UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante de frutos da Amazônia: chopé (*Gustavia augusta* L.), sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) e macambo (*Theobroma bicolor*)

Dora Enith García de Sotero

Tese para a obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Jorge Mancini-Filho

São Paulo
2002

Dora Enith García de Sotero

Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante de frutos da Amazônia: chopé (*Gustavia augusta* L.); sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) e macambo (*Theobroma bicolor*)

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

_____
Prof. Dr. Jorge Mancini-Filho
orientador/presidente

_____
Prof. Dr. Lireny Aparecida

_____
Prof. Dr. Massayoshi Yoshida

_____
Prof. Dr. Dulcinéia Saes Parra Abdalla

_____
Prof. Dr. Luiz Antônio Gioielli

São Paulo, 28 de Fevereiro de 2002

A Deus, pela vida e fortaleza que me proporciona em todo instante

À memória
da minha Mãe: TEODOMIRA TORRES de GARCÍA

Ao meu Pai
Aos meus Irmãos
Ao meu Esposo e
Aos meus Filhos

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jorge Mancini-Filho, que como orientador e amigo deu valiosa orientação para assim tornar possível a realização deste trabalho.

Aos integrantes do Departamento de Alimentos e Nutrição experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela magnífica colaboração dada nos diferentes laboratórios do Departamento, onde tive a oportunidade de desenvolver o trabalho.

Ao Departamento de Química da Faculdad de Ingenieria Química de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana por ter proporcionado a permissão de afastamento para o aperfeiçoamento profissional.

Ao Programa de Estudantes de Convênio/Pós Graduação (PEC/PG), a CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Agradecimentos à FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto: “Antioxidantes naturais presentes nos alimentos”, processo N° 99/03970-1.

À Rogério de Jesus Souza, especial agradecimento, pela demonstração de amizade sincera e apoio desinteressado na iniciação deste Doutorado.

Ao pessoal do Laboratório de lípides Rosângela, Maria Elena, Elaine, Nara, Ana Vladia, Céphora, Fabiana, Priscila especial agradecimento pelo apoio dado nos momentos mais difíceis, pela colaboração, amizade e carinho demostrado no dia a dia; e da mesma forma para a minha amiga Durvalina.

Ao pessoal da Secretaria do Departamento de Alimentos e Nutrição experimental, Angela, Isabel e Mónica, pela colaboração e demonstração de carinho e amizade em todo momento.

À Bibliotecária Adriana de Almeida Barreiros, pela atenção proporcionada durante o desenvolvimento do trabalho, e disponibilidade na revisão das referências bibliográficas.

Ao pessoal da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia, Benedita, Elaine e Jorge, pelas orientações e informações fornecidas com muita atenção e cordialidade.

A meus irmãos pelo apoio nos momentos de fraqueza, pela constante motivação e demonstração de amor e carinho. Enfim, a todos os amigos, que de uma ou outra maneira apoiaram o desenvolvimento do presente trabalho.

SUMÁRIO

Lista de ilustrações..... I
Lista de quadros..... IV
Lista de tabelas..... V
Lista de abreviaturas e siglas..... VIII
Lista de símbolos..... IX
Resumo..... X
Abstract..... XI

1. INTRODUÇÃO..... 1

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 3

2.1. Chopé..... 3
2.1.1. Identificação e Distribuição..... 3
2.1.2. Descrição..... 3
2.1.3. Projeção..... 4
2.2. Sacha Mangua..... 5
2.2.1. Identificação e Distribuição..... 5
2.2.2. Descrição..... 5
2.2.3. Valor Nutricional..... 6
2.2.4. Projeção..... 6
2.3. Macambo..... 7
2.3.1. Identificação e Distribuição..... 7
2.3.2. Descrição..... 8
2.3.3. Valor Nutricional..... 9
2.4. Fibra Alimentar..... 10
2.4.1. Definição..... 10
2.4.2. Efeitos fisiológicos..... 12
2.4.3. Aspectos analíticos..... 13
2.5. Radicais Livres..... 14
2.6. Espécies Reativas do Oxigênio (ERO's)..... 15
2.6.1. Radical Hidroxila ($OH^{\bullet}$)..... 16
2.6.2. Radical Superóxido ($O_2^{\bullet\ -}$)..... 17
2.6.3. Óxidos de Nitrogênio ($NO^{\bullet}$, $NO_2^{\bullet}$)..... 17
2.6.4. Radicais Peroxila ($RO_2^{\bullet}$)..... 18
2.7. Estresse Oxidativo..... 18
2.8. Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's) e as Conseqüências.....
Biológicas. 19
2.8.1. Lípides..... 20
2.8.2. Peroxidação de outras moléculas lipídicas..... 22
2.8.3. Proteínas..... 24

2.8.4. DNA..... 24
2.9. Antioxidantes..... 26
2.9.1. Antioxidantes em alimentos e sistemas biológicos..... 26
2.9.2. Avaliação dos antioxidantes nos sistemas biológicos..... 29
2.9.3. Natureza dos antioxidantes..... 29
2.9.4. Fontes dos antioxidantes naturais..... 30
2.10. Compostos fenólicos..... 33
2.11. Metabolismo dos polifenóis..... 34

3. 0BJETIVOS..... 37

4. MATERIAL E MÉTODOS..... 38
4.1. Material..... 38
4.1.1. Frutos..... 38
4.1.2. Animais..... 38
4.1.3. Reagentes..... 38

