



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - ICBS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
DA SAÚDE- PGCS**

# **CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE FARINHAS DE RESÍDUOS DE FRUTAS TROPICAIS**

Dissertação de Mestrado

**Alane Cabral de Oliveira**

Maceió-AL  
Fevereiro de 2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - ICBS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**DA SAÚDE- PGCS**

## **CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE FARINHAS DE RESÍDUOS DE FRUTAS TROPICAIS**

Alane Cabral de Oliveira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart

Co-orientadora: Iara Barros Valentim

Maceió-AL

Fevereiro de 2008

**Catálogo na fonte  
Universidade Federal de Alagoas  
Biblioteca Central  
Divisão de Tratamento Técnico**

**Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale**

O48c      Oliveira, Alane Cabral de.  
            Capacidade antioxidante de farinhas de resíduos de frutas tropicais / Alane  
            Cabral de Oliveira. – Maceió, 2008.  
            88 f. : il. tabs., grafs.

            Orientador: Marília Oliveira Fonseca Goulart.  
            Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal  
            de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2008.

            Bibliografia: f. 69-88.

            1. Frutas tropicais – Resíduos. 2. Farinhas – Frutas tropicais. 3. Capacidade  
            antioxidante. I. Título.

CDU: 634.6



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Membros da Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado da aluna Alane Cabral de Oliveira, intitulada: "Capacidade Antioxidante de Farinhas de Resíduos de Frutas Tropicais", apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 15 de fevereiro de 2008.

**Banca Examinadora:**

Marília Oliveira Fonseca Goulart - aprovada

Profª Drª. Marília Oliveira Fonseca Goulart – UFAL (Orientadora)

Maria Teresa Salles Trevisan - aprovada

Profª Drª. Maria Teresa Salles Trevisan – UFC (Titular)

Terezinha da Rocha Ataíde - aprovada

Profª Drª. Terezinha da Rocha Ataíde – UFAL (Titular)

*"Algumas pessoas sonham com o sucesso,  
outras levantam cedo e batalham para alcançá-  
lo"*

*Autor desconhecido*

*Dedico essa vitória a minha  
família, meu ALICERCE, por todo amor  
e incentivo.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Assim se faz ciência: de sucessos e fracassos, de momentos de grande alegria e momentos de desespero. Ao longo dos últimos anos, em que estou trabalhando no laboratório de Eletroquímica no âmbito do Mestrado em Ciências da Saúde, também provei essas diferentes sensações. A meu lado, apoiando-me, sempre as mesmas pessoas... pessoas mais próximas a quem eu agora agradeço por, de uma forma ou de outra, terem-me aturado e ajudado a alcançar o objetivo de finalizar este trabalho. Agradeço por isso:*

*Minha profunda gratidão a Deus, porque ninguém conquista uma vitória sozinho, sem Ele nada seria possível.*

*A minha orientadora, a Prof<sup>a</sup> Doutora Marília Goulart, por ter acreditado em mim e ter-me proposto o trabalho que agora apresento; pela sua disponibilidade e por ter partilhado comigo alguma da sua experiência e conhecimentos científicos, guiando-me por entre os tortuosos caminhos da ciência; e também por, acima de tudo, ter sido uma boa amiga.*

*A minha grande amiga, Prof<sup>a</sup> e Doutora Sandra Mary Vasconcelos, por ter me ensinado a amar a ciência, por ter confiando em mim e por todo o incentivo, mostrando sempre que eu sou capaz.*

*Um agradecimento em especial a Doutora Iara Valentim, pela amizade e pela enorme boa disposição com que teve este ano comigo. Fazendo-me acreditar no meu potencial e por ter sempre promovido discussões científicas de grande qualidade e me ter dado outra visão da ciência.*

*Ao Prof<sup>o</sup> Cícero Alexandre do Centro de Ciências Agrárias da UFAL por ter cedido às amostras de farinhas trabalhadas no presente trabalho.*

*Ao Prof<sup>o</sup> Doutor Etelvino Bechara do Laboratório de Radicais Livres e Bioluminescência do Departamento de Bioquímica da USP, por toda receptividade e por ter cedido seu laboratório para o desenvolvimento de algumas das técnicas*

*realizadas no presente trabalho. Um agradecimento ao Prof<sup>o</sup> Doutor Marcelo Paz e a mestranda Camila Moreno, do mesmo laboratório, pela paciência e por toda a ajuda no ensinamento das técnicas.*

*Às pessoas com quem partilhei o laboratório de Eletroquímica nos últimos tempos: ao Antonio Albuquerque, por seres um bom amigo, por estares sempre disposto a ajudar e pelo teu espírito crítico; ao Paulo, pela amizade e pela enorme boa disposição e ajuda em algumas figuras apresentadas no trabalho; ao Cícero Oliveira, pela tua simplicidade e sinceridade, e pela ajuda em algumas análises; à Francine, pela serenidade inspiradora com que afastaste as minhas frustrações e me fizeste acreditar em mim própria; à Aline Fidelis, pela amizade e por teres sempre promovido discussões científicas de grande qualidade. A todos os outros componentes do laboratório, por terem sido capazes de me aturar e contribuírem para um bom ambiente de trabalho.*

*Aos colegas de mestrado: Ana Raquel, Anderson, André, Iede, Fernando, Socorro, Paulo, Wendell e Charles. E em especial a minha grande amiga Andréa Aragão, pela amizade, pela confiança e por todo o incentivo dado. Entramos, passamos por nivelamento, créditos, experimentos, churrascos, almoços, tudo isso juntos, essa conquista nós partilhamos desde o começo. E também aos professores Eliana Maurício e Gilberto Fontes.*

*Aos professores que fizeram parte da banca de qualificação.*

*A minha família, minha mãe, meu pai, minha irmã Aline, ao Maurício, ao meu irmão Alan, por tudo.*

*As agências financiadoras: CAPES, CNPq, FAPEAL e PADCT.*

*A todos os outros colegas, amigos e docentes a quem não me referi, mas que sempre me presentearam com um sorriso ou uma palavra amiga e que por isso foram, e continuarão a ser, importantes para mim.*

*Meu muito obrigada*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>IV</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	2
1.2 ESPÉCIES REATIVAS DE IMPORTÂNCIA PARA OS SISTEMAS BIOLÓGICOS .....	3
1.2.1 ÂNION RADICAL SUPERÓXIDO.....	4
1.2.2 RADICAL HIDROXILA .....	5
1.2.3 PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO .....	6
1.2.4 OXIGÊNIO SINGLETO .....	6
1.2.5 PEROXINITRITO .....	6
1.3 ESTRESSE OXIDATIVO.....	7
1.4 SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE.....	8
1.4.1 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS .....	10
1.4.1.1 GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx) .....	10
1.4.1.2 CATALASE (CAT) .....	10
1.4.1.3 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).....	11
1.4.2 ANTIOXIDANTES NÃO-ENZIMÁTICOS .....	12
1.4.2.1 GLUTATIONA.....	12
1.4.2.2 VITAMINA E .....	13
1.4.2.3 VITAMINA A .....	14
1.4.2.4 VITAMINA C .....	16
1.4.2.5 POLIFENÓIS .....	17
1.5 FONTES NATURAIS DE ANTIOXIDANTES .....	19
1.6 ANTIOXIDANTES NA PRÁTICA NUTRICIONAL .....	25
1.7 MÉTODOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE FENÓIS E DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> .....	27

1.7.1 CONTEÚDO TOTAL DE FENÓIS .....	27
1.7.1.1 MÉTODO DE FOLIN – CIOCAULTEU .....	27
1.7.2 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	28
1.7.2.1 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL DPPH <sup>•</sup> .....	28
1.7.2.2 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL SUPERÓXIDO.....	28
1.7.2.3 INIBIÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO.....	30
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
2.1 GERAL.....	36
2.2 ESPECÍFICOS .....	36
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>37</b>
3.1 MATERIAL .....	38
3.2 MÉTODOS.....	39
3.2.1 COLETA DAS AMOSTRAS .....	39
3.2.2 PREPARO DAS AMOSTRAS .....	39
3.2.3 EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	40
3.2.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE FENÓIS.....	41
3.2.5 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL DPPH <sup>•</sup> .....	42
3.2.5.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	43
3.2.5.2 MEDIDAS DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS .....	44
3.2.6 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL SUPERÓXIDO .....	45
3.2.7 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS COMO INIBIDORAS DA LIPOPEROXIDAÇÃO.....	45
3.2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	47
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
4.1 CONTEÚDO TOTAL DE FENÓIS .....	49
4.2 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL DPPH <sup>•</sup> .....	53
4.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO ÂNION RADICAL SUPERÓXIDO .....	59
4.4 INIBIÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO .....	60

<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>6. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>67</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Redução tetravalente do O <sub>2</sub> na mitocôndria até a formação de água. Várias espécies reativas de O <sub>2</sub> são formadas no processo.....	4
<b>Figura 2.</b> Esquema simplificado dos sistemas oxidantes e antioxidantes que atuam na célula.....	9
<b>Figura 3.</b> Interconversão de glutathiona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona oxidase (GO) e glutathiona redutase (GR). ....	12
<b>Figura 4.</b> Estrutura química da Vitamina E. As setas indicam o sítio de oxidação (OH fenólico).....	14
<b>Figura 5.</b> Estrutura química de alguns carotenóides. ....	15
<b>Figura 6.</b> Ação antioxidante das vitaminas E e C na peroxidação lipídica das membranas celulares: .....	17
<b>Figura 7.</b> Estrutura química básica do flavonóide.....	18
<b>Figura 8.</b> Reação do ácido gálico em presença do molibdênio, componente do reagente de Folin - Ciocalteu. ....	27
<b>Figura 9.</b> Ação antioxidante do BHT frente ao radical DPPH* .....	28
<b>Figura 10.</b> Representação esquemática da geração do ânion radical superóxido e ação de um antioxidante presente no meio.....	29
<b>Figura 11.</b> Reações de Peroxidação Lipídica. ....	31
<b>Figura 12.</b> Lipossomas. A: Lipossoma unilamelar. B: Lipossoma multilamelar. ....	32
<b>Figura 13.</b> Micelas. ....	32
<b>Figura 14.</b> Lipossoma com sonda acoplada em cor verde. ....	33

<b>Figura 15.</b> Rota experimental simplificada utilizada neste trabalho .....	38
<b>Figura 16.</b> Aparelho de Soxhlet. ....	41
<b>Figura 17.</b> Curva de calibração com o ácido gálico. Medidas em absorvância, $\lambda = 760$ nm, do complexo formado entre o reagente de Folin-Ciocalteu e o padrão ácido gálico.....	42
<b>Figura 18.</b> Curva de calibração do DPPH <sup>•</sup> . Medida em absorvância a $\lambda = 516$ nm..	43
<b>Figura 19.</b> Porcentagem da capacidade antioxidante do extrato metanólico de farinhas proveniente das frutas acerola (FRAC), abacaxi (FRAB) e maracujá (FRMA) e atividade antioxidante dos controles ácido gálico e BHT, nas concentrações 25, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ .....	53
<b>Figura 20.</b> Comportamento cinético dos extratos metanólicos (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) frente ao DPPH <sup>•</sup> .....	55
<b>Figura 21.</b> Comportamento cinético dos extratos metanólicos (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) frente ao DPPH <sup>•</sup> .....	56
<b>Figura 22.</b> Comportamento cinético dos extratos metanólicos (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) frente ao DPPH <sup>•</sup> .....	57
<b>Figura 23.</b> Correlação entre os fenóis totais, expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG) e capacidade antioxidante (%) frente ao radical DPPH <sup>•</sup> (tempo de reação: 30 min.) dos extratos metanólicos (0,5 mg/ mL) de farinha de resíduo de acerola (FRAC) (1); farinha de resíduo de abacaxi (FRAB) (2) e farinha de resíduo de maracujá (FRMA) (3) nas concentrações de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....	58
<b>Figura 24.</b> Redução de NBT (%) em função das amostras estudadas (0,5 mg/ mL). .....	60
<b>Figura 25.</b> Proteção quanto à peroxidação lipídica por soluções aquosas (0,5 mg/ mL) de extratos de farinhas de resíduos de acerola (FRAC); farinhas de resíduos de	

abacaxi (FRAB); farinhas de resíduos de maracujá (FRMA) e padrão Trolox (1, 3, 5 mmolL<sup>-1</sup>), tempo de reação = 30 minutos.....62

**Figura 26.** Estrutura química do Trolox. ....63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Fontes naturais de antioxidantes . . . . .	21
<b>Tabela 2.</b> Rendimento (%) do processo de extração e conteúdo total de fenóis em extratos metanólicos de farinhas de resíduos de acerola, abacaxi e maracujá . . . . .	50
<b>Tabela 3.</b> Conteúdo total de fenóis em resíduos, frutas e polpas. . . . .	53

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$^1\Delta_g \text{O}_2$ ou $^1\text{O}_2^*$	Oxigênio singlete
$^3\Sigma_g^- \text{O}_2$	Oxigênio tripleto
<b>AA</b>	Atividade antioxidante
<b>AAPH</b>	2,2 – azobis-amidinopropano
<b>Abs</b>	Absorbância
<b>Abs</b> <sub>amostra</sub>	Absorbância da amostra
<b>Abs</b> <sub>controle</sub>	Absorbância do controle
<b>AO</b>	Antioxidante
<b>AOAC</b>	“Association of Official Analytical Chemists” – Associação de Químicos Analíticos Oficiais
<b>Asc<sup>•-</sup></b>	Semidesidroascorbato
<b>Asch<sup>-</sup></b>	Ascorbato
<b>Asch<sub>2</sub></b>	Vitamina C
<b>BHT</b>	Butil-hidroxitolueno
<b>BHA</b>	Hidroxianisol butilado
<b>Car</b>	Carotenóide
<b>CAT</b>	Catalase
<b>c-NOS</b>	NO-sintase constitutiva
<b>CuZnSOD</b>	Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
<b>DCV</b>	Doenças cardiovasculares
<b>DPPH<sup>•</sup></b>	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
<b>DPPH-H</b>	Difenil-picril-hidrazina
<b>DPPH<sub>REM</sub></b>	DPPH remanescente
<b>EAG</b>	Equivalente de ácido gálico
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetraacético
<b>ERC</b>	Espécies reativas de carbono
<b>ERCI</b>	Espécies reativas de cloro
<b>ERNs</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>ERON</b>	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>ERS</b>	Espécies Reativas de Enxofre

<b>FA-COA</b>	“Fatty Acyl- Coenzyme A” Acilgraxo – Coenzima A
<b>FRAB</b>	Farinhas de resíduos de abacaxi
<b>FRAC</b>	Farinhas de resíduos de acerola
<b>FRMA</b>	Farinhas de resíduos de maracujá
<b>GO</b>	Glutationa oxidase
<b>GPx</b>	Glutationa peroxidase
<b>GR</b>	Glutationa redutase
<b>GSH</b>	Glutationa
<b>GSSG</b>	Glutationa oxidada
<b>GST</b>	Glutationa transferase
<b>HOCI</b>	Ácido hipocloroso
<b>i-NOS</b>	NO-sintase induzida
<b>LDLs</b>	“Low-density lipoprotein” – Lipoproteína de baixa densidade
<b>MnSOD</b>	Superóxido dismutase dependente do manganês
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
<b>NBT</b>	“Nitro blue tetrazonium” – Azul de nitrotetrazônio
<b>NO<sup>-</sup></b>	Ânion nitroxila
<b>NO<sup>•</sup></b>	Óxido nítrico
<b>NO<sup>+</sup></b>	Cátion nitrosônio
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Ânion radical superóxido
<b>OH<sup>•</sup></b>	Radical hidroxila
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxinitrito
<b>PhGSH-Px</b>	Fosfolipídio glutaciona peroxidase
<b>PLA2</b>	Fosfolipase A2
<b>PMS</b>	Fenazina metassulfato
<b>QE</b>	Quercetina
<b>R<sup>•</sup></b>	Espécie radicalar
<b>ROO<sup>•</sup></b>	Radical peroxila
<b>RFC</b>	Reagente Folin-Ciocalteu
<b>RL</b>	Radical livre
<b>SH</b>	Tiol
<b>SOD</b>	Superóxido-dismutase

**UFAL**            Universidade Federal de Alagoas  
**USP**             Universidade de São Paulo  
**UV-VIS**        Ultravioleta-Visível

## RESUMO

Alternativas economicamente vantajosas com exploração completa do conteúdo antioxidante de resíduos de frutas tropicais de fábricas de sucos foram estudadas no estado de Alagoas, Brasil. Assim, extratos metanólicos de farinhas de resíduos de acerola (FRAC), maracujá (FRMA) e abacaxi (FRAB) foram avaliados quanto a sua capacidade antioxidante. Para isso, foram analisados o conteúdo total de fenóis, a capacidade antioxidante frente aos radicais DPPH<sup>•</sup> e ânion radical superóxido e o efeito de proteção à peroxidação da membrana lipídica, causada pelo radical peroxila, dos extratos metanólicos das farinhas. No último caso, um modelo de membrana bilamelar fosfolipídica com uma sonda fluorescente foi usado. Para a análise estatística, foi utilizado o programa epi info versão 6.04d (2001) e o Microsoft Excel, usando teste *t*, análise multivariada e qui-quadrado, considerando um  $p < 0,05$  como significativo. Os resultados para o conteúdo total de fenóis dos extratos metanólicos das farinhas de resíduos de acerola (FRAC), maracujá (FRMA) e abacaxi (FRAB) foram  $94,6 \pm 7,4$ ,  $41,2 \pm 4,2$  e  $9,1 \pm 1,3$  mg de equivalentes de ácido gálico/ g de extrato seco, respectivamente. FRAC mostrou o melhor conteúdo de fenóis e capacidade antioxidante frente ao radical DPPH<sup>•</sup>. FRMA mostrou a melhor capacidade antioxidante frente ao ânion radical superóxido. Resposta similar foi observada entre FRAC e FRMA quanto à proteção frente a peroxidação da membrana lipídica. De modo geral, estes dados sugerem que extratos metanólicos de farinhas de FRAC e FRMA podem ser úteis como suplementos antioxidantes ou aditivos alimentares, em especial, o extrato de acerola.

Palavras-chave: capacidade antioxidante, resíduos de frutas tropicais, DPPH, conteúdo total de fenóis, peroxidação lipídica, ânion radical superóxido.

## ABSTRACT

Economically advantageous alternatives to fully explore the antioxidant content of tropical fruit residues from juice processor industries have been currently studied in the State of Alagoas, Brazil. Thus, flour methanolic extracts of acerola (AC), passion fruit (PF) and pineapple (PA) residues were screened for their antioxidant capacity. For this, their total phenolic content, antioxidant capacity toward DPPH<sup>•</sup> and toward the superoxide anion radical, together with analysis of their protective effect against membrane lipid peroxidation, caused by peroxy radical, were determined in the flour methanolic extracts. In the last case, the phospholipid bilayer biomimetic model with the inclusion of a fluorescent probe was used. The statistical analysis employed the epi info version 6.04d (2001) program and Microsoft excel, using the test *t*, multivariate analysis and chi-square, considering  $p < 0.05$  as significant. The results of total phenolic content of flour methanolic extracts of AC, PF and PA were  $94.6 \pm 7.4$ ,  $41.2 \pm 4.2$  and  $9.1 \pm 1.3$  mg of gallic acid equivalents/ g of dry extract, respectively. AC showed the best total phenolic content and antioxidant capacity toward DPPH<sup>•</sup>. PF showed the best antioxidant capacity to superoxide anion radical. Similar indexes of lipid peroxidation protection were observed with both AC and PF residues. Altogether, these data suggest that flour methanolic extracts of AC and PF residues may be useful as antioxidant supplements or food additives, notably the acerola (AC) extracts.

Key-Words: antioxidant capacity, tropical fruit residues, DPPH, total phenolic content, lipid peroxidation, superoxide anion radical.

## 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Estudos epidemiológicos têm mostrado que dietas ricas em frutas e verduras estão associadas a uma menor incidência de doenças crônicas e degenerativas (ZIBADE *et al.*, 2007; JOHN *et al.*, 2002; GAZIANO *et al.*, 1995; HARTMAN *et al.*, 2006; GAZIANO, 1996). Um dos principais aspectos relacionados a este efeito protetor tem sido atribuído, em parte, à presença de compostos antioxidantes, dentre os quais se destacam os compostos fenólicos, além dos bem conhecidos  $\beta$ -caroteno, vitamina C e vitamina E (KIM, GIRAUD & DRISKELL, 2007; ZULUETA *et al.*, 2007; VASCONCELOS, SILVA & GOULART, 2006).

A proteção atribuída aos antioxidantes é decorrente da sua ação redutora frente a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON), bem como outras espécies reativas, que são moléculas formadas continuamente durante os processos metabólicos ou são provenientes de fontes exógenas. Tais espécies atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas (HALLIWELL, 1995). Porém, quando em excesso, podem causar danos celulares, atacando membranas lipídicas, proteínas e nucleotídeos, levando a uma série de alterações, até o surgimento de algumas doenças (NERI, *et al.*, 2005; NIKI *et al.*, 2005; THOMAS & BALASUBRAMANIAN, 2004).

A pesquisa de instrumentos para detecção precoce e prevenção de alterações no equilíbrio redox celular e de tecidos específicos constitui-se de forte interesse científico atual. Desta forma, buscam-se hoje medicamentos ou alternativas nutricionais (alimentos ou nutrientes específicos) que possam diminuir a ação deletéria destas espécies reativas sobre a saúde da população humana (MOUSA & MOUSA, 2007; BJELAKOVIC *et al.*, 2006; MORIARTY-CRAIGE *et al.*, 2005; BALDWIN *et al.*, 2005).

As indústrias alimentícias brasileiras produzem resíduos que poderiam ter um destino muito mais benéfico, favorecendo o homem e o meio ambiente. Muitos frutos comestíveis são processados para fabricação de sucos naturais, sucos concentrados, doces em conserva, polpas e extratos, os quais possuem sementes e cascas, fontes naturais de antioxidantes, que são muitas vezes descartadas, porém, poderiam ser utilizadas, evitando o desperdício de alimentos.

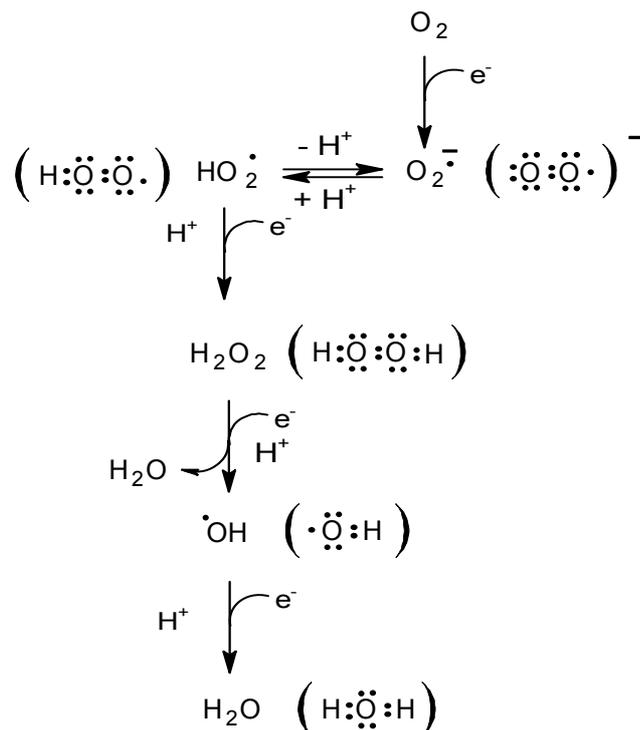
---

## 1.2 ESPÉCIES REATIVAS DE IMPORTÂNCIA PARA OS SISTEMAS BIOLÓGICOS

O termo radical livre (RL) é definido como qualquer espécie, de existência independente, com um ou mais elétrons livres ou não-pareados ocupando um orbital atômico ou molecular. Essas espécies são, geralmente, instáveis, e por esta razão, apresentam grande capacidade reativa, tendo tempo de meia vida muito curto. São reativos frente a uma grande variedade de compostos que estejam próximos, a fim de que a transferência de um elétron deste composto para o radical ou do radical para o composto contribua para a estabilização das espécies. Isto pode acontecer em diferentes ambientes, por exemplo, na célula, ou em um tecido do organismo, através de reações em cadeia, culminando com lesão celular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). O ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), o radical hidroperoxila ( $HO_2^{\bullet}$ ) e o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) são exemplos de RLs (GETOFF, 2007).

