

KARALAHANA EKSTRAKLARININ *INVITRO* OKSİDE LİPOPROTEİNLERDE MALONDİALDEHİT SEVİYELERİNE ETKİLERİ

THE IMPACTS OF KALE EXTRACTS ON THE LEVELS OF MALONDALDEHYDE IN *INVITRO* OXIDE LIPOPROTEINS

Nurçin KÜÇÜK KENT¹, Birgül VANİZÖR KURAL², Asım ÖREM³, Sevil CENGİZ⁴

ÖZET

Karalahana (*Brassica oleracea L. var. acephala* DC.); brokoli, karnabahar, brüksel lahanası, kırmızı lahana gibi sebzelerin yer aldığı çok sayıda türün bulunduğu *Brassicaceae* veya *Cruciferae* ailesinin bir üyesidir. Besin kaynağı olarak özellikle Karadeniz bölgesinde yaygın tüketilmektedir. Antioksidan özelliği bilinen karalahananın lipid metabolizmasına koruyucu etkisi ile ilgili sınırlı bilgi yer almaktadır.

Bu çalışmanın amacı, karalahana bitkisi yapraklarının sulu ve metanolik ekstraktların *invitro* ortamda bakırla okside edilen lipoproteinlerde lipid peroksidasyon son ürünü olan malondialdehit (MDA) seviyelerine etkilerini belirlemektir. Kurutulan karalahana yapraklarından hazırlanan 5, 10, 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlardaki sulu ve metanolik ekstraktlar, ultrasantifügasyonla yoğunluk gradientine göre ayrılan düşük ve çok düşük yoğunluklu lipoproteinlere (LDL ve VLDL) ilave edildi. 1 saat sonra 37°C de 24 saat Cu⁺² ile oksidasyona maruz bırakıldı ve tiyobarbitürük asit (TBARS) yöntemi ile MDA seviyeleri belirlendi.

Ekstrak ilavesiz değerlerle karşılaştırıldığında, hem sulu hem de metanollü ekstraktlar tüm konsantrasyonlarda okside LDL'de MDA seviyeleri azaltırken, okside VLDL'de MDA seviyeleri sulu ekstrakta sadece 100 µg/mL'lık konsantrasyonda, metanollü ekstrakta ise 100, 50 ve 25 µg/mL'lık konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlendi (p<0,05).

Sonuç olarak, karalahana ekstraktlarının, özellikle metanolik ekstraktların, lipoproteinlerde lipid peroksidasyonunu engelleyici niteliğe sahip olduğu, dolayısıyla karalahana ile beslenmenin kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde yarar sağlayabileceği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Karalahana, Lipid peroksidasyonu, Lipoproteinler

ABSTRACT

Kale or black cabbage (*Brassica oleracea L. var. acephala* DC.) is a member of *Brassicaceae* or *Cruciferae* family including a lot of vegetable species containing: broccoli, cauliflower, brussels sprouts, red cabbage etc.. Kale is consumed as a food source especially in Black Sea Region. Although Kale's antioxidant property is known, there is limited information about its protective effect on lipid metabolism.

The purpose of this study was to evaluate whether aqueous and methanolic extracts prepared from leaves of kale plant could have protective effects against the final product of lipid peroxide as malondialdehyde (MDA) in oxidized lipoproteins by copper. The prepared of aqueous and methanolic extracts from dry leaves of kale at 5, 10, 25, 50 and 100 µg/mL concentrations were added to low and very low density lipoproteins (LDL, VLDL) which were separated with density gradient by ultracentrifugation. After 1 hour, they have been exposed to oxidation by Cu⁺² at 37°C during 24 hours and the levels of MDA was determined by thiobarbituric acid (TBARS) method.

When it is compared with the levels of MDA without extracts, a statistically significant reduction was observed the level of MDA at both concentration of aqueous and methanolic extracts in oxidized LDL and also, only reduction at aqueous extract with 100 µg/mL and methanolic extracts with 100, 50 and 25 µg/mL in oxidized VLDL (p<0,05).

Finally, it may be said that the extracts of kale, especially methanolic extracts, may have inhibitive composition of lipid peroxidation in lipoproteins and therefore, nutrition with kale may be beneficial in prevention of cardiovascular diseases.

