



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL INSTITUTO DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

LUZIA CAROLINE RAMOS DOS REIS

**Efeito do Processamento na Concentração de Substâncias Bioativas em Brócolis e
Couve-flor**

Porto Alegre

2014

LUZIA CAROLINE RAMOS DOS REIS

**Efeito do Processamento na Concentração de Substâncias Bioativas em Brócolis e
Couve-flor**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios

Co-Orientadora: Prof. Dra. Simone Hickmann Flôres

Porto Alegre

2014

CIP- Catalogação na Publicação

Ramos dos Reis, Luzia Caroline
Efeito do Processamento na Concentração de
Substâncias Bioativas em Brócolis e Couve-flor / Luzia
Caroline Ramos dos Reis. -- 2014.

94 **f.**

Orientador: Alessandro de Oliveira Rios.
Coorientadora: Simone Hickmann Flôres.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Brócolis. 2. Couve-flor. 3. Processamento. 4.
Compostos Bioativos. I. de Oliveira Rios,
Alessandro, orient. II. Hickmann Flôres, Simone,
coorient. III. Título.

Autora: Luzia Caroline Ramos dos Reis (Nutricionista/UCS).

Título da dissertação: Efeito do processamento na Concentração de Substâncias Bioativas em Brócolis e Couve-flor

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Dissertação aprovada por:

Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios

Orientador - PPGCTA/ UFRGS

Prof^a. Dr^a. Simone Hickmann Flôres

Co-orientadora - PPGCTA/UFRGS

Prof^a. Dr^a. Elizete Maria Pesamosca Facco (UCS)

Membro da comissão julgadora

Prof^a. Dr^a. Vanuska Lima da Silva (UFRGS)

Membro da comissão julgadora

Prof^a. Dr^a. Florencia Cladera Olivera (PPGCTA/UFRGS)

Membro da comissão julgadora

Prof. Dr. Marco Antonio Zachia Ayub

Coordenador do PPGCTA

Prof. Dr. Vitor Manfroi

Diretor do ICTA/ UFRGS

Porto Alegre, novembro de 2014.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
Diâna e Luiz pelo carinho, por
sempre me incentivar a estudar e pela
confiança que depositam em mim.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por me dar forças para enfrentar esta fase de minha vida.

Agradeço ao meu namorado, Daniel, por ser paciente, me entender e me esperar durante o tempo em que ficamos longe.

Ao meu irmão Luiz Augusto, que plantou, cuidou e colheu os vegetais para que eu realizasse a pesquisa e também por me levar e me buscar a maior parte das vezes que precisei para ir para Porto Alegre e voltar para casa.

À minha irmã Cristine, por me incentivar nos estudos e até a chorar comigo nos momentos de saudade.

Aos meus avós, tios, primos por torcerem por mim!

Ao meu primo Luiz Augusto Ramos, por ser tão gentil e pela acolhida em sua casa durante todo o tempo em que precisei ficar em Porto Alegre.

Aos meus Orientadores, Professor Alessandro de Oliveira Rios e Professora Simone Hickmann Flôres pela paciência em me ensinar e sanar todas as dúvidas.

As colegas Anne, Camila, Emanuela e Priscilla, pelos momentos de descontração e risadas!

A todos os colegas do Laboratório de Compostos Bioativos.

Ao Roberval, pela ajuda no Laboratório 213.

Aos técnicos do Laboratório 214, Andressa, Andreza e Cristofer por me ajudar nas análises com espectrofotometria e HPLC.

À todos aqueles que torceram por mim (professores e colegas da Graduação).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	16
1.2 OBJETIVO GERAL.....	18
1.2.1 Objetivos Específicos	18
CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA	20
2. REVISÃO	21
2.1 VEGETAIS	21
2.1.1 Couve-flor	22
2.1.2 Brócolis	24
2.2 COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NOS VEGETAIS.....	26
2.2.1 Carotenoides	27
2.2.2 Clorofila	29
2.2.3 Compostos Fenólicos	31
2.3 AÇÃO ANTIOXIDANTE DOS COMPOSTOS BIOATIVOS.....	33
2.4 ESTABILIDADE DOS COMPOSTOS BIOATIVOS NO DESCONGELAMENTO.....	37
2.5 ESTABILIDADE DOS COMPOSTOS BIOATIVOS PROCESSAMENTO TÉRMICO.....	39
2.5.1 Vegetais In Natura	43
2.5.2 Processamento em Ebulição	43
2.5.3 Processamento a Vapor	45

2.5.4 Processamento em Micro-ondas	48
2.5.5 Processamento em <i>Sous vide</i>	49
2.6 CULTIVO ORGÂNICO DE VEGETAIS	50
CAPÍTULO 2: ARTIGOS	54
EFFECT OF DIFFERENT THAWING CONDITIONS ON THE CONCENTRATION OF BIOACTIVE SUBSTANCES IN BROCCOLI (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Avenger</i>)	55
1. Introduction	56
2. Materials and methods.....	58
2.1. <i>Sample preparation</i>	58
2.2. <i>Physicochemical analysis</i>	58
2.3. <i>Bioactive compound analysis</i>	59
2.3.1. <i>Total phenolic compounds</i>	59
2.3.2. <i>Chlorophyll content</i>	60
2.3.3. <i>Quercetin and kaempferol</i>	60
2.3.4. <i>Vitamin C</i>	61
2.3.5. <i>Carotenoid profile</i>	61
2.3.6. <i>Vitamin A</i>	62
2.4. <i>Statistical Analysis</i>	63
3. Results and discussion	63
3.1. <i>Physicochemical and color</i>	63
3.2. <i>Phenolic compounds, chlorophylls, flavonoids and vitamin C</i>	66
3.3. <i>Carotenoids content</i>	69
4. Conclusions	71
References	71

EFFECT OF PROCESSING ON THE CONCENTRATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN BROCCOLI (<i>Brassica oleracea</i> var. Avenger) AND CAULIFLOWER (<i>Brassica oleracea</i> var. Alphina F1) GROWN IN AN ORGANIC SYSTEM	75
1. Introduction	75
2. Materials and methods	76
2.1. <i>Plant materials</i>	76
2.2. <i>Field experiment and agriculture conditions</i>	76
2.3. <i>Sample preparation</i>	76
2.4. <i>Physicochemical analysis</i>	76
2.5. <i>Bioactive compounds analysis</i>	76
2.5.1. <i>Chlorophyll content</i>	76
2.5.2. <i>Quercetin and kaempferol</i>	76
2.5.3. <i>Carotenoids profile</i>	77
2.5.4. <i>Vitamin A</i>	77
2.5.5. <i>Antioxidant activity</i>	77
2.6. <i>Statistical Analysis</i>	77
3. Results and discussion	77
3.1. <i>Proximate composition</i>	77
3.2. <i>Physicochemical</i>	77
3.3. <i>Chlorophyll and flavonoids</i>	79
3.4. <i>Carotenoids</i>	79
3.5. <i>Antioxidant capacity</i>	81
3.6. <i>Principal Component Analysis</i>	82
4. Conclusions	82

Reference list	82
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
4. CONCLUSÃO.....	84
5. REFERÊNCIAS	85

LISTA DE FIGURAS**CAPÍTULO 2: ARTIGOS****EFFECT OF COOKING ON THE CONCENTRATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN BROCCOLI (*Brassica oleracea* var. Avenger) AND CAULIFLOWER (*Brassica oleracea* var. Alphina F1) GROWN IN AN ORGANIC SYSTEM**

Figure 1. Principal component analysis of organic broccoli (a) and cauliflower (b) in different processing conditions..... 81

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1: Composição Centesimal em 100g de Couve-flor Crua e Couve-flor Cozida	24
Tabela 2: Composição Centesimal em 100g de Brócolis Cru e Brócolis Cozido	26

CAPÍTULO 2: ARTIGOS

EFFECT OF DIFFERENT THAWING CONDITIONS ON THE CONCENTRATION OF BIOACTIVE SUBSTANCES IN BROCCOLI (*Brassica oleracea* var. Avenger)

Table 1: Physicochemical analyzes and color parameters of broccoli (dry sample) after different thawing conditions with mean and standard deviation	66
Table 2: Analysis of phenolic compounds, chlorophylls, flavonoids and vitamin C in broccoli (dry sample) after different thawing conditions with mean and standard deviation	69
Table 3: Analysis of carotenoids in broccoli ($\mu\text{g}/100$ g dry sample) after different thawing conditions with mean and standard deviation.....	70

EFFECT OF COOKING ON THE CONCENTRATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN BROCCOLI (*Brassica oleracea* var. Avenger) AND CAULIFLOWER (*Brassica oleracea* var. Alpha F1) GROWN IN AN ORGANIC SYSTEM

Table 1: Proximate composition (mean \pm standard deviation) in 100 g of dry weight ..	77
Table 2: Mean and standard deviation of physicochemical analysis and color parameters in different processes	78

Table 3: Analysis chlorophyll and flavonoids in different processes (mean and standard deviation)	79
Table 4: Analysis of carotenoids in different processes ($\mu\text{g}/100$ g dry weight; mean and standard deviation)	80
Table 5: Antioxidant activity of broccoli and cauliflower inflorescences in different processes (g of dry weight /g DPPH; mean and standard deviation)	80

RESUMO

O brócolis e a couve-flor são vegetais que pertencem a família *Brassicaceae* e contém um complexo de substâncias bioativas, como os compostos fenólicos, os carotenoides, os flavonoides, as clorofilas, vitaminas e minerais. O consumo destes vegetais está associado com a redução do risco de câncer, doenças cardiovasculares, catarata e outros distúrbios funcionais relacionados com a idade, por apresentar compostos bioativos. O descongelamento e o processamento são métodos que modificam as condições físicas e químicas e podem afetar a quantidade de compostos bioativos nos alimentos. Deste modo, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes condições de descongelamento (temperatura ambiente, temperatura refrigerada e micro-ondas) sobre o conteúdo de substâncias bioativas em brócolis (*Brassica oleracea* var. avenger); também avaliar o efeito do processamento (ebulição, vapor, micro-ondas e *sous vide*) na estabilidade de compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides, clorofila, vitamina A e atividade antioxidante em inflorescências de brócolis e couve-flor cultivados em sistema orgânico. Os resultados mostraram que o descongelamento em micro-ondas reteve maiores conteúdos de vários compostos bioativos analisados, entre eles a clorofila, os compostos fenólicos e a quercetina. Observou-se que para ambas as hortaliças (brócolis e couve-flor) o processamento contribuiu, de alguma maneira, para o aumento do conteúdo de compostos antioxidantes, devido ao rompimento do tecido vegetal pelo aquecimento, mostrando uma maior capacidade antioxidante no processamento em *sous vide* para o brócolis e a couve-flor orgânica.

Palavras-chaves: brócolis, couve-flor, carotenoides, clorofila, flavonoides, processamento.

ABSTRACT

Broccoli and cauliflower are vegetables that belong to the *Brassicaceae* family and contains a complex of bioactive substances, such as phenolic compounds, carotenoids, flavonoids, chlorophylls, vitamins and minerals. The consumption of these vegetables is associated with reduce of the risk of cancer, cardiovascular disease, cataracts, and other functional disorders related to age, for presenting bioactive compounds. Thawing and processing are methods that modify the physical and chemical conditions and can affect the amount of bioactive compounds in foods. Thus, this study aimed to evaluate the effect of different thawing conditions (room temperature, refrigerated temperature and microwave) on the content of bioactive compounds in broccoli (*Brassica oleracea* var. avenger); also evaluate the effect of processing (boiling, steaming, microwave and *sous vide*) on the stability of phenolic compounds, flavonoids, carotenoids, chlorophyll, vitamin A and antioxidant activity in inflorescences of broccoli and cauliflower grown in organic system. The results showed that thawing in microwave retained higher contents of various bioactive compounds analyzed, including chlorophylls, phenolic compounds and quercetin. It was observed that both vegetables (broccoli and cauliflower) processing contributed in some way to increase the content of antioxidant compounds, due to disruption of the plant tissue by heating, showing a higher antioxidant capacity in *sous vide* process for organic broccoli and cauliflower.

Keywords: broccoli, cauliflower, carotenoids, chlorophyll, flavonoids, processing.

1. INTRODUÇÃO

O consumo regular de frutas e hortaliças está associado com a redução dos riscos de Doenças Crônicas Não-Transmissíveis (DCNT), como o câncer, doenças cardiovasculares, catarata e outros distúrbios funcionais relacionados com a idade, em função de esses alimentos conterem compostos bioativos (VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009).

A ingestão de alimentos que contém compostos fenólicos pode estar relacionada com uma redução do risco de doenças cardiovasculares e de vários tipos de câncer. A adaptação da ingestão alimentar pela seleção cuidadosa de cultivares e métodos de processamento pode ter um potencial relevante (VOLDEN *et al.*, 2009).

A família *Brassicaceae*, também chamada de *Cruciferae*, possui exemplares importantes empregados na dieta humana. Entre esta família, destaca-se o brócolis (*Brassica oleracea*) e a couve-flor (*Brassica oleracea*) (ARBOS *et al.*, 2004). Esses vegetais podem ser consumidos durante todo o ano, como ingredientes de diferentes saladas ou após o cozimento de matérias-primas. A contribuição de Brassicas para a melhoria da saúde pode estar relacionada com sua capacidade antioxidante devido à presença de compostos fenólicos, carotenoides (principalmente a luteína e o β -caroteno), flavonoides (principalmente quercetina e campferol), vitaminas A e C e minerais como cálcio, potássio, ferro e zinco (KRINSKY, 1994; PODSEDEK, 2007).

As plantas que possuem propriedades antioxidantes estão relacionadas com a presença de compostos fenólicos, particularmente ácidos fenólicos e os flavonoides. Os carotenoides têm mostrado exibir várias funções biológicas, que são associados com a redução do risco de doenças degenerativas, prevenção de catarata, a redução na

incidência de degeneração macular causada por envelhecimento e à redução da incidência de DCNT (GÜLÇİN, 2012; KRINSKY, 1994; PODSEDEK, 2007).

Algumas hortaliças são suscetíveis ao processamento e ao armazenamento, e perdas consideráveis de compostos bioativos podem ocorrer nestas etapas. O processo de congelamento, se realizado de maneira adequada, pode manter as características nutricionais dos alimentos por um maior período de tempo. Contudo, o modo como o processo de descongelamento é conduzido, também pode influenciar nos teores nutricionais do produto final, principalmente em relação aos compostos bioativos. O descongelamento é um processo complexo que altera as condições físicas e químicas e pode afetar significativamente a qualidade dos alimentos (STINCO *et al.*, 2013).

Já no processamento de hortaliças, o conteúdo de compostos e a capacidade antioxidante podem ser alterados. Nicoli *et al.* (1999) apontaram diferentes consequências da armazenagem e processamento sobre as propriedades antioxidantes de alimentos, como a perda de antioxidantes naturalmente presentes, melhora da capacidade antioxidante de compostos bioativos, formação de novos compostos com atividade antioxidante ou pró-oxidante ou, ainda, nenhuma mudança na concentração de antioxidantes.

Alguns estudos realizados mostram que o processamento de hortaliças, principalmente aqueles em que se empregam altas temperaturas em um curto período de tempo, podem aumentar a disponibilidade de compostos fenólicos, carotenoides e a atividade antioxidante. Porém, para os flavonoides e as vitaminas, não há perdas significativas, ou observa-se uma redução após o processamento (MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2013a; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2013b; ZHANG, HUMAUZU, 2004; GĘBCZYŃSKI, KMIECIK, 2006; MAZZEO *et al.*, 2011; WACHTEL-GALOR *et al.*, 2008; MIGLIO *et al.*, 2008).

Assim, torna-se importante analisar o conteúdo de compostos bioativos em vegetais como o brócolis e a couve-flor, cultivados em sistema orgânico, além de verificar a estabilidade ou retenção de tais substâncias frente a diferentes processos.

1.2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes condições de descongelamento (temperatura ambiente, temperatura refrigerada e micro-ondas) nas características físico-químicas e no teor de compostos bioativos de brócolis (*Brassica oleracea* var. avenger), além de avaliar a influencia de diferentes processamentos térmicos (ebulição, vapor, micro-ondas e *sous vide*) nas características de qualidade e na concentração dos compostos bioativos de brócolis (*Brassica oleracea* var. avenger) e couve-flor (*Brassica oleracea* var. Alphina F1) cultivados em sistema orgânico.

1.2.1. Objetivos Específicos

1.2.1.1. Avaliar o efeito de diferentes condições de descongelamento (temperatura ambiente, temperatura refrigerada e micro-ondas) em brócolis através da:

- Determinação das características físico-químicas pelas análises de pH, SST, Aw, parâmetros de cor (L*, a* e b*), textura e umidade.
- Determinação dos compostos bioativos, clorofilas, compostos fenólicos, carotenoides, flavonoides, vitamina A e ácido ascórbico.

1.2.1.2. Avaliar diferentes processamentos térmicos (ebulição, vapor, micro-ondas e sous vide) para brócolis e couve-flor (Brassica oleracea var. avenger) cultivados em sistema orgânico através da:

- Determinação das características físico-químicas através das análises de pH, Sólidos Solúveis Totais (SST), parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) e textura.
- Determinação da composição centesimal através das análises de umidade, proteínas, lipídeos, carboidratos, fibras e cinzas.
- Determinação dos compostos bioativos, clorofilas, compostos fenólicos, atividade antioxidante, carotenoides, flavonoides e vitamina A.

CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO

2.1 VEGETAIS

Os vegetais e as frutas são fontes de nutrientes essenciais, e seu consumo tem sido associado à prevenção ou ao tratamento da obesidade e da manifestação da Síndrome Metabólica que é caracterizada pela associação de fatores de risco para as doenças cardiovasculares, vasculares periféricas e diabetes (COSTA; ROSA, 2010).

Resultados de pesquisas epidemiológicas sugerem que uma dieta humana rica em vegetais pode diminuir a incidência de câncer, predominantemente do trato gastrointestinal. Este efeito pode ser atribuído a fatores como a menor ingestão de energia (calorias), a presença de vitaminas (pró-vitamina A, vitaminas C e E), ao aumento do teor de fibras na alimentação, a presença de compostos específicos com propriedades quimiopreventivas contra a ação de algumas substâncias cancerígenas, além de estarem geralmente associadas à diminuição do uso de carne e de gordura, que, por si só pode contribuir para reduzir a incidência do câncer (HOCMAN, 1989).

Os efeitos protetores dos vegetais na dieta contra DCNT surgem a partir de uma combinação de vários componentes de alimentos. Destes, a maioria das pesquisas se concentram na ação antioxidante (WILLIAMSON, 1996).

Além disso, destaca-se que o consumo de vegetais deve ser desprovido de fertilizantes nitrogenados e excesso de resíduos de pesticidas. Deve-se evitar o consumo de algumas plantas contendo agentes cancerígenos naturalmente presentes nas plantas, tais como nitritos e lectinas, bem como o excesso de especiarias e de vegetais contaminados com micotoxinas (HOCMAN, 1989).

Os vegetais fornecem uma ótima combinação de fitoquímicos como antioxidantes naturais, fibras e outros compostos bioativos. No entanto, a capacidade de

promoção de saúde dos vegetais depende do tipo de processamento empregado, pois este pode afetar o conteúdo, a atividade e a biodisponibilidade de compostos bioativos (PUUPPONEN-PIMIA *et al.*, 2003).

As principais variáveis durante processamento de vegetais são os níveis de enzimas endógenas, atividade de água, pressão de oxigênio, energia térmica e mecânica. O tecido vegetal não processado é mais estável em comparação com o material triturado ou moído, onde as enzimas são ativadas devido à quebra de paredes celulares, reunindo substratos e enzimas (PUUPPONEN-PIMIA *et al.*, 2003).

Os vegetais crucíferos são relativamente boas fontes de antioxidantes, e há uma abundante variação substancial e significativa entre as subespécies para os fitoquímicos presentes, indicando que os benefícios para a saúde também dependem do genótipo de cada vegetal (SINGH *et al.*, 2007).

Vegetais do gênero *Brassica* L. contém substâncias bioativas com potencial para reduzir o estresse oxidativo induzido por danos no DNA, o que pode explicar o efeito preventivo dessas plantas contra o câncer, bem como o seu papel protetor em DCNT (SOENGAS *et al.*, 2011).

2.1.1. Couve-flor

A Couve-flor (*Brassica oleracea*) originária da costa do Mediterrâneo, difundiu-se pela Europa no início do século XVII e foi introduzida no Brasil com a vinda dos primeiros imigrantes italianos. É composta por flores brancas bem unidas, rodeadas de folhas alongadas, sendo consumida cozida, em saladas, sopas, refogados, gratinados e suflês (PHILIPPI, 2006).

A couve-flor pode ser produzida e consumida praticamente durante todo o ano no Brasil, sendo que os principais meses mais representativos de produção são fevereiro, março, abril maio, julho, agosto e dezembro (ORNELAS, 2007).

Em relação ao valor nutricional, segundo o teor de glicídios, a couve-flor é classificada como um vegetal do grupo A, contendo apenas 5% de glicídios (ORNELAS, 2007).

Ahmed e Ali (2013) analisaram a composição centesimal das inflorescências de couve-flor (*Brassica oleracea* var. botrytis L.) *in natura* e encontraram 88,64 % de umidade, 5,39 % de carboidratos, 3,15 % de proteínas, 0,25 % de lipídeos e 1,25 % de cinzas. Kahlon *et al.* (2007) analisaram as inflorescências de couve-flor após processamento em ebulição e encontraram 92,67 % de umidade. Picchi *et al.* (2012) analisaram o teor de SST de duas variedades de couve-flor *in natura* (*Brassica oleracea* var. Magnifico e var. Emeraude) e encontraram 5,76 e 5,54, respectivamente.