4.2. Métodos..... 39
4.2.1. Obtenção da farinha para as análises..... 39
4.2.2. Determinação da composição centesimal..... 40
4.2.2.1. Determinação da umidade..... 40
4.2.2.2. Determinação de lípides totais..... 40
4.2.2.3. Determinação da proteína total..... 40
4.2.2.4. Determinação das cinzas..... 41
4.2.2.5. Determinação das frações fibra..... 41
4.2.2.5.1. Tratamento dos cadinhos..... 41
4.2.2.5.2. Tratamento da lã de vidro..... 42
4.2.2.5.3. Preparo do hidrolisado..... 42
4.2.2.5.4. Determinação da fibra alimentar insolúvel... 43
4.2.2.5.5. Determinação da fibra alimentar solúvel..... 43
4.2.2.6. Determinação dos carboidratos..... 44
4.2.3. Obtenção dos extratos..... 44
4.2.4. Determinação do teor de matéria seca dos extratos e das frações..... 46
4.2.5. Obtenção da fração lipídica..... 46
4.2.6. Esterificação e identificação dos ácidos graxos..... 47
4.2.7. Determinação de compostos fenólicos..... 48
4.2.7.1. Obtenção de ácidos fenólicos livres e seus ésteres.... 48
4.2.7.1.1. Extração de ácidos fenólicos livres..... 48
4.2.7.1.2. Tratamento do resíduo dos ácidos fenólicos livres..... 50
4.2.7.1.3. Extração de ácidos fenólicos solúveis..... 50
4.2.7.1.4. Extração de ácidos fenólicos insolúveis..... 51
4.2.7.2. Padrões dos compostos fenólicos..... 51
4.2.7.3. Silanização dos padrões, das frações fenólicas e dos

extratos..... 51
4.2.8. Identificação dos compostos fenólicos nas amostras..... 52
4.2.9. Atividade antioxidante em sistema aquoso..... 53
4.2.10.Estudo cinético da atividade antioxidante em sistema aquoso. 54
4.2.11. Atividade antioxidante em sistemas lipídicos..... 55
4.2.11.1. Método da estufa "*Shall* test"..... 55
4.2.11.2. Método do Rancimat..... 55
4.2.12. Procedimento experimental "in vivo" 57
4.2.13. Avaliação da capacidade antioxidante no sistema "in vivo"..... 58
4.2.14. Quantificação do conteúdo de proteína..... 60
4.2.15. Cálculo das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)..... 61
4.2.16. Análise estatística..... 61

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 62

5.1. Composição centesimal..... 62
5.2. Análise da composição dos ácidos graxos dos lípides..... 63
5.3. Concentração de matéria seca..... 64
5.3.1. Atividade antioxidante em sistema aquoso..... 65
5.3.2. Compostos fenólicos identificados por cromatografia em fase gasosa associada ao espectro de massa..... 88
5.3.2.1. Nos extratos das amostras..... 88
5.3.2.2. Nas frações fenólicas das amostras..... 91
5.4. Atividade antioxidante em sistemas lipídicos..... 94
5.5. Avaliação da atividade antioxidante *"*in vivo*"* na composição dos ácidos graxos..... 102
5.5.1. Influência dos compostos fenólicos *in vivo* presentes nas amostras..... 103
5.5.2. Atividade antioxidante "in vivo" no tecido adiposo..... 103
5.5.3. Atividade antioxidante *"*in vivo*"* no fígado..... 105
5.5.4. Atividade antioxidante "in vivo*"* no cérebro..... 109
5.5.5. Atividade antioxidante *"*in vivo*"* no plasma..... 111

6. CONCLUSÕES..... 114

7. ANEXOS..... 116

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 125

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1. Obtenção dos extratos etérico, alcoólico e aquoso da farinha dos frutos de chopé, sacha mangua e macambo..... 45

Esquema 2. Extração e separação das frações dos ácidos fenólicos nas farinhas de chopé, sacha mangua e macambo: ácidos fenólicos livres, ácidos fenólicos de ésteres solúveis e ácidos fenólicos de ésteres insolúveis para análises em cromatografia gasosa..... 49

Figura 1. Terminologia do complexo fibra dietética..... 11

Figura 2. Efeitos fisiológicos da fibra dietética..... 13

Figura 3. Peroxidação do ácido graxo com 3 duplas ligações..... 23

Figura 4. Ataque das ERO's à proteína..... 25

Figura 5. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etéreo da farinha da polpa de chopé (C) no sistema β-caroteno/ácido linoléico..... 70

Figura 6. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etéreo da farinha da polpa de sacha mangua (SM) no sistema β-caroteno/ácido linoléico 70

Figura 7. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etéreo da farinha das sementes de macambo (M) no sistema β-caroteno/ácido linoléico..... 71

Figura 8. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato alcoólico da farinha da polpa de chopé (C) no sistema β-caroteno/ácido linoléico..... 71

Figura 9. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato alcoólico da farinha da polpa de sacha mangua (SM) no sistema β-caroteno/ácido linoléico..... 72

Figura 10. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato alcoólico da farinha das sementes de macambo (M) no sistemaβ-caroteno/ácido linoléico..... 72

Figura 11. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso da farinha da polpa de chopé (C) no sistema β-caroteno/ácido linoléico..... 73

Figura 12. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso da farinha da polpa de sacha mangua(SM) no sistema β-carotene/ácido linoléico..... 73

Figura 13. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso da farinha das sementes de macambo (M) no sistema β-caroteno/ácido linoléico..... 74

Figura 14. Curva cinética do potencial antioxidante da fração livre de ácidos fenólicos da farinha da polpa de chopé (C) no sistema β-caroteno/ácido linoléico 81