Keywords: Antioxidant, Kale, Lipid peroxidation, Lipoproteins

*Bu çalışma için gerekli etik kurul izinleri KTÜ Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı (11.03.2004, Etik Kurul No:2004/31) tarafından alınmıştır ve çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Araştırma Projesi (Proje No: 2004.114.001.03) ile desteklenmiştir "Karalahananın Lipoproteinlerin Oksidasyonuna Etkisi" başlıklı yüksek lisans tezi içeriğinde yer almaktadır.

¹Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Yardımcı Doçent Doktor

²Karadeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD Profesör Doktor

³Karadeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD Profesör Doktor

⁴Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Yardımcı Doçent Doktor

GİRİŞ

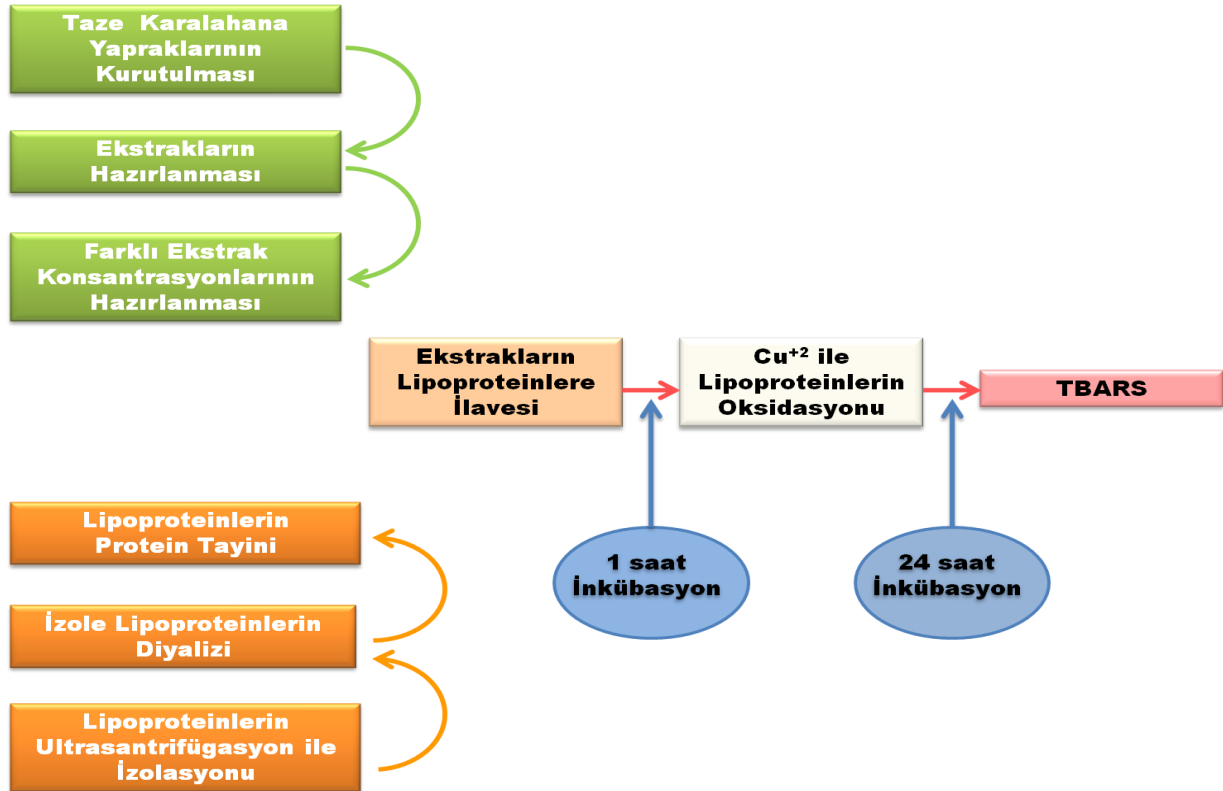
Brassicaceae veya *Cruciferae* bitkileri 338 cinsin ve 3709 türün yer aldığı, tarımdan insanların tükettiği besinlere, hayvan yemlerinden, yağ ürünleri ve biyoyakıtlara kadar birçok alanda kullanılan geniş bir bitki ailesidir (1-3). Altı alt gruba ayrılan *Brassica oleracea* bitkilerinden lahanana, brokoli, karnıbahar, Brüksel lahanası, karalahana sebze olarak sıklıkla tüketilmektedir. (3-5). Karalahana (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) çok eski zamanlardan beri Doğu Akdeniz ülkelerinde ve Türkiye’de özellikle Karadeniz Bölgesinde yaygın olarak yetişen bir bitki türüdür (6,7). Karalahana içeriğindeki fenolik bileşikler, glukosinolatlar, karotenoidler, vitaminler (C, K, E vitaminleri), essansiyel elementler, yağ asitleri ve aminoasitler ile oksidatif hasara karşı yararlı bir besin kaynağı olduğu düşünülmektedir (1,5,8-11).

