UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA

**Mecanismos de ação antioxidante de extratos
de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth)**

Mariana Séfora Bezerra Sousa

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Nutrição em Saúde Pública da
Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dra. Deborah
Helena Markowicz Bastos

São Paulo

2013

Mecanismos de ação antioxidante de extratos de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth)

Mariana Séfora Bezerra Sousa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dra. Deborah Helena Markowicz Bastos

São Paulo

2013

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida **exclusivamente** para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação.

Sou parte de tudo que encontrei;
ainda que toda experiência seja um círculo
em que brilha o mundo inexplorado com margens,
que sempre se desfazem sempre que avanço.
(...)

Venham amigos,
não é tarde para buscar um novo mundo.
Desatracai e, postos em ordem, batam
os sonoros encaixes; pois é meu intento
navegar além de onde o sol se põe.
(...)

Ainda que muito esteja perdido, muito nos resta;
e ainda que perdida a força dos velhos dias
que movia céus e terras; somos o que somos;
uma coragem única nos corações heroicos,
débeis pelo tempo e pelo destino,
mas persistentes em lutar, achar, buscar, jamais render-se.

Ulysses, de Alfred Tennyson

DEDICATÓRIA

A Deus...

*“...minha força é a fé que carrego no fundo do peito
Quando nada dá pé, é amém, é axé não tem jeito
Ninguém sabe como explicar essa força maior
Ele sempre estende a mão, não importa a religião
Não tem raça, não tem nação, porque Deus é um só
É o perfume que vem da natureza
Flor que renasce do solo da impureza
Uma estrela a me guiar
Manto que aquece a família e protege o meu lar
Ele é o céu, água do mar
Luz do luar, sol do verão
Enche de paz, minha oração
Me dá guarida
Vento que traz inspiração
Força da vida.”*

A minha mãe Ilza

Aos meus irmãos Miguel e Mariza

Ao amado Ronald

*“...Vocês foram meus olhos quando não pude ver, meus ouvidos quando não
pude ouvir, foram a mão estendida na hora do tropeço, foram o grito de
alegria na hora da conquista e me deram asas para eu voar...”
Sem vocês eu nada seria!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, força maior, pela vida e por cada anjo colocado ao meu lado. Por estar sempre em mim e comigo, me guiando e me acalmando a alma.

A Profa. Dra. Deborah H. Markowicz Bastos pela oportunidade e orientação.

A minha mãe Ilza, gigante guerreira, meu exemplo de força e coragem, por segurar a minha mão nos momentos mais difíceis, caminhando junto comigo e ajudando a construir o que hoje eu sou. Por encurtar as distâncias com seu amor, o qual não me deixou desistir!

*"She told me, daughter, sometimes it may seem dark
But the absence of the light is a necessary part
Just know, you're never alone,
You can always come back home."*

Aos meus irmãos Miguel e Mariza, pilares da minha vida, pelo amor e por acreditarem e confiarem em mim!

Ao meu pai e a toda minha família, especialmente, aos meus tios Chagas e Luizinha, e às primas-irmãs Magna e Marclane, pelo amor e cuidados a mim dedicados.

Ao Ronald, exemplo de generosidade, pelo amor, paciência, companheirismo e apoio incondicional... sempre! Por fazer dos meus sonhos os seus, compreendendo a minha ausência e a minha loucura pela ciência.

*"For all the joy you brought to my life
For every dream you made come true
You said no star was out of reach
You gave me faith 'coz you believed."*

Ao seu Feliciano e a Dona Raimunda, pela torcida e por literalmente colocarem "a mão na massa" quando necessário!

À amiga Andréia Marreiro, por, apesar da distância, me inspirar todos os dias com sua sabedoria e garra. Às amigas Débora Nascimento, Frankeline Gonçalves e Mariana de Moraes... por tornarem essa jornada, chamada vida, mais doce e feliz.

*"A glória da amizade não é somente a mão estendida,
o sorriso carinhoso e a delícia da companhia.
É também a inspiração espiritual que vem quando você descobre
que alguém acredita e confia em você."*

À Cíntia Silva, linda e graciosa surpresa do mestrado, pelo abraço apertado na hora da dor e pelas gargalhadas compartilhadas nas horas de alegria, por me "contaminar" com seu bom-humor e otimismo. Enfim, pela amizade que construímos!

"Bendito... encontro... na vida... amiga!"

À Thaíse Mendes, "*flor mineira*", pela feliz e agradável companhia na vida e na bancada! Pela amizade, calma, conversas, brincadeiras e por compartilhar comigo até os gostos musicais (risos)!

À Luciana C. Brigatto Fontes, pelo exemplo de competência e dedicação, especialmente pela amizade! Juntas com Thaíse e Cíntia formamos o "*quarteto fantástico*"!

À Amanda Carlos, pelo ombro amigo e também pelos "*puxões de orelha*". Vivo falando do imenso carinho que tenho por ela... Para alguns, a menina de "*humor ácido*", para mim será sempre o exemplo de sinceridade e cumplicidade!

Ao Augusto Carioca, que na verdade é cearense (risos), pelo companheirismo, amizade, apoio e incentivo! Quando eu não acredito, ele vai lá e me dá o "*empurrão*" necessário para continuar!

À Áurea J. Bombo Trevisan, pelo auxílio no planejamento experimental e análise estatística dos dados, mas, principalmente, pelo apoio e palavras de conforto.

À Érica Siguemoto, pela ajuda indispensável na análise de vitamina C e de carotenóides!

À Daniela Moura de Oliveira, pela ajuda inestimável na identificação e quantificação dos compostos fenólicos, por compartilhar um pouco do seu vasto conhecimento na área da espectrometria de massas, e, por muitas vezes, ter ouvido as minhas dúvidas e angústias.

Aos também companheiros de laboratório Érica Monaro, Jéssica Mascaretti, Nara Zandonadi, Bianka Salvador de Melo, Camila Olivieri, Gustavo Fontanari e à Tanila Wood pelo apoio e pelas conversas e momentos de descontração.

À Dra. Geni Sampaio, por me ajudar a dar os primeiros passos no laboratório de Bromatologia.

À Msc. Rosana Manólio Soares... por tudo! Por me receber sempre com um sorriso no rosto, tirando as minhas mais insanas dúvidas. Pela gentileza, paciência, disponibilidade e por nos contagiar com sua alegria. Por nos fazer acreditar que SIM, nós podemos SIM, nós conseguimos SIM, mais que isso, por nos ajudar a transformar as dificuldades em possibilidades!

Aos professores Drs. Marcelo Rogero e Úrsula Lanfer Marquez pela disponibilidade em participarem da banca e pela contribuição na minha formação acadêmica.

Aos professores Marcelo Hermes-Lima e Élide Campos da Universidade de Brasília-UnB, pela paciência, gentileza, disponibilidade e, principalmente, por

compartilharem o conhecimento! A orientação de vocês foi imprescindível para realização da análise de degradação da desoxirribose.

À profa. Dra. Dilina Marreiro, por ter me dado a oportunidade de galgar os primeiros passos na pesquisa. Tu és mestre e contigo eu aprendi a amar e acreditar na ciência!

À Universidade de São Paulo – USP pela oportunidade de realizar este trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa concedida.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Introdução: O murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) é um fruto utilizado pela população como alimento ou como agente terapêutico, mas ainda há poucos estudos sobre as suas propriedades funcionais. Assim, este trabalho objetivou caracterizar os frutos do murici quanto à composição de compostos antioxidantes e avaliar seus mecanismos de ação antioxidante *in vitro*.

Metodologia: Os frutos do murici foram coletados na cidade de Araiozes, Maranhão, Brasil. A composição centesimal foi avaliada pelos métodos oficiais de análise e o perfil de minerais por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado. Os perfis de carotenóides, tocoferóis e vitamina C foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. As condições ótimas para a extração de polifenóis de murici foram definidas por meio de planejamento composto central rotacional. Assim, o extrato A foi obtido usando 43,4% de acetona a 28,9°C por 50,8 minutos e o extrato B com 45,2% de acetona a 40°C por 52,8 minutos. Os extratos foram avaliados quanto ao perfil de compostos fenólicos por HPLC-ESI/MS e quanto aos mecanismos de ação antioxidante *in vitro*. **Resultados:** Os frutos de murici apresentaram (valor médio) 74,35 % de umidade, 0,94 % de cinzas, 0,68 % de proteínas, 1,82 % de lipídios, 4,31 % de carboidratos disponíveis e 17,91 % de fibras. Quanto ao perfil de minerais, o murici é uma boa fonte de potássio (338.58 mg 100 g⁻¹), cobre (200 µg 100g⁻¹) e magnésio (35.91 mg 100 g⁻¹). Os frutos apresentaram 57,41 mg/100 g vitamina C, 308,97 µg/g de luteína, 16,78 µg/g de β-caroteno, 3,80 µg/g de β-criptoxantina, 6,49 mg/100 g de α-tocoferol, 017 mg/100 g de β-tocoferol, 2,66 mg/100 g de γ-tocoferol e 0,33 mg/100 g de δ-tocoferol. A análise por HPLC-ESI/MS permitiu a identificação de 19 compostos fenólicos nos extratos de murici, sendo três dímeros de proantocianidinas, dois isômeros de catequina, ácido gálico, quercetina e seus derivados, entre outros. Os extratos de murici agiram eficientemente contra os radicais ABTS^{•+} (TEAC de 158,48 µM Trolox/ g murici fresco para o extrato A e 170,17 para o extrato B), peroxil (1252,88 µM Trolox/ g extrato para o extrato A e 1332,78 para o extrato B), hidroxil (IC₅₀ = 300,68 µg/mL para o extrato A e 281,33 para o extrato B), superóxido (IC₅₀ = 374,50 µg/mL para o extrato A e 350,92 para o extrato B). Os extratos inibiram a atividade da enzima xantina oxidase de maneira dose-dependente, porém, foram necessárias altas concentrações. No sistema Rancimat, a adição do extrato A na concentração de 2 mg/mL incrementou o tempo de indução da oxidação em 42,17 %, enquanto que o extrato B incrementou em 59,18%. Já no sistema de cooxidação β-caroteno/ácido linoleico, 150 µg/mL dos extratos inibiram cerca de 50 % da oxidação. **Conclusão:** Os frutos do murici são fontes potenciais de compostos antioxidantes, os quais atuam como *scavengers* de radicais livres, inibem a atividade da enzima xantina oxidase e a oxidação de lipídios.

Descritores: Murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth), Polifenóis; atividade antioxidante.

ABSTRACT

Introduction: The murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) is a fruit used by the population as food or as a therapeutic agent, but there are few studies about their functional properties. This study aimed to characterize the fruits of murici regarding the composition of antioxidant compounds and to evaluate their mechanisms of antioxidant action *in vitro*. **Methods:** The murici were obtained from Araiozes, Maranhão, Brazil. The chemical composition was assessed by official methods of analysis and profile of minerals by optical emission spectrometry with inductively coupled plasma. The analyses of vitamin C, carotenoids and tocoferols were performed by HPLC. Response surface methodology was employed to optimize the extraction of murici phenolics. The optimized conditions were 43.4% acetone for 50.8 min. at 28.9°C (Extract A) and 45.2% acetone for 52.8 min. at 40°C (Extract B). Phenolic compounds of the murici extracts were evaluated by HPLC-ESI/MS and the mechanisms of its antioxidant action were analyzed by *in vitro* methods. **Results:** The murici presented (average) 74.35% moisture, 0.68% protein, 1.82% fat, 4.31% carbohydrate and 17.91% fiber. Concerning the profile of minerals, murici is a good source of potassium (338.58 mg 100 g⁻¹), copper (200 mg 100g⁻¹) and magnesium (35.91 mg 100 g⁻¹). The presence of vitamin C (57.41 mg 100g⁻¹), lutein (308.97 mg g⁻¹), β -carotene (16.78 mg g⁻¹), β -cryptoxanthin (3.80 mg g⁻¹), α -tocopherol (6.49 mg 100 g⁻¹), β -tocopherol (0.17 mg 100 g⁻¹), γ -tocopherol (2.66 mg 100 g⁻¹) and δ -tocopherol (0.33 mg 100 g⁻¹) was observed in its composition. Nineteen phenolics have been identified in murici extracts, as three dimers proanthocyanidins, two isomers of catechin, gallic acid, quercetin and their derivatives. Murici extracts acted effectively against radical ABTS^{•+} (TEAC of 158.48 88 μ M Trolox/g fresh murici to extract A and 170.17 to extract B), peroxy (1252.88 μ M Trolox/g extract to extract A and 1332.78 to extract B), hydroxyl (IC₅₀ = 300.68 μ g/mL to extract A and 281.33 to extract B) and superoxide (IC₅₀ = 374.50 μ g/mL for the extract A and 350.92 to extract B). High concentrations of the extracts inhibited the activity of the enzyme xanthine oxidase in a dose-dependent manner. The result found by the Rancimat® method showed that the extract A at 2 mg/mL increased the oxidation induction time 42.17%, while the extract B increased 59.18%. Already in the β -carotene/linoleate model system, 150 μ g/mL of extracts inhibited the oxidation by 50%. The study still showed that the extract antioxidants may be effective in blocking radical chain reactions and may also interfere with the reactions that produce the secondary products that speed up the system's oxidative process. **Conclusion:** The murici is potential source of antioxidant compounds, which act as scavengers of free radicals, inhibit the activity of the enzyme xanthine oxidase and lipid oxidation.

Key-words: Murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth), Polyphenols; antioxidant activity.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 MECANISMOS DE GERAÇÃO DE RADICAIS LIVRES.....	21
2.2 ESTRESSE OXIDATIVO X DCNT.....	24
2.3 SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE	26
2.3.1 Antioxidantes enzimáticos.....	28
A) Superóxido dismutase (SOD)	28
B) Catalase (CAT)	28
C) Glutathione peroxidase (GPx)	28
D) Glutathione reductase (GR)	29
2.3.2 Antioxidantes dietéticos.....	30
A) Vitamina C.....	30
B) Carotenoides.....	32
C) Vitamina E.....	34
D) Minerais.....	36
E) Polifenóis	36
2.4 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES.....	41
2.5 MURICI (<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth).....	43
3. OBJETIVOS.....	46
3.1 OBJETIVO GERAL.....	46
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1 MATERIAL VEGETAL.....	47
4.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E FIBRAS.....	47
4.3 PERFIL DE MINERAIS.....	48
4.4 DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS ANTIOXIDANTES	48
4.4.1 Determinação de vitamina C.....	48
4.4.2 Determinação de carotenoides	50
4.4.3 Determinação de tocoferóis (Vitamina E)	52

4.5 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DO MURICI POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	53
A) Determinação dos compostos fenólicos totais.....	55
B) Avaliação da capacidade antioxidante pelo ensaio do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).....	56
4.6 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO MURICI POR HPLC-ESI/MS.....	58
4.7 MECANISMOS DE AÇÃO ANTIOXIDANTE	59
4.7.1 Determinação da atividade <i>scavenger</i> do radical ABTS ^{•+}	59
4.7.2 Determinação da atividade <i>scavenger</i> do radical peroxil....	60
4.7.3 Avaliação da atividade <i>scavenger</i> do radical hidroxil (•OH): ensaio de dano oxidativo à 2-deoxirribose.....	61
4.7.4 Determinação da atividade <i>scavenger</i> do ânion superóxido (O ₂ ^{•-}).....	63
4.7.5 Inibição da atividade da enzima xantina oxidase.....	64
4.7.6 Capacidade de redução do ferro – FRAP.....	65
4.7.7 Inibição da oxidação lipídica – RANCIMAT®.....	65
4.7.8 Inibição da oxidação do β-caroteno: sistema modelo de cooxidação β-caroteno/ácido linoleico.....	67
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	68
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
5.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E FIBRAS.....	69
5.2 PERFIL DE MINERAIS.....	70
5.3 DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS ANTIOXIDANTES.....	71
5.4 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DO MURICI POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.....	73
5.5 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO MURICI POR HPLC-ESI/MS.....	88
5.6 MECANISMOS DE AÇÃO ANTIOXIDANTE.....	92

5.6.1 Determinação da atividade <i>scavenger</i> do radical ABTS.....	92
5.6.2 Determinação da atividade <i>scavenger</i> do radical peroxil.....	94
5.6.3 Avaliação da atividade <i>scavenger</i> do radical hidroxil: ensaio de dano oxidativo a 2-deoxirribose.....	97
5.6.4 Determinação da atividade <i>scavenger</i> do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$).....	102
5.6.5 Inibição da atividade da enzima xantina oxidase.....	105
5.6.6 Capacidade de redução do Ferro – FRAP.....	107
5.6.7 Inibição da oxidação lipídica – Sistema Rancimat®.....	109
5.6.8 Inibição da oxidação do β -caroteno: sistema modelo de cooxidação β -caroteno/ácido linoleico.....	111
6. CONCLUSÕES.....	115
7. REFERÊNCIAS.....	116
ANEXO 1 – Primeira página do currículo Lattes do aluno.....	132
ANEXO 2 – Primeira página do currículo Lattes do orientador.....	133

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido ascórbico
AAPH	Dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)
ABTS	2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico
AP-1	Proteína ativadora 1
ARE	Elementos de resposta antioxidante
BHT	Butil hidroxi tolueno
CAT	Catalase
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DHA	Ácido dehidroascórbico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EpRE	Elementos de resposta à eletrófilo
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FRAP	Capacidade de redução do ferro
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
HAT	Hydrogen Atom Transfer
KEAP-1	Kelch-like ECH-associated protein 1
MDA	Malondialdeído
NBT	Nitroblue tetrazolium
Nrf2	Nuclear factor-E2-related factor
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
PIH	Piridoxal isonicotinoyl hidrazona
SET	Single Electron Transfer
SOD	Superóxido dismutase
TEAC	Atividade antioxidante expressa em equivalente de Trolox
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TPTZ	Tripiridiltriazina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processo simplificado de formação de espécies reativas de oxigênio por meio da adição de 4 elétrons e 4 íons de hidrogênio, formando água e liberando energia.....	21
Figura 2: Representação esquemática da peroxidação lipídica dos ácidos graxos da membrana celular.....	23
Figura 3: Classificação dos antioxidantes em enzimáticos e não enzimáticos.....	27
Figura 4: Vias de geração de radicais livres e sistema enzimático de defesa antioxidante.....	29
Figura 5: Ciclo oxidativo da vitamina C	31
Figura 6: Ação antioxidante da vitamina E na peroxidação lipídica e sua regeneração pela vitamina C.....	35
Figura 7: Sinalização do Nrf2 e sua possível modulação pela epigallocatequina-3 galato (EGCG).....	40
Figura 8: Representação fotográfica dos frutos do Murici (<i>Byrsonima crassifolia</i>).....	43
Figura 9: Obtenção dos extratos de murici com diferentes solventes.....	54
Figura 10: Degradação oxidativa da deoxirribose mediada pelo radical hidroxil.....	62
Figura 11: Cromatograma HPLC- MS com os compostos fenólicos presentes nos extratos de murici. Os números dos picos do cromatograma correspondem aos compostos da tabela 17.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Gradiente de eluição das fases móveis ao longo do tempo da análise dos carotenoides do murici.....	51
Tabela 2: Valores utilizados no planejamento experimental (Faixa de variação investigada dos fatores no planejamento composto central rotacional) para a extração de compostos antioxidantes.....	57
Tabela 3: Composição centesimal (g/100 g) do Murici.....	69
Tabela 4: Perfil de minerais (mg/100 g) do Murici.....	70
Tabela 5: Vitaminas antioxidantes do Murici.....	71
Tabela 6: Valores de fenólicos totais e IC ₅₀ dos extratos de murici obtidos com diferentes solventes.....	73
Tabela 7: Planejamento Fatorial 2 ² com ponto central, fenólicos totais (mg GAE*/100 mg resíduo seco) e IC ₅₀ (µg/mL) obtidos em função da relação massa volume, temperatura, tempo e concentração de acetona.....	75
Tabela 8: Estimativas de efeitos para a resposta fenólicos totais, Planejamento Fatorial 2 ² com ponto central.....	76
Tabela 9: Estimativas de efeitos para a resposta atividade antioxidante (IC ₅₀), Planejamento Fatorial 2 ² com ponto central.....	77
Tabela 10: Planejamento composto central rotacional, fenólicos totais (FT) (mg GAE*/100 mg resíduo seco) e IC ₅₀ (µg/mL) obtidos em função da relação massa volume, temperatura, tempo e concentração de acetona.....	79
Tabela 11: Regressão múltipla para ajuste do modelo quadrático aos dados de fenólicos totais de acordo com a tabela 10.....	80
Tabela 12: Regressão múltipla para ajuste do modelo quadrático aos dados da atividade antioxidante de acordo com a tabela 10.....	80
Tabela 13: Análise de variância (ANOVA) para a resposta fenólicos totais.....	81
Tabela 14: Análise de variância (ANOVA) para a resposta atividade antioxidante.....	81

Tabela 15: Condições ótimas, valores preditos e experimentais para fenólicos.....	87
Tabela 16: Condições ótimas, valores preditos e experimentais para AA.....	87
Tabela 17: Identificação dos compostos fenólicos dos extratos de murici por HPLC-ESI/MS.....	89
Tabela 18: Teores de ácido gálico e quercetina nos extratos de murici.....	91
Tabela 19: Atividade <i>scavenger</i> do radical ABTS ^{•+} pelos extratos de murici.....	92
Tabela 20: Atividade <i>scavenger</i> do radical peroxil pelos extratos de murici.....	95
Tabela 21: Concentrações dos extratos de murici necessárias para reduzir em 50% (IC ₅₀) o radical hidroxil/dano a 2-deoxirribose.....	97
Tabela 22: Concentrações dos extratos de murici necessárias para reduzir em 50% (IC ₅₀) o ânion superóxido.....	103
Tabela 23: Capacidade de redução do ferro (FRAP) por extratos de murici.....	108
Tabela 24: Índice de atividade antioxidante (IAA), utilizando o aparelho Rancimat®, do controle BHT e dos extratos de murici.....	110
Tabela 25: Efeito do extrato de murici na inibição da oxidação do β-caroteno pelo sistema modelo de cooxidação β-caroteno/ácido linoleico.....	112

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Superfície de resposta para a resposta fenólicos totais em função do tempo e da temperatura.....	83
Gráfico 2: Superfície de resposta para a resposta fenólicos totais em função da temperatura e da % de acetona.....	83
Gráfico 3: Superfície de resposta para a resposta fenólicos totais em função do tempo e da % de acetona.....	84
Gráfico 4: Superfície de resposta para a resposta fenólicos totais em função da temperatura e da relação massa/volume.....	84
Gráfico 5: Superfície de resposta para a resposta IC ₅₀ em função do tempo e da temperatura.....	85
Gráfico 6: Superfície de resposta para a resposta IC ₅₀ em função do tempo e da % de acetona.....	85
Gráfico 7: Superfície de resposta para a resposta IC ₅₀ em função da temperatura e da % de acetona.....	86
Gráfico 8: Superfície de para a resposta IC ₅₀ em função da % de acetona e da relação massa/volume.....	86
Gráfico 9: Efeito de diferentes concentrações de extratos de murici na degradação oxidativa da 2-deoxirribose.....	99
Gráfico 10: Efeito de diferentes concentrações de EDTA na degradação oxidativa da 2-deoxirribose na presença dos extratos de murici (320 µg/mL).....	100
Gráfico 11: Efeito do tempo de pré-incubação dos extratos de murici (A e B – 320 µg/mL) com o complexo Ferro-EDTA na degradação oxidativa da 2-deoxirribose.....	102
Gráfico 12: Efeito dos extratos de murici na atividade da enzima xantina oxidase.....	105
Gráfico 13: Curvas de descolorimento do β-caroteno na presença dos extratos de murici A e B e do padrão BHT.....	113

1. INTRODUÇÃO

O desequilíbrio entre moléculas antioxidantes e oxidantes, que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres, tem sido chamado de estresse oxidativo (Bianchi, 1999). Este tem sido relacionado com a fisiopatologia de diversas doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), tais como câncer, diabetes mellitus tipo 2, artrite reumatoide, choque hemorrágico, doenças cardiovasculares, catarata, disfunções cognitivas, aterosclerose e obesidade (Cerqueira et al., 2007).

Por outro lado, já foi reportado que o consumo de compostos bioativos com propriedades antioxidantes, como polifenóis, carotenoides e vitamina C, exerce impacto significativo sobre a saúde humana. Estudos clínicos e epidemiológicos têm demonstrado evidências de que os antioxidantes são elementos que contribuem para a baixa e significativa redução da incidência de DCNT encontradas em populações cujas dietas são ricas em alimentos fontes destes compostos (Liu, 2003; Scalbert et al., 2005).

O Brasil possui uma flora bastante diversificada, em toda a sua extensão, com vegetações de diferentes características e cujos princípios ativos são desconhecidos. A região Nordeste se destaca por produzir grande variedade de frutos tropicais, nativos e exóticos, com boas perspectivas para exploração econômica em decorrência de suas condições edafoclimáticas (Sacramento & Souza, 2000).

A determinação dos antioxidantes em frutas, hortaliças e sementes oleaginosas, produzidas e consumidas no Brasil são essenciais para avaliar

os alimentos-fonte de compostos bioativos e estimar sua ingestão pela população, além de descobrir novos vegetais funcionais, agregando valor comercial a alimentos até então de pouco uso alimentar (Faller & Fialho, 2009). Do ponto de vista de saúde pública, é importante identificar novos alimentos vegetais que possam prevenir a deficiência nutricional e as doenças crônicas.

O murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) é um fruto nativo do norte/nordeste brasileiro e que pode apresentar componentes funcionais importantes, como polifenóis e carotenoides, os quais atuam na regulação de importantes rotas metabólicas. Considerando que o hábito alimentar é um dos fatores determinantes para o estado de saúde ou doença de um indivíduo, investigar os mecanismos de ação antioxidante do murici pode gerar resultados importantes para o incentivo do consumo de alimentos que propiciem a diminuição do dano oxidativo, atuando, desse modo, na promoção da saúde humana.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MECANISMOS DE GERAÇÃO DE RADICAIS LIVRES

Radicais livres podem ser definidos como moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados no orbital atômico, constituindo espécies altamente reativas (Halliwell e Gutteridge, 1999). É importante salientar que existem também espécies reativas de oxigênio (ERO) ou nitrogênio (ERN) que não são radicalares. A formação destes radicais é um processo fisiológico e contínuo que ocorre no citoplasma, nas membranas celulares e nas mitocôndrias (principais geradoras de radicais livres) (Barbosa et al., 2010).

Mais de 95% de todo o oxigênio consumido durante o processo de obtenção de energia é reduzido à água por meio da adição de 4 elétrons, em reação catalisada pela citocromo oxidase. Durante o transporte de elétrons nas mitocôndrias, são geradas sucessivas espécies reativas, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($OH^{\bullet}$) (Cadenas & Davies, 2000) (Figura 1).

Figura 1: Processo simplificado de formação de espécies reativas de oxigênio por meio da adição de 4 elétrons e 4 íons de hidrogênio, formando água e liberando energia (Scheibmeir et al., 2005).

Em reações catalisadas por metais de transição, como ferro e cobre, o peróxido de hidrogênio e o superóxido podem formar o radical hidroxil, por meio das reações de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$) e Haber-Weiss ($\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$), respectivamente (Pollack & Leeuwenburgh, 2000).

O ânion superóxido ocorre em quase todas as células aeróbicas, mas embora seja permeável a membranas, é considerado pouco reativo em soluções aquosas (Vasconcelos et al., 2007). Já o radical hidroxil é considerado um dos radicais mais deletérios, com uma vida curta de 10^{-9} segundos (Valko et al., 2007). Este radical pode modificar as bases purínicas e pirimidínicas, levando à mutação do DNA. Além disso, é capaz de inativar várias proteínas, ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS), e iniciar a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (Campos & Yoshida, 2004). *“Este é um fenômeno complexo, iniciado pela abstração de um átomo de hidrogênio do grupo metileno posicionado entre duas bandas insaturadas na molécula lipídica, formando os radicais livres alcoxila ($\text{LO}\cdot$) e peroxila ($\text{LO}_2\cdot$) e peróxidos lipídicos”* (Campos & Yoshida, 2004) (Figura 2).

Espécies reativas também podem ser formadas endogenamente por meio da ação de NAD(P)H oxidases, xantina oxidase, mieloperoxidases (usam cloro como substrato e H_2O_2 como co-substrato para gerar espécies reativas), lipoxigenases (catalisam a oxidação dos ácidos graxos insaturados produzindo prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos) e óxido nítrico sintase (catalisa a oxidação de L-arginina à L-citrulina e óxido nítrico)

(Leopold & Loscalzo, 2009). Fatores externos, como poluentes, radiação gama, cigarro e praguicidas também contribuem para a produção de radicais livres no organismo (Elsayed, 2001).

Figura 2: Representação esquemática da peroxidação lipídica dos ácidos graxos da membrana celular (Campos & Yoshida, 2004).

Ressalta-se que, em baixas concentrações, estes radicais desempenham importantes funções biológicas, como produção de energia (ATP), fertilização do óvulo, ativação de genes (Barbosa et al., 2010). Além disso, podem exercer papel protetivo; neutrófilos, por exemplo, produzem radicais para atacar e destruir patógenos. No entanto, quando em excesso, estes radicais podem danificar moléculas, incluindo DNA, RNA, proteínas e lipídios, e trazer prejuízos para o organismo (Scheibmeir et al., 2005).

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO X DCNT

O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e as defesas antioxidantes do organismo. Pesquisas têm mostrado que está relacionado com o envelhecimento e com o surgimento ou agravamento de diversas DCNT, como aterosclerose, diabetes, obesidade e câncer (Stephens et al., 2009).

ERO podem oxidar a porção lipídica e proteica da lipoproteína de baixa densidade (LDL), aumentando seu reconhecimento pelo receptor *scavenger* dos macrófagos e, conseqüentemente, favorecendo o acúmulo descontrolado de LDL por estas células, o que contribui para a formação de células espumosas e, dessa forma, para a aterosclerose (Yamaguchi et al., 2002).

Além disso, estudos recentes observaram aumento do estresse oxidativo em obesos (Tinahones et al., 2009; Amirkhizi et al., 2010), o qual parece decorrer da hiperglicemia, hiperleptinemia, aumento de lipídios teciduais e níveis inadequados de defesas antioxidantes (Vincent & Taylor, 2006).

Associado a isso, o aumento da produção de ERO também pode aumentar a resposta inflamatória, ativando fatores de transcrição redox-sensíveis como o AP-1 e o NF-*kappa* B, os quais aumentam a expressão de genes envolvidos na síntese de citocinas inflamatórias e de moléculas de adesão celular (Higdon & Frei, 2003).

O diabetes mellitus também está fortemente associado ao estresse oxidativo. A hiperglicemia parece favorecer a formação de ERO por meio da

auto-oxidação da glicose, do citocromo P450 e NAD(P)H oxidase, sendo que a xantina oxidase tem sido implicada como a principal geradora de radicais no diabetes (Mazumder et al., 2012).

O estresse oxidativo também está associado com doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (Reed, 2011). Pamplona et al. (2005) detectaram, por exemplo, elevadas concentrações do peptídeo β -amilóide e de marcadores do dano oxidativo (malondialdeído, proteínas carboniladas, 8-hidroxiguanosina) no cérebro de pacientes com doenças de Alzheimer.

Radicais livres causam danos no DNA e prejudicam o sistema de reparo desta molécula. A oxidação do DNA por ERO gera 8-hidroxi-2-deoxiguanosine, um produto capaz de mutar o DNA e, assim, acelerar o envelhecimento e a carcinogênese. Neste sentido, ERO podem participar de diversos aspectos da progressão tumoral, por exemplo: proliferação celular (por meio da ativação da proteína quinase regulada por sinais extracelulares (ERK 1/2); evasão de apoptose (envolvendo ativação do NF- κ B e do fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) / Akt) e invasão de tecidos e metástase (com a secreção de metaloproteinase) (Sosa et al., 2013).

Ademais, já foi reportado na literatura relação entre o estresse oxidativo e as alergias (Matés et al., 2000), nefropatia, doenças oculares (Mazunder et al., 2012) e doenças inflamatórias intestinais (Pavlick et al., 2002). Dessa forma, a redução do estresse oxidativo parece ser uma alternativa preventiva ou terapêutica viável para estas patologias.

2.3 SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE

Considerando-se a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidas, os organismos aeróbios desenvolveram eficiente rede de defesa contra o estresse oxidativo. Neste sentido, vários antioxidantes agem de diferentes maneiras a fim de manter o equilíbrio redox *in vivo*. Antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que em pequenas concentrações é capaz de retardar ou inibir a oxidação do substrato (Halliwell, 1995).

Os antioxidantes podem ser classificados como antioxidantes preventivos, antioxidantes de “limpeza” e antioxidantes reparadores. Os preventivos agem na primeira linha de defesa com o intuito de evitar a formação de espécies reativas, por exemplo, por meio da quelação de metais como ferro e cobre. Os antioxidantes de “limpeza” (*scavenging*) removem os radicais livres rapidamente antes que estes ataquem as moléculas biológicas, como a enzima superóxido dismutase que converte H_2O_2 à água. Já os antioxidantes reparadores atuam na reparação dos danos causados, neutralizando resíduos e auxiliando na recuperação das funções, como as enzimas de reparo por excisão de bases e de nucleotídeos (DNA glicosilases e endonucleases). Além disso, alguns antioxidantes agem como sinalizadores celulares, regulando os níveis de compostos antioxidantes e enzimas (Niki, 2010). Já Ratnam et al. (2006) classificam os antioxidantes como enzimáticos e não enzimáticos (Figura 3).

Segundo Ratnam et al. (2006), a eficiência dos antioxidantes depende de fatores como: a) razão entre o número de radicais livres e o número e radicais sequestrados; b) destino dos radicais derivados dos antioxidantes;

c) interação com outros antioxidantes; d) concentração e mobilidade no organismo e e) biodisponibilidade.

Figura 3: Classificação dos antioxidantes em enzimáticos e não enzimáticos (Ratnam et al., 2006).

2.3.1 Antioxidantes enzimáticos

A) Superóxido dismutase (SOD)

Superóxido dismutase é a enzima que catalisa a dismutação do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio, por meio de sucessivas oxidações e reduções dos íons metálicos presentes no sítio ativo (Valko et al., 2006) (Figura 4). A diminuição da atividade desta enzima já foi associada com a progressão da retinopatia diabética em pacientes diabéticos (Naruse et al., 2013) e com o estresse oxidativo em mulheres com síndrome metabólica (Yokota et al., 2013).

B) Catalase (CAT)

Catalase é a enzima que protege as células por meio da catálise da decomposição do H_2O_2 a oxigênio molecular e água (Figura 4). Ocorre abundantemente no corpo, mas possui maior atividade no fígado, eritrócitos e pulmões. Por meio da eliminação do H_2O_2 , previne a formação do radical hidroxil, contra o qual não há sistema enzimático de defesa. Em endotélio de aorta humana, a superexpressão da catalase protegeu este tecido da apoptose causada pela LDL-oxidada (Lin et al., 2004) e inibiu a aterosclerose em ratos *knockout* para apolipoproteína E (Yang et al., 2004).

C) Glutathione peroxidase (GPx)

Glutathione peroxidase é uma seleno proteína que catalisa a decomposição de H_2O_2 ou um hidroperóxido ($ROOH$) à água, em um processo dependente da oxidação da glutathione (GSH) (Figura 4). Sua ação envolve adição de dois elétrons, reduzindo os peróxidos e formando selenoles ($Se-OH$). Dessa forma, eliminam os peróxidos, potenciais

substratos para reação de Fenton (Valko et al., 2006). Em células Caco2, o silenciamento gênico da GPx3 resultou em incremento na produção de ERO, no dano ao DNA e na apoptose (Barret et al., 2013).

D) Glutathiona redutase (GR)

A glutathiona oxidada (GSSG) possui ação oxidante devido à ligação dissulfeto de sua estrutura. Assim, a glutathiona redutase é de extrema importância para o sistema de defesa antioxidante já que catalisa a redução da glutathiona oxidada à glutathiona reduzida (GSH) (Barbosa et al., 2010) (Figura 4).

Figura 4: Vias de geração de radicais livres e sistema enzimático de defesa antioxidante (Biofiles, 2011).

2.3.2 Antioxidantes dietéticos

Os compostos antioxidantes obtidos da dieta complementam o sistema de defesa antioxidante. Pesquisas mostram que tais compostos podem atuar diretamente sobre os radicais livres ou podem modular, por exemplo, a atividade das enzimas antioxidantes.

A) Vitamina C

A vitamina C existe nos alimentos sob duas formas: a reduzida (ácido L-ascórbico) e a oxidada (ácido L-dehidroascórbico). A oxidação do ácido L-ascórbico é reversível, portanto, o ácido L-dehidroascórbico é facilmente reduzido a ácido ascórbico no organismo. Contudo, a hidrólise do ácido deidroascórbico é irreversível e gera o produto 2,3 diceto-L-gulônico, o qual não possui ação vitamínica (Decker & Clarkson, 2000; Rosa et al., 2007).

A atividade antioxidante desta vitamina deve-se a sua capacidade em doar facilmente um elétron, em um processo que envolve a formação do radical livre ascorbil (Rosa et al., 2007). No organismo, a vitamina C encontra-se como ascorbato, um poderoso agente redutor, solúvel em água, capaz de reduzir metais de transição (especialmente ferro e cobre). É considerada um excelente antioxidante *in vivo* porque converte as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em moléculas menos reativas e porque os derivados do ascorbato são pouco reativos (Barreiros et al., 2006).

Resumidamente, ERO e ERN oxidam a molécula de ascorbato, formando o radical ascorbil (pouco reativo). Este, prontamente sofre reação de desproporcionamento para formar ascorbato e deidroascorbato ou é reduzido de volta a ascorbato por uma NADPH semideidroascorbato redutase. Além disso, o produto da oxidação do ascorbato (deidroascorbato)

pode ser reduzido de volta a ascorbato pela glutatona ou oxidado irreversivelmente gerando oxalato e treonato (Figura 5).

Figura 5: Ciclo oxidativo da vitamina C (Barreiros et al., 2006).

A vitamina C age eficazmente contra os radicais superóxido, hidróperóxido, oxigênio singlete, ozônio, peroxinitrito e ácido hipocloroso. Além disso, atua como coantioxidante na regeneração do α -tocoferol a partir do radical α -tocoferoxil (Carr & Frei, 1999).

Rössig et al. (2001) verificaram redução nos níveis plasmáticos de micropartículas apoptóticas e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em pacientes com insuficiência cardíaca suplementados com vitamina C. Além disso, observou-se aumento da atividade das enzimas

superóxido dismutase e catalase em linfócitos de humanos suplementados com vitamina C (500 mg/dia/8 semanas) (Khassaf et al., 2003).

No entanto, na presença de metais oxidantes (como ferro e cobre), o ascorbato pode atuar como próoxidante, convertendo Fe^{3+} a Fe^{2+} , o qual reage com o oxigênio ou peróxido de hidrogênio gerando superóxido e hidroxil (Rietjens et al., 2002). Segundo Barreiros et al. (2006), a atividade antioxidante da vitamina C suplanta seu efeito próoxidante, uma vez que tais metais geralmente encontram-se ligados a proteínas de transporte ou armazenamento no organismo.

B) Carotenoides

“Os carotenoides são tetraterpenoides de 40 carbonos unidos por unidades opostas no centro da molécula.” (Uenojo et al., 2007). Estão divididos em duas classes: carotenos (possuem somente átomos de carbono e hidrogênio, por exemplo, licopeno e β -caroteno) e xantofilas (as quais possuem pelo menos um átomo de oxigênio, por exemplo, a luteína, a zeaxantina e a criptoxantina) (Tapiero et al. 2004). São sensíveis ao calor, luz, oxigênio, metais, peróxidos e às lipoxigenases (Jáuregui et al., 2011).

Seus efeitos biológicos incluem: indução de enzimas detoxificantes; estímulo às junções comunicantes do tipo “gap”; sinalização celular; ação pró-vitamina A e atividade antioxidante (Stall & Sies, 2005).

Nesta perspectiva, Kim et al. (2011) verificaram redução de malondialdeído (MDA) e de LDL-oxidada na aorta de porcos suplementados com luteína (0,1g/100g peso/12 semanas). Já em Barona et al. (2012), os níveis de luteína no sangue foram inversamente correlacionados com as

concentrações de LDL-oxidada em mulheres com síndrome metabólica. De forma semelhante, a suplementação com licopeno (10 ou 30 ou 50mg/kg/30 dias) resultou em diminuição sérica de LDL-oxidada e de MDA na aorta e aumento na atividade da SOD da aorta de ratos diabéticos (Zhu et al., 2011).

Geralmente, os carotenoides agem como antioxidantes por meio de três mecanismos básicos: 1) adição radicalar à cadeia do carotenoide; 2) abstração de hidrogênio do carotenoide e 3) transferência de elétrons (Polyakov et al., 2001).

Entre os vários radicais existentes, os carotenoides agem mais eficazmente contra o oxigênio singlete e os radicais peroxil (Stall & Sies, 2005). A eficácia destes compostos como antioxidante depende do número de duplas ligações conjugadas da molécula, assim, o licopeno é mais eficiente que o β -caroteno (Tapiero et al., 2004). Mortensen et al. (1997) observaram ainda a ação do licopeno, luteína, zeaxantina e astaxantina contra os radicais dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2\bullet$), sulfonil (RSO_2^-) e tiil (RS^-).

É importante salientar que sob elevada pressão de oxigênio e em altas concentrações, os carotenoides podem atuar como próoxidantes. Além disso, na presença de íons ferro o efeito próoxidante pode ser incrementado com concomitante redução da oxidação do carotenoide e redução de sua atividade “*scavenging*” (Polyakov et al., 2001).

C) Vitamina E

Vitamina E compreende o grupo dos tocoferóis e dos tocotrienóis, os quais existem em quatro formas isoméricas (α , β , γ , δ), sendo o α -tocoferol o mais abundante em frutos (Van Acker et al., 1993).

É considerada o maior antioxidante lipossolúvel, o qual atua como *scavenger* de radicais livres, doando hidrogênio para o radical peroxil e inibindo a peroxidação lipídica. Após este processo, o tocoferol é inativado e o radical tocoferoxil é gerado (Brigelius-Flohé, 2009). Buscando evitar a desativação desta molécula, as células dispõem de um mecanismo sinérgico de regeneração da vitamina E com o ascorbato nas membranas celulares e com a ubiquinona na membrana mitocondrial (Figura 6) (Barreiros et al., 2006). Além disso, a vitamina E também atua contra o ânion superóxido, oxigênio singlete e o radical hidroxil (Vasconcelos et al., 2006).

Os hidroperóxidos lipídicos, quando formados, podem gerar aglomerados que criam poros nas membranas através dos quais qualquer substância é capaz de difundir-se para dentro da célula. No final, a membrana lipídica pode perder sua funcionalidade (Van Acker et al., 1993).

Ademais, o α -tocoferol foi capaz de aumentar a expressão de enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GPx) e reduziu os níveis de proteínas carboniladas em ratos com linfoma; tais efeitos foram correlacionados com a redução do crescimento do tumor (Sharma & Vinayak, 2013). Segundo Nakamura & Omaye (2009), a modulação da expressão destas enzimas ocorre via fatores de transcrição redox-sensíveis (PPAR γ e NF-*kappa* B). Já Islam et al. (2000) verificaram diminuição da susceptibilidade da LDL à

oxidação em pacientes renais hemodialisados suplementados com α -tocoferol.

Assim como os carotenoides e a vitamina C, tocoferóis e tocotrienóis podem exercer efeito próoxidante. Isso porque o radical tocoferoxil é capaz de propagar a lipoperoxidação. Contudo, se a rede de antioxidantes/oxidantes estiver em equilíbrio, este efeito é inibido (Rietjens et al., 2002).

Figura 6: Ação antioxidante da vitamina E na peroxidação lipídica* e sua regeneração pela vitamina C.

*A formação do radical inicial, formado quando há abstração de hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), pode ser desencadeada por luz, calor, metais e radicais livres. A subsequente reação do radical lipídico com o oxigênio forma o radical peróxido, que se não for eliminado pela vitamina E, propaga a reação em cadeia de lipoperoxidação. O tocoferol até poderia reagir com o radical lipídico, mas essa reação é fisiologicamente difícil em virtude da elevada velocidade de reação entre $\text{L}^\bullet$ e o oxigênio e devido às altas concentrações de oxigênio molecular (Brigelius-Flohé, 2009). A oxidação do tocoferol por pelo radical peróxido gera o radical tocoferoxil, o qual é reduzido a tocoferol pelo ascorbato.

D) Minerais

Zinco e selênio são os mais importantes minerais que participam do sistema de defesa antioxidante. O zinco é capaz de inibir a atividade da NAD(P)H oxidase e de neutralizar radicais hidroxil, além de ser co-fator da enzima SOD. Já o selênio faz parte de muitas proteínas, entre elas a glutathione peroxidase e a tioredoxina redutase (Catania et al., 2009).

Magalhães et al. (2011) encontraram correlação positiva entre as concentrações de zinco eritrocitário e a atividade da SOD em pacientes hemodialisados e em indivíduos saudáveis. Semelhantemente, Lima et al. (2011) também verificaram esta correlação em pacientes com diabetes tipo 2. No estudo de Cominetti et al. (2012), a suplementação com castanha do Brasil (1castanha/dia/8 semanas), a qual continha 290µg de selênio, resultou em aumento sérico do selênio e em incremento da atividade da GPx. Além disso, a suplementação com selênio (0,5mg/kg/30 dias) reduziu os níveis de MDA e de proteínas carboniladas no córtex cerebral de ratos tratados com dimetoato (pesticida) (Amara et al., 2011).

E) Polifenóis

Polifenóis são um importante grupo de fitoquímicos originados naturalmente do metabolismo secundário de plantas. Estão envolvidos no crescimento e reprodução dos vegetais, na pigmentação e como agentes que oferecem resistência a patógenos e a condições de estresse (Bravo, 1998). São conhecidas mais de 8000 estruturas de compostos fenólicos, os quais podem ser classificados, quanto à sua estrutura química, em

flavonóides, ácidos fenólicos, amidas fenólicas e polifenóis não-flavonóides (Tsao, 2010).

Os ácidos fenólicos, os quais estão divididos em ácidos benzóicos (gálico, vanílico, siríngico) e cinâmicos (p-cumárico, caféico, ferúlico, sináptico) contêm um anel aromático com pelo menos um grupo hidroxila e com diferentes grupos funcionais (aldeídos, álcoois ou ácidos) que podem formar ésteres com os ácidos orgânicos ou se ligarem a açúcares (Manach & Donovan, 2004). Os flavonóides são formados por dois anéis aromáticos unidos por um heterociclo oxigenado. Dependendo do padrão de hidroxilação e das variações no anel aromático, podem ser divididos em flavanóis (catequina, epicatequina), flavonas (apigenina, luteolina), flavonóis (quercetina, campferol, miricetina), flavanonas (hesperidina, narigenina), antocianidinas (cianidina, pelargonidina, delphinidina, malvidina, peonidina) e isoflavonas (genisteína, daidzeína) (Lima, 2008). Já as amidas fenólicas, possuem um nitrogênio como substituinte funcional; pertencem a esse grupo os capsaicinóides (encontrada na pimenta) e a avenantramida (presente na aveia). Os polifenóis não flavonóides incluem ainda os estilbenos (resveratrol), o ácido elágico, lignanas, curcumina, ácido rosmarínico e taninos (proantocianidinas) (Tsao, 2010).

Estão presentes em uma grande variedade de frutas, hortaliças e chás. Contudo, fatores como cultivar, condições climáticas, solo, sítio de produção, fertilizantes, sistema de irrigação e grau de maturação influenciam diretamente nos teores de polifenóis nos alimentos (Shi et al., 2003).

Nos últimos anos, o consumo de polifenóis na dieta humana tem sido associado com a redução da incidência e agravamento de DCNT. Os mecanismos de ação não estão totalmente esclarecidos, mas polifenóis provavelmente modulam diversas vias metabólicas pelo menos, em parte, via ação antioxidante.

Já foi demonstrado que os polifenóis catequina, epicatequina, quercetina e resveratrol podem atuar diretamente contra as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, doando um elétron ou um átomo de hidrogênio (Číž et al., 2008).

Salienta-se que a atividade antioxidante destes compostos é influenciada por diversos fatores estruturais, como o número e a posição do grupo –OH, o tipo e a posição da glicosilação e o grau de impedimento estérico no sítio de abstração de H, assim, o potencial antioxidante pode diferir muito entre os diversos compostos (Vasconcelos et al., 2006).

Associada à atividade sequestrante, polifenóis podem quelar metais, como ferro e cobre, e assim inibir a formação de radicais livres por meio da reação de Haber–Weiss/Fenton (Rodrigo et al., 2011). Neste sentido, em células HepG2 e Jurkat (linhagem de linfoma), os fenólicos derivados do ácido cinâmico (trans-cinâmico, p-cumárico, ácidos cafeico e ferúlico) protegeram o DNA contra o dano oxidativo induzido por H₂O₂ em um processo mediado pela quelação intracelular do ferro (Kitsati et al., 2012).

Pesquisas ainda sugerem que os polifenóis ingeridos provavelmente transferem seu potencial antioxidante para partículas de LDL, aumentando sua resistência à oxidação. Sorrenti et al. (2004) constataram *in vitro* a

redução na oxidação da LDL por extrato de laranja vermelha, quercetina, rutina, cianidina glicosilada e pelos ácidos ferúlico, cumárico e cafeico.

Além disso, diversos polifenóis têm demonstrado *in vitro* e *in vivo* a capacidade de modular enzimas antioxidantes. Nesta perspectiva, catequina e epicatequina (23mg/kg/10 dias) incrementaram a atividade da SOD em ratos (Simos et al., 2012). Em adipócitos 3T3-L1 tratados com TNF- α , catequina e ácido p-cumárico retardaram o aumento na produção de ERO e incrementaram a atividade das enzimas SOD e GPx e os níveis de glutathione (Yen et al., 2011). Em ratos com dano neuronal (modelo de doença de Alzheimer), o hidrato de catequina (10mg/kg/21 dias) resultou em diminuição dos níveis de TBARS, TNF- α , IL-1 β e aumentou os níveis de glutathione e a atividade da GPx e catalase no hipocampo e no córtex cerebral (Ahmed et al., 2013).