Há, entretanto, compostos igualmente reativos que não possuem elétrons desemparelhados na última camada e, portanto, não podem ser classificados como RLs (CADENAS & DAVIES, 2000). Essas substâncias são classificadas de maneira mais ampla como espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e incluem o oxigênio molecular ( $O_2$ ), o oxigênio singlete ( $^1O_2^*$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o cátion nitrosônio ( $NO^+$ ), o ânion nitroxila ( $NO^-$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (GETOFF, 2007).

Sabe-se que a mitocôndria é a principal fonte intracelular de RLs (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; MANOLI *et al.*, 2007). Esse fato deve-se à presença da cadeia de transporte de elétrons ou fosforilação oxidativa, onde cerca de 95% do oxigênio molecular ( $O_2$ ) é reduzido à água (**Figura 1**), pela enzima citocromo oxidase, e o restante é transformado em espécies radicalares. Uma diminuição da atividade da citocromo oxidase pode, assim, levar a uma maior formação de RLs a partir da cadeia respiratória mitocondrial (NOHL, GILLE & STANIEK, 2005).



**Figura 1.** Redução tetravalente do  $\text{O}_2$  na mitocôndria até a formação de água. Várias espécies reativas de  $\text{O}_2$  são formadas no processo.

**Fonte:** COHEN (1989) *apud* FERREIRA & MATSUBARA (1997)

Existem outros mecanismos moleculares, além da fosforilação oxidativa, que ocorrem na mitocôndria, que podem levar à formação de espécies reativas de oxigênio. Dentre os quais, pode-se destacar a conversão enzimática de catecolaminas e indolaminas pela monoamina oxidase ou a auto-oxidação não enzimática de catecolaminas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007), como, também, a produção por macrófagos e neutrófilos, utilizada na defesa contra bactérias e fungos que, por ventura, possam invadir o organismo humano (GRISHAM, 2004).

### 1.2.1 ÂNION RADICAL SUPERÓXIDO

O ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) é o primeiro intermediário da redução monovalente do  $\text{O}_2$  até água, com formação das demais espécies reativas (**Figura 1**) (PERVAIZ & CLEMENT, 2007). O mesmo apresenta funções vitais para as

células de defesa e sem ele o organismo está desprotegido contra infecções causadas por vírus, bactérias e fungos (GRISHAM, 2004).

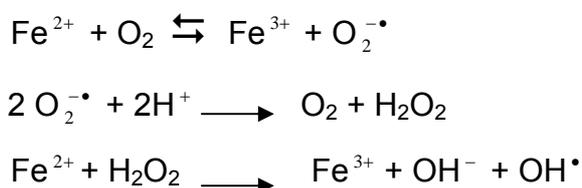
Isoladamente, este ânion radical é pouco reativo e, portanto, não é altamente citotóxico. Já o radical hidroperoxila ( $\text{HO}_2^\bullet$ ), que é a forma protonada do radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , tem uma facilidade maior de iniciar a destruição de membranas (BRAND *et al.*, 2004).

### 1.2.2 RADICAL HIDROXILA

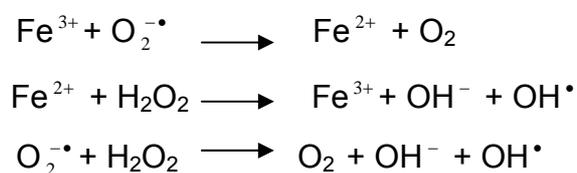
É importante salientar que não existem sistemas eficientes para neutralizar o radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ), principalmente pelo fato do mesmo apresentar um tempo de meia-vida muito curto, o que dificulta o seu seqüestro *in vivo* (VALKO *et al.*, 2007). Ele é considerado um dos mais reativos e mais deletérios ao organismo, capaz de tirar átomos de hidrogênio de grupo metileno, adjacentes às duplas ligações de ácidos graxos poli-insaturados. Esse processo dá início à peroxidação lipídica, provocando, assim, a lise da membrana celular (NIKI *et al.*, 2005).

O radical  $\text{OH}^\bullet$  pode ser formado *in vivo* através de reações entre íons de metais de transição, por exemplo, do ferro (Fe (II)) com o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), como nas reações de Fenton e Harber-Weiss (LLOYD, HANNA & MASON, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Reação de Fenton:



Reação de Haber-Weiss:



### 1.2.3 PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), embora não seja um RL, é considerado uma ERO, uma vez que pode funcionar como um intermediário na produção de espécies mais reativas, como o ácido hipocloroso (HOCl) (formado pela ação das mieloperoxidasas) e o radical hidroxila (UI *et al.*, 2004), como citado anteriormente. Embora o  $H_2O_2$  possua uma reatividade limitada, o mesmo é capaz de atravessar as membranas biológicas, causando dano celular (LIOCHEV & FRIDOVICH, 2007).

### 1.2.4 OXIGÊNIO SINGLETO

A forma mais deletéria do  $O_2$  ao organismo é o oxigênio singleto ( $^1\Delta_gO_2$  ou  $^1O_2^*$ ), intermediário fotoinduzido do oxigênio. O seu tempo de meia-vida depende muito do meio onde se encontra: em meio aquoso, é muito pequeno, pois ele colide com as moléculas de água ( $H_2O$ ) transferindo sua energia, desativando-se e retornando a sua forma menos reativa, oxigênio tripleto ( $^3\Sigma_g^-O_2$ ). Em meio orgânico é mais comum a ocorrência de choque com transferência de energia, sem reação química, seguida da dissipação dessa energia na forma de calor (RONSEIN *et al.*, 2006).

Além destes, existem ainda os radicais derivados dos tióis ou radicais de enxofre ( $RS^*$ ), as espécies reativas de cloro (ERCl), as espécies reativas de carbono (ERC) e os íons de metais de transição ferro (Fe), cobre (Cu), manganês (Mn) e zinco (Zn), que podem causar danos celulares (NORDBERG & ARNER, 2001).

### 1.2.5 PEROXINITRITO

Atualmente, o óxido nítrico ( $NO^*$ ) constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares. Este radical é produzido a partir do aminoácido L-arginina, através de uma reação catalisada pelas enzimas NO-sintase constitutiva (c-NOS) e induzida (i-NOS). O  $NO^*$  apresenta um papel dúbio, às vezes

benéfico, outras vezes prejudicial ao organismo. Está envolvido no relaxamento vascular e tem um papel de grande importância na proteção do vaso sanguíneo. Constitui um importante mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, capaz de destruir patógenos e células tumorais. Possui, ainda, um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. No entanto o  $\text{NO}^\bullet$  é potencialmente tóxico. A toxicidade se faz presente particularmente em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante (DUSSE, VIEIRA & CARVALHO, 2003).

Uma ação tóxica cooperativa de  $\text{NO}^\bullet$  e ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) resulta na formação de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (**Equação 1**), um poderoso oxidante de proteínas. O  $\text{ONOO}^-$  pode, posteriormente, protonar-se na presença de íon hidrogênio ( $\text{H}^+$ ), originando um radical altamente reativo e tóxico, o hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ), aumentando efetivamente a ação tóxica do  $\text{NO}^\bullet$  e do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).



### 1.3 ESTRESSE OXIDATIVO

O desbalanço entre a produção de espécies reativas e a remoção destas pelos sistemas de defesa antioxidante, com predomínio dos pró-oxidantes, é denominado de estresse oxidativo ou desbalanço redox (RAHMAN, BISWAS & KODE, 2006). O mesmo é considerado uma condição celular ou fisiológica de elevada concentração de espécies que causa danos moleculares às estruturas celulares, com conseqüente alteração funcional e prejuízo das funções vitais, em diversos tecidos e órgãos, tais como músculo, fígado, tecido adiposo, vascular e cerebral (MULLER *et al.*, 2007).

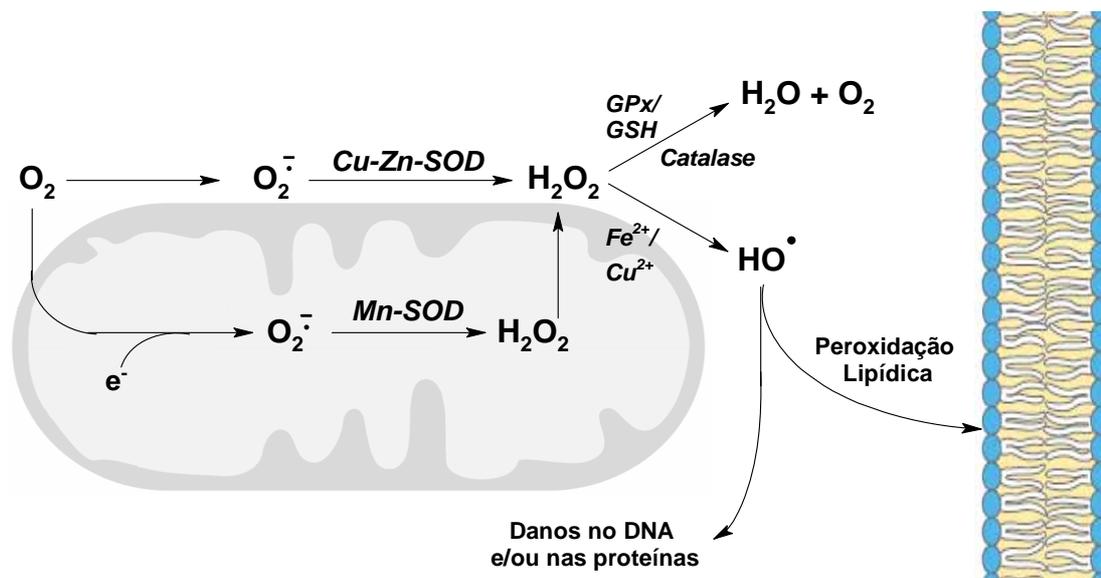
Hábitos de vida considerados inapropriados, como o consumo de álcool, tabagismo e dieta inadequada; condições ambientais impróprias, tais como a exposição à radiação não ionizante ultravioleta (UV) e outras ondas curtas, poluição, temperatura elevada, estados psicológicos que provoquem estresse emocional, o

envelhecimento e o exercício realizado de forma extrema também estão associados ao estresse oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Os sistemas biológicos oferecem condições favoráveis para a ocorrência de reações de caráter oxidativo, devido à existência de lipídios insaturados nas membranas celulares e pela abundância de reações oxidativas que ocorrem durante o metabolismo normal. A susceptibilidade de uma célula ou de um tecido ao estresse oxidativo depende de um grande número de fatores que incluem a disponibilidade de antioxidantes e a capacidade de inativação ou eliminação dos produtos oxidados formados (HALLIWELL *et al.*, 1995).

#### 1.4 SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE

Existem no organismo sistemas naturais de combate aos RLs, que podem ser classificados em enzimáticos ou não-enzimáticos, que, quando não eliminam, impedem a transformação dos RLs em produtos mais nocivos às células (BUONOCORE & GROENENDAAL, 2007). O efeito prejudicial dos RLs ocorre quando os mesmos estão em quantidade excessiva no organismo, ultrapassando a capacidade do organismo de neutralizá-los com os seus sistemas naturais (BARREIRO & DAVID, 2006). Os sistemas enzimáticos de defesa são compostos pelas seguintes enzimas: glutathione-peroxidase (GPx) (GPx-dependentes e não-dependentes de selênio), que atua sobre peróxidos em geral, utilizando a glutathione como co-fator; catalase (CAT) (heme-enzima), que atua na decomposição de  $H_2O_2$  a  $O_2$  e  $H_2O$  e a superóxido-dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do ânion radical  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$  (**Figura 2**) (VALKO *et al.*, 2007).



**Figura 2.** Esquema simplificado dos sistemas oxidantes e antioxidantes que atuam na célula. O superóxido é produzido intracelularmente, tanto no citosol como na mitocôndria. Duas moléculas de superóxido são rapidamente dismutadas, espontaneamente ou por via de superóxido dismutases, sendo que estas permitem o posterior fluxo de EROs entre compartimentos celulares. O peróxido de hidrogênio resultante da dismutação do superóxido pode depois ser enzimaticamente metabolizado em oxigênio e água, ou convertido no radical hidroxila, através de reações catalisadas por íons metálicos.

**Fonte:** Adaptado de NORDBERG & ARNER (2001).

Já o sistema antioxidante não enzimático tem a glutatona (GSH) em destaque, como principal antioxidante intracelular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Outros antioxidantes não enzimáticos que merecem destaque são em sua maioria exógenos, ou seja, precisam ser fornecidos pela alimentação (HALLIWELL *et al.*, 1995). Dentre os principais, pode-se citar: as vitaminas lipossolúveis (vitamina A,  $\beta$ -caroteno e vitamina E), as vitaminas hidrossolúveis (vitamina C e vitaminas do complexo B ( $B_{12}$ ,  $B_2$  e  $B_6$ )), os oligoelementos (zinco, cobre, selênio, magnésio, etc.) e os polifenóis (derivados de plantas) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; TAKATA, MATSUNAGA & KARUBE, 2002).

#### 1.4.1 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

##### 1.4.1.1 GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)

Nas células animais, há duas formas de GPx, como citado anteriormente. A forma dependente de selênio é capaz de reduzir qualquer hidroperóxido orgânico, além do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Essa forma possui massa molar de 81.000 g mol<sup>-1</sup>, é uma proteína tetramérica e possui um átomo de selênio em cada subunidade. O segundo tipo, independente do selênio, tem massa molar de 35.000 g mol<sup>-1</sup>, é dimérica e está apta a reduzir qualquer hidroperóxido orgânico, menos o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Na maioria dos animais, a enzima dependente de selênio é responsável pela maior parte da atividade da GPx, mas a proporção entre as duas formas varia muito entre as diferentes espécies, bem como de tecido para tecido em uma mesma espécie (DREVET, 2006).

A GPx apresenta alta atividade no fígado, moderada no coração, pulmão, cérebro, e baixa nos músculos. O pH ótimo para a GPx é próximo de 8,0, mas a enzima continua ativa com valores elevados. Sua atividade é mínima em pH abaixo de 6,0 (SEO *et al.*, 2004).

##### 1.4.1.2 CATALASE (CAT)

A CAT está presente na maioria das células aeróbias, sendo que, em animais, se encontra principalmente no fígado, rins e eritrócitos. Órgãos como cérebro, coração e músculo esquelético contêm, no entanto, pequenas quantidades da enzima. Os nutrientes mais importantes coadjuvantes da catalase são o ferro e os oito tocoferóis (vitamina E), que se apresentam distribuídos na membrana celular, na fase hidrofóbica. Apresenta massa molar de 240.000 g mol<sup>-1</sup> e, quando purificada, apresenta quatro subunidades, cada uma contendo um grupamento Fe III – protoporfirina, ligado ao seu sítio ativo (VALKO *et al.*, 2007).

Em relação ao pH, pode-se observar uma diminuição da atividade da enzima abaixo de pH 4,0. Na faixa de 4,0 a 8,5, a sua atividade permanece constante, sendo que, acima desse valor, volta a diminuir (VALKO *et al.*, 2007).

Segundo Sies (1999), a CAT é a enzima que se encarrega de fazer a conversão de altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos peroxissomas em água e oxigênio.

---

Já em outros compartimentos celulares, quando o peróxido de hidrogênio está presente em baixas concentrações (condições fisiológicas normais), a glutathione peroxidase é que se encarrega de transformá-lo em água.

#### 1.4.1.3 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A SOD constitui uma das enzimas mais importantes que atuam como antioxidantes celulares. Está presente no citoplasma celular (enzima cobre-zinco) e nas mitocôndrias (enzima manganês) (PETERSEN & ENGHILD, 2005).

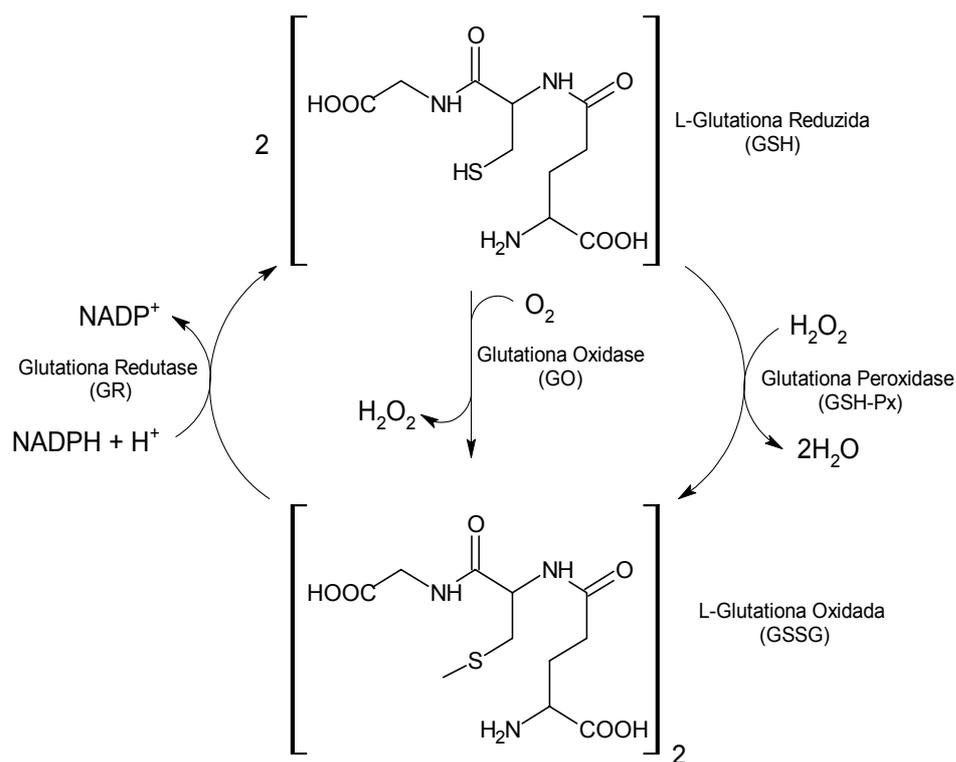
A forma que contém cobre e zinco, denominada de superóxido dismutase dependente de cobre e zinco (CuZnSOD), é muito estável e está presente em praticamente todas as células eucarióticas (plantas ou animais). A CuZnSOD tem massa molar de  $32.000 \text{ g mol}^{-1}$  e é constituída de duas subunidades protéicas idênticas, com um átomo de cobre e um de zinco em cada uma delas. O zinco não funciona no sítio catalítico, mas aparece para estabilizar a enzima. Essa conclusão foi extraída de experiências nas quais os metais foram removidos dos sítios ativos e recolocados em outros, sozinhos ou em conjunto (AFONSO *et al.*, 2007).

A SOD dependente do manganês (MnSOD) é uma proteína de cor rosa, cuja massa molar é de  $40.000 \text{ g mol}^{-1}$  e que contém manganês nos sítios ativos. A sua atividade diminui em pH alcalino. A atividade da MnSOD em relação à CuZnSOD depende do tecido e das espécies onde atuam. A remoção do manganês (Mn) dos sítios ativos causa perda da atividade catalítica, não podendo ser substituído por qualquer íon de transição, pois a enzima perde a sua atividade funcional. As seqüências de aminoácidos de todas as MnSOD, em todas as espécies, são parecidas e não estão relacionadas com àquelas da CuZnSOD (KINNULA & CRAPO, 2004).

## 1.4.2 ANTIOXIDANTES NÃO-ENZIMÁTICOS

### 1.4.2.1 GLUTATIONA

A glutathiona é abundante ( $3-10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) no citoplasma, no núcleo e nas mitocôndrias, consistindo no principal antioxidante solúvel destes compartimentos celulares. Está presente na maioria das células na sua forma reduzida (GSH) e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular, onde sua capacidade redutora está associada a este grupamento (CNUBBEN *et al.*, 2001). A glutathiona é reconhecida como substrato para GSH transferase (GST) e GSH peroxidase (GPx) (**Figura 3**), enzimas que catalisam as reações de destoxificação de compostos xenobióticos e de EROs e RLs (JÚNIOR *et al.*, 2001).



**Figura 3.** Interconversão de glutathiona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona oxidase (GO) e glutathiona redutase (GR).

**Fonte:** Adaptado de JÚNIOR *et al.*, 2001.

A concentração sanguínea de GSH pode ser regulada pela dieta e pelo estado nutricional. As informações obtidas da regulação dietética e dos níveis de GSH tecidual podem ser clinicamente relevantes, especialmente em relação às doenças onde estão envolvidas simultaneamente a diminuição das concentrações teciduais de GSH e a ocorrência de estresse oxidativo (SIES, 1999).

