



# UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E IDENTIFICAÇÃO  
E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE SEMENTES  
E CASCAS DE NOVOS CULTIVARES DE GIRASSOL (*Helianthus  
annuus L.*)**

MARYANA SILVA CANUTO  
ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marília Oliveira Fonseca Goulart

Maceió, Estado de Alagoas  
Junho, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
Campus A.C. Simões  
Tabuleiro do Martins  
57072-970 - Maceió-AL

**MARYANA SILVA CANUTO**

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E IDENTIFICAÇÃO E  
QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE SEMENTES E CASCAS DE  
NOVOS CULTIVARES DE GIRASSOL (*Helianthus annuus L.*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Oliveira Fonseca Goulart

Maceió-AL  
2017

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

C235a Canuto, Maryana Silva.

Avaliação da capacidade antioxidante e identificação e quantificação de compostos fenólicos de sementes e cascas de novos cultivares de girassol (*Helianthus annuus* L.) / Maryana Silva Canuto. – 2017.

83 f. : il.

Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart.

Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2017.

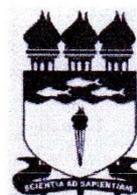
Bibliografia: f. 71-83.

1. Girassol. 2. Sementes secas. 3. Capacidade atioxidante. 4. Ácido clorogênico. I. Título.

CDU: 543.066



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA

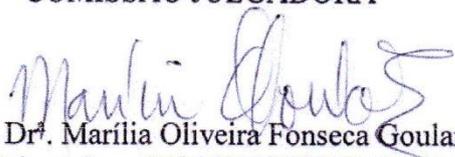


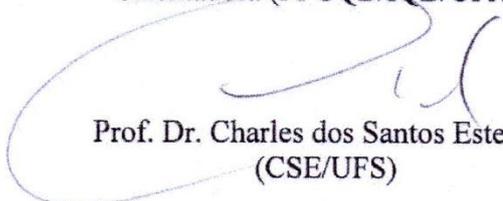
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone/Fax: (82) 3214-1144  
email: ppgqb.ufal@gmail.com

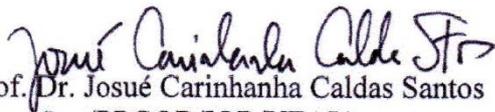
**FOLHA DE APROVAÇÃO**

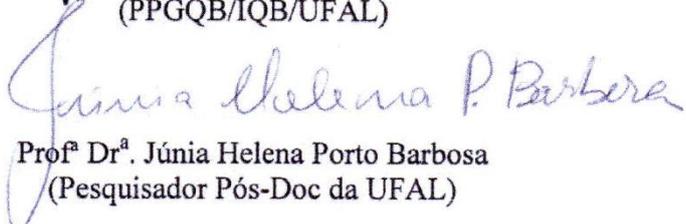
Membros da comissão julgadora da defesa de dissertação de mestrado de **Maryana Silva Canuto**, intitulada: “AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE SEMENTES E CASCAS DE NOVOS CULTIVARES DE GIRASSOL (*Helianthus annuus* L.)”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 17 de fevereiro de 2017, às 9h, na Sala de Reuniões do IQB.

COMISSÃO JULGADORA

  
Prof. Dr. Marília Oliveira Fonseca Goulart  
Orientadora (PPGQB/IQB/UFAL)

  
Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam  
(CSE/UFS)

  
Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos  
(PPGQB/IQB/UFAL)

  
Prof.ª Dr.ª Júnia Helena Porto Barbosa  
(Pesquisador Pós-Doc da UFAL)

## AGRDECIMENTOS

Quero agradecer a Deus, sem Ele nem uma vírgula deste trabalho seria colocada. Foi Ele quem me concedeu todas as oportunidades e abriu todas as portas.

Agradeço aos meus pais, Josival e Josinete, que acompanharam todo meu esforço e me deram apoio e forças para continuar, foram pessoas essenciais para esta conquista. Aos meus irmãos, Mayara e Madson, e meu namorado, Ayslan, por terem “arregaçado as mangas” e se disponibilizaram a me ajudar em tudo que fosse necessário.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra. Marília Goulart, por confiar em mim, na realização desse trabalho maravilhoso. Agradeço a Deus pela vida dela, um exemplo de esforço e dedicação à ciência.

Às minhas companheiras particulares de pesquisa, Jadriane e Lane, que em todo tempo estiveram ao meu lado e sempre me ajudaram, agradeço pelos ensinamentos, cobranças e principalmente pela amizade firmada entre nós.

À EMBRAPA, na pessoa dos pesquisadores Claudio Guilherme Portela e Luis Carlos Stutz, pelo fornecimento das sementes e disponibilidade durante todo o trabalho.

A todos os amigos do laboratório de Eletroquímica, em especial André, Thaíssa, Waldomiro, Eivaldo, Fabi Santos, Lourdinha e a queridíssima Júnia, que em tudo se fez presente, com conselhos incomparáveis. Além das parcerias e amizades construídas no IFAL como Sarah, Mayrane, Walker, Cristian e os demais alunos, sob a orientação dos professores Phabyanno Lima e Wilney Santos.

Ao professor Josué pela parceria, avaliações e contribuições durante todo o trabalho.

À professora Dra. Clésia Cristina Nascentes (Departamento de Química Analítica da UFMG), pela obtenção da composição inorgânica das amostras de girassol.

Aos amigos da graduação e pós-graduação que me acompanharam de perto e torceram por mim: Ygor, João César, Jéssica Guerra, Fran, Duda, Carol, Villy, Jessica Rocha, Thatiane e Sheila.

Aos meus amigos pessoais e “intransferíveis” Marcelo, Janiele, Jaci, Lucas, Van, Larissa, Kamila, Adna, Rogério, Kiki, Cido, Elton, Clívia e Minele que oravam por mim e sorriam comigo.

À Universidade Federal de Alagoas, ao Instituto Federal de Alagoas e ao Instituto de Química e Biotecnologia pela disponibilidade na execução do trabalho e oportunidade de realizar o curso de pós-graduação.

À CAPES, ao CNPq, à FAPEAL e ao programa PROCAD pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram, apoiaram e acreditaram no meu trabalho e que de alguma forma foram peças importantes na execução.

## RESUMO

O girassol é considerado uma oleaginosa rica em vitaminas, terpenóides, aminoácidos, carboidratos, ácidos fenólicos, entre outros. A presença desses compostos está relacionada às inúmeras atividades biológicas atribuídas à semente dessa planta, incluindo a atividade antioxidante, além da atuação na prevenção de doenças crônicas e degenerativas. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar sementes e cascas de girassol de diferentes cultivares, quanto à capacidade antioxidante e ao perfil químico. Os extratos metanólicos das amostras de girassol foram avaliados quanto à sua composição química (por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE), conteúdo de fenóis totais, flavonas e flavonóis e capacidade antioxidante (DPPH<sup>•</sup>, FRAP, peroxidação lipídica), além de ensaios eletroquímicos, com o uso da voltametria cíclica. O conteúdo total de fenóis variou entre 43,6 – 95,2 mg EAG/g de extrato seco, enquanto o conteúdo total de flavonas e flavonóis, entre 4,2 – 47,7 mg EQ/g de extrato seco. Houve variações também na atividade sequestradora de radicais (ASR) entre 21 – 40,8%, enquanto os valores de FRAP encontraram-se entre 89,7 – 196,9 mg ET/g de extrato seco. Em ensaios com utilização de membranas biomiméticas para avaliação da peroxidação lipídica, todos os extratos (25 µg/mL) mostraram proteção superior a 50%. A quantificação dos compostos individuais, identificados por CLAE, foi realizada por calibração externa, sendo possível a identificação de quatro compostos principais, incluindo ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico e rutina. No estudo eletroquímico, voltamogramas cíclicos, em eletrodo de carbono vítreo, evidenciaram a presença de picos com perfis e valores de  $E_{pa}$  semelhantes aos de ácidos fenólicos, como o ácido clorogênico, com transferência de elétrons de natureza reversível ou quase reversível. A determinação da composição revelou a presença de metais importantes, principalmente na atividade antioxidante. Os extratos revelaram ainda ausência de atividade antiglicante, para o método proposto. Os resultados obtidos quanto à capacidade antioxidante e à presença de compostos fenólicos biologicamente ativos, nas amostras de girassol, demonstram seu potencial uso para fins medicinais ou nutracêuticos.

**Palavras-Chave:** Girassol. Semente e casca. Capacidade antioxidante. Compostos fenólicos. Cromatografia líquida de alta eficiência. Ácido clorogênico.

## ABSTRACT

Sunflower is considered an oleaginous rich in vitamins, terpenes, aminoacids, carbohydrates, phenolic acids, among others. The presence of these compounds is related to the numerous biological activities assigned to the seed of this plant, including antioxidant activity, as well as action in the prevention of chronic and degenerative diseases. Thus, the objective of this study was to evaluate sunflower seeds and shells of different cultivars, as the antioxidant capacity and the chemical profile. The methanol extracts of sunflower samples were evaluated for their chemical composition (high-performance liquid chromatography - HPLC), content of total phenols, flavones and flavonols and antioxidant capacity (DPPH<sup>•</sup>, FRAP, lipid peroxidation), and electrochemical tests, using cyclic voltammetry. The total phenolic content ranged from 43.6 to 95.2 mg GAE, while the total content of flavones and flavonols, varied from 4.2 to 47.7 mg EQ. There was also variation in the scavenging activity of radicals (RSA) from 21 to 40.8%, while FRAP values were between 89.7 to 196.9 mg ET/g dry extract. In assays employing biomimetic membranes for evaluation of lipid peroxidation, all extracts (25 ug/mL) showed protection superior to 50%. The quantification of individual compounds, identified by HPLC, was performed by external calibration. It was possible to identify four major components, including chlorogenic acid, caffeic acid, p-coumaric acid and rutin. In the electrochemical study, cyclic voltammograms, on glassy carbon electrode, had shown the presence of peaks with profiles and  $E_{pa}$  values similar to those of phenolic acids, such as chlorogenic acid, with a reversible or quasi-reversible electron transfer nature. A determination of the composition revealed a characteristic of important metals, mainly in the antioxidant activity. The extracts also revealed the absence of antiglacial activity, for the proposed method. The results obtained so far and the presence of biologically active phenolic compounds in sunflower samples, demonstrate their potential use for medicinal or nutraceutical purposes.

**Keywords:** Sunflower. Seed and skin. Antioxidant capacity. Phenolic compounds. High-performance liquid chromatography. Chlorogenic acid.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação dos antioxidantes (azul: antioxidantes endógenos; verde: antioxidantes exógenos). .....	16
Figura 2. Vias de formação de EROs, o processo de peroxidação lipídica e o papel de antioxidantes no estresse oxidativo. ....	17
Figura 3. Compostos presentes na semente de girassol ( <i>Helianthus annuus</i> L.), onde (1) tiamina, (2) riboflavina, (3) $\alpha$ -tocoferol e (4) guaianólídeo. ....	24
Figura 4. Estrutura química básica do flavonóide. ....	25
Figura 5. Reação de redução do radical DPPH• por um antioxidante genérico RH. ....	29
Figura 6. Reação do ácido gálico em presença do molibdato (VI), componente do reagente de Folin-Ciocalteu. ....	31
Figura 7. Complexação do flavonóide quercetina com cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ) formando o complexo estável flavonóide- $Al^{3+}$ . ....	32
Figura 8. Reação de redução do complexo TPTZ (Fe (III)/Fe(II)). ....	32
Figura 9. Sonda fluorescente C11-BODIPY ancorada a um lipossomo. ....	33
Figura 10. Reação de geração de radicais durante o ensaio de peroxidação lipídica. ....	34
Figura 11. Principais etapas da reação de Maillard envolvendo açúcares redutores. ....	37
Figura 12. Representação esquemática de uma célula eletroquímica, constituída por três eletrodos. ....	45
Figura 13. Curva analítica para o método CTF (ácido gálico). ....	49
Figura 14. Curva analítica para o método CTFLA (quercetina). ....	49
Figura 15. Curva analítica para o método FRAP (trolox). ....	52
Figura 16. Proteção contra a peroxidação lipídica (%) em função do tempo (min). ..	54
Figura 17. Composição fenólica de extratos metanólicos das farinhas determinada por análise de CLAE, 1) ácido clorogênico, 2) ácido caféico, 3) Ácido p-cumárico e 4) rutina. ....	59
Figura 18. Voltamogramas dos extratos das farinhas de girassol em solução tampão fosfato, pH 7,4. Velocidade de varredura $50\text{ mV s}^{-1}$ . (A) VC dos extratos do cultivar EMBRAPA 122, (B) VC dos extratos do cultivar BRS 324, (C) VC dos extratos do cultivar BRS 387, (D) VPD dos extratos do cultivar EMBRAPA 122, (E) VPD dos extratos do cultivar BRS 324 e (F) VPD dos extratos do cultivar BRS 387. ....	61
Figura 19. A) Voltamograma cíclico do ácido clorogênico (CGA) (10-3 M) em solução tampão fosfato, pH 7,4, ECV. Velocidade de varredura $50\text{ mV s}^{-1}$ . B) Mecanismo proposto para a oxidação de CGA. ....	63
Figura 20. Porcentagem de inibição da formação de AGEs dos extratos de girassol. ....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frutas oleaginosas com atividade biológica, incluindo antioxidante. ....	19
Tabela 2. Classe, estrutura química e fontes de flavonoides. ....	26
Tabela 3. Equipamentos utilizados durante os experimentos. ....	39
Tabela 4. Características botânicas e regiões de adaptação dos cultivares. ....	40
Tabela 5. Códigos de identificação dos extratos produzidos. ....	41
Tabela 6. Gradiente utilizado nas análises por CLAE. ....	45
Tabela 7. Programa de aquecimento para o procedimento de digestão assistida por radiação microondas. ....	46
Tabela 8. Parâmetros operacionais ICP-OES. ....	46
Tabela 9. Rendimento das extrações metanólicas. ....	48
Tabela 10. Teor de flavonas e flavonóis (CTFLA) e de fenólicos totais (CTF) dos extratos metanólicos de girassol. ....	50
Tabela 11. Conteúdo total de fenóis e de flavonas e flavonóis para girassol de diferentes regiões. ....	51
Tabela 12. Capacidade antioxidante sequestradora de radicais (DPPH●) e redutora de ferro (FRAP). ....	52
Tabela 13. Valores de IC <sub>50</sub> para girassol de diferentes regiões. ....	53
Tabela 14. Análise por CLAE dos extratos metanólicos de compostos fenólicos. ....	56
Tabela 15. Concentração dos compostos fenólicos nos extratos metanólicos (mg/g de extrato seco). ....	57
Tabela 16. Compostos fenólicos encontrados em amostras de girassol de diferentes regiões. ....	58
Tabela 17. Potenciais de picos anódicos e catódicos para os extratos estudados. ..	62
Tabela 18. Concentração dos metais nas amostras de girassol. ....	65
Tabela 19. Coeficientes de correlação linear de Pearson entre as variáveis CTFLA, CTF, FRAP, DPPH, Peroxidação Lipídica (PL), concentração de ácido clorogênico ([ACG]) e valores de $E_{pa}$ . ....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-HNE	4-hidroxinonenal
AAPH	2,2'-azobis(2-metilpropionamida)
ABS <sub>amostra</sub>	Absorvância da amostra
ABS <sub>controle</sub>	Absorvância do controle
AGEs	Advanced glycation endproducts: produtos de glicação avançada
ALEs	Advanced lipoxidation endproducts: produtos de lipoxidação avançada
ASR	Atividade sequestradora de radicais
CAT	Catalase
BHA	2,3-terc-butil-4-hidroxianisol
BHT	2,6-diterc-butil-p-creso
BSA	Albumina de soro bovino
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CTF	Conteúdo total de fenóis
CTFLA	Conteúdo total de flavonas e flavonóis
CUPRAC	Potencial redutor de cobre
DP	Desvio padrão
DPPH <sup>•</sup>	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EAG	Equivalentes de ácido gálico
$E_{pa}$	Potencial de pico anódico
$E_{pc}$	Potencial de pico catódico
EQ	Equivalentes de quercetina
ERNOs	Espécies reativas de nitrogênio e oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ET	Equivalentes de trolox
FC	Folin-Ciocalteu
FRAP	Potencial redutor de ferro
G-6-PDH	Glicose-6-fosfato-desidrogenase

GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduced
GSSG	Glutathione oxidized
IC <sub>50</sub>	Concentração Inibitória em 50%
ICP-MS	“Inductively coupled plasma - mass spectrometry”: Espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente
ICP-OES	“Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry”: Espectrometria de emissão óptica com plasma
$I_{pa}$	Corrente de pico anódico
$I_{pc}$	Corrente de pico catódico
IQB	Instituto de Química e Biotecnologia
MDA	Malondialdeído
ORAC	Capacidade de absorção de radicais oxigenados
SOD	Superóxido dismutase
PPA	População polinizada aberta
PH	População híbrida
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TPTZ	2,4,6-tris(2-piridil)-5-triazina
TR	Tempo de retenção
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
UV-vis	Ultravioleta visível
VC	Voltametria cíclica
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial

## SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	14
1.1	Estresse Oxidativo e defesas antioxidantes .....	14
1.2	Fontes antioxidantes naturais .....	18
1.3	Girassol .....	22
1.4	Compostos fenólicos .....	24
1.5	Composição mineral de oleaginosas .....	26
1.6	Métodos analíticos para determinação da capacidade antioxidante .....	28
1.6.1	Capacidade antioxidante frente ao radical DPPH <sup>•</sup> .....	28
1.6.2	Conteúdo total de fenóis - Método de Folin-Ciocalteu .....	30
1.6.3	Conteúdo total de flavonas e flavonóis .....	31
1.6.4	Capacidade antioxidante pelo método de redução de ferro – FRAP .....	32
1.6.5	Avaliação da inibição da peroxidação lipídica .....	33
1.7	Medidas eletroquímicas .....	34
1.8	Atividade antiglicante .....	36
2	OBJETIVOS .....	38
2.1	Geral .....	38
2.2	Objetivos Específicos .....	38
3	EXPERIMENTAL .....	39
3.1	Reagentes e equipamentos utilizados .....	39
3.2	Coleta das amostras .....	40
3.3	Preparação dos extratos metanólicos de girassol .....	41
3.4	Obtenção do conteúdo total de fenóis e de flavonas e flavonóis .....	41
3.5	Capacidade antioxidante frente ao radical DPPH <sup>•</sup> .....	42
3.6	Capacidade antioxidante redutora de ferro (FRAP) .....	42
3.7	Avaliação da inibição da peroxidação lipídica .....	43
3.8	Identificação dos compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	44
3.9	Estudos Eletroquímicos .....	45
3.10	Determinação da composição inorgânica .....	46
3.11	Determinação da atividade antiglicante .....	47
3.12	Correlação linear de Pearson .....	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	48
4.1	Obtenção do conteúdo total de fenóis e de flavonas e flavonóis .....	48
4.2	Capacidade antioxidante frente ao radical DPPH <sup>•</sup> e capacidade redutora de ferro (FRAP) .....	51
4.3	Avaliação da inibição da peroxidação lipídica .....	54

4.4	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	55
4.5	Estudo Eletroquímico .....	60
4.6	Determinação da composição inorgânica .....	63
4.7	Determinação da atividade antiglicante .....	66
4.8	Correlação linear de Pearson.....	67
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	69
6	CONCLUSÕES .....	70
7	REFERÊNCIAS.....	71

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Estresse Oxidativo e defesas antioxidantes

O estresse oxidativo é definido como um estado, onde há desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, causando a disfunção da sinalização redox e dos mecanismos de controle e danos a biomoléculas (SITI et al., 2015). Esse processo tem importantes implicações sobre a etiologia de inúmeras doenças crônicas não transmissíveis como a aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e até mesmo o câncer (BARBOSA et al., 2010).

Vários fatores estão associados ao estresse oxidativo. Em geral, o hábito de vida não saudável é o principal fator seguido do consumo de álcool, tabagismo, dieta inadequada, exercício físico realizado de forma extrema, fatores relacionados ao meio ambiente como a exposição a temperaturas elevadas e à poluição ambiental, domiciliar e ocupacional, uso de alguns medicamentos e ainda fatores naturais e inevitáveis como o envelhecimento e estados psicológicos que provoquem estresse emocional (OLIVEIRA et al., 2009; PEREIRA, 2012).

Nos organismos aeróbios, a transferência de elétrons ao oxigênio, provocando a sua redução, base da bioenergética, é um processo essencial, portanto, espécies oxidantes são inevitavelmente produzidas e o processo é intensificado com disfunções biológicas, principalmente mitocondriais. Essas espécies se classificam em espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio e espécies mistas (ERONs), algumas de natureza radicalar e outras não radicalares (ERNs) (SÁ et al., 2012).

O radical hidroxila ( $\text{HO}^{\bullet}$ ) é o mais danoso ao organismo, pela ausência de sistemas enzimáticos, capazes de sua destoxificação. O radical ataca, rotineiramente, moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações (BARREIROS e DAVID, 2006; PYTEL et al., 2005; SILVEIRA, 2004). A estrutura lipídica que mais sofre ataques dos radicais hidroxila é a membrana celular, composta de fosfolipídios. Os radicais que se encontram centrados nos átomos de oxigênio realizam o ataque à cadeia lipídica, em sítios susceptíveis como o grupo metilênico alílico, convertendo-o em novo centro radicalar. Por sua vez, o carbono radicalar é capaz de, com relativa facilidade, adicionar-se ao oxigênio (biradical), o

que gerará o radical lipídio-peroxila, que ataca as proteínas da membrana celular, podendo causar severos danos às células (SILVA, 2015).

