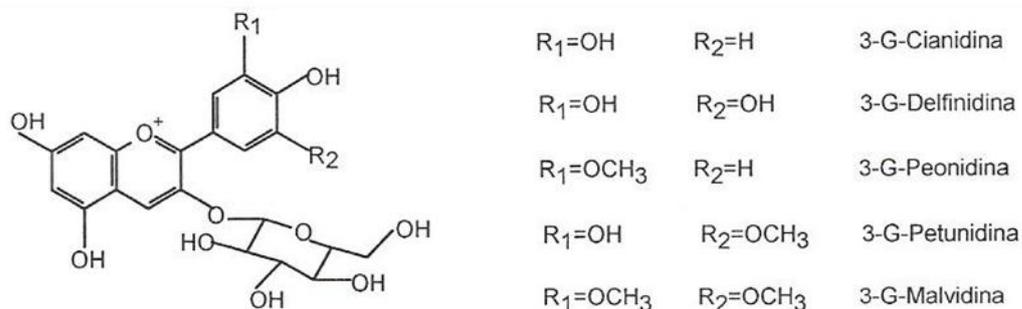


Figura 12: Estrutura da antocianinas monoglucosiladas (G-glucose).

(Mazza e Brouillard, 1990).

Na natureza encontram-se mais de 300 antocianinas, devido à diversidade de glicosilações. No entanto, o açúcar mais encontrado é a glucose, seguido da ramnose, galactose e arabinose. Por vezes os açúcares são acilados por ácidos, como o acético, cumárico, ferúlico ou o caféico (Bakker e Timberlake, 1985)

Os flavonóis são compostos orto-difenólicos e engloba as catequinas e os taninos condensados, nomeadamente as procianidinas ou orto-difenóis e as prodelfinidinas. As procianidinas e as prodelfinidinas constituem os

proantocianidinas, que são compostos que libertam antocianinas, quando aquecidas em meio fortemente ácido e alcoólico, mediante a ruptura das ligações entre as unidades monoméricas (Silva *et al.*, 2003). A unidade fundamental das proantocianidinas são as moléculas de flavan-3-óis e em alguns casos unidades de flavan-3,4-diol, podendo ser classificadas por dímeros, trímeros, oligómeros ou polímeros, dependendo do número de unidades de flavonóides. Estes compostos encontram-se em elevadas quantidades nos alimentos, nomeadamente nos frutos, conferindo-lhes características sensoriais, como a adstringência provocada pela precipitação das proteínas na presença dos taninos (Degáspari e Waszczynskyj, 2004).

O consumo de alimentos ricos em flavonóides é importante, porque os humanos não os sintetizam, sendo importante a sua ingestão (Peterson e Dwyer, 1998; Birt, *et al.*, 2001). No entanto, a confeção dos alimentos para consumo pode, resultar em perdas destes compostos, em maior ou menor grau, variando de acordo com o tipo de alimento e o tipo de preparação empregada. Todavia, os flavonóides são compostos relativamente estáveis, pois resistem à oxidação, altas temperaturas e moderadas variações de acidez (Peterson e Dwyer, 1998).

2.6. Atividade antioxidante

Atualmente existe um grande interesse em estudar os compostos antioxidantes, uma vez que são substâncias que em pequenas quantidades podem prevenir e tratar doenças causadas por radicais livres (Falleh *et al.*, 2008) Os radicais livres de oxigênio ou mais genericamente espécies reativas de oxigênio são produtos do metabolismo normal das células que estão associados a processos como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intracelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, quando em excesso tem efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lípidos de membrana e ataque às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, hidratos de carbono e DNA (Hussain *et al.*, 1987).

Os radicais livres do oxigênio, com os seus elétrons livres, podem atacar e danificar, praticamente, qualquer molécula encontrada no organismo. São tão ativos que, uma vez formados, ligam-se a diferentes compostos em frações de segundo. Ao fazê-lo, podem entregar o seu elétron livre ou capturar um elétron de outra molécula, a fim de formar um par. De uma forma ou de outra, os radicais acabam por ficar estáveis, mas a molécula atacada, transforma-se num radical. Isso inicia uma reação em cadeia que pode agir destrutivamente um tecido (Youngson, 1995).

As espécies reativas do oxigênio são: superóxido (O_2^-); radical hidroxilo ($OH\cdot$); óxido nítrico (NO); peróxido de hidrogênio (H_2O_2); radical lipídico ($L\cdot$); entre outros. Estes compostos assumem uma grande importância nos processos biológicos de produção de energia e fagocitose (Borek, 1997). Entre as espécies, o radical hidroxilo é mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares. Além disso, o peróxido de hidrogênio, apesar de não ser considerado um radical livre, é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos à molécula de DNA (Anderson, 2000).

Dessa forma, os radicais livres encontram-se relacionados com várias patologias tais como: artrite, choque hemorrágico, doenças cardíacas, cataratas,

disfunções cognitivas, envelhecimento e cancro, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (Halliwell *et al.*, 1995).

Atividade antioxidante depende de muitos fatores tais como a composição lipídica, concentração de antioxidantes, temperatura, pressão de oxigénio e na presença de muitos outros antioxidantes e componentes de alimentos comuns, por ex. Proteínas e água.

Os antioxidantes começaram a ser utilizados na Segunda Guerra Mundial para preservar os alimentos, sendo apenas utilizados antioxidantes naturais (Pokorny *et al.*, 2001). Nos dias de hoje, devido á elevada importância dada a este grupo de compostos, já existem antioxidantes artificiais, embora sejam mais aconselhados o uso destes sob a forma natural.

2.7. Bioacessibilidade

Alguns alimentos recebem a denominação de “alimentos funcionais”, pois são fonte de compostos bioativos, tais como compostos fenólicos, péptidos, vitaminas, antioxidantes e minerais. Estes compostos são essenciais para o organismo humano, além de promoverem benefícios para a saúde (Bouayed, 2010; Bouayed e Bohn, 2010). Assim, têm sido realizados muitos estudos, de forma a identificar alimentos que contenham compostos fenólicos. No entanto, o conteúdo total de um nutriente presente num alimento não revela exatamente o valor nutricional deste, pois deve-se ter em conta, que nem toda a quantidade do nutriente presente no alimento é libertado durante a digestão humana para ser absorvido pelo organismo. A quantidade disponível na corrente sanguínea depende da bioacessibilidade e da biodisponibilidade de cada composto. A bioacessibilidade refere-se à parte do nutriente que é libertado do alimento no trato gastrointestinal, tornando-se disponível na absorção intestinal de forma a entrar na corrente sanguínea. A biodisponibilidade refere-se à fração de um nutriente presente num alimento, que é disponibilizado para funções fisiológica, ou seja só um fração do nutriente é utilizado pelo organismo.

Nos seres humanos, o processo digestivo é iniciado na boca, onde ocorre a degradação inicial, de polissacarídeos e triglicéridos durante a mastigação, sob o efeito de α -amilase salivar e lipase lingual (Hinsberger e Sandhu, 2004; Pedersen *et al.*, 2002). Subsequentemente, o bolo alimentar prossegue para o sistema gastrointestinal, onde vai ocorrer a digestão. Nesta fase, as enzimas digestivas do estômago e do intestino delgado, através das secreções do fígado (sistema biliar), pâncreas, e mais tarde a fermentação bacteriana no cólon intestinal, em conjunto desempenham um papel fundamental na libertação de nutrientes e não-nutrientes (Biehler e Bohn, 2010; Hinsberger e Sandhu, 2004; Pedersen *et al.*, 2002; Saura-Calixto *et al.*, 2007), para que os nutrientes sejam absorvidos pelo intestino e posteriormente libertados na corrente sanguínea.