Figura 15. Curva cinética do potencial antioxidante da fração livre de ácidos fenólicos da farinha da polpa de sacha mangua (SM) no sistema β-caroteno/ácido linoléico 82

Figura 16. Curva cinética do potencial antioxidante da fração livre de ácidos fenólicos da farinha das sementes de macambo (M) no sistema β-caroteno/ácido linoléico com..... 82

Figura 17. Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ésteres solúveis de ácidos fenólicos da farinha da polpa de chopé (C) no sistema β-caroteno/ácido linoléico..... 83

Figura 18. Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ésteres solúveis de ácidos fenólicos da farinha da polpa de sacha mangua (SM) no sistema β-caroteno/ácido linoléico 83

Figura 19. Curva cinética do potencial antioxidante da fração de éste res solúveis de ácidos fenólicos da farinha das sementes de macambo (M) no sistema β-caroteno/ácido linoléico 84

Figura 20. Curva cinética do potencial antioxidante da fração insolúvel de ácidos fenólicos da farinha da polpa do chopé (C) no sistema β-caroteno/ácido linoléico..... 84

Figura 21. Curva cinética do potencial antioxidante da fração insolúvel de ácidos fenólicos da farinha da polpa da sacha mangua (SM) no sistema β-caroteno/ácido..... 85

Figura 22. Curva cinética do potencial antioxidante da fração insolúvel de ácidos fenólicos da farinha das sementes do macambo (M) no sistema β-caroteno/ácido linoléico..... 85

Figura 23. Capacidade antioxidante das frações fenólicas do macambo em óleo de soja medida através do Índice de peróxido no mé todo da estufa a 60°C..... 96

Figura 24. Capacidade antioxidante das frações fenólicas do macambo em óleo de soja medida pela presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no método da estufa a 60 °C..... 97

Figura 25. Capacidade antioxidante das frações fenólicas do macambo em óleo de soja medida pela formação de dienos conjugados no método da estufa a 60 °C..... 98

Figura 26. Porcentagem do período de indução com extratos de chopé (CHO) medida no método de Rancimat a 110°C..... 100

Figura 27. Porcentagem de aumento do período de indução dos extratos da sacha mangua (SM) medida pelo método de Rancimat a 110°C..... 101

Figura 28. Porcentagem do período de indução dos extratos do macambo (M) medido pelo método de Rancimat a 110°C..... 101

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Análise bromatológica da polpa do fruto da sacha mangua (*Grias neuberthii*)base seca..... 7

Quadro 2. Análise bromatológica da polpa e da polpa com as sementes do fruto de macambo (*Theobroma bicolor*)..... 9

Quadro 3. Limite máximo de uso de aditivos em alimento no Brasil..... 27

Quadro 4. Funções dos antioxidantes..... 28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Determinações da composição centesimal da farinha da polpa dos frutos do chopé (*Gustavia augusta* L.) e sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) e das sementes do fruto do macambo (*Theobroma bicolor*)..... 62

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos da fração lipídica da polpa dos frutos do chopé (*Gustavia augusta* L.), sacha mangua (*G. neuberthii* Macbr.) e das sementes do fruto do macambo (*Theobroma bicolor*)..... 64

Tabela 3. Teor de matéria seca dos extratos da farinha da polpa dos frutos do chopé (*Gustavia augusta* L.), sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) e das sementes do fruto do macambo (*Theobroma bicolor*..... 65

Tabela 4. Porcentagem de inibição da oxidação dos extratos da farinha da polpa dos frutos do chopé (*Gustavia augusta* L.), sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) e das sementes do fruto do macambo (*Theobroma bicolor* 67

Tabela 5. Parâmetros cinéticos do potencial antioxidante no sistema β-caroteno/ácido linoléico do extrato etéreo da farinha da polpa de chopé, sacha mangua e semente de macambo..... 76

Tabela 6. Parâmetros cinéticos do potencial antioxidante no sistema β-caroteno/ácido linoléico do extrato alcoólico da farinha da polpade chopé, sacha mangua e semente de macambo..... 76

Tabela 7. Parâmetros cinéticos do potencial antioxidante no sistema β-caroteno/ácido linoléico do extrato aquoso da farinha da polpa de chopé, sacha mangua e sementes do macambo 77

Tabela 8. Teor de matéria seca das frações fenólicas da farinha da polpa dos frutos do chopé (*Gustavia augusta* L.), sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) e das sementes do macambo (*Theobroma bicolor*)..... 77

Tabela 9. Porcentagem de inibição da oxidação das frações fenólicas da farinha da polpa dos frutos do chopé (*Gustavia augusta* L.), sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) e das sementes do fruto do macambo (*Theobroma bicolor*.)..... 79

Tabela 10. Parâmetros cinéticos do potencial antioxidante no sistema β-caroteno/ácido linoléico das frações de ácidos fenólicos livres da farinha da polpa de chopé, sacha mangua e da semente do macambo 86

Tabela 11. Parâmetros cinéticos do potencial antioxidante no sistema β-caroteno/ácido linoléico das frações de ácidos fenólicos de ésteres solúveis da farinha da polpa de chopé, sacha mangua e da semente do macambo 87

Tabela 12. Parâmetros cinéticos do potencial antioxidante no sistema β-caroteno/ácido linoléico das frações de ácidos de ésteres insolúveis da farinha da polpa de chopé, sacha mangua e da semente do macambo..... 87

Tabela 13. Compostos fenólicos identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectro de massa nos extratos da farinha da polpa do fruto do chopé (*Gustavia augusta* L.)..... 90

Tabela 14. Compostos fenólicos identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada ao expectro de massa nos extratos da farinha da polpa do fruto da sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.)..... 90