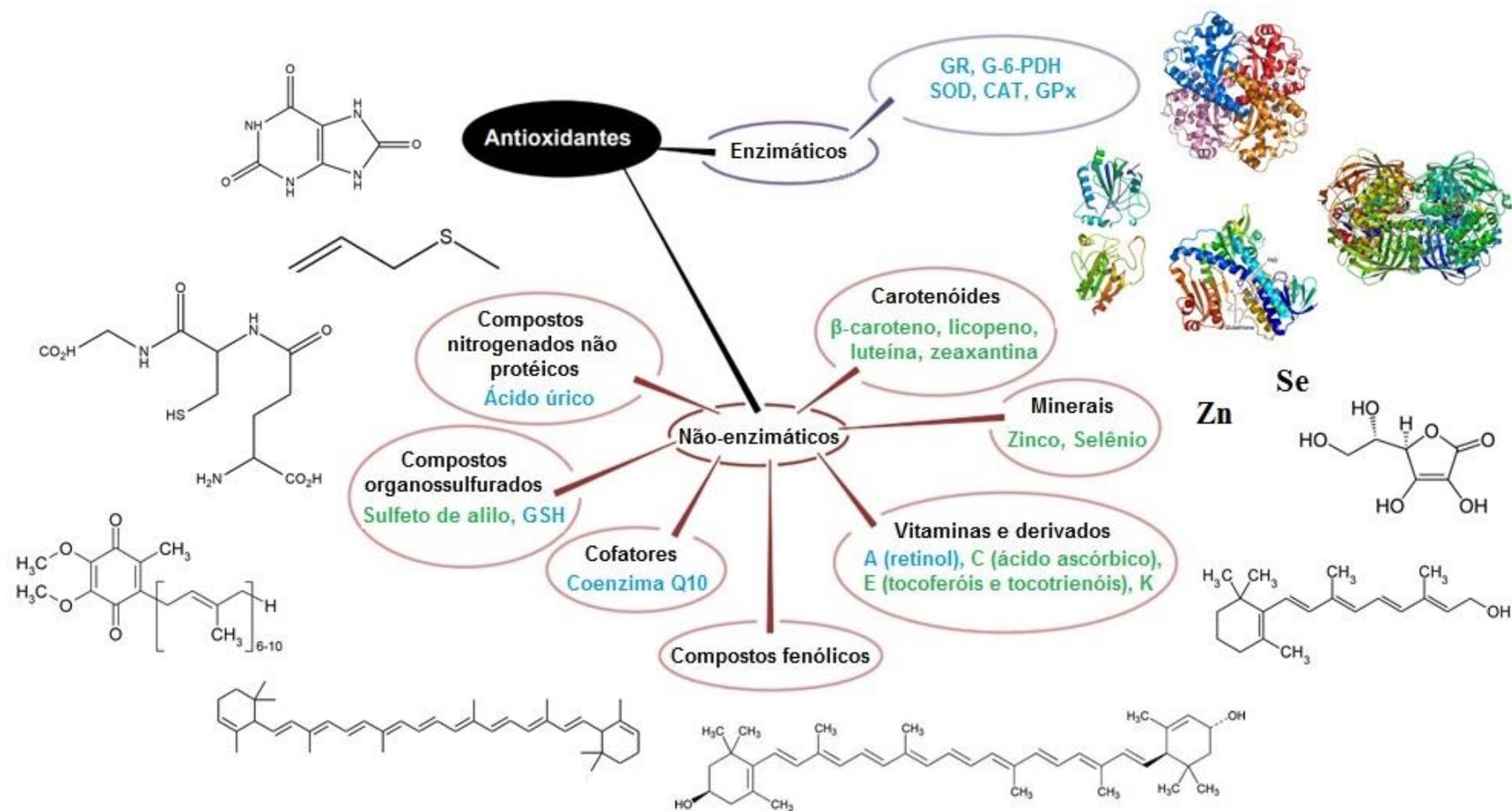
As reações radicalares são capazes de causar alterações progressivas em ambientes biológicos, surgindo então a importância da presença de compostos com ação antioxidante. Define-se um antioxidante como toda e qualquer substância que, ao se apresentarem em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, evita a oxidação dos mesmos, livrando assim o organismo dos efeitos nocivos causados pelo estresse oxidativo (LAGUERRE et al., 2010; HALLIWELL, 2000).

Na natureza, diversos organismos trazem consigo inúmeras moléculas que atuam como antioxidantes. Tais moléculas se encarregam de minimizar os efeitos danosos das EROs, nos organismos vivos. Os avanços tecnológicos propiciam que estas espécies possam ser isoladas, caracterizadas e utilizadas em diversos tipos de aplicações para as mais variadas finalidades (MISHRA et al., 2012).

Os primeiros sistemas de defesa antioxidante desenvolvidos contra os danos oxidativos são compostos pelas espécies que se mostram capazes de impedir a geração de espécies reativas de oxigênio e que bloqueiam radicais que venham a ser formados. Tais sistemas se apresentam em compartimentos celulares aquosos e na membrana plasmática, podendo ser enzimáticos ou não enzimáticos (Figura 1), e sua fonte pode ser natural do próprio organismo ou obtido por ingestão através da alimentação como o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), o  $\beta$ -caroteno (pro-vitamina A), o ácido ascórbico (vitamina C) e os compostos fenólicos (PISOSCHI e POP, 2015).

O sistema de defesa antioxidante enzimático é composto por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), que atuam prevenindo a formação ou neutralizando as EROs, além da glutathione reductase (GR) e da glicose-6-fosfato-desidrogenase (G-6-PDH). Há ainda a proteção não enzimática, por complexação de metais (que catalisam a formação de  $\text{HO}^\bullet$ , via reação de Fenton), remoção de oxigênio singleto e decomposição dos hidroperóxidos, gerando produtos mais estáveis e regenerando a defesa antioxidante enzimática. Dentre eles estão as vitaminas, cofatores enzimáticos, compostos nitrogenados e peptídeos (ALAM et al., 2013; CAROCHO e FERREIRA, 2013).

Figura 1. Classificação dos antioxidantes (azul: antioxidantes endógenos; verde: antioxidantes exógenos).



Fonte: Adaptado de CHAVARRIA, 2014.



transportadora de elétrons na mitocôndria. Essa primeira ERO sofre dismutação (2) pela ação da enzima SOD formando peróxido de hidrogênio, que é facilmente reduzido à H<sub>2</sub>O (3) a partir da ação GPx, levando à oxidação da GSH. A glutatona oxidada (GSSG) é reduzida novamente à GSH (4) pela GR, que utiliza o NADPH como doador de elétrons. Alguns metais de transição (5) podem reagir com o peróxido de hidrogênio levando à formação do radical hidroxila, que causa danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondriais. Esse radical inicia um processo importante nesse quadro conhecido como peroxidação lipídica, onde seus produtos geram reações em cascata. Alguns dos produtos desse processo de peroxidação lipídica são o 4-hidroxinonenal (4-HNE), o β-hidroxiacroleína e o malondialdeído (MDA), que reagem com bases nitrogenadas do DNA (citosina, adenina e guanina), causando danos, com sérias consequências em termos funcionais (VALKO et al., 2007).

Embora o sistema antioxidante endógeno seja eficiente, ele não é suficiente para controlar o dano oxidativo. Dessa forma se faz necessário complementá-lo via uma alimentação saudável para que as concentrações das EROs permaneçam baixas.

## **1.2 Fontes antioxidantes naturais**

Produtos naturais, como frutas, sementes, legumes, além dos seus derivados, têm sido cada vez mais reconhecidos devido à presença abundante de compostos fenólicos, dentre outros componentes bioativos. Esses, não mais importantes que os demais, possuem ação antioxidante sendo capazes de eliminar espécies reativas que tem sido frequentemente apontadas como causadoras de diversas doenças (QUIDEAU et al., 2011).

Segundo Oliveira e colaboradores (2009), os antioxidantes mais promissores são aqueles derivados de processamento de frutas e temperos, como gengibre e alecrim. Alguns alimentos e cosméticos já foram enriquecidos com estes produtos, com alto grau de sucesso. Alguns antioxidantes naturais são empregados como agentes profiláticos e terapêuticos, no intuito de agirem como uma contramedida em

radiação, no combate ao câncer e até mesmo, visando atenuar doenças relacionadas a idade.

O Brasil é um país caracterizado pela sua grande diversidade biológica, possuindo um extenso capital natural composto de pelo menos 13% de todas as espécies mundiais, a maior área de florestas tropicais, entre outros, tornando o território brasileiro rico em vegetais com ação antioxidante. Dentre esses vegetais, encontram-se as frutas oleaginosas, muito utilizadas na produção de biodiesel como alternativa de combustível renovável, além de serem fontes de nutrientes, agregando vários benefícios à saúde (ROMA et al., 2013).

Os frutos oleaginosos possuem em sua composição majoritária, moléculas de triacilglicerídeos, lipídios formados pela ligação de três moléculas de ácidos graxos com o glicerol. Mono e diglicerídeos, ácidos graxos livres, glicolipídios, proteínas, esteróis, entre outras substâncias que também fazem parte dessa composição em menor quantidade (GAMBARRA NETO, 2008).

Baseando-se nestas informações, a Tabela 1 lista frutos oleaginosos que apresentam atividade biológica, principalmente aqueles que são fontes naturais de antioxidantes.

**Tabela 1.** Frutas oleaginosas com atividade biológica, incluindo antioxidante.

OLEAGINOSA	PRINCIPAIS RESULTADOS	REFERÊNCIAS
<p><b>Açafrão</b></p> <p><i>Curcuma longa</i></p>	A farinha do açafrão revelou boa atividade antioxidante e proteção contra a peroxidação lipídica, demonstrando ainda boa correlação entre o conteúdo total de fenóis e a atividade antioxidante.	Camatari et al., 2016; Yadav e Kumar, 2013.
<p><b>Abacate</b></p> <p><i>Persea americana</i></p>	A casca do abacate mostrou ser fonte alternativa de nutrientes com rica composição em minerais. Seus resíduos apresentaram ação antioxidante e, inclusive, podem ser utilizados para aplicação na indústria de alimentos em substituição aos antioxidantes sintéticos.	Daiuto et al., 2014
<p><b>Amêndoa</b></p> <p><i>Prunus dulcis</i></p>	Oleaginoso considerado fonte natural de ácidos graxos, vitaminas, fitosteróis e flavonoides, compostos que fornecem benefícios à saúde, associados com efeitos fisiológicos antioxidantes.	Keser et al., 2014.
<p><b>Amendoim</b></p> <p><i>Arachis hypogaea</i></p>	Quatro variedades da semente foram avaliadas revelando ricas fontes de componentes com bons atributos nutricionais como ácidos graxos poliinsaturados ( $\omega 3$ e $\omega 6$ ), componentes fenólicos, biomoléculas antioxidantes, além de revelar atividade antibacteriana.	Sebei et al., 2013.

Fonte: AUTORA, 2016

**Tabela 1.** Frutas oleaginosas com atividade biológica, incluindo antioxidante (continuação).

<p><b>Arroz</b></p>  <p><i>Oryza sativa</i></p>	<p>Oito cultivares de arroz foram estudados, apresentando significativo conteúdo de fenóis totais, incluindo flavonoides, proantocianidinas e antocianinas, apresentando então potencial benéfico à saúde, principalmente as variedades vermelha e roxa, pouco consumidas pela população.</p>	<p>Min et al., 2012.</p>
<p><b>Avelã</b></p>  <p><i>Corylus avellana</i></p>	<p>Os extratos metanólicos de avelã turca foram avaliados pela primeira vez pelo método CUPRAC e DPPH*, os resultados foram promissores, revelando importante valor nutritivo associado à presença de compostos fenólicos na oleaginosa.</p>	<p>Altun et al., 2013.</p>
<p><b>Azeitona</b></p>  <p><i>Olea europaea</i></p>	<p>A presença de compostos fenólicos identificados no fruto desempenha um papel importante na saúde humana, além de contribuir para a prevenção de diabetes e, conseqüentemente, de doenças cardiovasculares.</p>	<p>Dekdouk et al., 2015.</p>
<p><b>Babaçu</b></p>  <p><i>Orbignya phalerata</i></p>	<p>O extrato aquoso não apresentou forte potencial antioxidante, de acordo com os ensaios AAPH, TBARS. Administrado por via oral em animais, observou-se também que não houve alteração significativa na atividade motora dos animais, quando comparado com o grupo de controle.</p>	<p>Silva et al., 2012.</p>
<p><b>Buriti</b></p>  <p><i>Mauritia flexuosa</i></p>	<p>Foram avaliadas as atividades antioxidante e antiproliferativa de extratos de buriti, não encontrando toxicidade significativa para as células normais MRC-5. Compostos fenólicos como ácido clorogênico, rutina e isoquercitrina foram identificados nos extratos.</p>	<p>Tauchen et al., 2016.</p>
<p><b>Castanha-do-caju</b></p>  <p><i>Anacardium occidentale</i></p>	<p>Extratos etanólicos da folha e semente da castanha de caju foram eficazes no ensaio de atividade antimicrobiana, ao passo que o extrato acetônico revelou a melhor atividade antioxidante frente ao radical DPPH* (52,5% ASR)</p>	<p>Doss e Thangavel, 2011.</p>
<p><b>Castanha-do-Pará</b></p>  <p><i>Bertholletia excelsa</i></p>	<p>Quantidades substanciais de antioxidantes fenólicos, responsáveis pelo controle do estresse oxidativo no organismo, revelando grande potencial no desenvolvimento de nutracêuticos ricos em antioxidantes e ingredientes de alimentos funcionais.</p>	<p>John e Shahidi, 2010.</p>
<p><b>Chia</b></p>  <p><i>Salvia hispânica</i></p>	<p>O estudo indica que o consumo diário de sementes e óleo promove efeito protetor contra o estresse oxidativo, revelando ainda propriedades antioxidantes <i>in vivo</i>.</p>	<p>Marineli et al., 2014.</p>
<p><b>Coco</b></p>  <p><i>Coccus nucifera</i></p>	<p>Os extratos mostraram boa atividade antioxidante incluindo a presença de flavonoides, saponinas, taninos. Extratos com a fibra da casca do coco também apresentaram a mesma atividade e seu potencial uso como suplemento em dietas.</p>	<p>Naskar et al., 2011; Oliveira et al., 2013.</p>

Fonte: AUTORA, 2016.

**Tabela 1.** Frutas oleaginosas com atividade biológica, incluindo antioxidante (continuação).

<p><b>Colza</b></p>  <p><i>Brassica napus</i></p>	<p>O estudo relatou a caracterização nutricional e composição antioxidante dessa semente rica em carboidratos, açúcares totais (incluindo frutose, glicose e sacarose), ácidos graxos, compostos fenólicos, incluindo flavonoides. Confirmam-se os benefícios da sua inclusão na gastronomia.</p>	<p>Batista et al., 2011.</p>
<p><b>Damasco</b></p>  <p><i>Prunus armeniaca</i></p>	<p>O fruto e a semente de diferentes genótipos de damasco apresentam atividade antioxidante total e conteúdo total de fenóis significativos, podendo ser utilizados para fins nutracêuticos.</p>	<p>Korekar et al., 2011.</p>
<p><b>Gergelim</b></p>  <p><i>Sesamum indicum</i></p>	<p>A farinha de semente desengordurada exibiu uma boa capacidade antioxidante pelos testes de DPPH<sup>•</sup> e ORAC, revelando a presença de diversos compostos responsáveis por essa atividade, identificados por CLAE, como ácido ferúlico.</p>	<p>Othman et al., 2015.</p>
<p><b>Linhaça</b></p>  <p><i>Linum usitatissimum</i></p>	<p>Extratos etanólico (80%) revelaram bons resultados quanto aos componentes antioxidantes, sendo essa oleaginosa, uma provável fonte de antioxidantes naturais e, podendo ser utilizada como ingrediente funcional e nutracêutico.</p>	<p>Anwar e Przybylski, 2012.</p>
<p><b>Macadâmia</b></p>  <p><i>Macadamia integrifolia</i></p>	<p>No fruto da macadâmia foram identificadas quantidades significativas de tocotrienóis e esqualeno, compostos que auxiliam na atividade antioxidante, anticancerígena e na redução de colesterol no sangue.</p>	<p>Wall, 2010.</p>
<p><b>Mamona</b></p>  <p><i>Ricinus communis</i></p>	<p>Os resultados do estudo corroboram a ideia dessa espécie ser utilizada como uma fonte de antioxidante natural e larvicida. Alguns compostos fenólicos foram identificados como: ácido gentsílico, catequina, rutina e ácido vanílico.</p>	<p>Wafa et al., 2014.</p>
<p><b>Milho</b></p>  <p><i>Zea mays</i></p>	<p>Uma variedade pigmentada da espécie (milho roxo) apresentou-se como fonte de antocianinas, flavonoides de grande relevância industrial, devido à sua possível utilização como corantes alimentares naturais e especialmente como agentes antioxidantes e anti-inflamatórios.</p>	<p>Ramos-Escudero et al., 2012.</p>
<p><b>Noz</b></p>  <p><i>Juglans regia</i></p>	<p>Nozes indianas revelaram potente atividade antiproliferativa contra várias linhagens de células de câncer humano e alta atividade antioxidante.</p>	<p>Negi et al., 2011.</p>

Fonte: AUTORA, 2016.

**Tabela 1.** Frutas oleaginosas com atividade biológica, incluindo antioxidante (continuação).

<p><b>Pinhão Manso</b></p>  <p><i>Jatropha curcas</i></p>	<p>Os resultados revelaram alto teor de compostos fenólicos e os extratos obtidos com diferentes solventes polares (água, etanol e acetato de etila) exibiram bioatividade relativamente forte.</p>	<p>Fu et al., 2014.</p>
<p><b>Pistache</b></p>  <p><i>Pistacia vera</i></p>	<p>A análise química mostrou níveis elevados de compostos fenólicos, sendo antocianinas as mais abundantes, além de possuir boas propriedades antioxidantes. Os autores sugerem que o extrato pode ser empregado como ingrediente fotoprotetor em cosméticos e formulações farmacêuticas.</p>	<p>Martorana et al., 2013.</p>
<p><b>Soja</b></p>  <p><i>Glycinemax</i></p>	<p>Semente com alto teor de polifenóis, sendo a isoflavona genisteína, encontrada mais abundantemente. A presença de tais compostos está associada aos efeitos farmacológicos e nutritivos dessa semente, disponível em larga escala.</p>	<p>Mujić et al., 2011.</p>

Fonte: AUTORA, 2016.

Sendo assim, a procura por antioxidantes naturais, incluindo sementes oleaginosas como o girassol, tem evoluído devido à preocupação pelo efeitos adversos causados por antioxidantes sintéticos, como é o caso do 2,3-terc-butil-4-hidroxianisol (BHA) e o 2,6-diterc-butil-p-creso (BHT), presentes em cosméticos e alimentos que, segundo Ito e colaboradores (1985), podem apresentar carcinogenicidade (JUNTACHOTE et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009).

### 1.3 Girassol

O girassol (*Helianthus annuus*) é uma planta nativa da América do Norte e Central, pertencente à família Asteraceae. Seu cultivo no Brasil iniciou-se no século XIX, na região Sul, provavelmente trazida por colonizadores europeus, que consumiam as sementes torradas e fabricavam uma espécie de chá matinal (ZHAO et al., 2011). Somente a partir de 1988 essa sultura tornou-se importante no país passando a ser cultivada também em estados no centro-oeste do país, como o Mato Grosso do Sul, por apresentar maior tolerância à seca (DALL'AGNOL et al., 2005).

O ciclo vegetativo desta planta possui de 90 a 130 dias, fator que varia com o tipo de cultivar, a data de semeadura ou as condições ambientais características de cada região e ano. Existem cerca de 49 cultivares de girassol registrados, dentre esses 12 apresentam ciclo de vida anual e 37 perene (CASTRO et al., 1996). A

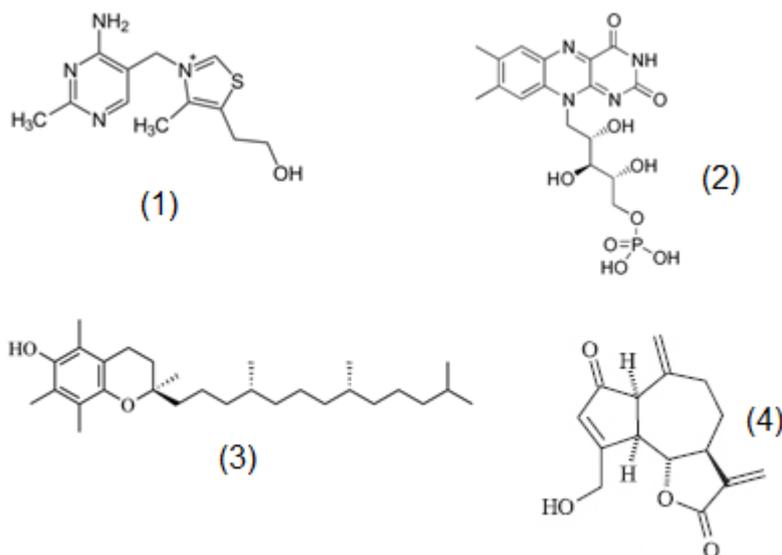
planta apresenta, ainda duas fases de desenvolvimento, a vegetativa e a reprodutiva. O período vegetativo inicia com o aparecimento plântulas e é finalizado com o início do aparecimento da inflorescência. A etapa reprodutiva começa com o aparecimento da inflorescência e termina com a maturação da planta, quando se observa o desenvolvimento de novas sementes (CASTRO e FARIAS, 2005).

Com a busca contínua por melhoria no padrão de vida, o girassol tem se tornado cada vez mais importante na produção de óleo, especialmente em condições de soja transgênica controlada (HOSSEINI et al., 2002). O fruto do girassol, também chamado de aquênio, é constituído pelo pericarpo (casca da semente) e pela própria semente (amêndoa). Dentre os usos e potencialidades da semente, destaca-se a utilização do seu óleo com elevado potencial nutritivo, uma alternativa para a produção de biocombustível e ainda, largamente utilizada na alimentação de passáros.

Seu fruto apresenta uma rica composição de vitaminas, incluindo tiamina, riboflavina e biotina, todas do complexo B, além de ser rica em vitaminas E e A. A presença de sesquiterpenos, como guaianolídeos, heliangolídeos e diterpenos (Figura 3), também agrega alto valor para a oleaginosa, principalmente pela atuação desses compostos como agentes de defesa contra pragas, além de apresentarem propriedades farmacêuticas. Aminoácidos e carboidratos também estão presentes nas sementes, assim como uma rica composição mineral, constituída principalmente por cálcio, fósforo, ferro, sódio e potássio, além dos ácidos fenólicos. Dentre eles, o ácido clorogênico é encontrado em maior quantidade nas sementes, acompanhado do ácido caféico, ácido ferúlico, entre outros (MACÍAS et al., 2006; ZHAO et al., 2011).

Essa composição química varia amplamente com o local de produção, clima, e fertilizantes. Mesmo se adaptando bem a diversos ambientes o girassol pode tolerar temperaturas baixas e estresse hídrico, sendo a oleaginosa com maior resistência à seca, ao frio e ao calor (PELEGRINI, 1985).

**Figura 3.** Compostos presentes na semente de girassol (*Helianthus annuus* L.), onde (1) tiamina, (2) riboflavina, (3)  $\alpha$ -tocoferol e (4) guaianolídeo.



Fonte: AUTORA, 2016.