Durante a digestão gastrointestinal, os polifenóis podem interagir com qualquer outra componente alimentar (por exemplo, a quelação de iões),

ocorrendo a degradação destes (Argyri, *et al.*, 2006; Cilla *et al.*, 2009; McDougall *et al.*, 2005; Saura-Calixto *et al.*, 2007). Estas mudanças estruturais podem afetar tanto a sua absorção como a bioactividade (Argyri *et al.*, 2006, El Hajji *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2003).

3. OBJETIVOS



Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo principal estudar o efeito da secagem na composição em compostos fenólicos e na atividade antioxidante da flor de cardo (*C. cardunculus* L.).

Para atingir este propósito foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Submeter a flor de cardo a diferentes processos de secagem: liofilização, e secagem em estufa por convecção às temperaturas de 40°C, 50°C e 60°C.
- Obter extratos ricos em compostos fenólicos antioxidantes.
- Quantificar o teor em compostos fenólicos totais, flavonóides e orto-difenóis nos diferentes extratos.
- Determinar a atividade antioxidante através dos métodos ABTS e DPPH,
- Avaliar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos ao longo do trato digestivo.

4. PARTE PRÁTICA



4.1. Metodologia experimental

4.1.1. Amostras

As amostras de flor de cardo usadas neste estudo eram da espécie *Cynara cardunculus* L. colhido na zona centro, mais propriamente em Oliveira do Hospital, na ANCOSE (Associação Nacional de Criadores de Ovinos da Serra da Estrela) na época da florescência, em Junho. Por forma a manter as características da flor procedeu-se à sua congelação, até se efetuar a secagem deste.

4.1.2. Processamento

As flores de cardo foram secadas a diferentes temperaturas (40°C, 50°C e 60°C) numa estufa com ventilação forçada regulada para a temperatura pretendida. A estufa usada foi uma WTB Binder, com uma velocidade de ar de 0,5 m/s. A cada 15 minutos, foi retirada uma amostra de forma a controlar a percentagem de humidade. A humidade foi determinada numa balança de Halogénio, *Halogen Moisture Analyser* HG 53 da Mettler Toledo. Cada processo de secagem ficou concluído quando se atingiu 1 % de humidade. Dos processos resultaram 3 amostras, **CS40**, **CS50** e **CS60**, para o cardo secado a 40, 50 e 60°C, respetivamente. Paralelamente, a flor do cardo foi liofilizado num liofilizador TDF 5505 da Uniequip, após ter sido congelada a uma temperatura de – 18°C. O processo de liofilização decorreu durante 24 horas, e as condições operatórias foram temperaturas entre – 52°C e – 49°C e pressão de 0,7 Pa. A amostra liofilizada foi designada **CL**.

4.1.3. Extração dos compostos fenólicos

A extração dos compostos fenólicos do cardo foi realizada por adaptação do procedimento descrito por Ferreira *et al.* (2002). A 5g de cada uma das amostras (CL, CS40, CS50 e CS60) adicionaram-se 100ml de uma solução metanol: ácido acético (98:2) (figura 13). A extração foi mantida durante 1 hora sob agitação. Passado este tempo, a fração líquida (**EM1**) foi recolhida por filtração. Ao resíduo sólido juntaram-se, novamente, 100 ml de metanol, sob agitação durante o mesmo período de tempo. Passado este tempo, foi recolhido o 2º extrato de metanol (**EM2**). Este processo foi novamente repetido, usando uma solução de acetona (60% v/v) em vez de metanol:ácido acético, dando origem a dois extratos de acetona (**EA1** e **EA2**).



Figura 13: Processo de extração

4.1.4. Determinação dos compostos Fenólicos

4.1.4.1. Método de Folin-Ciocalteu

O método de Folin-Ciocalteu foi utilizado para a determinação de compostos fenólicos, de acordo com o descrito por Gonçalves *et al.* (2012):

- Para um tubo, mediu-se 0,125 ml de extrato. Adicionou-se 0,75ml de água destilada e 0,125 ml de reagente de Folin-Ciocalteu deixando reagir durante 6 minutos. Juntou-se 2ml de solução de carbonato de sódio a 5% (m/v). Esperou-se 60 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. Efetuaram-se as leituras

das absorvâncias a 760 nm (realizou-se autozero no espectrofotómetro com água destilada).

As concentrações dos compostos fenólicos nos extratos foram obtidas através da reta padrão efetuada com concentrações de ácido gálico entre 0-0,5 g/l. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por grama de cardo.

4.1.4.2. Determinação do Teor em Orto-difenóis

O método utilizado foi o da reação com molibdato, descrito por Mateos *et al* (2001).

O princípio do método baseia-se na complexação dos orto-difenois com os iões molibdato. Desta complexação resulta uma alteração colorimétrica originando uma coloração alaranjada que tem absorção máxima a um comprimento de onda de 370nm.

Para a determinação das absorvâncias, adicionou-se num tubo de ensaio 4ml de extrato e 1ml de solução a 5% (m/v) de molibdato de sódio preparada em 50% (v/v) etanol. Esperou-se 10 a 15 minutos após homogeneização, de modo a que a reação ocorresse. Procedeu-se à leitura das absorvâncias a 370nm, em cuvetes de 1cm de percurso ótico.

As concentrações do teor em orto-difenóis foram obtidas através da reta padrão efetuada com concentrações de ácido gálico entre 0 e 300 mg/L. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por grama de cardo.

4.1.4.3. Determinação do teor em Flavonóides

Na determinação do teor em flavonóides o método utilizado foi uma adaptação do método descrito por Meda *et al.* (2005). Neste método utilizaram-se 2 mL de extrato misturados com 2 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio a 2%, as amostras foram preservadas no escuro durante.10 minutos. Em

seguida procedeu-se à leitura das absorvâncias no espectrofotómetro a 330 nm, em cuvetes de quartzo.

O total de flavonóides presente em cada amostra, foi determinado através da reta padrão efetuada com concentrações da solução de quercina entre 0,02 e 0,20. Os resultados foram expressos por mg de equivalentes de quercitina (EQ) por grama de amostra.

4.1.5. Determinação da atividade antioxidante

As metodologias implementadas para a determinação da atividade antioxidante total são os métodos: DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) e ABTS (2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid).

4.1.5.1. Método DPPH

A determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH realizou-se através da adaptação do método descrito por Brand-Williams *et al.* (1995), tendo-se realizado os seguintes passos:

- Preparação da solução DPPH (6×10^{-5}): Num balão de 50ml preparou-se uma solução metanólica contendo 1,25mg de DPPH. Efetuou-se a leitura desta solução a 515nm (autozero com metanol), cuja sua absorvância foi de 0,700.
- Num tubo juntou-se 2,0ml de solução de DPPH e 0,1 ml de amostra e agitou-se. Guardou-se no escuro e, deixou-se reagir durante 30min. Efetuou-se a leitura da absorvância a 515nm.

Para obter as concentrações foi elaborada uma reta padrão com concentrações de trolox entre 0,08 e 0.4 mmol. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de trolox por g.de amostra de cardo.

4.1.5.2.Método ABTS

A determinação da atividade pelo método do ABTS foi feita através da adaptação do método descrito por Re *et al.* (1999), tendo-se realizado os seguintes passos:

- Preparação da solução de ABTS: preparou-se uma solução de ABTS de concentração 7mmol numa solução de persulfato de potássio (0,66g/L). Antes de usar, manteve-se no escuro durante 16h. Decorrido esse tempo, dilui-se esta solução em etanol na proporção de 1:80. No espectrofotómetro, realizou-se o autozero a 734nm com etanol. Efetuou-se a leitura desta solução, cuja absorvância foi de 0,700.
- Num tubo tampado, juntou-se 2,5ml de solução de ABTS e 0,1 ml de amostra (ou solução controlo) e agitou-se. Deixou-se reagir, no escuro, durante 15min. Efetuou-se as leituras das absorvâncias a 734nm.