A modulação das enzimas antioxidantes por polifenóis parece ocorrer via ativação do fator de transcrição "*Nuclear factor-E2-related factor*" (Nrf2) (Chuang & McIntosh, 2011; Palsamy & Subramanian, 2011). Em condições basais, o Nrf2 encontra-se no citoplasma ligado ao complexo repressor *Kelch-like ECH-associated protein 1* (KEAP-1), o qual promove ubiquitinação e degradação do Nrf2 no proteasoma. No entanto, em resposta ao estresse oxidativo ou eletrofílico, o Nrf2 dissocia-se do KEAP-1 e transloca-se para o núcleo onde se liga aos elementos de resposta antioxidante (ARE) ou elementos de resposta à eletrófilo (EpRE), ativando a transcrição de enzimas antioxidantes (Figura 7) (Chapple et al., 2012; Takaya et al., 2012). Em adição, o Nrf2 inibe a expressão de mediadores pró-inflamatórios por

meio da regulação de enzimas anti-inflamatórias, como a heme oxigenase-1 (HO-1) (Kim et al., 2010).

A ação dos polifenóis é dose-dependente, de modo que elevadas concentrações podem desencadear ação pró-oxidante. Segundo Vasconcelos et al. (2006), os flavonoides, por exemplo, podem exercer este efeito na presença de metais de transição e de peroxidases, gerando radicais aroxila e desencadeando a co-oxidação da glutatona.

Figura 7: Sinalização do Nrf2 e sua possível modulação pela epigallocatequina-3 galato (EGCG)* (Na & Surh, 2008).

* Formas oxidadas da EGCG podem conjugar-se com GSH e, assim, diminuir o nível de GSH celular, causando uma perturbação no estado redox, com subsequente ativação de quinases (fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e MAPKs (quinases reguladas por sinal extracelular (ERK), quinases c-Jun N-terminal (JNK) e as quinases p38), ou atuam diretamente com os resíduos de cisteína do Keap 1, os quais desencadeiam a fosforilação do Nrf2. Ambos os eventos podem facilitar a translocação do Nrf2. ERO também pode estimular a fosforilação de Nrf2.

2.4 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

Não existe um método padrão e universalmente aceito para extração dos compostos antioxidantes para fins de estudo de sua atividade. Os pesquisadores enfrentam vários problemas metodológicos devido à grande diversidade de compostos, o que lhes conferem diferentes propriedades físico-químicas, e sua alta susceptibilidade à oxidação (Angelo & Jorge, 2007). Este desafio é ainda maior quando se considera os padrões de polimerização dos polifenóis e a matriz alimentar em que estão inseridos (Tsao, 2010).

Muitos métodos concentram-se na extração dos polifenóis por se tratarem de substâncias abundantes nos alimentos e altamente efetivas como antioxidantes. Estes métodos geralmente baseiam-se no uso de solventes com distintas polaridades e no estudo do binômio tempo e temperatura. O rendimento final da extração vai depender da solubilidade dos fenólicos no solvente utilizado, do grau de polimerização e de suas interações com outros constituintes dos alimentos (Andreo & Jorge, 2006). Polifenóis livres podem ser extraídos com água ou com solventes polares, como metanol e acetona. Contudo, alguns polímeros podem exigir o uso de ácidos ou de enzimas, como a glicosidase (Tsao, 2010).

No estudo de Razali et al. (2012) o metanol foi o solvente com maior poder extrator de polifenóis de *Tamarindus indica* L., sendo superior aos solventes acetato de etila e hexano. Já Sulaiman et al. (2011) verificaram que a acetona 70% foi melhor que a água ou etanol 70% ou metanol 70% na extração de polifenóis de vegetais crus, como alface, pepino, hortelã, cebola e aipo.

Além disso, o uso de longos tempos e de temperaturas muito elevadas geralmente interferem negativamente no rendimento dos polifenóis (Moure et al., 2001). O contrário pode ocorrer, dependendo, mais uma vez, do tipo de polifenol e da matriz estudada. Thoo et al. (2010), por exemplo, conseguiram extração máxima de polifenóis de *Morinda citrifolia* (noni) utilizando etanol 40% a 65°C por 40 minutos. Por outro lado, Michiels et al. (2012) extraíram maiores quantidades de polifenóis de laranja, maçã e brócolis utilizando a mistura de solventes acetona/água/ácido acético (70/28/2, v/v/v), por 1 hora a 4°C, com a razão sólido:solvente de 1g/20mL.

A extração de polifenóis pode ser feita ainda com o uso de gases supercríticos, como o CO₂, sob condições críticas de pressão e temperatura. Isto possibilita a não liberação de resíduos tóxicos de solventes no ambiente, entretanto, é um método que exige equipamentos sofisticados, elevando os custos do processo (Andreo & Jorge, 2006). Ribeiro et al. (2001), por exemplo, utilizaram CO₂ supercrítico para extração de antioxidantes de erva-cidreira (*Melissa officinalis*, L.). Além disso, alguns estudos também já foram desenvolvidos usando sistemas de ultrafiltração (Nawaz et al., 2006) e de micro-ondas (Li et al., 2011).

Nesta perspectiva, o uso da metodologia de superfície de resposta torna-se uma ferramenta útil e valiosa no campo da extração de antioxidantes. O planejamento fatorial permite o estudo da interação dos vários fatores que interferem na extração dos polifenóis, minimizando custos e maximizando o rendimento da extração. As vantagens ainda incluem: redução do número de experiências/repetições; análise simultânea dos

resultados; otimização de mais de uma resposta e cálculo do erro experimental (Rodrigues & Iemma, 2005).

2.5 MURICI (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth)

Byrsonima crassifolia (L.) Kunth pertence à família Malpighiaceae, gênero *Byrsonima*, o qual possui mais de 150 espécies (Vieira et al., 2010). Geralmente, ocorre nas regiões Amazônia, Nordeste e Planalto Central, em vegetação campestre, cerrado, duna e savana, sempre em solo bem drenado (Lorenzi, 2009).

O murici tem sido utilizado pela população como alimento ou como agente terapêutico, por sua ação cicatrizante e anti-inflamatória (Gusmão et al., 2006). Quando maduro, o murici possui a casca e a polpa suculenta, com coloração amarelo intenso, sabor adocicado e cheiro característico (Figura 13). A polpa é carnosa e macia, podendo ser consumida *in natura* ou sob a forma de sucos, geleias, sorvetes e licores (Alves & Franco, 2003).

Figura 8: Representação fotográfica dos frutos do Murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth).

O murici é uma boa fonte de energia, lipídios, fibras alimentares, cálcio (Silva et al., 2008) e de vitamina C ($84\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$) (Vieira et al., 2010). Estudos mostram que o murici também possui componentes antioxidantes, como os compostos fenólicos e carotenoides (Barreto et al., 2009). Associado a isso, algumas pesquisas sugerem que folhas de murici têm propriedade antimutagênica, devido à presença de taninos, flavonoides e terpenoides que protegeriam as células contra danos e modificações oxidativas no DNA (Mendanha et al., 2010).

Considerando-se a afeição dos mercados interno e externo por sabores exóticos, o murici apresenta grande potencial de aproveitamento e expansão na culinária brasileira. Tais características exóticas, como o sabor (gosto e aroma), tornam-no, na forma *in natura* e processada, candidato, em potencial, a exportações, bem como alternativa para geração de renda no mercado interno.

Além disso, tem-se explorado as possíveis atividades biológicas desta planta. Em extratos de folha de *Byrsonima crassifolia*, por exemplo, já foram identificados os compostos quercetina 3-O-xilosideo, rutina, quercetina e hesperidina, os quais foram correlacionados com o efeito antidepressivo *in vivo* (Herrera-Ruiz et al., 2011). Em outro estudo, este extrato foi capaz de inibir a formação de ERO em fibroblastos expostos à irradiação ultravioleta (Souza et al., 2012b). Já o extrato lipofílico de casca de *Byrsonima crassifolia* atuou como anti-inflamatório em modelo animal de dermatite (Maldini et al., 2009).

No estudo de Souza et al. (2008), o extrato metanólico dos frutos do murici apresentaram 2,9 mg de polifenóis/ g matéria seca e 0,2 mg/g de flavonoides. Este extrato aumentou a resistência da LDL à oxidação, embora tenha apresentado baixa atividade *scavenger* do radical peroxil.

Já o extrato hexânico de sementes de *Byrsonima crassifolia* inibiu a inflamação aguda e crônica em ratos, em um processo relacionado com a redução na produção de óxido nítrico. Esta atividade anti-inflamatória foi comparável aos padrões anti-inflamatórios, como a indometacina, dexametasona e diclofenaco de sódio (Muniz Ramirez et al., 2013).

Em modelo animal de diabetes, o extrato hexânico do murici reduziu as concentrações de glicose (efeito hipoglicêmico), incrementou a atividade da SOD e catalase hepáticas, restaurou as concentrações de glutathione e reduziu as concentrações TBARS, colesterol total e triacilgliceróis (Perez-Gutierrez et al., 2010). No estudo de Malta et al. (2012), o extrato etanólico do murici (que continha ácido ferúlico e resveratrol) apresentou atividade antimutagênica *in vivo*. Além disso, já foi relatada a ação do extrato acetônico do murici contra o peroxinitrito (Gordon et al., 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Investigar os mecanismos de ação antioxidante de extratos de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar o murici quanto à composição centesimal, minerais e vitaminas antioxidantes;
- Padronizar um método de extração dos compostos fenólicos dos frutos do murici usando Metodologia de Superfície de Resposta;
- Identificar e quantificar os principais compostos fenólicos dos extratos de murici;
- Determinar a atividade *scavenger* dos radicais livres ABTS, peroxil, hidroxil e superóxido pelos extratos de murici;
- Avaliar o efeito dos extratos de murici sobre a atividade da enzima xantina oxidase;
- Avaliar a capacidade de redução do ferro pelos extratos de murici;
- Determinar o efeito dos extratos de murici na oxidação lipídica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

Os frutos do murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) foram obtidos de produtores rurais, em Araiozes, Maranhão, Brasil. Os frutos foram selecionados, higienizados, congelados e transportados para o Laboratório da Universidade de São Paulo – USP. Os frutos foram acondicionados em sacos de polietileno com revestimento de folha de alumínio para impedir a passagem da luz, sendo fechados por pressão e armazenados a -20 °C até o momento das análises.

4.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E FIBRAS

Os teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e fibras alimentares foram determinados conforme métodos descritos pela AOAC (2005). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

- Umidade: determinada gravimetricamente em estufa a 105°C;
- Cinzas: obtidas por incineração da matéria orgânica a 550°C;
- Proteínas: determinadas pelo método de micro-Kjeldhal, o qual envolve digestão, destilação e titulação. Neste método, determinou-se o teor total de nitrogênio na amostra, a partir do qual calculou-se a concentração de proteína. O fator de conversão utilizado foi 5,75;
- Lipídios: a extração dos lipídios foi feita à quente com éter de petróleo pelo método de Soxhlet.
- Fibras totais, insolúveis e solúveis foram determinadas pelo método enzimático-gravimétrico.

O teor de carboidratos disponíveis foi estimado por diferença, a partir de 100 g do produto e a soma dos valores encontrados para umidade, cinzas, lipídeos, proteínas e fibras (AOAC, 2005).

4.3 PERFIL DE MINERAIS

Os minerais cálcio, ferro, zinco, magnésio, cobre, manganês, fósforo, potássio e sódio foram determinados por Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma indutivamente Acoplado (EOS-ICP), modelo Cirus Vision, Marca Spectro, segundo método proposto por Bataglia (1983). Para a análise do selênio, foi acoplado ao ICP um gerador de hidretos. Esta análise foi realizada no Laboratório de Fertilidade de Solo e Nutrição Vegetal, Paracatu, Minas Gerais, Brasil.

4.4 DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS ANTIOXIDANTES

4.4.1 Determinação de vitamina C

O conteúdo de ácido ascórbico (AA) e ácido dehidroascórbico (DHA) foi determinado segundo os métodos propostos por Cardoso et al. (2011a); Cardoso et al. (2011b) e Campos et al. (2009), com algumas modificações.

As frutas (cerca de 1g) foram despulpadas e homogeneizadas em turrax com 5 mL de água Milli-Q. Em seguida, foram adicionados 15 mL de solução de extração (3% ácido metafosfórico, 8% ácido acético, ácido sulfúrico 0,3N e EDTA 1mM). A mistura foi agitada em vórtex por 2 minutos e centrifugada a 1789 g/15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e diluído com água Milli-Q em balões de 25 mL. Desta diluição foram coletados 2 mL, os quais foram filtrados (filtro de 0,45nm) e armazenados em vial âmbar a 5°C até o momento da análise cromatográfica.

O ácido dehidroascórbico foi determinado por meio da diferença entre o conteúdo total de AA (após conversão de DHA à AA) e o conteúdo original de AA (antes da conversão à DHA). A 1 mL do extrato de murici foi adicionada 2,5 mL de uma solução de tampão trizma 0,5 M pH 9,0 com Ditioneitol (DTT) 40 mM, até o pH ficar entre 5,5-6,0. Em seguida, a amostra ficou em repouso, ao abrigo da luz, por 10 minutos. Após este período, foram adicionados 3 mL de ácido sulfúrico 0,4 M até a amostra atingir pH 3,0. O extrato foi filtrado (filtro de 0,45µm) e armazenado em vial âmbar sob refrigeração (5 °C) até o momento da análise cromatográfica. Todo o processo de extração foi feito ao abrigo da luz.

As análises foram feitas em sistema HPLC utilizando o cromatógrafo líquido Shimadzu modelo LC-20 AT, equipado com injetor automático SIL-20AC, controlador CBM-20A, forno de coluna CTO-20A e detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A, utilizando a coluna ACE 5 C18 (250 x 4,0 mm, 5 µm). A fase móvel foi isocrática constituída de fosfato de sódio monobásico 1 mM ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$) e EDTA 1 mM, com pH 3,0 ajustado com ácido fosfórico. O fluxo da fase móvel era de 1mL/min e o volume de injeção foi de 20 µL.

A identificação do ácido ascórbico foi realizada com base no tempo de retenção e espectro de absorção UV, em comparação com o padrão de referência. A quantificação foi feita pelo DAD, por meio da construção de curvas de calibração externa de 6 pontos com o padrão ácido ascórbico a 245 nm (1 a 8 µg/mL, $R^2 = 0,9995$). Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico por 100 gramas de amostra.

4.4.2 Determinação de carotenoides

A extração e a quantificação dos carotenoides (β -criptoxantina, β -caroteno e luteína) foram realizadas de acordo com Sá & Rodriguez-Amaya (2004); Rodriguez-Amaya (2001) e Craft & Soares (1992), com modificações.

Inicialmente, as amostras de murici foram misturadas com acetona gelada e colocadas em ultrassom por 10 minutos. Em seguida, a mistura foi homogeneizada em turrax. O sobrenadante foi coletado e o resíduo lavado 8 vezes sucessivas com acetona, sempre ao abrigo da luz. A solução obtida foi então filtrada à vácuo e colocada em funil de separação com éter de petróleo, éter etílico e água. A solução contendo os carotenóides foi recolhida, evaporada em rotaevaporador a 30 °C e o resíduo ressuspensionado em 2 mL de fase móvel. Este foi filtrado com filtro para seringa 0,22 μ m (Millipore) e colocado em vial âmbar para injeção. O volume de injeção foi 20 μ L.

A análise dos carotenoides do murici foi realizada em sistema HPLC, utilizando o cromatógrafo líquido Shimadzu modelo LC-20 AT, equipado com injetor automático SIL-20AC, controlador CBM-20A, forno de coluna CTO-20A e detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A, utilizando a coluna ACE 5 C18 (250 x 4,0 mm, 5 μ m).

A fase móvel era constituída de acetonitrila (ACN) grau HPLC (A): metanol (B): acetonitrila + 0.05% trietilamina (C): acetato de etila (C). Os solventes foram filtrados com membrana 0,45 μ m e desgaseificados em

ultrassom antes de serem acoplados ao sistema cromatográfico. A programação do gradiente encontra-se na tabela 1.

A identificação dos carotenoides foi realizada com base no tempo de retenção e espectro de absorção UV, em comparação com os padrões de referência. A quantificação foi feita pelo DAD, por meio da construção de curvas de calibração externa de 6 pontos com os respectivos padrões: β -caroteno a 452 nm (0,88 a 3,67 $\mu\text{g/mL}$, $R^2 = 0,9999$), β -criptoxantina a 450 nm (0,02 a 0,17 $\mu\text{g/mL}$, $R^2 = 0,9986$) e luteína a 446 nm (2,90 a 17,25 $\mu\text{g/mL}$, $R^2 = 0,9978$).

Tabela 1: Gradiente de eluição das fases móveis ao longo do tempo da análise dos carotenoides do murici.

Tempo (min)	Solvente
0 - 43 min	60% ACN + 0.05% trietilamina 20% metanol 20% acetato de etila
43,1 min – 45 min	40% acetato de etila 60% ACN + 0.05% trietilamina
45,1 – 53 min	40% acetato de etila 60% ACN + 0.05% trietilamina
53,1 – 55 min	60% ACN + 0.05% trietilamina 20% metanol 20% acetato de etila
55,1 – 60 min	60% ACN + 0.05% trietilamina 20% metanol 20% acetato de etila

O valor de vitamina A foi estimado de acordo com os fatores de conversão relatados pelo Institute of Medicine (IOM) (2001), onde cada

Equivalente de Atividade de Retinol (RAE) corresponde a 1µg de retinol ou 12 µg de β-caroteno em mistura de alimentos ou 24 µg de outros carotenóides pro-vitamínicos.

4.4.3 Determinação de tocoferóis (Vitamina E)

A determinação dos isômeros de tocoferóis (α, β, γ, δ-tocoferol) foi realizada no Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL, Campinas, São Paulo, Brasil, segundo Brubacher et al. (1985).

As amostras de murici foram pesadas, homogeneizadas com hexano e saponificadas com hidróxido de potássio. A identificação dos tocoferóis foi feita por comparação dos tempos de retenção e espectro de absorção da amostra com os padrões de referência. A quantificação foi realizada por padronização externa com injeção da mistura dos padrões analíticos as concentrações 0,0017 mg/mL para alfa-tocoferol, 0,00228 mg/mL para beta-tocoferol, 0,00233 mg/mL para gama-tocoferol e 0,00238 mg/mL para delta-tocoferol. As condições cromatográficas usadas foram: bomba isocrática Lab. Alliance, modelo RAD PUMP III, série 241205 -12W-B30, detector de fluorescência Waters, modelo e nº série 2475, fluxo 1,5 ml/min, excitação 294 nm e emissão 326 nm, coluna de sílica 125 x 4 mm, fase móvel constituída de hexano: acetato de etila e isopropanol (98,8: 1,2: 0,2).

O valor de vitamina E, expresso como Unidades Internacionais (UI), foi calculado de acordo com o fator de conversão reportado pelo Institute of Medicine (IOM) (2000), onde cada miligrama de alfa-tocoferol corresponde a 1,49 UI de alfa-tocoferol.

4.5 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DO MURICI POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

As variáveis resposta escolhidas para medir a capacidade antioxidante do extrato de murici foram: o teor de fenólicos totais (método de Folin) e o IC₅₀ do radical DPPH. Isso porque os polifenóis são os principais compostos relacionados com a atividade antioxidante de vegetais e também pelas inúmeras funções biológicas que podem exercer no organismo. Além disso, estes dois métodos são simples, práticos e baratos, sendo os mais utilizados na literatura.

A escolha do solvente constituiu o primeiro passo na extração dos antioxidantes. Na literatura, os solventes mais comumente utilizados são metanol, acetona e suas mistura com água. Dessa forma, inicialmente, foram realizados pré-testes com os solventes água e com as misturas dos solventes etanol:água (60:40), metanol:água (60:40) e acetona:água (60:40), a fim de verificar a mistura com maior capacidade para extração de compostos antioxidantes e, assim, decidir qual o solvente a ser empregado para otimização do processo de extração

Para o preparo dos extratos, foram pesados 2,5 g de murici (base úmida), o qual foi homogeneizado com o solvente (50 mL) em turrax por 1 minuto. Em seguida, a mistura foi submetida à agitação magnética por 1 hora, à temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 15000 g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e o volume completado para 50 mL (Figura 9).

Figura 9: Obtenção dos extratos de murici com diferentes solventes.

Os extratos foram analisados quanto ao teor de polifenóis e quanto à capacidade antioxidante pelo método DPPH.

A) Determinação dos compostos fenólicos totais

A dosagem dos compostos fenólicos totais presentes nos extratos foi realizada de acordo com Singleton & Rossi (1965), com adaptações. Em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (fundo plano, transparente, Greiner Bio-one GmbH), foram pipetados 120 µL de extrato da amostra convenientemente diluído e 50 µL de solução do reagente Folin-Ciocalteu diluído 5 vezes. Após agitação e incubação em temperatura ambiente por 3 minutos, foram pipetados 30 µL de solução de carbonato de sódio 200 g/L, seguido de incubação por 1 hora a 37°C e posterior leitura da absorbância em comprimento em 765 nm, utilizando-se o leitor de placas (modelo SpectraMax M5, Molecular Devices Inc.). Para o cálculo do teor de compostos fenólicos totais das amostras foi elaborada curva de calibração com o padrão ácido gálico em sete concentrações diferentes (0, 1, 2, 5, 10, 15 e 25 µg/mL; $R^2 = 0,9992$). Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico/100 mg resíduo seco. A quantificação do resíduo seco dos extratos foi determinada pelo método gravimétrico. Para isso, 1 mL do extrato foi transferido para vidro relógio, previamente tarado, e este foi colocado em estufa a 105°C, por 16 horas, seguido de resfriamento em dessecador e pesagem, sendo a operação repetida até peso constante, obtendo então o resíduo seco em mg/mL de extrato (AOAC, 1995).

B) Avaliação da capacidade antioxidante pelo ensaio do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Esta técnica está baseada na capacidade do radical DPPH em reagir com doadores de hidrogênio (antioxidantes). O antioxidante da amostra reduz o DPPH ao ceder um átomo de hidrogênio, produzindo mudança da coloração violeta para amarelo (Brand-Williams et al., 1995). Neste ensaio, foi utilizado o método proposto por Fukumoto & Mazza (2000), com algumas modificações. Em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (fundo plano, transparente, Greiner Bio-one GmbH), foram pipetados 200 µL de DPPH (150 µmol/ L) e 20 µL do extrato em diferentes diluições. Para o branco, foram pipetados apenas 200 µL de metanol e, para o controle, 200 µL de DPPH (150 µmol/ L) e 20 µL de metanol. A absorbância foi mensurada no comprimento de onda de 515 nm, após 30 minutos da reação no escuro, utilizando-se o leitor de placas (modelo SpectraMax M5, Molecular Devices Inc.).

A % de inibição foi calculada pela fórmula abaixo (equação 1). A atividade antioxidante foi expressa em IC₅₀ (concentração do extrato necessária para reduzir 50% do radical DPPH).

Equação 1:

$$\% \text{ de inibição: } \frac{\text{Abs. Controle} - \text{Abs. Amostra}}{\text{Abs. Controle}} \times 100$$

Com base nos resultados com os diferentes solventes, procedeu-se o processo de otimização de extração dos compostos antioxidantes por Metodologia de Superfície de Resposta. Foram escolhidas como variáveis

independentes do processo: tempo (minutos), temperatura (°C), relação massa: volume (m/v - mg/mL) e concentração do solvente (%). Foi realizado planejamento para as 4 variáveis, 2^4 , mais 8 ensaios axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 27 ensaios (Rodrigues & lemma, 2005). Os valores utilizados nos ensaios do planejamento estão apresentados na tabela 2. As variáveis dependentes estudadas foram teor de polifenóis e a atividade antioxidante avaliada pelo sequestro do radical DPPH.

Tabela 2: Valores utilizados no planejamento experimental (Faixa de variação investigada dos fatores no planejamento composto central rotacional) para a extração de compostos antioxidantes.

Variáveis	Níveis*				
	-2	-1	0	+1	+2
m/v (mg/mL)	-	20	60	100	140
Tempo (minutos)	0	40	80	120	160
Temperatura (°C)	10	25	40	55	70

Variáveis	Níveis*				
	-1,33	-1	0	+1	1,66
% Solvente	10	20	50	80	100

*Os níveis da relação massa/volume foram calculados pela fórmula $x = m/v - 60/40$; para o tempo, $x = \text{tempo} - 80/40$; para temperatura, $x = \text{temperatura} - 40/15$ e para % acetona, $x = \% \text{ acetona} - 50/30$.

Para descrição do processo foi empregada uma equação polinomial obtida por meio da análise de regressão múltipla do efeito das variáveis independentes nas variáveis resposta. O planejamento foi executado aleatoriamente.

As condições ótimas (tempo, temperatura, relação massa:volume e % solvente) de extração definidas por meio deste processo foram usadas para

o preparo dos extratos de murici utilizados na avaliação dos mecanismos de ação antioxidante e na identificação e quantificação dos polifenóis.

4.6 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO MURICI POR HPLC-ESI/MS

As análises do perfil de compostos fenólicos do extrato de murici foram realizadas em cromatógrafo líquido Agilent modelo 1200 SL, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) e espectrômetro de massas quadrupolo com fonte de íons eletrospray à pressão atmosférica (API-ESI), modelo Agilent 6150.

