**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando
seu aproveitamento**

Keityane Boone Bergamaschi

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos

**Piracicaba
2010**

Keityane Boone Bergamaschi
Bacharel em Medicina Veterinária

Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento

Orientador:
Prof. Dr. **SEVERINO MATIAS DE ALENCAR**

Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Bergamaschi, Keityane Boone

Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento / Keityane Boone Bergamaschi. - - Piracicaba, 2010.
96 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Alimentos de origem vegetal 2. Antioxidantes 3. Composição química 4. Compostos fenólicos 5. Metabolismo secundário 6. Resíduos - Aproveitamento I. Título

CDD 664.8
B493c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A DEUS,

AGRADEÇO.

Ao meu querido e amado noivo Pedro Gomes da Cruz, pelos momentos difíceis que passamos, pelo carinho, incentivo, amor e paciência.

OFEREÇO.

Aos meus amados pais Luiz Antonio Bergamaschi e Adália Boone Bergamaschi pelos ensinamentos de dignidade, dedicação e amor incondicional e ao meu amado irmão Flaulles.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me ensinou que não existem caminhos sinuosos mais sim, há caminhos difíceis de entender, mas quando os compreendemos são maravilhosos.

Aos meus pais, pelo grande amor, pelas horas fáceis e difíceis, pela grande ajuda financeira e por estarem comigo sempre, incondicionalmente. Muito obrigada!

Ao meu querido irmão Flaulles, por incentivar e apoiar meus projetos.

Ao meu amor Pedro, pelos anos de convivência, pelas dificuldades e pelos muitos momentos felizes.

Ao meu orientador professor Severino Matias de Alencar, em primeiro lugar pela confiança concedida, pelo total apoio no projeto e liberdade de decisões, por seu grande profissionalismo, sua sabedoria em ensinar, pelos momentos de descontração e sua grande amizade.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ao Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) e aos funcionários, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Aos professores Mauro Pereira de Figueiredo (UESB) e Luiz Gustavo Ribeiro Pereira (EMBRAPA), pelo grande incentivo dado a buscar o mestrado.

Aos meus Avós paternos Waldemar e Maria e maternos Gustavo (*in memorian*) e Ilda, por sempre estarem presentes em minha vida demonstrando o amor de vô e vó.

Aos meus tios “Tio Kary” e “Tio Zé”, por sempre estarem presentes e me amarem muito.

Ao meu “filhotinho Nino” por sempre estar de patas abertas.

Ao lindo casal que faz parte da minha vida meus sogros Adão e Ercília pelo carinho e grande apoio em todos os momentos.

As minhas cunhadas (Eliane, Guia, Solange, Ní e Paz), cunhados (João e Nilson), sobrinhas (Clarinha e Letícia) e aos sobrinhos (Felipe e Manoel Henrique) pelo carinho.

A querida Rosangela, que de amiga tornou-se uma “segunda mãe”, me aconselhando e oferecendo seu amor e carinho.

As verdadeiras amigas que fiz durante estes anos de curso de mestrado e que me ajudaram na realização deste trabalho e que sempre estarão em meu coração Priscilla, Ana Paula, Tatiane, Lucimara, Adna, Ivani, Luciana Ferracini, Juliana, Izabella, Luciana Mourão e Aline, agradeço não só a convivência, mas principalmente pelas risadas despendidas nos momentos felizes que foram muitos.

Aos colegas que fiz nesta escola Zizi, Rizia, Naiane, Ingridy, Guilherme, Cristina, Rodrigo (Paxuxu), Mirian (Tracks) e Maria Augusta (Unesp-Botucatu).

As professoras Solange Brazaca, Carmen Castillo, Marisa Regitano-d'Arce e Thais Vieira, pelo apoio oferecido.

Ao senhor Márcio da Horta e os funcionários e a todos os feirantes, por terem contribuído com o fornecimento dos resíduos vegetais.

A Agroindústria Conservas de Alcachofras Bom Sucesso e a CAP Agroindustrial, por cederem o resíduo de alcachofra e a película de amendoim, através do intermédio da professora Maria Antonia C. Domingues e Eduardo Micotti.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro do projeto concedido para a realização deste trabalho.

Realmente, é impossível agradecer a todas as pessoas, mas sem o apoio oferecido, este trabalho não teria si concluído. A todos, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 DESENVOLVIMENTO.....	19
2.1 Revisão bibliográfica.....	19
2.1.1 Metabolismo secundário em vegetais.....	19
2.1.1.1 Terpenos.....	20
2.1.1.2 Compostos nitrogenados.....	21
2.1.1.3 Compostos fenólicos.....	22
2.1.2 Resíduos vegetais como fonte de compostos bioativos.....	29
2.1.3 Radicais livres e peroxidação lipídica.....	31
2.1.4 Antioxidantes.....	33
2.1.5 Métodos de avaliação de atividade antioxidante <i>in vitro</i>	34
2.1.5.1 Ensaio do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil).....	36
2.1.5.2 Autoxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoléico.....	37
2.1.5.3 Método ABTS (2,2- azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico).....	37
2.1.5.4 FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>).....	39
2.1.5.5 Método Rancimat.....	39
2.2 Material e Métodos.....	40
2.2.1 Obtenção e tratamentos iniciais dos resíduos vegetais.....	40
2.2.2 Preparo dos extratos dos resíduos vegetais.....	41
2.2.3 Seleção dos solventes com maior poder de extração de compostos antioxidantes.....	42
2.2.4 Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	43
2.2.5 Avaliação da atividade antioxidante.....	43
2.2.5.1 Atividade sequestrante do radical livre (DPPH) e o EC ₅₀	43
2.2.5.2 Atividade antioxidante pelo método ABTS.....	44
2.2.5.3 Autoxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoléico.....	45
2.2.5.4 Estabilidade oxidativa - método Rancimat.....	45

2.2.5.5 Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP).....	46
2.2.6 Identificação química dos extratos dos resíduos vegetais.....	47
2.2.6.1 Purificação em SPE (Solid Phase Extraction).....	47
2.2.6.2 Derivatização – formação de derivados do trimetilsilil (TMS).....	48
2.2.6.3 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).....	48
2.2.7 Análise estatística.....	49
2.3 Resultados e discussão.....	49
2.3.1 Processo de liofilização.....	49
2.3.2 Seleção dos solventes com maior poder de extração de compostos antioxidantes.....	50
2.3.3 Teor de compostos fenólicos totais.....	52
2.3.4 Determinações da atividade antioxidante.....	54
2.3.4.1 Atividade sequestrante do radical livre (DPPH).....	54
2.3.4.2 Atividade antioxidante pelo método de redução do radical (ABTS).....	57
2.3.4.3 Autoxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoléico.....	59
2.3.4.4 Inibição da oxidação lipídica - método Rancimat.....	63
2.3.4.5 Capacidade antioxidante total do plasma (FRAP).....	66
2.3.5 Identificação química dos extratos dos resíduos vegetais por CG-EM.....	67
3 CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS.....	77
APÊNDICES.....	91

RESUMO

Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento

Os recursos naturais são fontes importantes de substâncias com grande potencial bioativo, não só pela quantidade de espécies vegetais existentes, mas principalmente pela variedade de metabólitos primários e secundários por elas sintetizados. Na sua grande maioria os resíduos vegetais são considerados sem valor econômico. A presença de substâncias biologicamente ativas em vegetais são alvo de um grande número de pesquisas visando o desenvolvimento de produtos que possam contribuir com a melhoria na qualidade de saúde e estilo de vida da população. Visando um melhor aproveitamento dos resíduos vegetais, objetivou-se avaliar a atividade antioxidante por meio de métodos distintos, bem como a identificação dos compostos presentes nas amostras de dez resíduos vegetais. O extrato etanólico e aquoso dos dez resíduos vegetais foram utilizados na quantificação dos compostos fenólicos, avaliação da atividade antioxidante, medidas por meio dos métodos do radical livre (DPPH), EC_{50} , $ABTS^{*+}$, da auto-oxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoléico, FRAP e estabilidade oxidativa em Rancimat, e a identificação química por meio da técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM). O teor de compostos fenólicos dos resíduos vegetais variou na faixa de 1,03 a 56,92 mg AG/mL de extrato. A película de amendoim e o talo de beterraba foram os que apresentaram as maiores quantidades destes compostos, enquanto que o resíduo de alcachofra apresentou o menor teor. Quanto à atividade antioxidante pelo método DPPH, os resíduos vegetais apresentaram potencial antioxidante tanto no extrato etanólico quanto no aquoso. A atividade antioxidante, pelo método ABTS, para os extratos etanólico e aquoso da película de amendoim foi de 990,79 e 262,12 μ M Trolox/g, respectivamente. A atividade antioxidante dos dez resíduos vegetais, medida por meio do método da auto oxidação beta-caroteno/ácido linoléico, variou de 2,25 a 70, 83%, tanto para o extrato etanólico quanto para o extrato aquoso. No método FRAP os melhores valores foram para o extrato etanólico da película de amendoim e talo de beterraba (1,605 e 0,619 μ mol/mg de extrato, respectivamente), e o extrato aquoso da película de amendoim 0,514 μ mol/mg de extrato. Na análise de Rancimat os resíduos vegetais apresentaram fatores de proteção que variaram de 0,21 a 1,13. Os compostos fenólicos identificados nos extratos foram os ácidos ascórbico, sinápico, caféico e *p*-cumárico além dos flavonóides kaempferol e epicatequina. Este trabalho demonstra que resíduos vegetais possuem atividade antioxidante que lhes confere potencial de utilização como fontes de compostos bioativos naturais.

Palavras-chave: Resíduos vegetais; Compostos fenólicos; Atividade antioxidante; CG-EM

ABSTRACT

Antioxidant capacity and chemical composition of vegetables residues for their use

Natural resources are important sources of bioactive substances with great potential not only by the number of plant species but mainly by the variety of primary and secondary metabolites synthesized by them. Mostly vegetables debris are considered without economic value. The presences of biologically active substances in plants are the target of a large number of research seeking to develop products that can contribute to improving the quality of health and lifestyle of the population. A better utilization of vegetables residues aimed to evaluate the antioxidant activity by different methods as well as the identification of compounds present in samples of ten vegetables residues. The ethanol extract and aqueous residues of the ten vegetables were used for the quantification of phenolic compounds and evaluation of antioxidant activity measured by the methods of free radical (DPPH); EC_{50} ; $ABTS^{++}$; auto-oxidation system of beta-carotene/linoleic acid; FRAP and Rancimat oxidative stability and chemical identification by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The phenolic content of vegetables residues varied in the range from 1,03 to 56,92 mg AG/mL extract. The film peanut and beet top showed the highest amounts of these compounds while the residue artichoke had the lowest content. The antioxidant activity by DPPH method the vegetables residues showed potential antioxidant in the aqueous ethanol extract as. The antioxidant activity by ABTS method for the ethanolic and aqueous film peanut was 990,79 and 262,12 μ M Trolox/g, respectively. The antioxidant activity of ten vegetables residues, as measured by the method of self beta-carotene/linoleic acid oxidation ranged from 2,25 to 70, 83% for both the ethanol extract as for the aqueous extract. In the FRAP method was the best values for the ethanol extract of the film peanuts and beet top (1,605 and 0,619 μ mol/mg extract, respectively) and aqueous film peanut 0,514 μ mol/mg of extract. In the analysis of vegetables debris Rancimat showed protection factors ranging from 0,21 to 1,13. The phenolic compounds identified in the extracts were ascorbic acid, sinapic, caffeic and *p*-coumaric addition of the flavonoids epicatechin and kaempferol. This work demonstrates that plant residues have antioxidant activity that gives them potential for use as sources of bioactive compounds.

Keywords: Vegetables residues; Compounds phenolic; Antioxidant activity; CG-MS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais vias do metabolismo secundário e suas interligações.....	20
Figura 2	Estrutura química de um fenol simples.....	22
Figura 3	Rota de formação dos compostos fenólicos.....	23
Figura 4	Estrutura química do ácido gálico (a) e ácido protocatéquico (b).....	26
Figura 5	Estrutura química do ácido ferúlico (a), ácido caféico (b) e ácido <i>o</i> -cumárico (c).....	27
Figura 6	Estrutura química das cumarinas.....	27
Figura 7	Estrutura química do radical DPPH e reação de estabilização com um antioxidante.....	36
Figura 8	Formação do radical ABTS estável com o persulfato de potássio.....	38
Figura 9	Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+}	39
Figura 10	Resíduos vegetais: talo de couve (A), talo de brócolis (B), talo de beterraba (C), folha/talo de rabanete (D), folha/talo de cenoura (E), casca de abóbora (F), resíduo de alcachofra (G), folha/talo de nabo (H), casca de maracujá (I) e película de amendoim (J).....	41
Figura 11	Capacidade de seqüestrar o radical DPPH dos resíduos vegetais utilizando-se cinco solventes. Análise estatística descritiva.....	51
Figura 12	Redução da porcentagem da absorbância inicial da emulsão beta-caroteno/ácido linoléico adicionada dos extratos etanólicos dos resíduos vegetais e padrão durante 120 minutos.....	62
Figura 13	Redução da porcentagem da absorbância inicial da emulsão beta-caroteno/ácido linoléico adicionada dos extratos aquosos dos resíduos vegetais e padrão durante 120 minutos.....	62

Figura 14	Índice de atividade antioxidante obtido a partir da análise de estabilidade oxidativa (Rancimat) do óleo de soja refinado sem antioxidante adicionado aos extratos dos resíduos vegetais e do BHT, na concentração 100 ppm, exceto o controle, livre de antioxidantes, utilizando solvente etanol:água (80:20 v/v) e água. Letras diferentes indicadas nas colunas diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de <i>Tukey</i> (coeficiente de variação de 3,5%).....	65
Figura 15	Perfil cromatográfico do extrato etanólico e aquoso do talo de brócolis.....	69
Figura 16	Perfil cromatográfico do extrato etanólico e aquoso do talo de beterraba.....	70
Figura 17	Perfil cromatográfico do extrato etanólico e aquoso da folha/talo de rabanete.....	70
Figura 18	Perfil cromatográfico do extrato etanólico e aquoso da folha/talo de nabo.....	71
Figura 19	Perfil cromatográfico do extrato etanólico e aquoso da película de amendoim.....	71
Figura 20	Curva de calibração do ácido gálico para o cálculo do teor de compostos fenólicos totais.....	92
Figura 21	Curva de calibração do trolox.....	93
Figura 22	Curva de calibração do sulfato ferroso.....	94
Figura 23	Diluições e ajuste das curvas dos extratos etanólico e aquosos dos resíduos vegetais pelo método $ABTS^{+•}$	95
Figura 24	Diluições e ajuste das curvas dos extratos etanólico e aquosos dos resíduos vegetais pelo método $ABTS^{+•}$	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação dos compostos fenólicos em plantas de acordo com o esqueleto básico.....	25
Tabela 2	Rendimento dos resíduos vegetais após o processo de liofilização.....	50
Tabela 3	Teor de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico nos extratos dos resíduos vegetais (mg AG/mL).....	52
Tabela 4	Percentuais de atividade antioxidante pelo método de seqüestro do radical livre (DPPH).....	55
Tabela 5	Valor de EC ₅₀ (g/L) dos extratos dos resíduos vegetais.....	57
Tabela 6	Atividade antioxidante equivalente ao trolox pelo método ABTS.....	58
Tabela 7	Porcentagem de atividade antioxidante pelo método de autooxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoléico.....	60
Tabela 8	Período de indução dos extratos etanólico e aquoso dos resíduos vegetais analisados no aparelho de Rancimat.....	64
Tabela 9	Poder redutor (μmol/mg) dos extratos dos resíduos vegetais.....	67
Tabela 10	Tempo de retenção, percentual de área de cada componente e íons importantes presentes no espectro de massa dos compostos silanizados presentes nos extratos etanólicos dos resíduos vegetais, por GC-EM.....	72
Tabela 11	Tempo de retenção, percentual de área de cada componente e íons importantes presentes no espectro de massa dos compostos silanizados presentes nos extratos aquosos dos resíduos vegetais, por GC-EM.....	73

1 INTRODUÇÃO

Os recursos naturais continuam sendo fontes importantes de substâncias naturais, representando um grande potencial de compostos bioativos. Isto se deve não apenas pela quantidade de espécies vegetais existentes, mas principalmente pela variedade de metabólitos primários e secundários por elas sintetizados.

As hortaliças e seus resíduos vegetais possuem altos teores de vitaminas, sais minerais e componentes bioativos, os quais atuam promovendo a assimilação de outros nutrientes, além de auxiliarem na prevenção de doenças. Evidências epidemiológicas têm demonstrado que existe uma forte correlação inversa entre o consumo regular de frutas e hortaliças e a prevalência de algumas doenças degenerativas. O efeito protetor exercido por estes alimentos tem sido atribuído à presença de compostos antioxidantes, dentre os quais se destacam os compostos fenólicos, as vitaminas C e E e o beta-caroteno (PESCHEL et al., 2006; MELO et al., 2006).

Estudos têm demonstrado que resíduos vegetais de uva, azeitona, maçã, tomate, alcachofra, pêra, beterraba e brócolis exibem grande potencial biológico (MILLER et al., 1993; LAVELLI; PERI; RIZZOLO, 2000; ALONSO et al., 2002). Nas partes externas dos vegetais, como folhas, cascas e peles, estão presentes as maiores concentrações de polifenóis, compostos estes que são sintetizados pelas plantas durante o mecanismo de defesa ao ataque de patógenos. Muitos destes compostos apresentam propriedades biológicas como agentes antioxidantes, antimicrobiana, anti-alérgicas, anti-aterogênicas, anti-inflamatórias, antitrombóticas, que os tornam possíveis agentes cardioprotetores. (WOLFE; WU; LIU, 2003; MOON; SHIBAMOTO, 2009).

Os vegetais e seus resíduos possuem substâncias biologicamente ativas os quais têm impulsionando o desenvolvimento de pesquisas por produtos que contribuam com a melhoria da qualidade de vida, provenientes especialmente de fontes naturais. Conseqüentemente, as preocupações do setor industrial na tentativa de atender a essas exigências fazem com que novas tecnologias sejam buscadas, visando à elaboração de produtos que proporcionem benefícios aos consumidores e, ao mesmo tempo, diminuam perdas econômicas (PEREIRA; VIDAL; CONSTANT, 2009).