Em relatório divulgado pela Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2011), o girassol ocupa a quarta posição de maior safra de oleaginosas do mundo e a quinta em área cultivada (1<sup>o</sup> soja, 2<sup>o</sup> algodão, 3<sup>o</sup> amendoim). De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2016), a Ucrânia ocupa a posição de maior produtora de grãos de girassol, acompanhada da Rússia. Alguns países da União Europeia, Argentina e Turquia também têm se destacado tanto em produção, como no consumo dessa oleaginosa. O Brasil é um produtor pouco expressivo de girassol, tendo contribuído com apenas 0,5% da produção mundial, aproximadamente, porém mesmo não participando do *ranking* de cultivo, a produção nacional cresceu 317% nos últimos cinco anos (USDA, 2016).

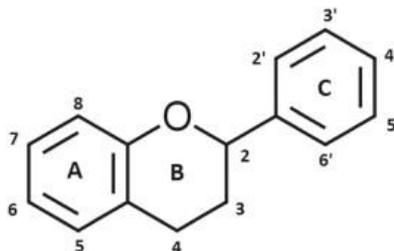
#### 1.4 Compostos fenólicos

Os flavonoides são uma classe de compostos que se apresentam numa enorme gama de compostos naturais. São considerados os compostos fenólicos naturais mais importantes. Flavonoides são antioxidantes e apresentam, adicionalmente, atividade antiinflamatória, anti-viral, anti-alérgica, anti-cancerígena e anti-envelhecimento (KUBOLA et al., 2011).

O termo “flavonoide” é atribuído a um grupo extenso de metabólitos de planta, que em sua grande maioria, derivam da rota biossintética do ácido chiquímico. Em sua estrutura apresentam um núcleo geral C6-cicloalquila C3-C6, que é representado pelas três unidades A, B e C (Figura 4). As unidades A e C são anéis aromáticos, de natureza fenólica, ao passo que a unidade B é um anel aromático que apresenta um oxigênio heterocíclico, uma benzo- $\gamma$ -pirona (GIL e COUTO, 2013).

Os flavonoides podem ser classificados em flavonas, flavanonas, flavonóis, flavanóis (catequinas), diidroflavonóis, isoflavonas e antocianinas (Tabela 2). As diferenças estruturais que identificam cada grupo advém de variações na posição e no número de grupos hidroxila presentes na estrutura, bem como sua natureza e ainda a quantidade de alquilações e/ou glicosilações existentes (GIL e COUTO, 2013).

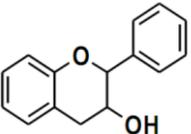
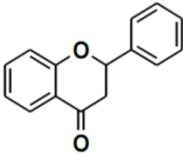
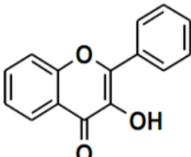
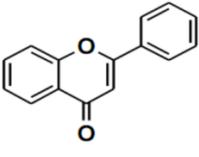
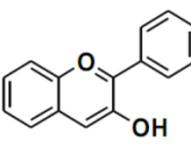
**Figura 4.** Estrutura química básica do flavonóide.



Fonte: OROIAN e ESCRICHE, 2015.

Esses compostos estabilizam os radicais livres por meio da doação de hidrogênio, ou ainda, os mais específicos possuem a propriedade de atuar na quelatação de cátions metálicos como o ferro(II) e o cobre(I) e com isso anular um dos fatores que geram os radicais hidroxila. Quando se refere à atividade *in vitro* de um flavonoide, deve-se atentar para o arranjo de seus grupos funcionais sobre a estrutura de seu núcleo. A configuração e a quantidade de grupamentos hidroxila são os fatores que influenciam de forma preponderante no mecanismo da atividade antioxidante de um flavonoide (PROCHÁZKOVÁ et al., 2011).

**Tabela 2.** Classe, estrutura química e fontes de flavonoides.

CLASSE	ESTRUTURA	NOME	FONTE
Flavanóis	OH no C-3, sem dupla ligação entre C-2 e C3, sem C=O no C-4 	Epicatequina Catequina Epigallocatequina Galato de Epicatequina	Chá verde, preto, uvas e vinho tinto
Flavanona	C=O no C-4 sem dupla ligação entre C-2 e C-3 	Nariginina Taxofolina	Cascas e frutas cítricas
Flavonóis	OH na posição 3 e C=O na posição 4 do anel C 	Campferol Quercetina Rutina Miricetina	Brócolis, chá preto, cebola, alface, maçã, cerejas, uvas, vinho tinto
Flavonas	C=O na posição 4 	Cricina Apigenina	Cascas de fruta, aipo, salsa
Antocianidinas	OH no C-3, com ligações duplas conjugadas, sem C=O no C-4 	Malvidina Cianidina Apigenidina	Uvas roxas, vinho tinto, morangos, cerejas, frutas e cascas de frutas coloridas

Fonte: THOMAZ, 2014.

## 1.5 Composição mineral de oleaginosas

As sementes oleaginosas, incluindo o girassol, possuem em sua composição minerais tais como magnésio, selênio, zinco, manganês entre outros, proporcionando assim, diversos efeitos benéficos à saúde (CARDOZO e MAFRA, 2015). As sementes de girassol apresentam em sua composição cerca de 4% de minerais, sendo: 120 mg de cálcio; 837 mg de fósforo; 7,1 mg de ferro; 30 mg de sódio e 920 mg de potássio (composição mineral média (mg/100 g)) (BRIGANTE, 2013).

Chaves e colaboradores (2010) determinaram a presença de metais por espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) e espectrometria de emissão óptica com plasma (ICP- OES) em sementes de sete plantas diferentes: caroço de algodão, girassol, mamona, nabo forrageiro, feijão manso, soja e tungue. Nesse estudo observou-se que, dos quatro principais elementos estudados, K era o mais concentrado, seguido de P, Mg e Ca para a maioria das sementes. Entre os elementos determinados pelo ICP-MS, Fe, Zn, Na, Al e Mn mostraram concentrações mais elevadas.

A presença de minerais na composição de óleos vegetais está relacionada com vários fatores tais como, característica do vegetal, composição química do solo, água de irrigação, fertilizantes e pesticidas que são utilizados durante o cultivo da espécie ou que são adicionados durante o processo de extração, armazenamento e transporte. A presença de metais (Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn e Mn) em óleos comestíveis, quando em quantidades adequadas, são essenciais, visto que podem atuar de forma benéfica no organismo (MENDIL et al., 2009).

As sementes de girassol são excelentes fontes de selênio e zinco (JAFARI et al, 2011). Esses minerais são essenciais, pois possuem forte potencial antioxidante, visto que são fundamentais para a atividade de algumas enzimas antioxidantes (MUHAMMAD et al., 2012).

O selênio é um mineral que apresenta capacidade antioxidante, devido a sua capacidade em aumentar a atividade da enzima GPx. Atua no organismo por meio de sua incorporação a proteínas (selenoproteínas). Existem cerca de 25 selenoproteínas conhecidos no organismo humano, dentre elas, destacam-se a glutathione peroxidase, tioredoxina redutase, iodotironina deiodinase, e selenoproteínas P, W, e R. A GPx representa 10-30% do selênio no plasma, e a selenoproteína P representa mais de 50% (FRITZ et al., 2011).

Atualmente, o interesse em estudar a participação do zinco na defesa antioxidante plasmática tem crescido. Este metal é responsável pela inibição da NADPH-oxidase que está associada com a produção de EROs. É considerado um cofator da SOD. Além disso, está associado de forma direta na neutralização do radical hidroxila e induz a produção de metalotioninas, substâncias que também contribuem para remoção do radical hidroxila (CATANIA et al., 2009).

Nisar e colaboradores (2011) determinaram a composição mineral de 16 cultivares de girassol, destes oito eram de população polinizada aberta (PPA), quando ocorre transferência dos grãos do pólen possibilitando a fecundação e desenvolvimento do fruto e das sementes, e oito de população híbrida (PH), derivadas do cruzamento genético entre duas espécies vegetais, utilizando um espectrômetro de absorção atômica, que indicou que o percentual de  $Zn^{2+}$  foi de 8,54 e 9,35%; de  $Cu^{2+}$  de 0,5 e 0,02%; de  $Mn^{2+}$  de 3,48 e 9,72%; de  $Co^{2+}$  de 18,67 e 16,81%;  $Mg^{2+}$  de 68,27 e 83,53%;  $Fe^{3+}$  de 4,32 e 4,35% para HP e OPP, respectivamente.

## **1.6 Métodos analíticos para determinação da capacidade antioxidante**

Atualmente o interesse em desenvolver novos métodos analíticos para determinação da capacidade antioxidante ou métodos de quantificação de antioxidantes presentes em alimentos como frutas, legumes, bebidas e outros, tem crescido, devido à importância comercial e farmacológica dos antioxidantes. Além disso também há uma busca por metodologias mais simples e de baixo custo (PALANISAMY et al, 2011) e que sejam universais.

Devido à grande variedade de ensaios antioxidantes, há exigência quanto à comparação fidedigna dos resultados obtidos, a partir destes ensaios.

É relevante apontar a relação existente entre a atividade antioxidante e a cinética da reação, que é geralmente expressa pela taxa de reação de eliminação ou ainda a porcentagem por unidade de tempo, enquanto que a capacidade antioxidante se relaciona com a eficiência da conversão termodinâmica de espécies reativas por espécies antioxidantes. Por isso, deve-se tomar um relativo cuidado quanto a estes dois termos, atividade e capacidade, que por vezes são expressos como sinônimos (OZYUREK et al., 2011).

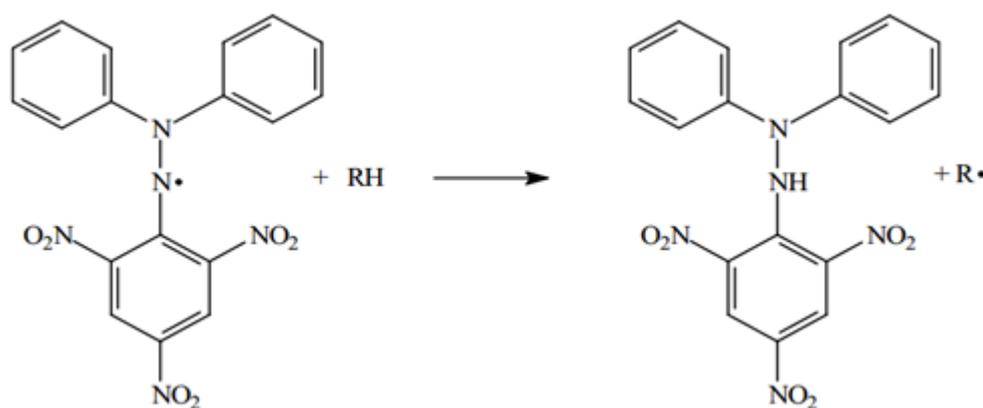
### **1.6.1 Capacidade antioxidante frente ao radical DPPH•**

O ensaio do DPPH• tem como objetivo avaliar o potencial de captura de radicais livres por uma molécula antioxidante. Este é um método colorimétrico, com comportamento cinético e de fácil avaliação da capacidade antioxidante. Mesmo sendo pequenas as semelhanças existentes entre o radical DPPH• e os radicais de

origem biológica, como o peroxila, o método é muito útil e quase universal, utilizado na medida do teor antioxidante de grãos, farelo de trigo, legumes, ervas, em óleos de sementes comestíveis e farinhas, realizado em diferentes solventes, incluindo etanol, metanol e água + álcool (diferentes proporções) (MISHRA et al., 2012).

O princípio do método consiste na redução do radical, que por sua vez deve estar em um meio onde haja um doador de hidrogênio (Figura 5). O radical em questão, quando em solução, tem coloração púrpura, com absorvância máxima em 517 nm, coloração essa que será atenuada devido à ação do antioxidante, uma vez que os antioxidantes têm a propriedade de converter os radicais livres em compostos reduzidos, com diferentes cores, no presente caso, em coloração amarela. Com isso, conclui-se que quanto mais rápido for o decaimento da absorvância, mais ativo será o antioxidante (BARROSO et al., 2011).

**Figura 5.** Reação de redução do radical DPPH• por um antioxidante genérico RH.



Fonte: Adaptado de FERREIRA, 2013.

Apesar de ser um método clássico e largamente utilizado na determinação da atividade antioxidante, o ensaio do DPPH•, apresenta algumas limitações. Apesar de ser um ensaio simples, o radical não apresenta semelhança com os radicais presentes no sistema biológico, sendo esses mais reativos (HUANG et al., 2005; PRIOR et al., 2005). Outra limitação consiste na falta de padronização do ensaio, desde a primeira aplicação até os dias atuais, o método sofreu modificações e, conseqüentemente, diferentes protocolos têm sido utilizados, acarretando em diferentes maneiras de interpretar e determinar a capacidade antioxidante de uma determinada substância (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2008).

### 1.6.2 Conteúdo total de fenóis - Método de Folin-Ciocalteu

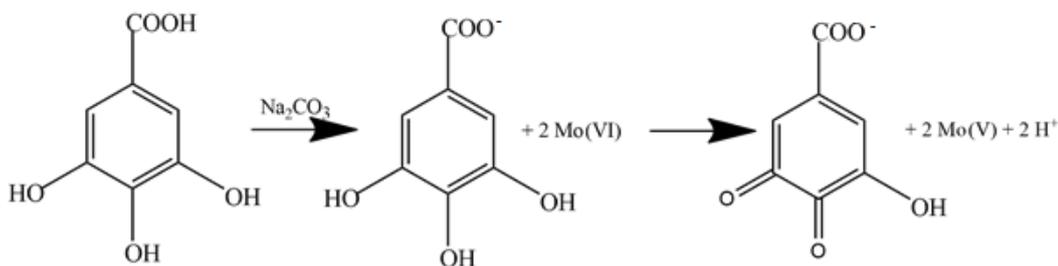
Os compostos fenólicos são considerados uns dos mais importantes, quando comparados com outros fitoquímicos, com atividade antioxidante. O termo refere-se a uma grande variedade de compostos (mais de 8000) encontrados em todo reino vegetal, com pelo menos, um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila, produzidos em plantas como metabolitos secundários através da via do ácido chiquímico (CARTEA et al., 2011).

Diversas técnicas podem ser utilizadas na quantificação espectrofotométrica de compostos fenólicos, porém, o ensaio Folin-Ciocalteu é o mais utilizado.

O reagente Folin-Ciocalteu é constituído pela mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, onde o molibdênio e o tungstênio estão no estado de oxidação  $6^+$ , porém na presença de agentes redutores, neste caso, os compostos fenólicos, ocorre a formação do molibdênio azul e tungstênio azul, que apresentam estado de oxidação entre 5 e 6, apresentando uma coloração que permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente são de natureza fenólica, revelando uma das limitações do método (Figura 6) (KLAJN et al., 2012). Estudos comprovam que o reagente de Folin-Ciocalteu também reage com outras moléculas, tais como proteínas, carboidratos, aminoácidos, nucleotídeos, tióis, ácidos graxos insaturados, vitaminas, aminas, aldeídos e cetonas (EVERETTE et al., 2010).

A determinação dos compostos fenólicos totais em alimentos apresenta certa complexidade devido a diversos fatores, tais como a ampla variedade de compostos fenólicos, a complexidade química da matriz, a presença de interferentes e a dificuldade de extração desses interferentes na matriz. Ainda não é possível determinar a concentração exata de compostos fenólicos, assim, é realizada uma estimativa da concentração total de compostos fenólicos. (ARCHELA e DALL'ANTONIA, 2013).

**Figura 6.** Reação do ácido gálico em presença do molibdato (VI), componente do reagente de Folin-Ciocalteu.



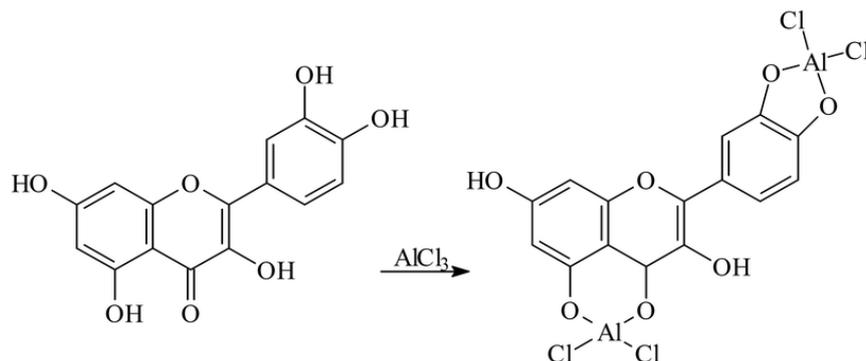
Fonte: Adaptado de SINGLETON et al., 1999.

### 1.6.3 Conteúdo total de flavonas e flavonóis

Existem muitas técnicas que podem ser aplicadas na análise de flavonoides em vegetais, entre elas, destaca-se a espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), técnica essa que possui um relativo destaque devido à sua praticidade, rapidez, baixo custo de operação e fácil disponibilidade em laboratórios de controle de qualidade (ALVES et al., 2010; KOMAROVA et al., 2009).

Mesmo diante de tantos indicativos positivos, a pouca seletividade tem sido uma das limitações desta técnica, especialmente em análises de matrizes complexas, como por exemplo, em extratos vegetais, visto que a espectrofotometria direta pode levar à sobreposição das bandas, impedindo assim a absorção do componente do qual se tem interesse. Devido a isto, algumas modificações vêm sendo empregadas, o método colorimétrico com o cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) tem mostrado relativa eficiência na obtenção dos espectros dos flavonoides, sem que haja a interferência de outros compostos fenólicos (Figura 7). A adição do cloreto de alumínio à amostra leva à formação de complexos estáveis entre os cátions  $\text{Al}^{3+}$  e as hidroxilas livres presentes nos flavonoides, gerando assim uma extensão do sistema conjugado e, conseqüentemente, um desvio batocrômico, que nada mais é do que um deslocamento dos seus máximos de absorção para regiões de maior comprimento de onda (MARQUES et al., 2012).

**Figura 7.** Complexação do flavonóide quercetina com cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) formando o complexo estável flavonóide- $\text{Al}^{3+}$ .

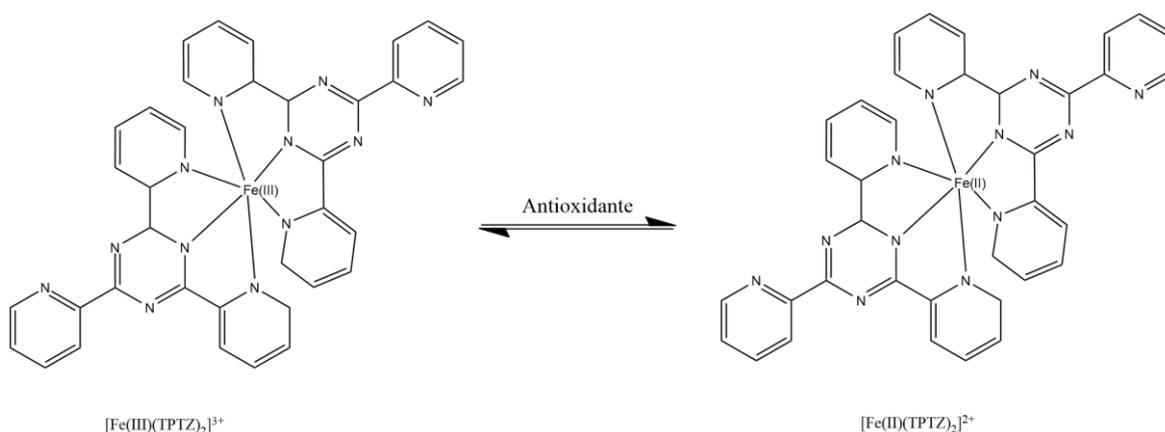


Fonte: MABRY et al., 1970.

#### 1.6.4 Capacidade antioxidante pelo método de redução de ferro – FRAP

O método FRAP mede a habilidade de um antioxidante em reduzir o complexo amarelo  $[\text{Fe}^{3+}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$  (complexo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina) ao complexo azul  $[\text{Fe}^{2+}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ , em meio ácido, em uma medida espectrofotométrica em 593 nm. O ensaio é considerado simples, rápido e robusto, podendo ser aplicado com o auxílio de métodos manuais, semiautomáticos ou automáticos (ALAM et al., 2013), conforme a reação descrita na Figura 8.

**Figura 8.** Reação de redução do complexo TPTZ (Fe (III)/Fe(II)).



Fonte: Adaptado de HUANG et al., 2005.

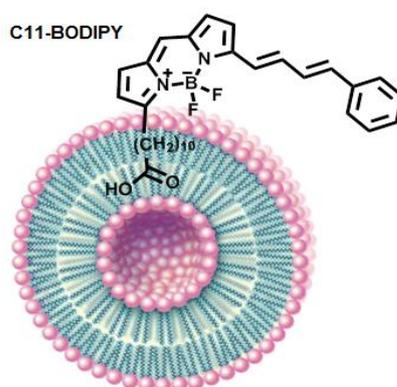
Uma das limitações desta técnica consiste na necessidade de um sistema aquoso, além de não ser aplicável à compostos que atuam por meio da doação de

átomos de hidrogênio, apenas avalia a capacidade da amostra em reduzir íons férricos (KOLEVA et al., 2002).

### 1.6.5 Avaliação da inibição da peroxidação lipídica

Técnicas fluorimétricas são frequentemente utilizadas na medida da lipoperoxidação. O método fundamenta-se no decaimento da fluorescência emitida por uma sonda acoplada ao lipossomo (Figura 9) (KAROLIN et al., 1994), através do ataque de uma espécie reativa (MACDONALD et al., 2007).