Foi utilizada coluna Agilent Zorbax SB-C18 (50 x 2,1 mm, 1.8 μ m) e fase móvel constituída de ácido fórmico 0,1% (v/v) em água deionizada (A) e acetonitrila grau HPLC com 0,1% de ácido fórmico (B). Os solventes foram filtrados com membrana 0,45 μ m e desgaseificados em ultrassom antes de serem acoplados ao sistema cromatográfico. A programação do gradiente foi a seguinte: 5% B até 0,5 min, 25% B até 10 min (mantendo até 13 min), 80% B até 13,5 min (mantendo até 15,5 min). A coluna foi re-equilibrada por 14 minutos a 5% B. O fluxo de fase móvel foi mantido em 300 μ L/min, a temperatura da coluna a 45°C e volume de injeção das amostras 10 μ L.

As condições do espectrômetro de massas foram: voltagem na fonte de ionização -3000 volts (modo negativo), fluxo de gás secante (nitrogênio) a 9 L/min, temperatura na fonte de ionização 350 °C e pressão de nebulização (nitrogênio) a 35 psi.

Os extratos foram evaporados, reconstituídos com água mili-Q e filtrados com filtro para seringa 0,22 μ m (Millipore). A separação foi

otimizada com o extrato de murici. Soluções com os padrões disponíveis (ácido gálico, rutina, ácido ferúlico, hesperidina, narigenina, catequina, epicatequina, miricetina, ácido cafeico, ácido p-cumárico e quercetina), foram então injetadas para elaboração de biblioteca dos espectros UV com os dados do detector de arranjo de diodos e identificação dos fragmentos correspondentes no detector de massas. A molécula desprotonada e o fragmento mais intenso dos padrões e dos principais picos encontrados no extrato foram selecionados para análise do modo SIM (*single ion monitoring*) do espectrômetro de massas e divididos em diferentes sinais (cromatogramas), de acordo com o tempo de retenção e grupo de compostos.

A identificação dos compostos fenólicos foi realizada com os padrões de referência, no caso do ácido gálico e quercetina, sendo quantificados pelo espectrômetro de massas (modo SIM) através de curva de calibração externa de 5 pontos (2 a 60 µg/mL de ácido gálico a 280 nm; $R^2 = 0,9909$ e quercetina a 360 nm; $R^2 = 0,9989$). Todos os outros compostos foram tentativamente identificados pelos espectros de absorção UV (similaridade com os dos padrões disponíveis) e de massas, além da ordem de eluição, com base nos resultados descritos na literatura (Gordon et al. 2011).

4.7 MECANISMOS DE AÇÃO ANTIOXIDANTE

4.7.1 Determinação da atividade *scavenger* do radical ABTS^{•+}

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método do radical ABTS^{•+} [2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico], usou-se a metodologia descrita por Re et al. (1999), com modificações.

Inicialmente, preparou-se o radical ABTS^{•+} a partir da reação de 7 mM do sal ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio, os quais foram incubados à temperatura ambiente e na ausência de luz por 16 horas. Transcorrido esse tempo, a solução foi diluída em etanol até a obtenção de uma solução com absorvância de 0,70 nm ($\pm$ 0,01). Para realizar as análises, foram adicionados 10 μ L da amostra diluída a 200 μ L da solução contendo o radical. Após 6 minutos a 30 °C, determinou-se a 734 nm a absorvância em leitor de placas modelo SpectraMax M5, Molecular Devices Inc. Para o cálculo da capacidade antioxidante foi elaborada curva de calibração com o padrão trolox ($R^2 = 0,9947$). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em μ M de Trolox/grama de murici fresco.

4.7.2 Determinação da atividade *scavenger* do radical peroxil

A atividade *scavenger* do radical peroxil pelos extratos de murici foi avaliada pelo Oxygen radical absorbance capacity (ORAC), segundo Ou et al. (2001) e Prior et al. (2003), com modificações. ORAC é um método que se baseia na proteção de uma sonda fluorescente (fluoresceína - (3'',6''-dihidroxi[isoben''zofuran-1[3H],9''[9H]-xanten]-3-ona)) contra o ataque do radical peroxil, o qual é gerado pela reação do AAPH [dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)] com oxigênio atmosférico.

Em microplaca FLUOTRAC 200 com 96 cavidades (fundo plano, cor preta, Greiner BIO-one Brasil), foram pipetados 50 μ L de amostra diluída, 150 μ L de fluoresceína (93,54 nmol/L) e 50 μ L de AAPH (221 mmol/L). Para o branco e diluições foi utilizado tampão fosfato (75 mmol/L, pH 7,4). Para

as 3 soluções (branco, trolox e amostra) determinou-se a área sob a curva (AUC) pela expressão:

$$\text{AUC} = (0,5 + F5/ F0 + F10/ F0 + F15/ F0 + \dots + F60/ F0) \times 5$$

A fluorescência foi mensurada a 37°C, com excitação de 493 nm e emissão de 515 nm, durante 60 minutos a cada 1 minuto, utilizando-se o leitor de placas (modelo SpectraMax M5, Molecular Devices Inc.). Após a adição da amostra e condicionamento a 37°C, o caráter antioxidante da amostra protege a fluoresceína do radical livre, mantendo a fluorescência por tempo maior.

Para o cálculo da capacidade antioxidante das amostras foi elaborada curva de calibração com o padrão trolox (400 µmol/ L) nas concentrações 0; 2,5; 5; 10; 20; 30 e 40 µM ($R^2 = 0,9968$). Os resultados foram expressos em equivalentes de Trolox (µM)/g de extrato.

4.7.3 Avaliação da atividade *scavenger* do radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$):

ensaio de dano oxidativo à 2-deoxirribose

A formação do radical hidroxil, o qual é formado pela reação de Fenton, foi mensurada por meio da degradação da 2-deoxirribose (Halliwell et al., 1987). A reação é iniciada com o ascorbato, o qual reduz o íon ferro (Fe^{3+} - EDTA), gerando o complexo Fe^{2+} -EDTA. Este reage com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formando radicais hidroxil, o qual ataca a molécula de 2-deoxirribose. Esta, ao ser atacada pelos radicais, gera substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), especialmente malondialdeído – MDA, as quais são mensuradas espectrofotometricamente a 532 nm (Figura 10). É interessante observar que o EDTA forma um complexo com o ferro,

impedindo que este metal se complexe com a deoxirribose ou ascorbato, ou até mesmo se precipite. No entanto, não o indisponibiliza para reação de Fenton. Pelo contrário, o EDTA facilita a participação do ferro nesta reação de oxidação, gerando, assim, mais radicais (Chobot, 2010).

Figura 10: Degradação oxidativa da deoxirribose mediada pelo radical hidroxil (Filgueiras et al., 2009).

O meio reacional era inicialmente composto de tampão fosfato 10 mM - pH 7,2, deoxirribose 5 mM, FeCl_3 50 μM , EDTA 50 μM e extratos de murici em diferentes concentrações pré-incubados por 10 minutos (exceto quando o tempo de pré-incubação foi variado). A reação foi iniciada com a adição de H_2O_2 10 mM e ascorbato 1 mM. A reação foi conduzida em volume reacional de 0,5 mL em tubos plásticos do tipo Eppendorf a 37 °C por 30 minutos, sendo então finalizada pela adição de ácido fosfórico 4% e TBA 1%. Em seguida, a mistura foi aquecida a 95 °C por 15 minutos. Depois do resfriamento, uma alíquota de 200 μL foi transferida para microplaca de poliestireno com 96 cavidades (fundo plano, transparente, Greiner Bio-one GmbH) e realizada a quantificação espectrofotométrica do aduto $\text{TBA}_2\text{-MDA}$ em 532 nm em leitor de placas modelo SpectraMax M5, Molecular Devices Inc. Compostos antioxidantes, ao reagirem com o radical hidroxil, diminuem

a degradação oxidativa da 2-deoxirribose e, conseqüentemente, reduzem a formação de MDA, resultando em menor intensidade da coloração rosa.

A % de sequestro do radical hidroxil foi calculada segundo a equação 1. Para cada condição experimental foi realizado um controle negativo no qual o ascorbato foi adicionado ao meio reacional depois do ácido fosfórico e do TBA e um controle positivo (sem adição de extrato). A absorbância do controle negativo foi subtraída do valor final de cada leitura (Hermes-Lima et al., 2000). Os resultados foram expressos como IC₅₀ (concentração do extrato necessária para inibir 50% dos danos à deoxirribose).

4.7.4 Determinação da atividade *scavenger* do ânion superóxido (O₂^{•-})

A estimação da atividade *scavenger* do ânion superóxido foi realizada através do sistema hipoxantina-xantina oxidase, segundo Gaulejac et al. (1999). Neste método, a ação da xantina oxidase sobre a hipoxantina gera radicais superóxido, os quais reduzem o nitroblue tetrazolium - NBT (amarelo) a formazan (púrpura). Este é mensurado espectrofotometricamente a 560 nm. Os compostos antioxidantes, ao reagirem com estes radicais, inibem a produção do formazan (Alves et al., 2010).

O NBT 1mM foi preparado em tampão Tris-HCl 0,05 M/pH 7,4. A solução de hipoxantina 5 mM e xantina oxidase 1,67 U/mL também foram preparadas no mesmo tampão. Os extratos testados foram evaporados e reconstituídos com água mili-Q.

A solução controle continha 230 μL de tampão Tris, 10 μL de NBT, 50 μL de hipoxantina e 10 μL de xantina oxidase. As soluções teste eram compostas de 220 μL de tampão Tris, 10 μL de NBT, 50 μL de hipoxantina, 10 μL de xantina oxidase e 10 μL de extrato. Após 10 minutos de reação foram realizadas as leituras a 560 nm em leitor de placas modelo SpectraMax M5, Molecular Devices Inc.

A % de inibição também foi calculada segundo a equação 1. Para cada amostra foi realizado um branco o qual foi descontado do valor final das leituras. Os resultados foram expressos como IC_{50} (concentração do extrato necessária para reduzir 50% do ânion superóxido).

4.7.5 inibição da atividade da enzima xantina oxidase

A atividade da enzima xantina oxidase foi determinada por meio da formação de ácido úrico a partir da xantina, segundo Tung & Chang (2010) com pequenas modificações. Primeiramente, 100 μL de xantina oxidase (XOD) 0,1U/mL preparada em 100 mM de tampão pirofosfato de sódio/HCl, pH 7,5 e 20 μL dos extratos foram mixados e mantidos a 37°C por 5 minutos. Os extratos foram previamente evaporados em Centrivap e reconstituídos com água mili-Q. Em seguida, adicionou-se 50 μL de xantina (XAN) 0,6 mM. A mistura foi incubada à temperatura ambiente e a absorbância a 295 nm foi realizada após 8 minutos de reação em leitor de placas, modelo SpectraMax M5, Molecular Devices Inc. O controle era constituído da mistura xantina oxidase e xantina. O alopurinol foi usado como controle positivo. Foram realizadas triplicatas para cada teste.

A % de inibição foi calculada pela equação 1. Para cada amostra foi realizado um branco o qual foi descontado do valor final das leituras.

4.7.6 Capacidade de redução do ferro – FRAP

Este método baseia-se na capacidade dos antioxidantes reduzirem, em pH ácido, o complexo Fe^{3+} -Tripiridiltiazina (TPTZ) a Fe^{2+} -TPTZ, o qual apresenta coloração azul intensa e absorção máxima em 593 nm (Benzie & Strain, 1996).

Os ensaios foram conduzidos conforme descrito no comunicado técnico da Empresa Brasileira de Agropecuária – EMBRAPA (Rufino et al., 2006). Em tubos de 2 mL, foram adicionados 90 μL de água, 900 μL do reagente FRAP (preparado com 25 mL de tampão acetato 0,3 M – pH 3,6, 2,5 mL de TPTZ 10 mM em HCl 40 mM e 2,5 mL de cloreto férrico 20 mM) e 30 μL dos extratos em diferentes diluições. A mistura foi agitada e uma alíquota de 200 μL foi transferida para microplaca de poliestireno com 96 cavidades (fundo plano, transparente, Greiner Bio-one GmbH). Após 30 minutos de incubação a 37°C, realizou-se a medida da absorbância a 595 nm em leitor de placas, modelo SpectraMax M5, Molecular Devices Inc. Simultaneamente foi realizado um branco, o qual teve seu valor subtraído das absorbâncias finais. Para o cálculo da capacidade de redução do ferro pelas amostras foi elaborada curva de calibração com o padrão sulfato ferroso nas concentrações de 0,2; 0,4; 1,0; 1,4; 2,0 e 2,5 mM ($R^2 = 0,9999$). Os resultados foram expressos em μM de sulfato ferroso/mg extrato.

4.7.7 Inibição da oxidação lipídica - RANCIMAT[®]

O princípio deste método está na determinação da condutividade dos ácidos voláteis recuperados durante o processo de oxidação lipídica. Neste

ensaio, o tempo necessário para produzir um aumento da condutividade devido à formação dos ácidos voláteis determina um período de indução, que pode ser definido como uma medida da estabilidade de uma gordura ou óleo (Méndez et al., 1996). A adição de um antioxidante resulta na inibição da oxidação com consequente aumento do período de indução.

Para avaliar a capacidade protetora dos extratos de murici utilizou-se o aparelho Rancimat[®] 743, marca Metrohm, conectado ao programa PC: 743 Rancimat 1.0, onde foi medido o período de indução da oxidação lipídica da banha de porco. Os extratos foram colocados nos tubos do Rancimat[®] e evaporados sob atmosfera de nitrogênio. Em seguida, 3 g de banha de porco sem antioxidante foram adicionados em cada tubo. Depois, com a programação de temperatura de 110°C, $\Delta T = 1,5^\circ\text{C}$, fluxo de ar de 20 L/h, os tubos foram acoplados ao aparelho Rancimat[®], até que a curva de condutividade em relação ao tempo de indução (TI) fosse finalizada para se calcular o Índice de Atividade Antioxidante (IAA). Um controle foi também preparado com a banha de porco sem antioxidante. Os resultados foram expressos como Índice de Atividade Antioxidante (IAA), calculado pela fórmula:

$$\text{IAA} = \frac{\text{TI amostra}}{\text{TI controle}}$$

onde: TI amostra = tempo de indução (h) da banha de porco + extrato contendo a amostra. TI controle = tempo de indução (h) da banha de porco sem antioxidante. O BHT (butil hidroxi tolueno) foi usado como controle positivo.

4.7.8 Inibição da oxidação do β -caroteno: sistema modelo de cooxidação β -caroteno/ácido linoleico

Os testes foram conduzidos segundo Duarte-Almeida et al. (2006), com algumas modificações. Inicialmente, preparou-se a mistura reativa com 40 μ L de ácido linoléico, 200 mg de Tween 40, 20 μ L de solução de β -caroteno a 2 mg/mL em clorofórmio e 500 μ L de clorofórmio em erlenmeyer. Em seguida, a mistura foi submetida à completa evaporação do clorofórmio sob nitrogênio. A esta mistura, adicionou-se 65 mL de água oxigenada. A mistura reativa, assim preparada, apresentou-se límpida com absorvância entre 0,6 e 0,7 em 470 nm.

Em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (fundo plano, transparente, Greiner Bio-one GmbH) (Costar, Cambridge, MA) foram pipetados em cada cavidade 200 μ L desta mistura reativa e 40 μ L de metanol (controle) ou o mesmo volume para o padrão BHT ou extratos das amostras. A placa foi incubada a 50 °C por 2 horas. A reação foi monitorada espectrofotometricamente pela perda da coloração do β -caroteno em 470 nm. As absorvâncias foram realizadas imediatamente e com intervalos de 15 min, durante 120 min, em leitor de placas modelo SpectraMax M5, Molecular Devices Inc. As análises foram realizadas em triplicatas.

Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da oxidação, que foi calculada a partir da correlação do decaimento da absorvância da amostra em relação ao do controle, obtendo-se a porcentagem da inibição da oxidação (% I) usando a equação abaixo:

$$Ac = Abs \text{ inicial} - Abs \text{ final}$$

$$Aam = Abs \text{ inicial} - Abs \text{ final}$$

$$\% I = 1 - \frac{Aam}{Ac} \times 100$$

A eficiência dos extratos de murici como antioxidantes também foi expressa por meio dos fatores cinéticos (F1 e F2), os quais foram calculados segundo Yanishlieva & Marinova (1995). A relação entre as tangentes da curva do extrato e do controle entre 15 e 45 minutos representa a eficiência do antioxidante contra os radicais peróxidos (produtos primários) (F1) e a relação entre as tangentes da curva do extrato e do controle entre 75 e 105 minutos representa a eficiência do antioxidante contra os produtos secundários da oxidação.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão. Para modelagem do processo de extração de antioxidantes foi empregada regressão linear múltipla, adotando-se como válidos, após realização do teste “t de student” os coeficientes significativos diferentes de 0 e a equação resultante foi empregada para geração das superfícies de resposta. Essa análise foi realizada como o auxílio do *software* Statistica, versão 11. Para verificar diferenças entre as médias dos extratos foi realizada análise de variância ANOVA ONE-WAY para amostras independentes, ou “t de student” quando necessário.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E FIBRAS

Os resultados da determinação da composição centesimal e fibras do murici encontram-se na tabela 3.

Tabela 3: Composição centesimal (g/100 g) do murici

Composição*	Média** $\pm$ DP (%)
Umidade	74,35 $\pm$ 0,07
Cinzas	0,94 $\pm$ 0,01
Proteínas	0,68 $\pm$ 0,01
Lipídios	1,81 $\pm$ 0,03
Carboidratos disponíveis	4,31
Fibras Alimentar Total	17,91 $\pm$ 0,37
Fibras Alimentar Insolúvel	16,55 $\pm$ 0,36
Fibras Alimentar Solúvel	1,36 $\pm$ 0,12

*Valores expressos em base úmida. **Média de 3 repetições.
DP – Desvio Padrão

Observa-se que os frutos contêm elevada quantidade de água e baixas concentrações de proteínas, o que corrobora os resultados de Guimarães & Silva (2008) e Finco et al. (2012). Quanto aos lipídios, valores semelhantes foram encontrados por Silva et al. (2008). Considerando-se a recomendação da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2007), a qual recomenda o consumo de 20-30 g/fibras/dia, 100 g destes frutos fornecem 17,91 g de fibras alimentares. É importante destacar que do conteúdo total de fibras, 16,55 % são fibras insolúveis. Estas incluem a celulose, hemicelulose e lignina, as quais aumentam a saciedade e melhoram o trânsito intestinal (SPOSITO et al., 2007).

5.2 PERFIL DE MINERAIS

Quanto ao perfil de minerais, os resultados estão apresentados na tabela 4. Os minerais majoritários foram o potássio, seguido do cálcio e magnésio. O mineral selênio não foi detectado.

Tabela 4: Perfil de minerais (mg/100 g) do murici

Minerais*	Média ** $\pm$ DP
Cálcio	76,95 $\pm$ 2,20
Ferro	0,38 $\pm$ 0,06
Zinco	1,46 $\pm$ 0,09
Cobre	0,23 $\pm$ 0,03
Magnésio	35,91 $\pm$ 0,03
Fósforo	7,69 $\pm$ 0,86
Potássio	338,58 $\pm$ 5,01
Selênio	nd
Manganês	0,27 $\pm$ 0,01

*Valores expressos em base úmida. **Média de 3 repetições.

DP – Desvio Padrão.

nd – Não detectado (< limite de quantificação 0,0002mg/kg).

De forma semelhante, Almeida et al. (2009) encontraram 346,73 mg.100g⁻¹ de potássio, 88,75 mg.100g⁻¹ de cálcio e 7,69 mg.100g⁻¹ de fósforo no murici. Neste estudo, os frutos apresentaram maiores teores de ferro, cobre e magnésio. Além disso, os autores encontraram 2,36 mg.100g⁻¹ de selênio. Considerando-se a Ingestão Dietética Recomendada (RDA) (Institute of Medicine) para um homem adulto saudável, 100g de murici fornecem 7,69 % das necessidades diárias de cálcio, 4,7 % de ferro, 11,7 % de manganês, 13,3 % de zinco, 8,5% de magnésio e 7,2 % de potássio.

5.3 DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS ANTIOXIDANTES

Os teores de vitamina C (ácido ascórbico e deidroascórbico), carotenoides (luteína, β -caroteno e β -criptoxantina) e vitamina E (tocoferóis) encontram-se na tabela 5.

Tabela 5: Vitaminas antioxidantes do murici.

Vitaminas Antioxidantes*	Média** $\pm$ DP
Vitamina C (mg/100 g)	57,41 $\pm$ 3,08
Ácido Ascórbico (mg/100 g)	35,42 $\pm$ 1,05
Ácido Deidroascórbico (mg/100 g)	21,99 $\pm$ 5,41
Carotenoides (μg/g)	329,55 $\pm$ 2,96
Luteína (μ g/g)	308,97 $\pm$ 6,04
β -caroteno (μ g/g)	16,78 $\pm$ 3,22
β -Criptoxantina (μ g/ g)	3,80 $\pm$ 0,12
Vitamina A (μg RAE 100 g-1)	155,66
Tocoferois (mg/100 g)	9,65 $\pm$ 0,12
α - tocoferol (mg/100 g)	6,49 $\pm$ 0,07
β -tocoferol (mg/100 g)	0,17 $\pm$ 0,01
γ -tocoferol (mg/100 g)	2,66 $\pm$ 0,07
δ -tocoferol (mg/100 g)	0,33 $\pm$ 0,02
Vitamina E (UI/100 g)	9,67

*Valores expressos em base úmida. **Média de 3 repetições. DP – Desvio Padrão

Os frutos do murici podem ser considerados boas fontes de vitamina C (57,41 mg/100g). Ao comparar este valor com a Ingestão Diária Recomendada (IOM, 2000), o consumo de 100 g de murici fornece 76,54 % da necessidade diária de vitamina C para uma mulher adulta e 63,78 % para um homem adulto. Este resultado contraria os valores encontrados por Almeida et al. (2011) (11,8 mg/100 g) e Finco et al. (2012) (17,45 mg/100 g).

No entanto, valores semelhantes (47,44 mg/100 g) foram reportados por Souza et al. (2012a) para polpa de murici.

Além disso, o murici contém boas quantidades de carotenoides, especialmente de luteína (308,97 µg/g), a qual representa 93,75 % do total de carotenoides. A luteína está presente naturalmente no epitélio da retina, estando relacionada com a prevenção da catarata e degeneração macular, possivelmente, por inibição de processos oxidativos (Mares-Perlman et al., 2002). Suas principais fontes são os vegetais verdes escuros, como couve e brócolis, além da gema do ovo e do milho, mas também pode ser encontrada em sementes de uva roxa, kiwi e abóbora (Sommerburg et al., 1998). O murici emerge como uma nova fonte de luteína.

Já os teores de β-caroteno (16,78 µg/g) estão acima dos valores normalmente encontrados em frutas como mamão (300 µg/100 g) e manga (1550 µg/100 g), mas são menores do que aqueles reportados para cenoura (5950 µg/100 g) (Campos & Rosado, 2005). Souza et al. (2012a) encontraram valores similares (1,25 mg/100g) em polpa de murici. Considerando-se a recomendação de ingestão de vitamina A (IOM, 2001), o consumo de murici (100 g) contribui razoavelmente para o fornecimento das necessidades diárias desta vitamina para um homem (17,29 %) e para uma mulher (22,23 %) adultos.

O murici também pode ser considerado uma boa fonte de vitamina E, pois seu consumo (100 g) satisfaz 43,26 % das necessidades diárias de um adulto saudável. Este é o primeiro trabalho que identifica e quantifica tocoferóis em frutos de murici.

5.4 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DO MURICI POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Os resultados obtidos para o teor de fenólicos totais (FT) e atividade antioxidante (AA) - método DPPH dos ensaios preliminares realizados para decisão do melhor solvente a ser empregado na otimização do processo estão na tabela 6. É possível observar que a acetona, na concentração de 60%, se revelou um solvente superior aos demais, pois, além de extrair a maior quantidade de polifenóis, também mostrou a maior capacidade antioxidante. Enquanto que a água foi o solvente mais ineficiente na extração destes compostos.

Tabela 6: Valores de fenólicos totais e IC₅₀ dos extratos de murici obtidos com diferentes solventes.

Solventes	Fenólicos totais (mg GAE*/100 mg extrato)	IC ₅₀ (µg/mL)
Água	8,79 ± 0,09 ^a	496,27 ± 8,53 ^a
Metanol 60%	20,92 ± 0,73 ^b	322,57 ± 10,24 ^b
Etanol 60%	18,06 ± 0,62 ^c	354,56 ± 6,99 ^c
Acetona 60%	27,94 ± 0,28 ^d	169,39 ± 10,62 ^d

*GAE: Equivalentes de Ácido Gálico

Letras diferentes na mesma coluna indicam que os extratos são estatisticamente diferentes (p < 0,05)

Estes resultados são concordantes com os descritos por Zhou & Yu (2004) e Wijekoon et al. (2011) que demonstraram que a mistura água: acetona é a mais eficiente na extração de antioxidantes fenólicos de grãos de aveia e de flores de *Etlingera elatior* Jack, respectivamente. Além disso, Sulaiman et al. (2011) e Michiels et al. (2012) também recomendam essa mistura como o melhor sistema para extração de polifenóis.