Para obter as concentrações foi feita uma reta padrão com concentrações de trolox entre 0,08 e 0.4mmol. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de trolox por cada grama de amostra de cardo.

4.1.6. Simulação *in vitro* das condições do trato digestivo

O método para a simulação *in-vitro* das diferentes etapas do sistema digestivo foi baseada no modelo proposto por MCDougal *et al* (2005). Para a simulação das diferentes fases do trato digestivo foi necessário preparar as seguintes soluções:

- Cloreto de sódio a 1% (m/v);
- Solução salina de α -amílase a 1% (m/v);
- Solução salina de pepsina 1% (m/v);
- Solução salina de pancreatina a 0,3% (m/v);
- Sais biliares a 1% (m/v).

O pH da solução de α amilase foi previamente ajustado a pH 6,5; pepsina a pH 2 e de pancreatina mais sais biliares a pH 7.

Solução in vitro do processo digestivo:

- **Boca:** Num tubo adicionou-se 1ml da amostra, mais 1ml de solução α amilase e deixou-se reagir durante 2 minutos a 37°C.
- **Estômago:** A 1ml da solução anterior adicionou-se 1ml da solução de pepsina e deixou-se reagir durante 2 horas a 37°C
- **Intestino:** A 1ml da solução anterior adicionou-se 1 ml da solução de pancreatina e sais biliares e deixou-se reagir durante 2 horas a 37°C.

No final de cada etapa foi avaliado o teor de compostos fenólicos. Paralelamente, em cada etapa, foram realizados ensaios controle, com as mesmas condições simuladas, mas sem amostra.

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS



5.1. Otimização do processo de extração

No sentido de otimizar o processo de extração, efetuaram-se três extrações sucessivas com cada um dos solventes, obtendo-se três extratos de metanol (EM1, EM2, EM3) e três extratos de acetona/água (EA1, EA2, EA3.).

Os resultados obtidos, descritos na tabela 4, mostraram que o terceiro extrato de metanol representava cerca de 10% do total de compostos extraídos com este solvente. De forma semelhante, a quantidade de compostos recolhidos no 3º extrato de acetona representava 8% do total extraído pelo mesmo. Assim, optou-se por realizar apenas duas extrações com cada um dos solventes, de forma a otimizar o tempo de trabalho e gasto de reagentes. Os diferentes extratos de metanol e de acetona foram misturados dando origem ao extrato de metanol (EM) e ao extrato de acetona (EA) (tabela 4).

Tabela 4: Percentagem de compostos presentes em cada extração.

	EM1	EM2	EM3	EA1	EA2	EA3
% de extração	57	33	10	70	21	8

5.2.Composição Fenólica

A figura 14 mostra a composição em compostos fenólicos, expressos em equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG/g), obtida para o cardo liofilizado (CL) e secado a 40°C (CS40), 50°C (CS50) e 60°C (CS60). Os valores descritos resultam da soma dos compostos fenólicos extraídos com as soluções de metanol e de acetona.

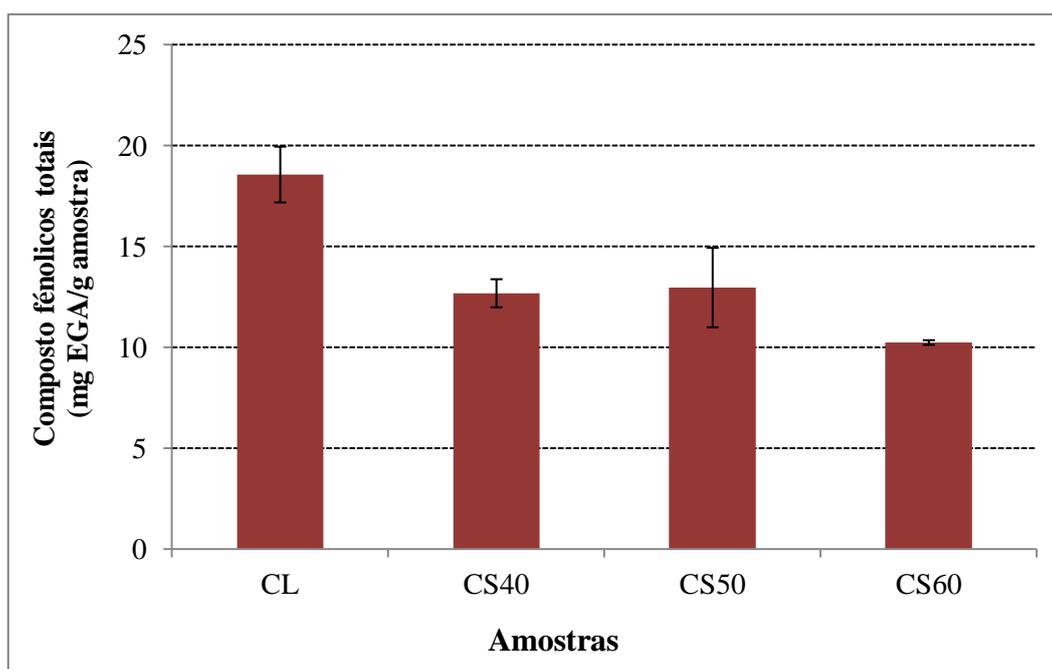


Figura 14: Concentração dos compostos fenólicos nas diferentes amostras de cardo.

Legenda: CL- cardo liofilizado, CS40- cardo secado a 40°C, CS50 – cardo secado a 50°C, CS60 – cardo secado a 60°C.

Pela observação da figura 14 verificou-se que o cardo liofilizado (CL) apresentava 18,5 mg em equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de cardo. A amostra CS40 apresentou uma quantidade de compostos fenólico muito semelhante à amostra secada a 50°C (CS50), com 12,7 e 13,0 mg (EAG) por grama de amostra, respectivamente. A amostra com menor quantidade de compostos fenólicos era a CS60 com 10,2 mg (EAG) por g de amostra.

A quantidade de compostos fenólicos extraídos com os diferentes solventes (Metanol e acetona) foi, em geral, semelhante entre si. No caso da

amostra CL, 69 % foram obtidos no extrato de metanol. No entanto, nas amostras secadas ocorreu uma ligeira tendência para uma maior extração com acetona, variando entre 50 e 58 % do total extraído.

Estes resultados podem estar relacionados com o facto do processo de liofilização se realizar a baixas temperaturas, não havendo a degradação dos compostos, enquanto nos processos de secagem, quanto maior a temperatura menor a quantidade de compostos fenólicos.

Comparando os valores obtidos com o valor descrito por outro estudo (Falleh *et al.*, 2008) realizado com cardo da espécie *C. Cardunculus* L. cultivado na Tunísia, verificou-se uma diferença significativa, pois o valor descrito foi de 6,96 mg EAG /g, um valor inferior aos obtidos neste trabalho (figura 14). Esta diferença pode dever-se ao processo de secagem usado, pois o valor descrito provém de uma secagem artesanal, exposição direta ao sol, enquanto neste trabalho a secagem foi por secador convectivo/liofilização. Pode ainda dever-se, ao processo de extração usado, pois no estudo descrito por Falleh *et al.*, (2008) foi efetuada uma extração com metanol durante 30min em agitação. Outro fator é a origem do cardo, pois estamos a comparar resultados provenientes de flor de cardo da Tunísia com a de Portugal.

5.3. Composição em Flavonóides

A figura 15 representa a composição de flavonóides nos extratos de metanol (EM) e de acetona (EA) das amostras, CL, CS40, CS50, CS60, expressa em mg equivalentes de quercitina (EQ) por g de amostra.