Tabela 15. Compostos fenólicos identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada ao expectro de massa nos extratos da farinha das sementes do fruto do macambo (*Theobroma bicolor*)..... 91

Tabela 16. Compostos fenólicos identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada ao expectro de massa nas frações fenólicas da farinha da polpa do fruto do chopé (*Gustavia augusta* L.)..... 93

Tabela 17 Compostos fenólicos identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada ao expectro de massa nas frações fenólicas da farinha da polpa do fruto do macambo (*Theobroma bicolor*)..... 93

Tabela 18. Compostos fenólicos identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada ao expectro de massa, nas frações fenólicas da farinha das sementes do fruto da sacha mangua (*Grias. neuberthii* Macbr.)..... 94

Tabela 19. Capacidade antioxidante das frações fenólicas do macambo (*Theobroma bicolor*) em óleo de soja medida através do Índice de peróxido no método da estufa a 60 °C..... 96

Tabela 20. Capacidade antioxidante das frações fenólicas do macambo (*Theobroma bicolor*) em óleo de soja medida pela presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no método da estufa a 60 °C..... 99

Tabela 21. Capacidade antioxidante das frações fenólicas do macambo (*Theobroma bicolor*) em óleo de soja medida pela formação de dienos conjugados no método da estufa a 60 °C..... 98

Tabela 22. Porcentagem do período de indução, em óleo de soja refinado, dos extratos de chopé, sacha mangua e macambo a 110°C: Método de Rancimat..... 100

Tabela 23. Médias da percentagem no aumento do peso dos ratos controle e dos ratos que foram administrados 200 μL do extrato aquoso dos frutos de chopé, sacha mangua e macambo durante 28 dias..... 103

Tabela 24. Perfil de ácidos graxos do tecido adiposo dos ratos controle e dos ratos que foram administrados 200 μL do extrato aquoso dos frutos durante 28 dias..... 104

Tabela 25 Peroxidação lipídica dos fígados dos ratos controle e dos ratos que foram administrados 200 μL do extrato aquoso dos frutos durante 28 dias..... 106

Tabela 26. Perfil de ácidos graxos dos fígados dos ratos controle e dos ratos que foram administrados 200 μL do extrato aquoso dos frutos durante 28 dias..... 108

Tabela 27. Perfil de ácidos graxos dos cérebros dos ratos controle e dos ratos que foram administrados 200 μL do extrato aquoso dos frutos durante 29 dias..... 110

Tabela 28. Perfil de ácidos graxos do plasma dos ratos controle e dos ratos que foram administrados 200 μL do extrato aquoso dos frutos durante 28 dias..... 112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHT	Hidroxibutiltolueno
TBHQ	Tercio butilidroquinona
BHA	Hidroxibutilanisol
PG	Propilgalato
AACC	American Association of Cereal Chemist's
FDA	Food and Drug Administration
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
PUFA	Ácidos graxos poliinsaturados
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
CNS	Conselho Nacional de Vigilância Sanitária
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AFL	Ácidos fenólicos lívres
AFES	Ácidos de ésteres Solúveis
AFEI	Ácidos fenólicos de ésteres Insolúveis
DE/EA/THF	Éter etílico/acetato de etila/tetraidrofurano
BSA	[N, O-bis (trimetilsilil)-acetamida]
D.O.	Densidade Ótica
F_1, F_2	Fatores Cinéticos
AOCS	American Oil Chemists' Society
TBARS	Substâncias Reativas ao ácido tiobarbitúrico
TMP	1,1,3,3-tetrametoxipropano
AA	Porcentagem da atividade antioxidante
ni	Não identificado
FAI	Fibra Alimentar Insolúvel
FAS	Fibra Alimentar Solúvel
MDA	Malonaldeído
PTN	Proteína

LISTA DE SÍMBOLOS

N	Normalidade de soluções
M	Molaridade de soluções
mM	Mili molar
P/v	Peso/volume
v/v	Volume/volume
ηm	Nanometro
μL	Microlitro
rpm	Rotações por minuto
PI	Período de Indução
$PI_{amostra}$	Período de Indução do óleo de soja + o extrato da amostra
$PI_{controle}$	Período de indução do óleo de soja

RESUMO

Polpas dos frutos chopé (*Gustavia augusta* L.) e sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) e sementes dos frutos de macambo (*Theobroma bicolor*) foram utilizadas na determinação da composição centesimal e da atividade antioxidante de seus extratos. Na quantificação da composição centesimal foram analisados os teores de umidade, proteínas, lipídeos, carboidratos, fibras e cinzas. Na avaliação da atividade antioxidante foram utilizados os extratos etéreo, alcoólico e aquoso, os quais foram obtidos de forma sequencial a partir das farinhas secas e peneiradas (32-mesh). Estas farinhas também foram fracionadas para a obtenção das frações ricas em ácidos fenólicos livres (AFL), ácidos fenólicos de ésteres solúveis (AFES) e ácidos fenólicos de ésteres insolúveis (AFEI).

Tanto nos diferentes extratos como nas diferentes frações foi determinada a atividade antioxidante "*in vitro*", empregando-se o sistema aquoso β-caroteno/ácido linoléico e no meio lipídico através do método de Rancimat a 110°C e o método da estufa a 60°C. Os compostos fenólicos foram identificados por CG-EM. Tendo em vista que o extrato aquoso das amostras apresentou melhor atividade antioxidante, este foi utilizado nas avaliações "*in vivo*" em ratos. Amostras de fígado, plasma, cérebro, tecido adiposo foram obtidas após 29 dias de fornecimento dos extratos por gavagem para os animais. Nestes tecidos foram avaliados os teores de ácidos graxos, onde pode ser observada uma certa proteção dos ácidos graxos insaturados, a qual pode estar relacionada com os antioxidantes naturais presentes nos extratos.

