

# Atividade antioxidante de flores de amor-perfeito submetidas a radiações ionizantes

## Antioxidant activity of pansy flowers submitted to ionizing radiations

Amanda Koike<sup>1,2</sup>, Isabel C.F.R. Ferreira<sup>1\*</sup> e Anna L.C.H. Villavicencio<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigação de Montanha (CIMO), ESA, Instituto Politécnico de Bragança, Campos de Santa Apolónia, 1172, 5301-855 Bragança, Portugal

<sup>2</sup>Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares –IPEN/CNEN-SP, Av. Prof. Lineu Prestes 2242, Cidade Universitária, São Paulo, Brasil

(E-mail: \*iferreira@ipb.pt)

<http://dx.doi.org/10.19084/RCA16221>

Recebido/received: 2016.12.22

Recebido em versão revista/received in revised form: 2017.02.20

Aceite/accepted: 2017.02.20

### RESUMO

As flores comestíveis são cada vez mais usadas em preparações culinárias, sendo necessárias novas abordagens para melhorar a sua conservação e segurança. O tratamento de irradiação pode ser a resposta a estes problemas, garantindo a qualidade dos alimentos, prolongando o tempo de prateleira e promovendo a desinfestação de alimentos. As flores de *Viola tricolor* L. (amor-perfeito) são amplamente utilizadas em preparações culinárias, sendo também reconhecidas pelas suas propriedades antioxidantes e componentes bioativos. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antioxidante de flores de *V. tricolor* submetidas ao processamento por radiação gama e feixe de elétrons a 0,5; 0,8 e 1,0 kGy. As propriedades antioxidantes foram avaliadas através dos ensaios da atividade captadora de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), poder redutor e inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno. Os fenóis totais foram determinados utilizando o ensaio de Folin-Ciocalteu. As amostras irradiadas demonstraram uma atividade antioxidante mais elevada, especialmente as tratadas com 1,0 kGy, independentemente da fonte de radiação, apresentando uma maior capacidade de neutralização de radicais DPPH e inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno. Assim sendo, os tratamentos de irradiação aplicados demonstram ser uma tecnologia viável para incrementar o potencial antioxidante das pétalas de flores comestíveis.

**Palavras-chave:** flores comestíveis, *Viola tricolor*, radiações ionizantes, atividade antioxidante.

### ABSTRACT

Edible flowers are increasingly being used in culinary preparations, which require new approaches to improve their conservation and safety. Irradiation treatment might be the answer to these problems, ensuring food quality, increasing shelf-life and disinfection of foods. *Viola tricolor* L. (johnny-jump-up) flowers are widely used in culinary preparations, being also acknowledged for their antioxidant properties and bioactive components. The purpose of this study was to evaluate the antioxidant activity of *V. tricolor* flowers submitted to electron beam and gamma irradiation at 0.5, 0.8 and 1.0 kGy, as also of non-irradiated samples (control). The antioxidant properties were evaluated through 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging activity, reducing power and  $\beta$ -carotene bleaching inhibition assays. Total phenolics were also determined, using the Folin-Ciocalteu assay. The irradiated samples displayed a higher antioxidant activity, especially those treated with 1.0 kGy, independently of source, translated in a higher capacity to scavenge DPPH and to inhibit  $\beta$ -carotene bleaching. Accordingly, the applied irradiation treatments seemed to represent a feasible technology to preserve the quality of edible flower petals.

**Keywords:** edible flowers, *Viola tricolor*, ionizing radiation, antioxidant activity.

## INTRODUÇÃO

O mercado de flores comestíveis está em expansão em Portugal e no mundo, devido à crescente tendência da aplicação de flores na gastronomia, gerando um aumento de variedades e crescimento económico.