Aliado às contribuições à saúde, compostos naturais também apresentam significativa importância para a aplicação industrial, já que os antioxidantes sintéticos mais utilizados pela

indústria de alimentos como o BHA (butil-hidroxianisol), o BHT (butil-hidroxitolueno), PG (galato de propila) e o TBHQ (terc-butilhidroquinona), utilizados como aditivos alimentares, têm despertado preocupação quanto às doses de segurança e toxicidade, pois podem está envolvidos em muitos riscos à saúde, incluindo câncer (BARREIROS; DAVID, 2006; MOHDALY et al., 2010).

Com a crescente consciência do consumidor em relação à segurança dos aditivos alimentares, criou-se a tendência e a necessidade de se identificar alternativas de fontes naturais que promovam uma maior segurança quando comparado aos antioxidantes sintéticos em alimentos (OLIVEIRA et al., 2009).

De acordo com o apresentado, visando o aproveitamento dos resíduos vegetais por meio da exploração de seu potencial antioxidante, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante por meio de métodos distintos e identificar a composição química de resíduos de interesse para o consumidor e para a indústria de alimentos.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Metabolismo secundário em vegetais

Em ambientes naturais, os vegetais estão cercados por um grande número de inimigos naturais. Todos os ecossistemas possuem uma significativa variedade de bactérias, fungos, vírus, nematóides, ácaros e insetos, para os quais as plantas possuem sistemas de proteção, compondo-se de barreiras físicas que protegem contra estes patógenos e reduzem a perda de água e a produção de compostos secundários ou metabólitos secundários, como os terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados, que desempenham respostas específicas contra ataques de patógenos (ROBARDS et al., 1999; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Sendo o metabolismo primário, o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial no vegetal, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Os compostos envolvidos no metabolismo primário possuem uma distribuição universal nas plantas. Esse é o caso dos aminoácidos, dos nucleotídeos, dos lipídios, carboidratos e da clorofila (CASTRO; KLUGE; PERES, 2005). Em contrapartida, o metabolismo secundário nos vegetais produz uma variedade de compostos orgânicos os quais não possuem uma distribuição universal, ou seja, os metabólitos secundários são restritos a uma espécie vegetal ou a um grupo de espécies relacionadas, enquanto que os metabólitos primários são encontrados em todo o reino vegetal. Essas substâncias não apresentam função direta em seu crescimento e/ou desenvolvimento, atuando principalmente em defesa do vegetal contra ataque de patógenos. A função dos metabólitos secundários foi durante muito tempo desconhecida nos vegetais sendo considerado apenas como produtos finais do metabolismo ou resíduos sem função aparente. Os estudos dessas substâncias foram iniciados pelos químicos orgânicos, demonstrando assim que esses compostos possuem papel contra herbivoria, ataque contra patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de sementes, microrganismos simbiotes, estresses abióticos (conteúdo de água, níveis de luminosidade, exposição à luz ultravioleta e deficiência de minerais) (BENNETT; WALLSGROVE, 1994; CASTRO; KLUGE; PERES, 2005).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos nitrogenados e compostos fenólicos (Figura 1). Os terpenos derivam-se do ácido malônico

(citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (cloroplasto). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou ácido malônico e os compostos nitrogenados são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano e tirosina), os quais derivam do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos (ornitina e lisina).

Figura 1 - Principais vias do metabolismo secundário e suas interligações
Fonte: Adaptado de Castro; Kluge; Peres (2005)

2.1.1.1 Terpenos

Os terpenos, ou terpenóides, constituem o maior grupo de produtos secundários, sendo essas substâncias insolúveis em água. São classificados pelo número de unidades pentacarbonadas e biossintetizados a partir de metabólitos primários por duas rotas diferentes, sendo a rota do ácido malônico (citoplasma) e a rota do metileritritol fosfato (cloroplasto). Alguns terpenos possuem função bem caracterizada no crescimento e desenvolvimento do vegetal, podendo ser considerados em alguns casos como metabólitos primários ao invés de secundários. Como por exemplos: o hormônio vegetal giberelina que é um diterpeno, os esteróis essenciais das membranas celulares que são derivados de triterpenos, os carotenóides de cores vermelha, amarela e laranja, tetraterpenos que atuam como pigmentos acessórios na fotossíntese e protegem os tecidos fotossintéticos contra a fotoxidação, apresentando atividade antioxidante e atuando através da interação com os radicais livres por divisão de sua extensa cadeia carbônica em membranas lipídicas. Além dessas funções, os terpenos também são tóxicos e deterrentes e/ou adstringente para muitos parasitas e herbívoros, exercendo assim um importante papel de defesa do reino vegetal (LICHTENTHALER, 1999).

Dentre o grupo de terpenos, os carotenóides representam um dos compostos mais presentes em frutas e verduras, tendo já sido identificado em mais de 1600 moléculas divididos em duas classes de moléculas: os carotenos (o beta-caroteno encontrado na cenoura e no dendê; o

licopeno encontrado no tomate e na melancia; a luteína encontrada nos vegetais verdes) e as xantofilas (zeaxantina, criptoxantina e astaxantina) (ANJO, 2004).

2.1.1.2 Compostos nitrogenados

Uma grande variedade de metabólitos secundários vegetais possui em sua estrutura o nitrogênio. Essa categoria inclui alguns compostos que atuam na defesa das plantas contra os parasitas e herbívoros, como os alcalóides e os glicosídeos cianogênicos. Esses compostos apesar de apresentarem um alto grau de toxicidade desperta grande interesse devido as suas propriedades medicinais.

Os alcalóides constituem uma família com mais de 15.000 metabólitos secundários nitrogenados, sintetizados a partir de aminoácidos (lisina, tirosina e triptofano). Sua estrutura química é composta de átomos de carbono e nitrogênio, tendo em seu anel heterocíclico um átomo de nitrogênio. A presença do átomo de nitrogênio protonado lhe confere característica alcalina, com pH variando entre 5 a 7,2. Estes compostos apresentam geralmente características de solubilidade em água. O papel dos alcalóides nos vegetais tem sido objeto de especulação há pelo menos 100 anos. Acreditava-se que os alcalóides eram compostos nitrogenados destinados à excreção, compostos que armazenavam nitrogênio ou reguladores de crescimento, mas existem poucas evidências que sustentem qualquer uma dessas funções. Acredita-se que a maior parte dos alcalóides funcione em defesa contra predadores, em especial aos mamíferos, devido à sua toxicidade (MITHEN et al., 2000).

Além dos alcalóides, as plantas possuem outros compostos nitrogenados com funções protetoras, como o grupo dos glicosídeos vegetais, os glucosinolatos ou glicosídeos, que liberam na sua decomposição substâncias voláteis de defesa. São encontrados principalmente na família das Brassicaceae e famílias relacionadas. Os glucosinolatos liberam compostos responsáveis pelo odor e pelo gosto característico de vegetais como couve, repolho, brócolis e rabanete (BENNETT; WALLSGROVE, 1994).

A liberação desses compostos voláteis a partir dos glucosinolatos é catalisada por uma enzima hidrolítica denominada tioglicosidase ou mirosinase, que cliva a glicose na sua ligação com o átomo de enxofre. A aglicona resultante, sem açúcar reorganiza-se com a perda do sulfato para originar produtos pungentes e quimicamente reativos, incluindo isotiocianatos e nitrilas,

dependendo das condições de hidrólise. Esses produtos agem na defesa da planta, como toxinas e repelentes contra herbívoros (MITHEN et al., 2000).

2.1.1.3 Compostos fenólicos

As plantas produzem uma variedade de produtos secundários que contêm um grupo fenol e um grupo hidroxila funcional em um anel aromático (Figura 2). Tais substâncias são classificadas como compostos fenólicos. Os fenóis vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos: alguns solúveis apenas em solventes orgânicos, outros são ácidos carboxílicos e glicosídeos solúveis em água e existem aqueles que são grandes polímeros insolúveis. Esses compostos podem ser agrupados em diferentes classes de acordo com sua estrutura química básica e em diferentes subclasses com substituições específicas na estrutura básica, associação com carboidratos e formas polimerizadas (FARAH; DONANGELO, 2006).

Figura 2 - Estrutura química de um fenol simples
Fonte: Bravo (1998)

Os compostos fenólicos são encontrados em todas as partes dos vegetais, mas distribuídos em quantidades diferentes em cada uma delas, podendo variar em diferentes populações de uma mesma espécie. O tipo e variedade de polifenóis variam com o estágio de desenvolvimento da planta, grau de maturação, condições ambientais, solo, manejo, processamento e armazenamento da matéria-prima e devido à sua diversidade química, os compostos fenólicos apresentam uma variedade de funções nos vegetais. A biossíntese pode ocorrer por meio de diferentes rotas, razão pela qual constituem um grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico. Duas rotas metabólicas básicas estão envolvidas na síntese de compostos fenólicos: a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico (Figura 3) (SILVA, 2003; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Figura 3 - Rotas de formação dos compostos fenólicos

Fonte: Adaptado de Rice-Evans; Miller; Paganga (1996); Robards et al. (1999); Taiz; Zeiger (2009)

A estrutura química dos compostos fenólicos determina sua capacidade de atuar como seqüestradores de radicais livres. O tipo de composto, o grau de metoxilação e o número de hidroxilas são alguns dos parâmetros que determinam esta atividade antioxidante, possibilitando atuarem como agentes redutores, exercendo proteção ao organismo contra o estresse oxidativo. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e na quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (GÓMEZ-RUIZ; LEAKE; AMES, 2007).

A classe mais abundante de compostos fenólicos em plantas deriva da fenilalanina, por meio da eliminação de uma molécula de amônio para formar o ácido cinâmico. Essa reação é catalisada pela enzima fenilalanina amonialiase, a qual se situa em um ponto de ramificação entre o metabolismo primário e o secundário, de forma que a reação que ela catalisa é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos. A atividade dessa enzima é aumentada por fatores ambientais, tais como baixos níveis de nutrientes, luz e infecção por patógenos (LICHTENTHALER, 1999).

Os vegetais podem modificar os esqueletos carbônicos básicos de compostos fenólicos simples para formar produtos mais complexos da mesma forma como fazem com outros produtos secundários. Muitos fenólicos simples apresentam funções importantes nos vegetais, agindo como compostos de defesa contra patógenos e herbivoria (TAIZ; ZEIGER, 2009). Na Tabela 1 encontram-se algumas das principais classes de compostos fenólicos em plantas, de acordo com o número de carbonos.

Tabela 1 - Classificação dos compostos fenólicos em plantas de acordo com o esqueleto básico

Classe	Estrutura
Fenólicos simples	C_6
Ácidos fenólicos	C_6-C_1
Acetofenonas, ácidos fenilacéticos	C_6-C_2
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C_6-C_3
Naftoquinonas	C_6-C_4
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$
Estilbenos	$C_6-C_2-C_6$
Flavonóides	$C_6-C_3-C_6$
Lignanas	$(C_6-C_3)_2$
Diflavonóides	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Melaninas vegetais	$(C_6)_n$
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$
Taninos hidrolisáveis	$(C_6-C_1)_n$
Taninos condensados	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Fonte: Adaptado de Balasundram; Sundram; Samman (2006).

As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre determinado meio. Esta atividade, por sua vez, dependerá da estrutura química do composto, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potencial de quelação de metais) (OLDONI, 2007).

Os compostos fenólicos englobam desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (CROFT, 1998). Ribéreau-Gayon (1968) adotou a seguinte classificação para estes compostos: pouco distribuídos na natureza, polímeros e largamente distribuídos na natureza.

Na família dos compostos fenólicos pouco distribuídos na natureza, apresentam-se em número reduzido, embora sejam encontrados com frequência. Neste grupo estão os fenóis

simples (pirocatecol, hidroquinona e o resorcinol) e os aldeídos derivados dos ácidos benzóicos, constituintes dos óleos essenciais.

Os polímeros são compostos fenólicos que não se apresentam em forma livre nos tecidos vegetais, representados pelos taninos e as ligninas. Os taninos são compostos de alto peso molecular, que conferem ao alimento a sensação de adstringência, e classificam-se em dois grupos, baseados em seu tipo estrutural: taninos hidrolisáveis (ácido gálico) e taninos condensados (catequina e leucoantocianidina). As ligninas são polímeros complexos de grande rigidez e resistência mecânica e sua hidrólise alcalina libera uma grande variedade de derivados dos ácidos benzóicos e cinâmico.

Na família dos compostos largamente distribuídos na natureza estão os fenólicos encontrados em todo o reino vegetal. Estes fenólicos estão divididos em dois grandes grupos: ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e os flavonóides e derivados.

O termo “ácidos fenólicos” em geral designa fenóis que possuem um ácido carboxílico funcional. São divididos em três grupos principais: os ácidos benzóicos, os ácidos cinâmicos e as cumarinas. O primeiro possui sete átomos de carbono (C6-C1) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza, caracterizando-se pela hidroxilação do carbono quatro do ácido benzóico, os mais comumente encontrados é o ácido gálico e o ácido protocatéquico (Figura 4).

Figura 4 - Estrutura química do ácido gálico (a) e ácido protocatéquico (b)
Fonte: Stalikas (2007)

O segundo grupo possui nove átomos de carbono (C6-C3), caracterizando-se pela hidroxilação do carbono quatro do ácido cinâmico, sendo os mais representativos os ácidos *o*-cumárico, caféico e ferúlico (Figura 5). As cumarinas são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido *o*-cumárico (Figura 6).

Figura 5 - Estruturas química do ácido ferúlico (a), ácido caféico (b) e ácido *o*-cumárico (c)
Fonte: Balasundram; Sundram; Samman (2006)

Figura 6 - Estrutura química das cumarinas
Fonte: Ramalho; Jorge (2006)

A atividade antioxidante dos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos é maior do que a dos ácidos hidroxibenzóicos. A presença do grupo $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ na estrutura do ácido cinâmico aumenta sua capacidade de estabilizar radicais livres. Provavelmente, ocorre a conjugação da dupla ligação do grupo $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ com as ligações duplas do anel (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Os flavonóides constituem a maior classe de fenólicos vegetais: são os pigmentos mais comuns depois da clorofila e carotenóides. Ocorrem geralmente em plantas como derivados glicosilados e seu papel fisiológico é diverso. Devido as suas cores atrativas, flavonas, flavonóis e antocianidinas contribuem como sinais visuais para os insetos durante a polinização. Além disso, a adstringência da catequina e outros flavonóis podem representar um sistema de defesa contra insetos nocivos as plantas. Agem também como catalisadores da fotossíntese e reguladores dos canais de íons envolvidos na fosforilação. Protegem células vegetais de espécies reativas de oxigênio produzidas pelo sistema de transporte de elétrons fotossintético e, por apresentarem propriedades absorptivas de ultravioleta, protegem as plantas contra a radiação ultravioleta do sol (STALIKAS, 2007).

Estruturalmente, os flavonóides constituem compostos de baixo peso molecular, consistindo de 15 átomos de carbono, contendo um esqueleto comum de difenilpiranos ($\text{C}_6-\text{C}_3-\text{C}_6$), compostos por anéis fenil ligados através de um anel pirano (heterocíclico). A atividade dos

flavonóides como agentes antioxidantes depende da propriedade redox de seus grupos hidrofenólicos e da relação estrutural entre as diferentes partes da estrutura química. Esta estrutura básica permite uma magnitude de padrões e substituições e variações no anel pirano, essas variações em substituição do anel pirano resultam em importantes classes de flavonóides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas e antocianidinas (ANGELO; JORGE, 2007).

A presença de grupos hidroxilas e açúcares aumentam a solubilidade em água dos flavonóides, outros substituintes, tais como éteres metílicos ou unidades de isopentil modificadas, tornam os flavonóides lipofílicos (hidrofóbicos). Os tipos diferentes de flavonóides desempenham diversas funções nos vegetais, incluindo pigmentação e defesas. De acordo com suas características químicas e biossintéticas, os flavonóides são separados em diversas classes: flavonas, flavonóis, dihidroflavonóides (flavanonas e flavanonóis), antocianidinas, isoflavonóides, auronas, neoflavonóides, biflavonóides, catequinas e seus precursores metabólicos conhecidos como chalconas e podem ocorrer como agliconas, glicosilados e como derivados metilados (OLDONI, 2007; STALIKAS, 2007).

Devido à grande diversidade estrutural, os possíveis benefícios à saúde de uma dieta com alimentos ricos em compostos fenólicos dependem da sua absorção e metabolismo, que são determinados pela estrutura química, como a conjugação com outros fenólicos, grau de glicosilação, acilação, tamanho molecular, solubilidade, hidroxilação e metilação (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

O grupo mais comum dos flavonóides pigmentados consiste nas antocianinas, as quais são responsáveis pela maioria das cores vermelha, rosa, roxa e azul observadas nos vegetais. Estruturalmente são constituídos por glicosídeos que apresentam açúcares ligados a sua estrutura no carbono três do anel pirano. Sem a presença dos açúcares em sua estrutura, as antocianinas são conhecidas como antocianidinas. A cor das antocianinas é influenciada pelo número de grupos hidroxila e metoxila no anel B da antocianidina, pela presença de ácidos aromáticos esterificados ao esqueleto principal e o pH do vacúolo no qual tais compostos estão armazenados (KONDO et al., 1992).

As flavonas e flavonóis estão muito presentes em flores e nas folhas de todas as plantas verdes, absorvem luz em comprimentos de ondas mais curtos do que as antocianidinas, agem na proteção das células contra o excesso de radiação UV-B (280–320 nm), pois se acumulam nas camadas epidérmicas das folhas e caules e absorvem intensamente a luz na região UV-B,

enquanto permitem a passagem contínua dos comprimentos de luz visível. As isoflavonas são flavonóides principalmente encontrados em leguminosas, com atividades biológicas descritas, como potente inseticida (rotenóides) e antiestrogênica (FERREIRA; OLIVEIRA; SANTO, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2009).

2.1.2 Resíduos vegetais como fonte de compostos bioativos

Nas últimas décadas, a população mundial cresceu de maneira acentuada, aumentando o interesse por pesquisas que proporcionem um melhor aproveitamento dos alimentos, visando à utilização total dos recursos alimentícios, de maneira que essa população possa manter um nível de alimentação com alto valor nutritivo e evitando assim os desperdícios (PEREIRA et al., 2003).