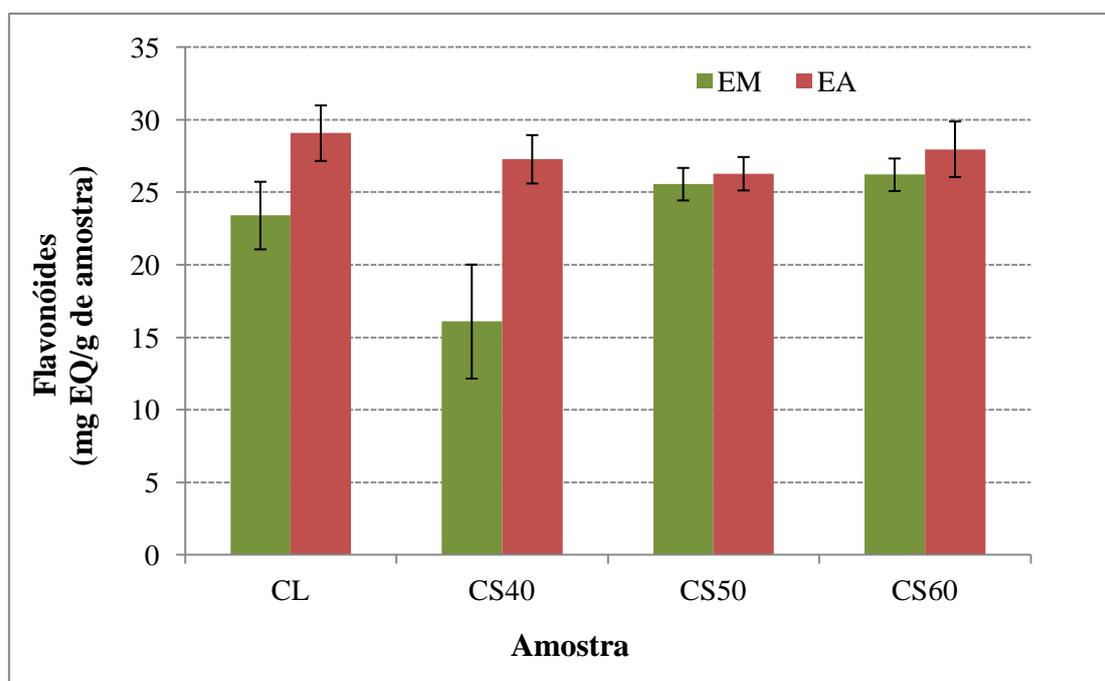


Figura 15: Concentração de flavonóides em cada extrato das diferentes amostras de cardo.

Legenda: CL- cardo liofilizado, CS40- cardo secado a 40°C, CS50 – cardo secado a 50°C, CS60 – cardo secado a 60°C, EM – extrato de metanol, EA – extrato de acetona.

O cardo liofilizado, conforme representado na figura 15, apresentou, em média, no extrato de metanol (23,40 mg EQ/g amostra) uma quantidade de compostos flavonóides 20% menor do que no extrato de acetona (29,08 mg EQ por cada grama de amostra). Na amostra secada a 40°C o extrato de metanol representa 37% (16,09 mg EQ/g de amostra) do total de flavonóides, enquanto que com o solvente de acetona retirou-se 27,28 mg em equivalentes de quercitina por grama de cardo. Os extratos de metanol e acetona referentes às amostras secadas a 50°C e 60°C obtiveram percentagens de extração muito semelhantes.

Nos estratos de metanol das amostras CS50 e CS60, obtiveram-se 25,56 e 26,21 mg EQ/g de amostra, respectivamente. No extrato de acetona, o teor de flavonóides foi de 26,28 mg em equivalentes de quercitina por g de amostra (CS50) e 27,97 mg EQ/g de cardo secado a 60°C (CS60). Os resultados obtidos permitiram inferir que a amostra CS60 continha uma percentagem relativa de compostos flavonoides superior às restantes.

Apesar das diferentes condições de extração usadas, bem como o comprimento de onda utilizado para as leituras de absorvâncias, comparando os resultados obtidos com o estudo realizado por Zheleva-Dimitrova *et al* (2011), a quantidade de flavonóides quantificados neste trabalho foi semelhante aos valores descritos para 8 géneros da família cynara, em que o teor de compostos flavonóides variou entre 1,86 a 3,31 g de quercitina por 100g de amostra.

5.4. Composição em orto-difenóis

Os resultados para a determinação de orto-difenóis, nos extratos de metanol e acetona para cada amostra (CL, CS40, CS50, CS60), foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de amostra como mostra a figura 16.

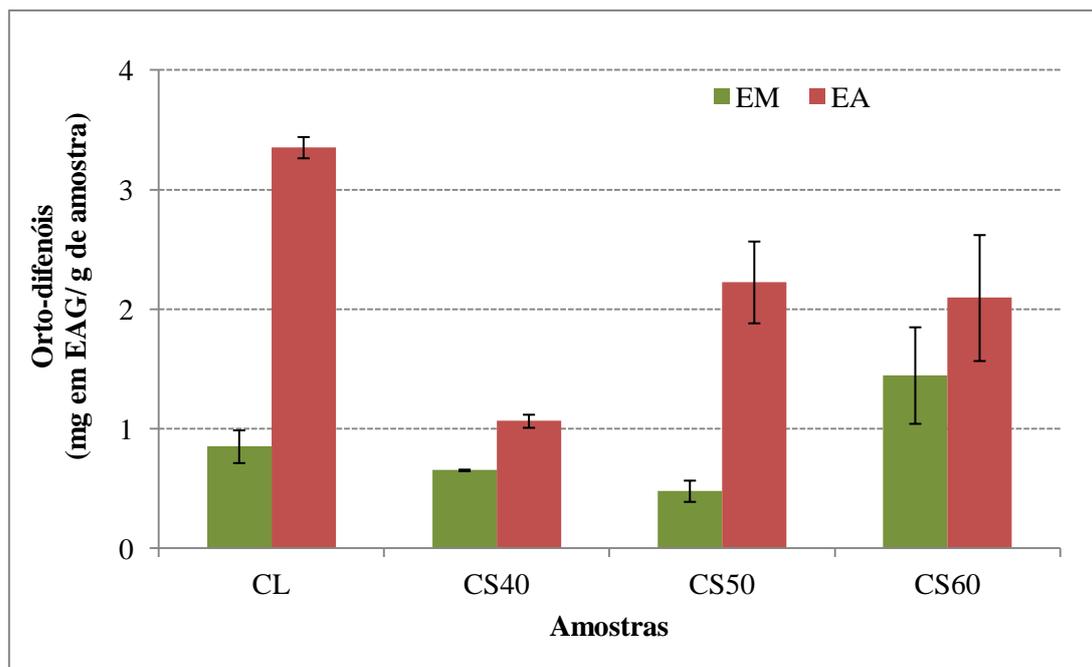


Figura 16: Concentração de orto-difenóis em cada solvente, relativa a cada amostra.

Legenda: CL- cardo liofilizado, CS40- cardo secado a 40°C, CS50 – cardo secado a 50°C, CS60 – cardo secado a 60°C, EM – extrato de metanol, EA – extrato de acetona

O teor de orto-difenóis mais elevado foi na amostra CL com 4,2 mg em EAG/g de cardo. Sendo a amostra secada a 40°C a que apresentou menor quantidade de orto-difenóis, 1,7 mg EAG por grama de amostra. As amostras CS50 E CS60, obtiveram respetivamente 2,7 e 3,5 mg equivalentes de ácido gálico por grama de amostra.

Os resultados mostraram que os compostos orto-difenólicos foram preferencialmente extraídos pela acetona. No caso das amostras CL e CS50, a

quantidade de compostos extraídos com acetona representava cerca de 80% do total, enquanto nas amostras CS40 e CS0 representavam cerca de 60%.

A amostra que detentora do maior teor orto-difenólico, foi a de cardo liofilizado (CL), seguido da amostra secada a 60°C (CS60), depois a amostra secada a 50°C (CS50), e com menor quantidade o cardo secada à temperatura mais baixa (CS40).