Lipoproteinler, serbest ve ester kolesterol, triaçilgliserol, yağ asitleri ve çeşitli protein ve vitamin gibi bileşiklerden oluşan lipid taşıyıcı proteinlerdir (12). Oksidatif stres sonucu lipoproteinlerin özellikle LDL'nin oksidasyona maruz kalması köpük hücre oluşumuna yol açarak kardiyovasküler hastalıklara neden olmaktadır (12,13). Bu nedenle lipoproteinleri oksidasyonlara karşı korumada antioksidan besin kaynaklarının yararlı olabileceği düşünülmektedir (14,15).

Karalahananın lipoproteinlerin oksidasyonu ve MDA seviyelerine etkisi ile ilgili sınırlı literatür çalışması yer almaktadır. Bu çalışmanın amacı; farklı konsantrasyonlardaki (100-5 µg/mL) sulu ve metanollü kara lahanana yaprağı ekstraktlarının *invitro* ortamda Cu⁺² ile okside edilen LDL ve VLDL'nin lipid peroksidasyonu son ürünü olan malondialdehit seviyelerini azaltıp azaltamayacağını belirlemektir.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışma yer alan deney aşamaları aşağıda ayrıntılı bir şekilde açıklanmış olup Şekil 1'de özetlenmiştir.



Şekil 1. Deney Aşamaları

Karalahana Ekstraktlarının Hazırlanması

Trabzon ili ve ilçelerinden temin edilen karalahana bitkisine ait taze ve yeşil yapraklar serin ve karanlık bir ortamda kurutuldu. Kurutulan karalahana örnekleri öğütücüde küçük parçalara ayrıldı ve harmanladı. Sulu ekstraktlar 56 g öğütülmüş karalahana bitkisi ultra saf su içinde 6 saat boyunca kaynatılarak; metanollü ekstraktlar ise 8 g öğütülmüş kara lahana bitkisi sokslet aparatında yaklaşık 24 saat boyunca çözücü ortam metanol olacak şekilde inkübe edilerek elde edildi. Kuru ağırlık hesapları rotary evaporatörde (R100, Bibby Sterilin Ltd., UK) ekstraktların 50 mL'sinin uçurulmasıyla sağlandı. Son olarak ekstraktlar 0,2 µM çapındaki filtre kağıtlarından süzülerek aligotlanıp deney gününe kadar -80°C'de saklandılar.

Lipoproteinlerin İzolasyonu

Yazılı onamları alınan sağlıklı 15 kişiden temin edilen EDTA'lı kan örnekleri 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 4°C 4000 rpm' de 20 dakika santrifüjlenerek plazmaları elde edildi. Elde edilen plazmalardan Slavovs ve ark. (1985) metoduna göre polikarbonat ultrasantrifüj tüpünde yoğunluğu NaBr ile 1.30 g/mL'ye getirilen plazma 1.24, 1.063, 1.019 ve 1.006 g/mL'lik gradient çözeltisi (NaBr/NaCl/EDTA/NaN₃) ile tabakalandırılıp Beckman Optima LE80K ultrasantrifüjünde 50000 rpm'de (90Ti rotor) 3 saat santrifüjlenerek elde edildiler (16). İzole lipoproteinler; 4°C'lik karanlık bir ortamda her 3-4 saatte tampon yenilenerek önce 10 mM EDTA-10 mM fosfat tampon içinde (pH 7,4) ve sonrasında 10 mM EDTAsız fosfat tamponu (pH 7,4) içinde 12 saat boyunca diyalize bırakıldı (17). Ardından protein miktarları ise Lowry metodu (1951) kullanılarak belirlendi (18).