Os resíduos de frutas, hortaliças e sementes são geralmente desperdiçados em todos os pontos de comercialização até o consumo final, incluindo agricultores, indústrias e consumidor. Os alimentos e os seus subprodutos, que muitas vezes destinam-se a ração animal, poderiam ser utilizados como fontes alternativas de compostos bioativos, diminuindo o desperdício de alimentos e no caso da agroindústria, agregando valor aos subprodutos.

Nos últimos anos cresceu o interesse pelos antioxidantes naturais de extratos de plantas devido à sua baixa toxicidade em relação aos antioxidantes sintéticos. Extratos de frutas, vegetais, cereais, sementes e seus subprodutos industriais são ricos em antioxidantes como o ácido ascórbico, tocoferóis, carotenóides e em compostos fenólicos (WOLFE; WU; LIU, 2003; MANACH et al., 2005).

Estudos demonstram que as cascas de arroz, amêndoas, trigo, pistache são fontes significativas de antioxidantes, representados principalmente pela presença de compostos fenólicos (RAMARARHNAME et al., 1995; WATANABE; OHSHITA; TSUHIDA, 1997; TAKEOKA; DAO, 2002; BRYNGELSSON et al., 2002; GOLI; BARZEGA; SAHARI, 2005 apud BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Outros resíduos gerados pela indústria alimentícia e no uso doméstico, como peles, cascas e fibras de frutas e vegetais são importantes fontes de antioxidantes naturais. Peschel et al. (2006), estudando peles de maçã e pêssgo verificaram que na pele destas frutas os teores de compostos fenólicos estão na ordem de $48,6 \pm 0,9$ e $60,7 \pm 0,9$ mg AG g⁻¹, respectivamente, sendo duas vezes superiores aqueles observados na polpa, demonstrando que uma riqueza em compostos bioativos esta sendo desprezados pela sociedade.

O maracujá é uma fruta muito utilizada pela agroindústria na produção de polpa, gerando uma grande quantidade de resíduos. Estudo demonstra que o suco de maracujá, já demonstrou a presença de diversos fitoquímicos com propriedade antioxidante, entretanto não existe nenhuma pesquisa que avaliando o potencial bioativo e a capacidade antioxidante dos resíduos gerados após o processamento desta fruta, no entanto, a avaliação da atividade antioxidante e do teor e composição de compostos fenólicos presentes no suco da fruta já foram realizados e indicaram a presença de diversos compostos fitoquímicos com propriedades antioxidantes (TALCOTT et al., 2003). Da mesma forma a alcachofra é muito utilizada pela indústria para fins alimentícios e medicinais, e, estudos têm demonstrado que os principais componentes químicos presentes nas folhas são os ácidos fenólicos, flavonóides e sesquiterpenos (NOLDIN et al., 2003).

O rabanete, o nabo, a couve e o brócolis pertencem a família Brassicaceae, que liberam na sua decomposição glicosinolatos que originam compostos responsáveis pelo odor e gosto característico desses vegetais. Esses produtos liberados agem na defesa da planta e há indícios de que esses vegetais apresentem importantes efeitos anti-carcinogênicos associados a atividade biológica dos produtos da decomposição dos glicosinolatos. Do mesmo modo, a beterraba apresenta as betalainas que são produtos naturais provenientes do metabolismo secundário e pertencentes ao grupo dos compostos secundários nitrogenados. São pigmentos hidrossolúveis, sendo divididos em duas classes: as betacianinas (cor avermelhada) e as betaxantinas (cor amarelada), caracterizando a coloração típica das raízes. Já a cenoura destaca-se pelo alto valor nutritivo, como um das principais fontes vegetais de pró-vitamina A (carotenóides). Os valores de vitamina C e caroteno encontrado nas folhas de cenoura e beterraba são maiores do que as encontradas nas partes usualmente utilizadas (SARTORELLI, 1998; CASTRO; KLUGE; PERES, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2009).

O consumo de vegetais crucíferos é fortemente associado à proteção contra o câncer, pois estes vegetais possuem muitos componentes bioativos; entre os mais estudados estão os glicosinolatos. Os glicosinolatos são compostos que ocorrem em muitas culturas agronomicamente importantes como o rabanete, a couve-flor, a couve, o brócolis, a mostarda e o nabo. O conteúdo desses compostos nas plantas varia entre as cultivares e as partes da planta, devido a fatores tais como a genética, o solo e nutrientes fornecidos a planta. Podem ser encontrados nas raízes, sementes, folhas e caule, sendo que os tecidos mais jovens contêm uma quantidade maior (BLAZEVIC; MASTELIC, 2009).

A abóbora é um vegetal da família das curcubitáceas, nativa das Américas, que apresenta boa fonte de caroteno, os quais são importantes precursores da vitamina A. Segundo Stahl e Sies (2003) os carotenóides fazem parte do sistema de defesa antioxidante em humanos e animais, devido à sua estrutura que atua protegendo as estruturas lipídicas da oxidação ou por seqüestro de radicais livres gerados no processo foto-oxidativo.

A literatura relata muitos benefícios à saúde associados com o consumo de amendoim, incluindo a prevenção contra doenças cardiovasculares (FELDMAN, 1999), a proteção contra o mal de Alzheimer e a inibição de câncer (AWAD et al., 2000). Estes benefícios são atribuídos principalmente pelo fato de que no amendoim não contêm ácidos graxos trans (SANDERS, 2001), é rico em ácidos graxos mono e poliinsaturados (KRIS-ETHERTON et al., 1999), micronutrientes como vitamina E, minerais (potássio, magnésio e zinco), fibras e fitoquímicos, em especial resveratrol, dentre outros compostos fenólicos (SANDERS; MCMICHAEL; HENDRIX, 2000; SOBOLEV; COLE, 1999). A pele tem uma cor avermelhada e um gosto adstringente, existem poucos estudos que têm demonstrado que a pele do amendoim é uma fonte rica de nutracêuticos e compostos bioativos, tais como os compostos fenólicos (YU et al., 2005).

Além do fato de diminuir o desperdício de alimentos, essas partes vegetais tradicionalmente não consumidas são fontes ricas de antioxidantes naturais, agindo isoladamente ou em sinergismo com outras substâncias e/ou aditivos nos alimentos, prevenindo os efeitos dos radicais livres no organismo e a deterioração oxidativa em alimentos, diminuindo assim o uso de antioxidantes sintéticos e agentes conservadores (MELO; VILELA, 2005).

2.1.3 Radicais livres e peroxidação lipídica

Atualmente, o grande interesse em relação a diversas substâncias bioativas, particularmente os antioxidantes naturais, deve-se aos efeitos destes compostos sobre os radicais livres e conseqüentes benefícios que promovem ao organismo (PEREIRA; VIDAL; CONSTANT, 2009).

Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou átomos que possuem um ou mais elétrons não pareados. Esta configuração faz com que essas moléculas sejam altamente reativas e em excesso interfiram negativamente na manutenção de muitas funções fisiológicas normais do organismo (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

No organismo são produzidos radicais livres de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio, mas entre todos o que mais se destaca, devido à reatividade e aos danos que podem ocasionar, são os radicais derivados do oxigênio. Esses radicais de oxigênio são produzidos principalmente na mitocôndria, e são conhecidos como espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (FERNANDEZ-PANCHON et al., 2008).

Esses radicais encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes no organismo. No entanto, quando em excesso, representam efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação de lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, enzimas, carboidratos e DNA, relacionando-se com várias patologias crônicas e degenerativas, incluindo o câncer, doenças cardíacas, mal de Alzheimer e também o processo de envelhecimento (FERNANDEZ-PANCHON et al., 2008; BARREIROS; DAVID, 2006).

A oxidação lipídica de ácidos graxos insaturados nas membranas lipídicas é um processo conhecido como peroxidação lipídica que pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, gerando principalmente radicais hidroxilas, alcoxilas e peroxilas, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (BENZIE; STRAIN, 1996). Esse processo promove grave alteração da membrana celular, causando perda da fluidez, alteração da função secretora e dos gradientes iônicos transmembrana, perda da seletividade na troca iônica, com liberação do conteúdo de organelas, levando à formação de produtos citotóxicos até a morte celular (VACA; WILHEM; HARMS-RINGDAHL, 1988; BABER; HARRIS, 1994).

A peroxidação lipídica consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poliinsaturado para produzir um hidroperóxido lipídico como produto primário inicial. Nos sistemas biológicos pode ocorrer principalmente por duas vias: enzimática envolvendo as ciclooxigenases e lipoxigenases na oxigenação dos ácidos graxos poliinsaturados e a peroxidação não enzimática, que envolve a participação de espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio, metais de transição e outros radicais livres (AL MEHDI et al., 1993; PORTER; CALDWELL; MILLS, 1995).

Os antioxidantes podem inibir a peroxidação lipídica, pois atuam interrompendo a cadeia de peroxidação pela reação com os radicais peroxila ou alcoxila e, dessa forma, gerando um

hidroperóxido e um radical livre formado a partir do antioxidante. Entre os antioxidantes, está o α -tocoferol, que interage com o oxigênio singlete e fornece átomos de hidrogênio para o radical peroxila dos ácidos graxos, impedindo dessa forma a reação em cadeia que se propaga nas membranas lipídicas (MAFRA; ABDALLA; COZZOLINO, 1999; KOLEVA et al., 2002).

2.1.4 Antioxidantes

O organismo possui diferentes mecanismos de defesa antioxidante para combater o excesso de radicais englobando enzimas (catalase, superóxido dismutase, glutathione redutase, glutathione peroxidase), pequenas moléculas antioxidantes (ácido úrico, glutathione, albumina, grupos protéicos, bilirrubina), além de certas vitaminas (ácido ascórbico, α -tocoferol) e carotenóides (FERNANDEZ-PANCHON et al., 2008). Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, diminui ou inibi significativamente a oxidação do mesmo (HALLIWELL, 2000).

Os antioxidantes são classificados em dois grupos, os primários e os secundários. Os antioxidantes primários são capazes de interromper a cadeia de radicais, cedendo hidrogênio a um radical lipídico livre e assumindo a forma de radical estável. Os secundários reduzem o processo de iniciação, utilizando agentes quelantes de metais (GORDON, 1990).

Os antioxidantes obtidos diariamente na dieta tais como vitaminas A, C e E, os flavonóides e carotenóides, promovem uma ação protetora contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo, sendo extremamente importantes na interceptação dos radicais livres. Em outros casos ainda, atuam como reparadores de lesões já causadas (BIANCHI; ANTUNES, 1999; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Em relação aos alimentos são utilizados os antioxidantes sintéticos que em sua maioria são fenóis mono ou polihídricos com várias substituições no anel. A presença de uma estrutura de anel conjugado e grupos hidroxilas atribui aos compostos fenólicos a capacidade de estabilizar os radicais livres. São chamados de aceptores ou inativadores de radicais livres, pois interrompem a cadeia de radical das reações oxidativas, contribuindo com hidrogênio de grupos hidroxilas fenólico. Os antioxidantes primários mais comuns são o butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butil hidroquinona (TBHQ), galatos e tocoferóis (WANASUNDARA; SHAHIDI, 1998).

Antioxidantes sintéticos são normalmente utilizados na indústria de óleos e de derivados lipídicos para evitar o processo de oxidação; entretanto, estes compostos podem apresentar alguns inconvenientes à saúde, principalmente alergias. Devido a isso, nos últimos anos se tem preocupação de se obter substâncias naturais que possuam função e eficiência similares aos antioxidantes sintéticos e poderem desempenhar, simultaneamente, as funções de mais do que um dos seus equivalentes sintéticos.

2.1.5 Métodos de avaliação de atividade antioxidante *in vitro*

Os antioxidantes naturais podem ser extraídos de vegetais e plantas disponíveis, sendo excelentes fontes de terpenos, compostos fenólicos e nitrogenados. Tais substâncias têm demonstrado alto potencial de compostos bioativos, podendo ser utilizadas principalmente na indústria alimentícia e farmacêutica (ZHENG; WANG, 2001).

Em virtude da grande diversidade química existente, particularmente entre os compostos fenólicos, vários ensaios *in vitro* têm sido desenvolvidos para avaliar a capacidade antioxidante de diferentes amostras. Entre esses diversos métodos e sistemas de solventes para extração de compostos antioxidantes em vegetais, existem alguns fatores que podem afetar o processo como: tipo do solvente e polaridade pode afetar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio, sendo aspecto-chave na medida da capacidade antioxidante; a presença de compostos não antioxidantes nas soluções testadas (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006).

Os vegetais passam por algumas etapas preliminares como a desidratação, liofilização, congelamento entre outros, a fim de facilitar processo de extração e conservar os compostos antioxidantes. Assim, os substratos atingem maior superfície de contato com o solvente de extração (JUNTACHOTE; BERGHOFER, 2005).

Desta forma existem diversos métodos para a extração dos compostos antioxidantes em vegetais, dentre esses, podem ser citados os métodos tradicionais de extração utilizando solventes (como água, etanol, éter, acetato de etila, clorofórmio, hexano e metanol) e a extração supercrítica que mediante as mudanças na pressão e na temperatura transforma o dióxido de carbono (CO₂) em fluido supercrítico para a extração (LEAL et al., 2003; REHMAN; HABIB; SHAH, 2004). Apesar da utilização de diferentes solventes no processo de extração e métodos para a determinação da atividade antioxidante, ainda não existe um procedimento metodológico universal (FRANKEL; MEYER, 2000).

Sob o ponto de vista químico não há como selecionar a metodologia mais eficiente para a extração e isolamento de todos ou de classe específica de antioxidantes naturais, devido a diversos fatores. A natureza química desses compostos nos alimentos varia do simples ao altamente polarizado e há uma grande variedade de compostos bioativos nos vegetais (como os ácidos fenólicos, antocianinas e taninos) e diferentes quantidades presentes, além da possibilidade de interação dos compostos antioxidantes com carboidratos, proteínas e outros componentes dos alimentos. Alguns desses complexos com alto peso molecular são altamente insolúveis em água. Entretanto, os extratos sempre contêm mistura de substâncias fenólicas de diferentes classes que são solubilizadas no solvente escolhido (SHAIDI; NACZK, 1995).

Os compostos fenólicos absorvem energia radiante na região do ultravioleta e esta característica fornece a base para quantificação espectrofotométrica de fenólicos totais. Os métodos de avaliação não são específicos e podem superestimar o conteúdo fenólico, entretanto são bastante utilizados pela praticidade e simplicidade. Um dos métodos mais utilizados é o ensaio de Folin-Ciocalteu, porém não é um método específico e detecta todos os grupos fenólicos encontrados nos vegetais, incluindo aqueles encontrados nas proteínas extraídas. A desvantagem deste método é a interferência de substâncias redutoras como ácido ascórbico (ROBARDS, 2003). Segundo Sousa et al. (2007), o método de Folin-Ciocalteu que quantifica os polifenóis totais pode ser influenciado por compostos tais como os aminoácidos, açúcares e a vitamina C, superestimando os valores da concentração de polifenóis totais.

Diversos ensaios têm sido utilizados para determinar a atividade antioxidante *in vitro* e podem ser classificados em duas categorias: ensaios baseados em estudos de cinética química, denominados de métodos diretos e ensaios mediados pela transferência de elétrons, métodos indiretos. O primeiro método é caracterizado pela presença de uma competição entre uma sonda oxidável e o antioxidante pelos radicais gerados por uma fonte de radicais livres, já o segundo método caracteriza-se pela habilidade do antioxidante em seqüestrar alguns radicais livres, que não estão associados com a real degradação oxidativa (HUANG; OU; PRIOR, 2005; ROGINSKY; LISSI, 2005).

Os métodos *in vitro* são avaliações potenciais da atividade antioxidante de um determinado composto puro ou extrato. Dentre os métodos espectrofotométricos *in vitro* mais utilizados estão o ensaio do DPPH radical (2,2-difenil-1-picrilidrazil), autooxidação do sistema

beta-caroteno/ácido linoléico, método ABTS (2,2- azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico) e o FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) (ROBARDS, 2003).

2.1.5.1 Ensaio do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil)

O ensaio do DPPH tornou-se bastante popular no estudo dos antioxidantes naturais, sendo uma das razões por se apresentar como um método simples e altamente sensível. Baseia-se na teoria de que um doador de hidrogênio é um antioxidante. O princípio do ensaio do DPPH é a redução do radical livre estável orgânico de nitrogênio (2,2-difenil-1-picrilidrazil), o qual apresenta o máximo de absorção a 515-520 nm na coloração violeta. Ao abstrair um radical hidrogênio do antioxidante em estudo, observa-se uma diminuição da absorbância e da coloração passando da cor violeta para o amarelo, reação apresentada na (Figura 7). O ensaio do DPPH é um teste rápido, simples, preciso e com boa reprodutibilidade dos resultados, que não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação. Entretanto, algumas precauções devem ser tomadas quanto à utilização do método e interpretação dos resultados, dentre eles, o tipo e concentração do composto analisado, cinética de reação do antioxidante, características do meio reacional (pH, tipo de solvente), presença de interferentes, sinergismo, afinidade solvente-substrato e maneira de expressar os resultados (MOLYNEUX, 2003).

Figura 7 - Estrutura química do radical DPPH e reação de estabilização com um antioxidante
Fonte: Moon; Shibamoto (2009)

Os resultados do DPPH são expressos de diversas maneiras, dentre eles o EC_{50} o qual tem sido muito utilizado, representando a quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50%. Esse método foi introduzido como sendo um método fácil e preciso para uso em frutas e extratos vegetais (ATMANI et al., 2009). Por isso, numerosos estudos sobre os antioxidantes presentes em plantas têm sido realizados usando o método DPPH, incluindo frutas e produtos hortícolas (PINTO et al., 2008).