Na Tabela 1, encontram-se os valores nutricionais de couve-flor crua e cozida, de acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011).

Verifica-se que no processamento térmico realizado na couve-flor cozida com água em ebulição, durante 20 minutos, houve perda de vitaminas hidrossolúveis, como a vitamina B2, B3 e diminuição da vitamina C. Houve também, diminuição no teor de todos os minerais, exceto para o zinco.

Portanto, torna-se importante não analisar somente os valores nutricionais, mas também o teor de compostos fenólicos, carotenoides, o conteúdo de clorofila e a ação antioxidante deste vegetal, devido a associação aos seus benefícios à saúde dos seres humanos.

Tabela 1. Composição Centesimal em 100g de amostra úmida de Couve-flor Crua e Couve-flor Cozida.

	Couve- flor Crua	Couve-flor Cozida
Umidade (%)	92,8	94,3
Kcal	23	19
Proteínas (g)	1,9	1,2
Lipídeos (g)	0,2	0,3
Carboidratos (g)	4,5	3,9
Fibra Alimentar (g)	2,4	3,1
Cálcio (mg)	18	16
Magnésio (mg)	12	5
Manganês (mg)	0,16	0,10
Fósforo (mg)	57	25
Ferro (mg)	0,5	0,1
Sódio (mg)	3	2
Potássio (mg)	256	80
Zinco (mg)	0,3	0,3
Vitamina B1 (mg)	0,03	0,04
Vitamina B2 (mg)	0,09	-
Vitamina B3 (mg)	0,10	-
Vitamina C (mg)	36,1	23,7

Tabela TACO, 2011.

2.1.2. Brócolis

O brócolis (*Brassica oleracea*) pertencente à família da couve, é um vegetal cujo nome vem do italiano *brocco*, que significa broto, pois a brotação floral é a parte comestível. Entretanto, são também consumidos os talos e as folhas, normalmente cozidos. O brócolis pode ser produzido e consumido praticamente durante todo o ano, (PHILLIPI, 2006; ORNELAS, 2007).

Em relação ao valor nutricional, segundo o teor de glicídios, o brócolis é classificado como um vegetal do grupo A, contendo apenas 5% de glicídios

(ORNELAS, 2007). Krause e Mahan (1991) citam que os principais minerais presentes no brócolis são o cálcio, o ferro e o magnésio.

Murcia *et al.* (1999) analisaram a composição centesimal e perfil de ácidos graxos das inflorescências de brócolis (*Brassica oleracea L. var. italica*) e encontraram 85,60 % de umidade, 4,72% de proteínas, 0,95 % de lipídeos e 1,13 % de cinzas. O ácido graxo predominante foi o ácido linolênico (45,40 %), seguido por ácido linoleico (18,70 %) e ácido palmítico (15,80 %).

Lin e Chang (2005) observaram as mudanças na textura em diferentes condições de processamentos em brócolis (*Brassica oleracea var Italica Plenck*) e concluíram que as amostras diretamente cozidas em água fervente por 8 minutos tiveram uma força de cisalhamento mais baixa e as amostras cozidas a 50 °C durante 10 minutos tiveram o valor mais elevado que as amostras *in natura*.

Martínez-Hernández *et al.* (2013a) encontraram 46,10 N para brócolis (*B. oleracea var. italica*) *in natura*, 13,30 N para ebulição convencional, 21,3 N para ebulição a vácuo, 11,30 para vapor, 7,8 N para cozimento com pressão, 44,00 N para micro-ondas convencional, 40 N para micro-ondas / *sous vide*, 40,7 N para fritura convencional, 40 N para fritura a vácuo, 42 N para o grelhado e 19,30 N para *sous vide*.

Na Tabela 2, encontram-se os valores nutricionais de brócolis cru e cozido, fornecidos pela Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011).

Verifica-se que no processamento térmico realizado no brócolis cozido com água em ebulição, durante 20 minutos, houve perda de vitaminas hidrossolúveis, como a vitamina B3, B6 e diminuição da vitamina B1 e B2. Porém, o teor de vitamina C aumentou, podendo ser devido ao rompimento do tecido vegetal pelo aquecimento, apresentando um maior teor deste micronutriente. Houve também, diminuição no teor de todos os minerais, após o processamento de brócolis.

Tabela 2. Composição Centesimal em 100g de amostra úmida de Brócolis Cru e Brócolis Cozido.

	Brócolis Cru	Brócolis Cozido
Umidade (%)	91,2	92,6
Kcal	25	25
Proteínas (g)	3,6	2,1
Lipídeos (g)	0,3	0,5
Carboidratos (g)	4,0	4,4
Fibra Alimentar (g)	2,9	3,4
Cálcio (mg)	86	51
Magnésio (mg)	30	15
Manganês (mg)	0,26	0,12
Fósforo (mg)	78	33
Ferro (mg)	0,6	0,5
Sódio (mg)	3	2
Potássio (mg)	322	119
Zinco (mg)	0,5	0,2
Vitamina B1 (mg)	0,12	0,04
Vitamina B2 (mg)	0,18	0,03
Vitamina B3 (mg)	1,39	-
Vitamina B6 (mg)	0,08	-
Vitamina C (mg)	34,3	42

Tabela TACO, 2011.

2.2. COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NOS VEGETAIS

Os compostos bioativos ocorrem naturalmente nos alimentos, principalmente as frutas e vegetais contém, por exemplo, pigmentos naturais que estão relacionados com importantes atividades biológicas. Seus efeitos benéficos em relação à saúde estão relacionados com suas propriedades antioxidantes, proteção contra danos oxidativos a componentes celulares, efeitos anti-inflamatórios e prevenção das doenças crônicas não transmissíveis. Tais compostos também agem conjuntamente com outras substâncias como as vitaminas e os minerais (VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009).

Alguns exemplos desses fitoquímicos presentes em frutas e vegetais são os carotenoides e os compostos fenólicos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

2.2.1. Carotenoides

Os carotenoides são comuns na natureza com mais de 600 compostos já identificados. Os benefícios que os carotenoides propiciam à saúde podem ser divididos em duas áreas principais: (1) atividade antioxidante na proteção das células contra dano oxidativo, que leva a doenças degenerativas, tais como a aterosclerose, câncer, artrite e degeneração macular e (2) atividade pró-vitamínica, como, por exemplo: β -caroteno e α -caroteno que tem atividade pró-vitamínica A, que podem ser convertidos na mucosa intestinal para a vitamina A (DOWNHAM; COLLINS, 2000).

Muitas pesquisas científicas indicam benefícios para a saúde a partir dos carotenoides, sendo que a maior parte tem foco no β -caroteno isolado, mas atualmente cada vez mais provas de que os carotenoides trabalham sinergicamente, indicando que o consumo misto de compostos bioativos é mais benéfico, a partir de fontes alimentares (DOWNHAM; COLLINS, 2000).

Os carotenoides também demonstraram várias funções biológicas como a redução do risco de doenças degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares e degeneração macular (de SÁ; RODRIGUEZ-AMAYA, 2003). A luteína e a zeaxantina são carotenoides encontrados na região macular do olho e alguns estudos sugerem que estes pigmentos podem proteger contra a degeneração macular relacionada com a idade e a principal causa de cegueira em pessoas com idade superior a 65 anos. Há também uma redução da incidência de catarata e propriedades anticancerígenas (OLEAA *et al.*, 2012). A criptoxantina tem sido investigada e vários estudos mostraram que este

carotenoide impede a hipertrofia dos adipócitos, sendo eficaz na prevenção da obesidade e melhoria dos sintomas da síndrome metabólica (TAKAYANAGI; MUKAI, 2014). Há também uma redução moderada do colesterol LDL, colesterol total e redução do risco de osteoporose, quando combinado com os fitoesteróis (GRANADO-LORENCIO *et al.*, 2014). O α -caroteno é relatado como tendo um efeito inibidor sobre a progressão de determinados tipos de câncer. O β -caroteno capta os radicais livres e é o carotenoide com maior atividade pró vitamínica A, a qual foi atribuída uma atividade de 100 % (DOWNHAM; COLLINS, 2000; BAUERNFEIND, 1972).

Kurilich *et al.* (1999) analisaram os teores de carotenoides por cromatografia líquida de alta eficiência em várias subespécies *Brassica oleracea*, entre eles o brócolis e a couve-flor *in natura*. Para o brócolis, os valores (em amostra úmida) encontrados foram de 0,03 mg/100 g de α -caroteno e 0,89 mg/100 g de β -caroteno. Para a couve-flor, os valores de α -caroteno foram abaixo do nível de detecção (ND) e 0,07 mg/100 g de β -caroteno.

Fernández-León *et al.* (2013), avaliaram o teor de carotenoides por cromatografia líquida de alta eficiência em brócolis fresco e após o armazenamento em atmosfera modificada. Eles encontraram 0,6 mg/100 g e 0,8 mg/100 g em amostra úmida, respectivamente para a luteína e β -caroteno. O resultado de β -caroteno encontrado por estes autores foi semelhante ao resultado descrito acima e encontrado por Kurilich *et al.* (1999), que foi de 0,8 mg/100 g.

Kaulmann *et al.* (2014) analisaram o perfil de carotenoides por cromatografia líquida de alta eficiência em diferentes subespécies *Brassica oleracea*, entre eles a couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) e duas variedades de brócolis: o ‘verde’ (*Brassica oleracea* var. *itálica* cv. verde calabrese) e o ‘marathon’ (*Brassica oleracea* var. *itálica* cv. Marathon). Os resultados encontrados (em amostra úmida) para a couve-

flor foram 22,4 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de β -caroteno, 15,7 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de β -criptoxantina, 28,9 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de luteína, 6,49 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de violaxantina e 1 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de neoxantina. Para os brócolis variedades 'verde' e 'marathon', os resultados foram respectivamente: 1138 e 873 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de β -caroteno, 15,10 e 8,24 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de β -criptoxantina, 2805 e 1905 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de luteína, 564 e 538 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de violaxantina e 164 e 139 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de neoxantina. Observou-se que o carotenoide prevalente, tanto na couve-flor quanto no brócolis, foi a luteína.

2.2.2. Clorofila

As clorofilas são os pigmentos naturais verdes mais abundantes presentes nas plantas e ocorrem nos cloroplastos das folhas e em outros tecidos vegetais. Possuem tom verde oliva e são obtidas de vegetais ou parte de vegetais como a grama, lucerne e urtiga (DOWNHAM; COLLINS, 2000).

O átomo de magnésio, importante para o indivíduo sob o ponto de vista bioquímico, é liberado da clorofila em diversas condições de armazenamento e/ou processamento do alimento e até durante a passagem pelo trato gastrointestinal, tornando-se disponível para a absorção. Entretanto, devido à abundância desse mineral nos alimentos tanto vegetais, como animais, é bastante raro um quadro de deficiência em indivíduos sadios e com alimentação balanceada. Por outro lado, o fitol, que é parte integrante da molécula de clorofila, parece ser responsável por efeitos biológicos importantes, tais como atividade termogênica em mamíferos e atividade inibidora sobre efeitos teratogênicos do retinol (LANFER-MARQUEZ, 2003).

A cor verde presente em alguns vegetais (como brócolis) é devido à clorofila, encontrada apenas em tecidos fotossintéticos, que desempenha um papel importante na

prevenção de várias doenças associadas ao estresse oxidativo, tais como câncer, doenças cardiovasculares e outras DCNT (SÁNCHEZ *et al.*, 2014).

Yuan *et al.* (2010) analisaram o teor de clorofila total por espectrofotometria em brócolis fresco e submetido a diferentes processamentos (ebulição, vapor, micro-ondas, fritura/ebulição e fritura) e observaram que o processamento em vapor não apresentou reduções significativas no conteúdo de clorofila em comparação ao *in natura*. Já nos demais processos, observaram-se elevadas perdas de clorofila total.

Aquino *et al.* (2011), avaliaram os teores de clorofila 'a', clorofila 'b' e clorofila 'total' por espectrofotometria em inflorescências de brócolis *in natura* e submetidos a diferentes tratamentos térmicos (vapor, água em ebulição, pressão e água, pressão em vapor durante 2, 4 e 6 minutos). Os teores de clorofila 'a' encontrados nas inflorescências de brócolis *in natura* foram de 5,120 µg/g; para clorofila 'b' os valores encontrados foram de 6,848 µg/g e para clorofila 'total' os teores foram de 11,968 µg/g. Observou-se que após o tratamento de água em ebulição por 2 minutos os teores de clorofila 'a' foram maiores (7,58 µg/g em amostra úmida) que as inflorescências *in natura* e que nos demais tratamentos. Já para as clorofilas 'b' e 'total', os tratamentos térmicos reduziram a sua quantidade.

Fernández-León *et al.* (2013), analisaram o conteúdo de clorofila 'a' e 'b' em brócolis fresco e após armazenamento em atmosfera modificada. Eles encontraram para as inflorescências *in natura* 9,38 mg/100 g de amostra úmida para clorofila 'a' e 3,24 mg/100 g de amostra úmida para clorofila 'b'.

Sánchez *et al.* (2014) analisaram o processamento em alta pressão (625 MPa durante 5 minutos a 20 °C) e alta pressão/alta temperatura (625 MPa durante 5 minutos a 70 °C e 117 °C) sobre o conteúdo de clorofilas 'a' e 'b' em vários vegetais, entre eles o brócolis. Observou-se que após o tratamento em alta pressão a 20 °C, não houve

reduções significativas no conteúdo de clorofila 'a'; já para clorofila 'b', observou-se um aumento significativo após este tratamento nas inflorescências de brócolis. Em relação ao tratamento de alta pressão e alta temperatura a 70 ° C, observou-se uma degradação significativa de clorofila 'a' de cerca de 27 % no brócolis, já na clorofila 'b', o conteúdo manteve-se estável após o tratamento e até mesmo uma significativa elevação (25%) foi apontada após este tratamento. Por último, no tratamento em alta pressão e alta temperatura a 117 °C observaram-se reduções significativas tanto na clorofila 'a', quanto na clorofila 'b' nas inflorescências de brócolis.

2.2.3. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são um grupo muito diversificado de fitoquímicos que estão largamente distribuídos nas plantas, tais como frutos, vegetais, chá, azeite, tabaco e dentre outros. Hoje em dia, há um crescente interesse em substâncias exibindo propriedades antioxidantes, que são fornecidas aos humanos como componentes alimentares ou como produtos farmacêuticos preventivos específicos. Por conseguinte. Sabe-se que as plantas que possuem propriedades antioxidantes e farmacológicas estão relacionadas com a presença de compostos fenólicos, especialmente os ácidos fenólicos e os flavonoides (GULÇIN, 2012).

Dentre as muitas ações dos flavonoides, sobressaem-se as atividades antioxidantes e os efeitos anti-neoplásicos. Estes compostos naturais têm várias vantagens sobre outros agentes terapêuticos pelas seguintes razões: (1) muitas dietas são ricas nestes fenólicos e são consumidos diariamente; (2) Raramente tem quaisquer efeitos secundários; (3) Têm meia-vida relativamente longa; (4) Podem ser facilmente absorvidos no intestino após a ingestão (TANWAR; MODGIL, 2012).

O estudo dos flavonoides é complexo, devido à heterogeneidade das diferentes estruturas moleculares e a escassez de dados sobre sua biodisponibilidade. Há uma necessidade de melhorar as técnicas analíticas para permitir a coleta de mais dados sobre absorção e excreção. Pensa-se que os flavonoides sozinhos ou em combinação com outras medidas preventivas e/ou estratégias terapêuticas tornar-se-ão futuros medicamentos eficazes contra a maioria das doenças degenerativas comuns, tais como câncer, diabetes e complicações cardiovasculares (TANWAR; MODGIL, 2012).

Puupponen-Pimia *et al.* (2003), analisaram as inflorescências de couve-flor *in natura* e encontraram 5,6 mg de ácido gálico/g de amostra seca de compostos fenólicos totais, 0,07 mg/g de quercetina e 0,025 mg/g de campferol. Sultana, Anwar e Iqbal (2008) também analisaram as inflorescências de couve-flor e encontraram 0,027 g de ácido gálico/100 g de amostra fresca para compostos fenólicos totais.

Volden *et al.* (2009) analisaram o teor de compostos fenólicos totais de cinco cultivares diferentes de couve-flor *in natura* (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), dois brancos (cv. 'Aviso', 'Dania'), um roxo (cv. 'Grafitti'), um verde (cv. 'Emeraude') e um romanesco (cv. 'Celio'). Os resultados para a cultivar branca 'Aviso' foi de 66,6 mg de ácido gálico/100 g de amostra fresca; 62,5 mg de ácido gálico/100 g para a cultivar branca 'Dania'; 146,4 mg de ácido gálico/100 g para a cultivar roxa 'Grafitti'; 71,8 mg de ácido gálico/100 g para a cultivar verde 'Emeraude' e 74,2 mg de ácido gálico/100 g para a cultivar romanesco 'Celio'.

Fernández-León *et al.* (2013), avaliaram o teor de compostos fenólicos totais e individuais em brócolis fresco. Os resultados encontrados para compostos fenólicos totais foram de 147,15 mg de ácido clorogênico/100g de amostra fresca. Já para os compostos fenólicos individuais, foram analisados os flavonoides, sendo eles:

quercetina, onde o teor encontrado foi de 6,03 mg/100 g e campferol, onde o valor foi de 3,29 mg/100 g.

Kaulmann *et al.* (2014) analisaram o conteúdo de compostos fenólicos totais e flavonoides totais por espectrofotometria em diferentes subespécies *Brassica oleracea*, entre eles a couve-flor (*Brassica oleracea* var. botrytis) e duas variedades de brócolis: o ‘verde’ (*Brassica oleracea* var. itálica cv. verde calabrese) e o ‘marathon’ (*Brassica oleracea* var. itálica cv. Marathon). A couve-flor apresentou 45,2 mg de ácido gálico/ 100 g de fenólicos totais e 14,70 mg de catequina/ 100 g de flavonoides totais. O brócolis ‘verde’ apresentou 101 mg de ácido gálico/100 g de fenólicos totais e 65 mg de catequina/ 100 g de flavonoides totais. Já o brócolis ‘marathon’ apresentou 58,5 mg de ácido gálico/ 100 g de fenólicos totais e 37,6 mg de catequina/100 g de flavonoides totais.

2.3. AÇÃO ANTIOXIDANTE DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

O princípio da atividade antioxidante é baseado na disponibilidade de elétrons para neutralizar os radicais livres. Além disso, tal ação parece estar relacionada com o número e a natureza do padrão de hidroxilação no anel aromático. A capacidade para atuar com o hidrogênio doador e a inibição da oxidação são reforçados pelo aumento do número de grupos hidroxila no anel fenol (GULÇIN, 2012).

O organismo humano está sujeito ao estresse oxidativo causado por Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) provenientes do meio ambiente ou geradas pelo próprio organismo. Entre as biomoléculas alvo dessas espécies encontram-se as que compõem membranas celulares, proteínas DNA e RNA. Hoje em dia sabe-se que a ação de espécies oxidantes sobre o DNA é responsável por

mutação ou mesmo oncogênese. No entanto, o organismo é protegido em parte por macro e micromoléculas de origem endógena ou obtidas diretamente da dieta. A proteção enzimática baseia-se quase que exclusivamente na decomposição de ânion superóxido ou dismutação de peróxido de hidrogênio, agentes oxidantes brandos. Cabe às micromoléculas, tais como compostos bioativos (tocoferóis, carotenoides e flavonoides, entre outros), o papel de impedir o ataque de ERO e ERN ou regenerar os danos causados em sistemas biológicos essenciais. O mecanismo complexo de atividade antioxidante e pró-oxidante destas substâncias está diretamente relacionado com a melhoria da qualidade de vida do ser humano (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A clorofila tem sido usada para cicatrização de feridas, como propriedades antígeno-tóxica e antimutagênica. Esta também foi citada como um desodorizante para reduzir o odor corporal e mau hálito. Certamente a clorofila recebeu muito menos interesse do que os carotenoides, mas parece ter potencial contra mutagênicos ambientais e alimentares. Cada vez mais os alimentos funcionais têm sido vistos como uma forma de abordar as deficiências nutricionais, que podem contribuir para muitas doenças degenerativas (DOWNHAM; COLLINS, 2000).

Várias são as afirmações veiculadas pelos meios de comunicação que procuram atribuir à ingestão de clorofila os mais diferentes benefícios à saúde humana. Algumas enfatizam as doenças cardiovasculares, outras, as doenças tumorais e há quem afirme que a clorofila evita queda de cabelo, promove a desinfecção interna do organismo, auxilia no tratamento da hipertensão, na proteção hepática, no diabetes e inúmeros outros efeitos, que de uma maneira ou outra estariam relacionados com o “Bem-Estar” do indivíduo. Apesar da variedade de ações apontadas, essas teorias falham em encontrar comprovação científica que as sustentem e muitas estão realmente longe de serem comprovadas (LANFER-MARQUEZ, 2003).

O núcleo tetrapirrólico da clorofila, da feofitina ou mesmo de alguns derivados dessa molécula, seria capaz de exercer uma atividade antioxidante e quimiopreventiva. Entretanto a clorofila exerce, quando exposta à luz, efeito pró-oxidante (LANFER-MARQUEZ, 2003).

A atribuição de atividades quimiopreventivas, apesar do enorme interesse que suscita entre os pesquisadores, ainda fica restrita ao trato gastrointestinal e a explicação mais convincente, até o momento, favorece a teoria da complexação com a substância carcinogênica, à semelhança da fração fibra solúvel e de muitas outras substâncias fitoquímicas presentes em dietas vegetais (LANFER-MARQUEZ, 2003).