Palavras chaves: Chopé, Sacha mangua, Macambo, antioxidantes naturais, compostos fenólicos, atividade antioxidante, análise bromatológica.

ABSTRACT

The centesimal composition and antioxidant activity of Chopé (*Gustavia augusta* L.) and Sacha Mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) fruits pulps and macambo (*Theobroma bicolor*) seeds were evaluated. The moisture, proteins, lipids, carbohydrates, fibers and ashes contents were determined for the centesimal composition.

The etheric, alcoholic and aqueous extracts from the fruits were sequentially obtained from dried and 32-mesh-sifted floors and their antioxidant activity were analyzed. The fractions of free-acid phenolics (FAP), soluble ester of acid phenolics (SEAP) and unsoluble ester of acid phenolics (IEAP) were obtained from the same floors.

The *in vitro* antioxidant activity was determined for all samples: different extracts and fractions. The aqueous system β-carotene/linoleic acid was employed and in the lipidic medium was used the Rancimat system (110°C) and stove (60°C) method. The phenolic compounds were identified and quantified by GC-MS method. The highest antioxidant activity was achieved in the aqueous extracts, these were used *in vivo* utilizing rats as experimental animals. Liver, plasma, brain and fat tissues samples were obtained 29-days after the animals had been received by gavagem. In these tissues, the fatty acids contents were evaluated and it was observed a certain protection to the unsaturated fatty acids, which can be related to the natural antioxidant substances present in the extracts.

Key words: Chope, Sacha Mangua, Macambo, natural antioxidants, phenolic compounds, antioxidant activity, centesimal analysis.

1. INTRODUÇÃO

Os lipídeos desempenham um papel importante na qualidade de certos produtos alimentícios, particularmente em relação às propriedades organolépticas que os tornam desejáveis, tais como: "*flavor*", cor, textura. Por outro lado, conferem valor nutritivo aos alimentos, constituindo uma fonte de energia metabólica, de ácidos graxos essenciais (ácido linoléico, ácido linolênico e ácido araquidônico) e das vitaminas A, D, E e K, que são lipossolúveis. A oxidação lipídica é um fenômeno espontâneo e inevitável, com uma implicação direta no valor comercial e nutritivo dos alimentos e de todos os produtos que a partir deles são formulados. A peroxidação lipídica constitui a principal causa de deterioração dos ácidos graxos, a qual pode ocorrer em processos de transformação e armazenamento. Alterações do tipo oxidativo, as quais têm como principal conseqüência a modificação do "*flavor*" original e o aparecimento de odores e sabores característicos do ranço, representam para o consumidor, ou para as industrias, uma importante causa de rejeição ou depreciação (SILVA, et al., 1999b).

Atualmente, nos alimentos processados, especialmente aqueles que possuem na sua composição compostos lipídeos, devem ser tomadas medidas que permitam limitar o processo oxidativo durante as fases de processamento e armazenamento dos produtos. Dentro dessas medidas a adição de antioxidantes é, sem dúvida, uma prática corrente, razão que justifica o atual interesse pela pesquisa de novos compostos com capacidade antioxidante (HEINONEN et al., 1997).

Entre os antioxidantes sintéticos mais usados na indústria de alimentos, temos o hidroxibutiltolueno (BHT), o hidroxibutilanisol (BHA), os galatos de propila (PG) a terciobutilidroquinona (TBHQ). Estudos recentes consideram que estes compostos podem causar danos ao organismo, abrindo assim, um caminho à pesquisa de novas fontes de antioxidantes naturais que possam

substituir os sintéticos com a mesma ou melhor qualidade e que não produzam danos no organismo.

Nos Estados Unidos a regulamentação para o emprego de antioxidantes em alimentos é controlado pelas instituições: Federal Food, Drug, Cosmetic Act, Meat Inspection Act, Poultry Inspection Act e várias leis estaduais. Em geral a maioria de países, tem regulamentada a utilização isolada ou combinada dos antioxidantes sintéticos em quantidades não superiores a 200 ppm. No Brasil, esta regulamentação, é controlada pela Resolução CNNPA de 24 de Novembro de 1988, publicado no Diário Oficial da União de 19/12/1988.

Antioxidantes são substâncias que apresentam a propriedade de inibir as alterações oxidativas que podem sofrer uma molécula. Todas as moléculas presentes na natureza são alvos potenciais do dano oxidativo: lipídeos, proteínas, ácidos nucléicos, carboidratos entre outras (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1994).

Entre os principais antioxidantes naturais tem-se os compostos fenólicos, o ácido ascórbico, o α-tocoferol, os carotenóides, sendo encontrados com maior freqüência nas fontes vegetais destacando-se os frutos, sementes e óleos vegetais.

A fim de incorporar novas fontes de antioxidantes naturais avaliou-se os extratos dos mesocarpos do chopé (*Gustavia augusta* L.), sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) e da semente do macambo (*Theobroma bicolor*), cujos frutos foram coletados nos arredores da cidade de Iquitos-Perú.