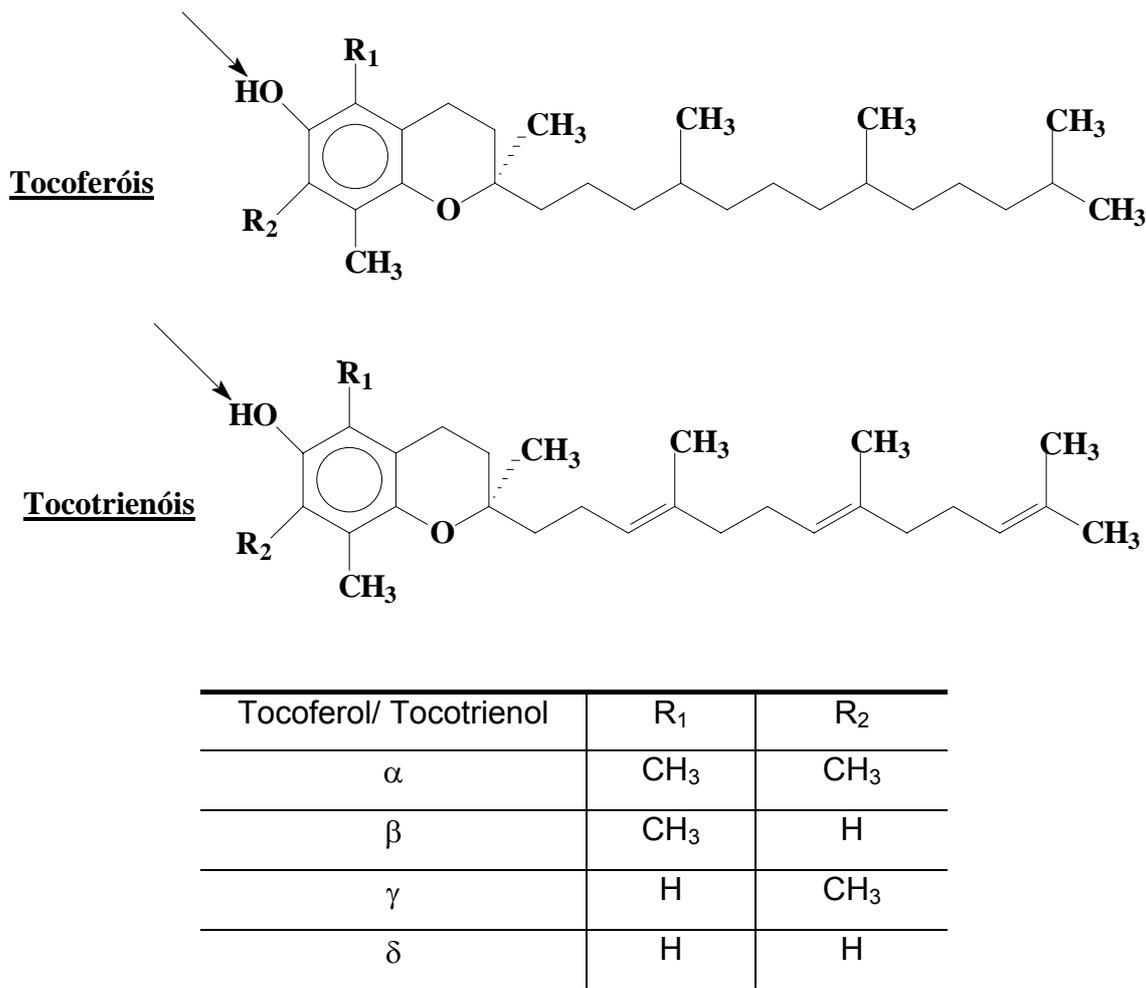
A maior parte da glutathiona livre *in vivo* está sob a forma de GSH ao invés de glutathiona oxidada (GSSG); porém, mais de 2/3 de tiois totais pode estar presente em outras formas, tais como cisteína e coenzima A (CNUBBEN *et al.*, 2001; SEO *et al.*, 2004).

#### 1.4.2.2 VITAMINA E

Vitamina E (**Figura 4**) é um termo genérico que se refere aos tocoferóis e tocotrienóis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  tocoferol e  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  tocotrienol). Todos estes compostos consistem de um núcleo cromanol com uma cadeia alifática lateral. Esta vitamina é considerada o antioxidante lipossolúvel mais importante presente nas regiões hidrofóbicas, e, portanto, é capaz de atuar na proteção contra a peroxidação de membranas. Dentre os tipos de tocoferóis, o  $\alpha$ -tocopherol é considerado o de maior poder antioxidante (NIKI *et al.*, 2005).

A vitamina E protege os fosfolípidios insaturados da membrana da degeneração oxidativa causada por espécies de oxigênio altamente reativas e outros RLs. Ela desempenha esta função através de sua capacidade de reduzir tais radicais a metabólitos não prejudiciais - um processo chamado de “varredura de radicais livres” (NIKI *et al.*, 2005).

A vitamina E pode reagir diretamente com uma série de oxirradicais, como o  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ , etc., e, também, com o  $^1O_2^*$ . A reação *in vivo* deste antioxidante consiste em sua oxidação primeiramente, à tocoferil quinona, biologicamente inativa, e, em seguida, pode ser reduzida à tocoferil hidroquinona (CHOW, 1991; WOLF, WOLF & RUOCCO, 1998).



**Figura 4.** Estrutura química da Vitamina E. As setas indicam o sítio de oxidação (OH fenólico)

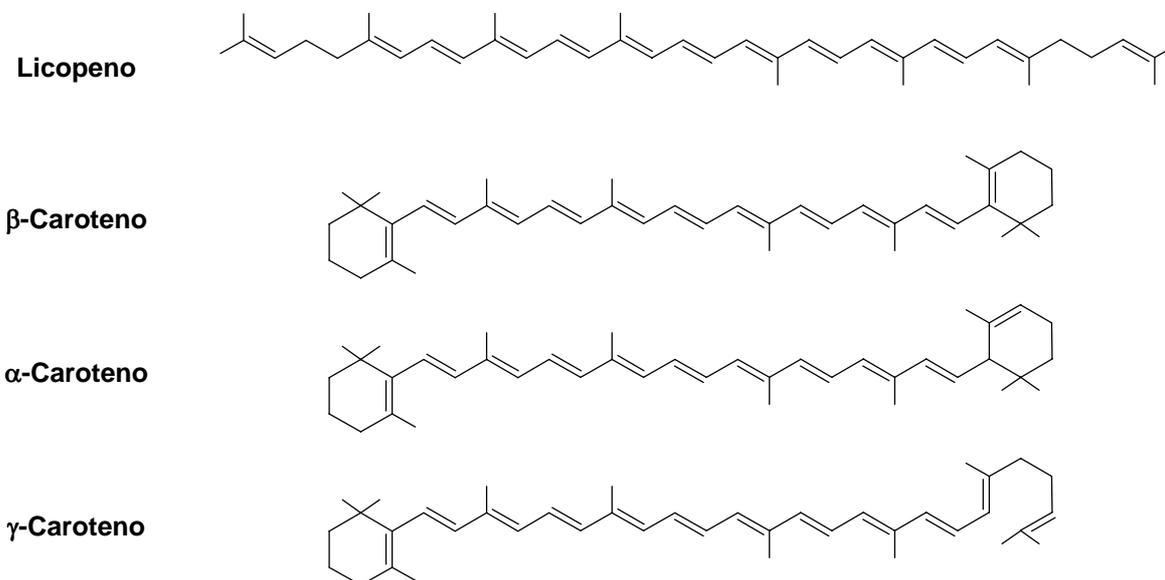
**Fonte:** Adaptado de CERQUEIRA, MEDEIROS & AUGUSTO (2007).

#### 1.4.2.3 VITAMINA A

Vitamina A é o termo genérico usado para descrever todos os compostos com atividade biológica de retinol, que foi originalmente isolado da retina, onde faz parte da molécula dos pigmentos visuais responsáveis pela visão (RAO & RAO, 2007).

Devido às suas similaridades com o retinol, os compostos são chamados de retinóides. Os retinóides ativos da vitamina A são encontrados, na natureza, em três formas: álcool (retinol); aldeído (retinal ou retinaldeído) e ácido (ácido retinóico). Os pigmentos vegetais, chamados carotenóides (**Figura 5**), podem produzir retinóides no metabolismo, sendo assim chamados de pró-vitaminas A. O licopeno não apresenta tal atividade, visto que, não apresenta o anel β-ionona em sua estrutura.

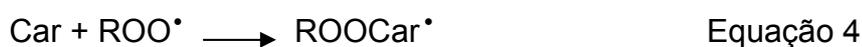
O mais ativo destes é o  $\beta$ -caroteno, um dímero de retinol (KRINSKY & JOHNSON, 2005).



**Figura 5.** Estrutura química de alguns carotenóides.

A vitamina A apresenta pequena ação antioxidante, mas seu precursor, o  $\beta$ -caroteno, é mais eficiente, podendo, desta forma, agir como antioxidante, em especial, sobre o  $^1O_2^*$  (YOUNG & LOWE, 2001; MORTENSEN, SKIBSTED & TRUSCOTT, 2001).

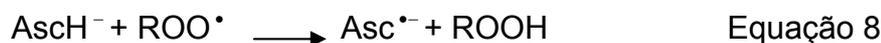
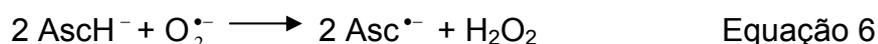
A atividade antioxidante de um carotenóide (Car) sobre espécies reativas ( $ROO^*$ ) pode ocorrer via três possibilidades mecânicas: transferência de elétrons a partir de seu carbono central (**Equação 2**) e/ou abstração do hidrogênio alílico (**Equação 3**) e adição radicalar (**Equação 4**).



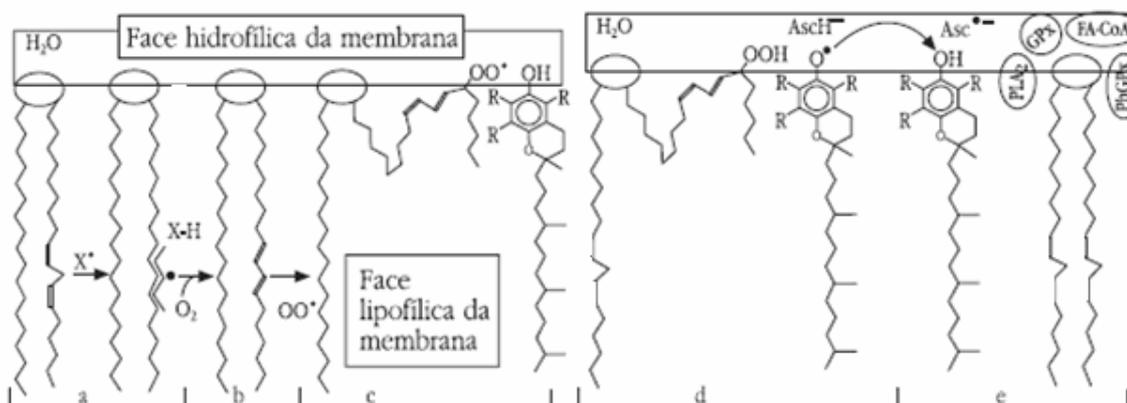
## 1.4.2.4 VITAMINA C

A vitamina C é essencial ao ser humano, visto que o mesmo não é capaz de sintetizá-la pela via da glicose, como acontece com as plantas e outros animais, necessitando, assim, ser obtida através da dieta (SILVA & COZZOLINO, 2006).

Em pH fisiológico (7,4), 99,95% da vitamina C ( $\text{AscH}_2$ ) encontra-se na forma de ascorbato ( $\text{AscH}^-$ ), que é a forma que atua como antioxidante, ao doar um  $\text{H}^\bullet$  ou  $\text{H}^+ + \text{e}^-$  para um RL. O ascorbato ( $\text{AscH}^-$ ) atua como antioxidante sobre EROs e ERNs, em ambiente biológico aquoso, resultando na formação do ânion radical semidesidroascorbato ( $\text{Asc}^{\bullet-}$ ), ou ascorbila, que é pouco reativo (**Equação 5**) (HAMRE *et al.*, 1997).



A vitamina C é considerada o mais importante antioxidante em fluídos extracelulares, pois o ascorbato atua eficientemente sobre o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (**Equação 6**), sobre o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (**Equação 7**), sobre o  $\text{OH}^\bullet$  (**Equação 5**) e o  $\text{ROO}^\bullet$  (**Equação 8**) e ainda sobre o  $^1\text{O}_2^*$ . O ascorbato pode atuar diretamente nas membranas celulares, por impedir o início da peroxidação lipídica ou indiretamente por regenerar a vitamina E, que atua como antioxidante na fase lipofílica da membrana (**Figura 6**) (HAMRE *et al.*, 1997).

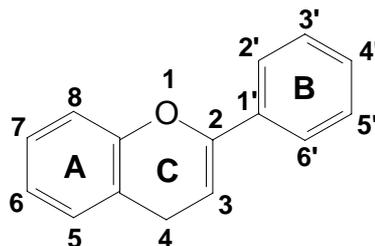


**Figura 6.** Ação antioxidante das vitaminas E e C na peroxidação lipídica das membranas celulares: (a) Abstração de  $H^\bullet$  do lipídio da membrana celular devido ao ataque do radical livre  $X^\bullet$ ; (b) Em presença de  $O_2$ , ocorre formação do radical peroxila  $R-OO^\bullet$ ; (c e d) A vitamina E remove o radical peroxila; (d e e) O ascorbato ( $AscH^-$ ) pode reciclar vitamina E; (e) Enzimas PLA2 (Fosfolipase A2) GSH-Px (Glutaciona Peroxidase) PhGSH-Px (Fosfolipídica glutaciona peroxidase) em presença de FA-CoA (Fatty Acyl-Acilgraxo – Coenzima A) podem reparar o dano ao ácido graxo.

**Fonte:** Adaptado de BUETTNER (1993).

#### 1.4.2.5 POLIFENÓIS

Polifenóis, em especial os flavonóides, possuem estrutura ideal para o seqüestro de radicais e são antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E *in vitro* (DIMITRIOS, 2006). A atividade dos flavonóides depende de sua estrutura (**Figura 7**) e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade com agente doador de  $H^\bullet$  e elétrons, estabilidade do radical flavanoíla formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas (WALLE, 2004).



**Figura 7.** Estrutura química básica do flavonóide. A estrutura básica do flavonóide é o núcleo flavona que consiste de 15 átomos de carbono arranjados em 3 anéis (C6-C3-C6) classificados em A, C e B.

Outro fator relacionado com o poder antioxidante de um flavonóide é a quantidade de hidroxilas (OH) presentes em sua estrutura; sendo assim, quanto maior o número de grupos - OH, maior a atividade com agente doador de  $H^\bullet$  ou de elétrons +  $H^+$ . Entre os flavonóides diidroxilados, destacam-se aqueles que possuem o sistema catecol (3',4'-diidroxil) no anel B. Os flavonóides com múltiplas hidroxilas como a miricetina, quercetina, luteolina, fustina, eriodictiol e taxifolina possuem forte atividade antioxidante quando comparados ao  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico,  $\beta$  - caroteno, glutathione, ácido úrico e bilirrubina (CAO, SOFIC & PRIOR, 1997).

O último fator importante que influencia a atividade antioxidante dos flavonóides é a sua interação com as biomembranas. A lipofilia do flavonóide indica a incorporação deste pela membrana, que é alvo da maioria das EROs e ERNs. Assim, deve haver uma concentração mínima do flavonóide por ácido graxo, de modo a assegurar a presença de uma de suas moléculas próxima ao sítio de ataque do radical. Flavonóides que possuem uma cadeia de açúcares ligada em sua estrutura são muito polares, não sendo assimilados pela membrana; porém, nesta forma, eles podem ser armazenados em vesículas, possuindo um tempo maior de permanência no organismo. Os flavonóides que são assimilados pelas membranas exercem a função de moduladores de fluidez. Ao restringir essa fluidez, os flavonóides geram um impedimento físico para a difusão das EROs e ERNs, de modo que decresce a cinética (ERLUND, 2004).

Existe, ainda, uma série de outros antioxidantes não enzimáticos que participam da defesa contra RLs nos sistemas biológicos como, por exemplo, a melatonina, a ubiquinona, a ceruloplasmina, o ácido úrico e a taurina (VALKO *et al.*, 2007).

## 1.5 FONTES NATURAIS DE ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes, como a vitamina C, vitamina E, carotenóides e flavonóides, estão presentes como constituintes dietéticos (MOURE *et al.*, 2001). Por exemplo, antioxidantes com importante atividade têm sido encontrados em frutas vermelhas (PANTELIDIS *et al.*, 2007); frutas obtidas de um supermercado em Singapura (LEONG & SHUI, 2002); frutas tropicais silvestres (KUSKOSKI *et al.*, 2006); em sucos de frutas como, laranja, maçã, abacaxi e uva (GARDNER *et al.*, 2000), como também em polpas de frutas congeladas (KUSKOSKI *et al.*, 2006). Estudos mostram, ainda, a influência do processamento e do tempo de armazenamento sobre o conteúdo de polifenóis em morangos (AYALA-ZAVALA *et al.*, 2004). Outros estudos têm analisado o potencial antioxidante de uma larga variedade de vegetais (ISMAIL, MARJAN & FOONG, 2004).

Vinhos contêm uma variedade de compostos polifenólicos, em especial resveratrol e seus derivados (NIKFARDJEM, LÁSZLÓ & DIETRICH, 2006). Beer *et al.* (2005) avaliaram o conteúdo de fenóis, ácido ascórbico e a inibição da peroxidação lipídica *in vitro* de vinhos tinto e branco produzidos no sul da África. Além de vinhos, estudos registram a atividade antioxidante em outros tipos de bebidas alcoólicas, como o licor (ALAMPRESE, POMPEI & SCARAMUZZI, 2005). Chá verde e chá preto têm sido extensivamente estudados quanto às suas propriedades antioxidantes frente a uma variedade de espécies reativas (THIAGARAJAN *et al.*, 2001). Luczaj & Skrzydlewska (2005) também revisaram as propriedades antioxidantes do chá-preto. Já Turkmen, Sari & Velioglu (2006) estudaram o efeito do tipo de solvente utilizado no processo de extração sobre o conteúdo de fenóis e capacidade antioxidante de chá preto e chá mate na Turquia.

Muitos dos princípios ativos em plantas medicinais são compostos fenólicos. Existe um grande número de trabalhos na literatura que descrevem a atividade antioxidante de ervas, plantas medicinais e temperos. Por exemplo: Silva *et al.* (2006) estudaram a correlação entre o conteúdo de fenóis de extratos de própolis brasileiro com a atividade antimicrobiana e capacidade antioxidante. Ainda no Brasil, Silva *et al.* (2007) avaliaram a capacidade antioxidante de quinze espécies de plantas selecionadas provenientes da região da Amazônia e Sousa *et al.* (2007) determinaram o conteúdo de fenóis totais e a capacidade antioxidante de folhas,

cascas e raízes de cinco diferentes espécies de plantas medicinais. Também foi estudada a capacidade antioxidante de vinte e seis extratos de temperos (SHAN *et al.*, 2005).

Sementes são outras fontes naturais de antioxidantes. Jayaprakasha, Singh & Sakariah (2001) estudaram a capacidade antioxidante de sementes de uva frente ao modelo de peroxidação lipídica *in vitro*. Já Sidduraju (2007) avaliou a atividade antioxidante de compostos fenólicos de sementes de tamarindo. Além disso, Soong & Barlow (2004) avaliaram o conteúdo total de fenóis e a capacidade antioxidante de sementes de frutas selecionadas, como: abacate, manga e jaca. Trevisan *et al.* (2006) caracterizaram alquilfenóis de líquido da castanha de caju (*Anacardium occidentale*) e determinaram a sua capacidade antioxidante.

A capacidade antioxidante de outras fontes naturais também tem sido testada. Recentemente, Ferreira *et al.* (2007) estudaram o poder redutor de duas espécies de cogumelos do nordeste de Portugal. Estudos também mostraram a capacidade antioxidante de alguns tipos de dieta seguidas por populações; a capacidade antioxidante da dieta do Mediterrâneo, por exemplo, que presa por uma alimentação rica em frutas e verduras, foi avaliada por Saura-Calixto & Goñi (2006), em Madri, na Espanha. Além disso, foi estudada a capacidade antioxidante de extratos voláteis de produtos da reação de Maillard (OSADA & SHIBAMOTO, 2006), que é decorrente de uma reação não enzimática entre açúcares redutores e aminoácidos ou proteínas em alimentos, após processo de aquecimento a altas temperaturas (FRIEDMAN, 2003). A atividade antioxidante e anti-radicalar da L-carnitina, que é considerada um transportador celular de ácidos graxos de cadeia longa (STEIBER, KERNER & HOPPEL, 2004), foi pesquisada (GÜLÇİN, 2006). Trevisan *et al.* (2006) caracterizaram os óleos essenciais de uma série de plantas da família *Ocimum* usados como temperos e aromatizantes em nutrição e analisaram sua capacidade antioxidante.

Resíduos da agricultura e da indústria alimentícia são fontes naturais atrativas de antioxidantes. Lafka, Sinanoglou & Lazos (2007) observaram uma elevada capacidade antioxidante de compostos fenólicos provenientes de produtos desperdiçados após o processamento de vinho. Já Aldini *et al.* (2006) estudaram a atividade antioxidante de polifenóis provenientes de resíduos sólidos de azeitona e Shui & Leong (2006) avaliaram a capacidade antioxidante de resíduos de

---

carambola. A capacidade antioxidante de bagaços de frutas como de uva (LU & FOO, 1999) e de maçã (LU & FOO, 2000) também foi estudada. Peschel *et al.* (2006) estudaram a capacidade antioxidante e o conteúdo total de fenóis de resíduos de maçã, pêra e alcachofra. Farhoosh, Golmovahhed & Khodaparast (2007) encontraram elevada capacidade antioxidante em folhas de chá e resíduos de chá preto. Já Prakash *et al.* (2007) avaliaram a capacidade antioxidante de sementes e resíduos agrícolas de soja. A **Tabela 1** apresenta os principais resultados encontrados nos estudos citados no presente item.

**Tabela 1.** Fontes naturais de antioxidantes.

Fontes naturais de antioxidantes	Principais resultados	Referência
<b>Frutas e derivados</b>		
Framboesa, amora preta, groselha vermelha, groselha espinhosa e cereja.	Dentre as frutas estudadas, a cereja é considerada aquela com maior fonte de antioxidantes, podendo ser empregada como aditivo alimentar.	Pantedilis <i>et al.</i> , 2007
Ameixa, morango, carambola, goiaba, uva, maçã, manga, kiwi, melão, mamão, abacate, coco, melancia, banana, laranja, sapoti rambutan, entre outras	A capacidade antioxidante das frutas estudadas variou de acordo com a espécie, de 0,06% para sapoti até 70,2% para rambutan.	Leong & Shui, 2002
Baguaçu e jambolão	O extrato metanólico do baguaçu apresentou elevado conteúdo de fenóis (896,7 mg 100g <sup>-1</sup> ) quando comparado com outros frutos em bagas e, também, com o jambolão (229,6 mg 100g <sup>-1</sup> )	Kuskoski <i>et al.</i> , 2006
Laranja, maçã, abacaxi e uva	A vitamina C foi responsável por grande parte da capacidade antioxidante no suco de laranja e menos que 5% no suco da maçã e abacaxi. Nestes últimos, a maior contribuição foi decorrente da quantidade de fenóis.	Gardner <i>et al.</i> , 2000

Polpa congelada de amora, uva, açai, goiaba, acerola, morango, abacaxi, manga, graviola, cupuaçu e maracujá	As polpas congeladas de acerola, açai e de morango foram a que apresentaram os maiores valores de fenóis: 580,1 mg 100g <sup>-1</sup> , 136,8 mg 100g <sup>-1</sup> e 132,1 mg 100g <sup>-1</sup> , respectivamente.	Kuskoski <i>et al.</i> , 2006
Morangos	Morangos estocados entre 5 ou 10°C mostraram elevada capacidade antioxidante, conteúdo total de fenóis e antocianinas, quando comparados com aqueles estocados a 0°C.	Ayala-Zavala <i>et al.</i> , 2004
<b>Vegetais</b>		
Couve, espinafre, cenoura e cebola	Cebola e espinafre apresentaram a maior capacidade antioxidante quando comparados com os outros vegetais estudados.	Ismail, Marjan & Foong, 2004
<b>Bebidas</b>		
Vinho tinto e branco	Foi observado que o vinho vermelho apresenta uma proteção maior à peroxidação lipídica, e isto foi atribuído principalmente ao conteúdo de fenóis das amostras analisadas.	Beer <i>et al.</i> , 2005
Licor de noz verde	A capacidade antioxidante do licor analisado apresentou direta correlação com o conteúdo total de fenóis, total de taninos e não taninos. O estudo mostrou ainda não haver diferença significativa entre licores com tempos de armazenamento diferentes.	Alamprese, Pompei & Scaramuzzi, 2005
Chá-preto e chá-verde	Extratos aquosos de chá-preto e verde mostraram ação capturadora de espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete, ânion superóxido e radical hidroxila.	Thiagarajan <i>et al.</i> , 2001
Chá- preto	O chá-preto mostra ações de inibição da geração de espécies reativas, como também neutralização das mesmas e quelação de metais de transição, ações essas atribuídas, em grande parte, ao conteúdo de catequinas	Luczaj & Skrzydlewska, 2005
Chá-preto e chá mate	Uma mistura contendo 15% do extrato etanólico do chá mate e 50% do extrato de chá-preto em acetona apresentou grande atividade antioxidante. Os resultados mostraram que solventes com diferentes polaridades apresentam efeito significativo sobre o conteúdo de fenóis e a capacidade	Turkmen, Sari & Velioglu, 2006

---

antioxidante das amostras analisadas.