**Figura 9.** Sonda fluorescente C11-BODIPY ancorada a um lipossomo.

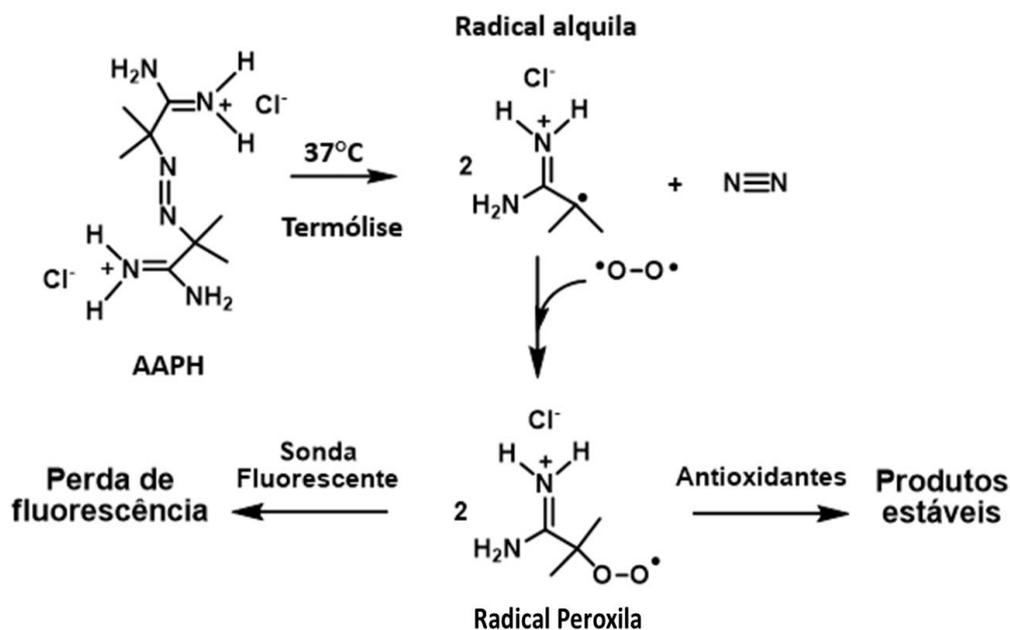


Fonte: FERREIRA, 2013.

O AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamida)) é um composto azo extensivamente usado como gerador de radicais livres a 37 °C, pois sofre termólise, produzindo nitrogênio molecular e radicais alquila, que podem se combinar para formar produtos estáveis ou reagir com oxigênio molecular formando os radicais peroxila (FERREIRA, 2013; ZULUETA et al., 2009).

A reação de termólise do AAPH durante o método de peroxidação lipídica está representada na Figura 10. Por meio desta reação é possível mensurar a capacidade de amostras em inibir a peroxidação lipídica, frente ao radical peroxila.

**Figura 10.** Reação de geração de radicais durante o ensaio de peroxidação lipídica.



Fonte: Adaptado de ZULUETA et al., 2009; FERREIRA, 2013.

O método consiste na simulação do dano oxidativo causado em membranas lipídicas, através da utilização de lipossomas de fosfatidilcolina de soja simulando uma membrana celular, levando à peroxidação lipídica. Esse dano, causado por radicais peroxila, é monitorado pelo decaimento de fluorescência da C11-BODIPY<sup>581/591</sup>, uma sonda fluorescente que fornece informações sobre a integridade do mimético de membrana. A principal característica desfavorável do método se relaciona a degradação da sonda sob iluminação (DRUMMEN et al., 2002; MACDONALD et al., 2007).

## 1.7 Medidas eletroquímicas

Vários métodos eletroquímicos estão sendo desenvolvidos com a finalidade de avaliar capacidade antioxidante, devido à rapidez, simplicidade e sensibilidade, na análise de compostos bioativos associados com a eliminação de radicais, assim como a própria atividade antioxidante. Outro ponto positivo é o baixo custo do ensaio e a fácil preparação da amostra a ser analisada. A relação do comportamento eletroquímico do composto e sua atividade antioxidante se mostra de grande

importância, visto que quanto mais baixo for o potencial de oxidação do composto, maior será seu poder antioxidante (SOCHOR et al., 2013).

Os ensaios eletroquímicos possuem grande potencial, pois apresentam uma alta capacidade de caracterização de antioxidantes a partir de fontes naturais, por fornecer parâmetros físico-químicos, que por sua vez são úteis para fornecer não somente o potencial redox, mas também o número de elétrons envolvidos, a influência causada pelos valores de pH do meio, a cinética de reação entre espécies, em fase homogênea ou heterogênea e outras informações. Há desvantagens, pois vários antioxidantes apresentam a mesma faixa de potencial e o método, quando comparado a técnicas hífenadas, como cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e mesmo CLAE, não apresenta o potencial de distinção estrutural (TEXEIRA et al., 2013).

Dentre as técnicas eletroquímicas mais difundidas pode-se ressaltar a voltametria cíclica (VC) e a voltametria de pulso diferencial (VPD), a coulometria, bem como outras técnicas acopladas (BORGES et al., 2011).

O método de voltametria cíclica se destaca por ser de baixo custo, rápido e bastante sensível à determinação de antioxidantes. Neste método, assim como em outras análises eletroquímicas, se utilizam três eletrodos: o eletrodo de trabalho, o eletrodo de referência e o eletrodo auxiliar. Há alguns parâmetros úteis: o potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ), a corrente de pico anódica ( $I_{pa}$ ), que pode ser correlacionada com a concentração do antioxidante (OROIAN e ESCRICHE, 2015). O voltamograma cíclico é comumente utilizado na análise de alimentos e produtos vegetais, tal método é capaz de determinar a capacidade antioxidante total do composto (SOCHOR et al., 2013).

A voltametria de pulso diferencial consiste num pulso de amplitude fixo sobreposto a uma rampa de potencial crescente que é aplicada ao eletrodo, sendo realizada por duas vezes a medida da corrente, uma anterior a aplicação do pulso (S1) e outra ao fim do pulso (S2). Daí então realiza-se uma subtração entre a segunda e a primeira corrente, para que então seja plotado um gráfico da diferença das correntes versus o potencial aplicado. Assim sendo, o voltamograma é constituído de picos de corrente de forma gaussiana, onde a área de cada pico é

diretamente proporcional à concentração do material analisado (SOCHOR et al., 2013).

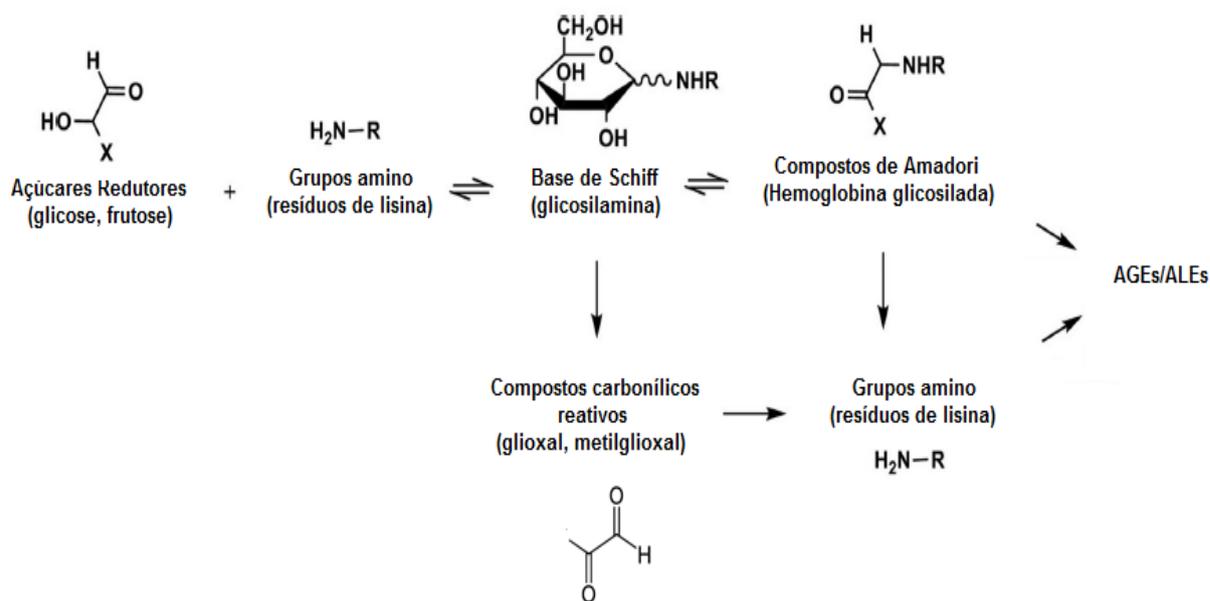
A voltametria de pulso diferencial está sendo testada na detecção de antioxidantes polifenólicos naturais em amostras biológicas e matrizes que apresentam diversas classes fenólicas. A aplicação desse método utilizando o eletrodo serigrafado, pode ser vista como um método de triagem rápida na análise de polifenóis em extratos naturais. Dentre os compostos puros que podem ser analisados por tal método temos: ácidos fenólicos, flavonas, flavonóis, catequinas e taninos (SOCHOR et al., 2013).

## **1.8 Atividade antiglicante**

Açúcares redutores, como glicose e frutose, produtos de oxidação de lipídios e aminoácidos podem reagir não enzimaticamente com grupamento amino de aminoácidos, peptídeos ou proteínas formando a base de Schiff e os produtos de Amadori, que representam a etapa inicial e reversível da reação de Maillard, uma série de reações que levam à formação dos chamados produtos de glicação avançada (AGEs) e de lipoxidação (ALEs) (Figura 11). Em seu estágio intermediário, a reação gera intermediários carbonílicos reativos capazes de atacar outros grupos amino, levando finalmente à formação dos chamados produtos da glicação (AGEs) ou da lipoxidação (ALEs) avançadas. In vivo, o processo inflamatório também promove a formação de AGEs/ALEs por meio da oxidação de aminoácidos mediada pelas enzimas NADPH oxidase e mieloperoxidase (BARBOSA et al., 2016; YAMAGISHI et al., 2010).

A base de Schiff, através de oxidação e geração de radicais, forma compostos carbonílicos reativos, como o glioxial e o metilglioxal, espécies altamente reativas e conferem aroma e cor aos alimentos. Esses produtos reagem com resíduos de proteínas, como lisina, arginina e cisteína, passando por uma ampla faixa de reações como desidratação, condesação, fragmentação, oxidação e ciclização para também formar AGEs e ALEs, gerando um quadro de estresse carbonílico (BARBOSA et al., 2016).

**Figura 11.** Principais etapas da reação de Maillard envolvendo açúcares redutores.



Fonte: Adaptado de BARBOSA et al., 2016.

Os AGEs são um grupo heterogêneo de compostos, incluindo adutos proteicos e produtos de ligação cruzada, capazes de modificar as propriedades químicas e funcionais de estruturas biológicas, através da geração de radicais, da formação de ligações cruzadas com proteínas e de interações com receptores celulares, como o receptor nuclear kB (NF-kB), que induz a expressão de mediadores inflamatórios e elicita o estresse oxidativo. As evidências do seu envolvimento em fisiopatologia de doenças crônico-degenerativas têm estimulado a investigação desses compostos (STERN et al., 2002; BARBOSA et al., 2008).

Os AGEs/ALEs podem ser adquiridos ainda através da dieta, considerada a principal fonte exógena, porém ainda existem estudos crescente quanto ao mecanismo de absorção e biodisponibilidade dos AGEs/ALEs dietéticos (URIBARRI et al., 2010).

Algumas substâncias demonstram efeitos anti-AGE, como é caso do ácido clorogênico que, segundo Kim e colaboradores (2011) inibiu a formação de AGEs com um valor de IC<sub>50</sub> de 148,32  $\mu$ M em um ensaio in vitro para a glicação de albumina de soro bovino (BSA) por glicose. Outros compostos fenólicos, vitaminas C e E e tiamina também apresentam essa propriedade (REDDY e BEYAZ, 2006).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar e comparar extratos das sementes e cascas de girassol, de diferentes cultivares, quanto à sua capacidade antioxidante, seu perfil químico e respectivas composições minerais.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- ✓ Obter extratos metanólicos das sementes e cascas de girassol;
- ✓ Avaliar capacidade antioxidante dos extratos frente ao radical DPPH• (atividade sequestradora de radicais) e frente aos íons ferro II (método FRAP), bem como seu conteúdo total de fenóis (CTF), conteúdo total de flavonas e flavonóis (CTFLA) e inibição da peroxidação lipídica;
- ✓ Avaliar a atividade antiglicante dos extratos;
- ✓ Identificar o perfil químico, em termos de compostos fenólicos dos extratos metanólicos por CLAE;
- ✓ Realizar estudo eletroquímico dos extratos vegetais;
- ✓ Determinar a composição mineral dos extratos vegetais.
- ✓ Correlacionar os dados obtidos.

### 3 EXPERIMENTAL

#### 3.1 Reagentes e equipamentos utilizados

Para o presente trabalho foram utilizados os seguintes reagentes e solventes: reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma), ácido gálico (Vetec Química Fina Ltda - Brasil), radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila - DPPH\* (Fluka - Brasil), 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina-TPTZ (Sigma), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico - Trolox®, sonda Bodipy C11<sup>581/591</sup> (ácido 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-undecanóico) (Molecular Probes), *L*-a-fosfatidilcolina (lecitina de soja), AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamida)) (Sigma), albumina do soro bovino (BSA) (Sigma), ácido clorogênico (Sigma), ácido caféico (Sigma), rutina (Sigma), ácido *p*-cumárico (Sigma), cloreto férrico hexa-hidratado, acetato de sódio tri-hidratado, ácido acético glacial, ácido clorídrico 37%, cloreto de alumínio, carbonato de sódio, hidróxido de amônio, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico. Soluções de referência de P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn e Sr, a 1000 mg L<sup>-1</sup> de maior grau de pureza analítica (ICP Standart, Merck Certipur®) e demais reagentes de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura (18 MΩ cm) de um sistema de purificação Milli-Q, da Millipore Inc.

A Tabela 3 lista os equipamentos utilizados.

**Tabela 3.** Equipamentos utilizados durante os experimentos.

Equipamento	Marca
Espectrofotômetro UV-vis	Agilent 8453
Espectrofluorímetro	Shimadzu, Japan RF-5301PC
Rotaevaporador	BUCHI R-210
Ultrassom	Cristófoli
Agitador de soluções (vórtex)	Phoenex AP-56
Balança analítica (0,01 mg/0,1 mg)	Mettler Toledo AG 245
Nanotrak-Zetatrac	NPA151-31A-0000-D30-10M
Aquecedor	BiomiXer 78 HW-1
pH metro (0,001 pH e 0,1 mV)	Quimis Aparelhos Científicos LTDA
Moinho de facas	Modelo 6826-057/OSTER
CLAE-PDA	Shimadzu
Banho de água termostaticada	BUCHI, Heating bath B-491
Potenciostato/Galvanostato PGSTAT	Autolab® AUT73222

Fonte: AUTORA, 2016.

O trabalho experimental foi realizado no laboratório de Eletroquímica do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), exceto as análises de peroxidação lipídica que foram realizadas na central analítica do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas e a determinação da composição inorgânica realizada no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

### 3.2 Coleta das amostras

As sementes de girassol, variedade Embrapa 122-V2000, variedade BRS 324 e híbrido BRS 387, foram fornecidas pela Embrapa Soja, em setembro de 2015. As amostras foram previamente armazenadas em local seco e arejado e, em seguida, trituradas e homogeneizadas em moinho de facas. Foram utilizadas farinhas obtidas do epicarpo do fruto (casca), da semente e do fruto completo (epicarpo + semente).

Na Tabela 4, são listadas informações sobre as principais características dessas sementes.

**Tabela 4.** Características botânicas e regiões de adaptação dos cultivares.

PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS CULTIVARES			
	Embrapa 122-V2000	BRS 324	BRS 387
Genética Teor de Óleo Cor do aquênio Início do florescimento Maturação fisiológica	Variedade 40-44% Preto com listras cinzas 53 dias 85 dias	Variedade 45-49% Estriado escuro 52-60 dias 80-100 dias	Híbrido simples 42-44% Branco com listras cinzas 53-63 dias 83-101 dias
Regiões de adaptação	 	 	 

Fonte: AUTORA, 2016.

### 3.3 Preparação dos extratos metanólicos de girassol

O processo de extração foi realizado segundo De Leornardis e colaboradores (2005), com algumas modificações. Para cada extração, foram pesados 10 g das farinhas, acondicionados em um cartucho de papel-filtro e desengorduradas com hexano, utilizando o aparelho de Soxhlet, durante um período de 6 h. Em seguida foram tratadas no mesmo extrator, com metanol (300 mL) e aquecimento na temperatura de ebulição do metanol (64 - 66°C), durante 6 h. Após resfriamento, os extratos foram concentrados em rota-evaporador, obtendo-se um total de 9 extratos que foram codificados conforme listado na Tabela 5 e armazenados sob refrigeração em frascos de vidro âmbar, para testes posteriores.

**Tabela 5.** Códigos de identificação dos extratos produzidos.

TIPO DE EXTRATO	CODIFICAÇÃO
Semente do híbrido BRS 387	S387
Pericarpo (casca) do híbrido BRS 387	C387
Fruto completo (casca + semente) do híbrido BRS 387	CS387
Semente da variedade BRS 324	S324
Pericarpo (casca) da variedade BRS 324	C324
Fruto completo (casca + semente) da variedade BRS 324	CS324
Semente da variedade Embrapa 122	S122
Pericarpo (casca) da variedade Embrapa 122	C122
Fruto completo (casca + semente) da variedade Embrapa 122	CS122

Fonte: AUTORA, 2016.

### 3.4 Obtenção do conteúdo total de fenóis e de flavonas e flavonóis

A determinação do conteúdo total de fenóis foi realizada de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (FC), descrito por Blainski e colaboradores (2013), com modificações. Os extratos foram diluídos em metanol e adicionou-se aos tubos, 120 µL da solução amostra (25 µg mL<sup>-1</sup>), 180 µL de água, 300 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 2,4 mL de carbonato de sódio a 5% (m/v), totalizando um volume de 3 mL. Os tubos foram postos em banho-maria a 40 °C ao abrigo da luz, por um período de 20 min. Em seguida, a mistura reacional foi colocada em uma cubeta de quartzo (capacidade = 3 mL; caminho óptico = 1 cm) e medida a absorvância a 760 nm, utilizando espectrofotômetro (UV-Vis modelo Agilent 8453). Os teores de fenóis totais (CTF) foram obtidos a partir de curva analítica, utilizando ácido gálico como

padrão e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico/g de extrato seco (mg de EAG/g de extrato seco).

Para a determinação do conteúdo total de flavonas e flavonóis, utilizou-se o método do cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ), descrito por Maisarah e colaboradores (2013), com algumas modificações. Foram adicionados 1,5 mL da solução do extrato ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) a 1,5 mL de solução metanólica de  $\text{AlCl}_3$  (2% m/v). Homogeneizou-se e deixou-se reagir à temperatura ambiente ao abrigo da luz por 1 h. A absorvância foi medida a 420 nm. Os teores de flavonas e flavonóis totais foram obtidos a partir de curva analítica realizada com quercetina, e os resultados expressos em mg de equivalentes de quercetina/g de extrato seco (mg de EQ/g de extrato seco).

### 3.5 Capacidade antioxidante frente ao radical DPPH•

A determinação da capacidade antioxidante dos extratos estudados foi realizada de acordo com Karamać e colaboradores (2012), com modificações. O método consistiu na adição de 300  $\mu\text{L}$  da solução do extrato ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) a 2,7 mL da solução metanólica de DPPH• ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A avaliação da capacidade antioxidante foi feita, monitorando-se a redução do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), de coloração púrpura, a DPPH-H (difenil-picril-hidrazina) de coloração amarela, por meio da medida do decréscimo da absorvância a 516 nm em espectrofotômetro (UV-Vis modelo Agilent 8453). A atividade sequestradora do radicais (ASR) foi calculada, usando a seguinte equação para um tempo de 30 min:

$$\%ASR = [(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{controle}}] \times 100$$

Onde,  $Abs_{\text{controle}}$  é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH• e  $Abs_{\text{amostra}}$  é a absorvância da mistura reacional (DPPH• + amostra). Foi determinada ainda a concentração necessária para inibição do radical DPPH• em 50% ( $IC_{50}$ )

### 3.6 Capacidade antioxidante redutora de ferro (FRAP)

A determinação da atividade antioxidante por meio da redução de íons ferro (FRAP) foi realizada pelo método de Benzie e Strain (1996), com algumas modificações. O método baseou-se na medida direta da habilidade dos antioxidantes da amostra em reduzir em meio ácido ( $\text{pH} = 3,6$ ), o complexo de  $\text{Fe(III)/TPTZ}$

(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina)  $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ , para formar o complexo de  $\text{Fe(II)[Fe(III)(TPTZ)}_2]^{2+}$ , de coloração azul, com absorção máxima em 595 nm.

O reagente FRAP foi preparado somente no momento da análise, através da mistura de 25 mL de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5 mL solução TPTZ (10 mM em HCl 40 mM) e 2,5 mL da solução de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (20 mM). Adicionou-se 90  $\mu\text{L}$  de cada solução dos extratos ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), em cada tubo de ensaio, acrescentou-se 270  $\mu\text{L}$  do solvente e misturou-se com 2,7 mL do reagente FRAP. Os tubos foram homogeneizados em agitador de tubos (vórtex, AP-56) e postos em banho-maria a  $37^\circ\text{C}$  por 30 min. Realizou-se então a medida da absorvância a 595 nm em espectrofotômetro (UV-vis modelo Mutispec- 1501, Shimadzu, Japão). Utilizou-se trolox para construção da curva analítica. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de trolox(ET)/g de extrato seco.

### 3.7 Avaliação da inibição da peroxidação lipídica

O presente método foi realizado segundo Drummen e colaboradores (2002). Lipossomas de fosfatidilcolina de soja (6-8% de insaturações) foram preparados, com o intuito de simular uma membrana celular. Para o método, foi necessário o preparo prévio de vesículas unilamelares de fosfatidilcolina de soja. Para isto, foi preparada uma solução de fosfatidilcolina de soja ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em 10 mL de tampão fosfato ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,4). Para solubilizar o lipídio, levou-se ao banho ultrassom, a  $50^\circ\text{C}$ , por cerca de 30 min, agitando-se em vórtex, a cada 10 min. Durante esta etapa, ocorre a formação dos lipossomas multilamelares. Em seguida, foi montado um sistema extrusor de membranas de 100 nm de diâmetro de poros (Avanti Polar Lipids®) e a solução contendo os lipossomas multilamelares foi passada por esse sistema (15 vezes), obtendo-se assim os lipossomas unilamelares com 100 nm de diâmetro (MACDONALD et al., 1991). Em seguida, foi realizada a incorporação adicional de  $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  da solução da sonda fluorescente C11-BODIPY<sup>581/591</sup> em DMSO (DRUMMEN et al., 2002). O tamanho de partícula foi confirmado por Nanotracer-Zetatracer, modelo NPA151-31A-0000-D30-10M.

Após o preparo das vesículas, medidas de fluorescência foram realizadas a  $37^\circ\text{C}$ , usando um espectrofluorímetro (Shimadzu, Japan RF-5301PC). Em uma cubeta de quartzo de 1,0 mL, quantidades adequadas de suspensão de vesícula unilamelar, em tampão fosfato pH 7,4 e da amostra ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ou Trolox ( $100 \mu\text{mol}$

L<sup>-1</sup>), como um controle positivo, foram misturados. A reação foi iniciada com a adição de 100 µL de AAPH (100 mmol L<sup>-1</sup>). O decaimento de fluorescência ( $\lambda_{\text{excitação}} = 580$  nm,  $\lambda_{\text{emissão}} = 600$  nm) foi monitorado continuamente durante 30 min. De acordo com DRUMMEN et al. (2002), esta sonda fluorescente, através de seu monitoramento, fornece informações sobre a integridade da membrana utilizada.