İzole Lipoproteinlerin Ekstraktlarla ve Bakırla Muamele Edilmesi

Sulu ve metanolik karalahana ekstraktları son konsantrasyonları 100, 50, 25, 10, 5 µg/mL olacak şekilde 50 µg/mL protein konsantrasyonuna ayarlanan LDL ve VLDL'lere eklenerek 37°C' de 1 saat

süresince ön-inkübasyona bırakıldı. Ekstraktlı ve ekstraksız izole lipoproteinler son konsantrasyonu 1,67 µM olacak şekilde CuSO₄.5H₂O ile muamele edilerek 37°C de 24 saat boyunca karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Oksidasyon, 1 mM EDTA ilave edilerek durduruldu (19, 20).

Malondialdehit Seviyelerinin Belirlenmesi

Oksidasyon sonrası lipoproteinlerdeki MDA seviyeleri, tiyobarbitürik asit yöntemi (TBARS) ile tayin edildi (21). Spektrofotometrik olarak 532 nm'de ölçülerek 1,1,3,3 tetrametoksiopropan standartları gözönüne alınarak numunelerdeki MDA seviyeleri belirlendi.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirilmede ikiden fazla grupların değerlendirmesinde Kruskal Wallis ve ikili grup değerlendirmelerinde ise Mann Whitney U testleri p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı farklı kabul edildi. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak gösterildi.

BULGULAR

Karalahana bitkisi yapraklarından hazırlanan sulu ve metanolik ekstraktların bakırla oluşturulan *invitro* LDL ve VLDL'de MDA, dolayısıyla lipid peroksidasyonuna etkisi Tablo 1'de gösterilmektedir. Oksidasyon öncesi değerlerine kıyasla; oksidasyon sonrası MDA seviyeleri ekstraksız lipoprotein gruplarında LDL için 8,2 kat, VLDL için ise 2,3 kat arttığı gözlemlendi (p<0,001). Metanollü ve sulu ekstraktlarla muamele edilen lipoproteinlerde ekstrak konsantrasyon artışına paralel olarak azalan MDA ürünü elde edildiği tespit edildi. Ancak tüm konsantrasyonlardaki hem sulu hem de metanollü ekstraktlar okside LDL'de MDA seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı azaltırken, okside VLDL'de MDA seviyelerini sulu ekstrakta sadece 100 µg/mL'lik konsantrasyonda, metanollü ekstrakta ise 100, 50 ve 25 µg/mL'lik konsantrasyonda anlamlı azalmıştı. Oksidasyona karşı koruyucu etkinin en fazla 100 µg/mL konsantrasyonundaki ekstraktlı gruplarda olduğu gözlenirken, oksidasyona karşı ortalama LDL inhibisyon yüzdeleri

yaklaşık olarak metanollü ve sulu ekstraktı gruplarda sırasıyla %76 ve %72 değerleri civarındaydı (Şekil 2). Metanolik ve sulu ekstrakt içeren VLDL oksidasyon gruplarında

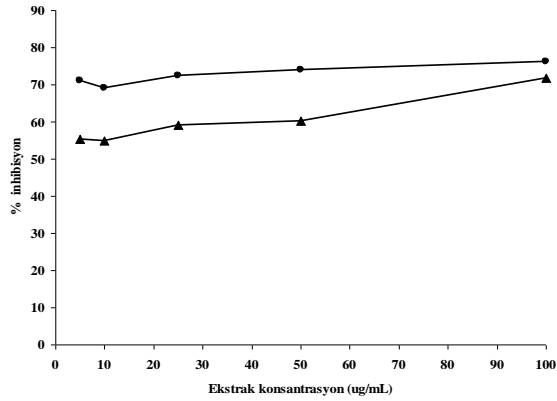
oksidasyon sonrasında VLDL yüzde inhibisyon değerleri ise sırasıyla ortalama olarak %53 ve % 47 değerleri civarındaydı (Şekil 3).