Kurilich *et al.* (2002) avaliaram o brócolis e concluíram que os seus extratos são protetores contra as espécies reativas de oxigênio e que há variabilidade no nível de proteção entre os genótipos. O conteúdo de ácido ascórbico, quercetina e campferol dos extratos hidrofílicos não pode explicar a variabilidade na capacidade antioxidante daqueles extratos. A luteína e a zeaxantina foram correlacionados com capacidade antioxidante dos extratos lipofílicos e explicam a variabilidade encontrada dentro daquelas frações. Diferenças na capacidade antioxidante encontradas entre os genótipos testados indica que a eficácia dos antioxidantes pode variar de genótipo a genótipo.

Melo *et al.* (2006) realizaram um estudo que avaliou a capacidade antioxidante de 15 hortaliças *in natura* e identificaram que o espinafre (220,56 µg/0,2 mL), a alface crespa (180,75 µg/0,2 mL), a cebola roxa (192,62 µg/0,2 mL), a cebola branca (170,45 µg/0,2 mL) e a couve-flor (163,42 µg/0,2 mL) apresentaram maior teor de compostos fenólicos totais. A couve-flor também apresentou moderada atividade antioxidante (60-70%). Portanto, este vegetal, além dos demais estudados, pode ser visto como fonte dietética de antioxidantes que pode trazer benefícios à saúde e, conseqüentemente, o seu consumo deve ser estimulado.

Wachtel-Galor *et al.* (2008) analisaram a capacidade antioxidante através do método FRAP (*ferric reducing/antioxidant power*) de inflorescências de couve-flor *in natura* e submetidas a diferentes processamentos (micro-ondas / ebulição / vapor por 5 e 10 minutos) e observaram que a hortaliça apresentou maior atividade antioxidante após o processamento. O processamento em vapor apresentou maior capacidade antioxidante, sendo que os valores mais do que duplicaram após 5 minutos, em comparação com a hortaliça *in natura*.

Martínez-Hernández *et al.* (2013b) analisaram as mudanças induzidas na atividade antioxidante em inflorescências de brócolis após vários processamentos (ebulição, ebulição a vácuo, vapor de baixa pressão, vapor de alta pressão, *sous vide*, micro-ondas, *sous vide*-micro-ondas, grelhado, fritura intensa e fritura intensa a vácuo) e demonstraram que a capacidade antioxidante aumentou após o cozimento em todos os tratamentos, com exceção de ebulição a vácuo. Os tratamentos *sous vide*, micro-ondas e fritura induziram os maiores aumentos (3.6 vezes). Esta melhoria na capacidade antioxidante pode ser explicada por várias formas: liberação de altas quantidades de componentes antioxidantes, devido à destruição térmica das paredes celulares e compartimentos sub-celulares; produção de fortes antioxidantes e eliminação do radical por reação química térmica; supressão da capacidade de oxidação de antioxidantes por inativação térmica de enzimas oxidativas e/ou a produção de novos antioxidantes não-nutrientes ou a formação de novos compostos, tais como produtos da reação de Maillard com atividade antioxidante.

Kaulmann *et al.* (2014) analisaram a capacidade antioxidante através dos métodos FRAP (Ferric-reducing antioxidant power) e ABTS (2-20-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt) em diferentes subespécies *Brassica oleracea*, entre eles a couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) e duas

variedades de brócolis: o ‘verde’ (*Brassica oleracea* var. itálica cv. verde calabrese) e o ‘marathon’ (*Brassica oleracea* var. itálica cv. Marathon). A couve-flor apresentou 72,4 mg/100 g de amostra úmida para radical ABTS e 533 $\mu\text{mol}/100$ g de amostra úmida para radical FRAP. O brócolis ‘verde’ apresentou 268 mg/100 g de amostra úmida de atividade antioxidante através do radical ABTS e 583 $\mu\text{mol}/100$ g de amostra úmida de atividade antioxidante através do radical FRAP. Já o brócolis ‘marathon’ apresentou 172 mg/100 g de amostra úmida de atividade antioxidante através do radical ABTS e 420 $\mu\text{mol}/100$ g de amostra úmida de atividade antioxidante através do radical FRAP.

2.4. ESTABILIDADE DOS COMPOSTOS BIOATIVOS NO DESCONGELAMENTO

Descongelar corretamente é essencial para maximizar a qualidade e a segurança dos vegetais. O descongelamento sob refrigeração a temperaturas abaixo de 5 °C e utilizando um forno micro-ondas são consideradas metodologias microbiologicamente seguras. Descongelar em micro-ondas ou cozinhar o vegetal diretamente são recomendados como parte de qualquer preparação da refeição. O processamento térmico garante segurança microbiológica, quando comparado com o descongelamento em temperatura ambiente e até mesmo na geladeira (MARTINS; SILVA, 2004).

Perdas nutricionais que ocorrem durante o descongelamento, podem diminuir os benefícios para a saúde de vegetais verdes congelados, como a quantidade de compostos fitoquímicos que estes vegetais contêm quando estão frescos, podendo também afetar gravemente a qualidade em termos de textura, teor de sólidos solúveis e entre outros (MARTINS; SILVA, 2004).

Alguns processos de descongelamento aplicados podem levar a perdas de compostos bioativos, como reportado por Oszmianski *et al.* (2009), onde foi avaliada a estabilidade de compostos fenólicos (antocianinas, ácido p-cumárico, ácido elágico, flavonóis, catequina e pró-antocianidinas) e flavonoides (quercetina e campferol) em três cultivares de morango (*Elkat*, *Kent* e *Senga Sengana*) em duas condições de descongelamento (micro-ondas por 5 minutos e a temperatura de 20 °C por 20 horas). O descongelamento em micro-ondas teve um efeito protetor em muitos compostos fenólicos tais como antocianinas, pró-antocianinas e catequina. Já para o conteúdo de flavonoides, observou-se que o descongelamento a 20° C por 20 horas, reteve maiores quantidades de quercetina nas variedades *Elkat* e *Senga Sengana*. Para o campferol, o descongelamento em micro-ondas apresentou maiores concentrações somente para a variedade *Kent*. Portanto, esta variação no teor de quercetina e campferol em variedades de morangos pode ser devido a fatores não só como cultivar, mas também a maturidade, o tamanho, a presença de aquênios e a extração por solvente.

Martins e Silva (2004) analisaram as perdas de clorofila (“a” e “b”) e vitamina C na qualidade de feijão verde em diferentes condições de descongelamento: temperatura ambiente (15 a 25°C) durante 3, 6, 9 e 12 horas de descongelamento; e temperatura refrigerada (7°C) durante 6, 12, 18 e 24 horas de descongelamento. Observou-se que as clorofilas “a” e “b” são melhores retidas no descongelamento a temperatura ambiente durante 3 horas de descongelamento. No descongelamento a temperatura refrigerada (após 6 horas a 7° C), a perda de clorofilas foi pequena quando comparada com a temperatura ambiente. Observou-se também que quanto mais tempo as amostras ficam descongelando, maior a perda de clorofilas, tanto para o descongelamento a temperatura ambiente, quanto para o descongelamento a temperatura refrigerada. Observou-se que o teor de vitamina C foi maior no descongelamento a temperatura ambiente (3 horas).

Holzwarth *et al.* (2012) analisaram o efeito de diferentes métodos de descongelamento (micro-ondas durante 10 minutos, temperatura de refrigeração a 4° C por 24 horas e temperatura ambiente a 20° C por 8 horas e 37° C por 2 horas) sobre o conteúdo de vitamina C em morangos e observou-se que o descongelamento em micro-ondas apresentou menores perdas de vitamina C (apenas 4%).

Stinco *et al.* (2013) analisaram a influência de diferentes condições de descongelamento (temperatura ambiente, temperatura de refrigeração e micro-ondas (800W por 20 segundos) em sucos de laranja sobre o teor de carotenoides totais e individuais. Concluiu-se que não houve diferença significativa nas diferentes condições de descongelamento sobre o conteúdo de carotenoides totais. Porém para os carotenoides individuais como luteína, zeaxantina, criptoxantina, α -caroteno, β -caroteno e vitamina A, o descongelamento em micro-ondas apresentou reduções significativas, quando comparado com o suco *in natura*, com o suco descongelado a temperatura ambiente e descongelado a temperatura de refrigeração.

2.5. ESTABILIDADE DOS COMPOSTOS BIOATIVOS NO PROCESSAMENTO TÉRMICO

O processamento térmico de alimentos pode ter ambos os efeitos benéficos e prejudiciais sobre os fitoquímicos dos vegetais. Estas modificações têm de ser tomadas em conta ao avaliar o valor nutricional dos vegetais e suas preparações. Além disso, o comportamento de alguns fitoquímicos em vegetais pode ser influenciado pela matriz do gênero alimentício, que devem ser mais bem avaliados (BUNEA *et al.*, 2008).

Os fatores que mais contribuem para a alteração de fitoquímicos em vegetais são temperatura, luz, oxigênio, umidade, pH do meio, agentes oxidantes e redutores e

presença de íons metálicos. Portanto, o processamento de alimentos induz mudanças e interações entre os constituintes de alimentos que podem afetar suas propriedades químicas e, conseqüentemente, a estabilidade de nutrientes, podendo apresentar um impacto positivo, em razão da destruição de inibidores ou através da formação de complexos desejáveis entre os componentes dos alimentos e os íons metálicos, melhorando assim sua biodisponibilidade, ou tendo um impacto negativo, em razão das perdas de nutrientes (CORREIA; FARAONI; PINHEIRO-SANT'ANA, 2008).

O aumento do conhecimento de mecanismos subjacentes (por exemplo, a difusividade, a degradação térmica, e os aspectos cinéticos) para perdas em vegetais processados é vital, de modo a adaptar os métodos para a otimização dos níveis de saúde relacionados aos fitoquímicos (VOLDEN *et al.*, 2009).

A avaliação das alterações ocorridas na capacidade antioxidante das hortaliças frente ao processamento parece ser um fator complicado, dada a complexidade desta propriedade e ampla variação entre os métodos de análise. Observa-se influência do método de preparo e do tipo de hortaliça, podendo ocorrer redução ou aumento da atividade antioxidante. A cocção pode ter uma influência negativa sobre alguns compostos antioxidantes, mas condições de cocção menos severas, como temperaturas menores (50°C) e tempo curto (30 segundos), podem ser benéficas em alguns casos, melhorando o valor nutricional das hortaliças. Isto deve ser levado em consideração ao se calcular a ingestão de antioxidantes (CAMPOS *et al.*, 2008).

A dificuldade de extração de carotenoides e compostos fenólicos de hortaliças cruas ainda parece ser um problema para a avaliação da real influência da cocção na retenção desses compostos, pois alguns trabalhos mostram uma maior eficiência de extração após a cocção. Esse aumento no teor de carotenoides pode ser atribuído a uma maior facilidade de extração, uma vez que o tratamento térmico além de inativar

enzimas oxidativas, desnatura complexos carotenoide-proteína existentes nas células vegetais (CAMPOS *et al.*, 2008).

Mazzeo *et al.* (2011) analisaram as inflorescências de couve-flor *in natura* e em diferentes processamentos (ebulição: água em ebulição por 9 minutos e; vapor: forno com atmosfera de pressão a 100 °C por 12 minutos) sobre o conteúdo de compostos fenólicos totais e flavonoides. Para os compostos fenólicos, foi observado que todos os métodos empregados diferiram e o maior conteúdo foi encontrado para o processamento em vapor. No conteúdo de flavonoides, observou-se que a quercetina aumentou após o processamento em vapor, porém para o campferol os processamentos tiveram um efeito contrário, apresentando menor conteúdo após o processamento.

Puupponen-Pimia *et al.* (2003) analisaram o teor de compostos fenólicos das inflorescências de couve-flor *in natura* e sob processo de branqueamento em água a 96 °C durante 3 minutos e encontraram 560 e 490 mg de ácido gálico/100 g de amostra seca, respectivamente, observando uma redução de 8.75 % de compostos fenólicos após o branqueamento. Os compostos fenólicos naturais contidos em alimentos são significativamente reduzidos após o processamento. No entanto, os tratamentos térmicos também podem induzir a formação de novos compostos que são antioxidantes, por exemplo, como é o caso de compostos formados durante a reação de Maillard.

Sikora *et al.* (2012) analisaram o efeito do processamento no conteúdo de flavonoides em várias subespécies da família Brassicacea, entre eles o brócolis (*Brassica oleracea* var. Botrytis Italica, cv. Sebastian), a couve-flor branca (*Brassica oleracea* var. Botrytis cv. Rober) e couve-flor verde (*Brassica oleracea* var. Botrytis cv. Amphora). Os teores de quercetina e campferol de todas as inflorescências diferiram significativamente, sendo que as amostras *in natura* apresentaram quantidades superiores comparadas com as processadas em ebulição.

Zhang e Hamauzu (2004) analisam o perfil de carotenoides (luteína, violaxantina, β -caroteno e carotenoides totais) em brócolis fresco e submetido a diferentes tratamentos térmicos (cocção convencional e micro-ondas para 30, 60, 90, 120 e 300 segundos) e observaram que apenas a luteína aumentou após o processamento, com maior teor (27,3%) após 300 segundos nas duas condições de processamento. Para os demais carotenoides, o processamento teve um efeito negativo sobre o conteúdo de carotenoides.

Gebczynski e Kmiecik (2007) analisaram o conteúdo de carotenoides em inflorescências de couve-flor branca (*Brassica oleracea* var. Planita F1) e verde (*Brassica oleracea* var. Trevi F1) *in natura* e submetidas a branqueamento e cozimento. Os resultados encontrados foram que o branqueamento reduziu o conteúdo de carotenoides, no entanto o cozimento produziu um aumento no teor de carotenoides em relação ao *in natura*, tanto na variedade 'branca', quanto na 'verde'.

Martínez-Hernández *et al.* (2013b) analisaram o conteúdo de luteína em inflorescências de brócolis *in natura* e submetidas a diferentes processamentos (ebulição, vapor de baixa pressão, vapor de alta pressão, *sous vide*, micro-ondas, *sous vide*-micro-ondas e grelhado). Todos os processamentos aumentaram o conteúdo de luteína em relação à hortaliça *in natura*. Os processos em ebulição e micro-ondas-*sous vide* apresentaram as quantidades mais elevadas de luteína e as concentrações mais baixas ocorreram no processamento em *sous vide*, devido ao longo tempo de cozimento e as altas temperaturas.

Testando a influência de diferentes formas de cocção de brócolis sobre a sua atividade antioxidante, Lin e Chang (2005), relataram aumento da atividade antioxidante, medida pelo poder de redução, em amostras pré-cozidas por 10 minutos a 50°C e cozidas por 8 minutos em água fervente, em relação às amostras frescas. Os

autores atribuíram estes resultados à danificação do tecido vegetal pelo aquecimento, com conseqüente, maior exposição dos compostos antioxidantes. Contudo, os autores não determinaram o teor de compostos bioativos presentes no brócolis.

2.5.1. Vegetais *In natura*

Os vegetais frescos ou *in natura* são uma fonte de vitaminas, minerais e fibras e diminuem o risco de algumas Doenças Crônicas Não-Transmissíveis (DCNT), o seu consumo é incentivado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2006).

Dentre as vitaminas presentes nos vegetais *in natura*, destacam-se principalmente a vitamina C, as vitaminas do complexo B, e a pró-vitamina A (β -caroteno). Nos minerais destacam-se: o ferro, o cálcio, o potássio e o magnésio (PHILIPPI, 2006).

Os vegetais *in natura* são mais práticos e seu consumo pode ser imediato, pois exige apenas a remoção da parte não comestível, seguido de higienização (PHILIPPI, 2006). Também melhoram as características sensoriais do cardápio, pelo seu colorido e variedade de sabor, favorecendo a sua aceitação (ORNELAS, 2007).

2.5.2. Processamento em Ebulição

No cozimento de vegetais por ebulição, ocorrem mudanças significativas na composição química dos compostos presentes, que afetam a biodisponibilidade e a concentração de nutrientes e de promoção da saúde de alguns destes compostos. O conteúdo de vitaminas e minerais, geralmente é menor após o processamento devido a lixiviação dos compostos através da água de ebulição. Já em alguns compostos

bioativos como os carotenoides e os polifenóis, pode ocorrer aumento destes após o processamento (PELLEGRINI *et al.*, 2010).

Puupponen-Pimia *et al.* (2003) analisaram o efeito do branqueamento (96 °C por 3 minutos) sobre o teor de compostos bioativos em couve-flor e encontraram perdas de 12,5 % de compostos fenólicos totais; maior conteúdo de quercetina e campferol após o branqueamento, mostrando 171 % e 200 %, respectivamente.

Nunn *et al.* (2006) analisaram o teor de α -caroteno e β -caroteno em brócolis após diferentes processamentos (ebulição convencional, ebulição induzida e vapor em micro-ondas) e observaram que para o α -caroteno, os valores não foram detectados, já para o β -caroteno, todos os processamentos diminuíram o conteúdo deste carotenoide, em comparação com o vegetal *in natura*.

Porém, Bunea *et al.* (2008) objetivaram analisar o conteúdo de carotenoides e compostos fenólicos no espinafre fresco, refrigerado e processado (*Spinacia oleracea* L.) e ressaltaram que o tratamento térmico, principalmente o método de ebulição, parece afetar o conteúdo de carotenoides e compostos fenólicos, em comparação a outras técnicas de processamento.

Miglio *et al.* (2008) avaliaram o efeito de diferentes métodos de cozimento (ebulição, vapor e fritura) sobre o teor de carotenoides em brócolis (*Brassica oleracea*, var. botrytis caput L.) e concluíram que o processamento em ebulição apresentou maior conteúdo de carotenoides totais em comparação com outros processamentos e com o vegetal *in natura*.

Sultana, Anwar e Iqbal (2008) com o intuito de avaliar o efeito de diferentes métodos de cocção sobre a atividade antioxidante de alguns vegetais (ervilha, cenoura, espinafre, repolho, couve-flor, nabo amarelo e nabo branco), concluíram que a ebulição, com poucas exceções, aumentou a ação antioxidante de hortaliças quando comparada

com a ação daquelas submetidas à cocção em micro-ondas. A cenoura em ebulição apresentou 0,008 mg/mL de potencial redutor e em micro-ondas apresentou 0,005 mg/mL. O espinafre em ebulição apresentou 0,016 mg/mL e em micro-ondas apresentou 0,009 mg/mL. O repolho em ebulição apresentou 0,008 mg/mL e em micro-ondas apresentou 0,005 mg/mL. Estes autores ressaltaram que o método de cocção empregado, além de propiciar a formação de novos compostos com ação antioxidante, pode, também, favorecer a extração ou a destruição de compostos bioativos.

Volden *et al.* (2009) avaliaram o teor de compostos fenólicos totais de 5 cultivares diferentes de couve-flor em vários processamentos térmicos (branqueamento, vapor e ebulição). O cozimento em ebulição foi o que mais afetou o conteúdo de compostos fenólicos totais (13-37%), seguido do branqueamento (10-21%).

Sikora *et al.* (2012) analisaram o teor de flavonoides em brócolis (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*, cv. Sebastian) e em duas variedades de couve-flor: a 'branca' (*Brassica oleracea* var. *botrytis* cv. Rober) e a 'verde' (*Brassica oleracea* var. *botrytis* cv. Amphora) após branqueamento (80 °C por 3 minutos) e cozimento (10-15 minutos). Eles concluíram que tanto o branqueamento, quanto o cozimento, reduziram o conteúdo de quercetina e campferol.

2.5.3. Processamento a Vapor

O processamento a vapor é o mais preferido para certos vegetais, principalmente para o brócolis, pois a textura é mais aceitável após o processamento (RENNIE; WISE, 2009). No entanto, a cozimento a vapor pode afetar a capacidade antioxidante de vegetais verdes devido à liberação de mais compostos fenólicos e aumentando sua a capacidade antioxidante (ADEFEGHA; OBOH, 2011).

Miglio *et al.* (2008) avaliaram o efeito de diferentes métodos de cozimento (ebulição, vapor e fritura) sobre a atividade antioxidante medida através dos métodos TEAC, FRAP e TRAP em brócolis (*Brassica oleracea*, var. botrytis caput L.) e concluíram que o processamento em vapor apresentou maior capacidade antioxidante nos três métodos avaliados em comparação com os demais processos e com o vegetal *in natura*.

Wachtel-Galor *et al.* (2008) analisaram a capacidade antioxidante através do método FRAP (ferric reducing/antioxidant power) de inflorescências de couve-flor *in natura* e submetidas a diferentes processamentos (micro-ondas / ebulição / vapor por 5 e 10 minutos) e observaram que a hortaliça apresentou maior atividade antioxidante após o processamento. O processamento em vapor apresentou maior capacidade antioxidante, sendo que os valores mais do que duplicaram após 5 minutos, em comparação com a hortaliça *in natura*.

Melo *et al.* (2009), avaliaram o teor de compostos fenólicos totais de várias hortaliças (batata inglesa (*Solanum tuberosum*), brócolis (*Brassica oleracea* var. italica), cebola branca (*Allium cepa*), cenoura (*Daucus carota*), couve-flor (*Brassica oleracea* var. botrytis L.), couve-folha (*Brassica oleracea*), espinafre (*Spinacia oleracea*), jerimum (*Curcubita pepo* L.), repolho verde (*Brassica oleracea* var. capitata) e vagem (*Phaseolus vulgaris*) submetidas à cocção em vapor por tempo suficiente para abrandar o tecido vegetal e torná-las palatáveis. Dentre as hortaliças estudadas, o brócolis destacou-se por apresentar maior teor de fenólicos totais (3.867,30 mg) e em sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico, o brócolis seguido do jerimum exibiu ação antioxidante superior a 70%, enquanto que a mais elevada capacidade de sequestro do radical DPPH foi exibida pela couve-flor.