### **Ervas, plantas medicinais e temperos**

- Própolis brasileiro Foi observada uma grande influência dos flavonóides na atividade antioxidante dos extratos de própolis estudados. Silva *et al.*, 2006
- 15 espécies de plantas da Amazônia Foi observada elevada correlação entre a capacidade antioxidante dos extratos destas plantas com o conteúdo total de fenóis. Souza *et al.*, 2006
- Plantas medicinais Todos os extratos apresentaram altos teores de compostos fenólicos quando comparados a dados de outras espécies descritas na literatura. Sousa *et al.*, 2007
- Grão de pimenta, orégano, noz-moscada, entre outros Os resultados encontrados sugerem que muitas das espécies analisadas apresentam alto teor de compostos fenólicos e demonstram boa capacidade antioxidante. Shan *et al.*, 2005

### **Sementes**

- Sementes de uva Os extratos de sementes de uva analisados apresentaram bom poder redutor frente ao método que envolve o ferrocianato de potássio e que os mesmos devem ser explorados para uma futura utilização na preservação de produtos alimentícios. Jayaprakasha & Sakariah, 2001
- Sementes de tamarindo Todos os extratos analisados apresentaram boa atividade antioxidante (64,5-71,1%) frente ao sistema de emulsão que envolve o ácido linoléico e melhor do que o padrão BHA (Hidroxianisol butilado). Siddhuraju, 2007
- Semente de abacate, manga, jaca e tamarindo As sementes apresentaram atividade antioxidante e conteúdo total de fenóis maior do que a porção comestível das respectivas frutas. Está contribuição foi sempre maior que 70%. Soong & Barlow, 2004
- Produtos derivados da castanha de caju Foi observada correlação significativa ( $p < 0,05$ ) entre a capacidade antioxidante e a concentração de alquilfenóis nos extratos estudados. Trevisan *et al.*, 2006

---

### **Outras fontes naturais**

---

---



---

Cogumelos	As duas espécies estudadas ( <i>Lactarius deliciosus</i> (L) Gray e <i>tricholoma portentosum</i> (Fr.)) apresentaram potencial antioxidante, mas a <i>L. deliciosus</i> mostrou-se mais ativa.	Ferreira <i>et al.</i> , 2007
Dieta do mediterrâneo	Foi encontrado uma quantidade de vitaminas C e E que corresponde a 10% das recomendações diárias de consumo. O conteúdo total de fenóis foi estimado em 1171 mg EAG/ pessoa/ dia.	Saura-Calixto & Goñi, 2006
Extratos voláteis de produtos da reação de Maillard	A atividade antioxidante de cada composto presente no extrato analisado não foi elevada. O alto poder antioxidante mostrado pelo extrato foi decorrente da ação sinérgica destes compostos da reação de Maillard.	Osada & Shibamoto, 2006
L-carnitina	A L-carnitina apresentou alta atividade antioxidante frente aos radicais livres DPPH, anion radical superóxido e peróxido de hidrogênio.	Gülçin, 2006
Óleos essenciais de uma série de plantas da família <i>Ocimum</i>	Os resultados sugerem que os óleos essenciais obtidos de várias plantas e temperos podem ser empregados na quimioprevenção do câncer e como alimentos funcionais.	Trevisan <i>et al.</i> , 2006
<b>Resíduos da agroindústria</b>		
Resíduos da vinicultura	O extrato etanólico dos resíduos estudados exibiu elevada atividade antioxidante, quando comparado com os extratos em outros solventes, contra o antioxidante sintético BHT, o palmitato de ascorbila e a vitamina E. Não foi observada correlação positiva entre atividade antioxidante e conteúdo total de fenóis.	Lafka, Sinanoglou & Lazos, 2007
Resíduos sólidos de azeitona	O extrato (1–20 µg/ml) analisado foi pré-incubado em células endoteliais e preveniu a peroxidação lipídica e a morte celular. Os resultados indicam uma grande capacidade antioxidante dos extratos estudados.	Aldini <i>et al.</i> , 2006
Resíduos de carambola	A alta quantidade de fenóis e a elevada capacidade antioxidante dos resíduos estudados indicam que os mesmos poderiam ser empregados como aditivos alimentares.	Shui & Leong, 2006

---



---

---

Bagaço de uva	Foram encontrados 17 tipos de compostos polifenólicos diferentes, dentre eles: ácido gálico, catequina, epicatequina, quercetina, entre outros.	Lu & Foo, 1999
Bagaço de maçã	Todos os compostos antioxidantes encontrados apresentaram elevada atividade antioxidante, sendo a atividade sequestradora de radicais DPPH 2 a 3 vezes e a do anion radical superóxido 10 a 30 vezes maior do que a das vitaminas C e E.	Lu & Foo, 2000
Resíduos de maçã, pêra e alcachofra	Extratos com elevado conteúdo de fenóis e elevada capacidade antioxidante foram encontrados.	Peschel <i>et al.</i> , 2006
Folhas de chá velho e resíduos de chá-preto	O resíduo de chá-preto apresentou maior capacidade antioxidante quando comparado com a folha de chá velho. Os mesmos podem ser utilizados como fontes naturais de antioxidantes.	Farhoosh, Golmovahhed & Khodaparast, 2007
Sementes e resíduos agrícolas de soja	Os extratos das sementes estudadas mostraram variações no conteúdo de fenóis (6,4 a 81,7 mg EAG/g), de flavonóides (3,5 a 44,6 mg QE (quercetina)/g) e atividade antioxidante (7,5% a 74,7%).	Prakash <i>et al.</i> , 2007

---

Este item mostrou a diversidade de estudos sobre a capacidade antioxidante de várias fontes naturais, fortalecendo, assim, o incentivo a uma alimentação equilibrada e diversificada, levando em consideração alimentos de origem vegetal, principalmente aqueles que são fontes de antioxidantes.

## 1.6 ANTIOXIDANTES NA PRÁTICA NUTRICIONAL

O interesse crescente na utilização de nutrientes antioxidantes numa série de condições, incluindo a melhora geral da saúde e o retardo no processo de envelhecimento, tem atraído a atenção da população em geral, que deseja saber quais são os benefícios da ingestão de quantidades elevadas de suplementos antioxidantes. Vários estudos na literatura descrevem o uso de suplementos de antioxidantes em diversas patologias (NERI *et al.*, 2005; BALDWIN *et al.*, 2005; DRISKO, CHAPMAN & HUNTER, 2003).

Quanto ao uso de vitaminas antioxidantes, há um vasto e controverso campo de descoberta. As vitaminas C, E e o  $\beta$ -caroteno têm sido apontados como atuantes

na prevenção de doenças crônicas, em especial doenças cardiovasculares (DCV) e câncer (KALIORA, DEDOUSSIS & SCHMIDT, 2006; LOPACZYNSKI & ZEISEL, 2001). Porém, a literatura nessa área se destaca por resultados controversos em experimentos semelhantes; talvez, em alguns casos, a ânsia em encontrar resultados positivos comprometa o necessário rigor científico das investigações (FUHRMAN, 2000).

Dentre todas as doenças em que o estresse oxidativo causa complicações, as DCV são as que contam com maiores evidências. Supõe-se que as vitaminas E e o  $\beta$ -caroteno possam inibir a oxidação das LDLs (*low-density lipoprotein* ou lipoproteínas de baixa densidade) para a sua forma mais aterogênica e, assim, preservar o endotélio (KALIORA, DEDOUSSIS & SCHMIDT, 2006). Contudo, faltam mais estudos publicados que substanciem a noção de que consumindo mais vitamina C, vitamina E ou  $\beta$ -caroteno (ou outros carotenóides) se reduza o risco de DCV.

Para as vitaminas C e E, foram estabelecidas as recomendações nutricionais diárias considerando a atividade antioxidante além da atividade nutricional, as quais são de 90 mg para homens e 75 mg para mulheres de vitamina C e 15 mg para homens e mulheres de vitamina E (US NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (USA), 2000).

Em relação aos carotenóides, os estudos existentes ainda não foram suficientemente conclusivos para o estabelecimento de recomendações nutricionais, apesar de se saber que tais substâncias influenciam as reações bioquímicas do sistema oxidativo (US NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (USA), 2000).

Para os flavonóides, discute-se, ainda, se os mesmos são nutrientes. Isto, porém, não implica em desconsiderar a relevância de tais substâncias na dieta, bem como sua atividade antioxidante (US NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (USA), 2000).

De acordo com a “American Dietetic Association” (Associação Dietética Americana (1996)), a melhor estratégia nutricional para promover a saúde e reduzir o risco de doenças crônicas é a obtenção de nutrientes de uma grande variedade de alimentos, onde os suplementos vitamínicos e de minerais só seriam apropriados quando bem aceitos pelo paciente e prescritos sob evidências científicas que comprovem sua eficácia e segurança.

## 1.7 MÉTODOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE FENÓIS E DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

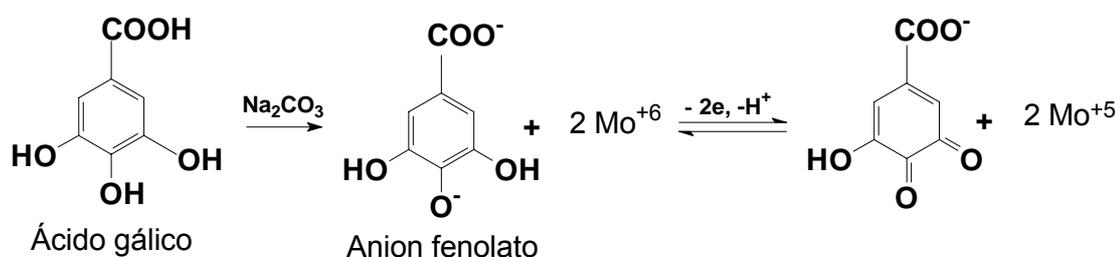
### 1.7.1 CONTEÚDO TOTAL DE FENÓIS

#### 1.7.1.1 MÉTODO DE FOLIN – CIOCAULTEU

A quantificação de compostos fenólicos é realizada por meio de uma variedade de métodos, todavia, o que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu (RFC) é o mais extensivamente utilizado (ABDILLE *et al.*, 2005; BANERJEE, DASGRUPTA & DE, 2005; STRATIL, KLEJDUS & KUBÁN, 2007; DASTMALCHI *et al.*, 2007).

O RFC consiste de mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6<sup>+</sup> (VI); porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 (V) e 6 (VI) e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que, não necessariamente, precisam ter natureza fenólica (HUANG, OU & PRIOR, 2005; SINGLETON, ORTHOFER & LAMUELA-RAVENTÓS, 1999).

A **Figura 8** mostra que em meio básico os compostos fenólicos (no exemplo, o padrão ácido gálico) são desprotonados gerando ânions fenolato. A partir daí, ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o RFC, onde, segundo Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventós (1999) o molibdênio (Mo), componente do reagente de Folin, sofre redução, e o meio reacional muda de coloração amarela para azul.

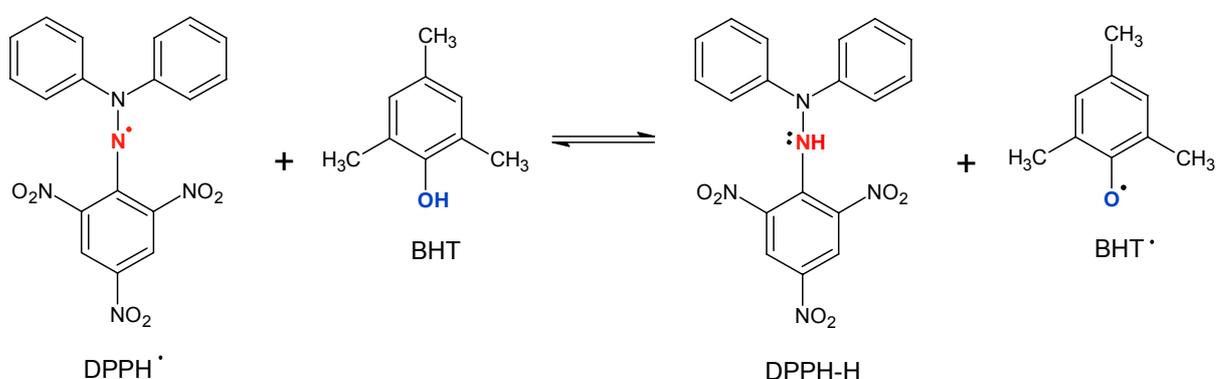


**Figura 8.** Reação do ácido gálico em presença do molibdênio, componente do reagente de Folin - Ciocalteu.

## 1.7.2 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

### 1.7.2.1 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL DPPH<sup>•</sup>

Vários métodos são utilizados para determinar a capacidade antioxidante de extratos e a atividade antioxidante de substâncias isoladas; um dos mais usados consiste em avaliar a atividade seqüestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH<sup>•</sup>), de coloração púrpura, que absorve em um comprimento de onda de 516 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R<sup>•</sup>), o DPPH<sup>•</sup> é reduzido formando difenil-picril-hidrazina (DPPH-H) (**Figura 9**), de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante (quantidade de DPPH<sup>•</sup> consumida pelo antioxidante) ou seqüestradora de RLs e/ou a porcentagem de DPPH<sup>•</sup> remanescente no meio reacional (HUANG, OU & PRIOR, 2005).

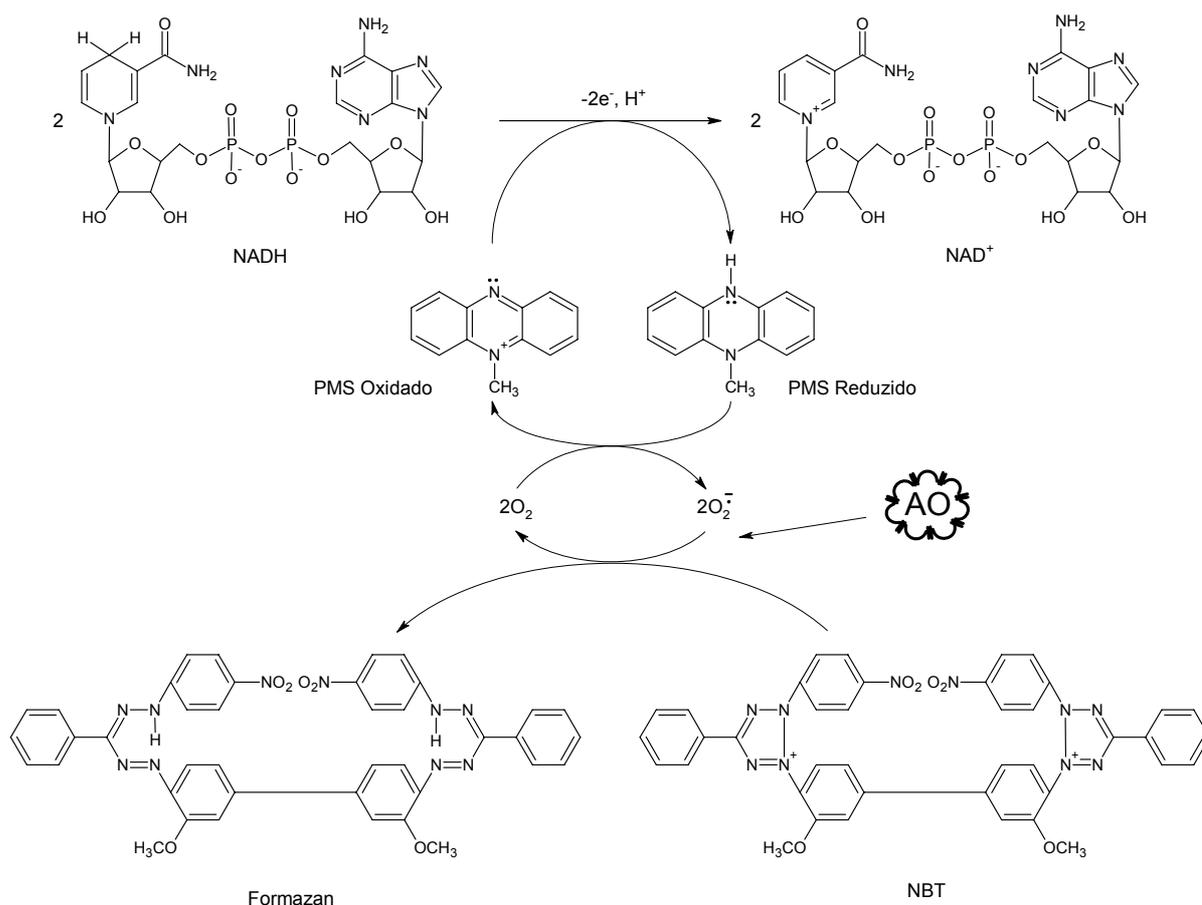


**Figura 9.** Ação antioxidante do BHT frente ao radical DPPH<sup>•</sup>

### 1.7.2.2 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL SUPERÓXIDO

A enzima antioxidante SOD catalisa a conversão do ânion radical superóxido em peróxido de hidrogênio e água (VALKO *et al.*, 2007). Técnicas que utilizam a SOD não são simples, e, além disso, apresentam custo elevado. Diante disto, Ewing

& Janero (1995) desenvolveram um método enzimático indireto de geração de superóxido em microplacas, que se apresenta rápido e econômico. A reação que ocorre neste método está representada na **Figura 10**. Esta reação tem início com a adição de NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) à mistura de PMS (fenazina metassulfato) e NBT (azul de nitrotetrazônio). A partir daí, há geração do ânion radical superóxido. Em seguida, dois ânions radicais superóxido gerados são capazes de doar cada um 1 elétron para o NBT que se reduz a formazan, que é monitorado em um comprimento de onda de 560 nm, em espectrofotômetro. Quando algum antioxidante é adicionado no meio, o mesmo é capaz de reagir com o ânion radical superóxido, diminuindo, dessa forma, a redução do NBT e, conseqüentemente, a formação de formazan.

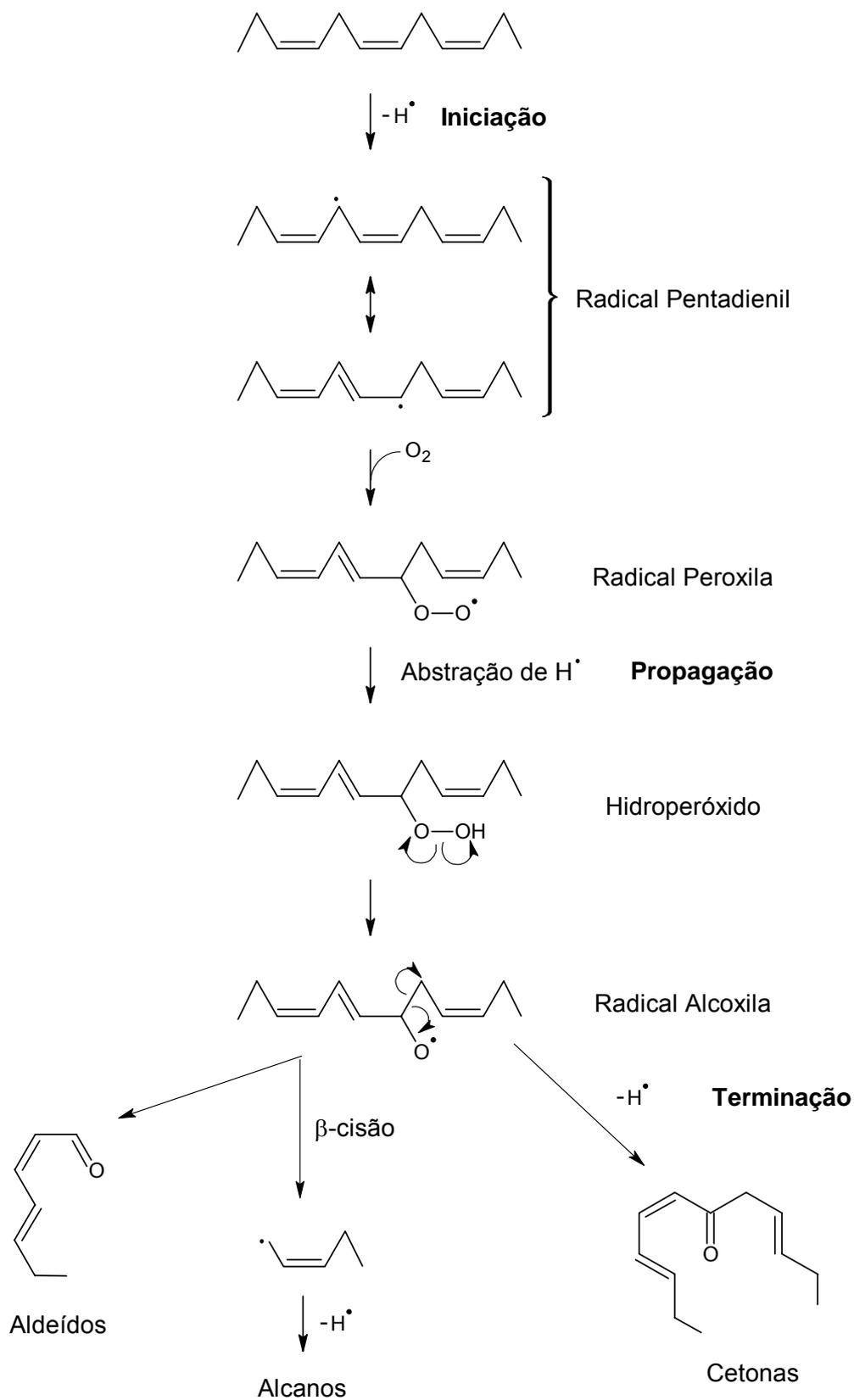


**Figura 10.** Representação esquemática da geração do ânion radical superóxido e ação de um antioxidante presente no meio. AO = antioxidante; NBT = azul de nitrotetrazônio; PMS: fenazina metassulfato; NADH = nicotinamida adenina dinucleotídeo.

### 1.7.2.3 INIBIÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROs, porém, a membrana é um dos mais atingidos, o que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular. A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (NIKI, 2005).