Com a mudança da polaridade do solvente, o tipo de composto antioxidante a ser dissolvido também varia. Solventes com baixa viscosidade têm baixa densidade e elevada difusividade, o que lhes permite difundir facilmente para dentro dos poros dos materiais vegetais e, assim, extrair os componentes bioativos (Wijekoon et al., 2011). Como um resultado disso, a atividade antioxidante do extrato também tende a aumentar, como observado neste estudo. Sendo assim, a acetona foi eleita como solvente para seguir-se com a otimização do processo de extração.

Consequente, foi executado um planejamento fatorial de 2 níveis com ponto central (Tabela 7), estabelecendo-se como fatores: a proporção massa/solvente (m/v) (mg/mL) (F1), a temperatura (°C) empregada durante a extração (F2), o tempo (minutos) de contato entre o fruto e o solvente (F3), e a concentração de acetona (%) (F4).

Planejamentos fatoriais de 2 níveis são úteis em etapas iniciais de investigação para quantificar os efeitos dos fatores na resposta e, desta maneira, auxiliar na eliminação de fatores menos significativos em etapas consecutivas da otimização de experimentos. A execução do ponto central em triplicata permite estimar o erro experimental do ensaio (Rodrigues & lemma, 2005).

Tabela 7: Planejamento Fatorial 2^2 com ponto central, fenólicos totais (mg GAE*/100 mg resíduo seco) e IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtidos em função da relação massa volume, temperatura, tempo e concentração de acetona.

Ensaio **	Variáveis codificadas				Variáveis originais				Fenólicos Totais	IC_{50}
	F 1	F 2	F 3	F 4	m/v	T (°C)	Tempo (min)	Aceto (%)		
1	-1	-1	-1	-1	20	25	40	20	24,57	146,12
2	1	-1	-1	-1	100	25	40	20	24,38	144,06
3	-1	1	-1	-1	20	55	40	20	23,90	162,26
4	1	1	-1	-1	100	55	40	20	23,55	165,41
5	-1	-1	1	-1	20	25	120	20	23,15	152,07
6	1	-1	1	-1	100	25	120	20	23,27	157,85
7	-1	1	1	-1	20	55	120	20	20,79	174,72
8	1	1	1	-1	100	55	120	20	20,86	179,86
9	-1	-1	-1	1	20	25	40	80	21,39	160,05
10	1	-1	-1	1	100	25	40	80	21,73	162,49
11	-1	1	-1	1	20	55	40	80	17,50	188,85
12	1	1	-1	1	100	55	40	80	18,06	184,94
13	-1	-1	1	1	20	25	120	80	19,84	163,47
14	1	-1	1	1	100	25	120	80	20,07	169,16
15	-1	1	1	1	20	55	120	80	12,83	205,09
16	1	1	1	1	100	55	120	80	13,21	203,07
17	0	0	0	0	60	40	80	50	27,03	132,73
18	0	0	0	0	60	40	80	50	27,52	128,68
19	0	0	0	0	60	40	80	50	26,58	137,29

**Não corresponde à ordem aleatorizada. *GAE: Equivalentes de Ácido Gálico

As tabelas 8 e 9 mostram as estimativas de efeitos para as respostas FT e AA, respectivamente. Para FT, foram significativos: média, curvatura, os efeitos lineares dos fatores temperatura, tempo e acetona, as interações temperatura e tempo e tempo e porcentagem de acetona. Para a atividade antioxidante, além da média e curvatura foram significativos os efeitos

lineares dos fatores temperatura, tempo e acetona. A proporção massa/solvente, na faixa estudada, não interferiu nas duas respostas.

Tabela 8: Estimativas de efeitos para a resposta fenólicos totais, Planejamento Fatorial 2^2 com ponto central.

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(2)	p-valor	Lim. de conf. -95%	Lim. de conf. + 95%
<i>Média</i>	20,57	0,12	175,0	<0,01	20,06	21,07
<i>Curvatura</i>	12,95	0,59	21,89	<0,01	10,40	15,49
(1)m/v	0,14	0,23	0,67	0,62	-0,87	1,15
(2) Temperatura	-3,46	0,23	-14,73	<0,01	-4,47	-2,45
(3) Tempo	-2,63	0,23	-11,20	<0,01	-3,64	-1,62
(4)% Acetona	-4,98	0,23	-21,18	<0,01	-5,99	-3,96
1 x 2	0,02	0,23	0,08	0,94	-0,99	1,03
1x 3	0,05	0,23	0,23	0,91	-0,52	0,58
1x 4	0,23	0,23	0,98	0,42	-0,78	1,24
2 x 3	-1,20	0,23	-5,10	<0,05	-2,21	-0,19
2 x 4	-1,89	0,23	-8,06	<0,05	-2,91	-0,88
3 x 4	-0,55	0,23	-2,34	0,14	-1,56	0,46
1x2x3	0,01	0,23	0,02	0,98	-1,01	1,02
1x2x4	0,07	0,23	0,31	0,79	-0,94	1,08
1x3x4	-0,13	0,23	-0,54	0,64	-1,14	0,88
2x3x4	-0,38	0,23	-1,62	0,25	-1,39	0,63

O planejamento fatorial de dois níveis com ponto central permite encontrar coeficientes de regressão para um modelo matemático linear e é bastante útil para encontrar os fatores que influenciam significativamente na resposta. Apesar de não permitir ajuste de um modelo quadrático (e desta forma, encontrar pontos máximos ou mínimos), é possível realizar um teste de curvatura, e pode-se verificar pelos dados das tabelas 8 e 9 que o teste

de curvatura é significativo ($p < 0,01$), tanto para FT quanto para AA. Isso indica que o modelo linear não é o mais apropriado para explicar a variação dos resultados e também que há probabilidade do ponto central estudado ser ou estar próximo da região ótima pretendida.

Por essa razão o próximo passo foi acrescentar 8 pontos axiais ao delineamento experimental, constituindo um planejamento composto central rotacional (PCCR), que permite o ajuste de um modelo quadrático (Tabela 10).

Tabela 9: Estimativas de efeitos para a resposta atividade antioxidante (IC_{50}), Planejamento Fatorial 2^2 com ponto central.

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(2)	p-valor	Lim. de conf. -95%	Lim. de conf. + 95%
<i>Média</i>	169,96	0,89	190,1	<0,01	167,12	172,8
<i>Curvatura</i>	-74,13	4,50	-16,47	<0,01	-88,45	-59,81
(1)m/v	1,78	1,79	0,99	0,39	-3,91	7,46
(2) Temperatura	26,12	1,79	14,60	<0,01	20,42	31,80
(3) Tempo	11,40	1,79	6,37	<0,01	5,70	17,07
(4)% Acetona	19,35	1,79	10,82	<0,01	13,65	25,03
1 x 2	-1,19	1,79	-0,66	0,55	-6,88	4,50
1x 3	1,87	1,79	1,05	0,37	-3,82	7,56
1x 4	-1,23	1,79	-0,68	0,54	-6,92	4,46
2 x 3	3,93	1,79	2,20	0,11	-1,76	9,62
2 x 4	5,58	1,79	3,12	0,05	-0,12	11,26
3 x 4	-0,27	1,79	-0,15	0,88	-5,96	5,41
1x2x3	-0,90	1,79	-0,50	0,65	-6,59	4,79
1x2x4	-2,33	1,79	-1,30	0,28	-8,02	3,36
1x3x4	-0,59	1,79	-0,33	0,76	-6,28	5,10
2x3x4	2,14	1,79	1,20	0,32	-3,55	7,83

Os valores reais e codificados das variáveis independentes (fatores) estão descritos na tabela 2 (Seção Materiais e Métodos). Como houve indícios de região ótima, optou-se por manter as condições do ponto central e, com a faixa de variação já estipulada no fatorial de dois níveis (para os níveis -1 e 1), mas não foi possível manter a faixa de variação necessária para o PCCR para os fatores 1 e 4. Para a proporção massa/solvente o nível de estudo -2 indica o valor -20 mg de fruto, e não há valor negativo para massa; para concentração de acetona o nível -2 indicou uma concentração de -10% e o nível +2 indicou uma concentração de 110%, justificando então a escolha da faixa de variação detalhada na tabela 2. Esse artifício matemático foi contabilizado durante a análise de regressão na estimativa do erro experimental. Os resultados do PCCR completo, para as respostas FT e para a atividade antioxidante, estão dispostos na tabela 10.

As tabelas 11 e 12 mostram os coeficientes estatisticamente significativos obtidos com a análise de regressão linear para o ajuste do modelo quadrático para as quatro variáveis independentes das respostas FT e AA, respectivamente. Para realizar ANOVA da regressão (Tabelas 13 e 14) foram incluídos no modelo apenas os efeitos significativos, e com isso houve estimativa do erro experimental com maior número de graus de liberdade.

Tabela 10: Planejamento composto central rotacional, fenólicos totais (FT) (mg GAE*/100 mg resíduo seco) e IC₅₀ (µg/mL) obtidos em função da relação massa volume, temperatura, tempo e concentração de acetona.

Variáveis codificadas					Variáveis originais			FT	IC ₅₀
Ensaio *	F 1	F 2	F 3	F 4	m/v	T (°C)	Tempo (min)	Aceto (%)	
1	-1	-1	-1	-1	20	25	40	20	24,57 146,12
2	1	-1	-1	-1	100	25	40	20	24,38 144,06
3	-1	1	-1	-1	20	55	40	20	23,90 162,26
4	1	1	-1	-1	100	55	40	20	23,55 165,41
5	-1	-1	1	-1	20	25	120	20	23,15 152,07
6	1	-1	1	-1	100	25	120	20	23,27 157,85
7	-1	1	1	-1	20	55	120	20	20,79 174,72
8	1	1	1	-1	100	55	120	20	20,86 179,86
9	-1	-1	-1	1	20	25	40	80	21,39 160,05
10	1	-1	-1	1	100	25	40	80	21,73 162,49
11	-1	1	-1	1	20	55	40	80	17,50 188,85
12	1	1	-1	1	100	55	40	80	18,06 184,94
13	-1	-1	1	1	20	25	120	80	19,84 163,47
14	1	-1	1	1	100	25	120	80	20,07 169,16
15	-1	1	1	1	20	55	120	80	12,83 205,09
16	1	1	1	1	100	55	120	80	13,21 203,07
17	0	0	0	0	60	40	80	50	27,03 132,73
18	0	0	0	0	60	40	80	50	27,52 128,68
19	0	0	0	0	60	40	80	50	26,58 137,29
20	-1	0	0	0	20	40	80	50	27,80 129,90
21	2	0	0	0	140	40	80	50	24,51 142,48
22	0	-2	0	0	60	10	80	50	23,73 167,38
23	0	2	0	0	60	70	80	50	20,81 192,18
24	0	0	-2	0	60	40	0	50	24,95 144,93
25	0	0	2	0	60	40	160	50	20,29 186,91
26	0	0	0	-1,33	60	40	80	10	16,58 201,93
27	0	0	0	1,66	60	40	80	100	13,73 218,58

**Não corresponde à ordem aleatorizada. *GAE: Equivalentes de Ácido Gálico

Tabela 11: Regressão múltipla para ajuste do modelo quadrático aos dados de fenólicos totais de acordo com a tabela 10.

Fatores	Coef. de Regressão	Erro Padrão	t(2)	p-valor	Lim. de conf. -95%	Lim. de conf. + 95%
Média	26,42	0,21	126,8	<0,01	25,52	27,31
temperatura (L)	-1,40	0,01	-14,56	<0,01	-1,81	-0,98
temperatura (Q)	-0,95	0,09	-10,06	<0,01	-1,35	-0,54
tempo (L)	-1,27	0,01	-13,19	<0,01	-1,68	-0,85
Tempo (Q)	-0,86	0,09	-9,13	<0,05	-1,26	-0,45
acetona (L)	-1,87	0,10	-17,89	<0,01	-2,32	-1,42
acetona (Q)	-4,23	0,14	-29,09	<0,01	-4,85	-3,60

Tabela 12: Regressão múltipla para ajuste do modelo quadrático aos dados da atividade antioxidante de acordo com a tabela 10.

Fatores	Coef. de Regressão	Erro Padrão	t(2)	p-valor	Lim. de conf. -95%	Lim. de conf. + 95%
Média	141,92	1,56	90,95	<0,01	135,21	148,6
temperatura (L)	10,77	0,88	12,25	<0,01	6,99	14,55
temperatura (Q)	7,88	0,84	9,36	<0,05	4,26	11,50
tempo (L)	7,29	0,88	8,30	<0,05	3,51	11,08
acetona (L)	7,32	0,96	7,64	<0,05	3,20	11,45
Acetona (Q)	23,34	1,31	17,77	<0,01	17,69	29,00

O modelo de segunda ordem com as variáveis codificadas, incluindo os parâmetros estatisticamente significativos, para o teor de FT está apresentado na equação 2 abaixo, onde x_2 = temperatura; x_3 = tempo; x_4 = % acetona. A análise de variância do modelo está apresentada na tabela 13.

$$\text{Eq. 2 - } \hat{y} = 26,42 - 1,40x_2 - 0,95x_2^2 - 1,27x_3 - 0,86x_3^2 - 1,87x_4 - 4,23x_4^2$$

Tabela 13: Análise de variância (ANOVA) para a resposta fenólicos totais.

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calculado}	R ²
Regressão	385,75	6	64,29	18,42	84,66%
Resíduos	69,9	20	3,49		
Falta de Ajuste	69,46	18	3,86	17,54	
Erro puro	0,44	2	0,22		
Total	455,65	26			

F_{teórico} (6,20; 5%) = 2,60; F_{teórico} (2,26; 5%) = 19,44

O valor de R² (84,06%) e o F_{calculado} (18,42) da regressão para a resposta fenólicos totais indicam um bom ajuste do modelo matemático

O modelo de segunda ordem com as variáveis codificadas, incluindo os parâmetros estatisticamente significativos, para a AA está apresentado na equação 3 abaixo, onde x₂ = temperatura; x₃ = tempo; x₄ = % acetona. A análise de variância do modelo está apresentada na tabela 14.

$$\text{Eq. 3 - } \hat{y} = 141,9 + 10,77x_2 + 7,88x_2^2 + 7,29x_3 + 7,32x_4 + 23,35x_4^2$$

Tabela 14: Análise de variância (ANOVA) para a resposta atividade antioxidante.

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calculado}	R ²
Regressão	12693,05	5	2538,61	15,85	79,06
Resíduos	3362,56	21	160,12		
Falta de Ajuste	3325,45	19	175,02	9,43	
Erro puro	37,11	2	18,55		
Total	16055,61	26			

F_{teórico} (5,21; 5%) = 2,68; F_{teórico} (2,26; 5%) = 19,44

O valor de R² (79,06%) e o F_{calculado} (15,85) da regressão para a resposta atividade antioxidante indicam que o modelo matemático é válido.

O teste F para significância da regressão considera como valor calculado de F a razão entre as médias quadráticas da regressão e dos resíduos. Quando o experimento fornece repetições é possível obter uma estimativa do erro aleatório, e através dela julgar se o modelo escolhido (linear, quadrático, entre outros) é uma boa representação das observações, ou se é preciso modificá-lo. É demonstrado que a soma quadrática residual deixada pelo modelo, para a qual se deseja o menor valor, pode ser decomposta em duas partes: uma causada pelos erros aleatórios (denominado erro puro), e a outra devida à falta de ajuste. Esta segunda parcela pode ser reduzida aperfeiçoando-se o modelo, a primeira não. Para se julgar falta de ajuste é realizado também um teste F com os respectivos graus de liberdade das médias quadráticas da falta de ajuste e do erro puro (Barros-Neto et al., 2003).

Para as duas respostas, FT e atividade antioxidante – método DPPH, não houve falta de ajuste do modelo quadrático, ou seja, a equação quadrática é adequada para descrever as respostas obtidas, na faixa de variação estudada. Também a regressão foi estatisticamente significativa para as duas respostas, e os coeficientes aceitos para gerar as equações do modelo (equações 2 e 3). Por meio dos resultados do planejamento também foi possível construir as superfícies de resposta (Gráficos 1 ao 8).

Gráfico 1: Superfície de resposta para a resposta fenólicos totais em função do tempo e da temperatura.

Gráfico 2: Superfície de resposta para a resposta fenólicos totais em função da temperatura e da % de acetona.

Gráfico 3: Superfície de resposta para a resposta fenólicos totais em função do tempo e da % de acetona.

Gráfico 4: Superfície de resposta para a resposta fenólicos totais em função da temperatura e da relação massa/volume.

Gráfico 5: Superfície de resposta para a resposta atividade antioxidante – método DPPH em função do tempo e da temperatura.

Gráfico 6: Superfície de resposta para a resposta atividade antioxidante – método DPPH em função do tempo e da % de acetona.

Gráfico 7: Superfície de resposta para a resposta atividade antioxidante – método DPPH em função da temperatura e da % de acetona.

Gráfico 8: Superfície de para a resposta atividade antioxidante – método DPPH em função da % de acetona e da relação massa/volume.

Para finalizar, ao se derivar as equações do modelo para as duas respostas e igualá-las à zero foi possível obter o ponto máximo (ótimo) para FT e o ponto mínimo (ótimo) para IC₅₀. Estas condições foram testadas e os resultados encontram-se nas tabelas 15 e 16, respectivamente. Foi possível observar que os valores de FT e IC₅₀ obtidos experimentalmente estão bem próximos dos valores preditos pelas equações 3 e 4, comprovando a validade do modelo para descrever o processo.

Tabela 15: Condições ótimas, valores preditos e experimentais para teor de fenólicos totais.

Condições ótimas			Fenólicos Totais (mg GAE/100 mg)	
% Acetona	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Experimental*	Predito
43,4	28,9	50,8	28,04 ± 1,14	27,61

*Média ± desvio-padrão (n=3)

Tabela 16: Condições ótimas, valores preditos e experimentais para AA.

Condições ótimas			IC ₅₀ (µg/mL)	
% Acetona	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Experimental*	Predito
45,2	40	52,8	139,00 ± 9,89	137,65

*Média ± desvio-padrão (n=3)

Dessa forma, as condições ótimas de tempo, temperatura e % de acetona definidas para a extração de polifenóis e para atividade antioxidante foram utilizadas para a obtenção do extrato A de murici (43,4% de acetona; 28,9°C; 50,8 minutos) e para o extrato B (45,2% e acetona; 40°C; 52,8 minutos), os quais foram avaliados quanto ao perfil de fenólicos e quanto aos mecanismos de ação antioxidante.

5.5 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO MURICI POR HPLC-ESI/MS

A análise por HPLC-ESI/MS permitiu a identificação de 15 compostos fenólicos nos extratos de murici, sendo três dímeros de proantocianidinas, dois isômeros de catequina, ácido gálico, quercetina e seus derivados, entre outros (Figura 11; Tabela 17). Não foram encontrados rutina, ácido ferúlico, hesperidina, narigenina, miricetina, ácido cafeico e ácido p-cumárico nas formas livres.

Figura 11: Cromatograma HPLC-MS com os compostos fenólicos presentes nos extratos de murici. Os números dos picos do cromatograma correspondem aos compostos da tabela 17.

Tabela 17: Identificação dos compostos fenólicos dos extratos de murici por HPLC-ESI/MS.

Pico	TR ^Y (min)	Íon molecular (m/z)	Íon(s) produto (m/z)	Composto
1	8,55	609	300	Quercetina deoxihexose*
2	8,75	463	301	Quercetina hexose*
3	8,96	463	301	Desconhecido
4	9,13	615	301	Galoil quercetina hexose*
5	9,54	433	301	Quercetina pentosidea*
6	10,35	585	301	Galoil quercetina pentosidea*
7	12,49	301	151	Quercetina [§]
8	2,85	577	425	Dímero de proantocianidina*
9	4,33	483	439	Digaloil glicose*
10	5,12	577	425	Dímero de proantocianidina*
11	5,48	577	425	Dímero de proantocianidina*
12	6,52	407	577	Dímero de galoil proantocianidina*
13	0,98	169	125	Ácido gálico [§]
14	3,39	289	245	Isômero de catequina
15	5,80	289	245	Isômero de catequina

^YTR – Tempo de Retenção. *Compostos previamente descritos na literatura [§]Quercetina e ácido gálico foram identificados com os padrões de referência. Os demais compostos foram tentativamente identificados.

Fragmentos dos compostos encontrados nos picos 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 e 12 estão de acordo com os resultados relatados por Gordon et al. (2011), que também identificaram ácido gálico e quercetina em extratos acetônicos de murici. Além disso, identificou-se tentativamente isômeros de catequina, os quais já foram encontrados em cascas de *Byrsonima crassifolia* por Maldini et al. (2011). Por outro lado, Malta et al. (2012) encontraram apenas ácido ferúlico e resveratrol em extratos de *Byrsonima*

verbascifolia, provavelmente, a espécie do fruto e o tipo de solvente utilizado na extração (etanol) resultaram em compostos diferentes.

Os compostos fenólicos identificados nos extratos têm um papel importante na prevenção de algumas doenças. Já está demonstrado que a quercetina é um potente antioxidante, atuando como *scavenging* de radicais livres, além de exercer efeito direto na apoptose, bloquear o crescimento de vários tumores (Gibellini et al., 2011), proteger contra osteoporose e doenças cardiovasculares e pulmonares (Boots et al., 2008). Semelhantemente, Sohi et al. (2003) mostraram que o ácido gálico também atua contra ERO, inibindo a peroxidação lipídica e a apoptose induzida por estresse oxidativo em linfócitos humanos.

As proantocianidinas (taninos condensados) são determinantes do *flavor* e da adstringência de frutas e bebidas como o vinho. Estes compostos têm sido associados com a eliminação de ERO e com a redução *in vivo* da oxidação da LDL e de hidroperóxidos lipídicos (Dixon et al., 2005). Já as catequinas podem existir como dois isômeros *trans*-catequina e *cis*-epicatequina, sendo que cada um dos diastereoisômeros existe como dois isômeros ópticos: (2R, 3S)-2,3-*trans*-(+)-catequina e (2S, 3R)-2,3-*trans*-(-)-catequina, (2R, 3R)-2,3-*cis*-(+)-epicatequina e (2S,3S)-2,3-*cis*-(-)-epicatequina (Ayres et al., 2009). Estudos têm mostrado que as catequinas também podem atuar como antioxidantes diretos (ação sobre radicais livres) e indiretos (aumentar a expressão de enzimas antioxidantes), bem como agentes antitumorigênicos e imunomodulatórios (Crespy & Williamson, 2004).

Na tabela 18 estão apresentados os resultados da quantificação do ácido gálico e quercetina dos extratos de murici utilizados neste estudo, os quais foram estatisticamente iguais.

Tabela 18: Teores de ácido gálico e quercetina nos extratos de murici.

Extratos	Ácido gálico	Quercetina
	µg/100 mg extrato	
Extrato A	21,30 ± 0,72 ^a	35,64 ± 0,44 ^b
Extrato B	20,31 ± 0,56 ^a	35,28 ± 1,73 ^b

Letras iguais na mesma coluna indicam que os extratos são estatisticamente iguais ($p > 0,05$)

Os teores de quercetina do murici são semelhantes aos teores encontrados em maçã, pêssago e uva roxa, mas inferior aos detectados em cebola (Aherne & O'brien, 2002). Para o ácido gálico, a quantidade é semelhante à descrita por Hakkinen et al. (1999) para morango, framboesa e groselha.

É importante ressaltar que o extrato A, obtido sob condições ótimas para extração de polifenóis, apresentou 28,04 mg GAE/100 mg extrato. Assim, o esperado seria uma maior identificação e quantificação de compostos fenólicos, o que não foi verificado pela análise cromatográfica dos extratos. Provavelmente, o método usado na determinação de fenólicos totais superestimou a concentração de polifenóis. Isto porque, embora seja o mais usado, prático e barato, o método é inespecífico para análise de fenólicos, o que é explicado pela reação do reagente Folin-Ciocalteu com outras substâncias como glicose, frutose, tirosina, fenilalanina, triptofano, ácido ascórbico e sulfitos (Prior et al., 2005).

5.6 MECANISMOS DE AÇÃO ANTIOXIDANTE

5.6.1 Determinação da atividade *scavenger* do radical ABTS^{•+}

O método que utiliza o radical ABTS^{•+} é um dos mais usados para avaliar a capacidade antioxidante de matrizes alimentares por sua praticidade, custo e rapidez. Além disso, é aplicado tanto para antioxidantes hidrofílicos como para os lipofílicos (Re et al., 1999). No entanto, apresenta o inconveniente do radical não estar presente *in vivo* (Pérez-Jimenez et al., 2008).

A reação baseia-se em no mecanismo básico de transferência de um elétron (SET - *Single Electron Transfer*) da molécula antioxidante para o radical (Apak et al., 2007). Este, ao abstrair um elétron do antioxidante, causa uma mudança em sua própria absorção. No final, tem-se o radical reduzido e o antioxidante oxidado (Castelo-Branco & Torres, 2011). Os resultados referentes à ação *scavenger* do radical ABTS^{•+} pelos extratos de murici encontram-se na tabela 19.

Tabela 19: Atividade *scavenging* do radical ABTS^{•+} pelos extratos de murici.