Volden *et al.* (2009) avaliaram o teor de compostos fenólicos totais de 5 cultivares diferentes de couve-flor em vários processamentos térmicos (branqueamento, vapor e ebulição). O cozimento à vapor foi o que menos afetou o conteúdo de compostos fenólicos totais (5,4%).

Roy *et al.* (2009) analisaram o processamento a vapor (durante 5 e 10 minutos) de inflorescências de brócolis (*Brassica oleracea*, L. var. *italica*, cv Green Comet) e mostraram que o processamento a vapor tanto a 5 minutos, quanto a 10 minutos elevou a capacidade antioxidante através do método ORAC (oxygen radical capacity) em 2,3 vezes; o conteúdo de compostos fenólicos totais e o teor de flavonoides em relação ao *in natura*, observando maiores concentrações após 10 minutos de cozimento.

Aquino *et al.* (2011) avaliaram o efeito de diferentes métodos e tempos de cocção na estabilidade de clorofilas e de ácido ascórbico em inflorescências de brócolis. As amostras foram submetidas ao cozimento em água em ebulição, em vapor, em água/pressão e em vapor/pressão nos tempos de 2, 4 e 6 minutos. Os resultados desse estudo demonstraram que o método mais indicado para o cozimento de inflorescências de brócolis foi o vapor, pois além da manutenção do ácido ascórbico (95,18%), neste tempo houve também uma boa retenção da clorofila total (77,18%).

Pigoli (2012) realizou um estudo com o intuito de verificar o método de cozimento mais adequado de hortaliças (abóbora, cenoura, couve-flor, brócolis) que visava minimizar as perdas nutricionais (proteínas, lipídios, fibras, açúcares redutores, açúcares totais, ácido ascórbico e minerais como ferro, zinco, magnésio, potássio, fósforo e cálcio) e concluiu que os métodos de cozimento à vapor e micro-ondas, foram os que permitiram menor perda de nutrientes dos vegetais estudados. Isto se deu provavelmente em função das hortaliças não entrarem em contato direto com a água do cozimento.

2.5.4. Processamento em Micro-ondas

No processamento de vegetais em micro-ondas, pode ocorrer redução da perda de valiosos nutrientes quando comparado com outros processos. Isso pode ser explicado principalmente devido à prevenção de perdas por lixiviação que ocorre durante o processamento convencional em água e a vapor. Os vegetais cozidos em micro-ondas são mais nutritivos do que aqueles aquecidos à mesma temperatura por branqueamento a vapor e convencional em água (RAMESH *et al.*, 2006).

Em um estudo realizado por Rehman, Islam e Shah (2003), a fim de minimizar as perdas de componentes insolúveis em fibra dietética, concluiu-se que os vegetais devem ser cozidos, quer pelo método ordinário ou num forno de micro-ondas em vez de uma panela de pressão.

Porter (2012) analisou as propriedades antioxidantes do brócolis verde e roxo sob diferentes condições de cozimento (ebulição a 5, 10 e 20 minutos; micro-ondas a 1, 2 e 5 minutos). Os resultados apresentados neste estudo mostraram evidentemente que o brócolis roxo apresentou maiores concentrações de compostos bioativos que o brócolis verde. Também mostrou que cozimento provoca alterações nas propriedades antioxidantes do brócolis de ambas variedades. Isto é esperado como resultado de uma série de efeitos, incluindo danos, liberação e transformação de componentes alimentares. Neste estudo, o processo em micro-ondas geralmente reteve melhor os componentes antioxidantes (compostos fenólicos, flavonoides, vitamina C e capacidade antioxidante DPPH) de ambas as variedades de brócolis, em comparação com ebulição. Isto pode ser explicado pela maior tempo de cozimento, maiores volumes de água e potencialmente maiores temperaturas durante a ebulição. Cozinhar em água parece

causar um efeito de lixiviação dos antioxidantes, e isto aumenta com o tempo de cozimento.

Martínez-Hernández *et al.* (2013a) analisaram o teor de luteína em brócolis após diferentes métodos de processamento (ebulição, micro-ondas, *sous vide*, vapor de alta pressão, vapor de baixa pressão, micro-ondas/*sous vide* e grelhado) e observaram que todos os tratamentos aumentaram o conteúdo deste carotenoide em comparação com o *in natura*, sendo que vapor de baixa pressão e micro-ondas registraram maiores aumentos.

Martínez-Hernández *et al.* (2013b) analisaram o conteúdo de compostos fenólicos totais após diferentes tratamentos térmicos (ebulição convencional, ebulição a vácuo, vapor, cozimento com pressão, *sous vide*, micro-ondas convencional, micro-ondas a vácuo, grelhado, fritura convencional, fritura a vácuo) em brócolis (*B. oleracea Italica Group* × *Alboglabra Group*, cv. Bimi). Todos os processamentos aumentaram o conteúdo de fenólicos totais, quando comparado com o vegetal *in natura* (exceto para ebulição convencional e a vácuo) sendo que o processo em micro-ondas convencional e grelhado mostraram maiores teores.

2.5.5. Processamento em *Sous vide*

A expressão de origem francesa “*sous vide*” significa “à vácuo” e representa um processo tecnológico de preparo de alimentos que consiste no cozimento a vácuo dos alimentos. Apresenta boas condições de conservação, com menores perdas de nutrientes. Estas características trazem vantagens nutricionais e organolépticas (sabor e textura), reduzem a atividade microbiana, a oxidação do alimento e a vida de prateleira do produto (até 4 semanas sob refrigeração e até 2 anos congelado). Este método é

empregado para processar alimentos de conveniência, incluindo refeições prontas (RINALDI *et al.*, 2013).

Petersen (1993) analisou a influência do processamento em *sous vide*, vapor e ebulição sobre o conteúdo de vitaminas B6, C e ácido fólico. Os resultados encontrados mostraram que o processamento em ebulição apresentou grandes perdas, enquanto que os processamentos em vapor e *sous vide* praticamente não tiveram perdas destas vitaminas.

Zhang e Hamauzu (2004) analisaram o teor de compostos bioativos em brócolis (*Brassica oleracea*) após cozimento convencional e vapor após 30, 60, 90, 120 e 300 segundos. O conteúdo de compostos fenólicos, carotenoides e a atividade antioxidante diminuíram após os tratamentos térmicos.

Martínez-Hernández *et al.* (2013c) analisaram as mudanças na qualidade de brócolis após diferentes métodos de cozimento (ebulição, vapor, *sou vide*, micro-ondas, *sous vide*/micro-ondas e grelhado). O processamento em *sous vide* mostrou maiores reduções no conteúdo de clorofila 'a' e 'b' em relação aos demais tratamentos e as amostras *in natura*, com somente 62 e 39 % de retenção, respectivamente. Já todos os processamentos aplicados aumentaram a capacidade antioxidante em relação ao *in natura*, tanto no método DPPH, quanto no FRAP; e os processos em *sous vide*, micro-ondas e micro-ondas/*sous vide* foram os que apresentaram maior conteúdo antioxidante.

2.6 CULTIVO ORGÂNICO DE VEGETAIS

Estudos têm demonstrado que o uso da agricultura orgânica pode aumentar a produção de metabólitos secundários, que são os compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides, as quais são responsáveis pela atividade antioxidante. O uso desta técnica

também tem atraído à atenção da produção de alimentos em função do aumento da consciência dos problemas de saúde que podem ser melhorados através da agricultura biológica, que produz alimentos saudáveis livres de contaminantes químicos. Na agricultura orgânica, nutrientes são fornecidos através de rotação de culturas, culturas de cobertura e adubo animal (NAGUIB *et al.*, 2012; PICCHI *et al.*, 2012).

Em um estudo realizado por Arbos *et al.* (2010), onde comparou-se o teor de compostos fenólicos entre alface, almeirão e rúcula de cultivos orgânico e convencional, plantados no mesmo local, os resultados foram superiores das hortaliças sob cultivo orgânico que sob cultivo convencional: a rúcula orgânica apresentou 126,84 mg de compostos fenólicos e a convencional 90,78 mg; a alface orgânica apresentou 108,72 mg em relação aos 91,22 mg do cultivo convencional e o almeirão orgânico apresentou 92,15 mg de compostos fenólicos e o convencional 81,04 mg.

Picchi *et al.* (2012) analisaram o conteúdo de fitoquímicos em duas variedades de couve-flor (*Brassica oleracea* var. 'Magnifico' e var. 'Emeraude') orgânica *in natura*. Três regimes de fertilização foram considerados no âmbito da agricultura orgânica. As duas variedades mostraram uma resposta contrastante com práticas orgânicas: o conteúdo fitoquímico de variedade 'Emeraude' foi em geral, reduzido, enquanto na 'Magnifico', a maioria dos parâmetros de qualidade não foi afetada ou foi aumentada. Sob o cultivo orgânico, o uso da adubação aumentou significativamente o conteúdo de fitoquímicos na variedade 'Magnifico', em particular o ácido ascórbico e os polifenóis. No entanto, os mesmos tratamentos de fertirrigação diminuíram o conteúdo de fitoquímicos na variedade 'Emeraude', particularmente os glicosinolatos e o ácido ascórbico. Esta variedade foi identificada como um fator-chave na determinação de qualidade de couve-flor sob diferentes práticas de agricultura. Além disso, os

resultados indicam que a adição de fertilizantes para o solo orgânico pode ser eficaz apenas com um genótipo adequado para couve-flor orgânica.

Naguib *et al.* (2012) analisaram o efeito de fertilizantes orgânicos (adição de 50 % de esterco de galinha + 50 % nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) e bio-orgânicos (composto de tratamento orgânico + complemento de biofertilizantes: 50 % *Azotobacter chroococcum* e 50 % *Bacillus megaterium*) sobre o conteúdo de quercetina e atividade antioxidante através do radical DPPH em inflorescências de brócolis (*Brassica oleracea* var. *Italica*). Para quercetina, as maiores concentrações foram para o tratamento com fertilizantes orgânicos e que o uso destes fertilizantes em cultivares de brócolis sugere um aumento na produtividade dos metabólitos secundários. No conteúdo da atividade antioxidante, estes autores concluíram que os extratos de brócolis cultivado com fertilizantes orgânicos e fertilizantes bio-orgânicos apresentaram uma atividade antioxidante maior do que as amostras controle (apenas adição de NPK).

Vinha *et al.* (2014) estudaram o efeito de sistemas agrícolas orgânico e convencional sobre os parâmetros físico-químicos, conteúdo de compostos bioativos e atributos sensoriais em tomate ('Redondo' 'cultivar'). A influência em fitoquímicos distribuição entre casca, polpa e sementes também foi acessado. Tomates orgânicos foram mais rico em licopeno (+ 20%), vitamina C (+ 30%), compostos fenólicos (+ 24%) e os flavonoides (+ 21%) e tiveram maior (+ 6%) atividade antioxidante in vitro. Nos frutos convencionais, o licopeno concentrou-se principalmente na polpa, enquanto que na casca e das sementes orgânicas, observou-se níveis elevados de compostos bioativos. Apenas os compostos fenólicos tiveram uma distribuição semelhante entre os diferentes cultivos de tomates. Além disso, uma análise sensorial indicou que a agricultura orgânica melhora as propriedades gustativas desta cultivar de tomate.

Baranski *et al.* (2014) realizaram uma revisão bibliográfica com base em 343 publicações que indicam diferenças estatisticamente significativas na composição entre alimentos à base de culturas orgânicas e não-orgânicas. As concentrações de uma gama de antioxidantes, tais como os polifenóis foram encontrados como sendo substancialmente maiores em culturas orgânicas como os compostos fenólicos, flavanonas, estilbenos, flavonas, flavonóis e antocianinas, sendo uma estimativa de 19 %, 69 %, 28 %, 26 %, 50 % e 51 % mais elevado, respectivamente. Muitos destes compostos têm sido previamente associados a uma redução do risco de doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e certos tipos de câncer. Além disso, a frequência de ocorrência de resíduos de pesticidas foi quatro vezes mais elevada em culturas convencionais, que também continham concentrações significativamente mais elevadas do metal cádmio tóxico. Diferenças significativas também foram detectadas para outros compostos (por exemplo, minerais e vitaminas). As concentrações de antioxidantes mais elevadas e menores concentrações de cádmio estão ligados a práticas agronômicas específicas (por exemplo, a não utilização de fertilizantes minerais como nitrogênio e fósforo) em sistemas de cultivo orgânico. Em conclusão, as culturas orgânicas, em média, têm concentrações mais elevadas de antioxidantes, concentrações mais baixas de cádmio e uma menor incidência de resíduos de pesticidas do que as culturas convencionais em todas as regiões e épocas de produção.

CAPÍTULO 2: ARTIGOS CIENTÍFICOS

**EFFECT OF DIFFERENT THAWING CONDITIONS ON THE
CONCENTRATION OF BIOACTIVE SUBSTANCES IN BROCCOLI**

(Brassica oleracea var. Avenger)

**Artigo formatado de acordo com as normas da revista “LWT – Food Science and
Technology”**

ABSTRACT

Thawing is a complex process that changes the physical and chemical conditions of a substance and can significantly affect the quality of food. Thus, this study aimed to evaluate the effect of different thawing conditions (room temperature, refrigerated temperature and microwave) on the content of bioactive compounds in broccoli (*Brassica oleracea* var. Avenger) and identify which method provides better retention of these substances. The results showed that thawing in a microwave retained the chlorophylls, phenolics and quercetin. Thawing at room temperature retained more kaempferol and β -carotene. Thawing at refrigerated temperature yielded higher concentrations of vitamin C.

Keywords: stability, carotenoids, flavonoids, quercetin, kaempferol.

1. Introduction

Broccoli (*Brassica oleracea*) is a common vegetable in the diet of humans worldwide and is an important source of biologically active compounds. Several epidemiological studies indicate that Brassica vegetables, especially broccoli, may protect cells against cancer due to their high content of carotenoids, flavonoids, phenolic compounds, chlorophyll, vitamins and minerals (Gawlik-Dziki et al., 2012; Moreno et al., 2006).

Bioactive compounds can be found naturally in foods, especially in fruits and vegetables, which contain *natural* pigments that are related to important biological activities. Their beneficial effects in relation to health are associated with antioxidant properties, protecting against oxidative damage to cellular components, anti-

inflammatory effects and prevention of chronic diseases. These compounds also act together with other substances such as vitamins and minerals (Volp, Renhe, and Stringueta, 2009).

However, such compounds are susceptible to damage or alteration during processing and storage, and considerable losses may occur in these steps. In addition, vegetables with high content of moisture are highly perishable, and low temperatures are normally used for preservation, such as freezing temperatures. The freezing process, if performed properly, can maintain the nutritional characteristics of food for a long period of time (Stinco et al., 2013).

Subsequently, how the thawing process is carried out can also influence the nutritional content of the final product, especially in relation to bioactive compounds. Thawing is a complex process that changes the physical and chemical conditions of a substance and can significantly affect the quality of food. The most common methods of thawing are room temperature, refrigerated temperature and microwaving. Thawing at room temperature (25 °C) is considered to be relatively fast, but there is a risk of pathogen growth if the temperature is above 30 °C. Thawing at refrigerated temperatures is safe in terms of pathogen contamination, but the process requires more time (5 to 6 hours). Microwave thawing is quick (30 to 90 seconds), but chemical deterioration of food can occur during heating (Stinco et al., 2013).

The aim of this study was to evaluate the effect of different thawing conditions (room temperature, refrigerated temperature and microwaving) on the content of bioactive compounds in broccoli (*Brassica oleracea* var. Avenger) and identify which method provides better retention of these substances.

2. Materials and methods

2.1. *Sample preparation*

Broccoli samples were obtained from a farmer in the Nova Petrópolis City, Rio Grande do Sul, Brazil (latitude 29 ° 22 '33" south, longitude 51 ° 06' 43" west and height 596 meters). Samples were harvested when the average weight of inflorescences was approximately 300 g. All samples were analyzed at the Laboratory of Bioactive Compounds in the Federal University of Rio Grande do Sul (FURG). The inflorescences were selected considering the absence of visual injury and infection as well as the uniformity of size and color. The samples were washed in running water and then immersed in a solution of 200 ppm sodium hypochlorite for 10 minutes for surface disinfection and then washed again with running water (BRASIL, 2004).

Blanching of all samples was performed through immersion in water at 70 °C for 6.5 minutes according to the methodology described by Gonçalves et al. (2011). Lastly, the samples were vacuum packed, frozen in liquid nitrogen and stored in a freezer at -18 °C until analysis.

The thawing conditions used were analyzed at a digital penetrometer of texture and a measured of water activity, where room temperature was at 20 ± 3 °C for 2 hours, refrigerated temperature at 7 °C for 6 hours and microwaving (Consul Practice®) at a power of 10 W for 70 seconds

2.2. *Physicochemical analysis*

The measurement of texture was performed with a digital penetrometer, PCE model FM 200, and the results are expressed in Newtons (N). The water activity (A_w)

was measured with a Rotronic Hygropalm 3. The total soluble solids (TSS) were determined by a Brix refractometer. pH analysis was performed using a Quimis pH meter, model Q-400A at 25 °C. The color measurements were performed using a portable colorimeter (Konica Minolta Model CR 400, Singapore). Colorimetric parameters were obtained according to the *Commission Internationale de l'Eclairage* (CIELAB system), and the value L* (brightness) and the coordinates a* (red-green component) and b* (yellow-blue component) were determined.

2.3. Bioactive compound analysis

2.3.1. Total phenolic compounds

To extract these substances, five grams of fresh sample were homogenized in an Ultra Turrax homogenizer (T25, IKA, China) with 20 mL methanol and centrifuged for 20 min at 25,400 g in a refrigerated centrifuge (Sigma, 4K 15, USA) at 4 °C. A 250 µL aliquot of the supernatant was diluted in 4 mL ultra-filtered water, and a control was also prepared containing 250 µL methanol. The samples and the control were combined with 250 µL 1 N Folin-Ciocalteu reagent (Swain and Hillis, 1959). After 3 min of reaction, 500 µL 1 N Na₂CO₃ were added, the mixture was incubated for 2 h at room temperature, and the absorbance was read at 765 nm in a UV-visible spectrophotometer (Shimadzu, UV-1800, Japan). A standard curve was constructed to quantitate the content of phenolic compounds, using 0 to 0.50 µg/mL gallic acid. The results were expressed in mg gallic acid equivalents/100 g fresh weight.

2.3.2. *Chlorophyll content*

Samples of broccoli (0.4 g) were crushed in a Ultra-Turrax homogenizer (T25, IKA, China) together with 5 mL acetone: water (80:20) and then centrifuged at 5000 g for 15 minutes (Sigma 4K 15, USA). The supernatant was used to determine the chlorophyll content according to Lichtenthaler (1987); readings for chlorophyll "a" at 663 nm and chlorophyll "b" at 647 nm were obtained by spectrophotometer (Shimadzu UV-1800, Japan). The results were expressed as mass of chlorophyll based on fresh weight (mg/100 g dry weight).

2.3.3. *Quercetin and kaempferol*

The content of quercetin and kaempferol was determined according Nuutila, Kammiovirta, and Oksman-Caldentey (2002) with some modifications. The samples (5 g) were hydrolyzed with 10 mL 1.2 M HCl in 50% aqueous methanol. Two milligrams of ascorbic acid was then added. After reflux (90 °C for 4 hours), the samples were sonicated and filtered with a 0.45 µm filter to obtain the organic solvent. The samples were analyzed by HPLC using a Waters Alliance e2695 chromatograph (USA) equipped with a quaternary pump solvent system and a UV-visible detector. The separations were performed by reversed phase chromatography at room temperature using a C18 polymer column (Vydac, 218TP). The mobile phase was a gradient of 40-60 % methanol: aqueous trifluoroacetic acid (300 µL/L) for 25 min followed by a gradient of 20-80% for 5 min, with a flow rate of 0.8 ml/min. The eluted components were monitored at 340 nm using a UV-visible detector. The concentrations of the compounds in the samples were determined by an external standard injected daily at 10

mg/ml quercetin and 2 mg/mL kaempferol. The results are expressed as mg/g fresh weight.

2.3.4. *Vitamin C*

The determination of vitamin C was based on the methodology proposed by Rosa et al. (2007) with some modifications. Each 5 g sample was ground in an Ultra Turrax (T25, IKA, China) with 20 mL 0.05 M suprapure 96% sulfuric acid (Merck, Darmstadt, Germany) for 1 min. BHT antioxidant was then added (2 mg), and the solution was centrifuged at 25,400 x g for 15 min and then filtered through a Teflon hydrophilic filter unit. The analyses were carried out in a high performance liquid chromatography unit (Waters Alliance e2695, USA) equipped with a degasser, a quaternary solvent pump and a UV/Vis detector. The column used was a 250 mm x 4.6 mm i.d., 5 μ m, C18 polymeric column (Vydac, Southborough, MA, USA). The mobile phase was 0.05 M suprapure sulfuric acid at 1.0 mL/min with an injection volume of 10 mL and wavelength of 254 nm. The concentration of vitamin C in the samples was determined by comparison to an external standard that was injected daily at 5 mg/ml. The results are expressed as mg ascorbic acid/g fresh weight.