Neste trabalho objetivou-se estudar, além das análises relativas à composição centesimal e a fração lipídica de três frutas da Região Amazônica, mas também a atividade antioxidante de seus extratos, tanto "*in vitro*" quanto "*in vivo*"; tendo-se em consideração que estes constituem parte da dieta da comunidade amazônica e mais especificamente os da Amazônia peruana.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CHOPÉ

2.1.1. Identificação e distribuição

O Chopé (*Gustavia augusta* L.) é uma espécie originária da Amazônia, da família Lecytidaceae, distribui-se na bacia do Amazonas, abrangendo os seguinte países: Brasil, Colômbia, Equador, Venezuela, Guiana, Suriname e Perú. Os nomes populares são chope, chopé masha, sacha chopé no Perú; cocora na Colômbia; jeniparana, jandiparana, janiparandiba, japaranduba, japuaranduba, pau-fedorento, general, mucurão no Brasil; tripa de pollo no Equador. Ocorre preferentemente na mata de terra firme de solos argilosos ou arenosos e, ocasionalmente na várzea onde atinge o maior porte. Apesar de ocorrer na mata primária densa, pode ser encontrada também em formações abertas e secundárias (LORENZI, 1992; FLORES PAYTAN, 1997).

As condições ambientais de adaptação do chopé são: temperatura anual máxima de 25 °C e mínima de 23,2 °C; precipitação pluvial anual máxima de 3419 mm e mínima de 1020 mm; desde o nível do mar até 900 m sobre o nível do mar. Desenvolve-se em terrenos não inundáveis, preferentemente em solos férteis, com abundante matéria orgânica e boa drenagem (LORENZI, 1992; FLORES PAYTAN, 1997).

2.1.2. Descrição

O chopé é uma árvore grande, extremamente ornamental, principalmente pelo perfume de suas flores; pode ser empregada com sucesso no paisagismo em geral. Na floresta amazônica atinge 30 m. de altura e 50 cm de diâmetro e quando cultivada é uma árvore pequena de até 8 m de altura e 20 cm de diâmetro. As folhas são simples e opostas.

Os frutos em número de 3 a 5 por inflorescência são pixídeos não operculados, ovóides de 6-7 cm de diâmetro, o epicarpo é de cor verde claro que torna-se marrom com o amadurecimento; o mesocarpo tem textura macia, de cor alaranjada intensa, com sabor amanteigado; é comestível, consumido diretamente *"in natura"*. A polpa quando separada do fruto, pode ser conservada sob refrigeração até 60 dias ou mais, mantendo a qualidade e o valor nutricional. O fruto apresenta de 2 a 10 sementes de forma cônicas, com 3-5 cm de comprimento e 3 cm de largura. O chopé floresce durante grande parte do ano, porém com maior intensidade nos meses de outubro a dezembro. A maturação de seus frutos ocorre predominantemente nos meses de março a maio (LORENZI, 1992; FLORES PAYTAN, 1997).

2.1.3. Projeção

O cultivo do chopé apresenta grande potencial econômico na Região Amazônica. Apresenta facilidade de adaptação à ecologia; a polpa tem potencial comercial como alimento natural nutritivo e como fonte de óleo da polpa comestível de boa qualidade; a torta pode ser usada na indústria de alimentos balanceados para gado (FLORES PAITAN, 1997).

2.2. SACHA MANGUA

2.2.1. Identificação e distribuição

A sacha mangua (*Grias* neuberthii Macbr.) é uma espécie da família Lecythidaceae nativa da Amazônia, originária do Sul da Colômbia, Equador e Norte do Perú. Os nomes populares deste fruto são: Sacha mangua, Sacha mango, mangua (Perú); cocora, cocoro, pepeguará (Colômbia); pitón (Equador) (FLORES PAYTAN, 1997). Distribui-se na bacia amazônica nas localidades de Porto Asis (Putumayo) na Colômbia; no rio Solimões até Caballo-cocha (Loreto) no Perú (MORI & PRANCE, 1990; DUKE & VASQUEZ, 1994; FORES PAYTAN, 1997).

As condições ambientais de adaptação da sacha mangua são: temperatura média anual máxima de 25.1°C e mínima de 23,2°C; precipitação pluvial máximo por ano de 3419 mm e mínimo de 1020 mm; altitude variável, até 1000 m sobre o nível do mar. Desenvolve-se preferencialmente em terrenos férteis e temporariamente alagáveis (FLORES PAYTAN, 1997).

2.2.2. Descrição

É uma árvore de 20 – 25 m de altura, o caule é reto pouco ramificado cujo diâmetro varia entre 30 – 40 cm, as folhas são simples, grandes, agrupam-se na parte terminal do caule e dos galhos, a inflorescência em cachos são desenvolvidos no caule, as flores são bissexuais. A espécie produz frutos quase o ano todo, sendo a maior produção nos meses de fevereiro até abril (FLORES PAYTAN, 1997). O fruto é de forma elipsoidal de 8 – 17 cm de comprimento e 5 – 9 cm de diâmetro de cor parda clara e peso varia entre 152 – 783 gr, o epicarpo é fino de 1 – 2 mm de espessura; mesocarpo de cor amarela quando maduro, de 0,5 – 1,0 cm de espessura; contém uma semente grande com peso que varia entre 50–240g (FLORES PAYTAN, 1997).

2.2.3. Valor nutricional

A polpa do fruto maduro é comestível têm sabor muito agradável e consome-se diretamente no estado natural podendo-se combinar com farinha. O óleo da polpa de alguns ecotipos oleosos é extraído fervendo o mesocarpo. Os frutos coletados no início da maturação amadurecem após 3 a 4 dias; mas são muito perecíveis. A polpa do fruto apresenta a análise bromatológica dado no quadro 1 (FLORES PAYTAN, 1997).