Extratos de Murici	TEAC*
	(μM Trolox/ g murici fresco)
Extrato A	$158,48 \pm 0,89^a$
Extrato B	$170,17 \pm 6,33^a$

*TEAC: Atividade Antioxidante expressa em equivalentes de Trolox. Letras iguais na mesma coluna indicam que os extratos são estatisticamente iguais ($p > 0,05$).

A atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) exibida pelos extratos foi elevada. Estes resultados são três vezes maiores que os valores encontrados por Souza et al. (2012a) para polpas de murici produzidas em

Minas Gerais, dez vezes maiores que a atividade antioxidante reportada por Almeida et al. (2011) e quarenta vezes maiores que os valores relatados por Silva et al. (2007) para frutos de *Byrsonima crassifolia*. Estes resultados comprovam a superioridade do método de extração padronizado neste estudo; Silva et al. (2007), por exemplo, realizaram extração com os solventes metanol:etanol:água:HCl por 24 horas, enquanto que Almeida et al. (2011) apenas homogeneizaram os frutos antes das análises. Ademais, fatores como clima e solo também podem ter influenciado a quantidade de fitoquímicos dos frutos e, conseqüentemente, a capacidade antioxidante. Ressalta-se que todas as análises deste estudo foram realizadas com extratos frescos, o que também contribui para sua melhor atividade.

Resultados semelhantes à atividade *scavenging* do radical $ABTS^{\cdot+}$ pelos extratos de murici foram encontrados para o camu camu (153 μ M Trolox/ g) (Rufino et al. 2010) e para o marolo (131,58 μ M Trolox/ g) (Souza et al, 2012a).

Polifenóis, de natureza lipofílica ou hidrofílica, e os carotenoides são os principais compostos dietéticos relacionados com a redução do radical $ABTS^{\cdot+}$. Tabart et al. (2009), por exemplo, mostraram que a quercetina e o ácido gálico apresentam atividade *scavenging* superior ao Trolox (análogo da vitamina E).

Adicionalmente, os carotenos mais importantes quantitativamente na dieta são os mais eficientes supressores do $ABTS^{\cdot+}$ (o licopeno é o mais potente, seguido do β -caroteno), sendo superiores às xantofilas. O número de duplas ligações influencia nesta capacidade, de modo que quanto menor

o número de ligações, menor é a capacidade de neutralizar este radical. Além disso, o menor potencial das xantofilas parece ser influenciado pelo aumento da polaridade dos compostos e pela remoção dos elétrons dos grupos funcionais dos anéis terminais (Muller et al., 2011). Zulueta et al. (2009) verificaram ainda que a atividade do β -caroteno contra o radical ABTS^{•+} (240 μ M Trolox) é maior que o ácido gálico (161 μ M Trolox), o qual é superior ao ácido ascórbico (90,5 μ M Trolox).

5.6.2 Determinação da atividade *scavenger* do radical peroxil

Os resultados da ação dos extratos de murici contra o radical peroxil encontram-se na tabela 20. Os valores ORAC correspondem a 106,49 μ M Trolox/ g murici fresco para o extrato A e 117,73 μ M Trolox/ g murici fresco para o extrato B, diferindo da atividade reportada por Silva et al. (2007) que foi somente de 11,8 μ M Trolox/ g murici fresco. O murici apresentou atividade (μ M Trolox/ g fruta fresca) contra o radical peroxil superior à goiaba (21,3) (Thaipong et al., 2006), morango (35,77), laranja (18,14) e maçã (29,36) (Apak et al., 2007), mas inferior à semente de uva Cabernet (1973,2 μ M Trolox/ g semente) (Bozan et al., 2008). Valores semelhantes foram encontrados por Silva et al. (2007) para o caule de *Arrabidaea chica* e para casca de *Cecropia palmata*.

O ORAC é um dos métodos com maior relevância biológica uma vez que a capacidade antioxidante medida *in vitro* pode refletir melhor a ação dos extratos *in vivo* (Prior et al., 2005). O radical peroxil, que é gerado pela reação do AAPH com oxigênio, oxida a sonda molecular (substrato oxidável, neste caso a fluoresceína) produzindo um sinal que é medido

fluorimetricamente. O mecanismo de ação antioxidante está baseado no mecanismo HAT (*Hydrogen Atom Transfer*), ou seja, na doação de um átomo de hidrogênio do antioxidante para o radical peroxil. A reação é competitiva, onde antioxidante e substrato competem pelo radical (Castelo-Branco & Torres, 2011; Prior et al., 2005).

Tabela 20: Atividade *scavenging* do radical peroxil pelos extratos de murici.

Extratos de Murici	ORAC*
	($\mu\text{M Trolox/ g extrato}^{\delta}$)
Extrato A	1252,88 $\pm$ 46,73 ^a
Extrato B	1332,78 $\pm$ 94,30 ^a

*ORAC: Oxygen radical absorbance capacity. ^oBase seca. Letras diferentes na mesma coluna indicam que os extratos são estatisticamente iguais ($p > 0,05$).

Neste ensaio, foi possível verificar que os antioxidantes dos extratos de murici, ao doarem um átomo de hidrogênio para o radical, inibiram a oxidação do substrato. Como este sistema envolve o peroxil como iniciador da oxidação e o mecanismo competitivo, que são similares à reação em cadeia da peroxidação lipídica, a ação antioxidante dos extratos torna-se representativa de condições reais. Contudo, Niki (2010) ressalta que a interação entre diferentes antioxidantes contra a peroxidação lipídica não pode ser mensurada pelo ORAC.

Segundo Prior et al. (2005), os carotenoides não são particularmente bons supressores de radicais peroxil, quando comparados aos compostos fenólicos (Prior et al., 2005). Neste sentido, Cíz et al. (2010) encontraram uma ótima correlação ($r = 0,950$) entre os teores de polifenóis e a capacidade antioxidante medida pelo ORAC. Também já foi observado que

a quercetina exibe equilaventes de trolox (6,47) > δ-tocoferol (1,36) > Vitamina C > α-tocoferol (Aruoma et al., 2003).

Por outro lado, no estudo de Zulueta et al. (2009), alguns carotenoides exibiram atividade contra o peroxil superior ao ácido gálico (luteína > zeaxantina > β-caroteno > ácido gálico > ácido ascórbico). É interessante observar que as xantofilas exibem atividade maior que os carotenos contra o peroxil, diferentemente do que ocorre contra o radical ABTS^{•+}, mostrando que a atividade antioxidante difere entre os métodos. Ainda assim, é possível estabelecer boa correlação entre os métodos ABTS e ORAC, no entanto, quando a matriz alimentar é muito complexa essa correlação pode ser baixa por causa dos diferentes mecanismos de ação e cinéticas exibidas pelos compostos antioxidantes (Zulueta et al., 2009).

Quanto aos polifenóis, o mecanismo HAT de doação de um átomo de hidrogênio por um composto fenólico (Ar-OH) pode ser resumida pela equação abaixo, onde o radical formado posteriormente (ArO[•]) é estabilizado por ressonância (Apak et al., 2007).

O potencial de doação do átomo de hidrogênio é fortemente influenciado pela estrutura dos compostos e, até mesmo, pelo número e posição das hidroxilas na cadeia dos fenólicos. Em compostos com a mesma estrutura, mas com diferentes números de hidroxilas, a capacidade antioxidante é proporcional ao número de substituintes hidroxilas, assim, miricetina > quercetina > campferol (Alves et al., 2010). Por sua vez, estes fenólicos são superiores ao ácido gálico, o qual apresenta atividade

semelhante ao trolox e superior ao ácido ascórbico e à glutathiona reduzida (Tabart et al., 2009).

5.6.3 Avaliação da atividade *scavenger* do radical hidroxil: ensaio de dano oxidativo a 2-deoxirribose

O radical hidroxil é um dos mais deletérios para o organismo, assim, compostos que atuem em sua neutralização constituem importante estratégia no combate aos danos oxidativos. Neste ensaio, os radicais gerados *in vitro* oxidam a molécula de 2-deoxirribose (2-DR), gerando substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Frequentemente, a ação dos antioxidantes ocorre via abstração de um átomo de hidrogênio, mas isso não exclui uma possível transferência de elétrons (Alves et al., 2010). Neste sentido, verificou-se que os extratos de murici inibiram a oxidação da 2-DR (Tabela 21).

Tabela 21: Concentrações dos extratos de murici necessárias para reduzir em 50% (IC_{50}) o radical hidroxil/dano a 2-deoxirribose

Extratos de Murici	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$ extrato)
Extrato A	$300,68 \pm 7,28^a$
Extrato B	$281,33 \pm 5,67^b$

Letras diferentes na mesma coluna indicam que os extratos são estatisticamente diferentes.

Os extratos de murici exerceram proteção contra o dano a 2-DR inferior ao extrato metanólico de *Sida rhomboidea* ($IC_{50} = 90,45 \mu\text{g/mL}$) (Thounaojam et al., 2010) e superior ao extrato aquoso de alga *Bryothamnion triquetrum* ($IC_{50} = 370 \mu\text{g/mL}$) (Vidal et al., 2006) e ao café torrado (15 mg/ mL inibiram 59,70 % da oxidação) (Vignoli et al., 2012).

Os compostos fenólicos são os principais inibidores da oxidação da 2-DR, o que ocorre via ação *scavengers* dos radicais hidroxil e também por meio da quelação dos íons ferro. Com a menor disponibilidade do ferro, ocorre menor produção de radicais hidroxil por meio da reação de Fenton e, conseqüentemente, menor dano a 2-DR (Moran et al., 1997; Cheng et al., 2002). Chobot (2010), por exemplo, verificou inibição da oxidação da 2-DR pela quercetina, a qual parece ser capaz de doar um elétron para o hidroxil ou para o peróxido de hidrogênio, produzindo água, além de quelar o ferro. Por outro lado, Yen et al. (2002) e Chen et al. (2002) mostraram que, em baixas concentrações, o ácido gálico aumenta a produção de radicais hidroxil (refletida no aumento do dano a 2-DR), provavelmente pela redução dos íons férricos e por autooxidação, produzindo H_2O_2 e superóxido, os quais formam hidroxil pela reação de Fenton e Haber-Weiss. Yen et al. (2002) também observaram este efeito para o ácido ascórbico. Estes achados apontam para o efeito próoxidante destes compostos.

Na tentativa de verificar o possível efeito próoxidante do murici, ou seja, verificar se haveria aumento do dano a 2-DR, testou-se várias concentrações dos extratos (60 – 4000 $\mu\text{g/mL}$). No entanto, mesmo em altas concentrações, os extratos não exerceram efeito próoxidante. Por outro lado, observou-se que a partir de 400 $\mu\text{g/mL}$ a inibição da oxidação torna-se cada vez menos dose-dependente (Gráfico 9). O aumento da concentração do extrato A de 400 $\mu\text{g/mL}$ para 4000 $\mu\text{g/mL}$ aumentou a % de inibição da oxidação de 57,36 % somente para 88,30 %, indicando uma possível saturação do efeito do murici.

Gráfico 9: Efeito de diferentes concentrações de extratos de murici na degradação oxidativa da 2-deoxirribose. Os pontos acima representam a média $\pm$ desvio-padrão (n=3).

Como mencionado anteriormente, quando um antioxidante interfere nos danos causados pelo radical hidroxil, isto pode ocorrer via sequestro deste radical, mas também pelo sequestro ou bloqueio de precursores de sua formação e/ou pela quelação de metais de transição (Filgueiras et al., 2009). Nesta perspectiva, ensaios realizados com diferentes concentrações de 2-DR, de ferro, de EDTA e com diferentes tempos de incubação, podem fornecer informações importantes acerca do possível efeito quelador do composto estudado.

Neste estudo, foram realizados ensaios com diferentes concentrações de EDTA e tempos de incubação dos reagentes com os extratos (antes da adição do ascorbato) para avaliar se a inibição da oxidação da 2-DR seria pela quelação dos íons ferro. Primeiramente,

avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de EDTA (0, 50, 100, 250 e 500 μM), com a concentração fixada de ferro em 50 μM e tempo de pré-incubação de 10 minutos (Gráfico 10). Este ensaio permitiu visualizar inicialmente que sem a adição do EDTA o dano a 2-DR foi mínimo. No entanto, quando o EDTA foi adicionado ao meio, independente da concentração do co-quelante, a produção de TBARS foi máxima, o que demonstra a maior disponibilização do ferro para reação na presença de EDTA. Ao adicionar os extratos, o dano a 2-DR diminuiu significativamente, porém, manteve-se estatisticamente constante em todas as concentrações de EDTA.

Gráfico 10: Efeito de diferentes concentrações de EDTA na degradação oxidativa da 2-deoxirribose na presença dos extratos de murici (320 $\mu\text{g/mL}$). Os pontos acima representam a média $\pm$ desvio-padrão ($n=3$).

Se os extratos de murici apresentassem comportamento antioxidante do tipo quelante, o esperado seria uma diminuição da % de proteção com o aumento da concentração de EDTA no meio, uma vez que o aumento da

concentração de EDTA dificultaria a retirada dos íons ferro do EDTA pelos compostos quelantes do murici. Ao aumentar as concentrações de EDTA de 25 para 100 μM , Hermes-Lima et al. (2000) observaram redução da proteção da 2-DR pelo quelante de ferro piridoxal isonocotinoil hidrazona (PIH); neste estudo, o IC_{50} aumentou de 147 μM para 615 μM . De forma semelhante, Pardo-Andreu et al. (2006) mostraram que a mangiferina foi menos eficaz na prevenção do dano a 2-DR na maior concentração de EDTA. Nestes estudos, os resultados sugerem que a prevenção do dano a 2-DR ocorre via quelação dos íons ferro, e não por neutralização do radical hidroxil.

O efeito antioxidante constante na presença de diferentes concentrações de EDTA também pode ser explicado por uma cinética lenta de remoção dos íons férricos do complexo Fe-EDTA. Neste caso, o tempo de pré-incubação de 10 minutos dos extratos de murici com o complexo Fe-EDTA não seria suficiente para que os compostos quelantes dos extratos removessem os íons férricos deste complexo. Assim, realizou-se um ensaio em que os extratos de murici foram pré-incubados com o complexo Fe-EDTA em diferentes tempos (0, 15, 30, 45 e 60 minutos) (Gráfico 11). Compostos antioxidantes do tipo quelante apresentam diminuição do dano a 2-DR com o aumento do tempo de pré-incubação. No entanto, não verificou-se alteração no potencial antioxidante dos extratos de murici com o aumento do tempo de pré-incubação. Resultados semelhantes foram reportados por Dalvi (2008) para o extrato aquoso de caqui.

Estes testes indicam que o comportamento dos extratos de murici não se assemelha ao que normalmente se observa por moléculas quelantes, indicando que a redução do dano a 2-DR realmente ocorre via redução do radical hidroxil.

Gráfico 11: Efeito do tempo de pré-incubação dos extratos de murici (A e B – 320 µg/mL) com o complexo Ferro-EDTA na degradação oxidativa da 2-deoxirribose. Os pontos acima representam a média ± desvio-padrão (n=3).

5.6.4 Determinação da atividade *scavenger* do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

Embora o ânion superóxido seja um oxidante fraco, este radical é precursor de espécies reativas importantes, como o hidroxil e o oxigênio singleto, que participam da peroxidação lipídica (Royer et al., 2011). A avaliação da atividade antioxidante contra o ânion superóxido mostrou que os extratos de murici são capazes de reagir com este radical de maneira dose-dependente (Tabela 22). Valores semelhantes foram reportados por Vidal et al. (2006) para o extrato de alga marinha *Bryothamnion triquetrum* (IC_{50} = 360 µg/mL) e por Thounaojam et al. (2010) para o extrato metanólico

de *Sida rhomboidea* ($IC_{50} = 142,36 \mu\text{g/mL}$). Neste, parte da atividade antioxidante foi atribuída ao ácido ascórbico, que apresentou IC_{50} de $40,23 \mu\text{g/mL}$. Por outro lado, extratos de própolis ($IC_{50} = 9,89 \mu\text{g/mL}$) (Gulçin et al., 2010) e de sementes de uva ($IC_{50} = 0,82 \mu\text{g/mL}$) (Wood et al., 2002) são muito mais eficazes contra o radical superóxido.

Tabela 22: Concentrações dos extratos de murici necessárias para reduzir em 50% (IC_{50}) o ânion superóxido.

Extratos de Murici	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Extrato A	$374,50 \pm 19,23^a$
Extrato B	$350,92 \pm 7,30^a$

Letras iguais na mesma coluna indicam que os extratos são estatisticamente iguais ($p > 0,05$).

Gaulejac et al. (1999) utilizaram essa metodologia para avaliar a atividade sequestradora do radical superóxido em vinho tinto e concluíram que esta atividade está relacionada principalmente com as antocianinas livres e aos taninos condensados. Estes resultados foram confirmados por Lu & Foo (2000), que constataram que as proantocianidinas oligoméricas da polpa de maçã são de 10 a 30 vezes mais efetivas que as vitaminas C e E contra o radical superóxido. Além disso, os dímeros de proantocianidinas, a quercetina e epicatequina também estão altamente relacionados com esta atividade. No trabalho de Figueirinha et al. (2008), os taninos ($IC_{50} = 4,47 \mu\text{g}$) também foram os principais compostos responsáveis pela ação *scavenger* do ânion superóxido por extratos de folhas de *C. citratus*, seguidos dos flavonoides ($IC_{50} = 13,4 \mu\text{g}$). Isto pode explicar a ação dos extratos de murici, os quais contêm muitos destes compostos.

Segundo Taubert et al. (2003), considerando-se os flavonoides, são os substituintes do anel B que determinam a cinética contra o superóxido. Neste sentido, parece que os grupos catecol e pirogalol são os principais locais de ataque por este radical, resultando no radical aroxil, o qual é estabilizado por ressonância. Dessa forma, proantocianidinas, ácido gálico, e miricetina apresentam as maiores constantes de velocidade do radical superóxido, seguidos de ácido cafeico, quercetina, rutina e catequina. É importante salientar que a constante de velocidade dos compostos fenólicos, embora seja superior às constantes de velocidade das vitaminas C e E, ainda assim está abaixo da constante de velocidade da SOD sob o superóxido. Porém, sabendo-se que certas condições podem reduzir a atividade desta enzima, a ação dos antioxidantes dietéticos torna-se de fundamental importância para a manutenção do estado redox das células.

Além dos compostos supracitados, os carotenoides também são capazes de reagir com o radical superóxido por meio da transferência de um elétron (TE) para o radical. Neste caso, o licopeno e o β -caroteno exercem atividade *scavenging* superior à luteína e zeaxantina (Trevithiak-Sutton et al., 2006). Todavia, a natureza do ânion superóxido é capaz de inverter a direção da TE, de modo que o superóxido torna-se um doador de elétrons e o carotenoide umceptor, sendo que este processo é energeticamente favorável em ambientes apolares. Assim sendo, *in vitro*, a astaxantina é mais eficaz que o licopeno, o qual tem atividade semelhante à luteína e é melhor que a zeaxantina (Galano et al., 2010).

A ação dos extratos de murici sobre o ânion superóxido pode ocorrer tanto por reação direta dos compostos antioxidante com o radical, quanto por inibição da atividade da enzima xantina oxidase, resultando assim, em menor produção deste radical. Portanto, visando esclarecer o mecanismo de ação antioxidante, foram realizados testes para verificar se os extratos de murici seriam capazes de interferir na atividade desta enzima.

5.6.5 Inibição da atividade da enzima xantina oxidase

A xantina oxidase é a enzima responsável pela conversão da hipoxantina em xantina e desta em ácido úrico. O acúmulo deste no organismo está relacionado com várias doenças crônicas, como gota e injúria vascular (Pacher et al., 2006). Além disso, é considerada uma das principais fontes biológicas do ânion superóxido e, portanto, sua inibição pode ter uso terapêutico (Alves et al., 2010). O efeito dos extratos de murici sobre a atividade da enzima xantina oxidase está no Gráfico 12.

Gráfico 12: Efeito dos extratos de murici na atividade da enzima xantina oxidase. Os pontos acima representam a média $\pm$ desvio-padrão (n=3).

Observa-se que os extratos inibiram a atividade da enzima xantina oxidase de maneira dose-dependente, porém, foram necessárias altas concentrações. O extrato A na concentração de 4 mg/mL inibiu a atividade da enzima em 49 % e o extrato B em 47,56 %, sendo ambos estatisticamente iguais ($p > 0,05$). Já o alopurinol (controle positivo), na concentração de 100 µg/mL inibiu a xantina oxidase em 87,01 %. Ou seja, a ação dos extratos de murici contra o ânion superóxido ocorre principalmente via atividade *scavenger* de radicais livres.

No trabalho de Wood et al. (2002), extratos de cascas de *Pinus radiata* e *Pinus marítima*, ricos em proantocianidinas, apesar de terem apresentado elevada atividade contra o ânion superóxido, não foram capazes de inibir a xantina oxidase. Por outro lado, Saghal et al. (2009) observaram redução de 47,21 % na atividade da xantina oxidase por extrato metanólico de sementes de *Swietenia mahagoni* na concentração de 1mg/mL. Já os extratos de folhas de *Acacia confusa* (100 µg/mL) inibiram esta enzima em 45 % (Tung & Chang, 2010). Kong et al. (2000) verificaram ainda que extratos de plantas medicinais chinesas apresentam baixíssimos valores de IC₅₀ para inibição da xantina oxidase: 18 µg/mL para galhos de *Cinnamomum cassia* e 22 µg/mL para flores de *Chrysanthemum indicum*.

Flavanonas (como a hesperdina e narigenina), isoflavonas, catequinas (Van Hoorn et al., 2002) e antocianidinas (Nagao et al., 1999) parecem não interferir na atividade da xantina oxidase. Entretanto, as flavonas (como luteolina e apigenina) e os flavonóis (como quercetina, campferol e miricetina) inibem a atividade desta enzima, mesmo em baixas

concentrações (Nagao et al., 1999). A planaridade da molécula é requisito básico para a elevada atividade inibitória. Além disso, a introdução de grupos hidroxilas nas posições C-5 e C-7 aumenta a ação inibitória, enquanto que a presença destes grupos em C-2 e C-3 diminui drasticamente este efeito (Van Hoorn et al., 2002). A ligação destes polifenóis com açúcares também atrapalha sua ação, assim, as agliconas são inibidores mais eficientes (Lin et al., 2002).

Geralmente, o mecanismo de ação inibitória por estes compostos é do tipo competitivo, ou seja, competem com o substrato pelo centro ativo da enzima (Lin et al., 2002). Os extratos de murici constituem uma mistura complexa, assim, é possível que também estejam envolvidos mecanismos não competitivos, ou seja, os compostos bioativos poderiam ligar-se a radicais que não se localizam no sítio ativo da enzima, alterando sua estrutura e, assim, inviabilizando sua atividade.

5.6.6 Capacidade de redução do ferro – FRAP

A capacidade de redução do ferro avaliada pelo método FRAP também está baseada exclusivamente no mecanismo SET (Muller et al., 2011), assim, não detecta compostos que atuem por transferência de átomos de hidrogênio, particularmente tióis (como a glutatona) e proteínas (como a albumina) (Prior et al., 2005).

Originalmente desenvolvido por Benzie e Strains (1996) para mensuração do poder redutor de plasma, este método mostrou-se prático, rápido e barato, sofrendo várias modificações para avaliação do poder redutor de matrizes alimentares. Na tabela 23 encontram-se os valores

FRAP para os extratos de murici, os quais mostram o elevado poder redutor dos extratos.

Tabela 23: Capacidade de redução do ferro (FRAP) por extratos de murici

Extratos de Murici	FRAP
	(µM sulfato ferroso/ mg extrato)
Extrato A	4,29 ± 0,40 ^a
Extrato B	4,55 ± 0,08 ^a

Letras iguais na mesma coluna indicam que os extratos são estatisticamente iguais ($p > 0,05$).

FRAP reflete principalmente a ação redutora de compostos fenólicos e da vitamina C (Prior et al., 2005), e, em menor proporção, do licopeno e de algumas xantofilas. Thaipong et al. (2006) encontraram elevada correlação positiva entre os teores de polifenóis e o FRAP ($r = 0,97$) e entre FRAP e os teores de ácidos ascórbico ($r = 0,92$) em extratos de goiaba. Por outro lado, detectaram correlação negativa com os teores de β -caroteno ($r = -0,73$). Isso porque os α e β -carotenos não apresentam a capacidade de redução do ferro, devido ao impedimento estérico do anel β -ionona. Já a luteína e a β -criptoxantina exercem poder de redução superior ao trolox, provavelmente, devido à presença dos grupos hidroxilas (Muller et al., 2011).

A capacidade de redução do ferro pelos polifenóis, também está relacionada com o grau de hidroxilação e extensão das conjugações destes compostos. Neste sentido, Firuzi et al. (2005) observaram que a quercetina foi o polifenol com maior FRAP, seguida da miricetina, rutina, catequina e campferol. Estes resultados corroboram os achados de Pulido et al. (2000), que verificaram ainda que os ácidos fenólicos (gálico e cafeico) possuem

poder de redução do ferro superiores ao ácido ascórbico, que por sua vez, é superior ao trolox.

Pode-se notar também que o Fe^{2+} é mais reativo que o Fe^{3+} para formar peróxido de hidrogênio, dessa forma, compostos com elevado poder de redução deste metal, podem exercer efeito próoxidante em algumas situações. No entanto, o ferro é sequestrado *in vivo* por proteínas (ferritina e transferrina), o que de certa forma dificulta sua participação nas reações de oxidação mediada por radicais livres (Niki, 2010).