2.1.5.2 Autoxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoléico

O método da autoxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoléico foi desenvolvido por Marco (1968), modificado por Miller (1971) e utiliza o ácido linoléico, o monopalmitato de polioxietileno sorbitan (Tween 40) e o beta-caroteno. O ácido linoléico em presença de oxigênio forma o radical peroxil ($\text{LOO}^\bullet$), este radical reage com o beta-caroteno, resultando na perda da coloração da solução passando da cor amarelo intenso para amarelo claro. A adição de uma amostra que contenha antioxidantes pode reagir competitivamente com o radical peroxil, contribuindo para retardar a queda de absorbância do beta-caroteno. Portanto os antioxidantes presentes nas amostras podem ser facilmente monitorados pelo branqueamento da cor da solução (JAYAPRAKASHA; PATIL, 2007). Este método é amplamente utilizado principalmente por não recorrer a altas temperaturas, permitindo a determinação do poder antioxidante de compostos termossensíveis e a avaliação qualitativa de extratos vegetais. Este ensaio apresenta algumas desvantagens como a dificuldade de interpretação dos dados devido a interação do beta-caroteno com oxigênio e a reprodutibilidade dos valores de absorbância médios (AMIN; NORAZAIDAH; HAINIDA, 2006).

2.1.5.3 Método ABTS (2,2- azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico))

A determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre ABTS^{*+} (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)) tem sido amplamente utilizada na avaliação da atividade antioxidante em alimentos e bebidas, devido à sua aplicabilidade na fase aquosa e lipídica e oferecer resultados reprodutíveis (MACDONALD-WICKS; WOOD; GARG, 2006). Inicialmente o ensaio do ABTS foi baseado na ativação de metamioglobina com peróxido de hidrogênio na presença de ABTS para gerar o radical ABTS^{*+} , com ou sem a adição de antioxidantes no meio, com o passar dos anos o método foi aperfeiçoado sendo que o radical passa a ser gerado sem a presença de antioxidantes, o radical ABTS estável, que tem uma absorção cromóforo azul-verde, é formado pela reação de persulfato de potássio com (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)) produzindo a oxidação do ABTS (Figura 8). A atividade antioxidante de produtos naturais é determinada pela descoloração do ABTS, medindo-se a redução do radical a uma absorbância de 734 nm (BIGLARI; ALKARKHI; EASA, 2008). A absorbância da reação da mistura de ABTS e um antioxidante é comparada com atividade do

antioxidante sintético Trolox (padrão), e os resultados são expressos em μMol de Trolox TEAC.g^{-1} (atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

Essa metodologia pode avaliar a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica, mas vale ressaltar que a reação com doadores de hidrogênio apresenta baixa seletividade, e dependendo do composto, como por exemplo, alguns polifenóis e produtos de origem natural, a reação com ABTS é muito lenta podendo influenciar no resultado (SURVESWARAN et al., 2007). Este método tem sido aplicado na investigação de atividade antioxidante de muitos produtos naturais, incluindo frutas e vegetais (TACHAKITTIRUNGROD; OKONOJI; CHOWWANAPHOONPOHN, 2007).

Figura 8 - Formação do radical ABTS estável com o persulfato de potássio
Fonte: Moon; Shibamoto (2009)

2.1.5.4 FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

O ensaio do FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) – Poder Antioxidante de Redução do Ferro foi desenvolvido inicialmente para quantificar o ácido ascórbico em soro ou plasma (BENZIE; STRAIN, 1996). Este método está baseado na capacidade de um antioxidante em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} , quando isso ocorre na presença de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) e em condições ácidas a redução é acompanhada pela formação de um complexo corado (azul intenso) com o Fe^{2+} , com uma absorção máxima a 593 nm (Figura 9). Este ensaio oferece resultados rápidos e reprodutíveis, apresentando como desvantagens o fato de que a curva padrão deverá ser realizada com um antioxidante que seja solúvel em água como o ácido ascórbico e o Trolox e geralmente não consegue medir todos os antioxidantes presentes em uma matriz complexa (APAK et al., 2004). No entanto, muitos estudos sobre plantas e alimentos utilizam esse método em conjunto com outros ensaios.

Figura 9 - Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+}
 Fonte: Rufino et al. (2006)

2.1.5.5 Método Rancimat

O método Rancimat ou índice de estabilidade de óleo é muito utilizado para a avaliação da oxidação lipídica em óleos e gorduras, sendo uma das reações mais importantes que podem ocasionar deterioração de sua qualidade. Alguns métodos têm sido desenvolvidos ao longo dos anos para se testar a resistência de gorduras e óleos à oxidação. Todos esses métodos envolvem o uso de temperaturas elevadas devido ao fato de que a taxa de reação da temperatura se comporta de maneira exponencial. Entre os métodos mais utilizados está o Rancimat devido principalmente à sua facilidade de utilização e reprodução dos resultados (GONZAGA et al., 2007; FARHOOSH et al., 2008). Baseia-se na determinação automática do tempo decorrido para se atingir a taxa máxima de oxidação de um óleo. Esse tempo, também chamado de período de indução ou índice

de estabilidade do óleo é determinado pela medida do aumento da condutividade da água deionizada, devido ao aumento de ácidos graxos voláteis gerados na amostra de óleo aquecido a altas temperaturas em aeração constante, esses compostos são presos em água e monitorados por condutividade elétrica (FARHOOSH et al., 2008).

Este método apresenta como vantagens a determinação de alguns parâmetros cinéticos dados que podem ser utilizados para distinguir a origem de óleos vegetais ou para caracterizar diferenças ou semelhanças entre os óleos. Estes dados são muito úteis para se predizer a estabilidade oxidativa de óleos vegetais em processamento térmico diversos, armazenamento e condições de distribuição (KOWALSKI et al., 2004).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Obtenção e tratamentos iniciais dos resíduos vegetais

Os resíduos vegetais foram adquiridos de hortas e feiras da região de Piracicaba – SP, coletados entre os meses de fevereiro a maio do ano de 2009, os quais foram talo de couve, talo de beterraba, talo de brócolis, folha/talo de cenoura, casca de abóbora, folhas/talo de nabo, casca de maracujá, folha/talo de rabanete. O resíduo de alcachofra (pétalas das flores inutilizadas para a produção de conservas) foi proveniente da Agroindústria Conservas de Alcachofras Bom Sucesso (São Roque-SP). A película de amendoim foi fornecida pela CAP Agroindustrial (Dumont-SP). A película foi produzida por meio do processo de blanchamento onde a mesma é separada do endosperma (grão) por aumento de temperatura, o que promove a expansão do grão. Na seqüência, diminui-se a temperatura com ar frio, ocorrendo à contração, e a película se solta do endosperma com auxílio de um processo de abrasão (lixamento).

No laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP, os resíduos vegetais foram lavados e os talos de couve, beterraba e brócolis separados de suas folhas. Para a abóbora e maracujá utilizou-se apenas as casca. Já para o rabanete, nabo e cenoura foram utilizados as folhas e os talos. A película de amendoim foi o único resíduo vegetal que não passou pelo processo de liofilização. A Figura 10 ilustra o aspecto dos materiais utilizados neste trabalho.

Figura 10 – Resíduos vegetais: talo de couve (A), talo de brócolis (B), talo de beterraba (C), folha/talo de rabanete (D), folha/talo de cenoura (E), casca de abóbora (F), resíduo de alcachofra (G), folha/talo de nabo (H), casca de maracujá (I) e película de amendoim (J)

2.2.2 Preparo dos extratos dos resíduos vegetais

Os extratos dos resíduos vegetais foram feitos em triplicatas, conforme descrito por Bloor (2001), e preparados em escala laboratorial com o emprego de solventes de diferentes polaridades

sendo consideradas as misturas de etanol:água destilada(80:20 v/v), água destilada, acetato de etila (99%) , clorofórmio (99%) e hexano (99%).

Inicialmente foi pesado 1g de cada resíduo liofilizado e não liofilizado (película de amendoim), obtido conforme o item 2.2.1, e adicionado 10 mL de cada solvente. Houve uma particularidade no caso da água, onde se adicionou 20 mL do solvente devido à consistência e elevada viscosidade que ficou o extrato tanto com o material liofilizado quanto não liofilizado (película de amendoim). A extração foi conduzida em ultrassom, a temperatura ambiente, durante 15 minutos. Após isto, o extrato foi centrifugado a 5000 x g durante 15 minutos, filtrado em papel *Whatman* nº 3 e o sobrenadante recolhido e armazenado em frasco âmbar para as análises subsequentes, por um prazo não superior a uma semana.

2.2.3 Seleção dos solventes com maior poder de extração de compostos antioxidantes

Para avaliar e selecionar o(s) melhor (es) solvente(s) dentre etanol:água destilada (80:20 v/v), água destilada, acetato de etila (99%), clorofórmio (99%) e hexano (99%), foi utilizado a metodologia do DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), essa medida de capacidade sequestrante baseia-se no princípio de que o DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), sendo um radical estável de coloração violeta, aceita um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula estável, sendo reduzido na presença de antioxidantes e adquirindo coloração amarela. Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a $\lambda=517$ nm, que desaparece à medida que ele vai sendo reduzido pelo hidrogênio doado por um composto antioxidante (MENSOR et al., 2001).

Foram utilizados os padrões de α -tocoferol e butil-hidroxi-tolueno (BHT) na concentração de 90 $\mu\text{g/mL}$. A mistura de reação ocorreu em tubos de vidro e foi constituída pela adição de 500 μL dos padrões ou extratos dos resíduos vegetais, 3,0 mL de etanol 99% e 300 μL do radical DPPH em solução de etanol 0,5 mM, e, incubada por 45 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A atividade anti-radical foi determinada na forma de atividade antioxidante (AA), pela Equação 1:

$$AA(\%) = 100 - \left(\frac{((A_a - A_b) \times 100)}{A_c} \right) \quad (1)$$

Onde:

Aa = absorbância da amostra

Ab = absorbância do branco

Ac = absorbância do controle negativo

O controle negativo foi feito substituindo-se o volume do extrato por igual volume do solvente utilizado na extração. O branco foi preparado substituindo o volume da solução de DPPH por igual volume de solvente.

2.2.4 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

A análise do teor de compostos fenólicos totais dos extratos dos resíduos vegetais foi feita de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela (1999), utilizando ácido gálico como padrão. O reagente de Folin-Ciocalteu é uma solução complexa de íons poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W. A leitura foi feita em espectrofotômetro a $\lambda=740$ nm.

Os extratos dos solventes selecionados de acordo com o item 2.2.2 foram diluídos e, uma alíquota de 0,5 mL da amostra diluída foi transferida para um tubo e adicionado 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído em água 1:10 (1:9 v/v). A mistura permaneceu em repouso por 3 a 8 minutos. Em seguida, adicionou-se 2 mL da solução de carbonato de sódio e água (4:96 m/v) e os tubos foram deixados em repouso por duas horas ao abrigo da luz. A absorbância foi medida em espectrofotômetro UV-mini 1240 (Shimadzu-Co) a $\lambda=740$ nm. Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições e os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente de ácido gálico (mg AG/g resíduo vegetal) calculados por meio do ajuste da curva de calibração do ácido gálico com concentrações que variaram de 5 a 80 $\mu\text{g/mL}$ (Apêndice 1).

2.2.5 Avaliação da atividade antioxidante

2.2.5.1 Atividade sequestrante do radical livre (DPPH) e o EC_{50}

A metodologia do DPPH descrita conforme o item 2.2.3, foi utilizada para medir a capacidade antioxidante dos solventes escolhidos etanol:água (80:20 v/v) e água destilada.

O radical DPPH reage rapidamente com alguns fenóis, mas existem reações secundárias que atuam concomitantemente, ocorrendo de forma lenta causando um progressivo decréscimo

na absorbância, podendo demorar algumas horas para que a reação seja estabilizada. Sendo assim, uma melhor interpretação dos resultados do método do DPPH é por meio do EC_{50} , o qual é definido como a concentração de substrato que reduz em 50% o radical DPPH (cor) inicial da reação. Esse parâmetro foi aparentemente introduzido por Brand-Williams e colaboradores (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; BONDET; BRAND-WILLIAMS; BERSET, 1997) e indica que quanto maior a atividade antioxidante, mais baixo é o valor de EC_{50} .

Os valores do EC_{50} foram calculados por regressão linear dos gráficos em que o eixo das abscissas representou a concentração dos extratos e o eixo das ordenadas a atividade antioxidante (%) calculada segundo a Equação 1. A cinética dos extratos dos vegetais foi determinada por meio do monitoramento a cada 20 minutos, durante 120 minutos, do declínio da absorbância da solução de DPPH a 517 nm. As concentrações utilizadas na reação foram calculadas a partir do extrato bruto 10% para o solvente etanol:água (80:20 v/v) (1,0 g resíduo vegetal liofilizado/10 mL de solvente) e o extrato bruto 5% para a solvente água (1,0 g resíduo vegetal liofilizado/20 mL de solvente) e submetidas à reação.

2.2.5.2 Atividade antioxidante pelo método ABTS

A atividade antioxidante pelo método ABTS [2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] foi feita conforme metodologia descrita por Rufino et al. (2007). O radical $ABTS^{\bullet+}$ foi formado pela reação de ABTS 7 mM com persulfato de potássio 140 mM, incubado à temperatura de 25 °C, em ambiente escuro, durante 16 horas. Uma vez formado o radical foi diluído com etanol 99% até a obtenção do valor de absorbância de $0,700 \pm 0,200$ a 734 nm.

A partir dos extratos dos resíduos vegetais obtidos com os melhores solventes e preparados conforme o item 2.2.2, foi preparado três diluições diferentes em triplicata. Em ambiente escuro, um volume de 3,0 mL da solução de radical $ABTS^{\bullet+}$ foi acrescentado a 30 μ L de cada diluição dos extratos, e, as absorbâncias lidas após seis minutos da reação em espectrofotômetro a 734 nm, utilizando o etanol 99% como branco. Foi utilizado como referência o Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico), um antioxidante sintético análogo à vitamina E, nas concentrações de 100 a 2000 μ M (Apêndice 2). Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em μ M trolox/g de resíduo vegetal.

2.2.5.3 Autoxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoléico

A medida da atividade antioxidante pela oxidação acoplada do beta-caroteno e do ácido linoléico foi realizada de acordo com o método de Emmons, Peterson e Paul (1999). Foram pesados inicialmente 10 mg de beta-caroteno, que foram dissolvidos em 100 mL de clorofórmio. Após isto, foi retirada uma alíquota de 3 mL da solução clorofórmio/beta-caroteno e adicionou-se 40 mg de ácido linoléico e 400 mg de Tween 40. Em seguida, o clorofórmio foi removido com a utilização de uma corrente de gás nitrogênio e o resíduo obtido foi redissolvido em 100 mL de água aerada durante 30 minutos. Alíquotas de 3 mL da emulsão beta-caroteno/ácido linoléico foram misturadas com 50 µL dos extratos dos resíduos vegetais obtidos com os melhores solventes, todos diluídos na razão de 1:10, e incubadas em banho-maria a 50 °C. A oxidação da emulsão foi monitorada em espectrofotômetro a $\lambda=470$ nm, no tempo inicial e em intervalos de 20 minutos durante duas horas. Para a amostra controle utilizou-se solvente etanol 80% e água destilada no lugar do extrato dos resíduos vegetais. Como controle positivo foi utilizado padrão de BHT na concentração de 100 ppm.

A atividade antioxidante (AA) foi expressa como percentual de inibição relativa comparada ao controle depois de 120 minutos utilizando-se a Equação 2:

$$AA(\%) = \frac{(DRc - DRs)}{DRc} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

DRc = taxa de degradação do controle ($= \ln(a/b)/120$)

DRs = taxa de degradação na presença do padrão ou extrato ($= \ln(a/b)/120$)

“a” e “b” são as absorbâncias no tempo inicial (0 min) e no tempo final (120min), respectivamente.

2.2.5.4 Estabilidade oxidativa - método Rancimat

O método Rancimat foi realizado de acordo com o descrito por Murcia, Jiménez e Matínez-Tomé (2001). Inicialmente, pesou-se 5 gramas de óleo de soja (fornecido pela Empresa Cargill Agrícola S/A) isento antioxidantes, sendo misturados com os extratos etanólico dos resíduos vegetais, na concentração de 100 ppm, calculado com base no teor de compostos fenólicos. Em relação aos extratos aquosos, primeiramente foram liofilizados e ressuspensos

em etanol:água (80:20 v/v). Novas análises do teor de compostos fenólicos totais foram feitas, para se preparar uma concentração de 100 ppm. Em seguida a mistura foi submetida a uma temperatura de 110 ± 1 °C, sob fluxo de ar seco constante a taxa de 9 L/h, conforme o método cd 12b-92 (AOCS, 2003) em equipamento Rancimat 743 (Metrohm AG, CH-9100 Herisau Switzerland).

A determinação do período de indução (PI) ou índice de estabilidade oxidativa foi baseada nas leituras de condutividade crescente em função da detecção do acúmulo de compostos de oxidação, que permitiram a formação de uma curva em função do tempo de reação. O controle foi preparado com óleo de soja sem antioxidante, e amostras contendo antioxidante sintético BHT na concentração de 100 ppm foram submetidas a essa análise, para efeitos de comparação com os extratos dos resíduos vegetais analisados.

A atividade antioxidante foi expressa pelo Fator de Proteção (PF), usando a Equação 3:

$$PF(\%) = \frac{PIa}{PIc} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

PIa = Período de indução do óleo com os extratos ou padrões

PIc = Período de indução do controle (óleo sem os extratos ou padrões)

2.2.5.5 Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)

Para a determinação da atividade antioxidante foi utilizada a metodologia do FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) – Poder Antioxidante de Redução do Ferro. Este método foi uma alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros, podendo ser aplicado para estudos da atividade antioxidante em extratos de alimentos, bebidas e para o estudo da eficiência antioxidante de substâncias puras, com resultados comparáveis àqueles obtidos com outras metodologias mais complexas (PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000).