2.2.4. Projeção

A sacha mangua é uma espécie em processo de domesticação tradicional que têm um potencial como cultura no trópico úmido; apresentando vantagens de adaptação às condições ecológicas do solo da região amazônica; existe um mercado local para os frutos e um potencial industrial para a extração de óleo da polpa comestível. Na mata virgem e nas localidades agrícolas, dispõe-se de germoplasma de boa qualidade, com um potencial de melhoramento. As desvantagens são: alta variabilidade de espécie, alta tendência ao aborto de frutos; os frutos são perecíveis e não

existe desenvolvimento agronômico e tecnológico de conservação e de processamento do fruto; pouca difusão da espécie e de seu potencial produtivo e econômico (FLORES PAYTAN, 1997).

Quadro 1. Análise bromatológica da polpa do fruto da sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) base seca (FLORES PAYTAN, 1997)

Determinações	***100g de polpa***
Proteínas	7,47**%**
Lipídeos	18,30**%**
Cinzas	3,55**%**
Fibra	33,84**%**
Carboidrato	36,84**%**
Cálcio	215,17 mg.
Fósforo	140,82 mg.
Ferro	1,52 mg.
Carotenóides totais	2,23 mg.

2.3. MACAMBO

2.3.1. Identificação e distribuição

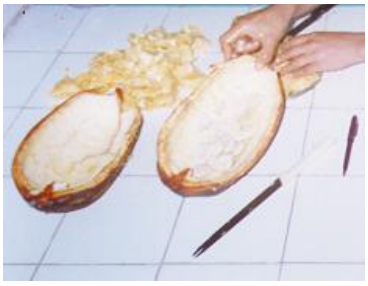
O macambo (*Theobroma bicolor*) é uma espécie da família Sterculiacea nativa da América Tropical, sendo originada provavelmente, da região amazônica. Os nomes populares são macambo no Perú; cacau do Perú no Brasil; macambo e bacau na Colômbia; e pataste (com algumas variações), nos outros países latino-americanos (CAVALCANTE, 1988; DUKE & VASQUEZ, 1994;GENTRY, 1996; FLORES PAYTAN, 1997).

O macambo está distribuído na bacia amazônica, não se podendo, entretanto, apontar com segurança sua região de origem, pelo fato de ser largamente cultivada desde o México, América Central, até o Norte da América do Sul incluindo a Amazônia. Em alguns desses lugares é

encontrado também, em estado espontâneo, na floresta densa ou aberta. Em Iquitos (Perú) e arredores é uma das árvores frutíferas mais comuns nos quintais (CAVALCANTE, 1988; DUKE & VASQUEZ, 1994; GENTRY, 1996).

As condições ambientais de adaptação do macambo são: temperatura anual máxima de 28 °C e mínima de 25 °C; precipitação pluvial máxima por ano de 3000 mm e mínimo de 900 mm; altitude variável, até 1000 m sobre o nível do mar. Desenvolve-se em terrenos não inundáveis (FLORES PAYTAN, 1997).

2.3.2. Descrição



É uma árvore de 25 – 30 m de altura na mata virgem e de 3 – 15 m quando cultivada. O tronco reto cilíndrico de 20 – 30 cm de diâmetro. Folhas simples e alternadas. O fruto é volumoso, oblongo elipsóideo, com até 35 cm de comprimento e 15 cm de diâmetro podendo atingir até 3 Kg de peso, possui em média 40 sementes por fruto, sendo que a cor do fruto é parda amarelada quando maduro o pericárpo é duro, lenhoso com 10 arestas longitudinais e reticulação lenhosa entre as mesmas. O tamanho da sementes varia de 16–30 mm de comprimento, 14–25 mm de largura e 8–13 mm de espessura; dispostas em 5 séries e envolvidas por uma polpa

amarelada fibrosa, com odor incomum. A frutificação ocorre entre os meses de agosto até abril (CAVALCANTE, 1988).

2.3.3. Valor nutricional

A polpa do fruto maduro é comestível, podendo ser consumida em seu estado natural e utilizada no preparo de sucos e sorvetes. Para o consumo deve ser separada da semente e prontamente manipulada para evitar perdas do valor nutricional decorrentes do processo do escurecimento. As sementes são consumidas fervidas ou assadas; são empregadas na culinária de forma similar às nozes e também no preparo de chocolate (CAVALCANTE, 1988; FLORES PAYTAN, 1997).

Quadro 2.- Análise bromatológica da polpa e da polpa com a semente do fruto de macambo (*Theobroma bicolor*) (FLORES PAYTAN, 1997)

Determinações	***100g de Polpa***	***100g de Polpa + Semente***
Umidade	88,00%	61,00%
Proteína	2,10%	6,70
Lipídeos	0,80%	9,20%
Fibras	0,70%	n.r
Cinzas	0,80%	n.r
Carboidratos	8,30%	21,50%
Cálcio	n.r	19,00 mg
Fósforog	44,00 mg	165,00 mg
Ferro	0,50 mg	1,70 mg
Vitamina A (retinol)	28,00 mg	nr
Tiamina	0,08 mg	0,95 mg
Riboflavina	0,09 mg	1,05 mg
Niacina	3,10 mg	1,20 mg
Vit. C	22,80 mg	9,20 mg

Nota: n.r = não registrado.

O macambo é um alimento que quando ingerido proporciona calorias, alguns minerais e vitamina C. As análises bromatológicas da polpa e da polpa com a semente estão apresentadas no quadro 2, segundo (FLORES PAYTAN, 1997).

2.4. FIBRA ALIMENTAR

Como será visto mais adiante, nossos resultados apresentaram um teor expressivo de fibras nos três frutos. Tendo em vista a importância das fibras na atualidade, decidimos acrescentar este item abordando as fibras e sua importância dietética dentro da revisão de literatura, apesar de não ser o objetivo central de nosso trabalho.