Ademais, alguns pontos devem ser considerados neste ensaio. Primeiramente, a interpretação dos resultados baseia-se na hipótese de que a capacidade de antioxidantes em reduzir os íons ferro, reflete a sua capacidade em reduzir a formação de ERO. O problema é que além de não considerar antioxidantes importantes como os tióis, este método inclui agentes redutores que não atuam como antioxidantes *in vivo* (Pinchuk et al., 2012). Além disso, o pH do sistema é muito ácido, o que, além de não corresponder a condições fisiológicas, altera a potencial redox dos polifenóis (Pulido et al., 2000).

5.6.7 Inibição da oxidação lipídica – Sistema Rancimat®

Como os extratos de murici apresentaram elevada capacidade antioxidante *in vitro* nos métodos empregados anteriormente e procurando investigar uma possível utilização dos extratos na indústria alimentícia, avaliou-se também o efeito antioxidante destes extratos pelo sistema lipídico Rancimat®.

O efeito dos extratos de murici sobre a oxidação da banha de porco, bem como do padrão BHT, encontram-se na tabela 24. Observa-se que o padrão BHT inibiu eficazmente o processo oxidativo na concentração de 1mg/mL. No entanto, na mesma concentração, os extratos de murici não foram capazes de inibir a oxidação. Todavia, o incremento na concentração do extrato resultou em aumento do tempo de indução, refletido no maior IAA.

A adição do extrato A na concentração de 2 mg/mL incrementou o tempo de indução da oxidação em 42,17 %, enquanto que o extrato B incrementou em 59,18 %. Ainda assim, os extratos tiveram ação antioxidante bem inferior ao padrão BHT. Provavelmente, as elevadas temperaturas usadas neste sistema destruíram os compostos antioxidantes termolábeis, requerendo assim uma maior concentração dos extratos para inibição da oxidação lipídica. Resultado semelhante foi encontrado por Queiroz et al. (2009) para extratos etanólicos de grãos de amaranto (*Amaranthus cruentus* L. *BRS-Alegria*) submetidos a diferentes processamentos.

Tabela 24: Índice de atividade antioxidante (IAA), utilizando o aparelho Rancimat®, do controle BHT e dos extratos de murici.

Extratos	IAA
Extrato A 1 mg/ mL	1,01 ± 0,02 ^a
Extrato B 1 mg/ mL	1,12 ± 0,10 ^a
Extrato A 2 mg/ mL	1,42 ± 0,05 ^b
Extrato B 2 mg/ mL	1,59 ± 0,03 ^b
BHT 1 mg/ mL	3,36 ± 0,25 ^c

Letras iguais na mesma coluna indicam que os extratos são estatisticamente iguais (p> 0,05).

5.6.8 Inibição da oxidação do β -caroteno: sistema modelo de cooxidação β -caroteno/ácido linoleico

A peroxidação lipídica ocorre *in vivo* e tem sido associada com desordens metabólicas e com doenças crônicas degenerativas (Niki, 2010). A iniciação deste processo pode ocorrer via enzimática (lipoxigenases e cicloxigenase) ou ser mediada por radicais livres e metais de transição. Independente do modo de iniciação, os radicais peroxila são os responsáveis pela propagação da reação (Niki, 2009). A peroxidação das membranas, por exemplo, pode levar a modificações da permeabilidade, perda de seletividade, alterações no DNA e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (Lima & Abdalla, 2001). Assim, a modulação deste processo pelos antioxidantes torna-se bastante interessante, contudo, a capacidade de bloqueio do radical livre não necessariamente se correlaciona com a capacidade de inibição da peroxidação lipídica (Niki, 2010).

O sistema β -caroteno/ácido linoleico, originalmente descrito por Marco (1968) e modificado por Miller (1971), está baseado na oxidação do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico. Por não utilizar altas temperaturas permite a avaliação de antioxidantes termossensíveis. Compostos antioxidantes, ao neutralizarem os radicais livres originados da peroxidação lipídica, podem retardar/prevenir a degradação do β -caroteno (Alves et al., 2010).

Os resultados mostram (Tabela 25 e Gráfico 13) que os extratos de murici retardaram fortemente a oxidação, com atuação semelhante ao antioxidante sintético BHT. É interessante observar que 150 $\mu\text{g/mL}$ de

extrato inibiram cerca de 50 % da oxidação, todavia, o aumento da concentração não resultou em proporcional proteção para o β -caroteno, indicando possível saturação do efeito do murici contra a lipoperoxidação.

Além disso, o estudo dos fatores cinéticos (F1 e F2) revelou que a atuação dos extratos de murici como antioxidantes ocorre tanto por bloqueio da formação de peróxidos (produtos primários) quanto contra os produtos secundários da oxidação. Lembrando que quanto mais próximo de 1 for o fator cinético, menor será a atividade antioxidante (Duarte-Almeida et al., 2006).

Tabela 25: Efeito do extrato de murici na inibição da oxidação do β -caroteno pelo sistema modelo de cooxidação β -caroteno/ácido linoleico.

Extratos	% I	F1	F2
Extrato A 150 μ g/mL	49,85 $\pm$ 2,17 ^a	0,54 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,04
Extrato B 150 μ g/mL	51,38 $\pm$ 0,60 ^a	0,50 $\pm$ 0,03	0,46 $\pm$ 0,00
Extrato A 300 μ g/mL	59,44 $\pm$ 1,86 ^b	0,45 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,03
Extrato B 300 μ g/mL	60,68 $\pm$ 1,04 ^b	0,46 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,03
Extrato A 600 μ g/mL	65,38 $\pm$ 1,15 ^c	0,38 $\pm$ 0,02	0,37 $\pm$ 0,02
Extrato B 600 μ g/mL	65,83 $\pm$ 0,57 ^c	0,37 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,01
Extrato A 1 mg/mL	69,33 $\pm$ 3,67 ^d	0,29 $\pm$ 0,01	0,45 $\pm$ 0,05
Extrato B 1 mg/mL	71,24 $\pm$ 1,60 ^d	0,28 $\pm$ 0,02	0,37 $\pm$ 0,02
BHT 100 μ g/mL	43,91 $\pm$ 1,45 ^e	0,65 $\pm$ 0,05	0,51 $\pm$ 0,02

%I: Porcentagem de inibição; F1: relação entre as tangentes das curvas cinéticas dos extratos e controle entre 15 e 45 minutos; F2: relação entre as tangentes das curvas cinéticas dos extratos e controle entre 75 e 105 minutos. Letras iguais indicam que os extratos A e B são estatisticamente iguais ($p > 0,05$).

◆ Controle ■ 150 µg/mL ▲ 300 µg/mL
 ✕ 600 µg/mL ✱ 1 mg/mL ● BHT 100 µg/mL

Gráfico 13: Curvas de decoloramento do β -caroteno na presença dos extratos de murici A e B e do padrão BHT. Os pontos acima representam a média $\pm$ desvio-padrão (n=3).

Broinizi et al. (2007) utilizaram esta técnica para avaliação da capacidade antioxidante de subprodutos do pseudofruto do caju (*Anacardium occidentale* L.), os quais inibiram a oxidação do β -caroteno na ordem de 30 % na concentração de 2,5 mg. Por outro lado, 3 μ g de extrato alcoólico da polpa de romã inibiram a oxidação em 65,59 % (Jardini & Mancini-Filho, 2007).

Diversos compostos estão envolvidos na inibição da peroxidação lipídica *in vivo*, como as vitaminas C e E (Vannucchi et al., 1998). Contudo, acredita-se que os compostos fenólicos presentes nos extratos de murici sejam os principais responsáveis pelos efeitos observados neste trabalho. Estes compostos, ao doarem um átomo de hidrogênio para os radicais lipídicos, retardam a reação de peroxidação. Porém, a ação dos polifenóis no organismo vai depender da extensão da sua absorção e metabolização (Bravo, 1998).

Neste sistema de cooxidação, as proantocianidinas e a quercetina de polpa de maçã exercem a maior atividade antioxidante, enquanto a epicatequina é bem menos ativa (Lu & Foo, 2000). Duarte-Almeida et al. (2006) verificaram ainda que o ácido gálico (1000 μ M) inibe a oxidação em 41 %, a quercetina (540 μ M) em 42 % e a catequina (700 μ M) em 34 %. Já a rutina e o ácido clorogênico são menos eficientes, mesmo em altas concentrações.

6. CONCLUSÕES

OS frutos de murici são fontes de fibras, cálcio, magnésio e potássio, além de compostos antioxidantes, como vitamina C, carotenoides, tocoferóis e polifenóis (especialmente ácido gálico e quercetina). Provavelmente, estes compostos interagem sinergicamente refletindo na elevada capacidade antioxidante dos extratos.

Os extratos de murici atuaram como antioxidantes por meio da ação *scavenger* dos radicais ABTS, peroxil, hidroxil e superóxido. Em altas concentrações, os extratos de murici ainda inibiram a atividade da enzima xantina oxidase. Além disso, exibiram elevado poder de redução dos íons ferro e foram capazes de inibir processos oxidativos em meio lipídico.

Considerando-se a importância da manutenção do estado redox das células para redução do risco de DCNT, o consumo de frutos de murici pode contribuir positivamente para a saúde da população. Contudo, mais estudos são necessários para esclarecer a extensão da atividade biológica deste fruto, especialmente *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS

- AHERNE, S.A. & O'BRIEN, N.M. Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. **Nutrition**, v.18, p. 75–81, 2002.
- AHMED, E.; KHAN, M.M.; JAVED, H.; VAIBHAV, K.; KHAN, A.; TABASSUM, R. et al. Amelioration of cognitive impairment and neurodegeneration by catechin hydrate in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. **Neurochemistry International**, 2013.
- ALMEIDA, M.M.B.; SOUSA, P.H.M.; FONSECA, M.L.; MAGALHÃES, C.E.C.; LOPES, M.F.G.; LEMOS, T.L.G. Avaliação de macro e microminerais em frutas tropicais cultivadas no nordeste brasileiro. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.29, n.3, p. 581-586, 2009.
- ALMEIDA, M.M.B.; SOUSA, P.H.M.; ARRIAGA, A.M.C.; PRADO, G.M.; MAGALHÃES, C.E.C.; MAIA, G.A. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2155-2159, 2011.
- ALVES, C.K.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Quím. Nova**, v.33, n.10, 2010.
- ALVES, G. L.; FRANCO, M. R. B. Headspace gas chromatography–mass spectrometry of volatile compounds in murici (*Byrsonima crassifolia* L. Rich). **Journal of Chromatography**, v. 985, n. 4, p. 297-301, 2003.
- AMARA, I.B.; SOUDANI, N.; HAKIMB, A.; TROUDI, A.; ZEGHAL, K.M.; BOUDAWARA, T. et al. Selenium and vitamin E, natural antioxidants, protect rat cerebral cortex against dimethoate-induced neurotoxicity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 101, p.165–174, 2011.
- AMIRKHIZI, F.; SIASSI, F.; DJALALI, M.; FOROUSHANI, A.R. Evaluation of oxidative stress and total antioxidant capacity in women with general and abdominal adiposity. **Obesity Research & Clinical Practice**, v.4,n.3, pp. e209-e216, 2010.
- ANDREO, D. & JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **B. CEEPA**, v.24, n.2, p. 319-336, 2006.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n.1, p. 232-240, 2007.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16th ed. Arlington (USA): AOAC; 1995.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 17th ed. Gaithersburg, MD: AOAC; 2005.
- APAK, R.; GÜÇLÜ, K.; DEMIRATA, B.; ÖZYÜREK, M.; CELIK, S.E.; BEKTAŞOĞLU, B. et al. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. **Molecules**, v. 12, p. 1496-1547, 2007.

- ARUOMA, O.I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**, v. 523–524, p. 9–20, 2003.
- AYRES, M.C.C.; CHAVES, M.H.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; VIEIRA JÚNIOR, G.M. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. **Quím. Nova**, v.32, n.6, 2009.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v. 23, n. 4, 2010.
- BARONA, J.; JONES, J.J.; KOPEC, R.E.; COMPERATORE, M.; ANDERSEN, C.; SCHWARTZ, S.J. et al. A Mediterranean-style low glycemic-load diet increases plasma carotenoids and decreases LDL oxidation in women with metabolic syndrome. **J Nutr Biochem.**, v.23, n.6, p. 609-15, 2011.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse Oxidativo: Relação entre Geração de Espécies Reativas e Defesa do Organismo. **Quím. Nova**, v. 29, n. 1, p.113-123, 2006.
- BARRETT, C.W.; NING, W.; CHEN, X.; SMITH, J.J.; WASHINGTON, M.K.; HILL, K.E. et al. Tumor suppressor function of the plasma glutathione peroxidase gpx3 in colitis-associated carcinoma. **Cancer Res.**, v.73, n.3, p. 1245-55, 2013.
- BARRETO, G.P.M.; BENASSI, M.T.; MERCADANTE, A.Z. Bioactive Compounds from Several Tropical Fruits and Correlation by Multivariate Analysis to Free Radical Scavenger Activity. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.20, n.10, p.1856-1861, 2009.
- BARROS-NETO, B.; SACARMINO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos, pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 401 p. Campinas: Ed. da UNICAMP; 2003.
- BATAGLIA, O.C. et al. **Métodos de Análise Química de Plantas**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1983. 48p. (Boletim Técnico, 78).
- 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**, v. 239, p. 70-76, 1996.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, maio/ago., 1999.
- BOOTS, A.W.; HAENEN, G.R.M.M.; BAST, A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, p. 325-337, 2008.
- BOZAN, B.; TOSUN, G.; OZACAN, D. Study of polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antiradical activity. **Food Chemistry**, v. 109, p. 426–430, 2008.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, London, v. 28, n.1, p. 25-30, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, Vol. 56, No. 11, pp.317-333, 1998.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Vitamin E: The shrew waiting to be tamed. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, p. 543–554, 2009.

BROINIZI, P.R.B.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; NOVOA, A.J.V.; TORRES, R.P.; AZEREDO, H.M.C. et al. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n.4, p. 902-908, 2007.

BRUBACHER, G.; MULLER-MULOT, W.; SOUTHGATE, D.A.T. **Methods for the determination of vitamins in food**. New York: Elsevier, 1985, 97-106p.

CADENAS, E. & DAVIES, K.J.A. Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress And Aging. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, n. 3/4, p. 222–230, 2000.

CAMPOS, E.B.P.; YOSHIDA, W.B. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. **J Vasc Br.**, v.3, n.4, p.357-66, 2004.

CAMPOS, F.M. & ROSADO, G.P. Novos Fatores de Conversão de Carotenóides Provitamínicos A. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25, n.3, p. 571-578, 2005.

CAMPOS, F.M.; RIBEIRO, S.M.R.; LUCIA, C.M.D.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M. Optimization of methodology to analyze ascorbic and dehydroascorbic acid in vegetables. **Química Nova**, v.32, n.1, 2009.

CARR, A.C. & FREI, B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. **Am J Clin Nutr.**, v.69, p.1086–107, 1999.

CARDOSO, L.M.; MARTINO, H.S.D.; MOREIRA, A.V.B.; RIBEIRO, S.M.R.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M.; Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the cerrado of Minas Gerais, Brazil: physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. **Food Research International**, v.4, n.7, p. 2151-2154, 2011a.

CARDOSO, P.C.; TOMAZINI, A.P.B.; STRINGHERA, P.C.; RIBEIRO, S.M.R.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M. Vitamin C and carotenoids in organic and conventional fruits grown in Brazil. **Food Chemistry**, v.126, n.2, p. 411-416, 2011b.

CASTELO-BRANCO, V.N. & TORRES, A.G. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. **Rev. Nutr.**, v. 24, n. 1, p.173-187, 2011.

CATANIA, A.S.; BARROS, C.R.; FERREIRA, S.R.G. Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v.53, n.5, 2009.

CERQUEIRA, F.M. et al. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quím. Nova**, v. 30, n. 2, p.441-449, 2007.

CHAPPLE, S.J.; SLOW, R.C.M.; MANN, G.E. Crosstalk between Nrf2 and the proteasome: Therapeutic potential of Nrf2 inducers in vascular disease and

aging. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, p.1315–1320, 2012.

CHENG, Z.; REN, J.; LI, Y.; CHANG, W.; CHEN, Z. Study on the Multiple Mechanisms Underlying the Reaction Between Hydroxyl Radical and Phenolic Compounds by Qualitative Structure and Activity Relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 4067–4073, 2002.

CHOBOT, V. Simultaneous Detection of Pro- and Antioxidative Effects in the Variants of the Deoxyribose Degradation Assay. **J Agric Food Chem.**, v.58, n.4, p. 2088–2094, 2010.

CHUNG, E.Y. et al. Resveratrol down-regulates interferon- γ -inducible inflammatory genes in macrophages: molecular mechanism via decreased STAT-1 activation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, p. 902–909, 2011.

CHOBOT, V. Simultaneous Detection of Pro- and Antioxidative Effects in the Variants of the Deoxyribose Degradation Assay. **J Agric Food Chem.**, v.58, n.24, p. 2088–2094, 2010.

ČÍŽ, M. et al. The Influence of Wine Polyphenols on Reactive Oxygen and Nitrogen Species Production by Murine Macrophages RAW 264.7. **Physiol. Res.**, v.57, p.393-402, 2008.

CÍZ, M.; CÍZOVÁ, H.; DENEV, P.; KRATCHANOVA, M.; SLAVOV, A.; LOJEK, A. Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. **Food Control.**, v. 21, p. 518–523, 2010.

CRAFT, N.E. & SOARES, J.H. (1992). Relative solubility and absorptivity of lutein and β -carotene in organic solvents. **J. Agric. Food Chem.**, v. 40, p. 431-434, 1992.

CRESPY, V. & WILLIAMSON, G. A Review of the Health Effects of Green Tea Catechins in In Vivo Animal Models. **J. Nutr.** 134: 3431S–3440S, 2004.

COMINETTI, C.; DE BORTOLI, M.C.; GARRIDO, A.B.; COZZOLINO, S.M.F. Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women. **Nutrition Research.**, v. 32, p. 403-407, 2012.

DALVI, L.T. Mecanismos de ação antioxidante de origem vegetal: estudo do polifenol ácido elágico e do extrato de caqui (*Diospyros kaki*). Brasília-DF, 2008, 129p. (**Dissertação de mestrado** – Universidade de Brasília – UnB).

DECKER, E.A. & CLARKSON, P.M. Dietary sources and bioavailability of essential and nonessential antioxidants. In: SEN, C.K; PACKER, L.; HANNINEN, O. **Oxidants and Antioxidants in Exercise**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 2000. Cap. 13. p.323-358.

DIXON, R.A.; XIE, D.; SHARMA, S.B. Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? **New Phytologist.**, v. 165, n.9, p. 9–28, 2005.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando Sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n.2, p. 446-452, 2006.

ELSAYED, N.M. Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental: nutritional interaction. **Nutrition**, v.17, p.828-834, 2001.

FALLER, A. L. K.; FIALHO E. Disponibilidade de polifenóis no Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 43, n. 2, p. 211-218, 2009.

FIGUEIRINHA, A.; PARANHOS, A.; PÉREZ-ALONSO, J.J.; SANTOS-BUELGA, C.; BATISTA M.T. Cymbopogon citratus leaves: Characterisation of flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. **Food Chemistry**, v. 110, p. 718–728, 2008.

FILGUEIRAS, C.T.; SOARES, A.L.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E.I. Avaliação da atividade antioxidante de ácido fítico de germe de milho. **Química Nova**, v. 32, n.7, p. 1787-1791, 2009.

FINCO, F.D.B.A.; SILVA, I.G.; OLIVEIRA, R.B. Physicochemical Characteristics and Antioxidant Activity of Three Native Fruits From Brazilian Savannah (Cerrado). **Alim. Nutr.**, v. 23, n. 2, p. 179-185, 2012.

FIRUZI, O.; LACANNA, A.; PETRUCCI, R.; MARROSUB, G.; SASO, L. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by ferric reducing antioxidant power Q assay and cyclic voltammetry. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1721, p. 174-184, 2005.

FUKUMOTO, L.R.; MAZZA, G. Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v.48, n.8, pp 3597–3604, 2000.

GALANO, A.; VARGASZ, R.; MARTINEZ, A. Carotenoids can act as antioxidants by oxidizing the superoxide radical anion. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v.12, p.193–200, 2010.

GAULEJAC, N.S.; GLORIES, Y.; VIVAS, N. Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines. **Food Research International**, v.32, p. 327-333, 1999.

GIBELLINI, L.; PINTI, M.; NASI, M.; MONTAGNA, J.P.; BIASI, S.; ROAT, E. et al. Quercetin and Cancer Chemoprevention. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

GORDON, A.; JUNGFER, E.; SILVA, B.A.; MAIA, J.G.S.; MARX, F. Phenolic Constituents and Antioxidant Capacity of Four Underutilized Fruits from the Amazon Region. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, n.14, p.7688–7699, 2011.

GUIMARÃES, M.M. & SILVA, M.S. Valor nutricional e características químicas e físicas de frutos de murici-passa (*Byrsonima verbascifolia*). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.28, n.4, p.817-821, 2008.

GÜLÇİN, I.; BURSAL, E.; SEHITOĞLU, M.H.; BILSEL, M.; GÖREN, A.C. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2227–2238, 2010.

GUSMÃO, E.; VIEIRA, F.A.; FONSECA JÚNIOR, E.M. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. Ex A. Juss.). **Cerne**, v.12, n.1, pp.84-91, 2006.

HÄKKINEN, S.; HEINONEN, M.; KÄRENLAMPI, S.; MYKKÄNEN, H.; RUUSKANEN, J.; TÖRRÖNEN, R. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. **Food Research International**, v. 32, n.5, p.345-353, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M.C.; ARUOMA, O.I. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. **Analytical Biochemistry**, v. 165, p. 215-219, 1987.

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

HALLIWELL, B., & GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine** (3rd ed.). Oxford University Press, 1999.

HERMES-LIMA, M.; PONKA, P. SCHILMAN, H.M. The iron chelator yridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and its analogues prevent damage to 2-deoxyribose mediated by ferric iron plus ascorbate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1523, p.154-160, 2000.

HERRERA-RUIZ, M.; ZAMILPA, A.; GONZÁLEZ-CORTAZAR, M.; REYES-CHILPA, R.; LEÓN, E.; GARCÍA, M.P. et al. Antidepressant effect and pharmacological evaluation of standardized extract of flavonoids from *Byrsonima crassifolia*. **Phytomedicine**, v. 18, n.14, p.1255-1261, 2011.

HIGDON, J.V.; FREI, B. Obesity and Oxidative Stress: A Direct Link to CVD? **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.23, p. 365-367, 2003.

IOM - Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. **Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc**. Washington, D.C., National Academy Press, 2001, 797p.

IOM - Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. **Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorous, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride**. Washington, D.C., National Academy Press, 1997.

IOM - Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. **Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids**. Washington, D.C., National Academy Press, 2000, 529p.

ISLAM, K.N.; O'BYRNE, D.; DEVARAJ, S.; PALMER, B.; GRUNDY, S.M.; JIALAL, I. Alpha-tocopherol supplementation decreases the oxidative susceptibility of LDL in renal failure patients on dialysis therapy. **Atherosclerosis**, v.150, n.1, p.217-224, 2000.

JARDINI, F.A. & MANCINI FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, 2007.

JÁUREGUI, ME.E.C.; CARRILLO, M.C.C.; ROMO, F.P. Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.61, n.3, 2011.

KHASSAF, M.; MCARDLE, A.; ESANU, C.; VASILAKI, A.; MCARDLE, F.; GRIFFITHS, R.D. et al. Effect of vitamin C supplements on antioxidant defence and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle. **J Physiol.**, v.549, n.2, p. 645–652, 2003.

KIM, J.E.; LEITE, J.O.; DEOGBURN, R.; SMYTH, J.A.; CLARK, R.M.; FERNANDEZ, M.L. A lutein-enriched diet prevents cholesterol accumulation and decreases oxidized LDL and inflammatory cytokines in the aorta of guinea pigs. **J Nutr.**, v.141, n.8, p.1458-63, 2011.

KIM, J.; CHA, Y.N.; SURH, Y.J. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. **Mutat. Res.**, v. 690, p.12-23, 2010.

KITSATI, N.; FOKAS, D.; OUZOUNI, M.; MANTZARIS, M.D.; BARBOUTI, A.; GALARIS, D. Lipophilic Caffeic Acid Derivatives Protect Cells against H₂O₂-Induced DNA Damage by Chelating Intracellular Labile Iron. **J. Agric. Food Chem.**, v.60, p. 7873–7879, 2012.

KONG, L.D.; CAI, Y.; HUANG, W.W.; CHENG, C.H.; TAN, R.X. Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout. **J Ethnopharmacol.**, v. 73, n.1-2, p. 199-207, 2000.

LEOPOLD, J.A.; LOSCALZO, J. Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v.47, p.1673–1706, 2009.

LI, Y.; SKOUROUMOUNIS, G.K.; ELSEY, G.M.; TAYLOR, D.K. Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. **Food Chemistry**, v. 129, p. 570–576, 2011.