Os antioxidantes presentes no extrato vegetal são avaliados como redutores do Fe^{+3} a Fe^{+2} , sendo quelados por 2,4,6-Tri(2-Piridil)-s-Triazina (TPTZ), para formar o complexo Fe^{+2} -TPTZ (cor azul) com absorção máxima em $\lambda=593$ nm (BENZIE; STRAIN, 1996). O poder antioxidante de redução do ferro é uma alternativa para a determinação da redução do ferro. O reagente de

FRAP foi preparado misturando-se **(a)** tampão acetato de sódio 300 mM a pH 3,6; **(b)** solução de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10mM em HCl 40 mM; **(c)** solução de cloreto férrico 20mM. Para obter o reativo FRAP os reativos **a**, **b** e **c** foram misturados na proporção de 10:1:1 no momento da análise. Como padrão foi utilizado o sulfato ferroso heptahidratado. Em um tubo de ensaio foram adicionados 3 mL do reagente FRAP, 100 µL do padrão ou do extrato do resíduo vegetal dos melhores solventes e incubados durante 30 minutos a 37 °C. A leitura da absorbância foi feita a 593 nm, o reagente do FRAP foi utilizado como branco. O padrão de sulfato ferroso heptahidratado foi utilizado para a construção de uma curva com diferentes concentrações que variaram de 100 a 2000 µM (Apêndice 3). Os resultados da atividade antioxidante serão expressos em µM sulfato ferroso/g de resíduo vegetal (atividade antioxidante equivalente ao sulfato ferroso heptahidratado). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.2.6 Identificação química dos extratos dos resíduos vegetais

2.2.6.1 Purificação em SPE (*Solid Phase Extraction*)

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica empregada para purificação de amostras complexas, principalmente quando se deseja eliminar interferentes em análises. Dentro de uma sequência analítica, o tratamento da amostra constitui uma etapa importante na qual os analitos são levados a uma forma passível de quantificação de acordo com o método analítico escolhido. O cartucho de SPE, além de extrair, concentrar e pré-purificar os analitos, também utiliza pequenos volumes de solventes e pouca manipulação da amostra, o que corrobora para a redução no tempo da análise (AQUINO NETO; NUNES, 2003).

Os cartuchos de SPE DSC-18 SPE Discovery ® (Supelco, 2 gramas) passaram por um processo de condicionamento realizado antes da passagem da amostra, utilizou-se 8 mL de metanol e, em seguida, 8 mL de água ácida (pH 2). Os extratos etanólicos dos resíduos vegetais foram rotaevaporados a uma temperatura média 45 °C para eliminação do solvente, em seguida, foram rediluídos em água até o volume original e acidificados até o pH 2. Os extratos aquosos foram apenas acidificados até o pH 2. Uma alíquota de 7 mL dos extratos foram aplicados aos cartuchos, em seguida, lavados com 15 mL de água ácida e finalmente com metanol 100% para eluição da fração de interesse que foi coletada, evaporada com gás nitrogênio em *vial* silanizado e derivatizado.

2.2.6.2 Derivatização – formação de derivados do trimetilsilil (TMS)

Inicialmente para a realização da derivatização das amostras toda a vidraria envolvida no processo passou pelo processo de silanização, onde o reagente silanizante reage quimicamente com os grupos polares da vidraria. O reagente de silanização utilizado foi (DMS-dimetil dicloro silano) diluído em tolueno obtendo-se uma solução de 10%. Após dez minutos o excesso de reagente foi eliminado, a vidraria lavada duas vezes com 1 mL de metanol e 1 mL de tolueno, sendo na sequência seca naturalmente.

Após a purificação das amostras, adicionou-se 100 µL do reagente derivatizante N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) na massa das frações recuperadas do cartucho SPE. A mistura foi homogeneizada e levada em estufa à 60 °C durante 10 minutos, período em que ocorreu a derivatização da amostra. Após esse tempo, o reagente derivatizante foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e o produto da derivatização (derivados do trimetilsilil – TMS) foram rediluídos em hexano (600 a 800 µL). A amostra silanizada foi homogeneizada e utilizada para a injeção em um cromatógrafo gasoso com espectrometria de massas (CG-EM). O mesmo procedimento foi realizado para padrões autênticos, entretanto utilizando a quantidade de 1,0 mg. Os padrões utilizados foram: os ácidos ferúlico, caféico, vanílico, sinápico, *o*-cumárico, *p*-cumárico, *m*-cumárico, (-)-epicatequina, quercetina e resveratrol. O processo de derivatização foi realizado sob condições anidras devido à alta sensibilidade dos derivados TMS quando em contato com a umidade (ZUO; WANG; ZHAN, 2002).

2.2.6.3 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

As análises por CG-EM foram conduzidas em cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo GC 2010 acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu, modelo QP 2010 Plus. As amostras foram separadas em coluna capilar (RTX5MS 30m x 0,25mm x 0,25 µm). A programação de temperatura iniciou em 80 °C (1 minuto), a taxa de aquecimento de 20 °C/minuto alcançou 250 °C (1 minuto) passou a 300 °C (5 minutos) a taxa de 6 °C/minuto, a 310 °C (5 minutos) a taxa de 15 °C/minuto, a 320 °C (10 minutos) a taxa de 20 °C/minuto, totalizando 40 minutos de análise. Hélio foi utilizado como gás de arraste. A temperatura do injetor foi de 280 °C e o volume de injeção foram de 0,5 µL no modo *splitless*. A interface foi mantida a 280 °C e o detector operou em modo *scanning* (*m/z* 40-800). A integração foi feita por meio do *software* LabSolutions-GCMS. Os flavonóides, ácidos fenólicos e derivados foram identificados por comparação com os

dados obtidos do CG-EM (tempo de retenção e fragmentação iônica) de padrões autênticos silanizados e eluídos nas mesmas condições e com a biblioteca *Wiley* 8.

2.2.7 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, no esquema fatorial 10x2 sendo dez resíduos vegetais e dois solventes, com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com o auxílio do pacote estatístico SAS 9.0 (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 2003) e quando significativos os efeitos, foram analisados pelo teste de *Tukey*, em nível significância de 5%. Na seleção dos solventes para as análises seguintes utilizou-se a estatística descritiva.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Processo de liofilização

Os resíduos vegetais foram liofilizados, homogeneizados, pesados e armazenados à -18 °C. A película de amendoim não necessitou do processo de liofilização, por ter sido fornecida já seca pela agroindústria.

Após o processo de liofilização calculou-se o rendimento de cada resíduo vegetal, onde a maioria apresentou baixo rendimento conforme demonstrado na Tabela 2. O resíduo de alcachofra (19,15%) foi o que apresentou o melhor rendimento. O talo de couve e o talo de brócolis foram os que apresentaram rendimentos menores em comparação com os demais (6,0 e 7,24%, respectivamente). No caso dos vegetais, o baixo rendimento pode ser devido ao fato de que o teor de água em sua composição normalmente varia de 80 a 90% de água. A película de amendoim, por ter sido fornecida seca pela agroindústria, foi realizada a análise do teor matéria seca do material, a qual apresentou um rendimento de 94,46% (peso seco).

Tabela 2 - Rendimento dos resíduos vegetais após o processo de liofilização

Resíduos vegetais	Matéria fresca	Liofilizado	Rendimento (%)
	Peso (g)		
Talo de Couve	589,76	35,61	6,03
Talo de Brócolis	682,96	49,48	7,24
Talo de Beterraba	434,97	38,68	8,89
Folha/talo de Rabanete	139,22	12,18	8,74
Folha/talo de Cenoura	558,37	70,80	12,67
Casca de Abóbora	816,78	95,55	11,69
Resíduo de Alcachofra	411,67	78,87	19,15
Folha/talo de Nabo	624,99	50,25	8,04
Casca de Maracujá	573,50	74,43	12,97

A determinação de umidade é uma das medidas mais importantes e utilizadas na análise de alimentos. A umidade de um alimento está relacionada com sua estabilidade, qualidade e composição. O processo de liofilização oferece um efeito semelhante ao processo de calor, atuam na redução da atividade de água, com a diferença de não aquecer o alimento resultando em uma maior retenção da qualidade nutricional e manutenção das características sensoriais (FELLOWS, 2006). O processo consiste em um congelamento rápido e a sublimação da água presente no congelado a vácuo. A sublimação da água é o processo de passagem da mesma do estado sólido (gelo) para o gasoso, sem passar pelo estado líquido. Isso é feito devido à combinação de pressão e temperatura adequadas (AZEREDO, 2004).

2.3.2 Seleção dos solventes com maior poder de extração de compostos antioxidantes

Os extratos dos resíduos vegetais foram obtidos de acordo com o item 2.2.2, onde foram extraídos e diluídos em seus respectivos solventes de extração.

A atividade antioxidante pelo método do radical livre DPPH, foi utilizado como o parâmetro na seleção dos melhores solventes dentre o etanol:água (80:20 v/v), água destilada, acetato de etila (99%), clorofórmio (99%) e hexano (99%). De acordo com os resultados da

atividade antioxidante, os melhores resultados foram encontrados para os solventes etanol:água (80:20 v/v) e água destilada, demonstrando que esses solventes foram mais efetivos no processo de extração de compostos bioativos presentes nos resíduos vegetais (Figura 11). Sendo assim, esses dois solventes prosseguiram nas análises seguintes.

Segundo Gómez-Plaza, Miñano e López-Roca (2006), água e solventes hidroalcoólicos são preferidos quando o objetivo é obter corantes ou produtos antioxidantes para a indústria de alimentos, devido à baixa toxicidade e abundância (ANDREO; JORGE, 2006). A determinação da atividade antioxidante dos extratos depende do tipo de solvente utilizado na extração, pois existem diferenças de polaridade entre os compostos fenólicos em função do agente extrator (MARINOVA; YANISHLIEVA, 1997).

Figura 11 - Capacidade de sequestrar o radical DPPH dos resíduos vegetais utilizando-se cinco solventes. Análise estatística descrita.

2.3.3 Teor de compostos fenólicos totais

Os conteúdos de compostos fenólicos totais extraídos com os solventes etanol:água (80:20 v/v) e água estão demonstrados na Tabela 3, sendo os valores expressos em mg AG/mL (equivalentes em ácido gálico, AG) dos resíduos vegetais.

Tabela 3 - Teor de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico nos extratos dos resíduos vegetais (mg AG/mL)

Resíduos vegetais	Fenólicos Totais (mg AG/mL extrato)	
	Etanol 80%	Água
Talo de Couve	6,95 ^{fe}	7,28 ^e
Talo de Brócolis	6,02 ^{efg}	6,65 ^{fe}
Talo de Beterraba	56,92 ^a	12,50 ^d
Folha/talo de Rabanete	8,68 ^e	17,75 ^c
Folha/talo de Cenoura	5,80 ^{efg}	5,82 ^{efg}
Casca de Abóbora	3,00 ^{gh}	4,08 ^{fgh}
Resíduo de Alcachofra	1,03 ^h	1,88 ^h
Folha/talo de Nabo	5,89 ^{efg}	13,00 ^d
Casca de Maracujá	3,80 ^{fgh}	8,69 ^e
Película de Amendoim	54,41 ^a	33,86 ^b

Letras diferentes diferem entre si pelo teste *Tukey* ($p < 0,05$). Interação significativa ($p < 0,0001$)

Os resultados demonstram que o extrato etanólico dos resíduos vegetais talo de beterraba e película de amendoim apresentaram os melhores resultados (56,92 e 54,41 mg AG/mL, respectivamente), sendo então o solvente hidroalcoólico mais eficaz na extração de compostos fenólicos do que a água ($p < 0,05$).

Yu, Ahmedna e Goktepe (2005) também encontraram resultados superiores para a película de amendoim no extrato etanólico em relação ao aquoso (89,9 e 56,7 mg AG/g, respectivamente), resultados esses superiores ao encontrado neste estudo. Esse fato pode ser

explicado devido as diferenças entre espécies, regiões de produção, época do ano e dentre outros fatores (HA; POKORNY; SAKURAI, 2007).

Kujala et al. (2000) encontraram resultados de 15,5 mg AG/g para a raiz de beterraba no extrato etanólico, sendo inferior quando comparado aos obtidos para o talo de beterraba (56,92 mg AG/g). A distribuição dos compostos fenólicos na raiz da beterraba indica ser semelhante ao da batata, onde os compostos fenólicos estão distribuídos principalmente entre o córtex e a casca e o restante é encontrando na parte mais interior do tubérculo (FRIEDMAN, 1997). O resultado superior encontrado no talo da beterraba pode ser explicado ao fato de que as folhas e talos estarem mais expostos do que o tubérculo, necessitando assim de uma maior proteção contra os patógenos.

O resíduo de alcachofra e a casca de abóbora apresentaram os menores teores de compostos fenólicos entre os resíduos vegetais, tanto no extrato etanólico quanto no aquoso (1,03 e 1,88, 3,00 e 4,08 mg AG/mL, respectivamente) ($p < 0,05$).

Entre os resíduos vegetais, os solventes etanol:água (80:20 v/v) e água demonstraram diferentes taxas de extração de compostos fenólicos. Este resultado é confirmado pela interação significativa encontrada entre os teores de compostos fenólicos totais dos resíduos vegetais e os solventes testados ($p < 0,05$ ou $p < 0,0001$). De certa forma, esse fato pode ser explicado pela solubilidade dos compostos fenólicos, a qual é influenciada pela polaridade dos solventes utilizados, pelo seu grau de polimerização, por sua interação com outros constituintes do vegetal e a pela formação de complexos insolúveis. Sendo assim, fatores como a composição do solvente, tempo e temperatura de extração, razão solvente:amostra e tratamento da amostra, possuem influência significativa na eficácia de extração, refletindo na maior ou menor recuperação dos compostos fenólicos (LIYANA-PATHIRANA; SHAHIDI; ALASALVAR, 2005; SU et al., 2007). Neste sentido, considerando que nos vegetais há polifenóis com polaridades distintas, não se recomenda o uso de solventes altamente polares ou apolares, de modo a possibilitar uma extração eficiente destes constituintes. Soluções aquosas de etanol, metanol e acetona são citados na literatura como eficientes para a extração de compostos fenólicos (NACZK; SHAHIDI, 2006).

Entretanto, Pérez-Jiménez e Saura-Calixto (2006) ressaltam que para a eficiência do processo de extração deve combinar pelo menos dois ciclos de extração, utilizando-se soluções de solventes orgânicos aquosos, com diferentes polaridades, de modo a extrair compostos com diferentes estruturas químicas. Em resíduos agroindustriais de alcachofra, tomate e brócolis a

maior extração de fenólicos foi obtida com acetona a 80%, porém o metanol a 50% e o etanol a 50% foram mais eficazes na extração de fenólicos de resíduos agroindustriais de maçã, morango, pepino e chicória (PESCHEL et al., 2006).

Existem outros fatores na célula que podem influenciar os resultados finais, como o fato de que os compostos fenólicos solúveis estão localizados em compartimentos dentro dos vacúolos celulares, na forma livre ou conjugada, enquanto que os fenólicos insolúveis encontram-se ligados a estruturas da parede celular, esterificados com uma aldopentose ou resíduos de galactose dos componentes pécnicos ou hemicelulósicos (FAULDS; WILLIAMSON, 1999).

Embora este método seja o mais utilizado para quantificação de compostos fenólicos em alimentos, o reagente Folin-Ciocalteu é capaz de interagir com outros compostos não fenólicos, o que pode resultar em valores superestimados de fenólicos totais (VINSON et al., 2001).

2.3.4 Determinações da atividade antioxidante

2.3.4.1 Atividade sequestrante do radical livre (DPPH)

A capacidade de sequestrar o radical DPPH pelos extratos etanólico e aquoso dos resíduos vegetais em estudo, expresso porcentagem, encontra-se na Tabela 4. A redução do radical DPPH foi medida por meio do monitoramento do declínio da absorbância a 517 nm, com mudança de coloração passando do violeta para o amarelo, caracterizando a redução do radical. Contudo, este método pode ser influenciado pelo solvente e pH das reações, fatores que podem sub ou superestimar o resultado final.

Os melhores resultados foram encontrados para os extratos etanólicos da película de amendoim, talo de brócolis, folha/talo de cenoura (96,55, 95,82 e 92,53%, respectivamente), ($p < 0,05$) e aquoso da película de amendoim (96,79%), ($p < 0,05$). Pela avaliação da atividade antioxidante, pode-se verificar que dentre os solventes testados o extrato etanólico teve um melhor resultado quando comparado ao extrato aquoso (Tabela 4).

Tabela 4 - Porcentagem de atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre (DPPH)

Resíduos vegetais	Solventes	
	Etanol 80% (%)	Água (%)
Talo de Couve	91,58 ^d	23,85 ^{ij}
Talo de Brócolis	95,82 ^{abc}	42,41 ^g
Talo de Beterraba	89,20 ^{de}	67,21 ^f
Folha/talo de Rabanete	92,17 ^{cd}	89,25 ^{de}
Folha/talo de Cenoura	92,53 ^{bcd}	26,39 ⁱ
Casca de Abóbora	19,49 ^j	7,34 ^k
Resíduo de Alcachofra	42,64 ^g	32,77 ^h
Folha/talo de Nabo	92,37 ^{cd}	88,44 ^{de}
Casca de Maracujá	89,67 ^{de}	86,04 ^e
Película de Amendoim	96,55 ^{ab}	96,79 ^a

Letras diferentes diferem entre si pelo teste *Tukey* ($p < 0,05$). Interação significativa ($p < 0,0001$)

Kaur e Kapoor (2002) avaliando a capacidade antioxidante por meio do método do DPPH de vegetais como brócolis, couve e raiz de beterraba encontraram para extratos etanólicos 78,4, 73,8 e 73,3%, respectivamente, e, para extrato aquoso 72,5, 68,5 e 55,00%, respectivamente. Esses valores representam a parte mais consumida dos vegetais, e, da mesma forma que os resultados encontrados neste trabalho para os respectivos resíduos, o solvente hidroalcoólico apresentou-se como melhor solvente extrator. Dentre os resíduos vegetais com menor ação antioxidante destacaram-se o resíduo de alcachofra e a casca de abóbora, que apresentaram atividade inferior a 50%, tanto para o extrato etanólico quanto para o aquoso (Tabela 4).

Com base nestes resultados, pode-se verificar a existência de compostos que atuam como doadores de hidrogênio ao radical DPPH, entretanto esta ação foi diferenciada para os resíduos vegetais e os solventes extratores. A atividade antioxidante pode ser influenciada por alguns fatores, incluindo as propriedades coloidais dos substratos, as condições e etapas de oxidação, a formação e estabilidade dos radicais, assim como a possível localização dos antioxidantes nos vegetais (ROCKENBACH et al., 2008). Alguns autores têm demonstrado de forma conclusiva

que existe uma forte relação positiva entre o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante de frutas e hortaliças (VELIOGLU et al., 1998; KAUR; KAPOOR, 2002; ABIDILLE et al., 2005), enquanto que outros autores não têm evidenciado esta correlação (KAHKONEN et al., 1999; ISMAIL; MARJAN; FOONG, 2004). A composição e a estrutura química do componente ativo do extrato são fatores importantes que influenciam a 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 (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992).