As flores comestíveis são utilizadas, desde há muitos anos, em preparações culinárias com a finalidade de adicionar beleza, aroma, cor e sabor. Atualmente, este tipo de aplicação na gastronomia tem como objetivo melhorar a qualidade sensorial e nutricional dos alimentos, pois diversas espécies possuem substâncias biologicamente ativas (Creasy, 1999; Mlcek e Rop, 2011; Anderson *et al.*, 2013). No entanto, são altamente perecíveis e devem estar livres de insetos, o que representa um desafio, pois são normalmente cultivadas sem o uso de agrotóxicos. A sua alta perecibilidade requer armazenamento em pequenas embalagens plásticas, em ambientes refrigerados, o que representa um custo adicional na cadeia comercial. Vários métodos são aplicados pela indústria de alimentos para aumentar a vida de prateleira de produtos alimentícios, assim como garantir a sua qualidade e segurança (Kelley *et al.*, 2003; Newnam e O'Conner, 2009; Farkas e Mohácsi-Farkas, 2011). Tratamentos capazes de aumentar a vida útil e garantir a segurança desses produtos poderiam constituir alternativas para minimizar tais problemas (Rop *et al.*, 2012).

O processo de irradiação de alimentos tem demonstrado ser uma ferramenta eficaz na preservação e extensão da vida útil de produtos perecíveis, na melhoria da qualidade sanitária, na desinfestação de insetos e segurança alimentar, podendo ser usado para tratar uma grande variedade de alimentos (Farkas, 2006; Farkas e Mohácsi-Farkas, 2011). Esse processo consiste na exposição do alimento às radiações ionizantes, é utilizado em vários países, e a sua eficiência e segurança tem recebido aprovação por diversas autoridades, como FAO, OMS, AIEA, UE e FDA e o Codex Alimentarius (Morehouse, 2002; Komolprasert *et al.*, 2007; Farkas e Mohácsi-Farkas, 2011). As flores de amor-perfeito são pequenas, e delicadas, possuem sabor refrescante e textura aveludada, o que permite a sua aplicação desde sobremesas a pratos quentes; além de utilizadas

como alimento, também têm aplicação na medicina. As suas atividades biológicas, com destaque para as propriedades antioxidantes, são atribuídas à presença de flavonoides, sendo a violantina o principal composto encontrado (Vukics *et al.*, 2008a, b; Mlcek e Rop, 2011; Hellinger *et al.*, 2014). Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antioxidante de flores de *V. tricolor* submetidas ao processamento por radiação gama e feixe de elétrons a 0,5, 0,8 e 1,0 kGy.

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de flores comestíveis da espécie *V. tricolor* (amor-perfeito) foram adquiridas de um distribuidor especializado em flores comestíveis do Brasil.

O processamento por radiação foi realizado no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN, São Paulo, SP – Brasil. As amostras não irradiadas foram utilizadas como grupo controlo. No processamento por radiação gama utilizou-se uma fonte de  $^{60}\text{Co}$  Gammacell 200 (Nordion Ltd., Ottawa, ON, Canadá), à temperatura ambiente ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ), com taxa de dose de 1,26 kGy/h, nas doses 0,5, 0,8; 1,0 kGy. O acelerador de feixes de elétrons (Dynamitron, Radiation Dynamics Inc., Edgewood, NY, EUA), foi utilizado à temperatura ambiente ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ), e foram aplicadas as mesmas doses: 0,5; 0,8 e 1,0 kGy. Após irradiação, as amostras foram liofilizadas (SL404, Solab, São Paulo, Brasil) e armazenadas em embalagem hermeticamente fechada. O procedimento de extração e ensaios de atividade antioxidante foram realizados no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada – do Instituto Politécnico de Bragança – Portugal. Os extratos hidrometanólicos (80:20, metanol/água) foram preparados a partir de uma metodologia anteriormente descrita (Barros *et al.*, 2008).