5.5. Atividade antioxidante

5.5.1. ABTS

A figura 17 representa a atividade antioxidante, expressa em mmol em equivalentes de trolox (ET) por grama de amostra, utilizando o método ABTS, na amostra de cardo liofilizado (CL) e secado a 40°C (CS40), 50°C (CS50) e 60°C (CS60). Os valores apresentados resultam da soma da atividade antioxidante presentes nos extratos de metanol e de acetona.

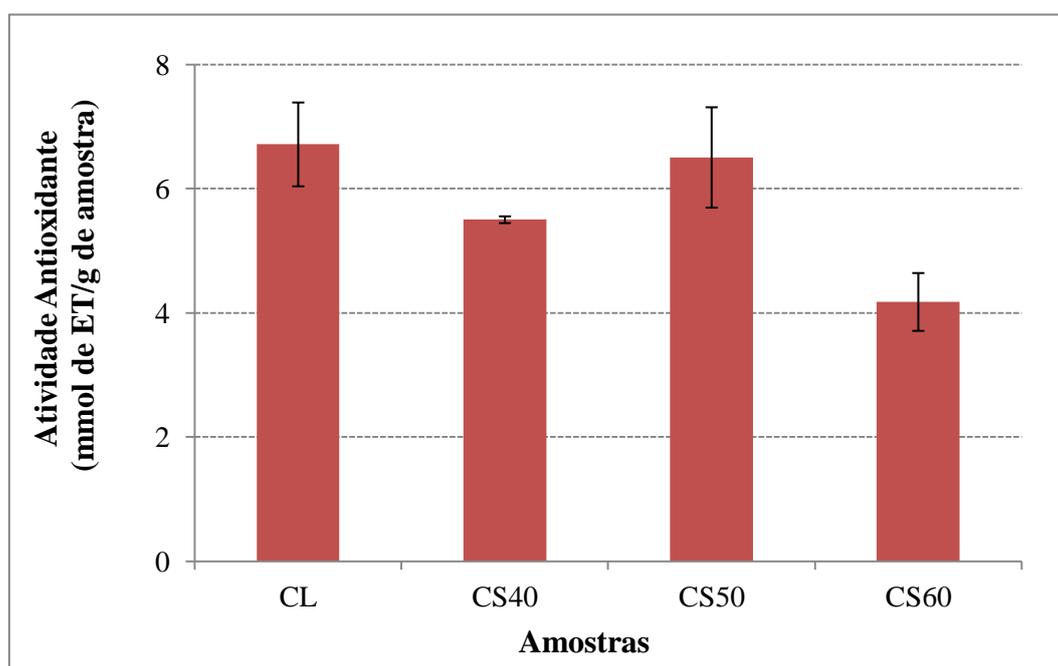


Figura 17: Atividade antioxidante das diferentes amostras de cardo, utilizando o método ABTS.

Legenda: CL- cardo liofilizado, CS40- cardo secado a 40°C, CS50 – cardo secado a 50°C, CS60 – cardo secado a 60°C.

De acordo com a figura 17 a atividade antioxidante mais elevada foi a amostra de cardo liofilizado com 6,7 mmol em equivalentes de trolox por grama de cardo, sendo que 78% se deveu à contribuição do extrato de acetona. O poder antioxidante da amostra secada a 50°C quando comparado com a amostra de cardo liofilizada, apresentou uma atividade muito semelhante, cerca de 7% mais

baixa. Neste caso a contribuição relativa de cada extrato para a atividade antioxidante total foi semelhante à da amostra CL. A amostra de cardo CS40 e CS60 apresentavam uma atividade antioxidante de 5,5 e de 4,2 mmol em equivalentes de trolox (ET) por grama de amostra, respetivamente.

Quanto á amostra CS60 o extrato de metanol contribuiu com 38% da atividade antioxidante, verificando-se condições semelhantes nas amostras CL e CS50 (22% e 57%). Pelo contrário, na amostra CS40 o extrato de metanol foi responsável por 57% da atividade antioxidante.

De acordo com Gouveia e Castilho (2012) a atividade antioxidante determinada através do método ABTS do cardo da Madeira foi de 4,19 mmol de trolox por grama de amostra. Sendo assim os valores obtidos encontram-se ligeiramente acima do valor descrito. No entanto, esta diferença de resultados pode estar relacionada com a origem do cardo, ou com o processo de secagem, pois no caso do cardo da Madeira, foi realizada uma secagem natural à temperatura ambiente ($\pm 20^{\circ}\text{C}$).

5.5.2. DPPH

Na figura 18 encontra-se representada a atividade antioxidante relativa a cada amostra (CL; CS40; CS50, CS60), expresso em mmol em equivalentes de trolox (ET) por g de amostra utilizando como método analítico o DPPH. Os valores apresentados resultam da soma da atividade antioxidante presentes nos extratos de metanol e de acetona.

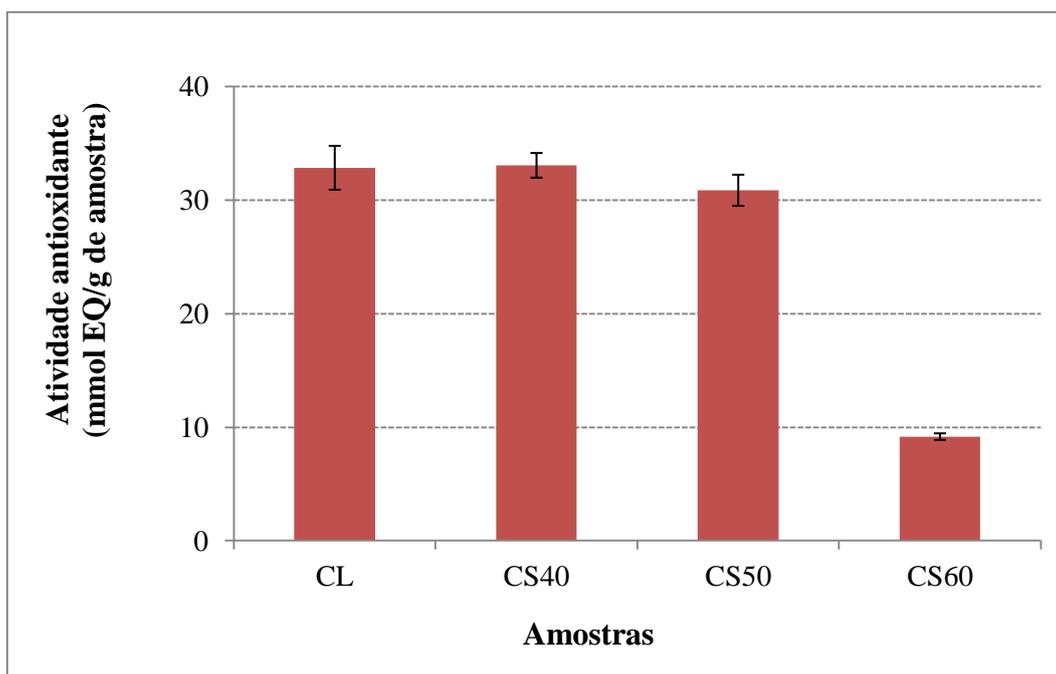


Figura 18: Atividade antioxidante das diferentes amostras de cardo, utilizando o método DPPH.

Legenda: CL- cardo liofilizado, CS40- cardo secado a 40°C, CS50 – cardo secado a 50°C, CS60 – cardo secado a 60°C.

Pela observação da figura 18, é possível verificar que a atividade antioxidante determinada pelo método DPPH foi muito semelhante nas amostras CL, CS40, CS50, as quais apresentaram, respetivamente, valores de 32,8; 33,1; 30,9 mmol ET/g de amostra. A amostra de cardo secado a 60°C foi a que apresentou menor atividade antioxidante, menos 71% em comparação com o poder antioxidante da amostra de cardo liofilizada. Este menor valor está de acordo com a menor quantidade de compostos fenólicos totais presentes nesta

amostra. Diversos autores (Katalinic *et al.*, 2004; Lachman *et al.*, 2007) descreveram uma correlação positiva entre o teor em compostos fenólicos e a atividade antioxidante.