2.3.5. *Carotenoid profile*

The carotenoid extract was prepared according to Mercadante and Rodriguez-Amaya (1991). The main steps were the extraction of the pigments with acetone and saponification with 10% KOH in methanol overnight at room temperature. After removing the alkali with deionized water, the extract was concentrated in a rotary

evaporator (Fisatom, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil) ($T < 35\text{ }^{\circ}\text{C}$), dried in a nitrogen flow and stored in the freezer for subsequent quantitation by high performance liquid chromatography. The column used was a 250 mm x 4.6 mm i.d., 3 μm , C 30 reversed phase polymeric column (YMC, Japan). The mobile phase was water, 99.99% methanol (J.T.Baker, Mexico) and 99.96% tert-methyl butyl ether (MTBE) (J.T.Baker – Mallinckrodt, EUA) starting at 5:90:5 (v/v/v), reaching 0:95:5 (v/v/v) in 12 min, 0:89:11 (v/v/v) in 25 min, 0:75:25 (v/v/v) in 40 min and finally 0:50:50 (v/v/v) after a total of 60 min, with a flow rate of 1 mL/min at 33 $^{\circ}\text{C}$.

For quantification, a standard curve was constructed with >93% β -carotene (Sigma, USA) (5– 50 mg/mL), >95% α -carotene (Fluka, USA) (2–25 mg/mL), >95% lutein (Indofine Chemical Company, Inc., England) (1–65 mg/mL), >95% cryptoxanthin (Sigma, USA) (4–100 mg/mL) and >95% zeaxanthin (Fluka, USA) (1–40 mg/mL). The limits of quantitation (LQ) and detection (LD) were 10.89×10^{-2} mg/kg² and 6.53×10^{-2} mg/kg, respectively, for β -carotene; 1.15×10^{-2} mg/kg and 6.9×10^{-2} mg/kg for lutein; 3.51×10^{-2} mg/kg and 2.11×10^{-2} mg/kg for cryptoxanthin; 1.59×10^{-2} mg/kg and 9.56×10^{-2} mg/kg for zeaxanthin; and 3.28×10^{-2} mg/kg and 1.97×10^{-2} mg/kg for α -carotene. The results are expressed as $\mu\text{g}/100$ g dry weight.

2.3.6. Vitamin A

Vitamin A activity was calculated assuming the bioconversion factor proposed by Guillard and Lequeu (1995). This information corresponds to an equivalence factor of 13 mg of β -carotene for 1 mg retinol (Bauernfeind, 1972).

2.4. Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using ANOVA. For differences between means, the Tukey test was applied at the 5% significance level by Software Statistica 10 (Statsoft Inc., São Paulo, Brazil).

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical and color

The inflorescences of fresh broccoli (*Brassica oleracea* var. Avenger) showed moisture content of 91.01%. Table 1 shows that the texture of broccoli inflorescences thawed at room temperature yielded higher values than other thawing conditions. This may be associated with decompartmentalisation of cells, caused by other methods that directly influence in the texture of food. Thawing in a microwave resulted in the lowest texture (22.98 N), probably due to greater water loss from the samples.

Fernández-León et al. (2013) found a 44.78 N texture of fresh broccoli inflorescences. This value was similar to the 54.35 N value after thawing at room temperature found in this study.

The water activity observed in samples thawed at room temperature (0.75) was significantly different from that of samples thawed at refrigerated temperature (0.52). Food with water activity values in the range of 0.6 to 0.9 is to be in a condition that may accelerate chemical and enzymatic reactions due to the reagent concentrations (Damodaram, Parkin, and Fennema, 2010).

The TSS content differs for each thawing condition, and the highest level was found for the inflorescences thawed in a microwave, which may be due to the higher water loss and greater retention of soluble solids than the other thawing methods.

Fernández-Léon et al. (2013) analyzed the total soluble solids of fresh inflorescences of broccoli and obtained a value of 9.33, which was higher than found in this study. This variation can be explained by the fact that any method of thawing may reduce the amount of total soluble solids, and the climate, type of ground and variety of vegetable may also affect this variation.

Regarding pH, the samples thawed at refrigerated temperature had a lower pH (6.54) than the other samples.

Martínez-Hernández et al. (2013) analyzed the pH of two varieties of fresh broccoli. The Kailan hybrid was pH 6.1, and the variety Parthenon was pH 5.9. These varieties had different pH values compared to those analyzed in this study ('Avenger') but showed similar values (6.54 at refrigerated temperature, 6.63 at room temperature and 6.64 in microwave thawing), indicating that different methods do not affect the pH of the product.

Stinco et al. (2013) analyzed the influence of different thawing conditions for orange juice on pH and concluded that there was no significant difference in the different thawing conditions (microwave, room temperature and refrigerated temperature).

There was no significant difference in any of the color parameters analyzed, L*, a* and b*, for the different thawing conditions (Table 1). All samples showed a* or b* of approximately -6.93 to -8.26 and 16.92 to 18.64, respectively, indicating an intense

green color. Thus, the different thawing conditions did not affect the color parameters of the sample.

Martins and Silva (2004) analyzed the loss in quality of green beans after thawing at room temperature (15 to 25 °C) for 3, 6, 9 and 12 hours and refrigeration temperature (7 °C) for 6, 12, 18 and 24 hours. They concluded that thawing at refrigerated temperature for 6 hours resulted in lower losses of the color parameters a^* and b^* .

Holzwarth et al. (2012) analyzed the effect of different thawing methods (microwave for 10 minutes, refrigerated temperature at 4 °C for 24 hours and room temperature at 20 °C for 8 hours and 37 °C for 2 hours) on strawberry color and concluded that thawing at refrigeration temperature (4 °C for 24 hours) resulted in greater losses of pigments compared to thawing in a microwave (10 minutes) or at room temperature (20 °C and 37 °C).

Stinco et al. (2013) analyzed the influence of different thawing conditions of orange juice on the color parameters and concluded that any condition resulted in a significant difference from fresh juice. However, for L^* and b^* , thawing in microwave resulted in higher values than thawing at room temperature.

Table 1: Physicochemical analyzes and color parameters of broccoli after different thawing conditions with mean and standard deviation.

	Microwave	Room temperature	Refrigerated temperature
Texture (N)	22.98 ± 4.21 ^b	54.75 ± 3.54 ^a	36.70 ± 3.92 ^b
Aw	0.65 ± 0.02 ^{ab}	0.75 ± 0.04 ^a	0.52 ± 0.09 ^b
TSS (°Brix)	3.30 ± 0.00 ^a	2.61 ± 0.00 ^b	3.00 ± 0.00 ^c
pH	6.64 ± 0.00 ^a	6.63 ± 0.00 ^a	6.54 ± 0.00 ^b
Color L*	34.51 ± 4.61 ^a	35.69 ± 2.37 ^a	36.96 ± 2.95 ^a
Color a*	-8.26 ± 1.49 ^a	-8.13 ± 1.17 ^a	-6.93 ± 0.37 ^a
Color b*	18.64 ± 3.23 ^a	16.92 ± 2.91 ^a	17.01 ± 0.18 ^a

^{a,b,c} Different superscript letters in the same row indicate a significant difference ($p < 0.05$).

3.2. Phenolic compounds, chlorophylls, flavonoids and vitamin C

Thawing at room temperature resulted in the lowest content of phenolic compounds (909.69 mg gallic acid/100 g dry sample) (Table 2) compared with thawing in a microwave and at refrigerated temperature.

Oszmianski, Wojdylo, and Kolniak (2009) evaluated the stability of phenolic compounds (anthocyanins, p-coumaric acid, ellagic acid, flavonols, catechins and pro-anthocyanidins) in three strawberry cultivars (*Elkat*, *Kent* and *Senga Sengana*) during pre-freezing treatments (with added L-ascorbic acid, sugar and pectin) and various freezing (with or without liquid nitrogen at - 20 °C for 6 months) and thawing (microwave for 5 minutes and at temperature of 20 °C for 20 hours) conditions. It was concluded that microwave thawing had a protective effect for many phenolic compounds such as anthocyanins, pro-anthocyanins and catechins.

Phenolic compounds are a group of substances that exhibit antioxidant properties obtained through plants such as broccoli, which has antioxidant properties related to the presence of flavonoids and phenolic acids (Gulçin, 2012).

Thawing in microwave resulted in a higher content of chlorophyll "a", chlorophyll "b" and "total" chlorophyll compared to thawing at room temperature or refrigeration temperature (Table 2).

Martins and Silva (2004) analyzed losses in the quality of green beans after thawing at room temperature (15 to 25 °C) for 3, 6, 9 and 12 hours and refrigeration temperature (7 °C) for 6, 12, 18 and 24 hours. Better retention of chlorophyll "a" and "b" was obtained after thawing at room temperature for 3 hours. After thawing at refrigeration temperature (after 6 hours at 7 °C), the loss of chlorophyll was small compared with thawing at room temperature. It was also observed that the longer the samples thaw, the greater the losses of chlorophylls were, for both thawing at room temperature and at refrigeration temperature.

Chlorophylls are the most abundant natural green pigments in plants and occur in the chloroplasts of leaves and other plant tissues. They have a green olive color and are obtained from greenery or piece of their (Downham and Collins, 2000). Phytol, which is part of the chlorophyll molecule, appears to be responsible for important biological effects, such as thermogenic activity and inhibition of the recently discovered teratogenic effects of retinol (Lanfer-Marquez, 2003).

Color a^* , which indicates red-green color intensity, and b^* , which indicates yellow-blue color intensity, were also higher after thawing in a microwave. These parameters are related to higher values of chlorophyll.

The flavonoid content of broccoli inflorescences is shown in Table 2. It was observed that the quercetin content was different in the three thawing conditions, and the highest value was found for samples thawed in a microwave. For kaempferol, inflorescences thawed at room temperature showed the highest values.

Oszmianski, Wojdylo, and Kolniak (2009) evaluated flavonoid stability (quercetin and kaempferol) in three strawberry cultivars (*Elkat*, *Kent* and *Senga Sengana*) during pre-freezing treatments (with addition of L-ascorbic acid, sugar and pectin) and various freezing (with or without liquid nitrogen at - 20 °C for 6 months) and thawing (microwave for 5 minutes and at 20 °C for 20 hours) conditions. Thawing at 20 °C for 20 hours retained greater amounts of quercetin in the *Elkat* and *Senga Sengana* varieties. Thawing in a microwave yielded higher kaempferol concentrations for the *Kent* variety only. Therefore, this variation in the content of quercetin and kaempferol in strawberry varieties may not only be due to the cultivar but also maturity, size, the presence of achenes and the extraction solvent used.

The vitamin C content of broccoli inflorescences differed for all methods of thawing. Thawing at refrigerated temperatures resulted in high values, and the lowest value was found for thawing at room temperature (Table 2).

Holzwarth et al. (2012) analyzed the effect of different thawing methods (microwave for 10 minutes, refrigerated at 4 °C for 24 hours and at room temperature of 20 °C for 8 hours and 37 °C for 2 hours) on the vitamin C content of strawberries. Microwave thawing caused smaller losses of vitamin C (only 4%).

Martins and Silva (2004) analyzed quality losses in green beans after thawing at room temperature (15 to 25 °C) for 3, 6, 9 and 12 hours and refrigeration temperature (7

°C) for 6, 12, 18 and 24 hours of thawing. The vitamin C content was highest after thawing at room temperature (3 hours).

Table 2: Analysis of phenolic compounds, chlorophylls, flavonoids and vitamin C in broccoli (dry sample) after different thawing conditions with mean and standard deviation.

	Microwave	Room temperature	Refrigerated temperature
Phenolic Compounds (mg/100 g)	1225.68 ± 5.75 ^a	909.61 ± 46.92 ^b	1115.87 ± 26.42 ^a
Chlorophyll a (µg/g)	1083.74 ± 112.08 ^a	632.00 ± 50.77 ^b	750.05 ± 25.32 ^b
Chlorophyll b (µg/g)	366.90 ± 22.53 ^a	158.52 ± 21.39 ^b	231.20 ± 27.98 ^b
Total chlorophyll (µg/g)	1450.60 ± 134.62 ^a	790.52 ± 72.16 ^b	981.25 ± 53.30 ^b
Quercetin (mg/100 g)	116.80 ± 4.66 ^a	50.90 ± 1.50 ^b	85.44 ± 1.42 ^c
Kaempferol (mg/100 g)	216.04 ± 11.56 ^b	396.93 ± 8.27 ^a	206.87 ± 2.52 ^b
Vitamin C (mg/100 g)	765.49 ± 2.56 ^b	658.74 ± 4.15 ^c	792.37 ± 1.39 ^a

^{a,b,c} Different superscript letters in the same row indicate a significant difference ($p < 0.05$).

3.3. Carotenoids content

The content of lutein, zeaxanthin and α -carotene did not differ significantly among thawing conditions (Table 3). However, for β -carotene, thawing at room temperature resulted in higher values than the other methods (microwave and refrigerated temperature). The levels of cryptoxanthin were below the detection limit (DL).

Stinco et al. (2013) analyzed the influence of different thawing conditions (room temperature, refrigerated temperature and microwave (800 W for 20 seconds)) on the total and individual content of carotenoids in orange juice. They concluded that there was no significant difference in the content of total carotenoids after different thawing

conditions. However, for individual carotenoids such as lutein, zeaxanthin, cryptoxanthin, α -carotene, β -carotene and vitamin A, thawing in a microwave caused significant reductions compared with fresh juice and juice thawed at room and at refrigerated temperatures.

Carotenoids like lutein, zeaxanthin, α -carotene and β -carotene found in broccoli inflorescences are compounds that possess antioxidant activity and protect cells against oxidative damage that leads to degenerative diseases such as atherosclerosis, cancer, arthritis and macular degeneration. They are also pro-vitamins (Downham and Collins, 2000).

Lastly, carotenoid content in broccoli inflorescences may vary with the region and variety of greenery being analyzed. The results of this study are consistent with the literature, and thawing at room temperature better preserved the β -carotene content.

From the results of total carotenoids and vitamin A content, thawing at room temperature also maintained higher values in comparison with thawing in a microwave and at refrigerated temperature.

Table 3: Analysis of carotenoids in broccoli ($\mu\text{g}/100$ g dry sample) after different thawing conditions with mean and standard deviation.

	Microwave	Room temperature	Refrigerated temperature
Lutein	7476.90 ± 388.02^a	7154.40 ± 73.73^a	6829.40 ± 132.45^a
Zeaxanthin	795.94 ± 4.80^a	815.65 ± 11.90^a	726.79 ± 48.67^a
α -carotene	538.45 ± 10.28^a	535.11 ± 11.17^a	566.48 ± 24.12^a
β -carotene	5831.20 ± 43.62^b	8847.40 ± 642.44^a	6799.30 ± 379.52^b
Total carotenoids	14642.00 ± 329.32^b	17352.00 ± 693.09^a	14921.00 ± 536.52^b
Vitamin A	448.56 ± 3.35^b	680.57 ± 49.42^a	523.02 ± 29.19^b

^{a,b,c} Different superscript letters in the same row indicate a significant difference ($p < 0.05$).

4. Conclusions

Based on the results, thawing in a microwave retained the contents of chlorophyll “a”, chlorophyll “b” and “total” chlorophyll, phenolic compounds and quercetin. However, thawing in a microwave resulted in lower values for texture, and it could be a negative effect on the sensory acceptability. Thawing at room temperature retained more kaempferol and β -carotene. Thawing at refrigerated temperature maintained higher concentrations of vitamin C. Therefore, defrosting in a microwave is recommended for inflorescences of broccoli, because it had a protective effect on many bioactive compounds.

References

- ANVISA (2004). *Cartilha sobre Boas Práticas para Serviços de Alimentação*. Resolução RDC n° 216, no. 3. Brasil: Brasília.
- Bauernfeind, J. C. (1972). Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20, 456–473.
- Damodaram, S.; Parkin, K. L., & Fennema, O. R. (2010). *Química de Alimentos de Fennema*. Tradução: Adriano Bradelli [et al.]. Porto Alegre: Artmed.
- Downham, A., & Collins, P. (2000). Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food and Science & Technology*. 35, 5-22.
- Fernández-León, M. F., Fernández-León, A. M. Lozano, M., Ayuso, M. C., & González-Gómez, D. (2013). Altered commercial controlled atmosphere storage conditions for ‘Parhenon’ broccoli plants (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*). Influence

on the outer quality parameters and on the health-promoting compounds. *LWT - Food Science and Technology*. 50, 665-672.

Gawlik-Dziki, U., Jeżyna, M., Świeca, M., Dziki, D., Baraniak, B., & Czyż, J. (2012). Effect of bioaccessibility of phenolic compounds on in vitro anticancer activity of broccoli sprouts. *Food Research International*. 49, 469-476.

Guilland, J. C., & Lequeu, B. (1995). *As Vitaminas: Do Nutriente ao Medicamento*. (Original Les Vitamines Tec & Doc; Lavoisier: Paris). São Paulo.

Gonçalves, E. M., Abreu, M., Brandão, T. R. S., & Silva, C. L. M. (2011). Degradation kinetics of colour, vitamin C and drip loss in frozen broccoli (*Brassica oleracea* L. ssp. Italica) during storage at isothermal and non-isothermal conditions. *International Journal of Refrigeration*. 34, 2136-2144.

Gulçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*. 86, 345–391.

Holzwarth, M., Korhummel, S., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2012). Evaluation of the effects of different freezing and thawing methods on color, polyphenol and ascorbic acid retention in strawberries (*Fragaria×ananassa* Duch.). *Food Research International*. 48, 241-248.

Lanfer-Marquez, U. M. (2003). O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 39, 227-242.

Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymology*. 148, 350–382.

- Martins, R. C., & Silva, C. L. M. (2004). Green beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) quality loss upon thawing. *Journal of Food Engineering*. 65, 37-48.
- Martínez-Hernández, G. B., Artés-Hernández, F., Gómez, P. A., & Artés, F. (2013). Comparative behaviour between kailan-hybrid and conventional fresh-cut broccoli throughout shelf-life. *LWT - Food Science and Technology*. 50, 298-305.
- Mercadante, A. Z., & Rodriguez-Amaya, D. B. (1998). Effects of ripening, cultivar differences, and processing on the carotenoid composition of mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 128-130.
- Moreno, D. A., Carvajal, C. M., López-Berenguer, C., & García-Viguera, C. (2006). Chemical and biological characterization of nutraceutical compounds of broccoli. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41, 1508–1522.
- Nuutila, A. M., Kammiovirta, K., & Oksman-Caldentey, K. M. (2002). Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chemistry*. 76, 519–525.
- Oszmianski, J., Wojdylo, A., Kolniak, J. (2009). Effect of L-ascorbic acid, sugar, pectin and freeze–thaw treatment on polyphenol content of frozen strawberries. *LWT - Food Science and Technology*. 42, 581-586.
- Rosa, J. S., Godoy, R. L. O., Neto, J. O., Campos, R. S., Matta, V. M. Freire, C. A., et al. (2007). Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência e exclusão iônica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 27, 837–846.
- Stinco, C. M., Fernández-Vázquez, F., Heredia, F. J., Meléndez-Martínez, A. J., & Vicario, I. M. (2013). Bioaccessibility, antioxidant activity and colour of carotenoids in

ultrafrozen orange juices: Influence of thawing conditions. *LWT - Food Science and Technology*. 53, 458-463.

Swain, T., & Hillis, W. E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 10, 63–68.

Volp, A. C. P., Renhe, I. R. T., & Stringueta, P. C. (2009). Pigmentos Naturais Bioativos. *Alimentos e Nutrição, Araraquara*. 20, 157-166.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Effect of cooking on the concentration of bioactive compounds in broccoli (*Brassica oleracea* var. Avenger) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. Alphina F1) grown in an organic system

CrossMark

Luzia Caroline Ramos dos Reis ^a, Viviani Ruffo de Oliveira ^b, Martine Elisabeth Kienzle Hagen ^b, André Jablonski ^c, Simone Hickmann Flôres ^a, Alessandro de Oliveira Rios ^{a,*}

^aInstituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43212, Campus do Vale, Porto Alegre, RS CEP 91501-970, Brazil

^bCurso de Nutrição, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos, 2400, Santa Cecília, Porto Alegre, RS, Brazil

^cDepartamento de Engenharia de Minas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 75, Campus do Vale, Porto Alegre, RS CEP 91501-970, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 July 2014

Received in revised form 19 September 2014

Accepted 21 September 2014

Keywords:

Stability

Kaempferol

Quercetin

Carotenoids

Vitamin C

Antioxidant capacity

ABSTRACT

Brassica vegetables have been shown to have antioxidant capacities due to the presence of carotenoids, flavonoids and vitamins. This study evaluates the influence of different processing conditions (boiling, steaming, microwaving and *sous vide*) on the stability of flavonoids, carotenoids and vitamin A in broccoli and cauliflower inflorescences grown in an organic system. Results indicated that *sous vide* processing resulted in greater antioxidant capacity and that all processes contributed in some way to an increased content of antioxidant compounds in both cauliflower and broccoli.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

A diet rich in cruciferous vegetables, particularly broccoli (*Brassica oleracea*) and cauliflower (*B. oleracea*) can prevent some diseases, such as cancer, cardiovascular disease, obesity, diabetes and hypertension, by the fact that these foods contain nutritional antioxidants in their composition (Lin & Chang, 2005).

The contribution of the Brassica vegetables to health may be related to the antioxidant capacity of these vegetables due to the presence of phenolic compounds, carotenoids, flavonoids, vitamins and minerals. It is known that plants with antioxidant properties are rich in phenolic compounds, particularly phenolic acids and flavonoids. Carotenoids have been shown to exhibit several

biological functions that are associated with the reduced risk of degenerative diseases: cataract prevention, the reduced incidence of macular degeneration caused by ageing and the reduced incidence of coronary heart disease (Gulçin, 2012; Krinsky, 1994; Podsedek, 2007).