Tablo 1. Ekstraktı Ekstraksız Okside Lipoproteinlerde MDA Seviyeleri

	Oksidasyon Öncesi	Ekstraksız Oksidasyon Sonrası	Ekstraktı Oksidasyon Sonrası Ekstrakt Konsantrasyonu (µg/mL)				
			0	5	10	25	50
Sulu Ekstraktlar							
LDL-MDA nmol/L	2,60 ± 1,06	21,33 ± 8,39	8,54 ± 2,23*	8,6 ± 2,17*	7,93 ± 2,82*	7,75 ± 2,27*	5,41 ± 1,76*
VLDL-MDA nmol/L	2,92 ± 1,74	6,83 ± 3,69	4,59 ± 2,90	4,43 ± 2,66	4,48 ± 2,49	3,86 ± 2,52	3,41 ± 2,17*
Metanollü Ekstraktlar							
LDL-MDA nmol/L	2,60 ± 1,06	21,33 ± 8,39	5,44 ± 2,46*	5,61 ± 1,79*	5,15 ± 1,76*	4,77 ± 1,75*	4,68 ± 2,14*
VLDL-MDA nmol/L	2,92 ± 1,74	6,83 ± 3,69	4,22 ± 2,34	3,98 ± 2,22	3,76 ± 2,04*	3,72 ± 2,0*	3,03 ± 1,76*

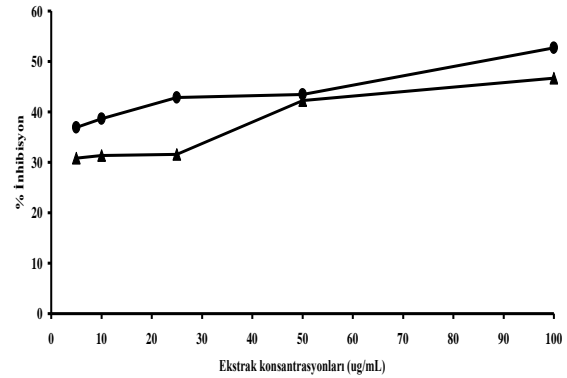
*Ekstraksız okside lipoproteinlerdeki MDA seviyelerine (0 grubu olarak ifade edilenler) göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0,01).

Şekil 2. Farklı Ekstrakt Konsantrasyonlarının LDL-MDA Oluşumunu İnhibe Edici Etkisi.



● : Metanollü Ekstraktlar, ▲ : Sulu Ekstraktlar.

Şekil 3. Farklı Ekstrakt Konsantrasyonlarının VLDL-MDA Oluşumunu İnhibe Edici Etkisi.



● : Metanollü Ekstraktlar, ▲ : Sulu Ekstraktlar

TARTIŞMA

Bu çalışmada taze karalahana yapraklarının sulu ve metanolik ekstraktların lipoproteinlerdeki lipid peroksidasyonuna karşı engelleyici etki gösterip göstermeyeceği incelendi. Çalışma sonunda sulu ve metanolik karalahana ekstraktlarının lipid peroksidasyon son ürünü olan MDA seviyesini ekstrak konsantrasyonu artışına paralel olarak düşürdüğü, özellikle metanolik ekstraktlarının düşürücü etkisinin fazla olduğu belirlendi.

Yöremizde yetişen karalahananın antioksidan özellikleri daha önceki çalışmalarla ortaya konulmuştur (9,11). Karalahana bitkisi birçok lahana çeşidine kıyasla içeriğindeki yüksek seviyedeki antioksidan bileşikler, C ve K vitamini, karotenoid, glukosinolatlar, esansiyel yağ asitleri ve diğer fenolik bileşiklerin bulunduğu yararlı bir sebze çeşididir (5,10, 22). Antioksidan besinler, metabolizmada artan oksidatif strese karşı savunmada koruyucu ve önemli görevler üstlenmektedirler (23). Oksidatif stres ile dolaşımında yükselen serbest radikal içerikli bileşikler; plazmadaki lipidlerin taşınımında görevli hidrofilik yapıları LDL ve VLDL lipoproteinlerinin oksidasyonlarını arttırarak ve sonrasında köpük hücre oluşumu ile başlayan karmaşık bir patolojik döngüyü tetikleyerek aterosklerozun meydana gelmesine neden olurlar (12, 13, 15, 24). Günümüze kadarki literatür bilgilerinde *Crucifera* bitkilerinin LDL oksidasyonuna karşı koruyucu etkilerinin olduğu rapor edilse de (10, 22, 25, 26) karalahana ile ilgili yer alan çalışmaların çoğunda: karalahananın antioksidan bileşik içeriği, besin kaynağı olarak tüketim şekilleri konuları çoğunlukla yer almaktadır ve lipid metabolizması ile ilişkisini ele alan sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır (10,11, 22, 27). Kural ve ark. (2011), karalahana ekstraktlarının lipoproteinlerin oksidasyonuna karşı direncini attırdığını kinetik konjuge dien takibi yaparak belirlemiştirler (11). Ayrıca metanolik ekstraktlarının lipoproteinlerin