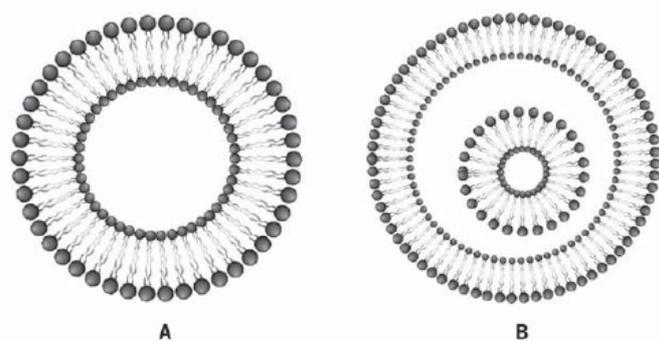
A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (**Figura 11**) (LIMA, CARATIN & SOLIS, 2002). A fase de iniciação representa o início da peroxidação, onde o ácido graxo poli-insaturado sofre ataque de uma espécie que é suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno, formando um radical de carbono. Este radical é estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado, duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples. Em meio aeróbio, o radical de carbono se combina com o oxigênio formando o radical peroxila, o qual pode abstrair um hidrogênio alílico de um outro ácido graxo, gerando outro radical de carbono e promovendo a etapa de propagação. O dieno também pode se combinar com o átomo de hidrogênio abstraído para formar um hidroperóxido lipídico ou atacar uma dupla ligação na mesma cadeia, gerando peróxidos cíclicos. A terceira e última etapa da reação, a fase de terminação, dá-se pela aniquilação dos radicais formados por ação de antioxidantes lipossolúveis, ou pela reação de dois radicais lipídicos, originando produtos não radicalares (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).



**Figura 11. Reações de Peroxidação Lipídica.**

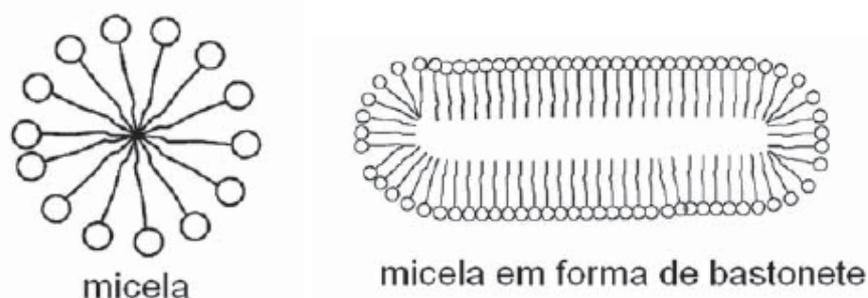
Fonte: Adaptado de HALLIWELL & GUTTERIDGE (2007)

Análises que utilizam a membrana lipídica como alvo de oxidação por espécies reativas têm sido feitas em grande extensão (MAKRIGIORGOS, 1997; ALDINI *et al.*, 2006). Dos diversos modelos de biomembranas desenvolvidos, os lipossomas (**Figura 12**) e as micelas (**Figura 13**) são as estruturas que mostram ser mais adequadas, uma vez que, esses micro-agregados, e em especial, os lipossomas, apresentam o ambiente químico e anisotrópico observado nas membranas biológicas. Além disso, o seu manuseio é mais fácil e mais reprodutível do que a utilização de células ou tecidos animais, já que as micelas e os lipossomas podem ser fácil e homoganeamente preparados e as suas propriedades físicas, bem caracterizadas (MORIGAKI & WALDE, 2007).



**Figura 12.** Lipossomas. A: Lipossoma unilamelar. B: Lipossoma multilamelar.

Fonte: FERREIRA *et al.* (2005)



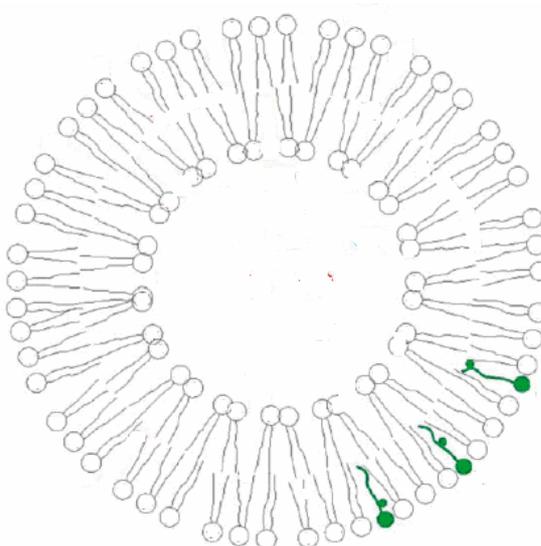
**Figura 13.** Micelas.

Fonte: FERREIRA *et al.* (2005)

A escolha dos surfactantes que formam os lipossomas é mais restrita, pois, embora usem fosfolipídios sintéticos, a preferência vai para os compostos de origem

natural. Os fosfolipídios contendo colina (fosfatidilcolina), geralmente denominados lecitinas, são os mais abundantes na natureza (encontram-se na gema dos ovos e na soja) e constituem o maior componente das membranas naturais, sendo, portanto, muito utilizados na formação de lipossomas para as mais variadas aplicações. Exigem, apenas, alguns cuidados na preparação das vesículas, como evitar exposição à luz e ao oxigênio, uma vez que, os fosfolipídios são sensíveis à temperatura, ao oxigênio/luz e aos agentes oxidantes (LOPES *et al.*, 2006).

Técnicas fluorométricas são frequentemente utilizadas na medida da lipoperoxidação. O método se fundamenta no decaimento da fluorescência emitida por uma sonda acoplada ao lipossoma (**Figura 14**), através do ataque de uma espécie reativa. Após a adição de uma espécie redutora, ou seja, o antioxidante, é observado um menor decaimento da fluorescência. Isto significa que a membrana foi protegida e o antioxidante foi atacado pelas espécies reativas presentes no meio (NAGUIB, 1998).



**Figura 14.** Lipossoma com sonda acoplada em cor verde.

Fonte: FERREIRA *et al.* (2005)

É cada vez mais intensa a busca por alimentos que apresentem, além do valor nutritivo básico, aspectos funcionais (como os antioxidantes) que possam auxiliar na proteção ou tratamento de doenças. Assim, resíduos de frutas que são

desperdiçados no dia-a-dia podem ser uma fonte alternativa na alimentação cotidiana. Porém, antes de serem incorporados ao consumo diário, são necessários estudos que apontem estes aspectos funcionais. Diante do exposto, foram elaborados os objetivos deste trabalho.

## **2. OBJETIVOS**

---

## 2.1 GERAL

Avaliar a capacidade antioxidante de farinhas provenientes de resíduos de frutas tropicais de uma fábrica de suco localizada em Alagoas.

## 2.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar o conteúdo total de fenóis de farinhas de resíduos de acerola, abacaxi e maracujá de uma fábrica de suco de Alagoas;
- ✓ Determinar a capacidade redutora das farinhas de resíduos de acerola, abacaxi e maracujá de uma fábrica de suco de Alagoas, frente ao radical DPPH\*;
- ✓ Determinar a capacidade redutora das farinhas de resíduos de acerola, abacaxi e maracujá de uma fábrica de suco de Alagoas frente ao anion radical superóxido gerado não enzimaticamente;
- ✓ Determinar o poder de inibição da peroxidação lipídica *in vitro* de farinhas de resíduos de acerola, abacaxi e maracujá de uma fábrica de suco de Alagoas.

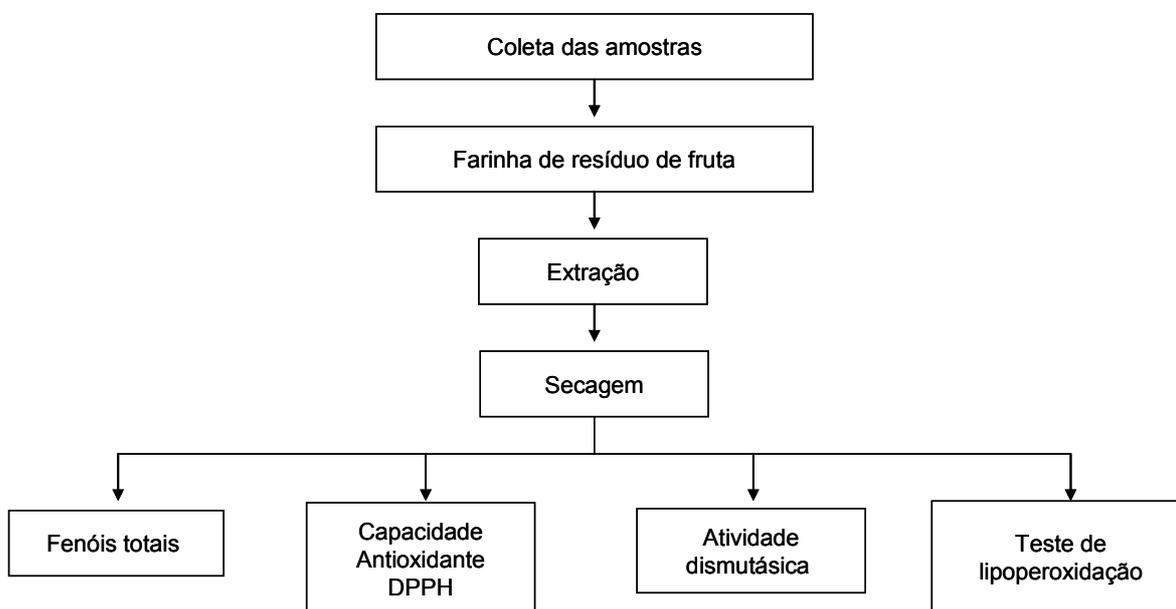
### **3. METODOLOGIA**

---

### 3.1 MATERIAL

Reagente de Folin-Ciocalteu, BHT (butil-hidroxitolueno), fosfatidilcolina de soja e AAPH (2,2 – azobis amidinopropano) da Sigma Aldrich (Brasil); Trolox® (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico), EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético), NBT (azul de nitrotetrazônio), PMS (fenazina metassulfato) e NADH (nicotinamida adenina dinucleotídio) da Acros Organics (Brasil); bicarbonato de sódio da Merck (Brasil); ácido gálico da Vetec Química Fina Ltda (Brasil); DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) da Fluka (Brasil); sonda Bodipy C11<sup>581/591</sup> da Molecular Probes (Canadá) e demais reagentes de grau analítico. As vidrarias utilizadas foram de uso exclusivo, sendo lavadas com acetona, antes e após a sua utilização.

A **Figura 15** mostra a rota experimental simplificada utilizada no presente trabalho.



**Figura 15.** Rota experimental simplificada utilizada neste trabalho

---

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Os resíduos (casca, semente e polpa) de acerola (*Malpighia emarginata*), abacaxi (*Ananas comosus*) e maracujá (*Passiflora alata*) foram coletados na fábrica de suco da Cooperativa Pindorama, no mês de novembro de 2006, e armazenados sob refrigeração até o preparo das farinhas.

A Cooperativa Pindorama, localizada na região sul do estado de Alagoas, é uma cooperativa comandada por pequenos produtores, onde todos os cooperados, além de fornecedores de matéria-prima, são donos do negócio e participam dos lucros. Inaugurada em 1956, é considerada a maior cooperativa agroindustrial do nordeste, com uma área de 32 mil hectares entre os municípios de Feliz Deserto, Penedo e Coruripe (<http://www.cooperativapindorama.com.br>).

A Fábrica de Sucos da Cooperativa Pindorama, René Bertholet, produz sete sabores – abacaxi, goiaba, caju, uva, acerola, maracujá e manga – uma completa linha de produtos derivados do coco, a exemplo do leite de coco em embalagens de 500 mL e 200 mL e do coco ralado em sachês de 50 g e 100 g.

Os sucos de abacaxi, acerola e maracujá são os que apresentam a maior quantidade de resíduos após o processo de fabricação (<http://www.cooperativapindorama.com.br/produtos.htm>).

### 3.2.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

Os resíduos coletados na fábrica de suco Pindorama foram encaminhados ao laboratório de Solos e Adubação, localizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), onde se procedeu ao processamento das farinhas estudadas, sob a supervisão do Prof. Cícero Alexandre da Silva.

Os resíduos das frutas foram lavados com água destilada. Em seguida, colocados em estufa a 60 °C por 72 h e depois triturados em moinho. Por fim, as

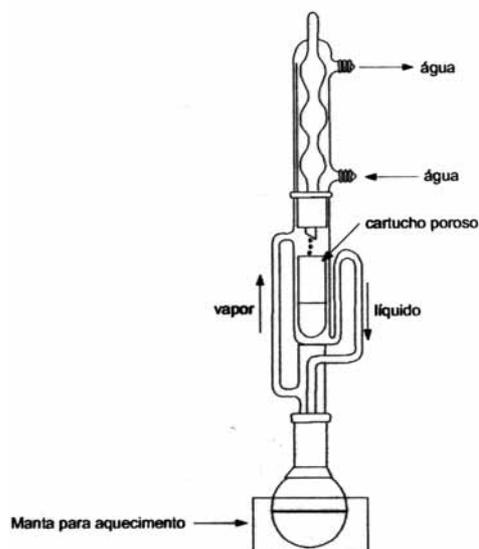
---

respectivas farinhas foram colocadas em sacos plásticos e armazenadas à temperatura ambiente.

### 3.2.3 EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os extratos das farinhas de resíduos de frutas foram feitos no Laboratório de Eletroquímica da UFAL, através da técnica de extração em aparelho do tipo Soxhlet (**Figura 16**), como descrito por AOAC (“Association of Official Analytical Chemists” ou Associação de Químicos Analíticos Oficiais) (1990). A extração foi feita utilizando solventes apolares (hexano) até polares (acetato de etila, clorofórmio e metanol), com o objetivo final de obtenção de um extrato solúvel em água sem interferentes, como, por exemplo, ácidos graxos de cadeia longa, que poderiam formar emulsões.

Foram pesados 22 g de cada farinha estudada e colocados em um cartucho poroso de celulose na câmara do extrator. Em seguida, foram medidos 150 mL de hexano e colocados em um balão de fundo chato, que foi acoplado ao extrator. A extração foi seguida por 4 h a 60 °C. O material extraído foi colocado em um rota-evaporador a 60 °C, para eliminação do solvente. Após esta etapa, 10 mL de hexano foram adicionados ao extrato seco, presente no balão, e com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, o mesmo foi retirado e colocado em um vidro âmbar. O extrato hexânico foi seco novamente em nitrogênio gasoso e armazenado sob refrigeração. Este mesmo procedimento foi repetido, utilizando a mesma amostra de farinha, para o clorofórmio, acetato de etila e metanol, em sequência.



**Figura 16.** Aparelho de Soxhlet.

**Fonte:** <http://www.qmc.ufsc.br/organica/exp7/solido.html>

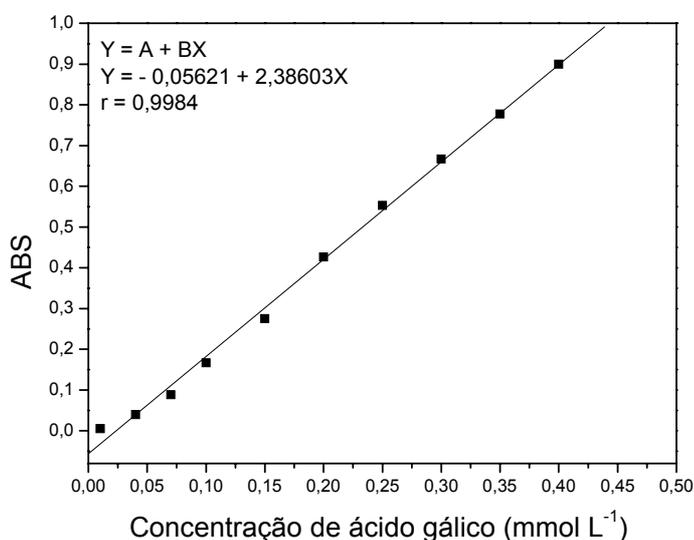
### 3.2.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE FENÓIS

#### 3.2.4.1 MÉTODO DE FOLIN – CIOCAULTEU

A determinação do conteúdo total de fenóis das amostras foi feita no laboratório de Eletroquímica da UFAL.

A concentração dos compostos fenólicos dos extratos metanólicos das farinhas de resíduos de frutas foi determinada utilizando o método do reagente de Folin-Ciocalteu (RFC), como descrito por Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventós (1999), com algumas modificações. Os extratos foram diluídos em água Milli Q ( $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Uma amostra de  $0,5 \text{ mL}$  de cada solução de extrato ou de água Milli Q (branco) foi misturada vigorosamente com  $0,5 \text{ mL}$  de RFC, em um balão volumétrico de  $5 \text{ mL}$ . Após 3 minutos,  $0,5 \text{ mL}$  de bicarbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) saturado (20%) foi adicionado à mistura e o volume foi completado com água milli Q. Então, o balão foi deixado no escuro, à temperatura ambiente, por 2 h, para que a reação ocorresse na ausência de luz. Em seguida, uma alíquota de  $1 \text{ mL}$  do produto reacional foi colocado em uma cubeta de quartzo (capacidade =  $1 \text{ mL}$ ; caminho óptico =  $1 \text{ cm}$ ) e

medida a absorvância a 760 nm, usando espectrofotômetro (UV-vis modelo Mutispec - 1501 Shimadzu, Japão). O teor de fenóis totais foi obtido a partir de uma curva de calibração realizada com ácido gálico (0,01- 0,4 mmol L<sup>-1</sup>) (**Figura 17**) e expresso como massa de equivalentes de ácido gálico por massa de extrato seco (mg de EAG/g).



**Figura 17.** Curva de calibração com o ácido gálico. Medidas em absorvância,  $\lambda = 760$  nm, do complexo formado entre o reagente de Folin-Ciocalteu e o padrão ácido gálico. Experimento realizado em triplicata.

### 3.2.5 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL DPPH<sup>•</sup>

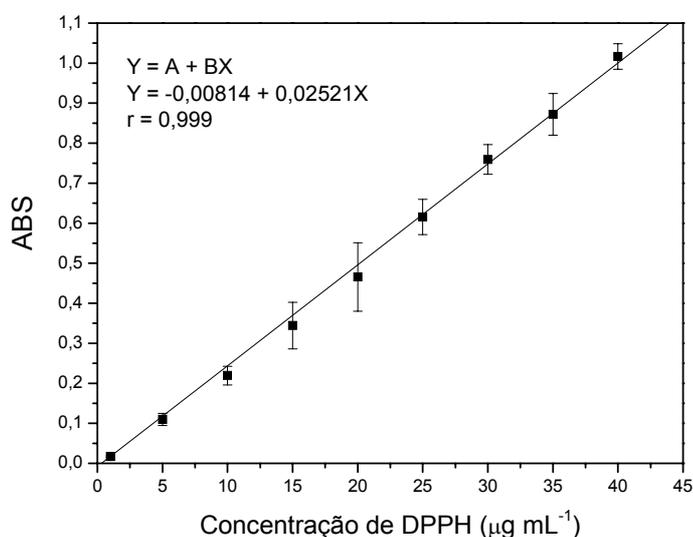
O poder redutor das amostras analisadas frente ao radical DPPH<sup>•</sup> foi determinado no laboratório de Eletroquímica da UFAL.

A avaliação da capacidade antioxidante dos extratos metanólicos das farinhas estudadas foi feita de acordo com Saánchez-Moreno, Larrauri & Saura-Calixto (1999), com algumas modificações. A capacidade antioxidante foi determinada

monitorando-se a reação entre o radical livre DPPH<sup>•</sup> e as amostras, através da medida do decréscimo da absorbância a 516 nm em espectrofotômetro (UV-vis modelo Mutispec - 1501 Shimadzu, Japão).

### 3. 2.5.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO

A curva de calibração do DPPH<sup>•</sup> foi construída numa faixa de concentração de 1 a 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Primeiramente, foram preparados 25 mL de solução estoque de DPPH<sup>•</sup> em metanol (40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), que foi mantida sob refrigeração e protegida da luz. Em seguida, foram feitas diluições de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O metanol foi utilizado como branco. A curva de calibração (**Figura 18**) foi construída segundo valores de absorbância a 516 nm das soluções preparadas nas diferentes concentrações estabelecidas.



**Figura 18.** Curva de calibração do DPPH<sup>•</sup>. Medida em absorbância a  $\lambda = 516$  nm. Experimento realizado em triplicata.

### 3.2.5.2 MEDIDAS DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS

Soluções metanólicas dos extratos metanólicos das farinhas de resíduos de frutas e dos controles positivos (BHT e ácido gálico) foram preparadas nas concentrações de 25, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As medidas das absorvâncias das misturas reacionais (0,3 mL da solução da amostra ou do controle positivo e 2,7 mL da solução estoque de DPPH $^{\bullet}$  na concentração de 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram feitas a 516 nm, no 1 $^{\text{o}}$ , 5 $^{\text{o}}$ , 10 $^{\text{o}}$ , 15 $^{\text{o}}$ , 20 $^{\text{o}}$ , 25 $^{\text{o}}$ , 30 $^{\text{o}}$ , 40 $^{\text{o}}$  e 50 $^{\text{o}}$  minuto. Para cada amostra e padrão analisados foi primeiramente feito um branco com 0,3 mL do extrato metanólico da amostra ou do padrão e 2,7 mL de metanol.

A partir da equação da curva de calibração e dos valores de absorvância no tempo t para cada concentração testada, foram determinados os percentuais de DPPH $^{\bullet}$  remanescentes (% DPPH $_{\text{REM}}$ ), conforme a **Equação 9**:

$$\% \text{ DPPH}_{\text{REM}} = [\text{DPPH}]_{\text{T=t}} / [\text{DPPH}]_{\text{T=0}} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

Onde,  $[\text{DPPH}]_{\text{T=t}}$  corresponde à concentração de DPPH $^{\bullet}$  no tempo t após a reação com o extrato e como os padrões e  $[\text{DPPH}]_{\text{T=0}}$  é referente à concentração inicial de DPPH $^{\bullet}$ , ou seja, 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (HUANG, OU & PRIOR, 2005).

A atividade antioxidante (AA) em percentagem foi calculada através da **Equação 10**, para um tempo de 30 minutos.

$$\% \text{ AA} = [(\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}) / \text{Abs}_{\text{controle}}] \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

Onde,  $\text{Abs}_{\text{controle}}$  é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH $^{\bullet}$  e  $\text{Abs}_{\text{amostra}}$  é a absorvância da mistura reacional (DPPH $^{\bullet}$  + amostra) (GULÇIN *et al.*, 2006).

### 3.2.6 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL SUPERÓXIDO

A capacidade antioxidante das amostras estudadas frente ao radical superóxido foi feita no Laboratório de Radicais Livres e Bioluminescência, localizado no Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo (USP), sob a supervisão do Prof. Etelvino Bechara.

A determinação da capacidade antioxidante dos extratos metanólicos das farinhas de resíduos de frutas foi determinada segundo Ewing & Janero (1995), com algumas alterações. O sistema reacional completo (volume total de 250  $\mu\text{L}$ ) consistiu em tampão fosfato pH 7,4 (0,1 M), contendo 0,1  $\text{mmol L}^{-1}$  de EDTA, 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  NBT, 78  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de NADH e 3,3  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de PMS (concentrações finais). Para isto, primeiramente, foi preparada uma solução, denominada de solução A, contendo 13,1 mg de NBT e 1,2 mg de EDTA, diluídos em 40 mL de tampão fosfato pH = 7,4 (0,1  $\text{mol L}^{-1}$ ). Em seguida, foram pesados 1,4 mg de NADH e dissolvidos em 10 mL de tampão fosfato pH = 7,4 (0,1  $\text{mol L}^{-1}$ ). Por fim, foram pesados 2,5 mg de PMS e dissolvidos em 500  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 7,4 (50  $\text{mmol L}^{-1}$ ). Desta solução, foi retirada uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  e adicionada a 9,9 mL de tampão fosfato pH = 7,4 (50  $\text{mmol L}^{-1}$ ). Foram adicionados em microplacas, 150  $\mu\text{L}$  da solução A, 25  $\mu\text{L}$  de metanol (branco) ou 25  $\mu\text{L}$  de amostra e 25  $\mu\text{L}$  de PMS. A reação foi iniciada com a adição de 50  $\mu\text{L}$  de solução de NADH. A absorbância foi monitorada continuamente através do surgimento de formazan, produto formado da redução do NBT, a 560 nm, em um tempo de 5 minutos, usando leitor de microplacas (Spectra Max 250®/Molecular Devices), no modo cinético.