Desta forma, diversos métodos e diferentes tipos de solventes têm sido utilizados para a extração de polifenóis vegetais, visando determinar a capacidade antioxidante (GOLI; BARZEGA; SAHARI, 2005; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). O tipo de solvente e a polaridade podem afetar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio, que é aspecto-chave na medida da capacidade antioxidante. A presença de compostos não antioxidantes nas soluções testadas também pode afetar os resultados (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006).

A interpretação dos resultados do método DPPH é freqüentemente expresso em EC_{50} (concentração eficiente) na qual é definido como a concentração de substrato que promove a perda de 50% da atividade DPPH (cor) no período de tempo especificado. Esse parâmetro foi aparentemente introduzido por Brand-Williams e colaboradores (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; BONDET; BRAND-WILLIAMS; BERSET, 1997) e indica que quanto maior a atividade antioxidante, mais baixo é o valor de EC_{50} .

Na Tabela 5 encontram-se os valores das concentrações dos extratos necessárias para reduzir em 50% o radical DPPH dos extratos etanólico e aquoso dos resíduos vegetais. Os melhores resultados foram observados tanto no extrato etanólico quanto no extrato aquoso para a película de amendoim (0,12 e 0,41 g/L, respectivamente) e talo de beterraba (0,26 e 0,64 g/L, respectivamente). Os demais resíduos vegetais demonstraram valores superiores a 1,17 g/L. Este fato demonstra que a interpretação dos resultados de atividade antioxidante com base apenas na análise de DPPH pode resultar em valores subestimados ou superestimados, pois os compostos dos extratos vegetais podem interagir com o radical DPPH em uma reação mais lenta devido a baixa interação com o radical livre DPPH ou pelo baixo teor de compostos fenólicos presentes no extrato. Os valores do EC_{50} demonstram resultados mais próximos da capacidade antioxidante real de um extrato.

Tabela 5 - Valor de EC₅₀ (g/L) dos extratos dos resíduos vegetais

Resíduos vegetais	EC ₅₀ (g/L)	
	Etanol 80%	Água
Talo de Couve	2,76	1,30
Talo de Brócolis	2,86	1,24
Talo de Beterraba	0,26	0,64
Folha/talo de Rabanete	2,71	1,17
Folha/talo de Cenoura	2,53	1,31
Casca de Abóbora	*	*
Resíduo de Alcachofra	*	*
Folha/talo de Nabo	3,12	1,19
Casca de Maracujá	*	*
Película de Amendoim	0,12	0,41

*Extratos com baixa atividade antioxidantes.

Utilizando a análise de EC₂₅ na avaliação da capacidade antioxidante de extratos aquosos de raiz e folha/talo de nabo, Fernandes et al. (2007) encontraram resultados significativos para a folha/talo (0,56 mg/mL), entretanto para raiz (1,44 mg/mL) o valor encontrado de atividade antioxidante foi superior quando comparado a folha/talo. O EC₅₀ e os valores encontrados no ensaio do DPPH são influenciados principalmente pelo teor de compostos fenólicos, os quais representam a principal contribuição quanto a capacidade de sequestrar radicais livres.

2.3.4.2 Atividade antioxidante pelo método de redução do radical (ABTS)

O método de determinação da atividade antioxidante por meio do princípio da reação da descoloração do radical (ABTS), em função de sua redução por um antioxidante, depende principalmente da concentração e poder da substância antioxidante e tempo de reação.

Os resultados da capacidade antioxidante estão mostrados na Tabela 6, a qual apresenta os valores de atividade antioxidante em equivalentes ao Trolox, para os extratos etanólico e aquoso dos resíduos vegetais. Dentre os resíduos vegetais de maior atividade está o extrato etanólico da

película de amendoim (990,79 μM Trolox/g resíduo) ($p < 0,05$). Apesar de possuir atividade inferior ao extrato etanólico, o extrato aquoso da película de amendoim apresentou valor superior quando comparado aos demais resíduos vegetais (262,12 μM Trolox/g resíduo) ($p < 0,05$).

Os extratos etanólico do talo de beterraba e folha/talo de rabanete apresentaram atividade antioxidante correspondente a 121,48 e 113,58 μM Trolox/g resíduo, respectivamente, mostrando um potencial de utilização como agentes antioxidantes. O resíduo de alcachofra foi o que apresentou a menor atividade antioxidante entre os resíduos, com valores semelhantes para o extrato etanólico e aquoso 3,40 e 3,19 μM Trolox/g resíduo, respectivamente não foi verificado diferença de atividade ($p > 0,05$). Estes resultados se correlacionam com o teor de compostos fenólicos totais, cujo resultado obtido para alcachofra foi o menor teor observado dentre o grupo de resíduos estudados (Tabela 3).

Tabela 6 - Atividade antioxidante equivalente ao trolox pelo método ABTS

Resíduos vegetais	Atividade antioxidante (μM Trolox/g resíduo)	
	Etanol 80% ¹	Água ¹
Talo de Couve	23,25 ^f	7,11 ^j
Talo de Brócolis	14,61 ^h	15,01 ^h
Talo de Beterraba	121,48 ^c	79,67 ^d
Folha/talo de Rabanete	113,58 ^c	35,70 ^e
Folha/talo de Cenoura	9,89 ⁱ	11,27 ⁱ
Casca de Abóbora	14,42 ^h	23,78 ^f
Resíduo de Alcachofra	3,40 ^k	3,19 ^k
Folha/talo de Nabo	19,32 ^g	14,60 ^h
Casca de Maracujá	23,21 ^f	21,49 ^{fg}
Película de Amendoim	990,79 ^a	262,12 ^b

Letras diferentes diferem entre si pelo teste *Tukey* ($p < 0,05$). Interação significativa ($p < 0,0001$)

¹Equivalentes em μM Trolox/g resíduo vegetal

Em estudos de vegetais usualmente consumidos pela população, Zitnanová et al. (2006) encontraram valores superiores na capacidade de sequestrar o radical (ABTS), na ordem, beterraba, seguida da cebola, brócolis, alho-porró, repolho (12,5; 8,9; 3,4; 6,1 e 4,0 μMol

Trolox/g, respectivamente) e a menor capacidade foi detectada na cenoura e couve folha (2,1 e 1,9, respectivamente). Pellegrini et al. (2003) analisando alguns vegetais encontrou valores para alcachofra, beterraba, brócolis, cenoura, abóbora e rabanete na ordem de 1,55; 5,21; 3,04; 0,44; 0,43 e 2,22 $\mu\text{Mol Trolox/g}$, respectivamente). Quando comparado aos resíduos do presente estudo, estes resultados foram inferiores.

Vários são os estudos onde se verificou a relação entre conteúdo de fenólicos e a atividade antioxidante, como o de Velioglu et al. (1998) que encontraram uma forte correlação em frutas, legumes e produtos de grãos. Sun et al. (2002) e Chinnici et al. (2004) também encontraram uma correlação positiva entre a atividade antioxidante e o índice de polifenóis totais. Em relação à película de amendoim, os resultados mostraram uma correlação positiva entre o conteúdo de polifenóis totais e a atividade antioxidante pelo método ABTS, sugerindo que o alto potencial antioxidante para os extratos de película de amendoim estão correlacionados com os valores elevados de compostos fenólicos totais.

2.3.4.3 Autoxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoléico

A ação antioxidante dos extratos etanólico e aquoso dos resíduos vegetais avaliada pelo sistema modelo beta-caroteno/ácido linoléico variaram de 2,25 a 70,83%, como mostrado na Tabela 7. Este método avalia o poder de inibição que um antioxidante exerce sobre os radicais formados durante a peroxidação do ácido linoléico. A atividade antioxidante por este método é muito útil especialmente na investigação de antioxidantes lipofílicos (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Tabela 7 - Porcentagem de atividade antioxidante pelo método de autooxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoléico

Resíduos vegetais	Atividade Antioxidante	
	Etanol 80%	Água
Talo de Couve	4,21 ^{fg}	3,32 ^{fgh}
Talo de Brócolis	40,63 ^b	70,83 ^a
Talo de Beterraba	40,63 ^b	68,12 ^a
Folha/talo de Rabanete	38,31 ^b	15,79 ^d
Folha/talo de Cenoura	2,39 ^{gh}	65,55 ^a
Casca de Abóbora	2,25 ^h	4,51 ^f
Resíduo de Alcachofra	22,15 ^c	26,49 ^c
Folha/talo de Nabo	16,49 ^d	14,94 ^d
Casca de Maracujá	5,28 ^f	13,53 ^d
Película de Amendoim	40,48 ^b	25,47 ^c

Letras diferentes diferem entre si pelo teste *Tukey* ($p < 0,05$). Interação significativa ($p < 0,0001$)
 Valor de referência do BHT foi de 92,88%

Os resultados obtidos nos diferentes resíduos estudados mostraram que em ambos os extratos ocorreu uma variação na porcentagem do descoloramento do beta-caroteno, com interação significativa ($p < 0,0001$). Em função da porcentagem de inibição apresentada, o extrato aquoso do talo de brócolis, talo de beterraba e folha/talo de cenoura foram os resíduos vegetais de maior ação antioxidante (70,83, 68,12 e 65,55%, respectivamente) ($p < 0,05$). O padrão utilizado como referência foi o BHT, o qual apresentou a atividade antioxidante de 92,88%, sendo superior aos extratos testados.

No grupo com moderada ação antioxidante, estão os resíduos vegetais do extrato etanólico do talo de brócolis, talo de beterraba, folha/talo de rabanete e película de amendoim que apresentaram 40,63, 40,63, 38,31 e 40,48%, respectivamente ($p < 0,05$). As menores atividades foram observadas para os extratos etanólicos e aquosos de talo de couve (4,21 e 3,32 %) e casca de abóbora (2,25 e 4,51%) ($p < 0,05$).

Ao se comparar os resultados desta metodologia com os da avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical livre DPPH, pode-se observar que os extratos dos resíduos vegetais se comportaram de formas distintas. A provável explicação para esta diferença pode ser devido às particularidades que este método apresenta, ou seja, o meio reacional é composto por uma emulsão que apresenta simultaneamente, regiões polares e apolares.

Segundo Porter (1993) os antioxidantes solúveis em água tendem a ser mais ativos do que antioxidantes solúveis em lipídeos quando testados em óleo puro. Ao contrário, antioxidantes solúveis em lipídeos tendem a apresentar uma maior proteção para uma emulsão óleo em água do que os antioxidantes solúveis em água. Este fenômeno pode ser chamado de “paradoxo polar”, sendo baseado na suposição de que o início da oxidação de lipídeos está localizado na interface do sistema, ou seja, a oxidação do óleo puro ocorre na interface ar/óleo, onde os antioxidantes hidrofílicos estão concentrados, enquanto a oxidação de emulsões está localizada na interface água/óleo onde os antioxidantes lipofílicos encontram-se (HUANG, 1996).

Em sistemas lipofílicos as taxas de reações de sequestro podem ser influenciadas pelo coeficiente de partição dos compostos fenólicos entre as fases aquosas e lipídicas, e dessa forma, reduzir a reação dos fenólicos polares com o radical não polar $\text{LOO}^\cdot$ (RICE-EVANS; NICHOLAS; PAGANGA, 1996).

Nas figuras 12 e 13 estão mostradas as cinéticas de inibição da oxidação pelos extratos etanólico e aquoso dos resíduos vegetais.

Figura 12 – Redução da porcentagem da absorbância inicial da emulsão beta-caroteno/ácido linolêico adicionada dos extratos etanólicos dos resíduos vegetais e padrão durante 120 minutos

Figura 13 - Redução da porcentagem da absorbância inicial da emulsão beta-caroteno/ácido linolêico adicionada dos extratos aquosos dos resíduos vegetais e padrão durante 120 minutos

Segundo KOLEVA et al. (2002) a oxidação lipídica é um complexo processo em cadeia, no qual estão envolvidos vários tipos de radicais livres de diferentes reatividades, e, a ação antioxidante de um composto bioativo depende do substrato lipídico, da sua solubilidade e do seu mecanismo de ação. Assim, em ensaios que contém lipídios como substrato oxidável, a exemplo da oxidação acoplada beta-caroteno/ácido linoléico, o papel protetor do antioxidante depende de sua solubilidade que determina sua distribuição na fase do sistema, incluindo localização e orientação.

A complexa composição dos extratos dos resíduos vegetais pode provocar interações sinérgicas ou antagônicas entre os compostos presentes, podendo, também, afetar sua partição nas fases do meio e, conseqüentemente, sua ação antioxidante. O exato mecanismo do antioxidante no sistema beta-caroteno/ácido linoléico é difícil de ser explicado, especialmente ao se testar a ação de matrizes complexas, como é o caso de extratos de resíduos vegetais.

2.3.4.4 Inibição da oxidação lipídica - método Rancimat

A inibição da oxidação lipídica utilizando o aparelho Rancimat® requer um equipamento simples, podendo ser utilizado como um método para se determinar a atividade antioxidante através de diversos substratos como a gordura vegetal hidrogenada e os óleos comestíveis. O lipídio é exposto a uma corrente de oxigênio, a uma temperatura de 100 °C, e o progresso das curvas de oxidação podem ser determinados por meio do índice de peróxido. Estas curvas compreendem uma fase de indução e uma de oxidação, durante a qual ocorre uma grande elevação no índice de peróxido e a detecção de produtos voláteis. A adição de um antioxidante resulta na inibição da oxidação (ANTOLOVICH et al., 2002).

O período necessário para ocorrência da taxa máxima da oxidação do óleo de soja, sem a adição de fontes oxidantes, foi de 6,95 horas (controle). Contudo, o tempo necessário para o período de indução da oxidação do óleo foi maior quando os extratos etanólico, aquoso e o aditivo (BHT) de alguns resíduos vegetais foram adicionados. O período de indução dos extratos etanólico e aquoso dos resíduos vegetais estão ilustrados na Tabela 8.

Tabela 8 – Período de indução dos extratos etanólico e aquoso dos resíduos vegetais analisados no aparelho Rancimat

Resíduos vegetais*	Período de Indução*	
	(horas)	
	Etanol 80%	Água
Talo de Couve	6,10±0,15	5,39±0,33
Talo de Brócolis	6,69±0,32	5,78±0,19
Talo de Beterraba	6,83±0,12	6,59±0,08
Folha/talo de Rabanete	7,06±0,07	1,68±0,25
Folha/talo de Cenoura	2,21±0,61	**
Casca de Abóbora	1,62±0,10	**
Resíduo de Alcachofra	**	6,42±0,03
Folha/talo de Nabo	1,32±0,15	5,69±0,24
Casca de Maracujá	6,53±0,12	1,21±0,04
Película de Amendoim	6,80±0,09	5,73±0,03
Controle	6,95±0,04	6,98±0,05
BHT	7,58±0,08	7,56±0,07

*Óleo de soja adicionado do BHT e extratos dos resíduos vegetais, na concentração 100 ppm, exceto o controle, livre de antioxidantes

**Valor a ser utilizado do extrato acima do limite

O valor do índice de atividade antioxidante dos extratos dos resíduos vegetais está ilustrado na (Figura 14). Os valores encontrados foram significativos, valores acima de 1,00, tanto para o extrato aquoso (talo de beterraba, resíduo de alcachofra e película de amendoim) (1,12, 1,09 e 1,02) quanto para o etanólico (película de amendoim e folha/talo de rabanete) (1,09 e 1,05) ($p < 0,05$). A atividade antioxidante do extrato aquosos da película de amendoim também foi relativamente alta quando testada em batata chips (REHMAN, 2003), onde esse resultado foi quase equivalente a atividade de antioxidantes sintéticos.

Figura 14 - Índice de atividade antioxidante obtido a partir da análise de estabilidade oxidativa (Rancimat) do óleo de soja refinado sem antioxidante adicionado aos extratos dos resíduos vegetais e do BHT, na concentração 100 ppm, exceto o controle, livre de antioxidantes, utilizando solvente etanol:água (80:20 v/v) e água. Letras diferentes indicadas nas colunas diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de *Tukey* (coeficiente de variação de 3,5%).

O mecanismo de ação dos antioxidantes presentes em extratos de plantas possui um papel importante na redução da oxidação lipídica não somente na conservação de alimentos, mas também em tecidos, pois quando incorporado na alimentação humana também reduz o risco de desenvolvimento de patologias, como arteriosclerose e câncer (CHU et al., 2002).

Estes resultados demonstram que extrato aquoso e etanólico dos resíduos vegetais que apresentaram bons resultados, retardaram o início da fase de propagação e, conseqüentemente, a fase de terminação da oxidação. Os óleos vegetais diferem no grau de insaturação e composição de ácidos graxos, assim como, na quantidade e qualidade de compostos presentes em sua matéria insaponificável. Estas diferenças influenciam a estabilidade oxidativa e as características sensoriais e tecnológicas de cada tipo de óleo (KAMAL-ELDIN, 2006).

Os valores de índice de atividade antioxidante dos extratos dos resíduos vegetais tanto etanólico quanto aquoso que apresentaram valores abaixo de 1,00 indicam que provavelmente os

compostos antioxidantes não foram extraídos pelos solventes ou, ainda, estes compostos não agiram de forma eficiente a ponto de evitar a oxidação dos lipídios do substrato (óleo de soja).

2.3.4.5 Capacidade antioxidante total do plasma (FRAP)

O método de capacidade antioxidante FRAP é baseado na capacidade de redução do ferro, em meio ácido, especificamente o complexo férrico/tripiridiltriazina (TPTZ) para o estado ferroso, mudando assim a coloração para azul na presença de um antioxidante. É, um método rápido e simples de se executar, reação reprodutível e linearmente correlacionada com a concentração molar do antioxidante presente (BENZIE; WAI; STRAIN, 1999). Este método foi inicialmente desenvolvido para a análise da capacidade antioxidante do plasma, mas pode ser também utilizado em uma grande variedade de amostras biológicas e compostos puros de frutas, vegetais, animais e tecidos (GHISELLI et al., 1998; TSAI et al., 2002; MODUN et al., 2003; KATALINIC et al., 2004).