### 3.8 Identificação dos compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos foram realizadas por CLAE. As condições cromatográficas foram adaptadas a partir De Leonardis e colaboradores (2005) e a identificação dos compostos fenólicos foi realizada por comparação com os tempos de retenção de substâncias-padrão

#### 3.8.1 Condições cromatográficas

**SISTEMA DE CLAE:** Shimadzu (série VP, Quioto, Japão) com um controlador de sistema (CBM-20A), bomba (VP LC-20AT), forno de coluna (CTO-20AC), coluna C18 Shimadzu VP-ODS (250 Lx 4,6 mm), detector PDA (SPD-M20A) e software (LC-solução).

**FASE MÓVEL A:** a solução de ácido acético 2% (v/v) foi preparada em água ultrapura (18 MΩ) de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore Inc. Em seguida, a solução, em valor de pH 4,0, foi filtrada em um sistema de filtração à vácuo, utilizando uma membrana de filtração PTFE modificada (diâmetro 47 mm e poro 0,45 µm, Millipore®).

**FASE MÓVEL B:** metanol (grau CLAE).

As fases móveis foram utilizadas através de um sistema gradiente de eluição, conforme a Tabela 6, com fluxo constante de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, temperatura da coluna de 27°C, comprimento de onda fixo de 325 nm e injeção de 20 µL, com tempo total de análise de 45 min. Os extratos foram dissolvidos em metanol (4 mg mL<sup>-1</sup>) e filtrados com um membrana de nylon de 0,45 µm antes da injeção no CLAE.

As soluções-padrão estoque de ácido clorogênico, ácido cafeico, rutina e ácido *p*-cumárico foram preparadas na concentração de 0,5 mg mL<sup>-1</sup> em metanol, acondicionadas em recipiente, ao abrigo da luz e mantidas sob refrigeração, para posteriores diluições e construção das curvas analíticas.

**Tabela 6.** Gradiente utilizado nas análises por CLAE.

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	0	0
10	95	5
20	75	25
30	50	50
40	65	35
45	95	5

FONTE: AUTORA, 2016.

### 3.9 Estudos Eletroquímicos

Todos os experimentos eletroquímicos foram realizados em potenciostato/galvanostato da Autolab<sup>®</sup>. Foi utilizada uma cela eletroquímica composta por um sistema de três eletrodos: um eletrodo de carbono vítreo (BAS, diâmetro 1,6 mm) como eletrodo de trabalho; um fio de platina, como eletrodo auxiliar e um eletrodo de Ag|AgCl|Cl<sup>-</sup> (saturado), como eletrodo de referência (Figura 12). Experimentos voltamétricos foram realizados em tampão fosfato pH 7,4 e 20% de etanol. Para o estudo do perfil voltamétrico, os extratos foram solubilizados em etanol (4 mg mL<sup>-1</sup> na cela eletroquímica) e o meio desaerado com nitrogênio, por aproximadamente 10 min.

O eletrodo de carbono vítreo passou por uma limpeza mecânica. Foi polido com alumina (0,3 µm) e lavado abundantemente com água, antes de ser levado ao ultrassom por 30 s em etanol. Após o procedimento de limpeza, foi realizado o teste com uma solução de ferricianeto-ferrocianeto de potássio, para verificar a área eletroativa do eletrodo já conhecida para sistema reversível, sendo utilizado como parâmetro para limpeza da área eletroativa do eletrodo. O estudo foi realizado utilizando a técnica de voltametria cíclica com velocidade de 50 mV s<sup>-1</sup>.

**Figura 12.** Representação esquemática de uma célula eletroquímica, constituída por três eletrodos.

Fonte: ANDRADE, 2013.

### 3.10 Determinação da composição inorgânica

Para a determinação da composição inorgânica foi utilizado o método descrito por Froes e colaboradores (2014) com algumas modificações. Para a digestão das amostras pesou-se cerca de 0,5 g da farinha das amostras em tubo apropriado para o forno de microondas, foram adicionados 3,5 mL de HNO<sub>3</sub> (14,0 mol L<sup>-1</sup>), 3,5 mL de H<sub>2</sub>O e 1,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% v/v), em seguida as amostras foram submetidas ao programa de aquecimento mostrado na Tabela 7. As amostras foram digeridas em triplicatas.

**Tabela 7.** Programa de aquecimento para o procedimento de digestão assistida por radiação microondas.

Etapa	Tempo (min)	Potência (W)	Temperatura (°C)
1	6	750	90
2	4	750	90
3	8	1000	180
4	15	1000	180

FONTE: AUTORA, 2016.

As condições operacionais otimizadas para a Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) se encontram na Tabela 8.

**Tabela 8.** Parâmetros operacionais ICP-OES.

Parâmetros	
Potência	1,4 Kw
Vazão do gás de nebulização	0,4 – 1,1 L min <sup>-1</sup>
Fluxo de amostra	1,0 mL min <sup>-1</sup>
Fluxo de gás auxiliar	0,2 L min <sup>-1</sup>
Diâmetro do tubo injector	2,0 nm
Linhas de emissão (λ/nm)	P (I=213,62), K (I=766,49), Ca (II=396,85), Mn (II=257,61), Fe (II=259,94), Ni (II=216,55), Cu (I=327,39), Zn (I=213,86)

FONTE: AUTORA, 2016.

Sendo (I) linha atômica e (II) linha iônica.

### 3.11 Determinação da atividade antiglicante

Este ensaio foi realizado de acordo com o método descrito por Beaulieu e colaboradores (2009) e Melo e colaboradores (2015), com algumas modificações. Inicialmente, preparou-se o meio de incubação constituído por BSA (1 mg mL<sup>-1</sup>), glicose (10 mg mL<sup>-1</sup>) e frutose (10 mg mL<sup>-1</sup>) em tampão fosfato de sódio (100 mM pH 7,4). Analisaram-se sete concentrações diferentes de soluções etanólicas dos extratos secos (2,5-100 µg mL<sup>-1</sup>) para determinação do IC<sub>50</sub>. Para determinar se os extratos interferiam com a fluorescência, preparou-se uma amostra em branco contendo glicose (100 mM) e frutose (100 mM) em tampão fosfato 100 mM para cada diluição. O controlo negativo era composto por glicose (10 mg mL<sup>-1</sup>), frutose (10 mg mL<sup>-1</sup>), BSA (1 mg mL<sup>-1</sup>) em tampão fosfato 100 mM e um controle positivo contendo aminoguanidina (0,78-50 µg mL<sup>-1</sup>).

As amostras foram incubadas no escuro a 37°C, com agitação constante durante 7 dias e a formação de AGE foi quantificada, utilizando o espectrofluorofotómetro RF-5301PC (Shimadzu, Japão), a  $\lambda_{ex} = 355$  e  $\lambda_{em} = 440$  nm. As análises foram realizadas, em triplicata. A porcentagem de inibição (I%) na formação de AGE foi calculada como se segue:

$$I\% = (F_{\text{controle negativo}} - F_{\text{experimento corrigido}} / F_{\text{controle negativo}}) * 100,$$

onde  $F_{\text{controle negativo}}$  é a fluorescência para o controle negativo e  $F_{\text{experimento corrigido}}$  é a fluorescência experimental corrigida para os tratamentos experimentais.

### 3.12 Correlação linear de Pearson

Os resultados mostrados no presente trabalho correspondem à média de três repetições  $\pm$  desvio-padrão da média ou porcentagem. O teste de correlação de Pearson foi realizado para determinar as correlações entre as médias, os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. A análise estatística foi realizada utilizando o programa SAEG 9.1 (System for Statistical Analysis, MG, Brazil). Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa Microsoft® Excel XP.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após extrações em metanol, os rendimentos foram calculados e listados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Rendimento das extrações metanólicas.

<b>Extrato</b>	<b>Rendimento (%)</b>
S387	16,99
C387	15,77
CS387	14,37
S324	15,03
C324	12,36
CS324	20,35
S122	18,63
C122	16,76
CS122	17,20

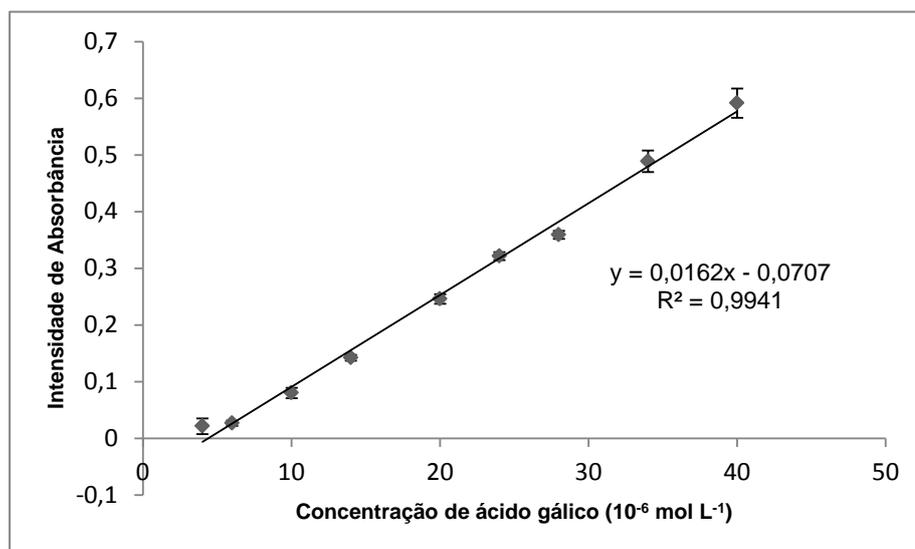
Fonte: AUTORA, 2016.

É possível perceber com os resultados da Tabela 9 que os rendimentos dos extratos do pericarpo, da semente e do fruto completo do girassol foram próximos, com maior percentual de extração para CS324. Os extratos foram submetidos a todas as análises mencionadas no experimental. Segundo De Leonardis (2005), o processo de desengorduramento das sementes de girassol não altera o conteúdo de proteínas e compostos fenólicos das mesmas.

### 4.1 Obtenção do conteúdo total de fenóis e de flavonas e flavonóis

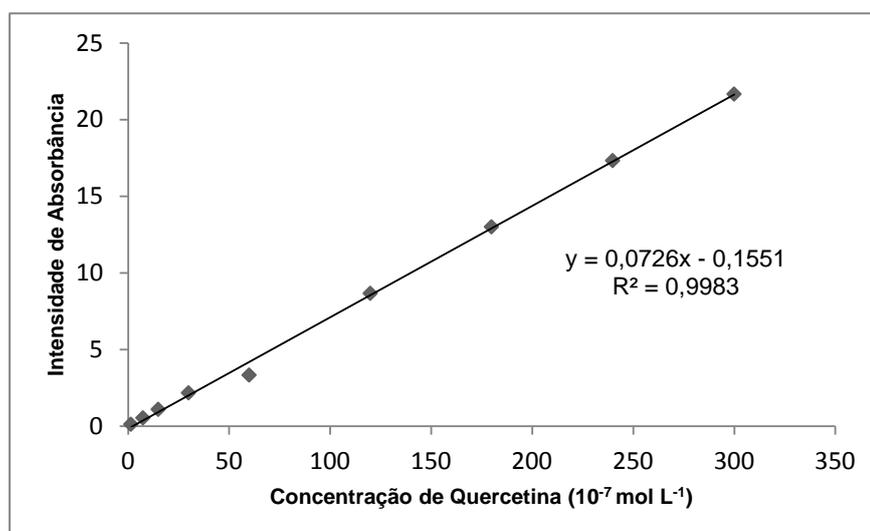
O método Folin Ciocalteu é bastante utilizado para a quantificação de compostos fenólicos sendo simples e reprodutível (HUANG et al., 2005). As curvas analíticas obtidas para os métodos estão descritas nas Figuras 13 e 14, onde y corresponde aos valores de intensidade de absorbância e x, as concentrações do padrão utilizado.

**Figura 13.** Curva analítica para o método CTF (ácido gálico).



Fonte: AUTORA, 2016.

**Figura 14.** Curva analítica para o método CTFLA (quercetina).



Fonte: AUTORA, 2016.

O teor de fenóis totais e de flavonas e flavonóis para os extratos metanólicos estão apresentados na Tabela 10. É possível observar que os valores para CTFLA variaram entre 13 e 47,7 mg de EQ/g de extrato seco, com exceção dos extratos S387 e C122, que apresentaram valores menores que 10 mg EQ/g de extrato seco. Para os valores de CTF, observam-se valores entre 43,6 e 95,2 mg de EAG/g de extrato seco. Para ambos os métodos, o extrato CS122, proveniente da farinha do fruto completo (semente e pericarpo), apresentou os maiores valores.

**Tabela 10.** Teor de flavonas e flavonóis (CTFLA) e de fenólicos totais (CTF) dos extratos metanólicos de girassol.

<b>EXTRATOS</b>	<b>CTFLA (mg EQ/g de extrato seco)</b>	<b>CTF (mg de EAG/g de extrato seco)</b>
<b>S387</b>	9,1 ± 0,1	76,3 ± 0,3
<b>C387</b>	14,3 ± 0,0	54,6 ± 0,2
<b>CS387</b>	22,8 ± 1,6	52,5 ± 1,4
<b>S324</b>	24,0 ± 0,0	65,2 ± 1,6
<b>C324</b>	13,0 ± 0,2	53,1 ± 1,9
<b>CS324</b>	40,9 ± 2,1	43,6 ± 0,3
<b>S122</b>	21,7 ± 1,9	57,5 ± 1,7
<b>C122</b>	4,2 ± 0,0	63,0 ± 0,8
<b>CS122</b>	47,7 ± 0,2	95,2 ± 0,7

Fonte: AUTORA, 2016.

Foi possível observar, de modo geral, que em extratos obtidos do fruto completo (CS) houve extração de um maior teor de flavonas e flavonóis quando comparados com seus respectivos extratos de semente e pericarpo. Esse mesmo comportamento não é observado para o conteúdo de fenóis totais. Como esperado, apesar dos padrões de comparação diferentes (Q vs AG), observa-se que os valores de CTF são sempre maiores do que os de CTFLA e CS324, apresenta valores mais próximos, possivelmente indicativo de um maior percentual de flavonoides constituintes.

Na Tabela 11, são listados os valores de CTF e CTFLA determinados para diferentes amostras de girassol, utilizando os métodos de FC e  $AlCl_3$ .

De acordo com os estudos apresentados na Tabela 9, foi possível observar que o extrato etanólico da torta de Porto Alegre apresentou valor de CTFLA inferior ao do presente trabalho (47,7 mg de EQ/g de extrato seco (CS122)). O extrato metanólico da casca de girassol roxo do Canadá (cultivar CM 160) apresentou CTF próximo ao valores encontrados nesse trabalho (95,2 mg de EAG/g de extrato seco). Esse tipo de cultivar com coloração diferenciada é largamente utilizado como planta ornamental, com tamanho menor que a flor tradicional (CASTRO et al., 1996). Por outro lado, extratos metanólicos da semente de girassol da Polônia e do Paquistão, respectivamente, apresentaram valores de CTF superior, o que pode ser provocado pela sazonalidade, visto que a composição química das sementes e cascas varia amplamente com o local de produção, clima, uso de fertilizantes e até mesmo com a

posição da semente no capítulo, tornando-se um fator limitante do estudo (CASTRO et al., 1996).

**Tabela 11.** Conteúdo total de fenóis e de flavonas e flavonóis para girassol de diferentes regiões.

Amostras	CTFL (mg de EQ/g de extrato seco)	CTF (mg de EAG/g de extrato seco)	Referências
Extrato metanólico da semente (Rio Grande do Sul)	-	34,7 ± 0,5	Fontoura, 2010
Extrato metanólico da casca de girassol roxo (Canadá)	-	97,5 ± 0,9	Velioglu et al., 1998
Extrato metanólico da semente (Polônia)	-	108,0 ± 0,9	Karamać et al., 2012
Extrato metanólico da semente (Paquistão)	45,0 ± 2,0	200,0 ± 5,7	Kamal, 2011
Extrato etanólico da torta (Porto Alegre)	10,4 ± 0,3	12,1 ± 0,3	Souza, 2013

Fonte: AUTORA, 2016.

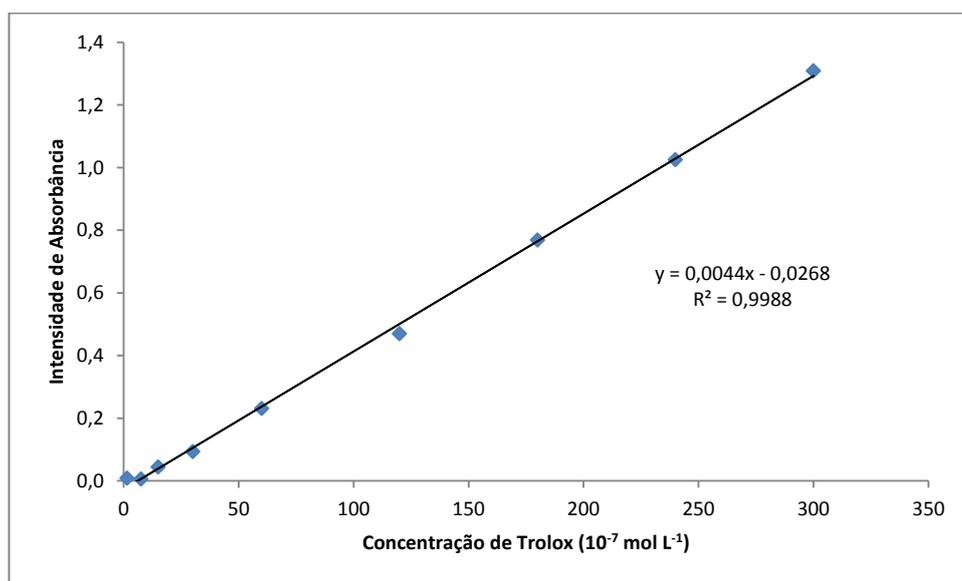
De acordo com os estudos apresentados na Tabela 11, foi possível observar que o extrato etanólico da torta de Porto Alegre apresentou valor de CTFLA inferiores ao do presente trabalho (47,7 mg de EQ/g de extrato seco (CS122)).

O extrato metanólico da casca de girassol roxo do Canadá (cultivar CM 160) apresentou CTF próximo ao valores encontrados nesse trabalho (95,2 mg de EAG/g de extrato seco). Esse tipo de cultivar com coloração diferenciada é largamente utilizado como planta ornamental, com tamanho menor que a flor tradicional (CASTRO et al., 1996). Por outro lado, extratos metanólicos da semente de girassol da Polônia e do Paquistão, respectivamente, apresentaram conteúdo superior, o que pode ser provocado pela sazonalidade, visto que a composição química das sementes e cascas varia amplamente com o local de produção, clima, uso de fertilizantes e até mesmo com a posição da semente no capítulo, tornando-se um fator limitante do estudo (CASTRO et al., 1996).

#### **4.2 Capacidade antioxidante frente ao radical DPPH<sup>•</sup> e capacidade redutora de ferro (FRAP)**

A curva analítica obtida para o método de FRAP é mostrada na Figura 15, onde  $y$  corresponde aos valores de intensidade de absorbância e  $x$ , as concentrações do padrão utilizado.

**Figura 15.** Curva analítica para o método FRAP (trolox).



Fonte: AUTORA, 2016.

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos para a atividade sequestradora de radical DPPH $^{\bullet}$  (%ASR), os valores de IC $_{50}$ , concentração necessária para inibição do radical DPPH $^{\bullet}$  em 50%, como também a capacidade antioxidante através da redução de ferro(III) para os extratos de girassol e suas frações (25  $\mu$ g mL $^{-1}$ ).

**Tabela 12.** Capacidade antioxidante sequestradora de radicais (DPPH $^{\bullet}$ ) e redutora de ferro (FRAP).

EXTRATOS	FRAP (mg de ET/g de extrato seco)	DPPH $^{\bullet}$ (%ASR)	IC $_{50}$ ( $\mu$ g mL $^{-1}$ )
<b>S387</b>	113,6 $\pm$ 0,8	26,9 $\pm$ 0,5	55,0
<b>C387</b>	136,3 $\pm$ 1,1	22,9 $\pm$ 0,7	60,0
<b>CS387</b>	163,2 $\pm$ 1,8	37,0 $\pm$ 1,0	48,0
<b>S324</b>	124,3 $\pm$ 1,2	40,8 $\pm$ 2,4	41,0
<b>C324</b>	89,4 $\pm$ 0,2	21,0 $\pm$ 1,1	49,0
<b>CS324</b>	196,9 $\pm$ 2,3	25,3 $\pm$ 4,7	59,0
<b>S122</b>	141,2 $\pm$ 0,4	26,3 $\pm$ 1,9	57,0
<b>C122</b>	136,8 $\pm$ 0,5	29,8 $\pm$ 0,7	50,0
<b>CS122</b>	152,3 $\pm$ 2,3	27,9 $\pm$ 2,2	55,0

Fonte: AUTORA, 2016.

Tanto para a atividade antioxidante por meio da redução de ferro quanto para atividade sequestradora de DPPH•, os extratos obtidos da variedade BRS 324, revelaram os maiores valores, sendo o extrato CS324 o mais destacado no método de FRAP (196,9 mg de ET/g de extrato seco) e o extrato S324 no método do DPPH• (40,8%) e nos valores de IC<sub>50</sub>. É importante destacar ainda que, os menores valores para ambos os métodos (DPPH• e FRAP) foram atribuídos também a um extrato dessa mesma variedade (C324).

Apesar de apresentarem algumas características botânicas diferentes, como teor de óleo, início de florescimento entre outras, conforme já descrito anteriormente na Tabela 4, a atividade antioxidante dessas sementes foi pouco influenciada com as mudanças botânicas e de melhoramento genético, conforme se observa nos dados apresentados para a redução de ferro e do radical DPPH•. No cultivo e trabalho em campo com os cultivares não existem descritores químicos cadastrados, apenas descritores morfológicos.

Para fins de comparação, na Tabela 13 estão listados valores de IC<sub>50</sub> encontrados na literatura para amostras de girassol.