Quanto às extrações efetuadas as diferenças entre cada um dos solventes são mínimas em média a acetona extraiu, 52% na CL, 49% na CS40, 48% na CS50 e 61% na CS60.

De acordo com o estudo efetuado por Gouveia e Carvalho (2012) a atividade antioxidante do cardo da madeira foi de 1,768 mmol equivalentes de trolox por grama de amostra. Quando comparado com o valor obtido verifica-se que o valor descrito é inferior. Esta diferença de resultados pode ter estado relacionada com a origem do cardo (Portugal Continental/Madeira) o processo de secagem (secagem artificial/secagem natural), o procedimento para a determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH não ter sido igual, etc.

Comparando com os resultados obtidos pelo método ABTS, verificou-se uma menor contribuição relativa aos compostos presentes no extrato de acetona para a atividade antioxidante total quando determinada pelo método do DPPH.

Contudo ao comparar os compostos fenólicos extraída pelo extrato de metanol nas amostras CL, CS40, CS50, CS60 com percentagens de 69%, 50%, 47% e 42%, respetivamente, á contribuição do mesmo extrato no método DPPH com 48% no CL, 31% no CS40, 52% no CS50 e 39% CS60, verificaram-se resultados muito semelhantes. Enquanto no método ABTS esta proporção não se aferiu, sendo o extrato de acetona responsável pela maior atividade antioxidante. Este fato, pode estar relacionado com o método ABTS apresentar maior solubilidade em solventes aquosos, pois o solvente de acetona contém 40% de água.

5.6. Avaliação da Bioacessibilidade

5.6.1. Composição Fenólica

A alteração da composição fenólica relativa ao extrato de metanol ao longo de condições *in vitro* simulantes do trato intestinal expressa em porcentagem, para cada uma das amostras de cardo, encontra-se representada na figura 19.

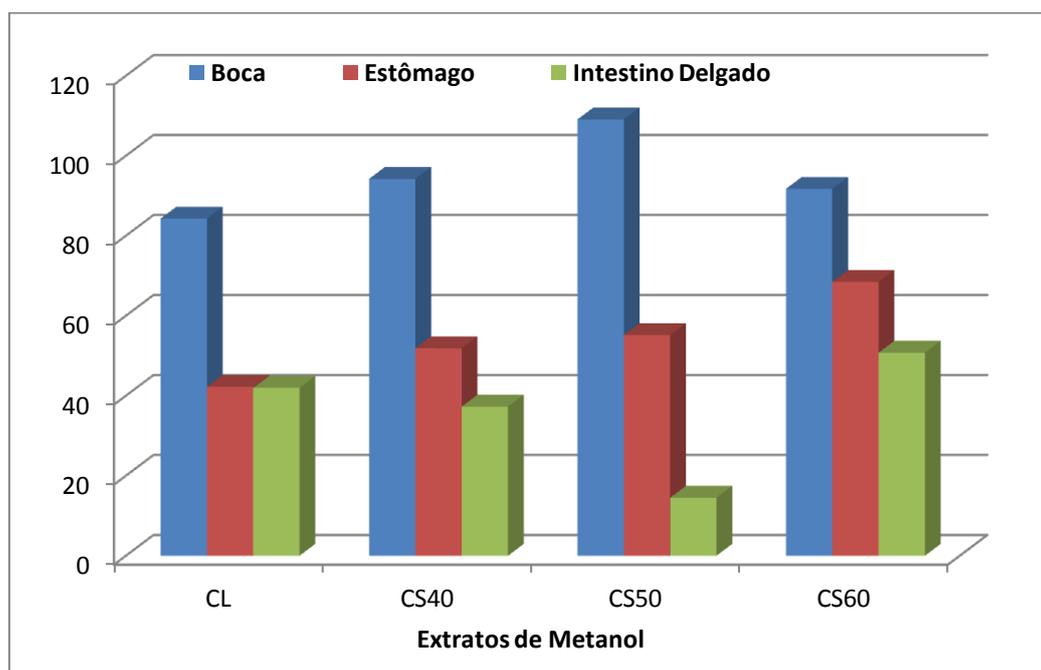


Figura 19: Composição fenólica nos extratos de metanol ao longo do trato digestivo.

Legenda: CL- cardo liofilizado, CS40- cardo secado a 40°C, CS50 – cardo secado a 50°C, CS60 – cardo secado a 60°C.

Pela observação da figura 19, verificou-se que a quantidade de compostos fenólicos nos extratos de metanol relativos à amostra de cardo liofilizado (CL), diminui ao longo do trato intestinal, começando na boca, local onde sofreu um decréscimo de 16%. Segue-se o estômago com um declínio de 42% e finalmente após as condições simulantes do intestino, a quantidade de compostos permaneceu inalterada. Quanto à amostra de cardo secado a 40°C (CS40) após a

boca, ocorreu uma diminuição dos compostos de 6%, na etapa referente às condições simulantes do estômago os compostos fenólicos ficaram reduzidos a 52%, enquanto no intestino a percentagem disponível para ser absorvida foi de 37%. Na amostra CS50, na boca a quantidade de compostos fenólicos aumentou ligeiramente (9%), no entanto a degradação após a digestão no estômago verificou-se um decréscimo para 54% do valor inicial. No final do trato digestivo, a quantidade de compostos fenólicos quantificada representava 15% do inicial. Quanto ao extrato de metanol secado a 60°C a degradação dos compostos foi mais ligeira ao longo das diversas fases do trato digestivo. Na boca a redução foi apenas de 8%, seguido do estômago com uma diminuição de 24%, após as condições simulantes às do intestino delgado, restou apenas 51% dos compostos contidos no início.

A figura 20 representa a quantidade de compostos fenólicos expressa em percentagem para cada amostra (CL, CS40, CS50, CS60) ao longo do trato intestinal.

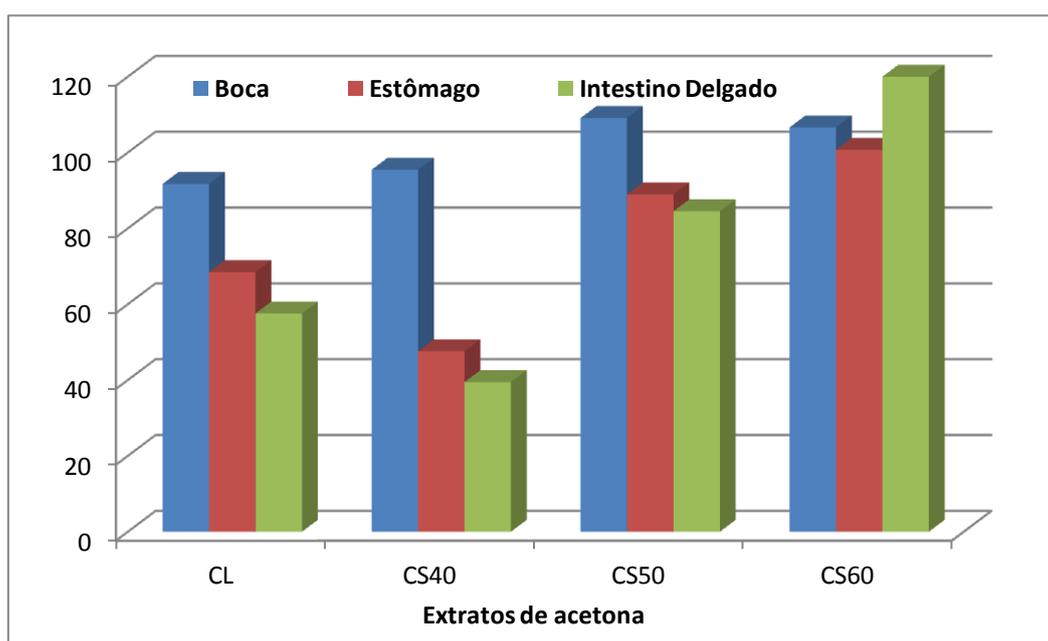


Figura 20: Composição fenólica nos extratos de acetona ao longo do trato digestivo.