Os resultados do poder redutor para os extratos hidroalcoólicos e aquosos estão mostrados na Tabela 9. Os melhores valores foram encontrados no extrato etanólico dos resíduos vegetais película de amendoim e talo de beterraba (1,605 e 0,619 $\mu\text{mol/mg}$, respectivamente) ($p < 0,05$), seguido pelo extrato aquoso dos resíduos película de amendoim, talo de beterraba e folha/talo de rabanete (0,514, 0,398 e 0,333 $\mu\text{mol/mg}$, respectivamente) ($p < 0,05$). Estudos avaliando a atividade antioxidante da película de amendoim mostraram valores variados, sendo estas diferenças relacionadas à espécie, tipo de extração e condições experimentais (HA; POKORNY; SAKURAI, 2007).

Halvorsen et al. (2009) encontraram valores de FRAP para raiz de beterraba, raiz de cenoura, couve, alcachofra, brócolis e rabanete de 1,98; 0,04; 2,65; 2,08; 0,35 e 0,39 $\mu\text{mol/mg}$, respectivamente. A variação observada entre os diferentes resíduos vegetais provavelmente ocorreu pelo mecanismo específico do FRAP na avaliação da atividade antioxidante, uma vez que este método é limitado à medição de compostos que promovam a transferência de elétrons (PRIOR; XIANLI; SCHAICH, 2005). Zitnanová et al. (2006) observaram que o brócolis foi mais efetivo na capacidade de reduzir Fe^{+3} em Fe^{+2} quando comparado com outros vegetais como a beterraba, repolho, cebola e alho-porró.

A estrutura química dos fenóis é formada pelo anel benzênico com grupos hidroxilas associado diretamente à estrutura cíclica. O grande grupo dos fenóis divide-se em flavonóides

(polifenóis) e não-flavonóides (fenóis simples ou ácidos) (JACKSON, 1994). As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre determinado meio. A atividade dos antioxidantes, por sua vez, depende de sua estrutura química, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potencial de quelação de metais) (MAMEDE; PASTORE, 2004).

Estudo realizado por Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000), observaram que a utilização de diferentes solventes influencia o poder redutor da amostra analisada. A eficiência antioxidante determinada pelo método do FRAP depende do potencial redox dos compostos analisados, caracterizado pela complexidade de suas moléculas.

Tabela 9 - Poder redutor ($\mu\text{mol}/\text{mg}$) dos extratos dos resíduos vegetais

Resíduos vegetais	Solventes	
	Etanol 80%	Água
Talo de Couve	0,082 ⁱ	0,102 ^h
Talo de Brócolis	0,105 ^h	0,118 ^g
Talo de Beterraba	0,619 ^b	0,398 ^d
Folha/talo de Rabanete	0,127 ^g	0,333 ^e
Folha/talo de Cenoura	0,101 ^h	0,079 ⁱ
Casca de Abóbora	0,033 ^k	0,026 ^l
Resíduo de Alcachofra	0,024 ^l	0,019 ^m
Folha/talo de Nabo	0,193 ^f	0,197 ^f
Casca de Maracujá	0,074 ^{ij}	0,068 ^j
Película de Amendoim	1,605 ^a	0,514 ^c

Letras diferentes diferem entre si pelo teste *Tukey* ($p < 0,05$). Interação significativa ($p < 0,0001$).

2.3.5 Identificação química dos extratos dos resíduos vegetais por CG-EM

As plantas representam uma extraordinária fonte de novos compostos bioativos. As técnicas analíticas são essenciais para a elucidação da composição química complexada dos produtos de origem vegetal. A espectrometria de massa (EM) constitui uma técnica micro-

analítica utilizada para obtenção de informações sobre o peso molecular e características estruturais da amostra, tornando-se uma das mais importantes ferramentas analíticas na determinação do perfil dos compostos bioativos. A análise por CG-EM têm sido empregada através de diferentes métodos para a caracterização e quantificação de compostos fenólicos em frutas, hortaliças e outros produtos naturais de plantas (HAO; ZHAO; YANG, 2007).

Para a análise química da composição dos extratos etanólicos e aquosos dos resíduos vegetais, foram escolhidos os que apresentaram os melhores resultados nas análises de atividade antioxidante, sendo então, o talo de brócolis, talo de beterraba, folha/talo de rabanete, folha/talo de nabo e a película de amendoim.

A análise de CG-EM possibilitou a identificação de 10 compostos nos extratos: ácido cítrico, ácido benzóico 2,6-dihidroxi, ácido siríngico, ácido-*p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido caféico, ácido ascórbico, ácido sinápico, canferol e epicatequina (Tabelas 10 e 11). Os compostos que se apresentaram com maior abundância no extrato etanólico foram a epicatequina na película de amendoim e o ácido sinápico no talo de brócolis, enquanto que no extrato aquoso foi o ácido cítrico no talo de beterraba e o ácido-*p*-cumárico na película de amendoim.

Os cromatogramas dos extratos dos resíduos vegetais estão apresentados nas Figuras 15 a 19. Os perfis obtidos dos extratos etanólicos e aquosos foram semelhantes. O extrato etanólico nos resíduos de talo de brócolis, talo de beterraba e película de amendoim conseguiu uma maior quantidade de compostos.

Os principais compostos identificados e que se destacaram no extrato etanólico, em porcentagem do total foram para o talo de brócolis o ácido ascórbico (15,32%) e o ácido sinápico (24,56%), folha/talo de nabo o ácido caféico (9,15%) e para a película de amendoim epicatequina (24,27%) e ácido-*p*-cumárico (8,79%). Para o extrato aquoso, o ácido cítrico representou 27,69% no talo de beterraba e o ácido caféico 8,99% na folha/talo de nabo. Quantidades significativas desses ácidos fenólicos, como ácido ferúlico, ácido-*p*-cumárico e ácido caféico, também foram identificados por Matsufugi et al. (2003) em raízes de rabanete, a qual é muito utilizada na alimentação e na indústria de alimentos para a fabricação de corantes alimentares. Os extratos aquosos de folha/talo de nabo foram analisados pela análise de HPLC por Fernandes et al. (2007) onde foi possível a identificação de 14 compostos fenólicos, dentre eles o ácido caféico, ácido ferúlico, ácido sinápico e o ácido ascórbico. Os resultados encontrados na análise por CG-EM no presente estudo demonstrou resultados equivalentes.

Apesar dos resíduos vegetais terem apresentados bons resultados nas análises anteriores de atividade antioxidante, não foi possível a identificação de quantidades significativas de compostos fenólicos na análise de CG-EM. Este fato evidencia a possibilidade de compostos fenólicos estarem unidos a outros grupos e/ou compostos, e, que assim não puderam ser identificados na análise de CG-EM. Além disto, compostos ainda desconhecidos podem também ser os responsáveis pela atividade antioxidante encontrada. Desta forma, estudos mais aprofundados de fracionamento e isolamento bioguiado são necessários para a elucidação estrutural dos verdadeiros compostos bioativos.

A literatura sugere um grande número de métodos analíticos para a separação e identificação dos compostos fenólicos, sendo que a maioria dos protocolos é baseada nas técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência com espectrofotometria na região do UV-visível, não sendo necessário a derivatização da amostra antes da análise (JUSTESEN; KNUTHESEN, 2001). Entretanto, quando comparado à espectrometria de massas, o espectro UV-visível não fornece dados suficientes para a identificação desses compostos (YAO et al., 2005).

Figura 15 – Perfil cromatográfico do extrato etanólico e aquoso do talo de brócolis

Figura 16 – Perfil cromatográfico do extrato etanólico e aquoso do talo de beterraba

Figura 17 – Perfil cromatográfico do extrato etanólico e aquoso da folha/talo de rabanete

Figura 18 – Perfil cromatográfico do extrato etanólico e aquoso da folha/talo de nabo

Figura 19 – Perfil cromatográfico do extrato etanólico e aquoso da película de amendoim

Tabela 10 – Tempo de retenção, percentual de área de cada componente e íons importantes presentes no espectro de massa dos compostos silanizados presentes nos extratos etanólicos dos resíduos vegetais, por GC-EM

Área (%)									
Resíduos vegetais (extratos etanólicos)									
Compostos	TR* (min)	Talo de		Folha/talo de		Folha/talo de		Película de Amendoim	Íon (m/z, abundância entre parênteses)**
		Brócolis	Beterraba	Rabanete	Nabo	Nabo	Amendoim		
Ácido cítrico	9,90	-	1,41	-	-	-	-	-	73 (100), 147 (41), 75 (15), 133 (10), 45 (10); 465M ⁺
Ácido benzóico 2,6-dihidroxi	7,43	2,31	0,64	-	-	-	3,77	-	73 (100), 355 (41), 255 (33), 267 (31), 270 (29)
Ácido síringico	9,58	-	3,92	-	-	-	-	-	327 (100), 73 (85), 342 (71), 312 (67), 297 (64); 342M ⁺
Ácido- <i>p</i> -cumárico	9,80	1,17	1,67	9,23	3,88	-	13,47	-	73 (100), 293 (59), 219 (54), 308 (45), 249 (38); 414M ⁺
Ácido ferúlico	10,70	5,95	2,62	6,60	6,24	-	1,52	-	338 (100), 73 (78), 308 (54), 323 (53), 249 (39); 338M ⁺
Ácido caféico	10,95	1,72	0,52	2,60	9,15	-	4,59	-	219 (100), 73 (82), 396 (76), 397 (27), 381 (21); 396M ⁺
Ácido ascórbico	9,90	15,32	-	0,35	1,49	-	-	-	73 (100), 74 (8), 45 (8), 75 (6), 59 (2); 464M ⁺
Ácido sinápico	11,70	24,56	0,68	0,39	-	-	-	-	73 (100), 338 (90), 368 (87), 353 (42), 75 (29); 368M ⁺
Kaempferol	19,33	0,22	-	0,30	-	-	1,37	-	559 (100), 560 (47), 73 (25), 561 (22), 487 (9); 559M ⁺
Epicatequina	17,40	-	-	-	-	-	28,50	-	368 (100); 73 (64), 355 (36), 369 (29), 370 (13); 650M ⁺

*Tempo de retenção (min) **Relação massa/carga

Tabela 11 - Tempo de retenção, percentual de área de cada componente e íons importantes presentes no espectro de massa dos compostos silanizados presentes nos extratos aquosos dos resíduos vegetais, por GC-EM

Área (%)							
Resíduos vegetais (extratos aquosos)							
Compostos	tR* (min)	Talo de Brócolis	Talo de Beterraba	Folha/talo de Rabanete	Folha/talo de Nabo	Película de Amendoim	Íon (m/z, abundância entre parênteses)**
Ácido cítrico	9,90	0,62	27,69	-	-	-	73 (100), 147 (41), 75 (15), 133 (10), 45 (10); 465M ⁺
Ácido benzóico 2,6-dihidroxí	7,43	0,14	1,94	0,09	-	-	73 (100), 355 (41), 255 (33), 267 (31), 270 (29)
Ácido síringico	9,58	-	-	-	-	-	327 (100), 73 (85), 342 (71), 312 (67), 297 (64); 342M ⁺
Ácido-p-cumárico	9,80	4,76	-	3,40	3,18	22,23	73 (100), 293 (59), 219 (54), 308 (45), 249 (38); 414M ⁺
Ácido ferúlico	10,70	2,87	-	2,36	5,31	6,38	338 (100), 73 (78), 308 (54), 323 (53), 249 (39); 338M ⁺
Ácido caféico	10,95	3,92	-	3,02	8,99	9,60	219 (100), 73 (82), 396 (76), 397 (27), 381 (21); 396M ⁺
Ácido ascórbico	9,90	0,31	-	0,34	0,70	-	73 (100), 74 (8), 45 (8), 75 (6), 59 (2); 464M ⁺
Ácido sinápico	11,70	0,13	-	0,05	-	-	73 (100), 338 (90), 368 (87), 353 (42), 75 (29); 368M ⁺
Kaempferol	19,33	0,49	-	0,24	-	4,54	559 (100), 560 (47), 73 (25), 561 (22), 487 (9); 559M ⁺
Epicatequina	17,40	-	-	-	-	4,50	368 (100); 73 (64), 355 (36), 369 (29), 370 (13); 650M ⁺

*Tempo de retenção (min) **Relação massa/carga

3 CONCLUSÕES

Os resíduos vegetais apresentaram atividade antioxidante pelos métodos de DPPH, ABTS, beta-caroteno, Rancimat e FRAP, destacando-se dentre eles a película de amendoim e o talo de beterraba.

Os extratos etanólicos dos diferentes resíduos apresentaram maiores valores de atividade antioxidante na maioria dos testes utilizados quando comparados aos extratos aquosos.

A análise de CG-EM permitiu a identificação de compostos de natureza fenólica que podem estar associados à atividade antioxidante dos resíduos vegetais talo de brócolis, talo de beterraba, folha/talo de rabanete, folha/talo de nabo e a película de amendoim, como ácido ascórbico, ácido sinápico, ácido caféico, epicatequina, ácido-*p*-cumárico.

A atividade antioxidante observada para os resíduos vegetais, película de amendoim e talo de beterraba apresentam potencial de aplicação direta em sistemas *in vivo* e/ou na indústria de alimentos.

REFERÊNCIAS

- ABIDILLE, M. D. H.; SINGH, R. P.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B. S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, Barking, v. 90, n.4, p. 891-896, 2005.
- AL MEHDI, A. B.; DODIA, C.; JAIN, M. K.; FISHER, A. B. A phospholipase A2 inhibitor decreases generation of thiobarbituric acid reactive substances during lung ischemia-reperfusion. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1166, n. 1, p. 56-62, 1993.
- ALONSO, A. M.; GUILLÉN, D. A.; BARROSO, C. G.; PUERTAS, B.; GARCÍA, A. Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 21, p. 5832–5836, 2002.
- AMIN, I.; NORAZAIDAH, Y.; HAINIDA, K. I. E. Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched *Amaranthus* species. **Food Chemistry**, Barking, v. 94, n. 1, p.47-52, 2006.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, São Paulo, v. 3, n. 2, p. 145–154, 2004.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, London, v. 127, n. 1, p. 186-198, 2002.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 18 th ed. Gaithersburg, 2005. cap. 42, p. 2-3.
- APAK, R.; GUÇLU, K.; OZYUREK, M.; KARADEMIR, S. E. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n.26, p. 7970-7981, 2004.
- AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia**: princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: Ed. Inter-ciência, 2003. cap. 1, p. 25-30.
- ATMANI, D.; CHAHER, N.; BERBOUCHA, M.; AYOUNI, K.; LOUNIS, H.; BOUDAUD, H.; DEBBACHE, N.; ATMANI, D. Antioxidant capacity and phenol content of selected algerian medicinal plants. **Food Chemistry**, Barking, v. 112, n. 2, p. 303-309, 2009.

AWAD, A. B.; CHAN, K. C.; DOWNIE, A. C.; FINK, C. S. Peanuts as a source of B-sitosterol, a sterol with anticancer properties. **Nutrition and Cancer**, Hillsdale, v. 36, n. 2, p. 238–241, 2000.

AZEREDO, H. M. C. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. 195 p.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. **Food Chemistry**, Barking, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.

BARBER, A. D.; HARRIS, S. R. Oxygen free radicals and oxidants: a review. **American Pharmacy**, Washington, v. 34, n. 9, p. 26-35, 1994.

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

BENNETT, R. N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **The New Phytologist**, Londres, v. 127, n. 4, p. 617-633, 1994.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BENZIE, I. F. F.; WAI, Y.; STRAIN, J. J. Antioxidant (reducing) efficiency of ascorbate in plasma is not affected by concentration. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stonehan, v. 10, n. 3, p. 146–150, 1999.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, n. 12, v. 2, p. 123-130, 1999.

BIGLARI, F.; ALKARKHI, A. F. M.; EASA, A. M. Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. **Food Chemistry**, Barking, v. 107, n. 4, p. 1636–1641, 2008.

BLAZEVIC, I.; MASTELIC, J. Glucosinolate degradation products and other bound and free volatiles in the leaves and roots of radish (*Raphanus sativus* L.). **Food Chemistry**, Barking, v. 113, n.1, p. 96–102, 2009.

BLOOR, S. J. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids, 2001. In _____ RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; QUEIROZ, M. E. L. R.; CAMPOS, F. M.; SANT'ANA, H. M. P. Antioxidant in mango (*Mangifera indica* L.) pulp. **Plants Foods for Human Nutrition**, New York, v. 62, n. 1, p. 13-17, 2007.

- BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Food Science and Technology**, London, v. 30, n. 6, p. 609-615, 1997.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, Londres, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, n.11, p. 317-333, 1998.
- BRYNGELSSON, S.; MANNERSTEDT-FOGELFORS, B.; KAMAL-ELDIN, A.; ANDERSSON, R.; DIMBERG, L. H. Lipids and antioxidants in groats and hulls of Swedish oats (*Avena sativa* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 82, n. 6, p. 606–614, 2002.
- CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; PERES, L. E. P. **Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática**. Piracicaba: Ed. Agronômica Ceres, 2005. 605p.
- CHINNICI, F.; BENDINI, A.; GAIANI, A.; RIPONI, C. Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. golden delicious apples as related to their phenolic composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 15, p. 4684-4689, 2004.
- CHU, Y. F.; SUN, J.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 23, p. 6910–6916, 2002.
- CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Science**, New York, v. 854, p. 435-442, 1998.
- DIMITRIOS, B. Review: Sources of natural phenolic antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 17, n. 9, p. 505-512, 2006.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linolêico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.
- EMMONS, C. L.; PETERSON, D. M.; PAUL, G. L. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. *in vitro* antioxidant activity and content of phenolic and tocol antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 12, p. 4894-4898, 1999.
- FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 23-36, 2006.

FARHOOSH, R. R.; NIAZMAND, R.; REZAEI, M.; SARABI, M. Kinetic parameter determination of vegetable oil oxidation under Rancimat test conditions. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 110, n. 6, p. 587–592, 2008.

FAULDS, C. B.; WILLIAMSON, G. The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York, v. 79, n. 3, p. 393–395, 1999.