oksidasyona karşı direncini arttırmada sulu ekstraktlardan daha etkili olduğunu ifade etmişler ve bunun nedenini de metanolik ekstraktların daha yüksek fenolik ve flavonoid içeriğe sahip olmasına bağlamışlardır. Bizim çalışmada da metanolik ekstraktlarının lipid peroksidasyonunu göstergesi olan MDA seviyesini düşürmede daha etkili olması bu çalışmayı desteklemektedir. Manchali ve ark. (2012) karalahanın da içinde yer aldığı *Cruciferous* sebzelerinin; LDL azaltıcı, serbest radikallere karşı mücadeleci ve oksidatif stresi azaltıcı etkilerinin kalp sağlığına yararlı olabileceğini rapor etti (28). Diğer yandan, bu çalışmada hazırlanan karalahana ekstraktları kaynatılarak elde edildi ve karalahananın tüketim ve pişirme metodları da kardiyokoruyuculuğu açısından önemli olabilir (29-32).

Sonuçta, karalahananın kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörü LDL ve VLDL oksidasyonlarına karşı önleyici etkileri sebebiyle besin olarak tüketiminin yararlı olacağı düşünülmektedir ve bu konuda ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Verkerk R, Schreiner M, Krumbein A, Ciska E, Holst B, Rowland I, Schrijver RD, Hansen M, Gerh C, Mithen R, Dekker M. Glucosinolates In Brassica Vegetables: The Influence Of The Food Supply Chain On Intake, Bioavailability And Human Health. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009; 53: S219 – S265.
2. Franzke A, Lysak MA, Al-Shehbaz IA, Koch MA, Mummenhoff K. Cabbage Family Affairs: The Evolutionary History Of Brassicaceae. *Trends in Plant Science.* 2011;16; (2): 108-116.
3. Mourato MP, Moreira IN, Leitão I, Pinto FR, Sales JR, Martins LL. Effect Of Heavy Metals In Plants Of The Genus Brassica. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16: 17975-17998.
4. Rakow G. Species Origin and Economic Importance of Brassica. *Biotechnology in Agriculture and Forestry.* 2004; 54: 3-7.
5. Podsedek A. Natural Antioxidants And Antioxidant Capacity Of Brassica Vegetables: A Review. *LWT.* 2007; 40: 1-11.
6. Balkaya A, Yanmaz R. Promising Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) Populations From Black Sea Region, Turkey. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science.* 2005; 33; (1): 1-7.
7. Hagen SF, Borgea GIA, Solhaugb KA, Bengtsson GB. Effect Of Cold Storage And Harvest Date On Bioactive Compounds In Curly Kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). *Postharvest Biology and Technology.* 2009; 51: 36-42.
8. Kopsell DE, Kopsell DA, Lefsrud MG, Curran-Celentano J. Variability In Elemental Accumulations Among Leafy *Brassica oleracea* Cultivars and Selections. *Journal Of Plant Nutrition.* 2004; 27; (10): 1813-1826.
9. Ayaz FA, Glew RH, Millson M, Huang HS, Chuang LT, Sanz C, Hayırlıoğlu-Ayaz S. *Nutrient contents of kale (Brassica oleracea L. var. acephala DC.).* *Food Chemistry.* 2006; 96: 572-579.
10. Jahangir M, Kim HK, Choi YH, Verpoorte R. Health-Affecting Compounds In *Brassicaceae*. *CRFSFS.* 2009; 8: 31-43.