**Tabela 13.** Valores de IC<sub>50</sub> para girassol de diferentes regiões.

Amostras	IC <sub>50</sub>	Referências
Extrato hidroalcolico da semente (Sérvia)	900 µg mL <sup>-1</sup>	Žilić et al., 2010
Extrato aquoso da semente (São Paulo)	30,0 µg mL <sup>-1</sup>	Giada e Mancini-Filho, 2009
Extrato etanólico da semente (São Paulo)	98,0 µg mL <sup>-1</sup>	
Extrato metanólico da semente (Paraná)	33,5 µg mL <sup>-1</sup>	Mercali, 2011

Fonte: AUTORA, 2016.

Comparando-se os resultados da literatura de diferentes extratos obtidos de sementes de girassol, observa-se que os valores de IC<sub>50</sub> apresentam uma certa variação de acordo com o solvente utilizado. Esse fator fica mais evidente ao se compararem os valores obtidos por Giada e Mancini-Filho (2009), onde extratos diferentes da mesma semente revelaram IC<sub>50</sub> diferentes, sendo o extrato aquoso, o que apresentou o menor valor, inclusive menor que o encontrado nesse trabalho (41

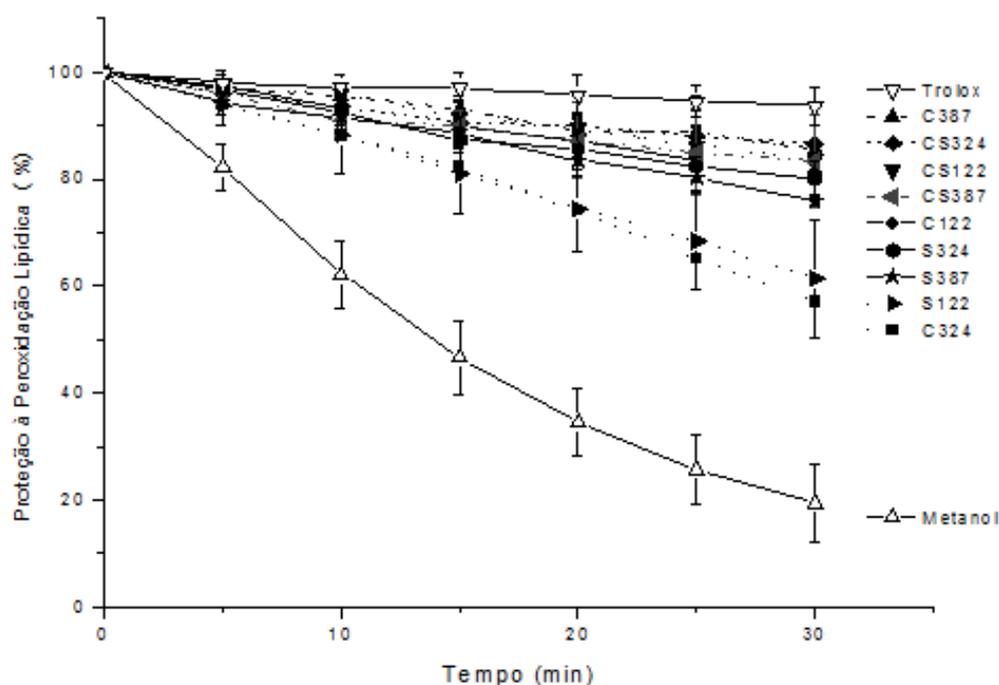
$\mu\text{g mL}^{-1}$  (S324)). Apesar de menor, o uso da água como solvente de extração apresenta-se como uma vantagem, principalmente se o extrato for destinado à futura indústria alimentícia e/ou cosmética.

### 4.3 Avaliação da inibição da peroxidação lipídica

O efeito protetor de antioxidantes contra peroxidação de lipídios tem sido largamente estudado (NIKI, 2010). Assim, a capacidade antioxidante dos extratos de girassol foi avaliada frente à peroxidação lipídica através da utilização de um modelo de lipoperoxidação em membrana (lipossomas unilamelares de lecitina de soja) mediado pelo radical peroxila como descrito na seção 3.7.

A Figura 16 mostra a proteção contra a peroxidação lipídica em função do tempo, onde primeiro foi realizado um branco: lipossoma + sonda C11-BODIPY<sup>581/591</sup> + metanol + AAPH (-◇-), para o controle positivo, utilizou-se uma solução de trolox (100  $\mu\text{M}$ ) (-★-).

**Figura 16.** Proteção contra a peroxidação lipídica (%) em função do tempo (min).



Fonte: AUTORA, 2016.

Pode-se observar no branco, onde há ausência de antioxidantes, a ocorrência da peroxidação lipídica lipossomal induzida por AAPH, o que ocasiona a perda de fluorescência. O controle positivo ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), como era de se esperar, inibiu a peroxidação lipídica oferecendo cerca de 95% de proteção ao final da cinética. Os extratos obtidos das farinhas de girassol apresentaram perfil semelhante ao longo dos 30 min, com valores maiores que 75% de proteção à membrana, exceto os extratos S122 e C324, que apresentaram menor proteção, 61% e 57%, respectivamente. A maior proteção é atribuída ao extrato obtido a partir da casca do híbrido BRS 387 (85%), podendo-se afirmar que esses extratos se mostraram promissores quanto à proteção da membrana.

#### **4.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

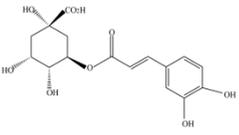
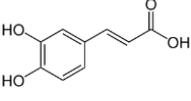
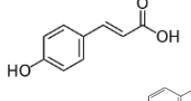
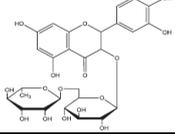
A CLAE tem sido muito utilizada devido à sua versatilidade e precisão, acompanhada do uso da fase reversa com colunas C18, principalmente, na determinação de compostos fenólicos de várias matrizes (ARCHELA e DALL'ANTONIA, 2013; WEISZ et al., 2009). Sendo assim, as condições adotadas nesse trabalho foram suficientes para promover a separação com boa resolução entre todos os compostos estudados.

A Figura 17 mostra os cromatogramas dos extratos metanólicos de girassol. Quatro compostos foram identificados nos extratos em tempos de retenção semelhantes: ácido clorogênico, ácido caféico, ácido p-cumárico e rutina, nas condições estudadas.

A quantificação foi feita, utilizando uma curva analítica para cada composto para se obter a equação de regressão linear para cada um e seus respectivos coeficientes para determinar a área do pico (Tabela 14), onde x corresponde a concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e y a área do pico (mAU). O ácido clorogênico foi o fenol mais abundante em todos os extratos, sendo este o polifenol mais encontrado em alimentos. Os outros fenóis identificados, juntamente com o flavonoide rutina, presentes em quantidades menores, também são abundantes em frutas, vegetais e alimentos derivados de produtos naturais além de estarem associados à redução no risco de doenças cardiovasculares, câncer e outras doenças crônicas (GARAMBONE e ROSA, 2008).

A rutina foi o único composto identificado apenas nos extratos CS122 e S387 onde não houve coeluição. Apesar de todo o rigor adotado no procedimento, a análise qualitativa é sujeita a erros devido ao uso dos tempos de retenção para a identificação dos analitos. Apesar do tempo de retenção (TR) ser característico de um composto sob determinadas condições, ele não é único, podendo outros compostos apresentarem o mesmo TR (LANÇAS, 2009), como foi o caso dos picos com tempo de retenção próximos à 36 min nos extratos S324, C324, CS324, CS387, C387, S122 e C122.

**Tabela 14.** Análise por CLAE dos extratos metanólicos de compostos fenólicos.

Composto	Equação de regressão linear	r <sup>2</sup>	Estrutura
Ácido clorogênico	$y = 29300x - 398714$	0,9995	
Ácido caféico	$y = 16028x - 41332$	0,9991	
Ácido <i>p</i> -cumárico	$y = 16262x - 52479$	0,9999	
Rutina	$y = 12727x - 12206$	0,9989	

Fonte: AUTORA, 2016.

É importante destacar a presença de um pico intenso não identificado com TR igual a 3.1 min no cromatograma do extrato S387. O não aparecimento desse pico no extrato CS387 sugere que, possivelmente, esse pico possa estar associado a algum produto de oxidação ou degradação do extrato, visto que os extratos, após obtidos, são armazenados para posterior análise por CLAE.

Da análise dos cromatogramas pode-se observar que foram identificados os mesmos compostos nos extratos, com exceção da rutina, porém com variações na intensidade do sinal obtido, esse fator está relacionado à variação das concentrações desses compostos obtidos a partir das curvas analíticas, como é possível observar na Tabela 15.

**Tabela 15.** Concentração dos compostos fenólicos nos extratos metanólicos (mg/g de extrato seco).

Concentração (mg/g de extrato seco)				
Extrato	Ácido Clorogênico	Ácido Caféico	Ácido <i>p</i> -cumárico	Rutina
<b>S387</b>	25,2 ± 0,6	2,4 ± 0,4	0,9 ± 0,7	4,5 ± 1,0
<b>C387</b>	21,9 ± 2,3	2,0 ± 1,7	0,8 ± 1,2	-
<b>CS387</b>	28,0 ± 1,4	2,7 ± 1,0	1,0 ± 1,6	-
<b>S324</b>	31,0 ± 0,7	3,0 ± 1,0	1,1 ± 0,3	-
<b>C324</b>	24,8 ± 1,6	2,3 ± 1,9	0,9 ± 2,1	-
<b>CS324</b>	14,4 ± 2,2	1,4 ± 0,1	0,6 ± 0,9	-
<b>S122</b>	17,3 ± 1,4	0,8 ± 3,0	0,7 ± 0,2	-
<b>C122</b>	27,3 ± 0,9	2,6 ± 0,3	1,0 ± 0,2	-
<b>CS122</b>	17,9 ± 1,0	1,7 ± 1,1	0,7 ± 1,5	3,9 ± 0,6

Fonte: AUTORA, 2016.

Esses compostos fenólicos também foram identificados em outros trabalhos com sementes e cascas de girassol como descrito na Tabela 16, em destaque os mais abundantes.

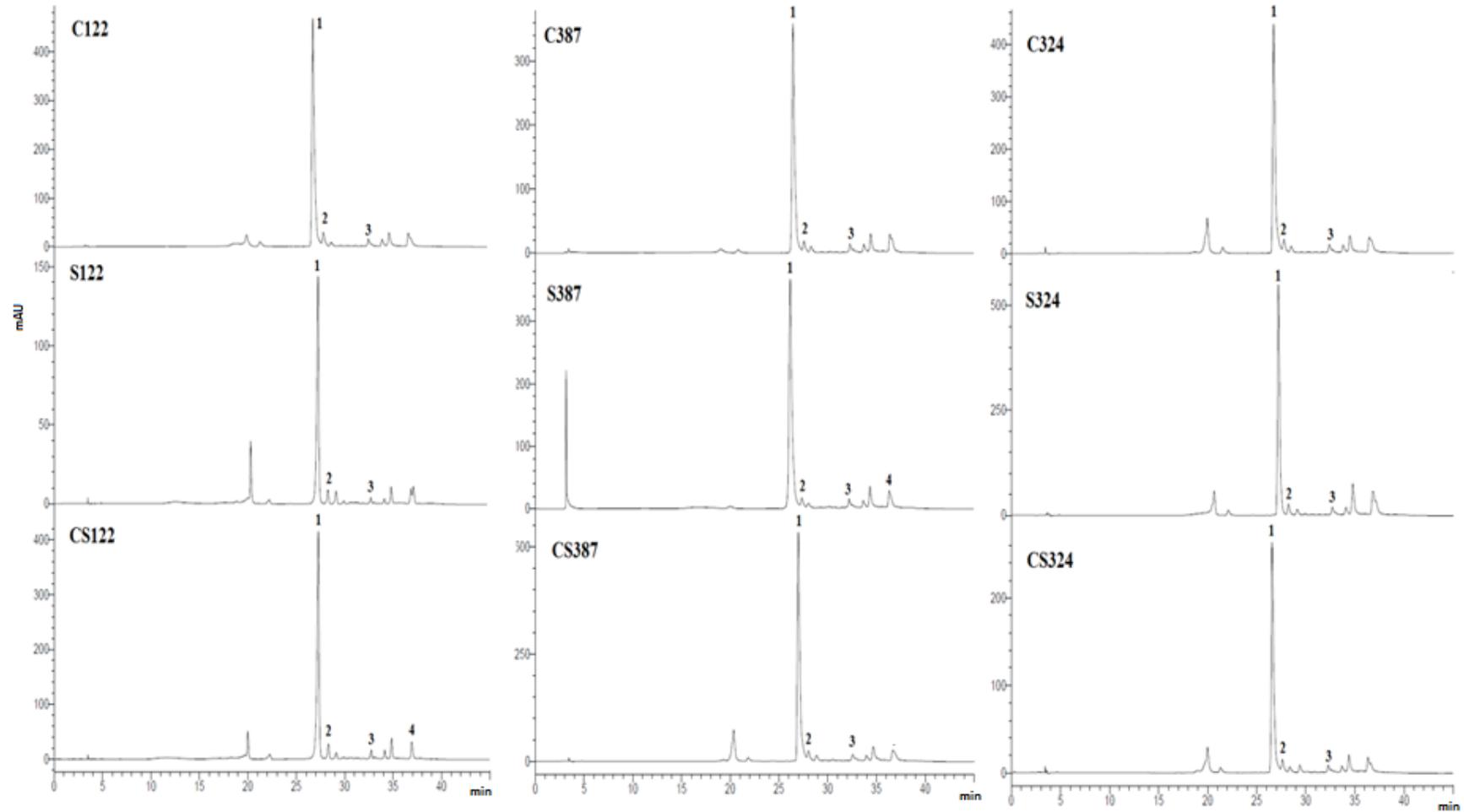
Os compostos fenólicos identificados nas amostras podem explicar a capacidade antioxidante dessas diante dos métodos aplicados nesse trabalho. Os resultados encontrados para inibição da peroxidação lipídica através da proteção a membrana são promissores (Figura 16) podendo também ser atribuídos à presença desses compostos. As interações com membranas lipídicas são eventos que podem mediar alguns efeitos biológicos e antioxidantes de flavonóides. Os flavonóides são geralmente moléculas anfífilas que possuem características físicas particulares de acordo com os diferentes substituintes na sua estrutura química. Em geral, a nível celular eles podem interagir com os lípidos na superfície da bicamada (adsorção); e/ou inserir-se na bicamada e interagir com as cadeias hidrofóbicas de lípidos (GALLEANO et al., 2010).

**Tabela 16.** Compostos fenólicos encontrados em amostras de girassol de diferentes regiões.

<b>Amostras</b>	<b>Concentração</b>	<b>Região</b>	<b>Compostos identificados</b>	<b>Referências</b>
Extrato metonolico de casca da semente de girassol	2 mg mL <sup>-1</sup>	Ítalia	<b>Ácido clorogênico</b> , ácido caféico, ácido protocatecuico, ácido siríngico, ácido ferúlico e ácido cinâmico	De Leonardis et al., 2005
Extrato metanólico de casca e semente de girassol	0,25 mg mL <sup>-1</sup>	Alemanha	<b>Ácido 5-O-cafeoilquínico</b> , ácido 3-o-cafeoilquínico, ácido 4-O-cafeoilquínico, ácido caféico, ácido ferúlico, ácido 5-p-cumaroilquínico e ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico	Weisz et al., 2009
Extrato etanólico de casca e semente de girassol	15 mg mL <sup>-1</sup>	Sérvia	<b>Ácido clorogênico</b> , ácido caféico, ácido rosmarínico, miricetina e rutina	Žilić et al., 2010
Extrato etanólico de semente de girassol	0,2 g mL <sup>-1</sup>	República Checa	<b>Catequina, ácido gálico, ácido siríngico</b> , ácido cafeico e ácido ferúlico	Zahradníková et al., 2008
Extrato metanólico de semente de girassol	1 mg mL <sup>-1</sup>	Polônia	<b>Ácido 5-O-cafeoilquínico</b> , ácido ferúlico, ácido 5-p-cumaroilquínico e quercetina	Karamać et al., 2012

Fonte: AUTORA, 2016.

**Figura 17.** Composição fenólica de extratos metanólicos das farinhas determinada por análise de CLAE, 1) ácido clorogênico, 2) ácido caféico, 3) Ácido p-cumárico e 4) rutina.



Fonte: AUTORA, 2016.

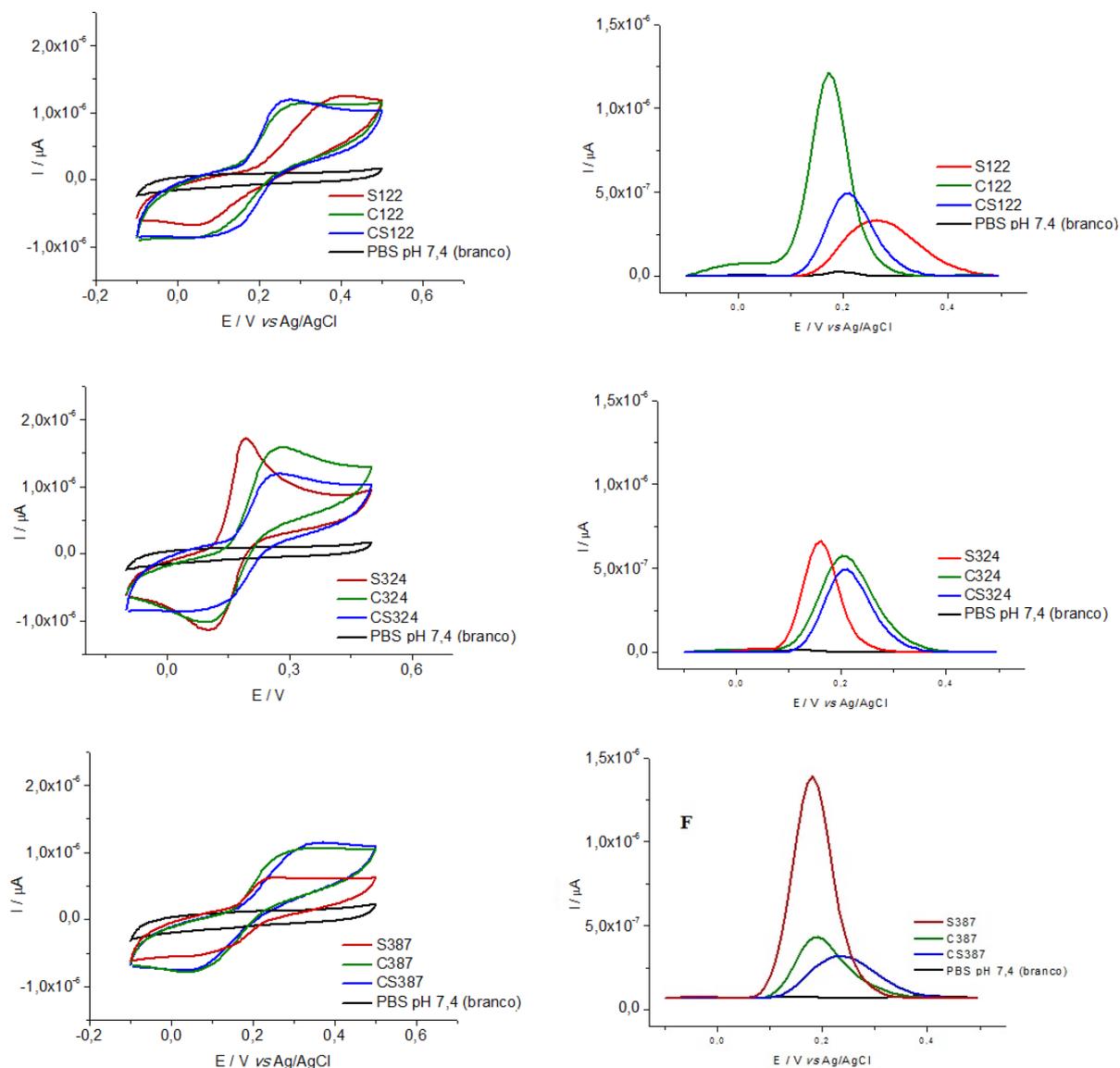
#### 4.5 Estudo Eletroquímico

As técnicas voltamétricas permitem correlacionar alguns parâmetros como potenciais de oxidação e intensidade de corrente com a capacidade antioxidante, logo, podem se mostrar mais seletivas e sensíveis que alguns métodos espectrométricos (ALVES et al., 2010). A Figura 18 apresenta os voltamogramas cíclicos e de pulso diferencial dos extratos.

Neste trabalho, os experimentos foram realizados em pH 7,4 por ser o pH próximo das condições fisiológicas (SOUZA et al., 2007). Em todos os voltamogramas cíclicos, é possível observar um sistema reversível ou quase-reversível, iniciado com a oxidação de uma espécie eletroativa na solução, com consequente aumento de corrente. Os produtos que foram gerados no sentido da varredura direta são então reduzidos na varredura inversa, gerando assim um sistema redox adicional, a depender da estabilidade do intermediário gerado, da velocidade da transferência de elétrons e do tipo de transporte de massa, sendo caracterizados como reversíveis, quae-reversíveis ou irreversíveis. Estes dados são corroborados nas leituras de VPD.

A partir desses métodos, é possível obter informações importantes como  $I_{pa}$  e  $I_{pc}$  (correntes de picos anódico e catódico, respectivamente) e  $E_{pa}$  e  $E_{pc}$  (potenciais de picos anódico e catódico, respectivamente). Com essas informações é possível correlacionar esses dados com a atividade antioxidante do extrato, pois quanto maior o valor de  $E_{pa}$ , menor é o poder doador de elétrons da espécie e, portanto, menor sua ação antioxidante (ALVES et al., 2010). Sendo assim, a Tabela 17, apresenta os valores de  $E_{pa}$  e  $E_{pc}$  para os extratos obtidos a partir do girassol.

**Figura 18.** Voltamogramas dos extratos das farinhas de girassol em solução tampão fosfato, pH 7,4. Velocidade de varredura  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . (A) VC dos extratos do cultivar EMBRAPA 122, (B) VC dos extratos do cultivar BRS 324, (C) VC dos extratos do cultivar BRS 387, (D) VPD dos extratos do cultivar EMBRAPA 122, (E) VPD dos extratos do cultivar BRS 324 e (F) VPD dos extratos do cultivar BRS 387.



Fonte: AUTORA, 2016.

Os extratos S324 e S387 destacam-se dentre os demais, sendo os primeiros com menor valor de  $E_{pa}$ . Os extratos S122 e CS387, apresentam maior valor de  $E_{pa}$ , logo, menor poder doador de elétrons.