Studies have shown that using organic fertilizers in the farming of organic vegetables that contain flavonoids, carotenoids and antioxidant capacity increases the production of secondary metabolites. The use of organic agriculture has also attracted the attention of food production as a function of the increased awareness of the health problems that can be alleviated by organic farming, which produces healthy food free of contaminants (Naguib et al., 2012; Picchi et al., 2012).

Vegetables are often eaten in raw form; however, there are situations wherein cooking is necessary or preferred by consumers. The processing of vegetables can change their content, activity and bioavailability of bioactive compounds such as carotenoids, polyphenols, flavonoids in broccoli and cauliflower (Puupponen-Pimia et al., 2003; Vallejo, Tomas-Barberan, & Garcia-Viguera, 2002). This will depend on the temperature employed, the pH of

Abbreviations: TSS, total soluble solids; N, Newtons; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; Na₂CO₃, sodium carbonate; HCl, hydrogen chloride; KOH, potassium hydroxide; HPLC, high performance liquid chromatography; MIBE, tert-butyl methyl ether; FRAP, ferric reducing antioxidant power; PCA, principal component analysis; LOD, limits of detection; LOQ, limits of quantification.

* Corresponding author. Tel.: +55 51 3308 9787; fax: +55 51 3308 7048.

E-mail address: alessandro.rios@ufrgs.br (A. de Oliveira Rios)

the plant, the presence of metal ions and these can be influenced by species, cultivar, soil type and climate (Verkerk et al., 2009).

Mazzeo et al. (2011) analysed two cooking methods (boiling and steaming) in the context of the stability of phytochemical compounds, total antioxidant capacity and colour in cauliflower. The boiling process had a detrimental effect on the content of polyphenols. An overall decrease of almost all observed compounds was detected, whereas there was a significant increase of polyphenols in steamed cauliflower. For L' and b^* colours, no significant changes in fresh and processed vegetables were observed, but for the a^* parameter, steaming and boiling induced an increase in the intensity of the colour in this plant. Both processes affect the antioxidant capacity of cauliflower. The antioxidant capacity was less affected in steam processing, which is in agreement with studies by Pellegrini et al. (2010). However, Wachter-Galor, Wong, and Benzie (2008) concluded that cauliflower exhibited higher antioxidant capacity after processing.

Miglio, Chiavaro, Visconti, Fogliano, and Pellegrini (2008) analysed the effects of different cooking methods (boiling, steaming and frying) on the nutritional and physicochemical characteristics of broccoli, and they concluded that all processing in water (boiling and steaming) better preserved the carotenoids, which is in agreement with what was demonstrated by Martínez-Hernández, Artés-Hernández, Gómez, and Artés (2013), that is, that all of the processing methods increased the content of lutein in relation to fresh vegetables. In the steaming process, broccoli retained a better texture quality, whilst boiling resulted in limited discoloration. An overall increase of total antioxidant values was observed in all processing treatments because of softening and the increased extractability of compounds, which is in agreement with studies reported by Martínez-Hernández et al. (2013) who observed a higher antioxidant capacity after all processing methods, except for vacuum boiling.

Therefore, this study sought to evaluate the influence of different processing conditions (boiling, steaming, microwaving and sous vide) on the stability of flavonoids, carotenoids and vitamin A in inflorescences of broccoli and cauliflower grown in an organic system.

2. Materials and methods

2.1. Plant materials

Samples of broccoli (20 heads) and cauliflower (20 heads) were obtained from a farmer in the Criúva District (Caxias do Sul), Rio Grande do Sul, Brazil (latitude 28° 52' 33.65" S, longitude 50° 58' 36.72" W and an average height of 860 M).

2.2. Field experiment and agriculture conditions

A field experiment was conducted during winter–spring 2013 for cauliflower and during spring–summer 2013–2014 for the broccoli grown in soil for organic cultivation. Seedlings were transplanted after 30 days with a distance of 25 cm and a depth of 10 cm, and they were fertilised with chicken manure only. During cultivation, the climate fluctuated between rain, sun, snow and frost formation. Samples were taken with a weight of approximately 300 g and a head diameter of 30 cm (± 3 cm). The analysed quality parameters were the absence of mechanical damage, discoloration, loss of water, rot and fallen flowers. The plants were harvested in the early morning, placed in coolers and transported to the Laboratory of Bioactive Compounds in the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) where they were immediately processed, frozen in liquid nitrogen and stored in a freezer at -180°C . The analyses conducted in triplicate.

2.3. Sample preparation

The inflorescences were selected considering the absence of visual damage and infections. The samples were cutted, leaving only the inflorescences (5 cm), washed in tap water and then immersed in a solution of sodium hypochlorite at 200 ppm for 10 min, washed again with water for disinfection and homogenised (BRASIL, 2005).

- Boiling: Fresh inflorescences of broccoli and cauliflower were boiled in an aluminium vessel (with a lid) in water, ratio of 5:1 (5000 mL:1000 g) at a temperature of 100°C for 5 min.
- Steam: Samples of 600 g of fresh broccoli and cauliflower were used, where the samples were placed in a steam vessel (Food Steamer, Evulon, 1050 W) with 250 mL of water for 20 min (final temperature of 95°C).
- Microwave: Samples of 200 g of fresh broccoli and cauliflower were placed in a dish with 16 mL of water with an acrylic cover for 4 min (Electrolux, ME21S 800W) (final temperature of 98°C).
- Sous vide: Samples of 100 g of fresh broccoli and cauliflower were used; the samples were placed in vacuum packed in sous vide packaging (20 x 25 cm, Solupack) and immersed in an aluminium pan with water at 90°C for 20 min. Finally, all samples (fresh and subjected to different processing) were rapidly frozen in liquid nitrogen and stored in a -200°C freezer until analysis.

2.4. Physicochemical analysis

All analyses were performed according to AOAC International (1997). Protein concentration was determined by the Kjeldahl method using a conversion factor of 5.75. The concentration of lipids was determined by the Soxhlet extraction method, and the dietary fibre (total and soluble) concentration was determined using an enzymatic gravimetric method. The ash in a controlled oven maintained at 550°C was used to determine the moisture content by the gravimetric method, and the total carbohydrate content was determined by the concentration difference.

A digital penetrometer (PCE, FM 200 model) was used to measure the texture, and the result was expressed in Newtons (N). The total soluble solids (TSS) were determined by the refractometer Brix reading. pH measurement was performed using a pH metre (Quimis, model Q-400A). The colour measurements were performed using a portable colorimeter (Konica Minolta Model CR 400, Singapore). The colorimetric parameters were obtained according to the Commission Internationale de l'Éclairage (CIELAB system) and they included the values of L' (brightness), and the coordinates a^* (red–green component) and b^* (yellow–blue component).

2.5. Bioactive compounds analysis

2.5.1. Chlorophyll content

The broccoli inflorescences (0.4 g) were homogenised in an Ultra-Turrax (T25, IKA, China) with 5 mL of acetone:water (80:20) and centrifuged at $5000 \times g$ for 15 min (Sigma, 4K 15, USA). The supernatant was collected, and the absorbance was measured using a spectrophotometer (Shimadzu UV-1800, Japan) where the absorbance of chlorophyll "a" was 663 nm, and that of chlorophyll "b" was 647 nm (Lichtenthaler, 1987). The results were expressed as the mass of chlorophyll based on fresh weight (mg/100 g dry weight).

2.5.2. Quercetin and Kaempferol

Flavonoids were determined according to the method described by Nuutila, Kammiovirta, and Oksman-Caldentey (2002) with

some modifications. The inflorescences (5 g) were hydrolysed with 10 mL of 1.2 M HCl in 50% aqueous methanol. Then, 2 mg of ascorbic acid was added. After reflux (90 °C, 3 h), the samples were filtered with an organic solvent-compatible 0.45-µm filter. The samples were analysed using an HPLC chromatograph (Waters Alliance Model e2695, USA) equipped with a quaternary pump system and a UV-Visible detector at a wavelength of 340 nm. The separations were performed by reversed phase chromatography on a C18 polymer column (250 × 4.6 mm id, 5 microns Vydac, 218TP proteins and peptides). The mobile phase was a gradient of 40–60% methanol:aqueous trifluoroacetic acid (300 µL L⁻¹) for 25 min and then a gradient of 20–80% with a flow rate of 0.8 mL min⁻¹. The concentration of compounds was determined by external standard, injecting the standard daily at a concentration of 5 mg/mL for quercetin (98%, Sigma-Aldrich) and 1 mg/mL for kaempferol (99%, Sigma-Aldrich).

2.5.3. Carotenoids profile

The analysis of carotenoids was performed according to the procedure described by Mercadante and Rodriguez-Amaya (1998). The main steps were the extraction of the pigments with acetone and methanol saponification with 10% KOH overnight at room temperature. The extract was rotaevaporated (Fisatom, Model 801) ($T < 25$ °C) and stored in the freezer (-18 °C) for subsequent quantification by HPLC, an Agilent 1100 Series (Santa Clara, CA, USA) equipped with a quaternary pump system solvent and a UV-visible detector was used. For carotenoids a 250 × 4.6 mm ID, 3-µm polymeric reverse phase C30 (YMC, model Cf99S03-2546WT) column was used. For analysis, the extract was diluted with methyl tert-butyl ether (MTBE, JT Baker, CAS Number 1634-04-4, purity 99.96%), ultrasonicated (Unique, Model USC1400) for 30 s, and filtered in a filter (Millex LCR 0.45 µm, 13 mm) for injection on the chromatograph.

For analysis by HPLC, we used an Agilent 1100 Series (Santa Clara, CA, USA) equipped with a quaternary pump system solvent and a UV-visible detector was used. The column used for carotenoids was a 250 × 4.6 mm ID, 3-µm polymeric reverse phase C30 (YMC, model Cf99S03-2546WT) column was used. The mobile phase was 5:90:5 water:methanol:methyl tert-butyl ether (MTBE, JT Baker, CAS Number 04-04-1634, purity 99.96%), reaching 0:95:5 at 12 min, 0:89:11 at 25 min, 0:75:25 at 40 min, and finally, 0:50:50 after a total of 60 min with a flow rate of 1 mL min⁻¹ at 33 °C. The spectra were collected between 250 and 600 nm, and the chromatograms were processed at a fixed wavelength of 450 nm for the carotenoids.

The identification of compounds was performed by comparing the retention times of the peaks for the sample and the control under the same conditions. For quantification, a standard curve was constructed for carotenoids in the following concentration ranges for the carotenoids: carotene 5–50 mg mL⁻¹ (97%, Sigma-Aldrich); *cx*-carotene 2–25 mg mL⁻¹ (95%, Sigma-Aldrich); Lutein 1–65 mg mL⁻¹ (95%, Sigma-Aldrich); cryptoxanthin 4–100 mg mL⁻¹ (97%, Sigma-Aldrich); and zeaxanthin 1–40 mg mL⁻¹ (95%, Sigma-Aldrich).

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were as follows: carotene, 6.53×10^{-2} and 10.89×10^{-2} µg/g; lutein, 6.9×10^{-3} and 1.15×10^{-2} g/g; cryptoxanthin, 2.11×10^{-2} and 3.51×10^{-2} µg/g; zeaxanthin, 9.56×10^{-2} and 1.59×10^{-2} µg/g; and *cx*-carotene, 1.97×10^{-2} and 3.28×10^{-2} µg/g.

2.5.4. Vitamin A

Vitamin A was calculated by the bioconversion factor proposed by Guillard and Lequeu (1995). This information corresponds to an equivalence factor of 13 mg of carotene for 1 mg retinol with regard to structural configurations identified in *trans*-carotene (Bauernfeind, 1972).

2.5.5. Antioxidant capacity

Antioxidant capacity was determined using a method based on capturing the DPPH radical (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) according to the method published by Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995) and adapted by Embrapa Agroindústria Tropical. Fresh samples (5 g) were weighed into centrifuge tubes and mixed with 20 mL of methanol in an Ultra-Turrax (T25, IKA, China). Then, the tubes were centrifuged at 25,400 × g (CR-GIII, Hitachi, Japan) for 15 min. From the extract obtained, three different dilutions (20% (v/v), 30% (v/v) and 40% (v/v)) were made. For the DPPH assay, an aliquot of 0.1 mL of each dilution of the extract was made to react with 3.9 mL of DPPH (0.06 mM). The absorbance at 515 nm was measured using a spectrophotometer (Shimadzu UV-1800, Japan) and the results were expressed in grams of fresh sample/g DPPH.

2.6. Statistical analysis

The data were analysed by ANOVA and Tukey's mean comparison test at a significance level of 5%, followed by a principal component analysis (PCA) using the software Statistica 12.0 (Statsoft Inc. São Paulo, Brazil).

3. Results and discussion

3.1. Proximate composition

According to the data shown in Table 1, fresh inflorescences of organic broccoli exhibited moisture of 86.76%, 19.53% carbohydrates, 46.93% total fibre, 44.57% insoluble fibre, 2.36% soluble fibre, 21.79% proteins, 2.56% lipids and 9.19% ash. The inflorescences of organic cauliflower contained 92.33% moisture, 22.00% carbohydrate, 47.43% total fibre, 46.00% insoluble fibre, 1.43% soluble fibre, 18.40% protein, 0.80% lipids and 11.37% ash.

3.2. Physicochemical

The moisture of organic broccoli inflorescences after processing in steam was equal to that measured after processing by the *sous vide* method (Table 2). Significant differences were observed for the fresh inflorescences and the inflorescences subjected to other processing methods (boiling and microwave). The microwave process resulted in the highest water loss compared to other processing methods (boiling, steam and *sous vide*). The moisture content of the inflorescences of cauliflower after processing varied significantly: processing by boiling resulted in higher moisture levels, due to the direct contact with boiling water and *sous vide* processing resulted in lower moisture levels.

The TSS content of fresh inflorescences of organic broccoli was equal to that obtained after the boiling process. Samples exhibited significant differences in the other processes (steam, microwave and *sous vide*), with the microwave process resulting in the highest levels of TSS compared to other processing methods (boiling, steam

Table 1
Proximate composition (mean of three replicates ± standard deviation) in 100 g of dry weight.

	Organic broccoli (%)	Organic cauliflower (%)
Moisture	86.76 0.50	92.23 0.22
Proteins	21.79 0.31	18.40 0.73
Lipids	2.56 0.04	0.80 0.02
Ash	9.19 0.23	11.37 0.11
Carbohydrates	19.53 0.00	22.00 0.00
Insoluble fibre	44.57 0.71	46.00 2.81
Soluble fibre	2.36 0.00	1.43 0.00
Total fibre	46.93 1.35	47.43 1.88

Table 2
Mean (three replicates) and standard deviation of physicochemical analysis and colour parameters in different processes.

	Organic broccoli					Organic cauliflower				
	Fresh	Boiling	Steam	Micro wave	Sous vide	Fresh	Boiling	Steam	Micro wave	Sous vide
Moisture (%)	86.76 ± 0.50 ^c	91.93 ± 0.68 ^a	88.81 ± 0.02 ^b	83.71 ± 0.10 ^d	88.05 ± 0.37 ^b	92.23 ± 0.22 ^b	93.28 ± 0.34 ^a	91.48 ± 0.27 ^{b,c}	90.60 ± 0.37 ^c	89.20 ± 0.42 ^d
TSS	2.13 ± 0.12 ^d	1.80 ± 0.00 ^d	2.80 ± 0.00 ^c	3.73 ± 0.12 ^b	3.40 ± 0.20 ^a	3.20 ± 0.00 ^f	2.60 ± 0.00 ^d	2.60 ± 0.00 ^d	4.80 ± 0.00 ^a	3.40 ± 0.00 ^b
pH	6.54 ± 0.00 ^b	6.57 ± 0.01 ^a	6.06 ± 0.00 ^d	6.20 ± 0.01 ^c	6.09 ± 0.00 ^d	7.08 ± 0.01 ^a	6.45 ± 0.10 ^b	6.40 ± 0.10 ^b	6.49 ± 0.01 ^b	6.35 ± 0.10 ^b
Texture (N)	72.62 ± 3.25 ^a	12.65 ± 1.00 ^b	12.37 ± 1.10 ^b	6.98 ± 1.03 ^c	16.77 ± 1.65 ^b	52.00 ± 1.41 ^a	33.50 ± 0.71 ^b	26.40 ± 0.85 ^c	8.38 ± 0.11 ^e	15.58 ± 0.32 ^d
Colour L*	39.22 ± 0.79 ^a	37.25 ± 0.87 ^{a,b}	38.27 ± 0.55 ^a	35.33 ± 0.50 ^{b,c}	35.13 ± 1.00 ^c	51.46 ± 2.09 ^a	45.33 ± 1.53 ^b	47.72 ± 0.34 ^b	47.92 ± 0.49 ^b	46.63 ± 0.44 ^b
Colour a*	9.42 ± 0.22 ^b	11.17 ± 0.60 ^a	4.56 ± 0.60 ^d	7.87 ± 0.26 ^c	3.48 ± 0.48 ^d	5.09 ± 0.37 ^a	4.23 ± 0.74 ^a	5.19 ± 0.13 ^a	5.11 ± 0.28 ^a	3.12 ± 0.23 ^b
Colour b*	20.29 ± 1.00 ^a	20.68 ± 1.41 ^a	19.36 ± 0.45 ^{a,b}	17.23 ± 0.26 ^b	17.18 ± 1.08 ^b	16.53 ± 1.40 ^{a,b}	13.40 ± 1.68 ^b	18.50 ± 0.17 ^a	15.28 ± 0.10 ^{a,b}	13.05 ± 2.04 ^b

^{a–e} Different superscript letters in the same row indicate statistically significant difference ($p < 0.05$).

and *sous vide*), due to higher water loss and higher sugar concentration. The cauliflower inflorescences exhibited TSS levels between 2.60 and 4.80. The naturally processed vegetables exhibited lower TSS levels. Higher levels were obtained after microwave processing than other processing methods (boiling, steam and *sous vide*) due to higher water loss and higher sugar concentration.

It was observed that the pH of the broccoli inflorescences after the steam and *sous vide* processes exhibited lower values of pH when compared to fresh vegetable and other processing methods (boiling and microwave). The highest pH was detected in broccoli after boiling because the food becomes less acidic in the water, which could change the chlorophyll colour. The pH of the cauliflower samples decreased after different processing methods (boiling, steaming, microwaving and *sous vide*) (Table 2). The texture of the broccoli inflorescences was equal after the boiling, steam and *sous vide* processing methods. As expected, the fresh greenery exhibited higher texture (72.62 N), and processing via microwave resulted in lower values (6.98 N) due to greater water loss. Lin and Chang (2005) observed changes in broccoli texture after different processing methods were applied (*B. oleracea* var. *Italica* Plenck), and they concluded that the samples directly cooked in boiling water for 8 min had a lower shear force, and the samples cooked at 50 °C for 10 min had a higher value than the fresh samples. Martínez-Hernández et al. (2013) measured values of 46.10 N for fresh broccoli (*B. oleracea* var. *Italica*), 13.30 N for broccoli subjected to conventional boiling, 21.30 N for broccoli subjected to vacuum boiling, 11.30 N for broccoli subjected to steaming, 7.80 N for broccoli cooked with pressure, 44.00 N for broccoli prepared in a conventional microwave, 40 N for broccoli prepared via microwavesous *vide*, 40.70 N for broccoli prepared by conventional frying, 40 N for broccoli subjected to vacuum frying, 42 N for grilled broccoli and 19.30 N for broccoli prepared via *sous vide*. The results for boiling, steam and *sous vide* were similar to those found in this study. Related to microwaving, the results published by these authors were higher, which was probably due to the short cooking time. The inflorescences of organic cauliflower showed a difference in texture between the fresh produce and that of the processed. The largest shear force was exhibited by the fresh inflorescences, which were stiffer, and with a softer texture than that for the microwaving, mainly due to the greater water loss. Although preparation via microwave is faster and more practical, it leads in this case to a significant loss of texture. Results could be different if change microwaving parameters, like cooking time, volume of water added and type of covering.

The colour parameter L^* that indicates lightness exhibited higher values in the fresh greenery and the broccoli processed via steaming and boiling, indicating a light green colour. For the parameter a^* (red-green intensity), it was observed that after processing via boiling, higher values were obtained, indicating an intense green colour, due to the application of high temperatures for a short time (100 °C for 5 min). For the parameter b^* (yellow–blue intensity), it was observed that the raw vegetables and those that were processed by steaming showed higher values, indicating a greenish–yellow colour. Martínez-Hernández et al. (2013) observed that after processing (boiling, steaming, microwaving and *sous vide*), broccoli inflorescences decreased in lightness (L^*) compared with the fresh vegetable.

The colour parameters analysed in the cauliflower inflorescences are presented in Table 2. Regarding the lightness (L^*), it was determined that fresh inflorescences exhibited higher values relative to the other processing methods. For the parameter a^* , it was observed that *sous vide* processing resulted in lower values with a lighter colour compared with the other processing methods. For the parameter b^* , the fresh samples and those processed via steaming and microwaving had higher values, indicating an intense yellow colour. Mazzeo et al. (2011) analysed the inflorescences of

fresh cauliflower and the effect of different processing methods (boiling: boiling water for 9 min and steam: atmosphere furnace pressure at 100 °C for 12 min) on the colour parameters. For the colour parameters L^* and b^* , there was no significant difference between the fresh and processed samples. For the colour parameter a^* , after the boiling process, the values were higher than those of the fresh inflorescences, indicating a more intense green colour, due to the short time and high temperature used (5 min at 100 °C).

3.3. Chlorophyll and flavonoids

The highest content of chlorophyll "a", "b" and "total" in organic broccoli inflorescences was found after microwave processing when compared to fresh vegetables. For chlorophyll "a", no significant difference was observed with the boiling process (Table 3). The a^* colour intensity parameter, which indicates a red–green colour, was also higher in the boiling process, and it is related to higher values of chlorophyll "a".