Legenda: CL- cardo liofilizado, CS40- cardo secado a 40°C, CS50 – cardo secado a 50°C, CS60 – cardo secado a 60°C.

Ao analisar figura 20 depreende-se que a amostra de cardo liofilizado (CL) começa por degradar-se após as condições simulantes às da boca ocorrendo uma perda de 8% do teor em compostos fenólicos, seguido do estômago com uma perda de 24%, ficando ainda mais reduzido o teor em compostos após as condições simulantes às do intestino, restando apenas 58% da concentração inicial. Na amostra de CS40 após a digestão na boca, a percentagem de compostos foi de 95%; no estômago deu-se uma redução significativa, libertando para o intestino 48%. Seguido de mais uma redução no teor total de fenóis, nas condições simulantes às do intestino delgado, para 39%. Relativamente à amostra secada a 50°C, após ter sido submetida às condições simulantes da boca, ocorreu um aumento de 9% no teor em compostos, enquanto no estômago deu-se uma diminuição dos compostos de 20%. Após a amostra ter sido submetida às condições simulantes do intestino delgado, a quantidade de compostos fenólicos disponível para absorção representava 85% do inicial. No extrato secado a 60°C houve um aumento de 7% após as condições simulantes às da boca, seguido de uma diminuição de 6% no estômago, e um aumento de 19% após a passagem por condições simulantes às do intestino delgado.

De acordo com um estudo realizado por Cilla *et al.*, (2009), após a ingestão de sumos de fruta o processo digestivo diminui cerca de 47% o teor inicial de compostos fenólicos. Outro estudo realizado por Tagliazucchi *et al.*, (2010) demonstrou que as uvas após a digestão intestinal, perderam cerca de 38% do total de compostos fenólicos. Segundo a investigação realizada por Bouayed *et al.*, (2011) em variedades de maçã, os compostos fenólicos após a digestão no estômago reduzem cerca de 35%, sendo que nos extratos de acetona estudados se verificou uma redução entre 15% e 61%. Nesta fase do processo digestivo os valores obtidos estão coincidentes com os valores descritos por Cilla *et al.*, (2009); Tagliazucchi *et al.*, (2010) e Bouayed *et al.*, (2011). No intestino o valor de compostos fenólicos pode aumentar mais de 10%, quando compara com o valor obtido após a digestão no estômago, conforme o descrito no estudo realizado por Bouayed *et al.*, (2011). Este fato verificou-se no extrato de acetona relativo à amostra de cardo secado a 60°C, apresentando um aumento de 13%.

O aumento de compostos fenólicos após a digestão no intestino delgado, pode estar relacionado com a duração desta etapa, cerca de 2h, ou o efeito das enzimas (lípase, pancreatina ou amilase e atividade das proteases) na matriz alimentar, facilitando a libertação dos compostos fenólicos ligados à matriz.

Apesar de matrizes alimentares diferentes (Cilla *et al.*, 2009; Tagliazucchi *et al.*, 2010 e Bouayed *et al.*, 2011), a percentagem final de compostos fenólicos disponibilizada para a potencial absorção intestinal foi semelhante ao obtido para os extratos do cardo.

6. CONCLUSÕES



Conclusões

A flor de cardo liofilizado apresentava 18,5 mg EAG/g de compostos fenólicos totais. A secagem em estufa originou uma diminuição dessa quantidade com o aumento da temperatura de secagem, em especial para 60°C. Em geral, a quantidade de compostos fenólicos extraídos com metanol foi semelhante à extraída com acetona.

A quantidade de compostos flavonoides presentes nas flores do cardo foi semelhante independentemente das condições de secagem do cardo.

O teor de orto-difenóis presentes na flor de cardo liofilizado era 4,2 mg EAG/g de amostra. As amostras de cardo secadas apresentaram valores mais baixos entre 1,7 e 3,5 mg EAG/g de amostra destes compostos. Os compostos orto-difenólicos foram preferencialmente (60-80%) extraídos com acetona.

Os valores de atividade antioxidante das amostras foram ligeiramente diferentes de acordo com o método utilizado. Apesar destas diferenças, o cardo liofilizado foi o que apresentou maior atividade antioxidante, enquanto que a amostra secada a 60°C apresentou o valor mais baixo.

Após a passagem por um modelo *in vitro* simulante do trato digestivo, 15% a 61% dos compostos fenólicos presentes no extrato de acetona mantiveram-se disponíveis para serem absorvidos pelo intestino. Os compostos fenólicos presentes no extrato de acetona mostraram-se mais resistentes às condições do trato digestivo, quando comparados com os do extrato de metanol.

A flor do cardo é constituída por compostos fenólicos que preservaram a maior parte da sua atividade antioxidante após os processos de secagem a que foram submetidos.

7. BIBLIOGRAFIA



Anderson D. (2000) Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research*, 350, 103-108.

Argyri K, Komaitis M, Kapsokefalou M. (2006). Iron decreases the antioxidant capacity of red wine under conditions of in vitro digestion. *Food Chemistry*, 96, 281–289.

Baini R, Langrish TAG. (2007) Choosing appropriate drying model for intermittent and continuous drying of bananas. *Journal of food Engineering*, 79, 330-343.

Bakker J, Timberlake CF. (1985). The distribution of anthocyanins in grape skin extracts of port wine cultivars as determined by high performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36 (12), 1315-1324.

Biehler E, Bohn T. (2010). Methods for assessing aspects of carotenoid bioavailability. *Current Nutrition & Food Science*, 6, 44–69.

Birt DF, Hendrich S, Wang W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 90 (2), 157-177.

Borek C. (1997) Antioxidants and cancer. *Science and Medicine*, 52-62.

Bouayed J, Bohn T. (2010). Exogenous antioxidants – double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative medicine and cellular Longevity*, 3, 228–237.

Bouayed J, Hoffmann L, Bohn T. (2011) Total phenolic, flavonóides, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food chemistry*, 128, 14-21.

Bouayed J. (2010). Polyphenols: A potential new strategy for the prevention and treatment of anxiety and depression. *Current Nutrition & Food Science*, 6, 13–18.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28 (1), 25-30.

Catherine AR, Packer L. (2003) *Flavonoids in health and disease*. Copyright. New York, Basel.

Cilla A, González-Sarrías A, Tomás-Barberán FA, Espín JC, Barberá R. (2009). Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to in vitro gastrointestinal digestion and their effects on proliferation, cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. *Food Chemistry*, 114, 813–820.

Corrêa RM, Corrêa SKVB, Pinto JEBP, Reis ES, Alves LA. (2004). Rendimento de óleo essencial e caracterização organoléptica de folhas de asa-peixe submetidas a diferentes métodos de secagem. *Cienc Agrotec*, 28, 339-344.

Degáspari CH, Waszczynskyj N. (2004) Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica*, 5, 33-40.

Detaille D, Sanchez C, Sanz N, Lopez NJM, Leverve X, El-Mir M. (2008). Interrelation between the inhibition of glycolytic flux by silibinin and the lowering of mitochondrial ROS production in perfused rat hepatocytes. *Life Scienc*, 82, 1070–1076.

Dôres RGR. (2007) Análise morfológica e Fitoquímica da Fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth). Universidade Federal de Viçosa. Brasil. Disponível em: http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde_arquivos/17/TDE-2007-04-18T081213Z-453/Publico/06%20-%20capitulo%204.pdf.

Doymaz I. (2005) Sun drying of figs: an experimental study. *Journal of Food Engineering*, 71, 403-407.