### Atividade captadora de radicais DPPH

A atividade captadora do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) foi avaliada de acordo com uma metodologia já descrita (Barreira *et al.*, 2008). As amostras (30  $\mu\text{L}$ ) das diferentes concentrações das soluções de extrato foram adicionadas nos

poços da microplaca juntamente com a solução metanólica (270 µL) contendo radicais DPPH ( $6 \times 10^5$  mol/L). A mistura foi mantida durante 60 min em repouso ao abrigo da luz. A redução do radical DPPH foi determinada medindo a absorbância a 515 nm em leitor de microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc.; Winooski, VT, EUA).

### *Inibição da descoloração do β-caroteno*

A realização do ensaio de inibição da descoloração do β-caroteno, decorreu com base numa metodologia já descrita (Barreira *et al.*, 2008). A solução de β-caroteno foi preparada por dissolução de 2 mg de β-caroteno em 10 mL de clorofórmio. Transferiu-se 2 mL desta solução para um balão de fundo redondo e o clorofórmio foi removido com auxílio de um rotaevaporador a 40°C. O ácido linoleico (40 mg), emulsionante Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 mL) foram adicionados ao balão com agitação vigorosa. As alíquotas (4,8 mL) da emulsão foram adicionadas a tubos de ensaio contendo 0,2 mL de solução extrato com diferentes concentrações, e leu-se a absorbância inicial a 470 nm em espectrofotómetro UV-Vis Specord 200 (AnalytikJena, Alemanha). Após leitura, os tubos foram incubados a 50°C em banho-maria sob agitação por um período de 2 h e mediu-se novamente a absorbância.

### *Poder redutor*

A avaliação do poder redutor foi realizada de acordo com uma metodologia já descrita (Barros *et al.*, 2011). Às diferentes concentrações dos extratos (0,5 mL) foi adicionado solução tampão de fosfato de sódio (200 mmol/L, pH 6,6, 0,5 mL) e ferricianeto de potássio (1% w/v, 0,5 mL). Em seguida, as amostras foram colocadas num banho-maria a 50°C durante 20 min e, posteriormente, adicionou-se ácido tricloroacético (10 % w/v, 0,5 mL). Transferiram-se 0,8 mL da solução para uma microplaca de 48 poços, adicionando água desionizada (0,8 mL) e cloreto férrico (0,1% w/v, 0,16 mL) e a absorbância foi medida a 690 nm no leitor de microplacas.

### *Determinação de teor de fenólicos*

Os fenóis totais foram determinados pelo ensaio de *Folin-Ciocalteu* de acordo com uma metodologia já descrita (Barros *et al.*, 2008). A solução de extrato (1 mL) foi misturada com o reagente de *Folin-Ciocalteu* (5 mL, previamente diluído com água 1:10, v/v) e 2 mL de solução de carbonato de sódio (diluído em água 75 g/L). Após homogeneização no vórtex, os tubos de ensaio foram colocados em banho seco a 40°C durante 30 min. A absorbância foi medida a 765 nm.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados da capacidade antioxidante do extrato de *V. tricolor* processado com radiação gama e feixes de eletrões estão representados nos Quadros 1 e 2. As amostras do extrato de *V. tricolor* irradiada mostraram maior poder redutor do que o grupo controlo, independente da fonte de radiação utilizada. Contudo, os resultados das amostras processadas com a dose de 0,8 kGy em acelerador de eletrões evidenciaram um alto potencial de inibição da descoloração do β-caroteno em relação às restantes doses aplicadas e ao controlo. Efeitos semelhantes foram observados em estudos da influência do processo de irradiação em substâncias antioxidantes presentes em alimentos, que descreveram um aumento significativo no teor de fenólicos de amostras de *Cammellia sinensis* e *Ilex paraguariensis* tratadas com doses máximas de 10,0 kGy (Furgeri *et al.*, 2009; Fanaro *et al.*, 2014). Entretanto, não é conhecido o motivo pelo qual tal fenómeno acontece, evidenciando a necessidade de esclarecer os efeitos do processamento com radiação, visto que pode haver um aumento da disponibilidade de substâncias relevantes para manutenção da saúde humana. Ao comparar os resultados dos ensaios realizados neste trabalho em relação às fontes de radiação utilizadas, é notória a diferença encontrada na capacidade de inibição do β-caroteno nas amostras irradiadas por acelerador de eletrões em relação as amostras processadas com radiação gama. Nos demais ensaios não houve diferenças estatisticamente significativas tanto nas diferentes doses de radiação como na fonte utilizada.