Yuan, Sun, Yuan, and Wang (2009) analysed the total chlorophyll content in fresh broccoli subjected to different processes (boiling, steaming, microwaving, stir-frying, boiling and stir-frying), and they observed that steam processing did not cause significant reductions in the content of chlorophyll compared to the raw broccoli. In the other processes, there were high losses of chlorophyll.

The levels of quercetin and kaempferol in organic broccoli inflorescences subjected to different processes were higher than in the fresh produce, whereas the lowest levels were obtained for the boiling process. In inflorescences of organic cauliflower, it was observed that the microwave, boiling and *sous vide* processes resulted in high concentrations of flavonoids. Kaempferol levels were higher in the fresh and steamed vegetables than other processing methods (boiling, microwave and *sous vide*). Sikora, Cieslik, Filipiak-Fiorkiewicz, and Leszczyńska (2012) analysed the effect of processing on the content of flavonoids in various subspecies of Brassicaceae, including broccoli (*B. oleracea* var. *Botrytis Italica* cv. Sebastian), white cauliflower (*B. oleracea* var. *Botrytis cv. Rober*) and green cauliflower (*B. oleracea* var. *botrytis cv. Amphora*). The concentration of quercetin and kaempferol of all inflorescences differed significantly, and the fresh samples exhibited higher amounts compared with the boiled samples. These results are in agreement with this study of flavonoids in broccoli inflorescences. As for cauliflower, the results are consistent only with the content of kaempferol. The differences can be explained by the greater amount of water in cooking, allowing greater leaching of glycosides in water.

3.4. Carotenoids

The levels of carotenoids in inflorescences of organic broccoli and organic cauliflower are presented in Table 4. The results from studies performed by Kaulmann, Jonville, Schneider, Hoffmann, and Bohn (2014) that assessed the content of carotenoids in 27 varieties of fresh vegetables in the Brassicaceae family, including broccoli and cauliflower, indicated that broccoli was one of the richest vegetables in carotenoids. Cauliflower had low concentrations of carotenoids (75 µg/100 g of fresh weight).

For broccoli, it was observed that the steam processing resulted in higher concentrations of lutein, carotene, total carotenoids and vitamin A when compared to fresh vegetable and other cooking methods (boiling, microwave and *sous vide*). As for zeaxanthin and α -carotene, fresh vegetables exhibited higher concentrations when compared to all processes. Processing in boiling maintained the highest levels of cryptoxanthin when compared to fresh vegetables, steam, microwave and *sous vide* processes. In microwave

Table 3 Analysis of chlorophyll and flavonoids in different processes (mean of three replicates and standard deviation).

	Organic broccoli				Organic cauliflower			
	Fresh	Boiling	Steam	Microwave	Sous vide	Fresh	Boiling	Micro wave
Chlorophyll a (µg/g)	1071 ± 6.26 ^a	1057 ± 42.72 ^a	529 ± 17.04 ^c	1057 ± 42.72 ^a	571 ± 5.69 ^{b,c}	652 ± 7.39 ^{a,c}	407 ± 0.23 ^c	652 ± 7.39 ^{a,c}
Chlorophyll b (µg/g)	378 ± 0.40 ^b	378 ± 0.40 ^b	147 ± 4.06 ^d	539 ± 11.03 ^b	197 ± 4.12 ^c	652 ± 7.39 ^{a,c}	407 ± 0.23 ^c	652 ± 7.39 ^{a,c}
Total chlorophyll (µg/g)	144 ± 5.87 ^b	144 ± 5.87 ^b	677 ± 21.10 ^d	1597 ± 53.74 ^a	768 ± 8.91 ^{c,d}	652 ± 7.39 ^{a,c}	407 ± 0.23 ^c	652 ± 7.39 ^{a,c}
Quercetin (mg/100 g)	1267 ± 60.75 ^d	1267 ± 60.75 ^d	2373 ± 36.51 ^b	1667 ± 73.66 ^c	2939 ± 0.49 ^a	652 ± 7.39 ^{a,c}	407 ± 0.23 ^c	652 ± 7.39 ^{a,c}
Kaempferol (mg/100 g)	1093 ± 16.48 ^e	1093 ± 16.48 ^e	4544 ± 57.06 ^b	2582 ± 23.35 ^d	3919 ± 112.38 ^c	652 ± 7.39 ^{a,c}	407 ± 0.23 ^c	652 ± 7.39 ^{a,c}

Different superscript letters in the same row indicate statistically significant difference ($p < 0.05$).

Not determined.

Table 4
Analysis of variance of different processes (g/100 g dry weight) of three replicates (mean of three replicates, standard deviation).

	Organic broccoli					Organic cauliflower				
	Fresh	Boiling	Steaming	Microwave	Sous vide	Fresh	Boiling	Steaming	Microwave	Sous vide
Lutein	1676 ± 743 ^{3C}	2076 ± 96.93 ^b	2926 ± 355.3	1271 ± 6.75 ^d	1931 ± 100.27 ^{1C}	34.18 ± 1.42 ¹	59.79 ± 0.62 ^b	121.10 ± 1.13 ¹	54.57 ± 1.01 ¹	22.86 ± 0.97 ¹
Zeaxanthin	501 ± 26.14 ^a	105 ± 1.34 ^d	284 ± 1.72 ^b	96.83 ± 4.81 ^d	175 ± 4.06 ^c	3.83 ± 0.04 ^d	6.99 ± 0.15 ^b	16.65 ± 0.65 ^c	6.32 ± 0.33 ^{1C}	5.15 ± 0.12 ¹¹¹
Cryptoxanthin	164 ± 8.84	252 ± 0.71 ¹	190 ± 4.15 ^b	119 ± 0.31 ^d	178 ± 0.53 ^{bC}	15.90 ± 0.63 ^{1C}	19.22 ± 0.85 ^b	31.71 ± 1.00 ¹	14.56 ± 0.18 ^{1d}	12.61 ± 0.68 ¹¹
α-Carotene	248 ± 35 ^{1a}	119 ± 5.93 ^c	159 ± 0.88 ^b	78.13 ± 0.70 ^C	95.42 ± 1.68 ¹¹	3.75 ± 0.20 ^b	2.89 ± 0.17 ¹¹	9.70 ± 0.25 ¹	3.66 ± 0.15 ^b	2.17 ± 0.02 ¹¹
β-Carotene	3211 ± 160.64 ^b	3437 ± 139.31 ^{11b}	4021 ± 20.45 ¹¹	2461 ± 129.71 ^c	2567 ± 92.56 ^c	55.6 ± 2.79 ^{1a}	135 ± 6.41 ^b	163 ± 13.02 ^b	76.57 ± 3.23 ¹	45.03 ± 3.12 ¹
Total Carotenoids	5773 ± 311.71 ^b	5990 ± 241.59 ^b	7581 ± 169.91 ¹¹	4025 ± 142.29 ^d	495 ± 7.91 ^c	61.4 ± 3.02 ¹	234 ± 8.21 ^f	342 ± 14.05 ^b	156 ± 4.53 ¹	87.84 ± 2.66 ^e
Vitamin A	247 ± 12.30 ^b	26.41 ± 1.02 ^{1b}	309 ± 15.42 ¹¹	189 ± 9.98 ^c	197 ± 7.51 ^f	42.81 ± 2.15 ¹	10.41 ± 0.49 ^b	125.3 ± 1.00 ¹¹	5.89 ± 0.25 ^c	3.46 ± 0.24 ^c

– Different superscript letters in the same row indicate statistically significant difference (p < 0.05).

Table 5
Antioxidant activity of broccoli and cauliflower in different processes (g of dry weight) DPPH: mean of three replicates, 100 standard deviation.

	Organic broccoli					Organic cauliflower				
	Fresh	Boiling	Steaming	Microwave	Sous vide	Fresh	Boiling	Steaming	Microwave	Sous vide
DPPH	22,264 ± 87.85 ^c	28,178 ± 262.35 ^b	21,868 ± 1,073.59 ^a	3145 ± 221.4 ¹¹¹	19,513 ± 1,913.13 ¹	25,704 ± 1,836.44 ^b	37,349 ± 333.94 ^a	23,732 ± 4085.2 ^C	33,516 ± 1,652.69 ^b	12,449 ± 398.91 ^f
Zeaxanthin	207 ± 7.27 ^d	979 ± 36.78 ^a	384 ± 1.24 ^c	672 ± 19.74 ^b	989 ± 26.09 ¹	45.29 ± 0.64 ^{bC}	60.98 ± 2.14 ¹¹	46.80 ± 1.21 ^b	40.66 ± 1.01 ¹¹¹	41.91 ± 0.10 ^{1d}
Cryptoxanthin	696 ± 365.3 ^b	808 ± 26.78 ^a	385 ± 23.0 ¹	449 ± 5.21 ^{Cd}	485 ± 4.3 ¹	250 ± 1.64 ^a	206 ± 2.14 ¹	186 ± 1.52 ¹	157 ± 0.4 ¹¹	157 ± 0.4 ¹¹
α-Carotene	641 ± 3.10 ¹	453 ± 13.15 ¹	222 ± 13.1 ¹	218 ± 0.32 ¹	271 ± 10.47 ^b	45.29 ± 0.64 ^b	1.11 ± 3.78 ^a	253 ± 3.36 ^b	227 ± 2.53 ^c	198 ± 0.56 ^a
Total Carotenoids	1959 ± 49.35 ¹	2241 ± 3.16 ¹	1349 ± 44.65 ^d	1339 ± 14.78 ^d	2108 ± 20.88 ±	45.29 ± 0.64 ^b	1.11 ± 3.78 ^a	253 ± 3.36 ^b	227 ± 2.53 ^c	198 ± 0.56 ^a
Vitamin A	1727 ± 0.81 ^b	31.94 ± 0.19 ¹¹	34.86 ± 1.01 ¹	17.07 ± 1.01 ^c	16.81 ± 0.02 ¹	20.88 ±				

– Values not detected

– Different superscript letters in the same row indicate statistically significant difference (p < 0.05).

processing, we observed significant reductions of all carotenoids. Martínez-Hemández et al. (2013) analysed the content of lutein in fresh broccoli inflorescences that were subjected to different processing methods (boiling, low pressure steaming, high pressure steaming, *sous vide*, microwaving, *sous vide*-microwave and grill). All processing increased the content of lutein in relation to fresh vegetables. Boiling and microwave-*sous vide* processes showed the highest amounts of lutein, and the lower concentrations occurred in the *sous vide* process due to the long cooking times and high temperatures.

The inflorescences of organic cauliflower exhibited higher concentrations of zeaxanthin, cryptoxanthin and α -carotene after steam processing when compared to fresh vegetable and other cooking methods (boiling, microwave and *sous vide*). Lutein, β -carotene, total carotenoids and vitamin A had higher values in the fresh vegetables when compared to all cooking methods applied. *Sous vide* processing exhibited greater losses of all carotenoids.

3.5. Antioxidant capacity

DPPH analysis was performed using methanol extracts, and from these extracts, the content of compounds present in the extracts that could indicate antioxidant capacity was also evaluated by HPLC. The results of the DPPH antioxidant capacity are shown in Table 5. The higher antioxidant capacity for both organic broccoli inflorescences, which were similar to those for organic cauliflower, was observed in *sous vide* processing when compared to fresh vegetable and other processing methods (boiling, steam

and microwave). The methanol extracts for DPPH analysis in inflorescences of fresh and processed broccoli injected into the column of carotenoids that presented antioxidant capacity were lutein, zeaxanthin, cryptoxanthin, β -carotene, total carotenoids and vitamin A, but the processes of boiling and microwaving did not indicate any antioxidant capacity for cryptoxanthin.

The extracts of organic cauliflower exhibited antioxidant capacity, whereas the fresh vegetables produced lutein and total carotenoids. After all of the processing methods were performed, lutein, zeaxanthin and total carotenoids were detected in the extracts. The methanol extracts of both inflorescences of broccoli, similar to those of the fresh and processed cauliflower, were injected into the column of flavonoids, and they did not exhibit any antioxidant capacity (the values were below the detection limit). Martínez-Hemández et al. (2013) analysed the changes in the antioxidant capacity of broccoli inflorescences after several processing methods (conventional boiling, vacuum boiling, steaming, pressure cooking, *sous vide*, conventional microwaving, vacuum microwaving, grilling, conventional deep frying and vacuum deep frying), and they showed that antioxidant capacity increased after all cooking treatments, except for vacuum boiling. *Sous vide*, microwaving and deep frying treatments induced the highest increases (3.6-fold). These results are consistent with our study and this improvement can be explained by several possibilities: the release of high amounts of antioxidant compounds due to thermal destruction of cellular and sub-cellular compartment walls, production of strong antioxidants and radical elimination by thermal chemical reaction, suppression of oxidation capacity of antioxidants for thermal inactivation of oxidative enzymes and/or the

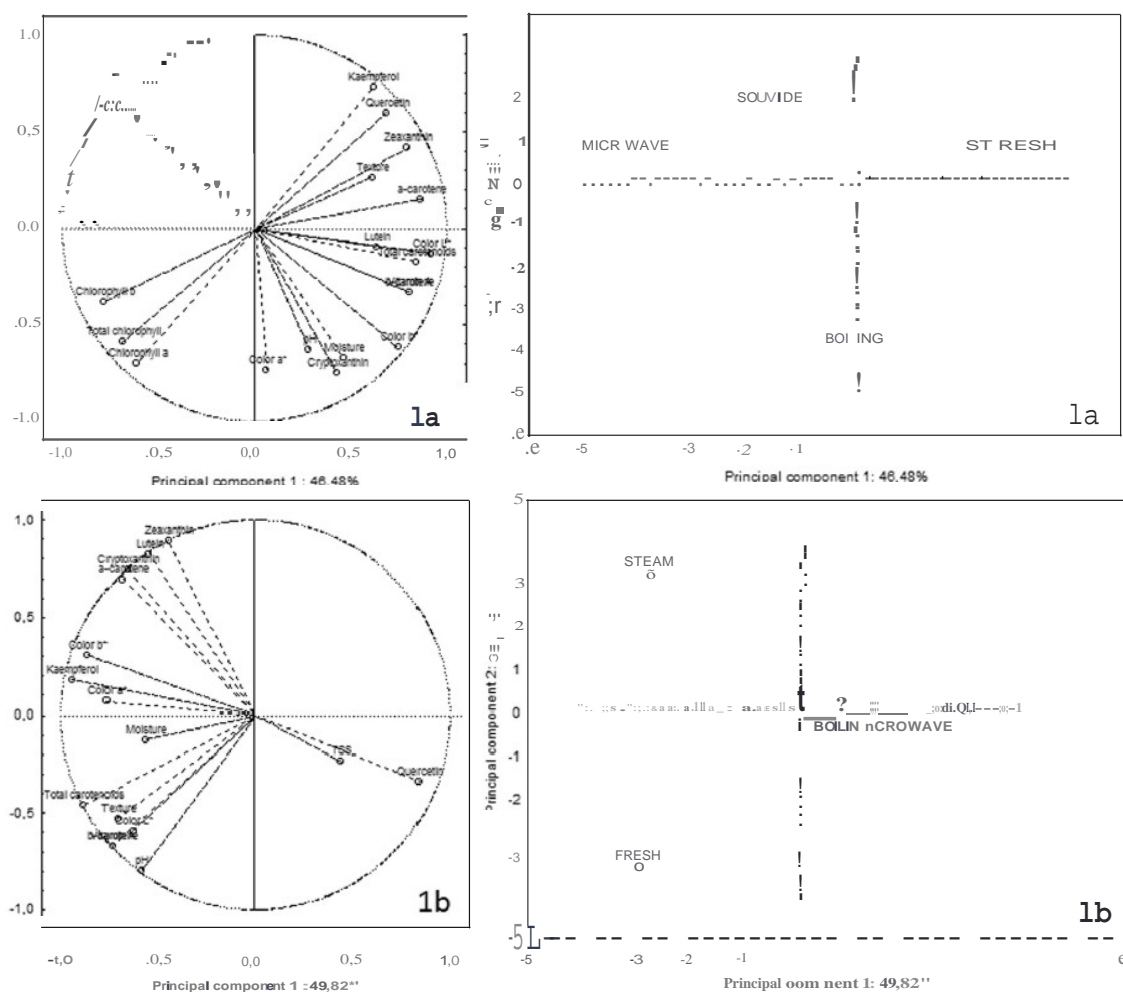


Fig. 1. Principal component analysis of organic broccoli (a) and cauliflower (b) in different processing conditions.

production of new non-nutrient antioxidants or the formation of new compounds such as Maillard reaction products with antioxidant capacity. Wachtel-Galor, Wong, and Benzie (2008) analysed the antioxidant capacity by the FRAP method (Ferric Reducing antioxidant power) of fresh inflorescences of cauliflower, and they subjected it to different processes (microwave boiling steaming for 5 and 10 min). They observed that cauliflower heads exhibited higher antioxidant capacity after processing. Steam processing resulted in a higher antioxidant capacity, with values that were more than twice after 5 min compared to those of the fresh vegetable. These results are confirmed by the data presented in the current study because after the *sous vide* processing was steaming the treatment that exhibited the highest antioxidant capacity.

3.6. Principal component analysis

The organic broccoli was evaluated within the context of seven physicochemical parameters and thirteen bioactive compounds. By analysing the components (Fig. 1a), the variance of the data was accounted for the significant contributions of 46.69% for the first and 27.09% for the second principal components. It was observed that fresh inflorescences of organic broccoli presented higher values of texture, colour, L^* , quercetin, kaempferol, α -carotene and zeaxanthin because the fresh vegetable had intact compounds. In the boiling process, the highest values were observed for moisture-related parameters – pH, colour a^* , b^* , chlorophyll "a" – because of the direct contact with boiling water and being heated at high temperatures for a short period of time (100 °C for 5 min), which resulted in the retaining of the intense green colour. Microwave had higher TSS, chlorophyll "b" and "total" for the greater water loss and higher concentrations of these compounds. The steam process has been shown to preserve larger quantities of lutein, carotene, vitamin A and carotenoids because the heating disrupts plant tissue and causes the availability of more compounds.

In organic cauliflower, seven physicochemical parameters and ten parameters of bioactive compounds were evaluated. From the principal component analysis of organic cauliflower inflorescences (Fig. 1b), the variance of the data was accounted for the significant contributions of 49.97% for the first and 31.81% for the second principal components. Steam processing resulted in a higher content of lutein, zeaxanthin, cryptoxanthin, α -carotene, colour a^* , b^* and kaempferol because the heat breaks the vegetable cell wall and makes these compounds more available. Fresh vegetables exhibited a greater tendency to be more rigid in the fresh greenery and contain intact compounds. The pH, colour L^* , α -carotene, total carotenoids and vitamin A values were also greater. The microwave process resulted in higher amounts of TSS and quercetin by losing water after the process, and concentrating these compounds due to the slower heating process of the plant tissue made them more available. Finally, boiling resulted in higher moisture due to the direct contact with boiling water.

4. Conclusions

For the broccoli and cauliflower inflorescences grown under an organic system, all processes contributed in some way to an increased content of antioxidant compounds, with greater antioxidant capacity being observed following *sous vide* processing for both vegetables in the tested conditions. Therefore, this study confirms that after processing, inflorescences of broccoli and cauliflower cultivated in an organic system had higher content of

bioactive substances than fresh vegetables, including chlorophylls, carotenoids, flavonoids and vitamin A.