El Hajji H, Nkhili E, Tomao V, Dangles O. (2006). Interactions of quercetin with iron and copper ions: Complexation and autoxidation. *Free Radical Research*, 40, 303–320.

Falleh H, ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M, Abdelly C. (2008) Phenolic composition of *cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Sciencedirect*, 372-379.

Ferreira A, Candeias M. (2005) Secagem solar de frutos e plantas aromáticas. *Revista de Ciências Agrárias* 28 (1), 363-370.

Ferreira D, Guyot S, Marnet N, Delgadillo I, Renard C, Coimbra M. (2002) Composition of Phenolic Compounds in a Portuguese Pear (*Pyrus communis* L. Var. S. Bartolomeu) and Changes after Sun-Drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4537-4544.

Filip V, Plockova M, Smidrkal J, Spickova Z, Melzoch K, Schmidt S. (2003). Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. *Food Chemistry*, 83(4), 585-593.

Giada MLR, Mancini J. (2006) Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. *UEPG Ciências Biológicas e da Saúde*, 12 (4), 7-15.

Gonçalves FJ, Rocha SM., Coimbra MA. (2012) Study of the retention capacity of anthocyanins by wine polymeric material. *Food Chemistry*, 134 (2), 957-963.

Gouveia SC, Castilho PC. (2012) Phenolic composition and antioxidant capacity of cultivated artichoke, Madeira cardoon and artichoke-based dietary supplements. *Food research international*, 48, 712-724.

Halliwel B, Aeschbach R, Loliger J, Arouma OI. (1995) The Characterization of Antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33, 601-617.

Harborne JB. (1973) Flavonoids as systematic markers in the angiosperms. *Chemistry in botanical classification*, 103-150.

Harborne JB. (1977) Flavonoids and evolution of the angiosperms. *Biochem Syst. Ecol*, 5, 7-22.

Hinsberger A, Sandhu BK. (2004) Digestion and absorption. *Current Paediatrics*, 14, 605-611

Huang D, Ou B, Prior R. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.

Hussain SR, Cillar J, Cillard P. (1987). Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, 26, 2489-2491.

Karathanos VT, Belessiotis. (1997) Sun and artificial air drying kinetics of some agricultural products. *Journal of Food Engineering*, 31, 35-46.

Katalinic, V., Milos, M., Modun, D., Music, I., & Boban, M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chemistry*, 86(4), 593-600.

Kim EY, Jho HK, Kim DI, Rhyu MR. (2008). *Cirsium japonicum* elicits endothelium-dependent relaxation via histamine H (1)-receptor in rat thoracic aorta. *J.Ethnopharmacol*, 116, 223-227.

King A, Young G. (1999) Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 99 (2), 213-218.

Lachman, J., Šulc, M., & Schilla, M. (2007). Comparison of the total antioxidant status of Bohemian wines during the wine-making process. *Food Chemistry*, 103(3), 802-807.

Lee KW, Kim YJ, Kim DO, Lee HJ, Lee CY. (2003) Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (22), 6516–6520.

Lee YN. (2002) *Flora of Korea*. Kyohak Publishing Co. Ltd., 844.

Marques LG. (2008) *Liofilização de Frutas Tropicais*. Tese de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, Brasil.

Mateos R, Espartero JL, Trujillo M, Ríos JJ, León-Camacho M, Alcudia F. (2001). Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (5), 2185-2192

Mazza G., Brouillard R. (1990). The mechanism of copigmentation of anthocyanins in aqueous-solutions. *Phytochemistry*, 29 (4), 1097-1102.

McDougall GJ, Dobson P, Smith P, Blake A, Stewart D. (2005). Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (15), 5896–5904

McDougall GJ, Fyffe S, Dobson P, Stewart D. (2005). Anthocyanins from red wine – Their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 66 (21), 2540-2548.

Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. (2005) Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 99, 571–577.

Noguchi N, Niki E. (2000). Forum: Therapeutic Applications of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Human Disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 1538-1546.

Pedersen AM, Bardow A, Jensen SB, Nauntofte B. (2002). Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Diseases*, 8 (3), 117–129.

Peleg H, Bodine KK, Noble AC. (1998) The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. *Chemical Senses*, Oxford, 23 (3), 371-378.

Peterson J, Dwyer J. (1998) Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, 18 (12) 1995-2018.

Pietta PG, Mauri PL, Manera E, Ceva PL, Rava A. (1989). An improved HPLC determination of flavonoids in medicinal plant extracts. *Chromatographia*, 27, 509-512.

Pitombo RNM. (1989) A liofilização como técnica de conservação de material de pesquisa. *Ciência e Cultura*, 41 (5), 427-431.

Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M. (2001) Antioxidants in food: Practical applications. CRC press, 285-310.

Portis E, Barchi L, Acquadro A, Macua JI, Lanteri S. (2005) Genetic diversity assessment in cultivated cardoon by AFLP (amplified fragment length polymorphism) and microsatellite markers. *Plant Breeding*, 1242, 99–304

Radünz LL, Melo EC, Martins PM. (2002) Secagem de alecrim pimenta (*Lippiasidoide*s Cham.) em secador de leito fixo. *Rev Bras Plant Med*, 5, 79-82.

Re R, Pellgrimi N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Evans CR, (1999). Antioxidant activity applying on improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26, 1231-1237.

Robba L, Carine MA, Russell SJ, Raimondo FM. (2005) The monophyly and evolution of *Cynara* L. (Asteraceae) sensu lato: evidence from the internal transcribed spacer region of nrDNA. *Plant Systematics and Evolution*, 253, 53–64.

Rodrigues RC, Almeida JC, Pereira CD, Gomes DS, Madanelo JP, Oliveira MJ, Fonseca ML. (2000) Queijo Serra da Estrela Processos tradicionais e Inovações Tecnológicas. Direção Regional de Agricultura da Beira Litoral. Coimbra, Portugal.

Sá FV, Barbosa M. (1990) O Leite e os seus produtos. 5. Clássica Editora. Lisboa, Portugal.

Sacilik K. (2007) Effect of drying methods on thin-layer drying characteristics of hull-less seed pumpkin (*Cucurbita pepo* L.). *Journal of Food Engineering*, 79, 23-30.

Saura-Calixto F, Serrano J, Goni I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101, 492–501.

Schultz V. (2002) *Fitoterapia racional: um guia de fitoterapia para ciências da saúde*. Barueri, Manole.

Shahidi F, Naczk M. (2004). *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. CRC Press, 1 (14), 403-414.

Sharma A, Chen CR, Lan NV. (2009) Solar-energy drying systems: A review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 13, 1185-1210.

Silva RJ, Sousa I, Laureano O, (2003). Factores condicionantes de vinificação e conservação na cor de vinhos portugueses. X Congresso brasileiro de vinicultura e enologia, 69.

Simões C. (2000) *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Tese de mestrado. Ed Universidade UFRGS. Porto Alegre, Florianópolis.

Smith PM (1976) *The chemotaxonomy of plants*. Tese de mestrado. Edward Arnold, Bristol.

Soares SE. (2002) Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de nutrição*, 15 (1), 71-81

Tagliacruzchi D, Verzelloni E, Bertolini D, Conte A. (2010) In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120, 599–606.

Wiklund A. (1992) The genus *Cynara* L. (Asteraceae-Cardueae). *Botanical journal of the linnean society*, 109, 75-123.

Youngson R. (1995) *Como Combater os Radicais Livres: O Programa de Saúde dos Antioxidantes*. Rio de Janeiro, Campos.

Zamora F. (2003) *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*. Madrid Ediciones Mundi-Prensa, 1, 225.

Zheleva-Dimitrova D, Zhelev I, Dimitrova.Dyulgerova I. (2011) Antioxidant activity of some Carduud species growing in Bulgaria. *Free radicals and antioxidants*, 1 (4), 15-20.