### 3.2.7 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS COMO INIBIDORAS DA LIPOPEROXIDAÇÃO

A presente técnica foi feita no Laboratório de Radicais Livres e Bioluminescência, localizado no Departamento de Bioquímica da USP, sob a supervisão do Prof. Etelvino Bechara.

Neste experimento, realizado segundo Drummen *et al.* (2002), lipossomas de fosfatidilcolina de soja (6 – 8 % de insaturações) foram preparados, com o intuito de

simular uma membrana celular. Nesta preparação, foi adicionada uma sonda fluorescente, que, através de seu monitoramento, fornece informações sobre a integridade da membrana.

O azo composto AAPH foi utilizado como gerador de radical peroxila. Através deste estudo, mediu-se a capacidade das amostras em inibir a peroxidação lipídica frente ao radical peroxila.

### 3.2.7.1 PREPARO DO LIPOSSOMA COM A SONDA FLUORESCENTE

Em um tubo de ensaio, foram pesados 7,5 mg de fosfatidilcolina de soja e adicionados 2 mL de tampão fosfato pH 7,4 e 77  $\mu\text{L}$  da sonda C11- Bodipy<sup>581/591</sup> e, então, agitado com o auxílio de um agitador de tubos de ensaio. Nesta etapa, ocorre a formação dos lipossomas multilamelares. O volume do tubo de ensaio foi completado para 10 mL com tampão fosfato. Em seguida, foi montado um extrusor com poros de 100 nm de diâmetro da Avanti Polar Lipids®, e os lipossomas multilamelares formados foram colocados em uma seringa que foi acoplada ao extrusor. Os lipossomas foram passados por 15 vezes pelo extrusor, formando assim os lipossomas unilamelares com 120 nm de diâmetro. Por fim, os lipossomas unilamelares foram colocados em vidro âmbar e armazenados sob refrigeração.

### 3.2.7.2 MONITORAMENTO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Foram preparadas soluções aquosas das amostras dos extratos metanólicos das farinhas ( $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ), do trolox (controle positivo) ( $1, 3 \text{ e } 5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e do AAPH em tampão fosfato ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e mantidas protegidas da luz, sob refrigeração. Em seguida, foram adicionados, em uma cubeta, 800  $\mu\text{L}$  dos lipossomas com a sonda, 50  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato pH 7,4 e 50  $\mu\text{L}$  da amostra ou trolox. A cubeta foi, então colocada em um fluorímetro (Spex Fluorolog - 1681®) acoplado a um banho maria à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Para o início da reação, 100  $\mu\text{L}$  do AAPH foram adicionados, completando o volume para 1 mL. A medida do decaimento ( $\lambda_{\text{excitação}} = 580 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emissão}} = 600 \text{ nm}$ ) da fluorescência foi feita em uma cinética de 30 minutos. Foi

utilizada como branco uma solução de 800  $\mu\text{L}$  do lipossoma com a sonda, 100  $\mu\text{L}$  do tampão e 100  $\mu\text{L}$  do AAPH.

### 3.2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados mostrados no presente trabalho correspondem à média de três repetições ( $n=3$ )  $\pm$  desvio - padrão da média ou porcentagem (%). Foram considerados estatisticamente diferentes, os resultados do conteúdo de fenóis e da capacidade antioxidante que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ( $p < 0,05$ ). Foi utilizado o qui-quadrado para comparação de frequências ou porcentagens e o Teste- $t$  ou análise multivariada para comparação de duas ou mais de duas médias, respectivamente. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa Microcal Origin® 7.0 e do Epi Info® version 6.04d (2001).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

A eficiência antioxidante de compostos bioativos em alimentos de origem vegetal depende de sua estrutura e da sua concentração no alimento. Por sua vez, a quantidade destas substâncias em vegetais é amplamente influenciada por fatores genéticos, condições ambientais, além do grau de maturação e variedade da planta, entre outros aspectos. Sabe-se, ainda, que a atividade antioxidante é influenciada pelo substrato utilizado no ensaio, pelo solvente e pela técnica de extração utilizada, bem como pelo binômio tempo-temperatura. No que se refere aos solventes orgânicos, o metanol, por conseguir extrair elevada quantidade de compostos bioativos, tem sido apontado como o mais efetivo (NACZK & SHAHIDI, 2004; MOURE *et al.*, 2001).

Em decorrência da grande diversidade química existente, em especial entre os compostos fenólicos, vários ensaios têm sido desenvolvidos para avaliação da capacidade antioxidante de amostras. Alguns deles determinam a habilidade dos antioxidantes em seqüestrar espécies reativas geradas no meio reacional. Outros avaliam a eficiência dos antioxidantes em inibir a peroxidação lipídica por meio da quantificação dos produtos da reação, como dienos conjugados e hidroperóxidos, bem como dos produtos da decomposição da peroxidação lipídica, ou ainda, medindo a inibição da oxidação do lipídio do sistema pelo antioxidante a ser testado. Não obstante a diversidade de métodos para avaliar a capacidade antioxidante, não existe um procedimento metodológico universal (HUANG, OU & PRIOR, 2005; HALLIWELL, 1995; NIKI *et al.*, 2005). Este fato impõe a necessidade de avaliar a capacidade antioxidante por diferentes ensaios, com fundamentos e mecanismos de ação diferentes.

#### **4.1 CONTEÚDO TOTAL DE FENÓIS**

Sabe-se que os compostos fenólicos são importantes constituintes de vegetais como as frutas (DIMITRIOS, 2006). O conhecimento de alimentos fontes destes compostos pode direcionar a uma melhor orientação nutricional, principalmente em pacientes que apresentam patologias associadas ao desbalanço redox ou na prevenção, em populações saudáveis. Por isso, é importante analisar o

conteúdo total de fenóis das farinhas de resíduos de frutas, já que as mesmas poderão ser incorporadas à alimentação cotidiana, adicionadas, por exemplo, a farinha de mandioca, que faz parte do hábito alimentar da população nordestina ou sendo utilizadas como aditivos alimentares, aumentando a vida de prateleira de alimentos.

A **Tabela 2** apresenta os resultados do conteúdo total de fenóis dos extratos metanólicos da farinha de resíduos de acerola (FRAC), farinha de resíduos de abacaxi (FRAB) e farinha de resíduos de maracujá (FRMA). Estes resultados estão expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico/ grama de extrato seco (mg EAG/ g de extrato seco) e em miligramas de equivalentes de ácido gálico/ 100 gramas de farinha (mg EAG/ 100g de farinha). O ácido gálico é o padrão comumente utilizado para o teste do reagente de Folin-Ciocalteu (RFC).

**Tabela 2.** Rendimento (%) do processo de extração e conteúdo total de fenóis em extratos metanólicos de farinhas de resíduos de acerola, abacaxi e maracujá.

Extratos metanólicos das farinhas	Rendimento (%)	Total de fenóis (mg EAG/ g de extrato seco)	Total de fenóis (mg EAG/ 100 g de farinha)
FRAC	7,1	94,59 ± 7,44a	681,02 ± 53,55b
FRAB	30,2	9,10 ± 1,26a	274,91 ± 37,97b
FRMA	2,5	41,24 ± 4,16a	103,10 ± 10,4b

Médias com mesma letra apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA).

Observa-se que o conteúdo total de fenóis do extrato metanólico (mg EAG/ g extrato seco) da FRAC foi duas vezes maior do que o do extrato metanólico da FRMA e dez vezes maior do que o da FRAB ( $p < 0,01$ ) (**Tabela 2**, coluna 3). Quando estes valores foram convertidos para 100g de farinha de cada fruta (**Tabela 2**, coluna 4), levando-se em consideração o rendimento do processo de extração (**Tabela 2**, coluna 2), foi observado que a FRAB superou o conteúdo total de fenóis da FRMA. Este aspecto se torna importante na hora de uma prescrição dietética dessas farinhas, visto que a FRAB seria mais recomendada, em detrimento da de maracujá. Aspectos importantes como biodisponibilidade destes fenóis no organismo humano devem ser investigados.

Existem outros agentes redutores que poderiam promover a redução do molibdênio presente no RFC, como, por exemplo, o ácido ascórbico, que apesar de não ser um “fenol”, é um enol, com propriedades semelhantes. Isso poderia justificar, em parte, o alto conteúdo de “fenóis” no extrato da FRAC, visto que a casca desta fruta é rica em tal constituinte (CHAVES *et al.*, 2004). Segundo Philippi (2002), dados de composição química de vitamina C destas frutas seguem a seguinte ordem: 1.677,5 mg/ 100 g de acerola; 30,0 mg/ 100g de maracujá e 15,4 mg/ 100 g de abacaxi. Assim, como a FRAC é composta, em grande parte, da casca da fruta, isto poderia justificar o maior valor encontrado neste estudo. Li *et al.* (2006) avaliaram a quantidade total de fenóis da polpa, casca e sementes da fruta romã e encontraram a casca como maior fonte dos mesmos. Este fato poderia também explicar os valores encontrados para a farinha de acerola.

Além da vitamina C, outros compostos não fenólicos, como os glicídios, podem ser capazes de reduzir o RFC (STRATIL, KLEJDUS & KUBÁN, 2007). Os frutos carnosos, como a acerola, têm como característica comum sua riqueza em açúcares (OLIVEIRA, BASTOS & FEITOSA, 1999). As pentoses e, mais concretamente, as riboses são açúcares redutores mais reativos. As hexoses (glicose, frutose) são um pouco menos reativas e os dissacarídeos redutores (lactose, maltose), menos ainda (HARRIS, 2002).

Para fins de comparação, a **Tabela 3** mostra o conteúdo total de fenóis de extratos metanólicos de resíduos de maçã, morango, pêra, carambola, uva e das frutas acerola e abacaxi, bem como das respectivas polpas das duas últimas frutas e também da polpa de maracujá.

Como pode ser visto na **Tabela 3**, os valores encontrados para o conteúdo total de fenóis de resíduos de diferentes frutas foram significativamente menores ( $p < 0,05$ ) do que o do extrato seco da FRAC do presente estudo. Já o extrato seco da FRMA apresentou conteúdo de fenóis maior do que o extrato seco de resíduo de pêra ( $p = 0,000047$ ) e o extrato seco de resíduo de carambola ( $p = 0,000000$ ). Em relação às frutas abacaxi e acerola (resultados expressos em mg EAG/ 100 g da fruta fresca), pode-se observar que a FRAB apresentou valores maiores ( $p < 0,01$ ) do que os da sua respectiva fruta e polpa, enquanto que a FRAC superou apenas os valores referentes à polpa da mesma fruta. Não foi encontrado na literatura dados de

conteúdo total de fenóis da fruta maracujá, apenas da sua polpa, que apresentou valores significativamente menores ( $p < 0,01$ ) do que os da farinha de resíduo de maracujá do presente estudo.

**Tabela 3.** Conteúdo total de fenóis em resíduos, frutas e polpas.

Resíduos, frutas e polpas	Total de fenóis	Referência
Resíduos de maçã	52,18 ± 4,80*	Peschel <i>et al.</i> 2006
Resíduos de morango	59,77 ± 4,24*	Peschel <i>et al.</i> 2006
Resíduos de pêra	18,41 ± 2,12*	Peschel <i>et al.</i> 2006
Resíduos de carambola	32,2 ± 3,6*	Shui & Leong, 2006
Resíduos de uva	2,77 ± 0,23*	Lafka, Sinanoglou & Lazos, 2007
Abacaxi	2,58 ± 0,05**	Gorinstein <i>et al.</i> , 1999
Abacaxi	40,4 ± 1,0**	Sun <i>et al.</i> , 2002
Acerola	896 – 1888**	Lima <i>et al.</i> , 2005
Polpa de abacaxi	21,7 ± 4,5**	Kuskoski <i>et al.</i> , 2006
Polpa de acerola	580,1 ± 4,6**	Kuskoski <i>et al.</i> , 2006
Polpa de maracujá	20,0 ± 2,6**	Kuskoski <i>et al.</i> , 2006

\* mg EAG (equivalentes de ácido gálico)/ g de extrato seco

\*\* mg EAG (equivalentes de ácido gálico)/ 100 g da fruta fresca

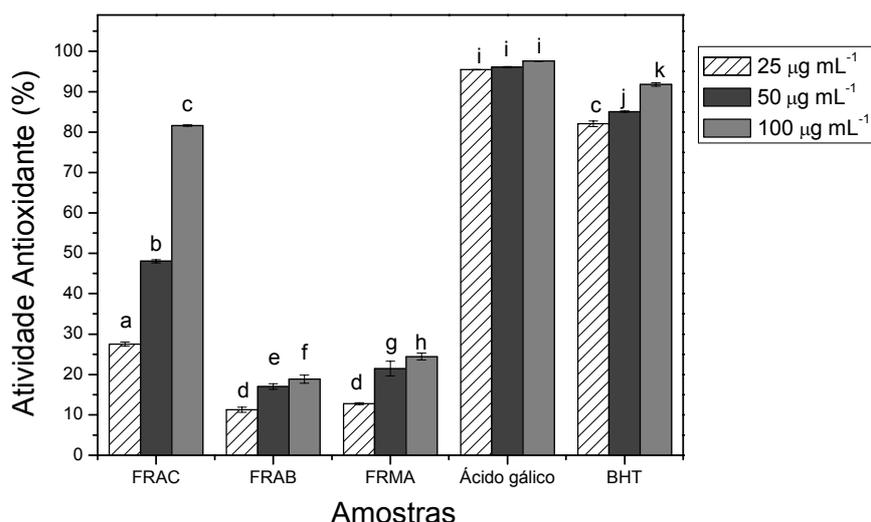
Esta análise mostrou que, mesmo após a técnica de extração utilizada e o processamento para fabricação das farinhas, ainda existem espécies com capacidade redutora para o RFC. Isto evidencia que resíduos da agroindústria podem ser aproveitados, evitando o grande desperdício, que é comum no setor da indústria de sucos.

Como citado, o conteúdo total de fenóis obtido pelo método de Folin-Ciocalteu não é específico, porque este pode sofrer a ação de interferentes contidos nas amostras analisadas. Diante disto, outros métodos são importantes para confirmação da capacidade antioxidante *in vitro* de amostras de produtos naturais.

## 4.2 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL DPPH<sup>\*</sup>

O método de captura de radicais sintéticos DPPH<sup>\*</sup> é comumente empregado na verificação da habilidade de seqüestro de RLS por antioxidantes. O uso do RL DPPH<sup>\*</sup> é vantajoso na análise da eficiência de um antioxidante porque ele é mais estável do que os radicais hidroxila e superóxido (HUANG, OU & PRIOR, 2005).

Os resultados da avaliação quantitativa da capacidade antioxidante de soluções metanólicas dos extratos das farinhas provenientes dos resíduos das frutas acerola (FRAC), abacaxi (FRAB) e maracujá (FRMA) e dos controles ácido gálico e BHT, nas concentrações 25, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , determinada pelo ensaio do DPPH<sup>\*</sup>, estão apresentados na **Figura 19**.



Porcentagens com letras diferentes apresentam diferença significativa,  $p < 0,05$ .

**Figura 19.** Porcentagem da capacidade antioxidante do extrato metanólico de farinhas provenientes das frutas acerola (FRAC), abacaxi (FRAB) e maracujá (FRMA) e atividade antioxidante dos controles ácido gálico e BHT, nas concentrações 25, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Tempo de reação: 30 min. Experimento realizado em triplicata.

Os resultados mostram que todos os extratos metanólicos das farinhas têm atividade seqüestradora do radical DPPH<sup>\*</sup>. Os extratos de FRAB e FRMA apresentaram capacidade antioxidante abaixo de 25% nas três concentrações

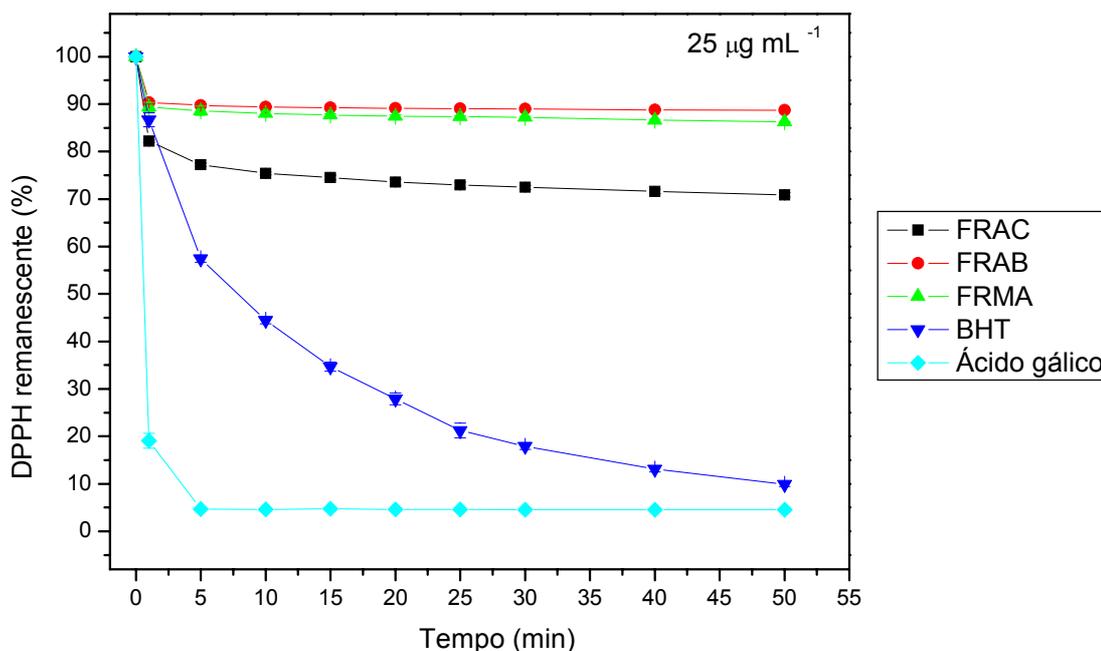
estudadas, e a capacidade antioxidante aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) com o aumento da concentração de extrato; entretanto, este aumento não foi de forma acentuada. Para o extrato de FRAC, a capacidade antioxidante aumentou de forma considerável com o aumento da concentração de extrato no meio, alcançando um valor de 81,6% para a concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Nota-se que nesta concentração, a capacidade antioxidante do extrato de FRAC se aproxima da atividade antioxidante do padrão BHT, porém com diferença significativa ( $p = 0,000000$ ), em um tempo de reação de 30 minutos. O BHT é um composto fenólico sintético amplamente utilizado na indústria de alimentos como aditivo alimentar lipossolúvel. Entretanto, não se sabe o quanto este antioxidante é seguro com relação à saúde da população consumidora. Alguns estudos (WILLIAM, IATROPOULOS & WHYSNER, 1999) mostraram efeitos carcinogênicos em ratos após a sua administração. Por isso, tem-se investigado antioxidantes de fontes naturais que possam ser utilizados na conservação de alimentos pela indústria, principalmente, os de natureza hidrossolúvel. Por exemplo, Ribeiro, Bernardo-Gil & Esquivel (2001) avaliaram a capacidade antioxidante *in vitro* do fitoterápico *Melissa officinalis*, visando tal substituição.

Em resíduos de frutas, Shui & Leong (2006) estudaram resíduos de carambola de uma fábrica de suco em Singapura e observaram que os mesmos têm um poder de proteção, com relação ao processo de rancificação, de óleos de soja, superior ao BHT. Este resultado abre possibilidades futuras de uso das presentes farinhas como aditivos alimentares.

Outro ponto que é importante para avaliação de um antioxidante é o comportamento cinético da reação do DPPH<sup>•</sup> com cada extrato estudado. As **Figuras 20, 21 e 22** mostram o percentual de DPPH<sup>•</sup> remanescente (%) em função do tempo (min) da reação do DPPH<sup>•</sup> com as amostras e os controles, nas concentrações de 25, 50 e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

A **Figura 20** mostra que no primeiro minuto de reação em uma concentração de  $25 \mu\text{g L}^{-1}$ , o ácido gálico consome mais de 80% do DPPH<sup>•</sup> presente no meio, enquanto que o BHT alcançou este percentual após 25 minutos. De acordo com a literatura, este resultado já era esperado (FUJISAWA, KADOMA & YOKOE, 2004).

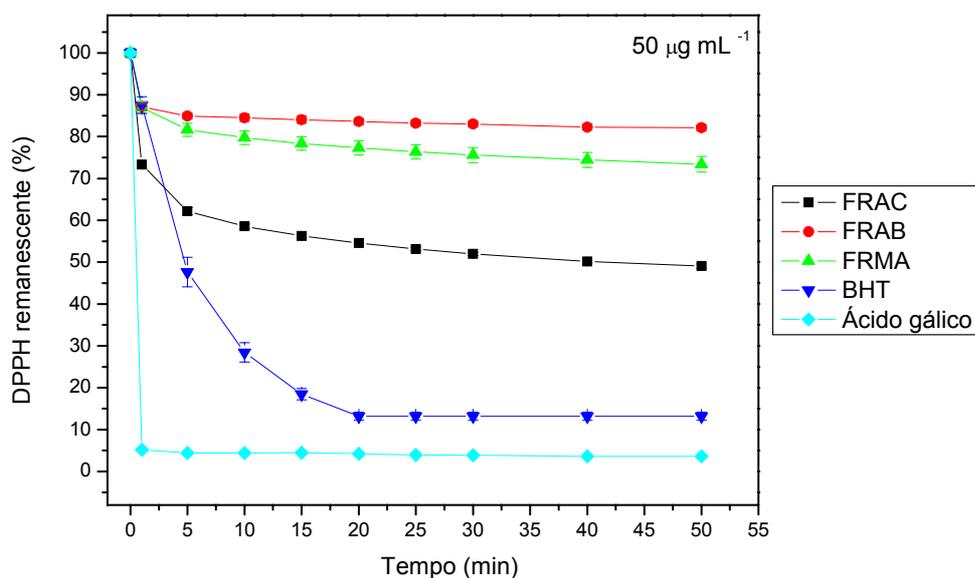
Para as amostras estudadas, observa-se que os extratos das FRMA e FRAB consumiram em torno de 10% de DPPH<sup>\*</sup> no primeiro minuto e mantiveram-se constantes até o final do experimento. Já o extrato da FRAC apresentou um consumo acima de 20% de DPPH<sup>\*</sup> para este mesmo período de tempo ( $p < 0,05$ ).



**Figura 20.** Comportamento cinético dos extratos metanólicos ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) frente ao DPPH<sup>\*</sup>. FRAC = farinha de resíduo de acerola; FRAB = farinha de resíduo de abacaxi; FRMA = farinha de resíduo de maracujá e BHT = Butil-hidroxitolueno. Experimento feito em triplicata.