**Quadro 1** - Atividade antioxidante expressa em valores de EC<sub>50</sub> de amostras de *Viola tricolor* irradiadas por 60 Co acordo com a dose de radiação

Ensaio	Valores de EC <sub>50</sub> (mg/mL de extrato)			
	Dose de irradiação			
	controle	0,5 kGy	0,8 kGy	1,0 kGy
Poder redutor	0,29±0,01 <sup>a</sup>	0,21±0,01 <sup>a</sup>	0,27±0,01 <sup>a</sup>	0,30±0,01 <sup>a</sup>
Folin – Ciocalteu*	177±21 <sup>a</sup>	178±12 <sup>a</sup>	170±19 <sup>a</sup>	179±10 <sup>a</sup>
DPPH	0,25±0,02 <sup>a</sup>	0,25±0,01 <sup>a</sup>	0,23±0,04 <sup>a</sup>	0,22±0,01 <sup>a</sup>
Inibição de descoloração do β-caroteno	2,03±0,30 <sup>a</sup>	1,63±0,30 <sup>a</sup>	1,62±0,10 <sup>a</sup>	1,00±0,20 <sup>b</sup>

Valores representam a média±desvio padrão.

Letras iguais na mesma linha indica igualdade estatística (p>0,05).

Letras diferentes na mesma linha indica diferença estatística (<0,05).

\* Resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato.

**Quadro 2** - Atividade antioxidante expressa em valores de EC<sub>50</sub> de amostras de *Viola tricolor* irradiadas por acelerador de elétrons de acordo com a dose de radiação

Ensaio	Valores de EC <sub>50</sub> (mg/mL de extrato)			
	Dose de irradiação			
	controle	0,5 kGy	0,8 kGy	1,0 kGy
Poder redutor	0,29±0,01 <sup>a</sup>	0,19±0,01 <sup>a</sup>	0,20±0,01 <sup>a</sup>	0,34±0,02 <sup>a</sup>
Folin – Ciocalteu*	177±21 <sup>a</sup>	156±11 <sup>a</sup>	200±10 <sup>a</sup>	168±12 <sup>a</sup>
DPPH	0,25±0,02 <sup>a</sup>	0,23±0,01 <sup>a</sup>	0,29±0,01 <sup>a</sup>	0,23±0,01 <sup>a</sup>
Inibição de descoloração do β-caroteno	2,03±0,30 <sup>a</sup>	1,67±0,07 <sup>a</sup>	6,61±0,5 <sup>a</sup>	2,05±0,36 <sup>b</sup>

Valores representam a média±desvio padrão.

Letras iguais na mesma linha indica igualdade estatística (p>0,05).

Letras diferentes na mesma linha indica diferença estatística (<0,05).

\* Resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato.