Estudo realizado através da voltametria cíclica, com eletrodos de carbono vítreo em em solução tampão fosfato, pH 7,4 e velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  do ácido clorogênico, evidenciou a oxidação da molécula em potencial de 268 mV, valor semelhante aos dos extratos estudados, com característica também reversível

ou quase-reversível. Esse fator refere-se à oxidação da porção *o*-catecólica da molécula, como proposto por Namazian e Zare (2005) e descrito na Figura 19, envolvendo a remoção de 2 elétrons ( $e^-$ ) e dois prótons ( $H^+$ ), gerando a quinona correspondente.

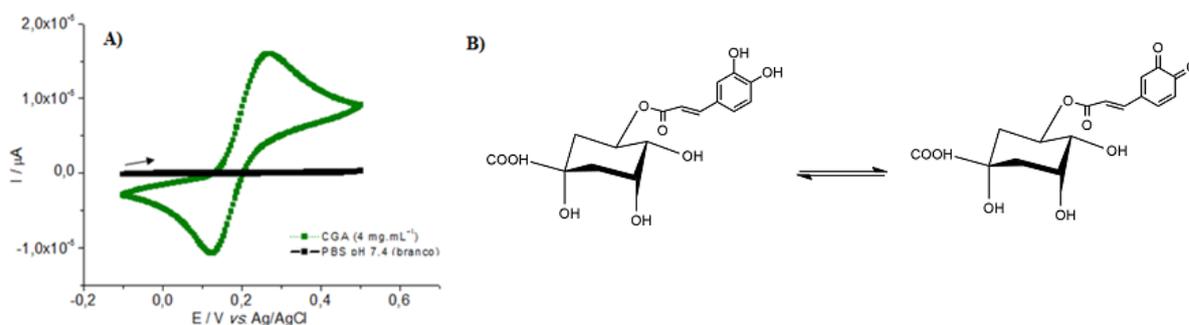
**Tabela 17.** Potenciais de picos anódicos e catódicos para os extratos estudados.

<b>Extrato</b>	<b>E<sub>pa</sub> (mV)</b>	<b>E<sub>pc</sub> (mV)</b>
<b>S387</b>	235	111
<b>C387</b>	296	60
<b>CS387</b>	356	63
<b>S324</b>	190	111
<b>C324</b>	272	108
<b>CS324</b>	281	114
<b>S122</b>	387	56
<b>C122</b>	274	115
<b>CS122</b>	262	129
<b>Ácido Clorogênico</b>	268	123

Fonte: AUTORA, 2016.

Dessa forma, a presença de picos semelhantes aos do ácido clorogênico sugere a possível indicação que esse compostos eletroativos com sistema reversível ou quase-revesível presente em grandes quantidades nos extratos de semente e casca de girassol, tenha mascarado os demais constituintes das amostras, visto que, segundo os dados de CLAE (Figura 17), esse foi ácido mais abundante nos extratos. A presença de outros ácidos fenólicos que, segundo Yakovleva e colaboradores (2007), apresentam potencial anódico inferior a 400 mV, como o ácido caféico, não pode ser descartada.

**Figura 19.** A) Voltamograma cíclico do ácido clorogênico (CGA) ( $10^{-3}$  M) em solução tampão fosfato, pH 7,4, ECV. Velocidade de varredura  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . B) Mecanismo proposto para a oxidação de CGA.



Fonte: AUTORA, 2016. Adaptado de NAMAZIAN e ZARE, 2005.

#### 4.6 Determinação da composição inorgânica

Os elementos que normalmente são determinados nas sementes de girassol podem ser divididos em macronutrientes ou elementos principais constituído por Ca, K, S e P, esses fazem parte de sistemas enzimáticos e moléculas importantes, são necessários em grandes quantidades e tem função estrutural. O grupo dos micronutrientes é composto por Cu, Fe, Mn, Ni, Sr e Zn (CASTRO et al., 1996).

As concentrações de elementos selecionados nas amostras de girassol foram determinadas com desvios padrão em torno dos valores médios, essas são apresentadas na Tabela 18. A determinação dos elementos foi realizada nas amostras após digestão assistida por microondas.

A menor concentração foi estabelecida para o oligoelemento estrôncio, com valor médio entre  $0,00 - 3,34 \text{ mg kg}^{-1}$  em todas as amostras, assim como para o níquel ( $0,00 - 6,15 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Este último elemento também foi encontrado em sementes de girassol da Turquia estudadas por Kafaoglu e colaboradores (2016), com valores superiores desse micronutriente ( $5535 \pm 85 \text{ mg kg}^{-1}$ ) importante no crescimento, metabolismo, envelhecimento e absorção de ferro pelas plantas.

Os valores encontrados para os macronutrientes P, S, Ca e K corroboraram com as quantidades encontradas em outros estudos, como é o caso das pesquisas realizadas por Moreda-Piñeiro e colaboradores (2016), onde sementes de girassol da Espanha apresentaram concentração de  $73,4 \pm 53.6 \text{ mg kg}^{-1}$  para cálcio,  $857,9 \pm$

467 mg kg<sup>-1</sup> para o potássio e 761,9 ± 192 mg kg<sup>-1</sup> para o fósforo. Os altos valores desses minerais se justificam por eles serem os mais abundantes em solo. Esses metais, necessários em grande quantidade para o organismo humano, são fornecidos ao solo a partir de adubos e fertilizantes, o que acentua sua concentração (CASTRO et al., 1996). O ferro é um elemento de grande importância tanto para o desenvolvimento da planta, como no organismo humano, desempenhando papel fisiológico em vários eventos celulares. Ressalta-se o seu envolvimento na reação de Fenton com o peróxido de hidrogênio e geração do radical hidroxila, influenciando assim a velocidade da reação. Seus valores para as amostras de girassol variaram entre 22,0 – 117,0 mg kg<sup>-1</sup>.

**Tabela 18.** Concentração dos metais nas amostras de girassol.

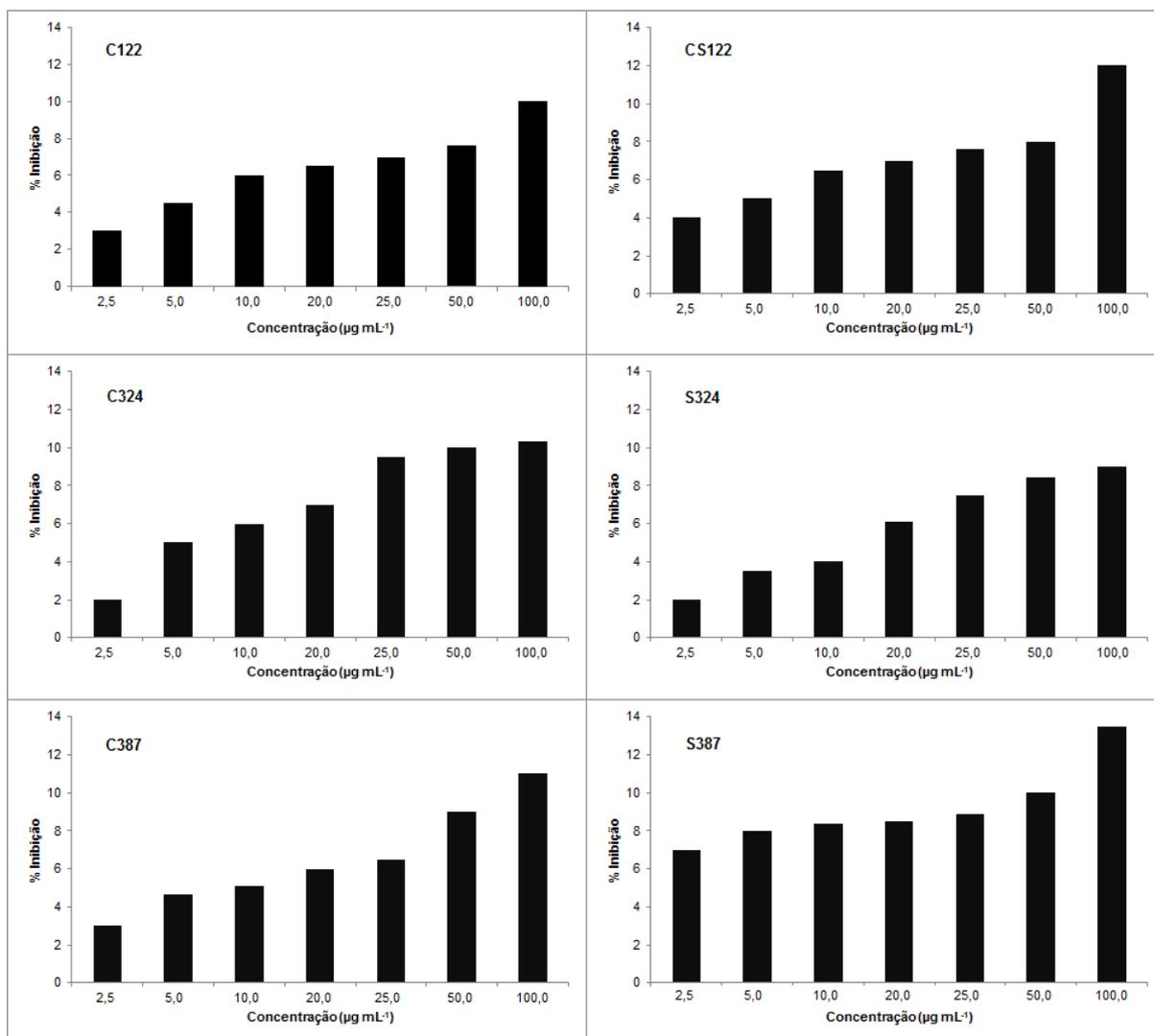
Analitos (mg kg <sup>-1</sup> )	S387	C387	CS387	S324	C324	CS324	S122	C122	CS122
P	154	149	159	187	230	234	151	290	221
S	75,4	95,4	85,8	96,9	145	157	59,6	198	126
Cl	5,74	67,9	12,4	18,6	64,0	25,5	3,09	41,2	12,0
K	753	1648	896	1093	2093	1615	604	2032	1217
Ca	216	541	315	295	581	493	154	602	317
Mn	14,4	10,5	14,3	16,9	19,3	21,7	12,4	16,2	16,3
Fe	22,0	27,5	37,1	27,0	74,1	26,8	24,8	117	47,0
Ni	0,70	0,00	1,23	0,99	6,15	1,40	0,42	10,3	1,91
Cu	9,67	9,67	10,5	9,73	11,0	10,3	9,50	11,6	10,4
Zn	36,9	23,3	27,9	31,2	28,7	33,3	35,2	31,9	38,0
Sr	0,00	3,34	0,91	0,39	2,89	2,03	0,42	3,12	0,79

Fonte: AUTORA, 2016.

#### 4.7 Determinação da atividade antiglicante

A atividade antiglicante dos extratos, estudada através da porcentagem de inibição da formação de produtos de glicação avançada, foi obtida e os resultados são mostrados na Figura 20.

**Figura 20.** Porcentagem de inibição da formação de AGEs dos extratos de girassol.



Dos 9 extratos estudados nesse trabalho, 3 deles (CS387, CS324 e S122) não apresentaram porcentagem de inibição. Os demais, de modo geral, revelaram porcentagem inferior a 14%, sendo o extrato S324 o que apresentou a menor porcentagem de inibição na concentração máxima de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Os extratos C324 e C122 apresentaram perfis de inibição semelhantes, atingindo, ao final da última concentração, 10,3% e 10,0%, respectivamente. O extrato S387 apresentou a maior porcentagem de inibição (13,5%) na concentração de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Esse mesmo extrato apresentou ainda, a maior porcentagem de inibição (7,0%) para a menor concentração utilizada (2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Estes valores são indicativos de ausência de atividade antiglicante. Não são encontrados na literatura estudos envolvendo a atividade antiglicante de sementes e cascas de girassol para possíveis comparações.

#### 4.8 Correlação linear de Pearson

De acordo com os resultados obtidos foi realizado um estudo de correlação entre os resultados CTFLA, CTF, FRAP, DPPH\*, Peroxidação Lipídica e os valores de concentração de ácido clorogênico encontrados por CLAE, nas amostras estudadas. A Tabela 19 mostra os resultados encontrados.

**Tabela 19.** Coeficientes de correlação linear de Pearson entre as variáveis CTFLA, CTF, FRAP, DPPH, Peroxidação Lipídica (PL), concentração de ácido clorogênico ([ACG]) e valores de  $E_{pa}$ .

	DPPH*	FRAP	CTFLA	CTF	[ACG]	PL	$E_{pa}$
<b>DPPH*</b>	1,0000						
<b>FRAP</b>	0,1601	1,0000					
<b>Flav</b>	0,0872	0,6452	1,0000				
<b>Folin</b>	0,1181	-0,2168	0,2491	1,0000			
<b>[ACG]</b>	0,6223	-0,5334	-0,6004	0,0295	1,0000		
<b>PL</b>	0,3613	0,6548	0,3517	0,1277	-0,0090	1,0000	
<b><math>E_{pa}</math></b>	-0,2229	0,3138	0,1521	-0,3646	-0,4511	-0,2700	1,0000

\* $p \leq 0,05$ . Fonte: AUTORA, 2016.

Diante dos resultados pode-se sugerir que o conteúdo total de flavonas e flavonóis esteja relacionado com a atividade FRAP, revelado através de uma correlação positiva (0,6452), sendo a maior correlação positiva entre as variáveis encontradas nesse trabalho.

É possível observar também uma boa correlação entre a concentração de ácido clorogênico com a atividade sequestradora do radical DPPH\* (0,6223), apontando que esse composto está envolvido na defesa antioxidante, principalmente porque ácidos fenólicos, como o ácido clorogênico e ácido cafeico, apresentam

característica de antioxidante comprovada (JESZKA-SKOWRON et al., 2016). Esse valor confirma os dados apresentados em diversos estudos, que mostram que a capacidade antioxidante é fortemente relacionada com o teor de compostos fenólicos totais presentes

Observa-se, ainda, uma correlação positiva significativa entre FRAP e peroxidação lipídica (0,6548). Esse valor é explicado pela ação catalisadora do ferro em reações de lipoperoxidação, ocorrendo a conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais altamente reativos (alcoxila e peroxila), que, por sua vez, iniciam nova cadeia de reações (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Ao passo que os valores de [ACG] se correlacionam negativamente com os dados de FRAP (-0,5334). Hynes e O'Coinceanainn (2004), sugerem que alguns ácido fenólicos como ácido clorogênico e ácido cafeico dificultam a liberação de ferro que está fortemente ligado a compostos de coordenação, como é o caso do complexo TPTZ. Um comportamento negativo também foi observado entre a concentração de ácido clorogênico e o teste de CTFLA (-0,6004), o que é esperado, visto que o composto não é caracterizado como um flavonol nem flavona.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os estudos realizados quanto ao conteúdo total de fenóis e de flavonas e flavonóis, pode-se afirmar que o extrato obtido da farinha da casca + semente do cultivar EMBRAPA 122 apresentou valores superiores aos demais extratos, o que indica maior concentração desses compostos.

Sobre a atividade sequestradora de radicais (ASR %) e redutora de ferro (FRAP), os extratos obtidos da semente e casca + semente (S324 e CS324) se destacaram com relação às demais, com valores superiores, inclusive aos de sementes dos demais cultivares. O extrato S324 ainda apresentou a menor concentração necessária para a inibição do radical DPPH<sup>•</sup> em 50% corroborando com o valor encontrado para a ASR.

Para os estudos de peroxidação lipídica *in vitro*, todos os extratos apresentaram bons resultados frente à inibição do radical peroxila (75%), com exceção dos extratos S122 e C324 que apresentaram as menores proteções, em torno de 60%, embora configure, ainda assim, uma boa proteção.

A avaliação dos compostos fenólicos por CLAE foi satisfatória, permitindo a realização de uma análise qualitativa e quantitativa, com a identificação inicial de 4 compostos.

Os resultados encontrados nos estudos eletroquímicos sugerem que a abundante presença de ácido clorogênico na amostra possa ter levado ao mascaramento dos demais compostos fenólicos existentes nas amostras e responsáveis pela atividade antioxidante.

A composição inorgânica das amostras de girassol revelam a presença de metais importantes principalmente na atividade antioxidante, como o ferro.

A atividade antiglicante, estudada a partir da porcentagem de inibição da formação de produtos de glicação avançada, revelou um percentual inferior a 18% entre os extratos estudados.

## **6 CONCLUSÕES**

As amostras de girassol estudadas neste trabalho apresentaram resultados promissores quanto à capacidade antioxidante e riqueza em compostos fenólicos biologicamente ativos, demonstrando assim o potencial uso dessas farinhas para fins nutracêuticos. No entanto ainda se faz necessário a realização de outros métodos tanto de avaliação da capacidade antioxidante, para determinação de “perfil antioxidante”, como para identificação adicional e quantificação de seus constituintes.

## 7 REFERÊNCIAS

ALAM, N.; BRISTI, N.J.; RAFIQUZZAMAN. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 143-152, 2013.

ALTUN, M.; CELIK, S.E.; GUCLU, K.; OZYUREK, M.; ERCAG, E.; APAK, R. Total antioxidant capacity and phenolic contents of Turkish hazelnut (*Corylus Avellana L.*) kernels and oils. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, p. 53–61, 2013.

ALVES, L.D.S.; ROLIM, L.A.; FONTES, D.A.F.; ROLIM-NETO, P.J.; LA ROCA, M.F.; SOARES SOBRINHO, J.L. Desenvolvimento de método analítico para quantificação do efavirenz por espectrofotometria no uv-vis. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1967-1972, 2010.

ANDRADE, M.N.S.C. **Desenvolvimento de um biossensor para ácido láctico a base de nanomateriais eletródicos**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2013.

ANWAR, F.; PRZYBYLSKI, R. Effect of solvents extraction on total phenolic and antioxidant activity of extracts from flaxseed (*Linum usitatissimum L.*). **Acta scientiarum Polonorum / Technologia alimentaria**, v. 11, n. 3, p. 293-301, 2012.

ARCHELA, E.; DALL'ANTONIA, L.H. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 34, n. 2, p. 193-210, 2013.

BARBOSA, J.H.P.; SOUZA, I.T.; SANTANA, A.E.G.; GOULART, M.O.F. A determinação dos produtos avançados de glicação (AGES) e de lipoxidação (ALES) em alimentos e em sistemas biológicos: avanços, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 39, n. 5, p. 608-620, 2016.

BARBOSA, J.H.P.; Oliveira, S.L.; Tojal e Seara, L. O Papel dos Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs) no Desencadeamento das Complicações Vasculares do Diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 56, n. 6, p. 940-950, 2008.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, n. 23, v. 4, p. 629-643, 2010.

BARHÉ, T.A.; TCHOUYA, G.R. F. Comparative study of the anti-oxidant activity of the total polyphenols extracted from *Hibiscus Sabdariffa L.*, *Glycine max L. Merr.*, yellow tea and red wine through reaction with DPPH free radicals. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2016.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARROSO, M. F.; ÁLVAREZ, N.L.S.; MATOS, D.C.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Towards a reliable technology for antioxidant capacity and oxidative damage evaluation: Electrochemical (bio)sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 30, p. 1–12, 2011.

BATISTA, C.; BARROS, L.; CARVALHO, A.M.; FERREIRA, I.C.F.R. Nutritional and nutraceutical potential of rape (*Brassica napus* L. var. *napus*) and “tronchuda” cabbage (*Brassica oleraceae* L. var. *costata*) inflorescences. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p.1208–1214, 2011.

BEAULIEU, L.-P.; HARRIS, C.S.; SALEEM, A.; CUERRIER, A.; HADDAD, P.S.; MARTINEAU, L.C.; BENNETT, S.A.L.; ARNASON, J.T. Inhibitory effect of the cree traditional medicine wiishichimanaanh (*Vaccinium vitis-idaea*) on advanced glycation endproduct formation: identification of active principles. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 741–747, 2009.

BENZIE, I.E.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, n. 239, p. 70-76, 1996.

BLAINSKI, A.; LOPES, G.C. MELLO, J.C.P. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. **Molecules**, v. 18, p. 6852-6865, 2013.

BRIGANTE, G.P. **Deterioração de sementes de girassol durante o armazenamento**. 2013. 206 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia - Produção Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

BORGES, L.L.; LÚCIO, T.C.; GIL, E.S.; BARBOSA, E.F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopedia Biosfera**, v. 7, p. 1-20, 2011.

BOUAYED, J., BOHN, T. Exogenous antioxidants - double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, p. 228-237, 2010.

CAMATARI, F.O.S.; LOPES, K.H.; VALENTIM, I.B.; XAVIER, J.A.; COSTA, J.G.; SANTANA, A.E.G.; GOULART, M.O.F. Antioxidant potential of flours from cereals, tubers, beans and seeds chemical profile of curcuma longa flour. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, v. 6, v. 2, p. 1-8, 2016.

CARDOZO, L; MAFRA, D. Alimentação Pode Levar a Benefícios para o Sistema Cardiovascular: Fato ou Ficção?. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 28, n. 2, p. 87-88, 2015.

CAROCHO, M; FERREIRA, I.C.R.F. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

- CARTEA, M.E.; FRANCISCO, M.; SOENGAS, P.; VELASCO, P. Phenolic Compounds in Brassica Vegetables. **Molecules**, v. 16, p. 251-280, 2011.
- CASTRO, C.; CASTIGLIONI, V.B.R.; BALLA, A. **A cultura do girassol: tecnologia de produção**. 2ª ed. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1996.
- CASTRO, C.; FARIAS, J.R.B. **Ecofisiologia vegetal**. In: LEITE, R.M.V.B.C.; BRIGHNTI, A.M.; CASTRO, C. (Ed.). **Girassol no Brasil**. Londrina: Embrapa Soja, p.163-164, 2005.
- CATANIA, A.S.; BARROS, C.R.; FERREIRA, S.R. Vitamins and minerals with antioxidant properties and cardiometabolic risk: controversies and perspectives. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 550-559, 2009.
- CHAVARRIA, D. F.; **Desenvolvimento de Novos Antioxidantes Lipofílicos como Solução Terapêutica para Doenças Neurodegenerativas**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em Bioquímica, 2014.
- CHAVES, E.S.; SANTOS, E.J.; ARAUJO, R.G.O.; OLIVEIRA, J.V.; FRESCURA, V.L.A.; CURTIUS, A.J. Metals and phosphorus determination in vegetable seeds used in the production of biodiesel by ICP OES and ICP-MS. **Microchemical Journal**, 96, 71–76, 2010.
- Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira: grãos**. Brasília, 2011.
- DAIUTO, E.R.; TREMOCOLDI, M.A.; VIEITES, R.L.; ALENCAR, S.M.; Composição química e atividade antioxidante da polpa e resíduos de abacate 'Hass'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, n. 2, p. 417-424, 2014.
- DALL´AGNOL, A.; VIEIRA, O. V.; LEITE, R. M. V. B. C. **Origem e história do girassol**. In: LEITE, R. M. V. B. C.; BRIGHNTI, A. M.; CASTRO, C. de. (ed.). **Girassol no Brasil**. Londrina: Embrapa Soja, p.163-164, 2005.
- DE LEONARDIS, A.; MACCIOLA, V.; DI DOMENICO, N. A first pilot study to produce a food antioxidant from sunflower seed shells (*Helianthus annuus*). **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, p. 220–227, 2005.
- DEKDOUK, N.; MALAFRONTI, N.; RUSSO, D. Phenolic compounds from *Olea europaea* L. possess antioxidant activity and inhibit carbohydrate metabolizing enzymes in vitro. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.
- Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - USDA. **USDA agricultural baseline projections to 2016**. Disponível em < <http://usda.mannlib.cornel.edu/datasets/Baseline>> Acesso em 01 de ago. 2016.