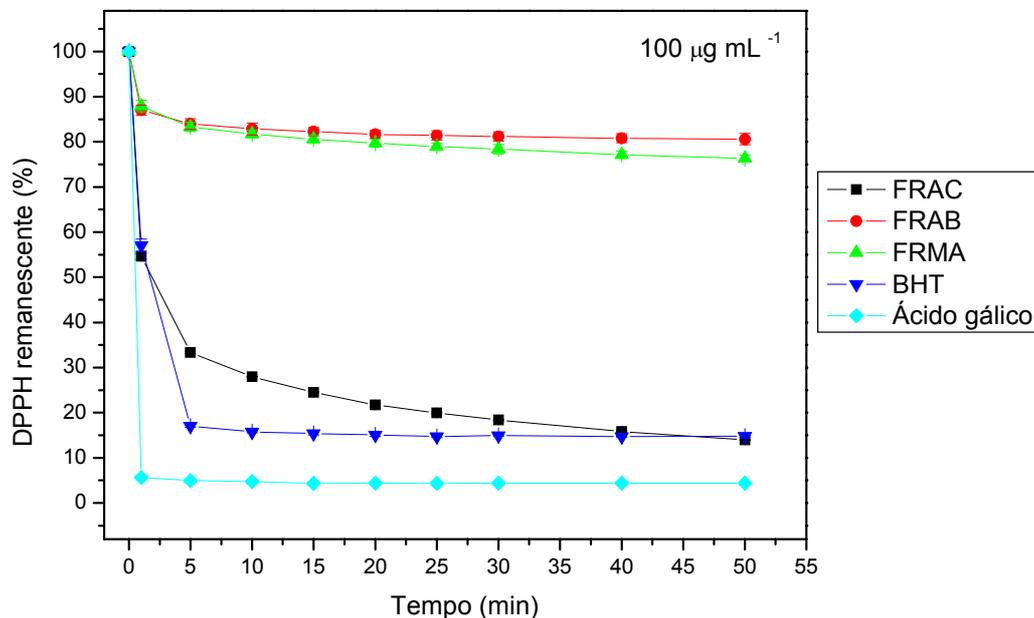
A mesma análise foi feita para a concentração de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  e é mostrada na **Figura 21**. Nesta reação, o ácido gálico consome quase que 100% de DPPH<sup>\*</sup> no primeiro minuto da cinética e o BHT alcança um pouco mais de 80% de consumo de DPPH<sup>\*</sup>, em torno dos 20 minutos de reação e permanece constante até o final do tempo estabelecido. Em relação aos extratos de farinhas estudados, os de resíduo de abacaxi e de maracujá consumiram em torno de 20% do DPPH<sup>\*</sup> presente no meio e o extrato de FRAC quase 50%, para os 50 minutos de reação. Nesta concentração estudada, também pode ser observado que não houve diferença

significativa entre os extratos de FRAB e FRMA ( $p > 0,05$ ) no tempo de cinética estudado.



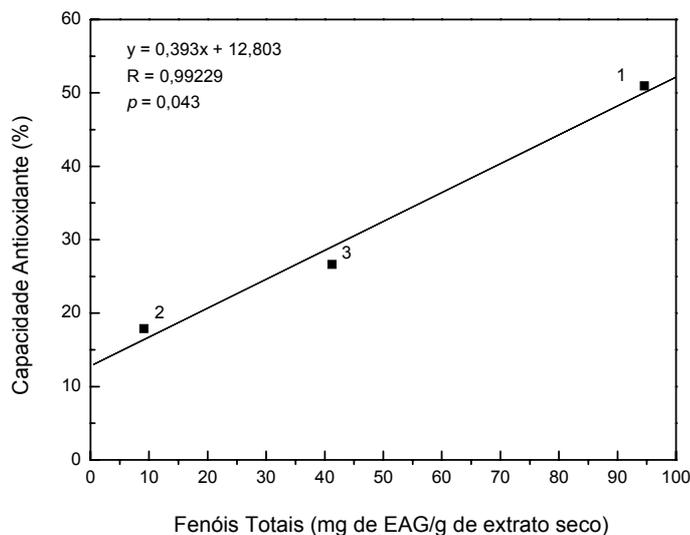
**Figura 21.** Comportamento cinético dos extratos metanólicos ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) frente ao  $\text{DPPH}^\bullet$ . FRAC = farinha de resíduo de acerola; FRAB = farinha de resíduo de abacaxi; FRMA = farinha de resíduo de maracujá e BHT = Butil-hidroxitolueno. Experimento feito em triplicata.

O comportamento cinético da reação do  $\text{DPPH}^\bullet$  com cada extrato e controle, na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , é mostrado na Figura 22. Para o padrão ácido gálico não houve aumento da ação antioxidante frente ao radical  $\text{DPPH}^\bullet$ , como também para o padrão BHT e os extratos de FRAB e FRMA ( $p > 0,05$ ), quando comparados com a concentração de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para o extrato de FRAC foi observado que, em tempos mais curtos, por exemplo, 10 minutos, o mesmo apresenta capacidade antioxidante um pouco menor que a atividade antioxidante do BHT ( $p < 0,01$ ), que se iguala após os 40 minutos de reação ( $p > 0,05$ ).



**Figura 22.** Comportamento cinético dos extratos metanólicos ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) frente ao  $\text{DPPH}^{\bullet}$ . FRAC = farinha de resíduo de acerola; FRAB = farinha de resíduo de abacaxi; FRMA = farinha de resíduo de maracujá e BHT = Butil-hidroxitolueno. Experimento feito em triplicata.

Foi observada uma correlação positiva entre a quantidade de fenóis totais dos extratos estudados e a capacidade antioxidante frente ao  $\text{DPPH}^{\bullet}$ , conforme mostrado na **Figura 23**. Esta análise sugere que os fenóis, determinados pelo método de Folin e expressos em EAG, podem está relacionados, em grande parte, com a capacidade antioxidante dos extratos estudados. Isto pode ser verificado pelos resultados encontrados para o extrato de FRAC, que mostra maior conteúdo de fenóis e maior capacidade seqüestradora de radicais, que os extratos analisados das outras farinhas.



**Figura 23.** Correlação entre os fenóis totais, expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG), e capacidade antioxidante (%) frente ao radical DPPH<sup>•</sup> (tempo de reação: 30 min.) dos extratos metanólicos (0,5 mg/ mL) de farinha de resíduo de acerola (FRAC) (1); farinha de resíduo de abacaxi (FRAB) (2) e farinha de resíduo de maracujá (FRMA) (3), nas concentrações de 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Experimento feito em triplicata.

Alguns autores têm demonstrado que existe uma forte relação positiva entre o teor de fenóis totais e a capacidade antioxidante (frente ao DPPH<sup>•</sup>) em frutas, hortaliças e temperos (ABDILLE *et al.*, 2005; VISON, HAO & ZUBIK, 1998; MELO *et al.*, 2006; SHAN *et al.*, 2005), enquanto que outros autores não tem evidenciado tal correlação (ISMAIL, MARJAN & FOONG, 2004; MAISUTHISAKUL, SUTTAJIT & PONGSAWATMANIT, 2007; RIBEIRO, BERNADO-GIL & ESQUÍVEL, 2001). Shui & Leong (2006) observaram uma correlação positiva entre o total de fenóis e a capacidade antioxidante em resíduos e no suco da fruta carambola, e concluíram que, 70% dos fenóis da fruta estavam presentes no resíduo e que estes eram responsáveis por grande parte desta capacidade. Já Bocco *et al* (1998) não encontraram relação positiva entre fenóis totais e capacidade antioxidante em semente e casca de limão.

A composição química e a estrutura química do componente ativo do extrato são fatores importantes que influenciam na eficácia do antioxidante natural. A

---

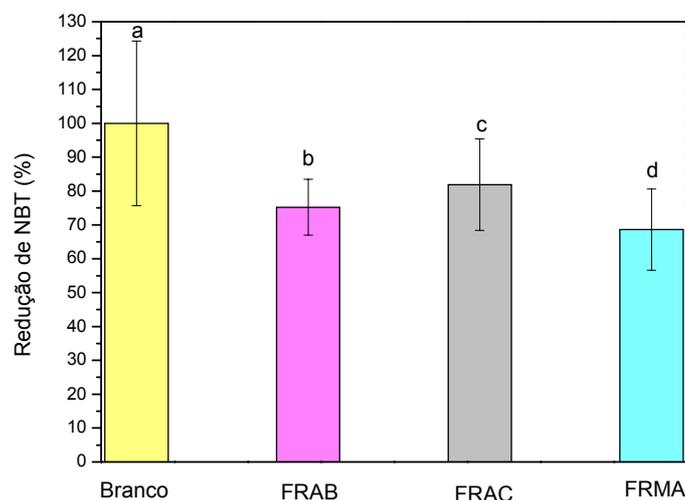
posição e o número de hidroxilas presentes na molécula dos polifenóis é um fator relevante para esta atividade. Acredita-se que a *orto*-dihidroilação contribui marcadamente para a atividade antioxidante do composto (DIMITRIOS, 2006). Assim, a capacidade antioxidante de um extrato não pode ser explicada apenas com base em seu teor de fenóis totais, a caracterização da estrutura do composto ativo, também é necessária (MELO *et al.*, 2006).

### 4.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO ÂNION RADICAL SUPERÓXIDO

Sabe-se que o ânion radical superóxido é uma das espécies reativas que mais contribuem para o desbalanço redox (PERVAIZ & CLEMENT, 2007). Como descrito anteriormente (item 1.7.2.2), o método de análise se baseia na formação do ânion radical superóxido de forma indireta, onde a sua presença é monitorada através da reação de redução de NBT a formazan.

A **Figura 24** mostra o percentual de redução de NBT em função das amostras analisadas. O branco mostra que após a geração do ânion radical superóxido no meio reacional houve 100% de redução de NBT. Isto indica que não existem ainda espécies redutoras (antioxidantes) no meio. Foi também observado que o NBT presente no meio foi protegido por todos os extratos estudados ( $p < 0,05$ ). Pode-se afirmar, desta forma, que os extratos possuem capacidade antioxidante frente ao ânion superóxido. Diferentemente das outras análises, o extrato de FRAC não foi o que apresentou maior atividade dentre os extratos estudados. O extrato de FRMA impediu de forma mais efetiva a redução de NBT a formazan. Tal fato explica-se, possivelmente, pela presença de substâncias, que não os fenóis, que estariam presentes no resíduo de maracujá e teriam efeito sobre  $O_2^{\bullet-}$ . Javanmardi *et al* (2003) afirmaram que a presença de outros antioxidantes, como metabólitos secundários, a exemplo dos óleos voláteis, carotenóides, vitaminas, entre outros, estariam contribuindo com 29% da capacidade antioxidante de 23 espécies do gênero botânico da família *Lamiaceae*, *Ocimum*, visto que foi encontrado um coeficiente de correlação de 0,71 entre a quantidade de fenóis totais e a atividade antioxidante. Segundo a literatura (Moure *et al.*, 2001) alguns extratos de fontes naturais podem

apresentar boa capacidade antioxidante frente a uma determinada espécie reativa, porém, não necessariamente, a todas, haja vista os diferentes fundamentos dos métodos.



Porcentagens com letras diferentes apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

**Figura 24.** Redução de NBT (%) em função das amostras estudadas (0,5 mg/ mL). Farinha de resíduo de acerola (FRAC); Farinha de resíduo de abacaxi (FRAB) e farinha de resíduo de maracujá (FRMA). Tempo de reação: 5 minutos. Experimento feito em triplicata.

Siddhuraju (2007), ao estudar a capacidade antioxidante de cascas de sementes do fruto tamarindo frente ao ânion radical superóxido, utilizando o mesmo sistema do presente estudo, encontrou resultado positivo dose dependente (quanto maior a concentração, maior a capacidade redutora da amostra), tanto no produto natural, como após aquecimento a 135 °C, por 25 minutos.

#### 4.4 INIBIÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO

A peroxidação lipídica tem sido objeto de extensos estudos e existe ampla evidência do envolvimento de RLs mediando este processo, em várias desordens e doenças (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Por exemplo, a oxidação da LDL é aceita como um evento inicial importante na patogênese da aterosclerose (CIPOLLONE, FAZIA & MEZZETTI, 2007). De acordo com a IV Diretriz Brasileira

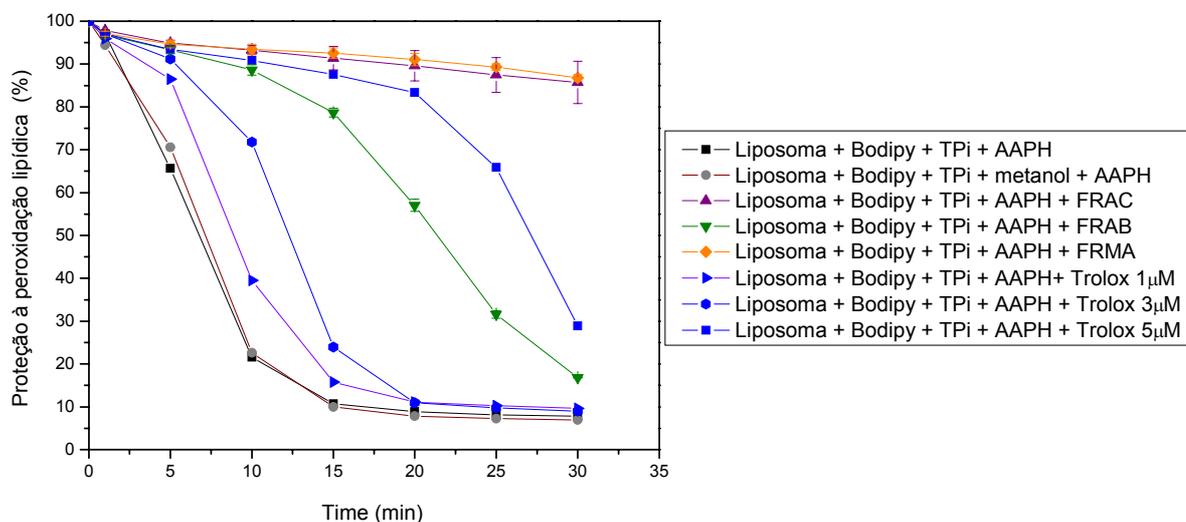
---

Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2007), não existem estudos randomizados, controlados e com número suficiente de pacientes que demonstrem a prevenção de eventos clínicos relacionados à aterosclerose com suplementações com antioxidantes como, por exemplo, as vitaminas E, C ou  $\beta$ -caroteno. Apenas os flavonóides presentes na dieta podem, potencialmente, estar envolvidos na prevenção da aterosclerose, por inibirem a oxidação das LDL, diminuindo sua aterogenicidade e, conseqüentemente, o risco de doença arterial coronária.

Para compreender o quanto os antioxidantes protegem a membrana celular, faz-se necessário um estudo envolvendo tal estrutura. Por isso, modelos de bicamadas de fosfolipídios que imitam a membrana celular são frequentemente utilizados na avaliação da atividade antioxidante. Embora estes estudos sejam importantes e essenciais para o entendimento de mecanismos e cinéticas de ações antioxidantes, deve-se ficar bem claro que, os resultados de experimentos em modelos *in vitro* não podem ser diretamente extrapolados para sistemas *in vivo* (ITOH *et al.*, 2007).

Na técnica fluorométrica (citada no item 1.7.2.3) utilizada na medida da peroxidação lipídica, normalmente se utiliza azo compostos geradores de espécies reativas. O mais comumente utilizado é o AAPH (2,2 – azobis amidinopropano). Este azo-composto é uma substância hidrossolúvel geradora de RLs por decomposição térmica à 37°C, sendo todos os radicais formados do tipo peroxila. Uma vez gerados no meio extracelular, eles irão atacar a membrana causando várias alterações oxidativas. A indução de lipoperoxidação por azo-indicador, como o AAPH, apresenta como característica a geração de carbono central radicalar aos pares, que reagem prontamente com oxigênio, para formar radical peroxila (LAGUERRE, LECOMTE & VILLENEUVE, 2007; LÚCIO *et al.*, 2007).

A **Figura 25** mostra a proteção à peroxidação lipídica em função do tempo, onde primeiro foram feitos dois brancos: (1) lipossoma + sonda Bodipy C<sup>581-591</sup> + tampão fosfato pH 7,4 + AAPH; (2) lipossoma + sonda Bodipy C<sup>581-591</sup> + metanol + AAPH. Em seguida, foi avaliada a atividade do controle (Trolox (**Figura 26**) nas concentrações 1, 3 e 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e das amostras (FRAC, FRAB e FRMA).



**Figura 25.** Proteção quanto à peroxidação lipídica por soluções aquosas (0,5 mg/ mL) de extratos de farinhas de resíduos de acerola (FRAC); farinhas de resíduos de abacaxi (FRAB); farinhas de resíduos de maracujá (FRMA) e padrão Trolox (1, 3, 5 mmol L<sup>-1</sup>), tempo de reação = 30 minutos. Experimento feito em triplicata.

Inicialmente foi observado com o branco (1) que o lipossoma sofre peroxidação após a geração do radical peroxila no meio reacional. Também foi constatado com o branco (2) que o metanol não influencia esta análise. Descartou-se, portanto, a influência de vestígios de metanol que pudessem ainda estar presentes nos extratos estudados. Analisou-se o padrão Trolox (**Figura 26**) no mesmo meio reacional.

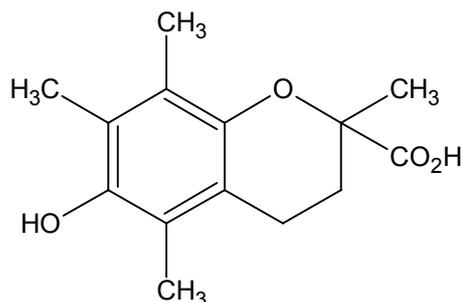


Figura 26. Estrutura química do Trolox.

Nota-se que à medida que se aumenta a concentração desse padrão, ocorre uma maior proteção à membrana. Para os extratos, observa-se que não houve diferença com relação à proteção quanto à peroxidação lipídica entre FRAC e FRMA ( $p > 0,05$ ). Já o extrato de FRAB apresentou resposta intermediária entre as concentrações 3 e 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  do Trolox. Desta forma, podemos afirmar que para uma concentração de 0,5  $\text{mg mL}^{-1}$  das amostras de FRAC e FRMA estudadas existe uma proteção à membrana continuamente, durante 30 minutos (tempo da reação). Isto pode ser devido à presença de diferentes tipos de antioxidantes nos extratos analisados, que podem atuar sinergicamente (MOURE *et al.*, 2001).

Esta ação sinérgica tem sido observada entre antioxidantes apenas sintéticos, naturais e sintéticos e apenas naturais. Este efeito é definido como uma ação combinada, que resulta em um aumento do potencial antioxidante, mais do que um mero efeito aditivo (MOURE *et al.*, 2001). Por exemplo, o ácido ascórbico presente em uma amostra pode regenerar outro antioxidante no meio que sofreu oxidação, como mencionado no item 1.4.2.4 na **Figura 6**. Marinova, Toneva & Yanishlieva (2008), ao analisarem a auto-oxidação de triacilgliceróis em óleo de girassol aquecido à 100°C, encontraram efeito sinérgico entre o  $\alpha$ -tocoferol e a miricetina, através da regeneração desta substância, pelo  $\alpha$ -tocoferol. Contrariamente, Heo *et al.* (2007), após estudos da capacidade antioxidante de fenóis individuais e combinados, frequentemente encontrados em vegetais, como a catequina, o ácido clorogênico, a cianidina, entre outros, não encontraram efeito sinérgico entre os mesmos, com observação apenas de efeito aditivo.

Na **Figura 25** foi também observado que os extratos de FRAC e FRMA se mostraram mais potentes que o padrão utilizado nas concentrações já estabelecidas. O Trolox é considerado um análogo hidrossolúvel da vitamina E, onde seu grupo carboxila possibilita solubilidade moderada em água, além do mais, possui vantagens superiores em relação aos  $\alpha$ -tocoferóis, que são lipossolúveis. A comercialização do Trolox em nutrição humana depende da verificação do grau de toxicidade da molécula em organismos vivos (SAGACH *et al.*, 2002).

Aldini *et al.* (2006), ao estudarem a capacidade antioxidante de polifenóis de resíduos sólidos de azeitona utilizando modelos de células endoteliais com sonda fluorescente acoplada (Bodipy C<sup>581/591</sup>) e após indução de lipoperoxidação pelo azo-composto AAPH, encontraram resultados semelhantes ao padrão Trolox, porém trabalhando com a mesma concentração ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

## **5. CONCLUSÃO**

---

Diante dos resultados encontrados, podemos concluir que:

Com relação ao conteúdo total de fenóis, determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, tanto o extrato seco da FRAC, quanto à própria farinha de resíduo de acerola apresentou-se com a maior quantidade, superando o conteúdo total de fenóis da polpa desta fruta e de resíduos de diferentes frutas descritos na literatura. Já a farinha de resíduo de abacaxi superou a quantidade de fenóis da fruta e polpa de abacaxi e também da farinha de resíduo de maracujá. E a farinha de resíduo de maracujá mostrou-se melhor do que a polpa da mesma fruta.

Sobre a capacidade antioxidante frente ao radical sintético DPPH<sup>\*</sup>, todas as farinhas estudadas apresentaram tal ação, sendo que a FRAC destacou-se até ao ponto de ser comparada ao padrão BHT.

Há uma correlação positiva entre o conteúdo total de fenóis das amostras estudadas e a capacidade antioxidante frente ao radical DPPH<sup>\*</sup>, significando que os compostos fenólicos podem contribuir com boa parte da capacidade antioxidante destas amostras.

Em relação ao poder redutor das amostras estudadas sobre o radical superóxido, gerado por um método não enzimático, todas as amostras apresentaram tal ação, sendo a FRMA, a detentora de maior atividade. Sugere-se, então, que outras substâncias redutoras presentes em maior parte neste extrato podem ter influenciado.

Já na técnica que simulou uma membrana lipídica, onde sua peroxidação foi induzida através da oxidação por radicais peroxila, foi observado que as FRAC e FRMA protegem a membrana lipídica do ataque de tais radicais, de forma contínua no tempo estabelecido, e com a mesma intensidade.

Por fim, todas as farinhas de resíduos de frutas tropicais estudadas apresentaram capacidade antioxidante *in vitro* frente às diferentes espécies reativas; entretanto, a intensidade desta ação foi diferenciada entre elas. Portanto, vale a pena investir em tais farinhas, dando uma atenção especial à de acerola, que foi, dentre as avaliadas, a com maior conteúdo total de fenóis e elevada capacidade antioxidante frente a duas das três espécies reativas estudadas.

## **6. PERSPECTIVAS**

---

Análises microbiológicas, toxicológicas e da presença de agrotóxicos nas farinhas de resíduos das frutas estudadas serão necessárias antes de uma aplicação *in vivo*.

Assim, seria possível o enriquecimento da alimentação de populações, através da suplementação com estas farinhas ou da utilização dos extratos das mesmas como aditivos alimentares, principalmente, para aquelas que apresentam patologias relacionadas ao desbalanço redox ou mesmo em populações saudáveis, prevenindo alterações relacionadas ao excesso endógeno de espécies reativas. Agregaria valor à produção, com a vantagem adicional de evitar o desperdício.