FELDMAN, E. B. Assorted monounsaturated fatty acids promote healthy hearts. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 70, n. 6, p. 953–954, 1999.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. Porto Alegre: Artmed, 2 ed. 2006. 602p.

FERNANDES, F.; VALENTÃO, P.; SOUSA, C.; PEREIRA, J. A.; SEABRA, R. M.; ANDRADE, P. B. Chemical and antioxidative assessment of dietary turnip (*Brassica rapavar. rapa L.*). **Food Chemistry**, Barking, v. 105, n. 3, p. 1003–1010, 2007.

FERNANDEZ-PANCHON, M. S.; VILLANO, D.; TRONCOSO, A. M.; GARCIA-PARRILLA. Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 48, n. 7, p. 649–671, 2008.

FERREIRA, M. M. M.; OLIVEIRA, A. H. C.; SANTOS, N. S. Flavonas e flavonóis: novas descobertas sobre sua estrutura química e função biológica. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 2, n. 2, p. 57–60, 2008.

FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York, v. 80, n. 13, p. 1925–1941, 2000.

FRIEDMAN, M. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 5, p. 1523–1540, 1997.

GHISELLI, A.; NARDINI, M.; BALDI, A.; SCACCINI, C. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from Italian red wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 2, p. 361–367, 1998.

GOLI, A. H.; BARZEGAR, M.; SAHARI, M. A. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 92, n. 3, p. 521–525, 2005.

GÓMEZ-PLAZA, E.; MIÑANO, A.; LÓPEZ-ROCA, J. M. Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. **Food Chemistry**, Barking, v. 97, n. 1, p. 87–94, 2006.

- GÓMEZ-RUIZ, J. A.; LEAKE, D. S.; AMES, J. M. In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.55, n.17, p. 6962-6969, 2007.
- GONZAGA, F. B.; PASQUINI, C.; RODRIGUES, C. E. C.; MEIRELLES, A. J. A. Comparison of near-infrared emission spectroscopy and the Rancimat method for the determination of oxidative stability. **Europe Journal Lipid Science Technology**, Weinheim, v. 109, n. 1, p. 61–65, 2007.
- GORDON, M. H. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. In _____ HUDSON, B. J. F. **Food antioxidants**. London: Elsevier Applied Science, 1990. p. 1-18.
- GORINSTEIN, S.; MARTÍN-BELLOSO, O.; LOJEK, A.; CÍZ, M.; SOLIVA-FORTUNY, R.; PARK, Y. S. Comparative content of some phytochemicals in Spanish apples, peaches and pears. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York, v. 82, n. 10, p. 1166–1170, 2002.
- HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovascular Research**, London, v. 47, n. 3, p. 410-418, 2000.
- HALVORSEN, B. L.; HOLTE, K.; MYHRSTAD, M. C. W.; BARIKMO, I.; HVATTUM, E.; REMBERG, S. F.; WOLD, A. N.; HAFFNER, K.; BAUGEROD, H.; ANDERSEN, L. F.; MOSKAUG, J.; JACOBS, D. V. R.; BLOMHOFF, R. A Systematic Screening of Total Antioxidants in Dietary Plants. **The Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 132, n. 3, p. 461-471, 2009
- HA, H. V.; POKORNY, J.; SAKURAI, H. Peanut skin antioxidants. **Journal of Food Lipids**, Barking, v. 14, p. 298–314, 2007.
- HAO, C.; ZHAO, X; YANG, P. GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 26, n. 6, p. 569-580, 2007.
- HUANG, D.; OU, B., PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.
- HUANG, S. W.; FRANKEL, E. N.; SCHWARZ, K.; AESCHBACH, R.; GERMAN, J. B. Antioxidant activity of carnosic acid and methyl carnosate in bulk oils and oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 10, p. 2951-2956, 1996.
- ISMAIL, A.; MARJAN; Z. M.; FOONG, C. W. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. **Food Chemistry**, Barking, v. 87, n. 4, p. 581-586, 2004.
- JACKSON, R. Chemical constituents of grapes. In _____ **Wine science: principles and applications**. London: Academic Press, 1994. p. 178-219.

JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. *In vitro* evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. **Food Chemistry**, Barking, v. 101, n. 1, p. 410-418, 2007.

JUNTACHOTE, T.; BERGHOFER, E. Antioxidant properties and stability of ethanolic extracts of holy basil and galangal. **Food Chemistry**, Barking, v. 92, n. 2, p. 193-202, 2005.

JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P. Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. **Food Chemistry**, Barking, v.73, n. 2, p. 245-250, 2001.

KAHKONEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; RAUHA J. P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T. S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, 1999.

KAMAL-ELDIN, A. Effect of fatty acids and tocopherols on the oxidative stability of vegetable oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 108, n. 12, p. 1051-1061, 2006.

KATALINIC, V.; MILOS, M.; MODUN, D.; MUSIC, I.; BOBAN, M. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. **Food Chemistry**, Barking, v. 86, n. 4, p. 593–600, 2004.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 153-161, 2002.

KOLEVA, I. I.; VAN BEEK, T. A.; LINSSEN, J. P. H.; GROOT A.; EVSTATIEVA, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, Oak Ridge, v. 13, n. 1, p. 8-17, 2002.

KONDO, T.; YOSHIDA, K.; NAKAGAWA, A.; KAWAI, T.; TAMURA, H.; GOTO, T. Strutural basis of blue-color development in flower petals from *Commelina communis*. **Nature Chemistry**, London, v. 358, p. 515-518, 1992.

KOWALSKI, K. B.; RATUSZ, K.; KOWALSKA, D.; BEKAS, W. Determination of the oxidative stability of vegetable oils by differential scanning calorimetry and Rancimat measurements. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 106, n. 3, p. 165-169, 2004.

KRIS-ETHERTON, P. M.; PEARSON, T. A.; WAN, Y.; HARGROVE, R. L.; MORIARTY, K.; FISHELL, V. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentration. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 70, n. 6, p. 1009–1015, 1999.

- KUJALA, T. S.; LOPONEN, J. M.; KLIKA, K. D.; PIHLAJA, K. Phenolics and Betacyanins in Red Beetroot (*Beta vulgaris*) Root: Distribution and Effect of Cold Storage on the Content of Total Phenolics and Three Individual Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n.1, p. 5338-5342, 2000.
- LAVELLI, V.; PERI, C.; RIZZOLO, A. Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using xanthine oxidase, myeloperoxidase, and copper-induced lipid peroxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 5, p. 1442–1448, 2000.
- LEAL, P. F.; BRAGA, M. E. M.; SATO, D. N.; CARVALHO, J. E.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. M. Functional properties of spices extracts obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 9, p. 2520-2525, 2003.
- LICHTENTHALER, H. K. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 47-50, 1999.
- LIYANA-PATHIRANA, C. M.; SHAHIDI, F.; ALASALVAR, C. Antioxidant activity of cherry laurel fruit (*Laurocerasus officinalis* Roem.) and its concentrated juice. **Food Chemistry**, Barking, v. 99, n. 1, p. 121-128, 2006.
- LOU, H.; YUAN, H.; MA, B.; REN, D.; JI, M.; OKA, S. Polyphenols from peanut skins and their free radical-scavenging effects hong xiang. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, p. 2391–2399, 2004.
- MACDONALD-WICKS, L. K.; WOOD, L. G.; GARG, M. L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 86, n. 13, p. 2046–2056, 2006.
- MAFRA, D.; ABDALLA, D. S. P.; COZZOLINO, S. M. F. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 3, p. 205-212, 1999.
- MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 22, n. 2, p. 233-252, 2004.
- MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; REMESY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 81, n. 1, p. 230S–242S, 2005.
- MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v.45, n. 9, p. 594-598, 1968.

- MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. I. Antioxidant activity of extracts from selected species of the family *Lamiaceae* in sunflower oil. **Food Chemistry**, Barking, v. 58, n. 3, p. 245-248, 1997.
- MATSUFUJI, H.; OTSUKI, T.; TAKEDA, T.; CHINO, M.; TAKEDA, M. Identification of Reaction Products of Acylated Anthocyanins from Red Radish with Peroxyl Radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 10, p. 3157-3161, 2003.
- MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; LEAL, F. L. L.; CAETANO, A. C. S.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.
- MELO, P. C. T.; VILELA, N. J. Desafios e perspectivas para a cadeia brasileira de tomate para processamento industrial. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 154-157, 2005.
- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. **Phytotherapy Research**, London, v.15, n. 2, p.127–130, 2001.
- MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists Society**, London, v. 48, n. 2, p. 91, 1971.
- MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A.; DAVIS, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, Oxford, v. 84, n. 2, p. 407-412, 1993.
- MITHEN, R. F.; DEKKER, M.; VERKERK, R.; RABOT, S.; JOHSON, I. T. The nutritional significance and bioavailability of glucosinolates in human foods review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, n. 7, p. 967-984, 2000.
- MODUN, D.; MUSIC, I.; KATALINIC, V.; SALAMUNIC, I.; BOBAN, M. Comparison of protective effects of catechin applied *in vitro* or *in vivo* on ischemia-reperfusion injury in the isolated rat hearts. **Croatian Medical Journal**, Zabreg, v. 44, n. 6, p. 690–696, 2003.
- MOHDALY, A. A. A.; SARHAN, M. A.; MAHMOUD, A.; FAWZY, M. Antioxidant efficacy of potato peels and sugar beet pulp extracts in vegetable oils protection. **Food Chemistry**, Barking, v. 123, n. 4, p. 1019-1026, 2010.
- MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal of Science and Technology**, Hat Yai, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2003.
- MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 5, p. 1655–1666, 2009.

MURCIA, M. A.; JIMÉNEZ, A. M.; MATÍNEZ-TOMÉ, M. Evaluation of the antioxidant properties of mediterranean and tropical fruits compared with common food additives. **Journal of Food Protection**, Ames, n. 64, v. 12, p. 2037-2046, 2001.

NACZK, M., SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 41, n. 5, p. 1523-1542, 2006.

NOLDIN, V. F.; FILHO, V. C.; MONACHE, F. D.; BENASSI, J. C.; CHRISTMANN, C.; PEDROSA, R. C.; YUNES, R. A. Composição química e atividades biológicas das folhas de (*Cynara scolymus* L. alcachofra) cultivada no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 331-334, 2003.

OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. 2004, 104p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

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

PACKER, L.; HIRAMATSU, M.; YOSHIKAWA, T.; Antioxidant food supplements in human health. **Academic Press**, Orlando, 1999, 269p.

PEREIRA, A. L. F.; VIDAL, T. F.; CONSTANT, P. B. L. Antioxidantes alimentares: importância química e biológica. **Nutrire**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 231-247, 2009.

PELLEGRINI, N.; SERAFINI, M.; COLOMBI, B.; RIO, D. D.; SALVATORE, S.; BIANCHI, M.; BRIGHENTI, F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 2, n. 1, p. 2812-2819, 2003.

PEREIRA, G. I. S.; PEREIRA, R. G. F. A.; BARCELOS, M. F. P.; MORAIS, A. R. Avaliação química da folha de cenoura visando ao seu aproveitamento na alimentação humana. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 4, p. 852-857, 2003.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, Toronto, v. 39, n. 7, p. 791-800, 2006.

PESCHEL, W.; SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W.; PLESCHER, A.; GARTZÍA, I.; JIMÉNEZ, D.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.; BUXADERAS, S.; CODINA, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, Barking, v. 97, n. 1, p. 137-150, 2006.

PINTO, S. M.; KWON, Y. I.; APOSTOLIDIS, E.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I.; SHETTY, K. Functionality of bioactive compounds in Brazilian strawberry (*Fragaria x Ananassa* Duch.) cultivars: evaluation of hyperglycemia and hypertension potential using *in vitro* models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 12, p. 4386–4392, 2008.

PORTER, N. A.; CALDWELL, S. E.; MILLS, K. A. Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**, Chicago, v. 30, n. 4, p. 277-290, 1995.

PORTER, W. L. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. **Toxicology and Industrial Health**, Princeton, v. 9, n. 12, p. 93-122, 1993.

PRIOR, R. L.; XIANLI, W.; SCHAICH, K. Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenolics as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAMARARHNAME, N.; OSAWA, T.; OCHI, H.; KAWAKISHI, S. The contribution of plant food antioxidants to human health. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 6, n. 3, p. 75-82, 1995.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.

REHMAN, Z. U. Evaluation of antioxidant activity of methanolic extract from peanut hulls in fried potato chips. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 58, n. 1, p. 75–83, 2003.

REHMAN, Z.; HABIB, F.; SHAH, W. H. Utilization of potato peels extract as a natural antioxidant in soy bean oil. **Food Chemistry**, Barking, v. 85, n. 2, p. 215-220, 2004.

RIBÉREAU-GAYON, P. **Les composés phénoliques des végétaux**. França : Dunod, 1968. 254p.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 20, p. 933-956, 1996.

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1000, p. 657–691, 2003.

- ROBARDS, K.; PRENZLER, P. D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, Barking, v. 66, p. 401-436, 1999.
- ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; KUKOSKI, E. M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades *Tannat* e *Ancelota*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 238-244, 2008.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, Barking, v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMENÉZ-PÉREZ, J.; CALIXTO-SAURA, F. D. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Fortaleza: EMBRAPA, 2007. 4p. (Comunicado Técnico, n. 128).
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Fortaleza: EMBRAPA, 2006. 4p. (Comunicado Técnico, n. 125).
- SANDERS, T. H. Non-detectable levels of trans-fatty acids in peanut butter. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 5, p. 2349–2351, 2001.
- SANDERS, T. H.; MCMICHAEL, R. W.; HENDRIX, K. W. Occurrence of resveratrol in edible peanuts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 4, p. 1243–1246, 2000.
- SARTORELLI, C. S. C. **Caracterização química da parte aérea de cenoura (*Daucus carota*) e beterraba (*Beta vulgaris*), visando ao aproveitamento na alimentação humana**. 1998. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.
- SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **CRC-Critical Reviews in Food Science Nutrition**. Columbus, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.
- SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics**: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic Publishing, 1995. p. 281-319.
- SILVA, D. H. S.; PEREIRA, F. C.; ZANONI, M. V. B.; YOSHIDA, M. Lipophyllic antioxidants of *Iryanthera juruensis* fruits. **Phytochemistry**, Oxford, v. 57, p. 437-442, 2001.
- SILVA, P. C. F. **Propriedades antioxidantes *in vitro* de uva branca e de uva tinta e de seus respectivos vinhos elaborados**. 2003. 138p. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

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

SOBOLEV, V. S.; COLE, R. J. Trans-Resveratrol content in commercial peanuts and peanut products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 4, p. 1435–1439, 1999.

SOUSA, C. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C. A.; DA COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; MARIANA, H. C. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, New York, v. 24, n. 6, p. 345–351, 2003.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, Eaton, v. 30, p. 3268–3295, 2007.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS 9.0**. Cary:SAS Institute, 2003.

SU, L.; YIN, J. J.; CHARLES, D.; ZHOU, K.; MOORE, J.; YU, L. L. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. **Food Chemistry**, Barking, v. 100, n. 3, p. 990–997, 2007.

SUN, J.; CHU, Y. F.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 25, p. 7449–7454, 2002.

SURVESWARAN, S., CAI, Y. Z., CORKE, H., SUN, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, Barking, v. 102, p.938–953, 2007.

TACHAKITTIRUNGROD, S.; OKONOGI, S.; CHOWWANAPHOONPOHN, S. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. **Food Chemistry**, Barking, v. 103, p. 381–388, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009, 820p.

TAKEOKA, G. R.; DAO, L. T. Antioxidant constituents of almond. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 496–501, 2002.

TALCOTT, S. T.; PERCIVAL, S. S.; PITTET-MOORE, J.; CELORIA, C. Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 4, p. 935–941, 2003.

- TSAI, P. J.; MCINTOSH, J.; PEARCE, P.; CAMDEN, B.; JORDAN, B. R. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. **Food Research International**, Weinheim, v. 35, p. 351–356, 2002.
- VACA, C. E.; WILHEM, J.; HARMS-RINGDAHL, M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA: a review. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 195, p. 137-149, 1988.
- VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 10, p. 4113-4117, 1998.
- VINSON, J. A.; SU, X.; ZIBIK, L.; BOSE, P. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Fruits. **Journal Agricultural Food Chemical**, New York, v. 49, n. 11, p. 5315-5321, 2001.
- WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Antioxidant and prooxidant activity of green tea extracts in marine oils. **Food Chemistry**, Barking, v. 63, n. 3, p. 335–342, 1998.
- WATANABE, M.; OHSHITA, Y.; TSUSHIDA, T. Antioxidant compounds from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) hulls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, p. 1039–1044, 1997.
- WOLFE, K.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant activity of apple peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 3, p. 609-614, 2003.
- YAO, L. H. **Flavonoids and other polyphenols in Australian tea and honey**. 2002. 165p. (PhD thesis). The University of Queensland, Santa Lúcia, 2002.
- YU, J.; AHMEDNA, M.; GOKTEPE, I. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. **Food Chemistry**, Barking, v. 90, p. 199–206, 2005.
- ZITNANOVÁ, I.; RANOSTAJOVÁ, S.; SOBOTOVÁ, H.; DEMELOVÁ, D.; PECHÁN, I.; DURACKOVÁ, D. Antioxidative activity of selected fruits and vegetables. **Versita**, Bratislava, v. 61, n. 3, p. 279-284, 2006.
- ZHENG, W.; WANG, S. Antioxidant activity and phenolic composition in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 11, p. 5165-5170, 2001.
- ZUO, Y.; WANG, C.; ZHAN, J. Separation, characterization and quantitation of benzoic and phenolic antioxidants in American cranberry fruit by GCMS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 13, p. 3789-3794, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Figura 20 - Curva de calibração do ácido gálico para o cálculo do teor de compostos fenólicos totais

APÊNDICE 2

Figura 21 - Curva de calibração do Trolox

APÊDICE 3

Figura 22 - Curva de calibração do sulfato ferroso

APÊNDICE 4

Figura 23 - Diluições e ajuste das curvas dos extratos etanólico e aquoso dos resíduos vegetais pelo método ABTS⁺⁺

Figura 24 - Diluições e ajuste das curvas dos extratos etanólico e aquoso dos resíduos vegetais pelo método ABTS⁺⁺