LIMA, V.B.S.; SAMPAIO, F.A.; BEZERRA, D.L.C.; MOITA NETO, J.M.; MARREIRO, D.N. Parameters of glycemic control and its relationship with the zincemia and the activity of the superoxide dismutase enzyme in type 2 diabetic patients. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v.55, n.9, 2011.

LIMA, E.S. & ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, 2001.

LIMA, A. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*) São Paulo, 2008. 186p. (Tese de Doutorado—Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

LIN, C.M.; CHEN, C.S.; CHEN, C.T.; LIANG, Y.C.; LIN, J.K. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 294, p. 167–172, 2002.

LIN, S.J.; SHYUE, S.K.; LIU, P.L. et al. Adenovirus-mediated overexpression of catalase attenuates oxLDL-induced apoptosis in human aortic endothelial cells via AP-1 and C-Jun N-terminal kinase pathways. **J Mol Cell Cardiol.**, v.36, p. 29–39, 2004.

LIU, R.H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **Am J Clin Nutr.**, v.78, n.3, p. 517S-520S, 2003.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**, vol. 1. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2009.

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

MAGALHÃES, R.C.N.; ARAÚJO, C.G.B.; LIMA, V.B.S.; NETO, J.M.M.; NOGUEIRA, N.; MARREIRO, D.N. Nutritional status of zinc and activity superoxide dismutase in chronic renal patients undergoing hemodialysis. **Nutrición Hospitalaria**, v. 26, p. 1456-1461, 2011.

MALDINI, M.; SOSA, S.; MONTORO, P.; GIANGASPERO, A.; BALICK, M.J.; PIZZA, C. et al. Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, n.3, p.430-433, 2009.

MALDINI, M.; MONTORO, P.; PIZZA, C. Phenolic compounds from *Byrsonima crassifolia* L. bark: phytochemical investigation and quantitative analysis by LC-ESI MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, p. 1-6, 2011.

MALTA, L.G.; GHIRALDINI, F.G.; REIS, R.; OLIVEIRA, M.V.; SILVA, L.B.; PASTORE, G.M. In vivo analysis of antigenotoxic and antimutagenic properties of two Brazilian Cerrado fruits and the identification of phenolic phytochemicals. **Food Research International**, v. 49, n.1, p. 604-611, 2012.

MANACH, C.; DONOVAN, J. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. **Free Radical Research**, Vol.38, No.8, pp.771-785, 2004.

MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil Society**, v. 45, p. 594-598, 1968.

MARES-PERLMAN J, MILLEN A, FICEK T, HANKINSON S. The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. Overview. **J Nutr.**, v.132, p.518S–24S, 2002.

MATES, J.M.; PEREZ-GOMEZ, C.; BLANCA, M. Chemical and biological activity of free radical ‘scavengers’ in allergic diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 296, p.1–15, 2000.

MAZUMDER, P.M.; RATHINAVELUSAMY, P.; SASMAL, D. Role of antioxidants in phytomedicine with special reference to antidiabetic herbs. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, p.969-979, 2012.

MENDANHA, D.M.; FERREIRA, H.D.; FELÍCIO, L.P.; SILVA, E.M.; PEREIRA, D.G.; NUNES, W.B.; CARVALHO, S. Modulatory effect of *Byrsonima verbascifolia* (Malpighiaceae) against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genet. Mol. Res.**, v.9, n.1, p. 69-77, 2010.

MÉNDEZ, E. et al. Validation of the Rancimat test for the assessment of the relative stability of fish oils. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 73, n. 8, p. 1033-37, 1996.

MILLER, H.E. **A simplified method for the evaluation of antioxidant.** J. Am. Oil Society, v. 48, p. 91, 1971.

Mitochondrial Stress and ROS. Biofiles, v.6, n.22. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com>> Acessado em 17/11/2012.

MICHIELS, J.A.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J.O.; DOMMES, J. Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 986-993, 2012.

MORAN, J.F.; KLUCAS, R.V.; GRAYER, R.J.; ABIAN, J.; BECANA, M. Complexes of Iron with Phenolic Compounds from Soybean Nodules and Other Legume Tissues: Prooxidant and Antioxidant Properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v.22, n.5, p.861-870, 1997.

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

MORTENSENA, A.; SKIBSTEDA, L.H.; SAMPSONB, J.; RICE-EVANS, C. EVERETT, S.A. Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. **FEBS Letters**, v. 418, p. 91-97, 1997.

MÜLLER, L.; FRÖHLICH, K.; BÖHM, V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxyl radical scavenging assay. **Food Chemistry**, v. 129, p. 139–148, 2011.

NA, H.; SURH, Y. Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 1271–1278, 2008.

NAGAO, A.; SEKI, M.; KOBAYASHI, H. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. **Biosci Biotechnol Biochem.**, v. 63, n.10, p. 1787-90, 1999.

NAKAMURA, Y.K.; OMAE, S.T. Vitamin E-modulated gene expression associated with ROS generation. **Journal of Functional Foods**, v. 1, p. 241 – 252, 2009.

NARUSE, R.; SUETSUGU, M.; TERASAWA, T.; ITO, K.; HARA, K.; TAKEBAYASHI, K. et al. Oxidative stress and antioxidative potency are closely associated with diabetic retinopathy and nephropathy in patients with type 2 diabetes. **Saudi Med J.**, v.34, n.2, p.135-41, 2013.

NAWAZ, H.; SHI, J.; MITTAL, G.S.; KAKUDA, Y. Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. **Separation and Purification Technology**, v. 48, p. 176–181, 2006.

NIKI, E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. **Free Radic Biol Med.**, v. 47, n.5, p. 469-84, 2009.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 503–515, 2010.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **J Agric Food Chem.**, v.49, p. 4619-26, 2001.

PAMPLONA, R.; DALFO, E.; AYALA, V.; BELLMUNT, M. J.; PRAT, J.; FERRER, I.; PORTERO-OTIN, M. Proteins in human brain cortex are modified by oxidation, glycox- idation, and lipoxidation: effects of Alzheimer disease and identification of lipoxidation targets. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p.21522–21530, 2005.

PACHER, P.; NIVOROZHKIN, A.; SZABÓ, C. Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. **Pharmacol Rev.**, v.58, p. 87–114, 2006.

PALSAMY, P.; SUBRAMANIAN, S. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2–Keap1 signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1812, p. 719–731, 2011.

PARDO-ANDREU, G.L.; DELGADO, R.; NÚÑEZ-SELLÉS, A.J.; VERCESI, A.E. Dual mechanism of mangiferin protection against iron-induced damage to 2-deoxyribose and ascorbate oxidation. **Pharmacological Research**, v. 53, p. 253–260, 2006.

PAVLICK, K.P.; LAROUX, F.S.; FUSELER, J.; WOLF, R.E.; GRAY, L.; HOFFMAN, J.; GRISHAM, M.B. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in Inflammatory bowel disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 3, p. 311–322, 2002.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; DÍAZ- RUBIO, M.E.; SERRANO, J.; GONÍ, I.; et al. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, v.41, p. 274–285, 2008.

PEREZ-GUTIERREZ, R.M.; MUÑIZ-RAMIREZ, A.; GOMEZ, Y.G.; RAMÍREZ E.B. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antiglycation effects of *Byrsonima crassifolia* fruit and seed in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Plant Foods Hum Nutr.**, v. 65, n. 4, p. 350-357, 2010.

PINCHUK, H.; SHOVAL, Y.; DOTAN, D.L. Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 165, p. 638 – 647, 2012.

POLLACK, M. & LEEUWENBURGH, C. Molecular mechanisms of oxidative stress in aging: free radicals, aging, antioxidants and disease. In: SEN, C.K.; PACKER, L.; HANNINEN, O. **Oxidants and Antioxidants in Exercise**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 2000. Cap. 30. p.881-923.

POLYAKOV, N.E.; LESHINA, T.V.; KONOVALOVA, T.A.; KISPERT, L.D. Carotenoids as scavengers of free radicals in a Renton reaction: antioxidants or pro-oxidants? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 3, p. 398–404, 2001.

PRIOR et al. Assays for hidrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **J Agric Food Chem.**, v.51, p. 3273-3279, 2003.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 4290–4302, 2005.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 3396–3402, 2000.

QUEIROZ, Y.S.; SOARES, R.A.M.; CAPRILES, V.D.; TORRES, E.A.F.S.; AREAS, J.A.G. Efeito do processamento na atividade antioxidante do grão de amaranto (*Amaranthus cruentus* L. BRS-Alegria). **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 59, n.4, 2009.

RAMIREZ, M.; COTERA, F.L.; PEREZ GUTIERREZ, R.M. Anti-inflammatory activity of the hexane extract of *Byrsonima crassifolia* seeds in experimental animal models. **Altern Ther Health Med.**, v.19, n.1, p. 26-36, 2013.

RATNAM, D.V.; ANKOLA, D.D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D.K.; RAVI KUMAR, M.N.V. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, p. 189-207, 2006.

RAZALI, N.; MAT-JUNIT, S.; ABDUL-MUTHALIB, A.F.; SUBRAMANIAM, S.; ABDUL-AZIZ, A. Effects of various solvents on the extraction of antioxidant phenolics from the leaves, seeds, veins and skins of *Tamarindus indica* L. **Food Chemistry**, v. 131, n.2, p. 441-448, 2012.

RE, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, n.9/10, p.1231-1237, 1999.

REED, T.T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, p.1302–1319, 2011.

RIBEIRO, M.A.; BARNARDO,-GIL, M.G.; ESQUÍVEL, M.M. Melissa officinalis, L.: study of antioxidant activity in supercritical residues. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 21, n.1, p. 51-60, 2001.

RIETJENS, I.M.C.M.; BOERSMA, M.G.; HAAN, L.; SPENKELINK, B.; AWAD, H.M.; CNUBBEN, N.H.P et al. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoid. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 11, p. 321–333, 2002.

RODRIGO, R.; MIRANDA, A.; VERGARA, L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, p. 410–424, 2011.

RODRIGUES, M.I. & IEMMA, A.F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. 1 ed. Campinas, São Paulo: Casa do Pão Editora, 2005.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **A guide to carotenoid analysis in food**. Washington: Internation Life Sciences Institute. 2001.

ROSA, J.S.; GODOY, R.L.O.; OIANO NETO, J.; CAMPOS, R.S.; MATTA, V.M.; FREIRE, C.A. et al. Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência e exclusão iônica. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.27, n.4, p. 837-846, 2007.

RÖSSIG, L.; HOFFMANN, J.; HUGEL, B.; MALLAT, Z.; HAASE, A.; FREYSSINET, J. et al. Vitamin C Inhibits Endothelial Cell Apoptosis in Congestive Heart Failure. **Circulation**, v.104, p. 2182-2187, 2001.

ROYER, M.; DIOUF, P.N.; STEVANOVIC, T. Polyphenol contents and radical scavenging capacities of red maple (*Acer rubrum* L.) extracts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2180–2188, 2011.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMENES, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Comunicado técnico on line/Embrapa**, Fortaleza, 2006.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996–1002, 2010.

SÁ, M. C & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Optimization of HPLC quantification of carotenoids in cooked green vegetables – Comparison of analytical and calculated data. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.17,p. 37-51, 2004.

SACRAMENTO, C.K.; SOUZA, F. X. Cajá (*Spondias mombin* L.). **Jaboticabal: FUNEP**, (Série Frutas Nativas), 42p. 2000

SAHGAL, G.; RAMANATHAN, S.; SASIDHARAN, S.; MORDI, M.N.; ISMAIL, S.; MANSOR, S.M. In Vitro antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of methanolic *Swietenia mahagoni* seed extracts. **Molecules**, v. 14, n.6, p. 4476-85, 2009.

SCALBERT, A.; JOHNSON, I.T.; SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **Am J Clin Nutr.**, v.81 (1 Suppl), p. 215S-217S, 2005.

SCHEIBMEIRA, H.D.; CHRISTENSENA, K.; WHITAKERA, S.H.; JEGAETHESANA, J.; CLANCYB, R.; JANET, D. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. **Pierce Intensive and Critical Care Nursing**, v.21, p. 24-28, 2005.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, JR., J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. **Am J Enol Viticult.**, 16: 144-58, 1965.

SHARMA, R.& VINAYAK, M. α -Tocopherol prevents lymphoma by improving antioxidant defence system of mice. **Mol Biol Rep.**, v.40, n.2, p.839-849, 2013.

SHI, J.; YU, J.; POHORLY, J.E.; KAKUDA, U. Polyphenolics in Grape Seeds - Biochemistry and Functionality. **J Med Food**, v.6, n.4, p. 291–299, 2003.

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

SILVA, M.R.; LACERDA, D.B.C.L.; SANTOS, G.G.; MARTINS, D.M.O. Caracterização química de frutos nativos do cerrado. **Ciência Rural**, v.38, n.6, p.1790-1793, 2008.

SIMOS, Y.V.; VERGNADIS, I.I.; TOLIOPOULOS, I.K; VELALOPOULOU, A.P.; KARAGOUNIS, I.V.; KARKABOUNAS, S.C. et al. Effects of catechin and epicatechin on superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity, in vivo. **Redox Rep.**, v.17, n.5, p. 181-6, 2012.

SOHI, K.K.; MITTAL, N.; HUNDAL, M.K.; KHANDUJA, K.L. Gallic acid, an antioxidant, exhibits antiapoptotic potential in normal human lymphocytes: A Bcl-2 independent mechanism. **J Nutr Sci Vitamino.**, v.49, n.4, p. 221-7, 2003.

SOMMERBURG O, KEUNEN JE, BIRD AC, VAN KUIJK FJ. Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes. **Br J Ophthalmol.**, v.82, p. 907–10, 1998.

SORRENTI, V.; DI GIACOMO, C.; RUSSO, A.; ACQUAVIVA, R.; BARCELLONA, M.L. ; VANELLA, A. Inhibition of LDL Oxidation by Red Orange (*Citrus sinensis*) Extract and its Active Components. **Journal of Food Science**, v.69, n.6, p.480-484, 2004

SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; KONDOH, H.; LLEONART, M.E. Oxidative stress and cancer: an overview. **Ageing Research Reviews**, v. 12, p. 376–390, 2013.

SOUZA, V.R.; PEREIRA, P.A.P.; QUEIROZ, F.; BORGES, S.V.; CARNEIRO, J.D.S. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, v.134, p. 381–386, 2012a.

SOUZA, R.O.; SIQUEIRA, S.; ROGEZ, H.; FONSECA, M.J.V. Photochemoprotective effect of *Byrsonima crassifolia* extract against oxidative damage induced by UVA radiation in fibroblast cell culture. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n.1, p.105, 2012b.

SOUZA, J.N.S.; SILVA, E.M.; LOIR, A.; REES.; ROGEZ, J.; LARONDELLE Y. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological *in vitro* assays. **Food Chemistry**, v. 106, n.1, p. 331-339, 2008.

SPOSITO, A.C.; CAMELLI, B.; FONSECA, F.A.H.; BERTOLAMI, M.C.; AFIUNE, N.A.; SOUZA, A.D. et al. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v.28 (Supl 1), p. 2-19, 2007.

STAHL, W. & SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1740, p. 101– 107, 2005.

STEPHENS, J.W.; KHANOLKAR, M.P.; BAIN, S.C. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. **Atherosclerosis**, v. 202, p. 321–329, 2009.

SULAIMAN, S.F.; SAJAK, A.B.; OOI, K.L.; SUPRIATNO; SEOW, E.M. Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 4-5, p. 506-515, 2011.

TABART, J.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J.; DOMMES, J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1226–1233, 2009.

TAKAYA, K. et al. Validation of the multiple sensor mechanism of the Keap1-Nrf2 system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, p. 817–827, 2012.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.58, p. 100–110, 2004.

TAUBERT, D.; BREITENBACH, T.; LAZAR, A.; CENSAREK, P.; HARLFINGER, S.; BERKELS, R. et al. Reaction Rate Constants of Superoxide Scavenging by Plant Antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, n. 12, p. 1599–1607, 2003.

TINAHONES, F.J.; MURRI-PIERRI, M.; GARRIDO-SÁNCHEZ, L.; GARCÍA-ALMEIDA, J.M.; GARCÍA-SERRANO, S.; GARCÍA-ARNÉS, J.; GARCÍA-FUENTES, E. Oxidative Stress in Severely Obese Persons Is Greater in Those With Insulin Resistance. **Obesity**, v.17, n.2, pp. 240–246, 2009.

THAIPONGA, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 669–675, 2006.

THOO, Y.Y.; HO, S.K.; LIANG, J.Y.; HO, C.W.; TAN, C.P. Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). **Food Chemistry**, v. 120, n.1, p.290-295, 2010.

THOUNAOJAM, M.C.; JADEJA, R.N.; DEVKAR, R.V.; RAMACHANDRAN, A.V. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Sida rhomboidea*. Roxb methanolic extract determined using different *in vitro* models. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales e Aromáticas**, v.9, n.3, p.191-198, 2010.

TREVITHICK-SUTTON, C.C.; FOOTE, C.S.; COLLINS, M.; TREVITHICK, J.R. The retinal carotenoids zeaxanthin and lutein scavenge superoxide and hydroxyl radicals: A chemiluminescence and ESR study. **Molecular Vision**, v. 12, p.1127-35, 2006.

TSAO, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. **Nutrients**, Vol.2, pp. 1231-1246, 2010.

TUNG, Y.; CHANG, S. Inhibition of xanthine oxidase by *Acacia confusa* extracts and their phytochemicals. **J. Agric. Food. Chem.**, v.58, p. 781-786, 2010.

UENOJO, M.; MARÓSTICA JUNIOR, M.R.; PASTORE, G.M.. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Quim. Nova**, v. 30, n. 3, p.616-622, 2007.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1–40, 2006.

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

VAN ACKER, S.B.E.; KOYMANS, L.M.H.; BAST, A. Molecular pharmacology of vitamin E: structural aspects of antioxidant activity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 15, p. 311-328, 1993.

VAN HOORN, D.E.; NIJVELDT, R.J.; VAN LEEUWEN, P.A.; HOFMAN, Z.; M'RABET, L.; DE BONT, D.B.; VAN NORREN, K. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. **European Journal of Pharmacology**, v. 451, p. 111-118, 2002.

VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E.A.M.; CUNHA, D.F.; JUNQUEIRA-FRANCO, M.V.M.; BERNARDES, M.M.; JORDÃO-JR, A.A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v.31, n.4, p.31-44, 1998.

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

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos para sua Determinação. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VIDAL, A.; FALLARERO, A.; ANDRADE-WARTA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; LIMA, A.; TORRES, R.P. et al. Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum*(S.G.Gmelin) Howe. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.42, n.4, p.589-600, 2006.

VIEIRA, R.F.; AGOSTINI-COSTA, T.S.; SILVA, D.B.; SANO, S.M.; FERREIRA, F.R. **Frutas nativas da região centro-oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010.

VIGNOLI, J.A.; BASSOLI, D.G.; BENASSI, M.T. Atividade antioxidante de cafés torrado e solúvel: padronização e validação de métodos. **Coffee Science**, v.7, n.1. p. 68-75, 2012.

VINCENT, H.K.; TAYLOR, A.G. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. **Int J Obes**, v.30, n.3, p. 400-18, 2006.

WIJEKOON, M.M.J.O.; BHAT, R.; KARIM, A.A. Effect of extraction solvents on the phenolic compounds and antioxidant activities of bunga kantan (*Etlingera elatior* Jack.) inflorescence. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.24, n. 4–5, p. 615–619, 2011.

WOOD, J.E.; SENTHILMOHANA, S.T.; PESKIN, A.V. Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pHs. **Food Chemistry**, v. 77, p. 155–161, 2002.

YANG, H.; ROBERTS, L.J.; SHI, M.J.; et al. Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu,Zn-SOD dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. **Circ Res.**, v.95, p.1075–81, 2004.

YANISHLIEVA, N.; MARINOVA, E.M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p.377-382. 1995.

YAMAGUCHI, Y., KUNITOMO, M., HAGINAKA, J. Assay methods of modified lipoproteins in plasma. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v.781, pp. 313-330. 2002.

YEN, G.C.; CHEN, Y.C.; CHANG, W.T.; HSU, C.L. Effects of polyphenolic compounds on tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced changes of adipokines and oxidative stress in 3T3-L1 adipocytes. **J Agric Food Chem.**, v.59, n.2, p. 546-51, 2011.

YEN, G.; DUH, P.; TSAI, H. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. **Food Chemistry**, v. 79, p. 307–313, 2002.

YOKOTA, T.; KINUGAWA, S.; YAMATO, M.; HIRABAYASHI, K.; SUGA, T.; TAKA, S. et al. Systemic Oxidative Stress Is Associated With Lower Aerobic Capacity and Impaired Skeletal Muscle Energy Metabolism in Patients With Metabolic Syndrome. **Diabetes Care**, 2013.

ZHOU, K. & YU, L. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. **LWT - Food Science and Technology**, v.37, n.7, p. 717–721, 2004.

ZHU, J.; WANG, C.G.; XU, Y.G. Lycopene attenuates endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats by reducing oxidative stress. **Pharm Biol.**, v.49, n.11, p.1144-9, 2011.

ZINGG, J. Vitamin E: An overview of major research directions. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 28, p. 400–422, 2007.

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

ANEXO 1 – Primeira página do currículo Lattes do aluno

Mariana Séfora Bezerra Sousa

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/5128391992666610>
Última atualização do currículo em 05/02/2013

Mestranda em Nutrição em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo - USP. Formada em Nutrição pela Universidade Federal do Piauí (2010). Especialista em Nutrição Humana e Saúde pela Universidade Federal de Lavras/Minas Gerais - UFLA (2011). Tem experiência na área de Bromatologia, Nutrição e Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT), Compostos Bioativos em Alimentos e seus Efeitos Fisiológicos. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome

Mariana Séfora Bezerra Sousa

Nome em citações bibliográficas

SOUSA, M.S.B.; SÉFORA, M.; SÉFORA-SOUSA, M.

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição.
Av. Dr. Arnaldo, 715 - Cerqueira César - 01246-904 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30617705
URL da Homepage: <http://www.fsp.usp.br>

Formação acadêmica/titulação

2011

Mestrado em andamento em Nutrição em Saúde Pública (Conceito CAPES 6).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Mecanismos de ação antioxidante de extratos de murici (*Byrsonima crassifolia*)
Orientador: Deborah Helena Markowicz Bastos.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

2010 - 2011

Especialização em Nutrição Humana e Saúde. (Carga Horária: 420h).
Universidade Federal de Lavras, UFLA, Brasil.
Título: Mecanismos Moleculares de Ação de Polifenóis de Uvas e Vinho Tinto contra os Processos Oxidativos e Inflamatórios envolvidos na Aterosclerose.
Palavras-chave: Resveratrol, LDL-ox, Citocinas, Nrf2, MAPK, NF-kB, AP-1, PPAR, Desacetilases de Histonas.
Orientador: Dr. Michel Cardoso de Angelis.

2005 - 2010

Graduação em Nutrição.
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Brasil.
Título: Estado Nutricional Relativo ao Zinco em Pacientes com Câncer de Mama.
Orientador: Dra. Dilina do Nascimento Marreiro.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

ANEXO 2 – Primeira página do currículo Lattes do orientador

Deborah Helena Markowicz Bastos

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2

• Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2399624390092442>

Última atualização do currículo em 10/03/2013

Graduada em Engenharia Agrônômica pela Universidade de São Paulo (1982), mestrado em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo (1989) e doutorado em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas (1996). Atualmente é Professor Associado da Universidade de São Paulo (obteve o título de Livre-Docente em dezembro de 2007). É docente colaborador do Mestrado Erasmus Mundus- FIPDes. É editor associado do periódico *Molecules* desde 2007. Atua como revisor de vários periódicos da área e como Assessor Científico de várias Instituições de fomento à pesquisa (FAPESP, FAPEMAT, CNPq). Tem experiência na área de Nutrição, com ênfase em Composição de Alimentos, atuando principalmente nos seguintes temas: análise e composição de alimentos, alimentos funcionais e compostos bioativos. Tem desenvolvido ações junto à FAO para a avaliação dos indicadores da biodiversidade da dieta. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome

Deborah Helena Markowicz Bastos

Nome em citações bibliográficas

Bastos, D.H.M.; Markowicz Bastos, D.H.; Bastos, D.M.; Bastos, Deborah H. Markowicz

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição.

Av. Dr. Arnaldo, 715 - Cerqueira César - 01246-904 - São Paulo, SP - Brasil

Telefone: (11) 30617855, Ramal: 244

Formação acadêmica/titulação

2007

Livre-docência.

Faculdade de Saúde Pública -USP.

Título: Erva-mate (*Ilex paraguariensis*): compostos bioativos e funcionalidade, Ano de obtenção: 2007.

2008 - 2008

Pós-Doutorado.

Touro University.

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.

Grande área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Ciência de Alimentos. .

1993 - 1996

Doutorado em Engenharia de Alimentos (Conceito CAPES 7).

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.

Título: Compostos voláteis de méis de eucalipto e laranja, Ano de obtenção: 1996.

Orientador: Maria Regina Bueno Franco.

Palavras-chave: mel; compostos voláteis; sabor; cromatografia gasosa de alta eficiência; análise sensorial.

1984 - 1989

Mestrado em Ciências dos Alimentos (Conceito CAPES 7).

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Extrusão termoplástica de pulmão bovino, Ano de Obtenção: 1989.

Orientador: José Alfredo Gomes Arêas.