DOSS, V.A.; THANGAVEL, K.P. Antioxidant and antimicrobial activity using different extracts of *Anacardium occidentale* L. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, v. 2, n. 3, p. 436–443, 2011.

DRUMMEN, G.P.C.; VAN LIEBERGEN, L.C.; OP DEN KAMP, J.A. POST, J.A. C11-Bodipy<sup>581/591</sup>, an oxidation-sensitive fluorescent lipidperoxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 4, p. 473-490, 2002.

EVERETTE, J.D.; BRYANT, Q.M.; GREEN, A.M.; ABBEY, Y.A.; WANGILA, G.W.; WALKER, R.B. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, p. 8139-8144, 2010.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, F.R. **Emprego de técnicas avançadas em estudos bioeletroquímicos de substâncias de interesse biológico**. 2013. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Alagoas. Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia, 2013.

FOTI, M. C. Use and Abuse of the DPPH• Radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 8765–8776, 2015.

FONTOURA, J.B. **Atividade antifúngica das flores de girassol (*Helianthus annuus*) contra cepas de *Sporothrix schenckii***. Dissertação (mestrado). Porto Alegre, 2010.

FRITZ, H., KENNEDY, D., FERGUSSON, D., FERNANDES, R., COOLEY, K., SEELY, A., SAGAR, S., WONG, R., SEELY, D. Selenium and lung cancer: a systematic review and meta analysis. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. 1-10, 2011.

FROES, R.E.S.; BORGES NETO, W.; BEINNER, M.A.; NASCENTE, C.C.; SILVA, J.B.B. determination of inorganic elements in teas using inductively coupled plasma optical emission spectrometry and classification with exploratory analysis. **Food Analytical Methods**, v. 7, p. 540–546, 2014.

FU, R.; ZHANG, Y.; GUO, Y.; LIU, F.; CHEN, F. Determination of phenolic contents and antioxidant activities of extracts of *Jatropha curcas* L. seeds hell, a by-product, a new source of natural antioxidante. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 265-270, 2014.

GALLEANO, M.; VERSTRAETEN, S.V.; OTEIZA P.I.; FRAGA, C.G. Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 501, p. 23-30, 2010.

GAMBARRA NETO, F.F. **Classificação de óleos vegetais utilizando voltametria de onda quadrada e métodos quimiométricos**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

GARAMBONE, E.; ROSA, G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 2, p. 229-235, 2008.

GIADA, M.D.L.R.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant capacity of the striped sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed extracts evaluated by three in vitro methods. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, n. 5, p. 395-401, 2009.

GIL, E.S.; COUTO, R.O. Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 3, p. 542-558, 2013.

GODMAN, M.; BOSTICK, R.M.; KUCUK, O.; JONES, D.P. Clinical trials of antioxidants as cancer prevention agents: past, present and future. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, p. 1068-1084, 2011.

GRANATO, D.; SANTOS, J.S.; MACIEL, L.G.; NUNES, D.S. Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 266-279, 2016.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. *The Lancet*, vol. 355, p. 1179-1180, 2000.

HYNES, M.J.; O'COINCEANAINN, M. The kinetics and mechanisms of reactions of iron(III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, p. 1457-1464, 2004.

HOSSEINI, M.K.; POWELL, A.A.; BINGHAM, I.J. Comparison of the seed germination and early seedling growth of soybean in saline conditions. **Seed Science Research**, v. 12, n. 3, p. 165-172, 2002.

HUANG, D.; BOXIN, O.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

JAFARI, S.; KHAZAEI, J.; ARABHOSSEINI, A.; MASSAH, J.; KHOSHTAGHAZA, M-H. Study on mechanical properties of sunflower seeds. **Food Science and Technology**, v. 14, n. 1, p. 06, 2011.

JESZKA-SKOWRON, M.; STANISZ, E.; PAZ DE PENA, M. Relationship between antioxidant capacity, chlorogenic acids and elemental composition of green coffee. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 243-250, 2016.

JOHN, J.A.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Journal of functional foods**, v. 2, p. 196-209, 2010.

JUNTACHOTE, T.; BERGHOFER, E.; SIEBENHANDL, S.; BAUE, F. Antioxidative effect of added dried Holy basil and its ethanolic extracts on susceptibility of cooked ground pork to lipid oxidation. **Food Chemistry**, v. 100, p. 129–135, 2007.

KAFAOGLU, B; FISHER, A.; HILL, S.; KARA, D. Determination and evaluation of element bioaccessibility in some nuts and seeds by in-vitro gastro-intestinal method. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 45, p. 58-65, 2016.

KAMAL, J. Impact of allelopathy of sunflower (*Helianthus annuus L.*) roots extract on physiology of wheat (*Triticum aestivum L.*). **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 65, p. 14465-14477, 2011.

KARAMAĆ, M.; KOSINSKA, A.; ESTRELLA, I.; HERNANDEZ, T.; Duenas, M. Antioxidant activity of phenolic compounds identified in sunflower seeds. **European Food Research and Technology**, v. 235, p. 221–230, 2012.

KAROLIN, J.; JOHANSSON, L.B.; STRANDBERG, L.; NY, T. Fluorescence and Absorption Spectroscopic Properties of Dipyrrometheneboron Difluoride (BODIPY) Derivatives in Liquids, Lipid Membranes, and Proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, p. 7801-7806, 1994.

KESER, S.; DEMIR, E.; YILMAZ, O. Phytochemicals and antioxidant activity of the almond kernel (*Prunus dulcis Mill.*) from Turkel. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 36, n.3, 2014.

KIM, J.; JEONG, I-H.; KIM, C-S.; LEE, Y.M.; KIM, J.M.; KIM, J.S. Chlorogenic acid inhibits the formation of advanced glycation end products and associated protein cross-linking. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 3, p. 495-500, 2011.

KLAJN, V. M.; GUTKOSKI, L. C.; FIORENTINI, Â. M.; ELIAS, M. C. Compostos antioxidantes em aveia. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 18, n. 4, 2012.

KOLEVA, L.I.; VAN BEEK, T.A.; LINSSEN, J.P.H.; GROOT, A.; EVSTATIEVA, L.N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, v.13, p. 8-17, 2002.

KOMAROVA, N.I.; ROGACHEV, A.D.; CHERNYAK, E.I.; MOROZOV, S.V.; FOMENKO, V.V.; SALAKHUTDINOV, N.F. Quantitative HPLC determination of main flavonoid content of *Rhododendron adamsii* leaves and stems. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 27, 2009.

KOREKAR, G.; STOB DAN, T.; SINGH, H.; CHAURASIA, O. P.; SINGH, S.B. Phenolic content and antioxidant capacity of various solvent extracts from seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) fruit pulp, seeds, leaves and stem bark. **Acta Alimentaria**, v. 40, p. 449-458, 2011.

KRAUTWALD, M.; MÜNCH, G. Advanced glycation end products as biomarkers and gerontotoxins – A basis to explore methylglyoxal-lowering agents for Alzheimer's disease?. **Experimental Gerontology**, v. 45, p. 744–751, 2010.

KUBOLA, J.; SIRIAMORNUN, S.; MEESO, N. Phytochemicals, vitamin C and sugar content of Thai wild fruits. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 972-981, 2011.

LAGUERRE, M.; DECKER, E.A.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Methods for evaluating the potency and efficacy of antioxidants. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v.13, p. 518–525, 2010.

LANÇAS, F. M. Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, 2009

LOBO, V.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals and functional foods: impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v.4, p.118–126, 2010.

LOPES JÚNIOR, C.A.; OLIVEIRA, S.R.; MAZZAFERA, P.; ARRUDA, M.A.Z. Expanding the information about the influence of cadmium on the metabolism of sunflowers: Evaluation of total, bioavailable, and bioaccessible content and metallo-biomolecules in sunflower seeds. **Environmental and Experimental Botany**, v. 125, p. 87–97, 2016.

LORENZO, J.M.; MUNEKATA, P.E.S. Phenolic compounds of green tea: Health benefits and technological application in food. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 6, p. 709-719, 2016.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The systematic identification of flavonoids**. Springer: Berlin, p.51-52, 1970.

MACDONALD, M.L.; MURRAY, I.V.J.; AXELSEN, P.H. Mass spectrometric analysis demonstrates that BODIPY 581/591 C11 overestimates and inhibits oxidative lipid damage. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, p. 1392-1397, 2007.

MACDONALD, R.C.; MACDONALD, R.I.; MENCO, B.P.; TAKESHITA, K.; SUBBARAO, N.K.; HU, L.R.L. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1061, n. 2, p. 297-303, 1991.

MACÍAS, F.A.; FERNÁNDEZ, A.; VARELA, R.M.; MOLINILLO, F.M.G.; TORRES, A.; ALVES, A.L.C.A. Sesquiterpene Lactones as Allelochemicals. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 795-800, 2006.

MAISARAH, A.M.; NURUL AMIRA, B.; ASMAH, R.; FAUZIAH, O. Antioxidant analysis of different parts of *Carica papaya*. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 3, p. 1043-1048, 2013.

MARCUCCI, M.C.; WOISKY R.G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Química Nova**, v. 46, p. 3-9, 1998.

MARINELI, R.S.; MORAES, É.A.; LENQUISTE, S.A.; GODOY, A.T.; EBERLIN, M.N.; JÚNIOR, M.R.M. Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia

seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). **Food Science and Technology**, v. 59, p. 1304–1310, 2014.

MARQUES, G.S.; MONTEIRO, R.P.M.; LEÃO, W.F.; LYRA, M.A.M.; PEIXOTO, M.S.; ROLIM-NETO, P.J.; XAVIER, H.S.; SOARES, L.A.L. Evaluation of procedures for spectrophotometric quantification of total flavonoids in leaves of *Bauhinia forficata*. **Química Nova**, v. 35, p. 517–522, 2012.

MARTORANA, M.; ARCORACI, T.; RIZZA, L.; CRISTANI, M.; BONINA, F.P.; SAIJA, A.; TROMBETTA, D.; TOMAINO, A. In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effect of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seed and skin extracts. **Fitoterapia**, v. 85, p. 41-48, 2013.

MELO, I.S.V.; SANTOS, A.F.; LEMOS, T.L.G.; GOULART, M.O.F.; SANTANA, A.E.G. Oncocalyxone A functions as an anti-glycation agent in vitro. **PLoS One** 10, p. 1–8, 2015.

MENDIL, D.; ULUÖZLÜ, O. D.; TÜZEN, M.; SOYLAK, M. Investigation of the levels of some element in edible oil samples produced in Turkey by atomic absorption spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 165, p.724-728, 2009.

MERCALI, C.A. **Estudo do perfil fitoquímico, nutricional e atividades biológicas do broto de girassol** (*Helianthus annuus* L.). Dissertação (mestrado). Uritiba, 2011.

MIN, B.; GU, L.; MCCLUNG, A.M.; BERGMAN, C.J.; CHEN, M.H. Free and bound total phenolic concentrations, antioxidant capacities, and profiles of proanthocyanidins and anthocyanins in whole grain rice (*Oryza sativa* L.) of different bran colours. **Food Chemistry**, v. 133, p. 715–722, 2012.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N.K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, p. 1036-1043, 2012.

MOREDA-PIÑEIRO, J.; HERBELLO-HERMELO, P.; DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, R.; BERMEJO-BARRERA, P.; MOREDA-PIÑEIRO, A. Bioavailability assessment of essential and toxic metals in edible nuts and seeds. **Food Chemistry**, v. 205, p. 146–154, 2016.

MUHAMMAD, S.A.; BILBIS, L.S.; SAIDU, Y.; ADAMU, Y. Effect of antioxidant mineral elements supplementation in the treatment of hypertension in albino rats. **Oxidat Med and Cellul Long**, id. 134723, p. 1-8, 2012.

MUJIĆ, I.; ŠERTOVIĆ, E.; JOKIĆ, S.; SARIĆ, Z.; ALIBABIĆ, V.; VIDOVIĆ, S.; ŽIVKOVIĆ, J. Isoflavone content and antioxidant properties of soybean seeds. **Journal of Food Science and Technology**, v. 3, p. 16–20, 2011.

NAMAZIAN, M.; ZARE, H.R. Electrochemistry of chlorogenic acid: experimental and theoretical studies. **Electrochimica Acta**, v. 50, p. 4350–4355, 2005.

NASKAR, S.; MAZUMDER, U.K.; PRAMANIK, G.; BALA, A.; HALDAR, P.K.; ISLAM, A.; GUPTA, M. Comparative in vitro antioxidant activity of different parts of *Cocos Nucifera* (Linn.) on reactive oxygen and nitrogen species. **Internation Journal of Pharmacy and Pharmaceurical Sciences**, v. 3, p. 104-107, 2011.

NEGI, A.S.; LUQMAN, S.; SRIVASTAVA, S.; KRISHNA, V.; GUPTA, N.; DAROKAR, M.P. Antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* fruit extracts. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, p. 669-673, 2011.

NISAR, M.; HUSSAIN, S.; NAUSHEEN; KHAN, N.; SIDDIQUI, M.F.. Chemical composition of open pollinated and hybrid population of sunflower (*Helianthus annuus L.*). **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, n. 1, p. 157-163, 2011.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 503-515, 2010.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, M.B.S; VALENTIM, I.B.; VASCONCELOS, C.C.; OMENA, C.M.B.; BECHARA, E.J.H.; COSTA, J.G.; FREITAS, M.L.; SANT'ANA, A.E.G.; GOULART, M.O.F. *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) Husk Fiber Ethanolic Extract: Antioxidant Capacity and Electrochemical Investigation. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 16, n. 1, 2013.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: chacterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v.74, p.10-36, 2015.

OTHMAN, B.S.; KATSUNO, N.; KANAMARU, Y.; YABE, T. Water-soluble extracts from defatted sesame seed flour show antioxidant activity *in vitro*. **Food Chem**, v. 175, p. 306-314, 2015.

OZYUREK, M.; GUCLU, K.; TUTEM, E.; BASKAN, K.S.; ERÇAG, E.; CELIK S. E.; BAKI, S.; YILDIZ, L.; KARAMAN, S.; APAK, R. A comprehensive review of CUPRAC methodology. **Analytical Methods**, v. 3, p. 2439-53, 2011.

PALANISAMY, U.; LING, L. T.; MANAHARAN, T.; APPLETON, D. Rapid isolation of geraniin from *Nephelium lappaceum* rind waste and its anti-hyperglycemic activity. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 21-27, 2011.

PELEGRINI, B. **Girassol uma planta solar que das Américas conquistou o mundo**. São Paulo: Icone Editora LTDA, 1985

PEREIRA, G.P. **Compostos bioativos e atividade antioxidante em bananas (*Musa sp.*)**. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho Araraquara, São Paulo, 2012.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNEIRO, M.; DÍAZ-RUBIO, M.E.; SERRANO, J.; GOÑI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Updated methodology to determine

antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, v. 41, n. 3, p. 274-285, 2008.

PISOSCHI, A.M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUSOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N.; **Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids**, v. 82, p. 513-523, 2011.

PYTEL, R.F.; SILVA, L.V.N.; NUNES, A.S.; Estudo in vivo de atividade anti-radicalar por quantificação de peróxidos cutâneos. **Anais Brasileiros de Dermatologia.**, v. 80, p. S323-S328, 2005.

QUIDEAU, A.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSÉGU, L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, p. 586–621, 2011.

RAMOS-ESCUADERO, F.; MUÑOZ, A. M.; ALVARADO-ORTÍZ, C.; ALVARADO, Á.; YÁÑEZ, J. A. Purple corn (*Zea mays L.*) phenolic compounds profile and its assessment as an agent against oxidative stress in isolated mouse organs. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, p. 206–215, 2012.

REDDY, V.P.; BEYAZ, A. Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 13, p. 646-654, 2006.

ROMA, J.C.; SACCARO JUNIOR, N.L.; MATION, L.F.; PAULSEN, S.S.; VASCONCELLOS, P.G. A economia de ecossistemas e da biodiversidade no brasil (TEEB-BRASIL): Análise de lacunas. Texto para discussão. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – IPEA**. Rio de Janeiro, 2013.

SÁ, P.S.; GUIMARAES, A.L.; OLIVEIRA, A.P.; SIQUEIRA FILHO, J.A., FONTANA, A.P.; DAMASCENO, P.K.F.; BRANCO, C.R.C.; BRANCO, A.; ALMEIDA, J.R.G.S. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 561-566, 2012.

SEBEI, K.; GNOUMA, A.; HERCHI, W.; SAKOUHI, F.; BOUKHCHINA, S. Lipids, proteins, phenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of seeds of peanuts (*Arachis hypogaea l*) cultivated in Tunisia. **Biological Research**, v. 46, n. 3, p. 257-63, 2013.

SILVA, A.P.S.; CERQUEIRA, G.S.; NUNES, L.C.C.; FREITAS, R.M. Effects of an aqueous extract of *Orbignya phalerata* Mart on locomotor activity and motor coordination in mice and as antioxidant in vitro. **Pharmazie**, v. 67, p. 260–263, 2012.

SILVA, J.J.D.L. **Ações do ácido caurenóico e da l-arginina sobre o estresse oxidativo e a inflamação em retalhos cutâneos randomizados em ratos.** Tese (Doutorado em Cirurgia), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

SILVEIRA, L.R. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 6, p. 812-822, 2004.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenol and other oxidação substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-177, 1999.

SITI, H.N.; KAMISAH, Y.; KAMSIAN, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). **Vascular Pharmacology**, v. 71, p. 40–56, 2015.

SOCHOR, J., DOBES, J., KRYSSTOFOVA, O., RUTTKAY-NEDECKY, B. Electrochemistry as a Tool for Studying Antioxidant Properties. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8, p. 8464–8489, 2013.

SOUZA, A.C.P. **Extração de compostos fenólicos de subprodutos do processamento de sementes de girassol.** (Trabalho de Conclusão de Curso). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

SOUZA, J.; FREITAS, Z. M. F. STORPIRTIS, S. Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, 2007.

STERN, D.M.; YAN, S.D.; YAN, S.F.; SCHMIDT, A.M. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes. Ageing research reviews, v. 1, n. 1, p. 1-15, 2002.

TAUCHEN, J.; BORTL, L.; HUML, L.; MIKSATKIVA, P.; DOSKOCIL, I.; MARSIK, P.; VILLEGAS, P. P. P.; FLORES, Y. B.; DAMME, P. V.; LOJKA, B.; HAVLIK, J.; LAPCIK, O.; KOKOSKA, L. Phenolic composition, antioxidant and anti-proliferative activities of edible and medicinal plants from the Peruvian Amazon. **Revista Brasileira de farmacognosia**, 2016.

TEXEIRA, J.; GASPAR, A.; GARRIDO, M.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. **BioMed Research International**. Article ID 251754, p. 11, 2013.

THOMAZ, A.M.A.U. **Avaliação das potencialidades biotecnológicas da semente de goiaba (Psidium guajava L.).** Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

URIBARRI, J.; GOODMAN, S.; CAI, W.; CHWN, X.; PYZIK, R.; YONG, A.; STRIKER, G.E.; VLASSARA, H. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 110, n. 6, p. 911-916, 2010.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44–84, 2007.

VELIOGLU, Y.S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B.D. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4113-4117, 1998.

Wafa, G.; AMADOU, D.; LARBI, K.M.; HÉLA, E.F. O. Larvicidal activity, phytochemical composition, and antioxidant properties of different part of five populations of *Ricinus communis* L. **Industrial Crops and Products**, v. 56, p. 43-51, 2014.

WALL, M.M. Functional lipid characteristics, oxidative stability, and antioxidant activity of macadamia nut (*Macadamia integrifolia*) cultivars. **Food Chem**, v. 121, p. 1103–1108, 2010.

WEISZ, G.M.; KAMMERER, D.R.; CARLE, R. Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MS. **Food Chemistry**, v. 115, p. 758–765, 2009.

YADAV, S.; KUMAR, A. Antioxidant activity of free and bound phenolic in *Curcuma longa*. **Internation Journal of Phytomedicine**, v. 5, p. 58-61, 2013.

YAKOVLEVA, K.E.; KURZEEV, S.A.; STEPANOVA, E.V.; FEDOROVA, T.V.; KUZNETSOV, B.A.; KOROLEVA, O.V. Characterization of plant phenolic compounds by cyclic voltammetry. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 661-668, 2007.

YAMAGISHI, S.; MATSUI, T.; ADACHI, H.; TAKEUCHI, M. Positive association of circulating levels of advanced glycation end products (AGE) with pigment epithelium-derived factor (PEDF) in a general population. **Pharmacological Research**, v. 61, n. 2, p. 103-107, 2010

ZAHRADNÍKOVÁ, L.; SCHMIDT, S.; SÉKELYOVÁ, Z.; SEKRETÁR, S. Fractionation and identification of some phenolics extracted from evening primrose seed meal. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 26, n. 1, p. 58-64, 2008.

ZHAO G. V.; ZHONG, P.; CHEN, X. Recent progress and the development strategy of sunflower (*Helianthus annuus*) in China. **Food Industry**, v. 10, p. 76–78, 2011.

ZIA-UL-HAQ, M.; AHMAD, M.; MEHJABEEN, JEHAN, N.; AHMAD, S.; QAYUM, M.; MARWAT, IK. Antimicrobial screening of selected flora of Pakistan. **Journal Archives of Biological Sciences**. v. 63, p. 691-696, 2011.

ŽILIĆ, S., MAKSIMOVIĆ DRAGIŠIĆ, J., MAKSIMOVIĆ, V., MAKSIMOVIĆ, M., BASIĆ, Z., CREVAR, M., STANKOVIĆ, G. The content of antioxidants in sunflower seed and kernel. **HELIA**, v. 33, n. 52, p. 75-84, 2010.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, v. 114, p. 310-316, 2009.