References

- AOAC International (1997). *Official methods of analysis of AOAC international* (16th ed.). Gaithersburg, MD, USA: Association of Analytical Communities.
- Bauernfeind, J. C. (1972). Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20, 456–473.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28, 25–30.
- BRASIL (2005). CGPAN/SAS/Ministério da Saúde. Guia Alimentar para a População Brasileira: Promovendo a alimentação saudável, 3, 1–44.
- Guillard, J. C., & Lequeu, B. (1995). *As Vitaminas: Do Nutriente ao Medicamento*. São Paulo, Brasil: Santos [Original Les Vitamines Tec & Doe; Lavoisier: Paris].
- Gulçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345–391.
- Kaulmann, A., Jonville, M., Schneider, Y., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2014). Carotenoids, polyphenols and micronutrient profiles of *Brassica oleraceae* and plum varieties and their contribution to measures of total antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 155, 240–250.
- Krinsky, N. I. (1994). The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 66, 1003–1010.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymology*, 148, 350–382.
- Lin, C., & Chang, C. (2005). Texture change and antioxidant properties of broccoli under different cooking treatments. *Food Chemistry*, 90, 9–15.
- Martínez-Hernández, G. B., Artés-Hernández, F., Colares-Souza, F., Gómez, P. A., García-Gómez, P., & Artés, F. (2013). Innovative cooking techniques for improving the overall quality of a kailan-hybrid broccoli. *Food Bioprocess and Technology*, 6, 2135–2149.
- Martínez-Hernández, G. B., Artés-Hernández, F., Gómez, P. A., & Artés, F. (2013). Induced changes in bioactive compounds of kailan-hybrid broccoli after innovative processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 5, 33–43.
- Mazzeo, T., N'Dri, D., Chiavaro, E., Visconti, A., Fogliano, V., & Pellegrini, N. (2011). Effect of two cooking procedures on phytochemical compounds, total antioxidant capacity and colour of selected frozen vegetables. *Food Chemistry*, 128, 627–633.
- Mercadante, A. Z., & Rodriguez-Arnaya, D. B. (1998). Effects of ripening, cultivar differences, and processing on the carotenoid composition of mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 128–130.
- Miglio, C., Chiavaro, E., Visconti, A., Fogliano, V., & Pellegrini, N. (2008). Effects of different cooking methods on nutritional and physicochemical characteristics of selected vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 139–147.
- Naguib, A. E. M., El-Baz, F., Saïama, Z. A., Hanaa, H. A. E. B., Ali, H. F., & Gaafar, A. A. (2012). Enhancement of phenolics, flavonoids and glucosinolates of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) as antioxidants in response to organic and bio-organic fertilizers. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 11, 135–142.
- Nuutila, A. M., Kammiovirta, K., & Oksman-Caldentey, K. M. (2002). Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chemistry*, 76, 519–525.
- Pellegrini, N., Chiavaro, E., Gardana, C., Mazzeo, T., Contino, D., Gallo, M., et al. (2010). Effect of different cooking methods on color, phytochemical concentration, and antioxidant capacity of raw and frozen Brassica vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4310–4321.
- Picchi, V., Migliori, C., Scalzo, R. L., Campanelli, G., Ferrari, V., & Cesare, L. F. D. (2012). Phytochemical content in organic and conventionally grown Italian cauliflower. *Food Chemistry*, 130, 501–509.
- Podsdek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 1–11.
- Puupponen-Pimia, R., Kinen, S. T. H., Suortti, A. T., Lampi, A., Eurla, M., Piironen, V., et al. (2003). Blanching and long-term freezing affect various bioactive compounds of vegetables in different ways. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 1389–1402.
- Sikora, E., Cieslik, E., Hlupiak-Fiorkiewicz, A., & Leszczynska, T. (2012). Effect of hydrothermal processing on phenolic acids and flavonoid contents in selected brassica vegetables. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 11, 45–51.
- Vallejo, F., Tomas-Barberan, F. A., & Garcia-Viguera, C. (2002). Glucosinolates and vitamin C content in edible parts of broccoli florets after domestic cooking. *European Food Research and Technology*, 215, 310–316.
- Verkerke, R., Schreiner, M., Krumbein, A., Ciska, E., Holst, B., Rowland, I., et al. (2009). Glucosinolates in Brassica vegetables: The influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *MOERUAR Nutrition & Food Research*, 53 [219–165].
- Wachtel-Galor, S., Wong, K. W., & Benzie, I. F. F. (2008). The effect of cooking on Brassica vegetables. *Food Chemistry*, 110, 706–710.
- Yuan, G., Sun, B., Yuan, J., & Wang, Q. (2009). Effects of different cooking methods on health-promoting compounds of broccoli. *Journal of Zhejiang University Science B*, 10, 580–588.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos métodos de processamento empregados nas inflorescências de brócolis orgânico, observou-se que o processo em vapor reteve maiores concentrações de carotenoides, *sous vide* reteve maiores teores de compostos fenólicos, ebulição preservou a clorofila 'a', o processo em micro-ondas obteve maiores teores de clorofila 'b' e 'total' e a hortaliça *in natura* apresentou maiores concentrações de flavonoides. Para as inflorescências de couve-flor orgânica, o processamento em vapor apresentou maiores concentrações de carotenoides em geral e o micro-ondas apresentou maiores teores de compostos fenólicos e quercetina. Por fim, na atividade antioxidante total, as hortaliças orgânicas apresentaram maiores teores no processo em *sous vide*.

Deve-se levar em conta que o cultivo orgânico oferece alimentos saudáveis isentos de contaminantes, onde se adotam métodos culturais, biológicos e mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos, a eliminação do uso de organismos geneticamente modificados e radiações ionizantes, em qualquer fase do processo de produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente.

O descongelamento em micro-ondas é o mais apropriado para quem opta por descongelar as inflorescências de brócolis e processar posteriormente, pois as menores perdas de compostos bioativos foram observadas no descongelamento em micro-ondas.

4. CONCLUSÃO

As inflorescências de brócolis e couve-flor são boas fontes de compostos bioativos. Ambos têm quantidade considerável de fibras, açúcares e água, obtendo baixa quantidade de calorías. As inflorescências de brócolis destacam-se por ter grandes quantidades de carotenoides, sendo eles, o β -caroteno, a luteína, criptoxantina, zeaxantina e α -caroteno; também apresenta grandes teores de clorofilas ('a', 'b' e 'total'), compostos fenólicos totais, flavonoides (principalmente o campferol e a quercetina) e capacidade antioxidante. As inflorescências de couve-flor destacam-se por apresentar maiores concentrações de flavonoides, principalmente a quercetina e o campferol, compostos fenólicos totais e em menores proporções os carotenoides, entre eles o β -caroteno, a luteína, a criptoxantina, a zeaxantina e o α -caroteno e capacidade antioxidante.

Por último, o processamento das hortaliças estudadas obteve, na maioria dos casos, um aumento no teor de compostos bioativos, mostrando que o processamento pode ter efeitos positivos nos vegetais estudados.

5. REFERÊNCIAS

ADEFEGHA, S. A., OBOH, G. Enhancement of total phenolics and antioxidant properties of some tropical green leafy vegetables by steam cooking. **Journal of Food Processing and Preservation**. Volume 35, páginas 615-622. 2011.

AHMED, F. A.; ALI, R. F. M. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Fresh and Processed White Cauliflower. **BioMed Research International**. Volume 1, páginas 1-9. 2013.

AQUINO, A. C. M. S; SILVA, M. H. M.; ROCHA, A. K. S.; CASTRO, A. A. Estudo da influência de diferentes tempos e métodos de cocção na estabilidade dos teores de clorofila e ácido ascórbico em brócolis (*Brassica oleraceae*). **Scientia Plena**. Volume 7, páginas 1-6. 2011.

ARBOS, K. A.; FREITAS, R. J. S.; STERTZ, S. C.; DORNAS, M. F. Atividade Antioxidante e teor de fenólicos totais em hortaliças orgânicas e convencionais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Volume 30, páginas 501-506. 2010.

ARBOS, K. A.; VILLAS-BOAS, L. B.; SANTOS, C. A. M.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Influência de diferentes técnicas de cultivo sobre o potencial antioxidante de crucíferas. **Alimentos e Nutrição**. Volume 15, nº 1, páginas 55-61. 2004.

BARANSKI, M.; SREDNICKA-TOBER, D.; VOLAKAKIS, N.; SEAL, C.; SANDERSON, R.; STEWART, G. B.; BENBROOK, C.; BIAVATI, B.; MARKELLOU, E.; GIOTIS, C.; GROMADZKA-OSTROWSKA, J.; REMBIAŁKOWSKA, E.; SKWARŁO-SONTA, K.; TAHVONEN, R.; JANOVSKA, D.; NIGGLI, U.; NICOT, P.; LEIFERT, C. Higher antioxidant and lower cadmium concentrations and lower incidence of pesticide residues in organically grown crops: a systematic literature review and meta-analysis. **British Journal of Nutrition**, páginas 1-18. 2014.

- BARREIROS, A. L. B.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Química Nova*, Volume 29, páginas 113-123. 2006.
- BAUERNFEIND, J. C. Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Volume 20, páginas 456-473. 1972.
- BRASIL. **Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável**. Brasília, 2006.
- BUNEA, ANDREIA; ANDJELKOVIC, M.; SOCACIU, C.; BOBIS, O.; NEACSU, M.; VERHÉ, R.; CAMP, J. V. Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Food Chemistry*. Volume 108, páginas 649-656. 2008.
- CAMPOS, F. M.; MARTINO, H. S. D.; SABARENSE, C. M.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Estabilidade de compostos antioxidantes em hortaliças processadas: uma revisão. *Alimentos e Nutrição*. Volume 19, páginas 481-490. 2008.
- CORREIA, L. F. M.; FARAONI, A. S.; PINHEIRO-SANTANA, H. M. Efeitos do processamento industrial de alimentos sobre a estabilidade de vitaminas. *Alimentos e Nutrição*. Volume 19, página 83-95. 2008.
- COSTA, N. M. B; ROSA, C. O. B. **Alimentos Funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. 2010.
- DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Quarta Edição. Artmed, Porto Alegre, 2010.
- DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food and Science & Technology*. Volume 35, páginas 5-22. 2000.

FERNÁNDEZ-LEÓN, M. F.; FERNÁNDEZ-LEÓN, A. M.; LOZANO, M.; AYUSO, M. C.; GONZÁLEZ-GÓMEZ, D. Altered commercial controlled atmosphere storage conditions for 'Parhenon' broccoli plants (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). Influence on the outer quality parameters and on the health-promoting compounds. *Food Science and Technology*. Volume 50, páginas 665-672. 2013.

GRANADO-LORENCIO, F.; LAGARDA, M J.; GARCIA-LÓPEZ, F. J.; SÁNCHEZ-SILES, L. M.; BLANCO-NAVARRO, I.; ALEGRÍA A.; PÉREZ-SACRISTÁN, B.; GARCIA-LLATAS, G.; DONOSO-NAVARRO G.; SILVESTRE-MARDOMINGO, R. A.; BARBERÁ, R. Effect of b-cryptoxanthin plus phytosterols on cardiovascular risk and bone turnover markers in post-menopausal women: A randomized Crossover trial. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. Páginas 1-7. 2014.

GEBCZYNSKI, P.; LISIEWSKA, Z. Comparison of the level of selected antioxidative compounds in frozen broccoli produced using traditional and modified methods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. Volume 7, páginas 239–245. 2006.

GULÇIN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*. Volume 86, páginas 345–391. 2012.

HOCMAN, G. Review: Prevention of Cancer: Vegetables and Plants. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Volume 93 B, páginas 201-212. 1989.

HOLZWARTH, M., KORHUMMEL, S., CARLE, R., & KAMMERER, D. R. Evaluation of the effects of different freezing and thawing methods on color, polyphenol and ascorbic acid retention in strawberries (*Fragaria×ananassa* Duch.). *Food Research International*. Volume 48, páginas 241-248. 2012.

KAHLON, T. S., CHIU, M. M., CHAPMAN, M. H. Steam cooking significantly improves in vitro bile acid binding of beets, eggplant, asparagus, carrots, green beans, and cauliflower. *Nutrition research*. Volume 27, páginas 150-755. 2007.

KAULMANN, A., JONVILLE, M., SCHNEIDER, Y., HOFFMANN, L., & BOHN, T. Carotenoids, polyphenols and micronutrient profiles of *Brassica oleraceae* and plum varieties and their contribution to measures of total antioxidant capacity. *Food Chemistry*. Volume 155, páginas 240-250. 2014.

KRAUSE, M. V.; MAHAN, L. K. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. Roca, São Paulo, 1991.

KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*. Volume 66, páginas 1003-1010. 1994.

KURILICH, A. C.; JEFFERY, E. H.; JUVIK, J. A.; WALLIG, M. A.; KLEIN, B. P. Antioxidant Capacity of Different Broccoli (*Brassica oleracea*) Genotypes Using the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Volume 50, páginas 5053-5057. 2002.

KURILICH, A. C.; TSAU, G. J.; BROWN, A.; HOWARD, L.; KLEIN, B. P.; JEFFERY, E. H.; KUSHAD, M.; WALLIG, M. A.; JUVIK, J. A. Carotene, Tocopherol, and Ascorbate Contents in Subspecies of *Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Volume 47, páginas 1576-1581. 1999.

LIN, C. H.; CHANG, C. Y. Textural change and antioxidant properties of broccoli under different cooking treatments. *Food Chemistry*. Volume 90, páginas 9-15. 2005.

LANFER-MARQUEZ, U. M. **O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Volume 39, páginas 227-242. 2003.

MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, G. B.; ARTÉS-HERNÁNDEZ, F.; COLARES-SOUZA, F.; GÓMEZ, P. A.; GARCÍA-GÓMEZ, P.; ARTÉS, F. Innovative Cooking Techniques for Improving the Overall Quality of a Kailan-Hybrid Broccoli. *Food Bioprocess and Technology*. Volume 6, páginas 2135-2149. 2013a.

MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, G. B.; ARTÉS-HERNÁNDEZ, F.; GÓMEZ, P. A.; ARTÉS, F. Induced changes in bioactive compounds of kailan-hybrid broccoli after innovative processing and storage. *Journal of Funcional Foods*. Volume 5, páginas 33-43. 2013b.

MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, G. B.; ARTÉS-HERNÁNDEZ, F.; GÓMEZ, P. A.; ARTÉS, F. Quality changes after vacuum-based and conventional industrial cooking of kailan-hybrid broccoli throughout retail cold storage. *LWT – Food Science and Technology*. Volume 50, páginas 707-714. 2013c.

MARTINS, R. C.; SILVA, C. L. M. Green beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) quality loss upon thawing. *Journal of Food Engineering*. Volume 65, páginas 37-48. 2004.

MAZZEO, T.; N'DRI, D.; CHIAVARO, E.; VISCONTI, A.; FOGLIANO, V.; PELLEGRINI, N. Effect of two cooking procedures on phytochemical compounds, total antioxidant capacity and colour of selected frozen vegetables. *Food Chemistry*. Volume 128, páginas 627-633. 2011.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; SANTANA, A. P. M. Antioxidant capacity of vegetables submitted to thermal treatment. *Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition*. Volume 34, páginas 85-95. 2009.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; LEAL, F. L. L.; CAETANO, A. C. S.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Volume 26, páginas 639-644. 2006.

MIGLIO, C.; CHIAVARO, E.; VISCONTI, A.; FOGLIANO, V.; PELLEGRINI, N. Effects of Different Cooking Methods on Nutritional and Physicochemical Characteristics of Selected Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Volume 56, páginas 139-147. 2008.

MURCIA, M. A., LÓPEZ-AYERRA, B. & GARCÍA-CARMONA, F. Effect of Processing Methods and different Blanching Times on Broccoli: Proximate

Composition and Fatty Acids. *LWT: Food Science and Technology*. Volume 32, n° 4, páginas 238-243. 1999.

NAGUIB, A. E. M.; EL-BAZ, F.; SALAMA, Z. A.; HANAA, H. A. E. B.; ALI, H. F.; GAAFAR, A. A. Enhancement of phenolics, flavonoids and glucosinolates of broccoli (*Brassica oleracea* var. Italica) as antioxidants in response to organic and bio-organic fertilizers. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. Volume 11, páginas 135-142. 2012.

NICOLI, M. C.; ANESE, M.; PARPINEL, M. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends Food Science and Technology*. Volume 10, páginas 94-100. 1999.

NUNN, M. D., GIRAUD, D. W., PARKHURST, A. M., HAMOUZ, F. L., DRISKELL, J. A. Effects of cooking methods on sensory qualities and carotenoid retention in selected vegetables. *Journal of Food Quality*. Volume 29, páginas 445–457. 2006.

OLEAA, J. L.; ARAGÓNA, J. A.; ZAPATAB, M. E.; TUR, J. A. Characteristics of patients with wet age-related macular degeneration and low intake of lutein and zeaxanthin. *Archivos de La Sociedad Espanola de Oftalmologia*. Volume 87, páginas 112-118. 2012.

ORNELAS, L. H. **Técnica Dietética: seleção e preparo de alimentos**. Atheneu, São Paulo, 2007.

OSZMIANSKI, J., WOJDYLO, A., KOLNIAK, J. Effect of L-ascorbic acid, sugar, pectin and freeze–thaw treatment on polyphenol content of frozen strawberries. *LWT - Food Science and Technology*. Volume 42, páginas 581-586. 2009.

PELLEGRINI, N., CHIAVARO, E., GARDANA, C., MAZZEO, T., CONTINO, D., GALLO, M, RISO, P., FOGLIANO, V., PORRINI, M. Effect of different cooking methods on color, phytochemical concentration, and antioxidant capacity of raw and frozen Brassica vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Volume 58, páginas 4310–4321. 2010.

PETERSEN, M. A. Influence of sous vide processing, steaming and boiling on vitamin retention and sensory quality in broccoli florets. *Z Lebensm Unters Forsch.* Volume 197, páginas 375-380. 1993.

PHILIPPI, S. T. **Nutrição e Técnica Dietética.** Manole, Barueri, 2006.

PICCHI, V.; MIGLIORI, C.; SCALZO, R. L.; CAMPANELLI, G.; FERRARI, V.; CESARE, L. F. D. Phytochemical content in organic and conventionally grown Italian cauliflower. *Food Chemistry.* Volume 130, páginas 501-509. 2012.

PIGOLI, D. R. **Dissertação de Mestrado.** Alterações nutricionais em hortaliças decorrentes de diferentes métodos de cozimento. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrônomicas. Botucatu, 2012.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT – Food Science and Technology.* Volume 40, páginas 1-11. 2007.

PORTER, Y. Antioxidant properties of green broccoli and purple-sprouting broccoli under different cooking conditions. *Bioscience Horizons.* Volume 5, páginas 1-11. 2012.

PUUPPONEN-PIMIA, R., HAKKINEN, S. T.; AARNI, M.; SUORTTI, T.; LAMPI, A.; EUROLA, M.; PIIRONEN, V.; NUUTILA, A. M.; OKSMAN-CALDENTY, K.. Blanching and long-term freezing affect various bioactive compounds of vegetables in different ways. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* Volume 83, páginas 1389–1402. 2003.

RAMESH, M. N.; WOLF, W.; TEVINI, D.; BOGNÁR, A. Microwave Blanching of Vegetables. *Journal of Food Science.* Volume 67, páginas 390-398. 2006.

REHMAN, Z., ISLAM M., SHAH, W.H. Effect of microwave and conventional cooking on insoluble dietary fibre components of vegetables. *Food Chemistry.* Volume 80, páginas 237–240. 2003.

- RENNIE, C., WISE, A. Preferences for steaming of vegetables. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*. Volume 23, páginas 108-110. 2009.
- RINALDI, M., DALL'ASTA, C., MELI, F., MORINI, E., PELLEGRINI, N., GATTI, M., CHIAVARO, E. Physicochemical and Microbiological Quality of Sous-Vide-Processed Carrots and Brussels Sprouts. *Food Bioprocess and Technology*. Volume 6, páginas 3076–3087. 2013.
- ROY, M. K.; JUNEJA, L. R.; ISOBE, S.; TSUSHIDA, T. Steam processed broccoli (*Brassica oleracea*) has higher antioxidant activity in chemical and cellular assay systems. *Food Chemistry*. Volume 114, páginas 263-269. 2009.
- SÁ, M. C; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoid composition of cooked green vegetables from restaurants. *Food Chemistry*. Volume 83, páginas 595-600. 2003.
- SÁNCHEZ, C.; BARANDA, A. B.; MARANON, I. M. The effect of High Pressure and High Temperature processing on carotenoids and chlorophylls content in some vegetables. *Food Chemistry*. Volume 163, 37-45. 2014.
- SIKORA, E.; CIEŚLIK, E.; FILIPIAK-FLORKIEWICZ, A.; LESZCZYŃSKA, T. Effect of hydrothermal processing on phenolic acids and flavonols contents in selected brassica vegetables. *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. Volume 11, páginas 45-51. 2012.
- SINGH, J.; UPADHYAY, A. K.; PRASAD, K.; BAHADUR, A.; RAI, M. Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in Brassica vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*. Volume 20, páginas 106–112. 2007.
- SOENGAS, P.; SOTELO, T.; VELASCO, P.; CARTEA, M. E. **Antioxidant Properties of Brassica Vegetables**. *Funcional Plant Science and Biotecnology*. Vol. 5:43-55, 2011.
- STINCO, C. M., FERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, F., HEREDIA, F. J., MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J., & VICARIO, I. M. Bioaccessibility, antioxidant activity and colour

of carotenoids in ultrafrozen orange juices: Influence of thawing conditions. *LWT - Food Science and Technology*. Volume 53, páginas 458-463. 2013.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; IQBAL, S. Effect of different cooking methods on the antioxidant activity of some vegetables from Pakistan. *International Journal of Food Science & Technology*. Volume 43, páginas 560-567. 2008.

Tabela brasileira de composição de alimentos (TACO). Quarta edição. Campinas, São Paulo, 2011.

TAKAYANAGI, K.; MUKAI, K. Beta-Cryptoxanthin, a Novel Carotenoid Derived from Satsuma Mandarin, Prevents Abdominal Obesity. *Nutrition in the Prevention and Treatment of Abdominal Obesity*. Volume 34, páginas 381–399. 2014.

TANWAR, B.; MODGIL, R. Flavonoids: Dietary occurrence and health benefits. Review Article. *Spatula DD*. Volume 2, páginas 59-68. 2012.

VINHA, A. F.; BARREIRA, S. V. P. COSTA, A. S. G.; ALVES, R. C.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Organic versus conventional tomatoes: Influence on physicochemical parameters, bioactive compounds and sensorial attributes. *Food and Chemical Toxicology*. Volume 67, páginas 139–144. 2014.

VOLDEN, J.; BORGE, G. I. A.; HANSEN, M.; WICKLUND, T.; BENGTSSON, G. B. Processing (blanching, boiling, steaming) effects on the content of glucosinolates and antioxidant-related parameters in cauliflower (*Brassica oleracea* L. ssp. *Botrytis*). *Food Science and Technology*. Volume 42, páginas 63-73. 2009.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos Naturais Bioativos. *Alimentos e Nutrição*. Volume 20, páginas 157-166. 2009.

YUAN, G.; SUN, B.; YUAN, J.; WANG, Q. Effects of different cooking methods on health-promoting compounds of broccoli. *Journal of Zhejiang University Science B*. Volume 10, páginas 580-588. 2009.

WILLIAMSON, G. Protective effects of fruits and vegetables in the diet. *Nutrition & Food Science*. Volume 96, páginas 6-10. 1996.

WACHTEL-GALOR, S.; WONG, K. W.; BENZIE, I. F. F. The effect of cooking on Brassica vegetables. *Food Chemistry*. Volume 110, páginas 706-710. 2008.

ZHANG, D., HAMAUZU, Y. Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food Chemistry*. Volume 88, páginas 503-509. 2004.