11. Kural BV, Küçük N, Yücesan FB, Örem A. Effects Of Kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC) Leaves Extracts On The Susceptibility Of Very Low And Low Density Lipoproteins To Oxidation. *Indian J Biochem Biophys.* 2011; 48: 361-364.
12. Heinecke JW. Oxidants And Antioxidants In The Pathogenesis Of Atherosclerosis: Implications For The Oxidized Low Density Lipoprotein Hypothesis. *Atherosclerosis.* 1998; 141: 1–15.
13. Nakajima K, Nakano T, Tanaka A. The Oxidative Modification Hypothesis Of Atherosclerosis: The Comparison Of Atherogenic Effects On Oxidized LDL And Remnant Lipoproteins In Plasma. *Clinica Chimica Acta.* 2006; 367: 36 – 47.
14. Verhoeven DTH, Goldbohm RA, Poppel GV, Verhagen H, Brandt PAVD. Epidemiological Studies on Brassica Vegetables and Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 1996; 5: 733-748.
15. Agbor GA, Vinson JA, Oben JE, Ngogang JY. Antioxidant Effect of Herbs and Spices on Copper Mediated Oxidation of Lower and Very Low Density Lipoprotein. *Chinese Journal of Natural Medicines.* 2010; 8: 0114–0120.
16. Sclavons MM, Cordonnier CM, Mailleux PM, Heller FR, Dessager JP, Harvent CM. Fast Separation Of Tree Main Plasma Lipoprotein Classes By Ultracentrifugation Using Vertical Rotor and Multiple Discontinues Density Gradient. *Clin Chim Acta.* 1985; 153; (2): 125-135.
17. Stoscheck CM. Quantification Of Protein. *Guide To Protein Purification Methods In Enzymology.* 1990; 182: 50-68.
18. Lowry OH, Rosebrough NL, Farr AL, Randel RJ. Protein Measurement With Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-275.
19. Menendez R, Fraga V, Amor AM, González RM, Mas R. Oral Administration Of Policosanol Inhibits In Vitro Copper Ion-Induced Rat Lipoprotein Peroxidation. *Physiology & Behavior.* 1999; 67: 1-7.
20. Puhl H, Waeg G, Esterbauer H. Methods To Determine Oxidation Of Density Lipoproteins: Method In *Enzymology.* 1994; 233: 425-441.
21. Yagi K. Lipid Peroxides and Related Radicals In Clinical Medicine: Free Radicals In Diagnostic Medicine. Plenum Press, Newyork. 1994; Pp. 1-15.
22. Soengas P, Sotelo T, Velasco P, Carrea ME. Antioxidant Properties of Brassica Vegetables. *Functional Plant Science and Biotechnology.* 2011; 5; (2): 43-55.
23. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative Stress Relationship With Exercise And Training. *Sports Med.* 2006; 36; (4): 327-358.
24. Torres N, Guevara-Cruz M, Velázquez-Villegas LA, Tovar AR. Nutrition And Atherosclerosis. *Archives of Medical Research.* 2015; 46: 408-426.
25. Duchnowicz P, Borsa M, Podsédek A, Koter-Michalaka M, Broncel M. Effect Of Polyphenols Extracts From Brassica Vegetables On Erythrocyte Membranes (in vitro study). *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2012; 3; 4: 783–790.
26. Harish R, Chauhan JB. In Vitro Antioxidant Activity And Total Phenolic Of *Brassica oleracea* var. *gemmifera* (Brussel sprouts). *J Nat Prod Plant Resour.* 2014; 4; (1): 57-63.
27. Nazzaro F, Cardinale F, Cozzolino A, Granese T, Fratianni F. Polyphenol Composition and Antioxidant Activity of Different Potentially Functional Kale-Based Snacks. *Food and Nutrition Sciences.* 2014; 5: 1145-1152.
28. Manchali S, Chidambara Murthy KN, Patil BS. Crucial Facts About Health Benefits Of Popular Cruciferous. *Journal Of Functional Foods.* 2012; 4: 94 –106.
29. Kahlon TS, Chapman MH, Smith GE. In Vitro Binding Of Bile Acids By Spinach, Kale, Brussels Sprouts, Broccoli, Mustard Greens, Green Bell Pepper, Cabbage And Collards. *Food Chemistry.* 2007; 100: 1531–1536.
30. Murador DC, Cunha DT, Rosso VV. Effects Of Cooking Techniques On Vegetable Pigments: A Meta-Analytic Approach To Carotenoid And Anthocyanin Levels. *Food Research International.* 2014; 65: 177–183.
31. Shahidi F, Ambigaipalan P. Phenolics And Polyphenolics In Foods, Beverages And Spices: Antioxidant Activity And Health Effects –A Review. *Journal of Functional Foods.* 2015; 18: 820–897.
32. dos Reis LCR, de Oliveira VR, Hagen MEK, Jablonski A, Flôres SH, de Oliveria Rios A. Carotenoids, Flavonoids, Chlorophylls, Phenolic Compounds And Antioxidant Activity In Fresh And Cooked Broccoli (*Brassica oleracea* var. Avenger) And Cauliflower (*Brassica oleracea* var. Alpha F1). *LWT - Food Science and Technology.* 2015; 63 (1): 177-183.