## CONCLUSÕES

De acordo com os resultados dos ensaios expostos no presente trabalho, conclui-se que o processamento das amostras por radiação não comprometeu a atividade antioxidante da espécie de flor comestível *V. tricolor*. Portanto, a irradiação das mesmas demonstrou-se uma tecnologia viável para preservar a qualidade de flores comestíveis.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) pelo apoio financeiro ao CIMO (projeto estratégico PEst-OE/AGR/UI0690/2014). À CNEN, CAPES, CNPq e IPEN-CNEN/SP e projeto bilateral FCT-CNPq, Portugal/Brasil 2014.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, R.; Schnelle, R. & Bastin, S. (2012) – *Edible flowers*. University of Kentucky – College of Agriculture.
- Barreira, J.C.M.; Ferreira, I.C.F.R.; Oliveira, M.B.P.P. & Pereira, J.A. (2008) – Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chemistry*, vol. 107, n. 3, p. 1106-1113. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.030>
- Barros, L.; Cabrita, L.; Vilas Boas, M.; Carvalho, A.M. & Ferreira, I.C.F.R. (2011) – Chemical, biochemical and electrochemical assays to evaluate phytochemicals and antioxidant activity of wild plants. *Food Chemistry*, vol. 127, n. 4, p. 1600-1608. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.024>
- Barros, L.; Falcão, S.; Baptista, P.; Freire, C.; Vilas-Boas, M. & Ferreira, I.C.F.R. (2008) – Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chemistry*, vol. 111, n. 1, p. 61-66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.033>
- Creasy, R. (1999) – *The edible flowers garden* (2<sup>nd</sup> ed.). Periplus Editions, Boston. ISBN: 962-593-293-3.
- Fanaro, G.B.; Hassimotto, N.M.A.; Bastos, D.H.M. & Villavicencio, A.L.C.H. (2014) – Effects of  $\gamma$ -radiation on microbial load and antioxidant proprieties in black tea irradiated with different water activities. *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 97, p. 217-222. <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2013.11.036>
- Farkas, J. & Mohácsi-Farkas, C. (2011) – History and future of food irradiation. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 22, n. 2-3, p. 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.002>
- Farkas, J. (2006) – Irradiation for better foods. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 17, n. 4, p. 148-152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.003>
- Furgeri, C.; Nunes, T.C.F.; Fanaro, G.B.; Souza, M.F.F.; Bastos, D.H.M. & Villavicencio, A.L.C.H. (2009) – Evaluation of phenolic compounds in maté (*Ilex paraguariensis*) processed by gamma radiation. *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 78, n. 7-8, p. 639-641. <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2009.03.056>
- Hellinger, R.; Koehbach, J.; Fedchuk, H.; Sauer, B.; Huber, R.; Gruber, C. W. & Gründemann, C. (2014) – Immunosuppressive activity of an aqueous *viola tricolor* herbal extract. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 151, n. 1, p. 299-306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.044>
- Kelley, K.M.; Cameron, A.C.; Biernbaum, J.A. & Poff, K.L. (2003) – Effect of storage temperature on the quality of edible flowers. *Postharvest Biology and Technology*, vol. 27, n. 3, p. 341-344. [http://dx.doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00096-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00096-0)
- Komolprasert, V. (2007) – Packaging for foods treated by ionizing radiation. In: Jung, H.H. (Ed.) – *Packaging for nonthermal processing of food*. IFT Press/Blackwell Publishing. ISBN: 978-0-8138-1944-0
- Mlcek, J. & Rop, O. (2011) – Fresh edible flowers of ornamental plants – A new source of nutraceutical foods. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 22, n. 10, p. 561-569. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2011.04.006>
- Morehouse, K.M. (2002) – Food irradiation – US regulatory considerations. *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 63, n. 3-6, p. 281-284. [http://dx.doi.org/10.1016/S0969-806X\(01\)00514-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0969-806X(01)00514-X)
- Newnam, S.E. & O'Conner, A.S. (2009) – *Edible flowers*. Colorado State University Extension.
- Rop, O.; Mlcek, J.; Jurikova, T.; Neugebauerova, J. & Vabkova, J. (2012) – Edible flowers – A new promising source of mineral elements in human nutrition. *Molecules*, vol. 17, n. 6, p. 6672-6683. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules17066672>
- Vukics, V.; Kery, A.; Bonn G. K. & Guttman, A. (2008a) – Major flavonoid components of heartsease (*Viola tricolor* L.) and their antioxidant activities. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 390, n. 7, p. 1917-1925. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-008-1885-3>
- Vukics, V.; Ringer, T.; Kery, A.; Bonn, G. K. & Guttman, A. (2008b) – Analysis of heartsease (*Viola tricolor* L.) flavonoid glycosides by micro-liquid chromatography coupled to multistage mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, vol. 1206, n. 1, p. 11-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.017>