## 7. REFERÊNCIAS

---

---

ABDILLE, Md.; SINGH, R.P.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B.S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, v. 90, p. 891-896, 2005.

AFONSO, V.; CHAMPY, R.; MITROVIC, D.; COLLIN, P.; LOMRI, A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. **Joint Bone Spine**, v. 74, p. 324-329, 2007.

ALAMPRESE, C.; POMPEI, C.; SCARAMUZZI, F. Characterization and antioxidant activity of nocino liqueur. **Food Chemistry**, v. 90, p. 495-502, 2005.

ALDINI, G.; PICCOLI, A.; BERETTA, G.; MORAZZONI, P.; RIVA, A.; MARINELLO, C.; MAFFEI FACINO, R. Antioxidant activity of polyphenols from solid olive residues of c.v. Coratina. **Fitoterapia**, v. 77, p. 121-128, 2006.

AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. Position of the American Dietetic association: vitamin and mineral supplementation. **Journal of American Dietetic Association**, v. 96, p. 73-77, 1996.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists**. 15. ed. Washington, 1990. 684p.

AYALA-ZAVALA, J.F.; WANG, S.; WANG, C.; GONZALEZ-AGUILA, G. Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol**, v. 37, p. 687-695, 2004.

BALDWIN, C.M.; BELL, I.; GUERRA, I.; QUAN, S. Antioxidant nutrient intake and supplements as potential moderators of cognitive decline and cardiovascular disease in obstructive sleep apnea. **Sleep Medicine Reviews**, v. 9, p. 459-476, 2005.

- 
- BANERJEE, A.; DASGRUPTA, N.; DE, B. *In vitro* study of antioxidant of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, v. 90, p. 727-733, 2005.
- BARREIRO, A.L.; 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.
- BJELAKOVIC, G.; NIKOLOVA, D.; SIMONETTI, R.G.; GLUUD, C. 243 Antioxidant supplements for prevention of liver cancer. **Journal of Hepatology**, v. 44, p. S97-S98, 2006.
- BOCCO, A; CUVELIER, M.; RICHARD, H.; BERSET, C. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Citrus Peel and Seed Extracts. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 2123-2129, 1998.
- BRAND, M.D. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 6, p. 755 – 767, 2004.
- BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipidic peroxidation,  $\alpha$ -tocoferol, and ascorbate. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v. 300, n. 2, p. 535-543, 1993.
- BUONOCORE, G.; GROENENDAAL, F. Anti-oxidant strategies. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 12, p. 287-295, 2007.
- CADENAS, E.; DAVIES, K. J. A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, p. 222–230. 2000.

---

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 5, p. 749–760, 1997.

CERQUEIRA, F.M.; MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes Dietéticos: Controvérsias e Perspectivas. **Química Nova**, v.30, n. 2, p.441-449, 2007.

CHAVES, M.C.V.; GOUVEIA, V.; ALMEIDA, F.; LEITE, J.; SILVA, F. Caracterização físico-química do suco da acerola. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n.2, 2004.

CHOW, C.K. Vitamin E and oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 11, p. 215-232, 1991.

CIPOLLONE, F.; FAZIA, M.; MEZZETTI, A. Oxidative stress, inflammation and atherosclerotic plaque development. **International Congress Series**, v. 1303, p. 35–40, 2007.

CNUBBEN, N.H.P.; RIETJENS, I.; WORTELBOER, H.; ZANDEN, J.; VAN BLADEREN, P. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, p. 141–152, 2001.

ÇORUH, N.; CELEP, A.; OZGOKÇE, F.; ISCAN, M. Antioxidant capacities of *Gundelia tournefortii* L. extracts and inhibition on glutathione-S-transferase activity. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1249-1253, 2007.

DASTMALCHI, K.; DORMAN, H.; KOSAR, M.; HILTUNEN, R. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water-soluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. **LWT**, v. 40, p. 239-248, 2007.

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolics antioxidant. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, p. 505-512, 2006.

DREVET, J.R. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, p. 70–79, 2006.

DRISKO, J.; CHAPMAN, J.; HUNTER, V. The use of antioxidant therapies during chemotherapy. **Gynecologic Oncology**, v. 88, p. 434–439, 2003.

DRUMMEN, G.P.C.; GADELLA, B.; POST, J.; BROUWERS, J. C11-bodipy581/591, an oxidation-sensitive fluorescent lipid Peroxidation probe: (micro) spectroscopic characterization and validation of methodology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 4, p. 473–490, 2002.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.P.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n.4, p. 343-350, 2003.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition Research**, v. 24, p. 851–874, 2004.

EWING, J.P.; JANERO, D.R. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. **Analytical Biochemistry**, v. 232, p. 243-248, 1995.

FARHOOSH, F.; GOLMOVAHHED, G.A.; KHODAPARAST, M.H.H. Antioxidant activity of various extracts of old tea leaves and black tea wastes (*Camellia sinensis* L.). **Food Chemistry**, v. 100, p. 231–236, 2007.

FERREIRA, H.; LÚCIO, M.; SIQUET, C.; REIS, S. Utilização de modelos membranares na avaliação da actividade de fármacos. **Química**, v. 99, p. 39-51, 2005.

FERREIRA, I.C.F.; BAPTISTA, P.; VILAS-BOAS, M.; BARROS, L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1511-1516, 2007.

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. 61-8, 1997.

FRIEDMAN, M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4504-4526, 2003.

FUHRMAN, M.P. Antioxidant Supplementation in Critical Illness: What Do We Know? **Nutrition**, v. 16, p. 470–471, 2000.

FUJISAWA, S.; KADOMA, Y.; YOKOE, I. Radical-scavenging activity of butylated hydroxytoluene (BHT) and its metabolites. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.130, p.189–195, 2004.

GARDNER, P.T.; WHITE, T.; MCPHAIL, D.; DUTHIE, G. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. **Food Chemistry**, v. 68, p. 471-474, 2000.

GAZIANO, J. M. Antioxidants in cardiovascular disease: Randomized trials. **Nutrition**, v. 12, p. 583-588, 1996.

GAZIANO, J.M.; MANSON, J.; BRANCH, L.; COLDITZ, G.; WILLETT, W.; BURING, J. A prospective study of consumption of carotenoids in fruits and vegetables and decreased cardiovascular mortality in the elderly. **Annals of Epidemiology**, v. 5, p. 255-260, 1995.

GETOFF, N. Anti-aging and aging factors in life. The role of free radicals. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76, p. 1577-1586, 2007.

GORINSTEIN, H.; ZEMSER, M.; HARUENKIT, R.; CHUTHAKORN, R.; GRAUER, F.; MARTIN-BELLOSO, O.; TRAKHTENBERG, S. Comparative content of total polyphenols and dietary fiber in tropical fruits and persimmon. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 10, p.367–371, 1999.

GRISHAM, M.B. Reactive oxygen species in immune responses. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 36, n. 12, p. 1479 – 1480, 2004.

GÜLÇİN, I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. **Life Science**, v. 78, p. 803-811, 2006.

GÜLÇİN, I.; ELIAS, R.; GEPDIREMEN, A.; BOYER, L. Antioxidant activity of lignans from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.). **European Food Research Technology**, v. 223, p. 759-767, 2006.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v. 49, p. 1341-1348, 1995.

HALLIWELL, B.; AESCHBACHT, R.; LOLIGERT, J.; ARUOMA, O. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 601-617, 1995.

---

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, 2007, 851 p.

HAMRE, K.; WAAGBO, R.; BERGE, R.; LIE, O. Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic salmon. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 22, n. 1 e 2, 137-149, 1997.

HARRIS, R.A. Metabolismo de carboidratos I: Principais vias metabólicas e seu controle. In: DEVLIN, T.M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. 4.ed. São Paulo: Copyright, 2002, cap. 7, p. 222-263.

HARTMAN, R. E.; SHAH, A.; FAGAN, A.; SCHWETYE, K.; PARSADANIAN, M.; SCHULMAN, R.; FINN, M.; HOLTZMAN, D. Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 24, p. 506-515, 2006.

HEO, H.J.; KIM, Y.J.; CHUNG, D.; KIM, D. Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. **Food Chemistry**, v.104 p. 87–92, 2007.

<http://www.cooperativapindorama.com.br>

<http://www.cooperativapindorama.com.br/produtos.htm>

<http://www.qmc.ufsc.br/organica/exp7/solido.html>

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

ISMAIL, A.; MARJAN, Z.M.; FOONG, C.W. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. **Food Chemistry**, v. 87, p. 581–586, 2004.

---

ITOH, N.; CAO, J.; CHEN, Z.; YOSHIDA, Y.; NIKI, E. Advantages and limitation of BODIPY as a probe for the evaluation of lipid peroxidation and its inhibition by antioxidants in plasma. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 2059-2063, 2007.

JAVANMARDI, J.; STUSHNOFF, C.; LOCKE, E.; VIVANCO, J. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. **Food Chemistry**, v. 83, p. 547-550, 2003.

JAYAPRAKASHA, G.K.; SINGH, R.P.; SAKARIAH, K.K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. **Food Chemistry**, v. 73, p. 285-290, 2001.

JOHN, J. H.; ZIEBLAND, S.; YUDKIN, P.; ROE, L.S.; NEIL, H.A.W. Effects of fruit and vegetable consumption on plasma antioxidant concentrations and blood pressure: a randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 359, p. 1969-1974, 2002.

JÚNIOR, L.R.; HÖEHR, N.; VELLASCO, A.; KUBOTA, L. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quimica Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

KALIORA, A.; DEDOISSIS, G.; SCHMIDT, H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. **Atherosclerosis**, v. 187, p. 1-17, 2006.

KIM, Y.; GIRAUD, D. W.; DRISKELL, J. A. Tocopherol and carotenoid contents of selected Korean fruits and vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, p.458-465, 2007.

KINNULA, V.L.; CRAPO, J.D. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 36, n. 6, p. 718 – 744, 2004.

KRINSKY, N.I.; JOHNSON, E.J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, p. 459–516, 2005.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.; MORALES, M.; FETT, R. Frutos tropicais e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 36, n.4, p. 1283-1287, 2006.

LAFKA, T.; SINANOGLU, V.; LAZOS, E.S. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1206-1214, 2007.

LAGUERRE, M.;LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v.46, p. 244–282, 2007.

LEONG, L.P.; SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. **Food Chemistry**, v. 76, p. 69–75, 2002.

LI, Y.; GUO, C.; YANG, J.; WEI, J.; XU, J.; CHENG, S. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. **Food Chemistry**, v. 96, p. 254–260, 2006.

LIMA; E.S.; CARATIN, R.F.; SOLIS, V.S. Peroxidação dos ácidos graxos. In: CURI, R.; et al. **Entendendo as gorduras: os ácidos graxos**. 1. ed. brasileira. São Paulo: Manole, 2002. cap. 29, p. 404-418.

LIMA, V.L.A.G.; MÉLO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; PRAZERES, F.G.; MUSSER, R.S.; LIMA, D.E.S. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. **Food Chemistry**, v. 90, p. 565–568, 2005.

LIOCHEV, S. I.; FRIDOVICH, I. The effects of superoxide dismutase on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 42, p. 1465–1469, 2007.

LLOYD, R.V.; HANNA, P.M.; MASON, R.P. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. **Free Radical in Biology and Medicine**, v.. 22, n. 5, p. 885–888, 1997.

LOPACZYNSKI, W.; ZEISEL, S. Antioxidants, programmed cell death, and cancer. **Nutrition Research**, v. 21, p. 295–307, 2001.

LOPES, L.B.; SCARPA, M.; PEREIRA, N.; OLIVEIRA, L.; OLIVEIRA, A. Interaction of sodium diclofenac with freeze-dried soya phosphatidylcholine and unilamellar liposomes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 4, 2006.

LU, Y.; FOO, L.Y. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. **Food Chemistry**, v. 68, p. 81-85, 2000.

LU, Y.; FOO, L.Y. The polyphenol constituents of grape pomace. **Food Chemistry**, v. 65, p. 1-8, 1999.

LÚCIO, M.; FERREIRA, H.; LIMA, J.; REIS, S. Use of liposomes to evaluate the role of membrane interactions on antioxidant activity. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, p. 163–170, 2007.

LUCZAJ, W.; SKRZYDLEWSKA, E. Antioxidative properties of black tea. **Preventive Medicine**, v. 40, p. 910– 918, 2005.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food Chemistry**, v. 100, p.1409-1418, 2007.

---

MAKRIGIORGOS, G.M. Detection of lipid peroxidation on erythrocytes using the excimer-forming property of a lipophilic BODIPY fluorescent dye. **Journal of Biochemical Biophysical Methods**, v. 35, p. 23–35, 1997.

MANOLI, I.; ALESCI, S.; BLACKMAN, M.; SU, Y.; RENNERT, O.; CHROUSOS, G. Mitochondria as key components of the stress response. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.18, n. 5, p. 190-198, 2007.

MARINOVA, E.; TONEVA, A.; YANISHLIEVA, N. Synergistic antioxidant effect of  $\alpha$ -tocopherol and myricetin on the autoxidation of triacylglycerols of sunflower oil. **Food Chemistry**, v. 106, p. 628–633, 2008.

MELO, E.A.; MACIEL, M.; LIMA, V.; LEAL, F.; CAETANO, A.; NASCIMENTO, R. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.

MORIARTY-CRAIGE, S. E.; ADKISON, J.; LYNN, M.; GENSLER, G.; BRESSLER, S.; JONES, D.; STERNBERG, P. Antioxidant supplements prevent oxidation of cysteine/cystine redox in patients with age-related macular degeneration. **American Journal of Ophthalmology**, v. 140, p. 1020-1026, 2005.

MORIGAKI, K.; WALDE, P. Fatty acid vesicles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 12, p. 75–80, 2007.

MORTENSEN, A.; SKIBSTED, L.H.; TRUSCOTT, T.G. The Interaction of dietary carotenoids with radical species. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, n. 1, p. 13–19, 2001.

MOURE, A.; CRUZ, J.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NÚÑEZ, M.; PARAJÓ, J. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p.145-171, 2001.

MOUSA, A. S.; MOUSA, S. A. Cellular effects of garlic supplements and antioxidant vitamins in lowering marginally high blood pressure in humans: pilot study. **Nutrition Research**, v. 27, p. 119-123, 2007.

MULLER, F.L.; LUSTGARTEN, M.; JANG, Y.; RICHARDSON, A.; VAN REMMEN, H. TRENDS in oxidative aging theories. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, p. 477–503, 2007.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**, v.1054, p. 95-111, 2004.

NAGUIB, Y.M. A fluorometric method for measurement of peroxy radical scavenging activities of lipophilic antioxidants. **Analytical Biochemistry**, v. 265, p. 290-298, 1998.

NERI, S.; SIGNORELLI, S.; TORRISI, B.; PULVIRENTI, D.; MAUCERI, B.; ABATE, G.; IGNACCOLO, L.; BORDONARO, F.; CILIO, D.; CALVAGNO, S.; LEOTTA, C. Effects of antioxidant supplementation on postprandial oxidative stress and endothelial dysfunction: A single-blind, 15-day clinical trial in patients with untreated type 2 diabetes, subjects with impaired glucose tolerance, and healthy controls. **Clinical Therapeutics**, v.27, p.1764-1773, 2005.

NIKFARDJEM, M.S.; LÁSZLÓ, G.Y.; DIETRICH, H. Resveratrol-derivatives and antioxidative capacity in wines made from botryzed grapes. **Food Chemistry**, v. 96, p. 74-79, 2006.

NIKFARDJEM, N.; LÁSZLÓ, F.; DIETRICH, Y. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. **Food Chemistry**, v. 93, p. 713–718, 2005.

---

NIKI, E.; YOSHIDA, Y.; SAITO, Y.; NOGUCHI, N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, p. 668–676, 2005.

NOHL, H.; GILLE, L.; STANIEK, K. Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 719-723, 2005.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system, **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

OLIVEIRA, M.E.B.; BASTOS, M.S.R.; FEITOSA, T. Avaliação de parâmetros de qualidade físico-química de polpa congelada de acerola, cajá e caju. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.19, n.3, p.326-332. 1999.

OSADA, Y.; SHIBAMOTO, T. Antioxidative activity of volatile extracts from Maillard model systems. **Food Chemistry**, v. 98, p. 522-528, 2006.

PANTELIDIS, G.E.; VASILAKAKIS, M.; MANGANARIS, G.A.; DIAMANTIDIS, GR. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. **Food Chemistry**, v. 102, p. 777–783, 2007.

PERVAIZ, S.; CLEMENT, M. Superoxide anion: oncogenic reactive oxygen species? **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 1297–1304, 2007.

PESCHEL, W.; SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W.; PLESCHER, A.; GARTZIA, I.; JIMÉNEZ, D.; LAMUELA-RAVENTOS, R.; BUXADERAS, S.; CODINA, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, v. 97, p. 137–150, 2006.

---

PETERSEN, S.V.; ENGHILD, J.J. Extracellular superoxide dismutase: structural and functional considerations of a protein shaped by two different disulfide bridge patterns. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 59, p. 175–182, 2005.

PHILIPPI, S.T. **Tabela de Composição de Alimentos: Suporte para Decisão Nutricional**. 2. ed. São Paulo: Coronário, 135 p., 2002.

PRAKASH, D.; UPADHYAY, G.; SINGH, B.; SINGH, H. Antioxidant and free radical-scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). **Food Chemistry**, v. 104, p. 783–790, 2007.

RAHMAN, I.; BISWAS, S.; KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, p. 222–239, 2006.

RAO, A.V.; RAO, L.G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, v. 55, p. 207–216, 2007.

RIBEIRO, M.A.; BERNARDO-GIL, M.G.; ESQUÍVEL, M.M. *Melissa officinalis*, L.: study of antioxidant activity in supercritical residues. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 21, p. 51–60, 2001.

ROSEIN, G.E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E.; MASCIO, P. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 563-568, 2006.

SAÂNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI; J.; SAURA-CALIXTO, F. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. **Food Research International**, v. 32, p. 407-412, 1999.

SAGACH, V.F.; SCROSATI, M.; FIELDING, J.; ROSSONI, G.; GALLI, C.; VISIOLI, F. The water soluble vitamin E analogue trolox protects against ischaemia/reperfusion damage in vitro and ex vivo. A comparison with vitamin E. **Pharmacological Research**, v. 45, n. 6, p. 435-439, 2002.

SAURA-CALIXTO, F.; GOÑI, I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. **Food Chemistry**, v. 94, p. 442–447, 2006.

SEO, Y.J.; *et al.* Role of glutathione in the adaptive tolerance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 8, p. 1272–1281, 2004.

SHAN, B.; CAI, Y.Z.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 53, p. 7749-7759, 2005.

SHUI, G.; LEONG, L.P. Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. **Food Chemistry**, v. 97, p. 277-284, 2006

SIDDURAJU, J. Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated *Tamarindus indica* seed coat. **LWT**, v. 40, p. 982-990, 2007.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 27, n. 9/10, p. 916–921, 1999.

SILVA, E.M.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonic region. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1012-1018, 2007.

SILVA, J.F.; SOUZA, M.; MATTA, S.; ANDRADE, M.; VIDAL, F. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 99, p. 431-435, 2006.

SILVA, V.L.; COZZOLINO, S.M.F. Vitamina C (ácido ascórbico). In: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 2.ed. atual. e ampl. Barueri-SP: Manole, 2006. cap. 12, p. 305-324.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.S. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOONG, Y.; BARLOW, P. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, v. 88, p. 411–417, 2004.

SOUSA, C.M.; SILVA, H.; VIEIRA-Jr, G.; AYRES, M.; COSTA, L.; ARAÚJO, D.; CAVALCANTE, L.; BARROS, E.; ARAÚJO, P.; BRANDÃO, M.; CHAVES, M. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

STEIBER, A.; KERNER, J.; HOPPEL, C.L. Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 25, p.455-473, 2004.

STRATIL, P.; KLEJDUS, B.; KUBÁN, V. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. **Talanta**, v. 71, p. 1741-1751, 2007.

SUN, J.; CHU, Y.; WU, X.; LIU, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 7449-7454, 2002.

---

TAKATA, J.; MATSUNAGA, K.; KARUBE, Y. Delivery systems for antioxidant nutrients. **Toxicology**, v. 180, p. 183-193, 2002.

THIAGARAJAN, G.; CHANDANI, S.; SUNDARI, S.; RAO, H.; KULKARNI, A.; BALASUBRAMANIAN, D. Antioxidant Properties of Green and Black Tea, and their Potential Ability to Retard the Progression of Eye Lens Cataract. **Experimental Eye Research**, v. 73, p. 393-401, 2001.

THOMAS, S.; BALASUBRAMANIAN, K.A. Role of intestine in postsurgical complications: involvement of free radicals. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 6, p. 745-756, 2004.

TREVISAN, M. T. S. ; SILVA, M. G. V. ; PFUNDSTEIN, B. ; SPIEGELHALDER, B. ; OWEN, R. . Characterization of the Volatile Pattern and Antioxidant Capacity of Essential Oils from Different Species of the Genus *Ocimum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4378-4382, 2006.

TREVISAN, M. T. S. ; SPIEGELHALDER, B. ; BARTSCH, H. ; OWEN, R. ; WURTELE, G. ; PFUNDSTEIN, B. ; HAUBNER, R. . Characterization of alkyl phenols in Cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 2, p. 188-197, 2006.

TURKMEN, N.; SARI, F.; VELIOGLU, S. THIAGARAJAN *et al.*, 2001). Effects of Extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. **Food Chemistry**, v. 99, p. 835-841, 2006.

UI, I.; OKAJO, A.; ENDO, K.; UTSUMI, H.; MATSUMOTO, K. Effect of hydrogen peroxide in redox status estimation using nitroxyl spin probe. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 37, n.12, p. 2012–2017, 2004.

US NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (USA). **Dietary Reference Intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids**. Washington DC: National Academy Press, 2000, 506p. (A report on the antioxidants and related compounds. Subcommittees on Upper Reference Intake Levels of Nutrients and Interpretation of Uses of Dietary Reference Intakes and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Food and Nutrition Board).

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

VASCONCELOS, S.M.L.; SILVA, A.M.; GOULART, M.O.F. Pró-antioxidantes e antioxidantes de baixo peso molecular oriundos da dieta: estrutura e função. **Nutrire**, v. 31, n. 3, p. 95-118, 2006.

VISON, J.A.; SU, X.; ZUBIK, L.; BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 49, p. 5315-5321, 2001.

WALLE, T. Absorption and metabolism of flavonoids. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 36, n. 7, p. 829 – 837, 2004.

WILLIAMS, G.M.; IATROPOULOS, M.J.; WHYSNER, J. Safety Assessment of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene as Antioxidant Food additives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 1027-1038, 1999.

WOLF, R.; WOLF, D.; RUOCCO, V. Vitamin E: the radical protector. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 10, p. 103–117, 1998.

YOUNG, A. J.; LOWE, G.M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, n. 1, p. 20-27, 2001.

ZIBADI, S.; FARID, R.; MORIGUCHI, S.; LU, Y.; FOO, L.; TEHRANI, P.; ULREICH, J.; WATSON, R. Oral administration of purple passion fruit peel extract attenuates blood pressure in female spontaneously hypertensive rats and humans. **Nutrition Research**, v. 27, p. 408–416, 2007.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M.; FRASQUET, I.; FRÍGOLA, A. Vitamin C, vitamin A, phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice and skim milk mixture beverages marketed in Spain. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1365-1374, 2007.