Até o final da década de sessenta, as fibras foram praticamente ignoradas como parte dos alimentos, consideradas como contaminantes que deveriam ser eliminados, ao invés de um componente valioso dos alimentos. Quando foi comprovado que o baixo consumo de fibras estava relacionado com os altos índices de doenças, tais como o câncer de cólon, doenças coronarianas e diabetes, aumentou, de um modo excepcional, o interesse pelas dietas com fibras (CROGHAN, 1995).

A fibra é uma parte integrante da dieta diária, e esta exerce efeitos fisiológicos diretos através do trato gastrointestinal, afetando de forma indireta as atividades metabólicas. A inter-relação destes efeitos é responsável pela possível influência desejável da fibra na regulação do peso, metabolismo dos carboidratos e lípides e função do cólon (SCHWEIZER & WÜRSCH, 1991).

2.4.1. Definição

O termo fibra alimentar no início foi definido por TROWELL (1974) como a parte das paredes celulares vegetais incluídas na dieta humana que

resiste à ação das secreções do trato gastrointestinal. Esta definição foi modificada por TROWELL et al., (1976) que conceituaram à fibra dietética como a soma dos polissacarídeos e ligninas que não são digeridas pela ação das secreções endógenas do trato gastrointestinal. CUMMINGS (1981) define a fibra em função das substâncias químicas que a compõe, sem incluir aspectos fisiológicos que não se conheciam exatamente. Uma proposta mais ampla foi dada por ASP (1987), que define a fibra dietética como polissacarídeos, exceto amido e lignina que não são digeridos ou absorvidos pelo intestino delgado humano. Os componentes da fibra alimentar, segundo SCHWEIZER & WÜRSCH (1991) são apresentados na figura 1.

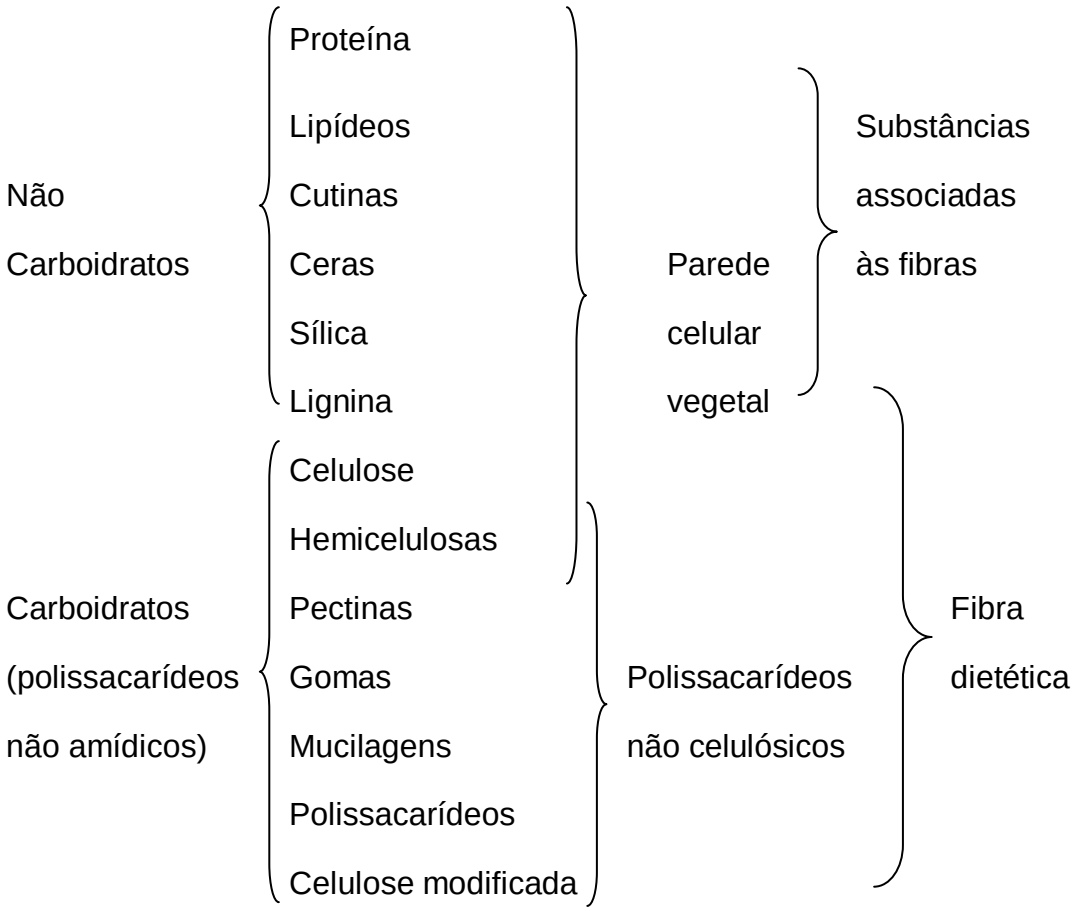


Figura 1. Terminologia do complexo fibra dietética. (SCHWEIZER & WÜRSCH, 1991)

A fibra alimentar é um complexo formado por vários compostos de natureza química diversificada. THEANDER & AMAN (1981) definiram à fibra alimentar em função de sua solubilidade em água em dois grupos:

- Fibra insolúvel inclui a celulose, hemicelulose, lignina, taninos, proteína, cutina ,cera, produtos da reação de Maillard e amido resistente.
- Fibra solúvel compreende a pectina, algumas hemiceluloses, polifenóis solúveis, gomas, mucilagens e proteína.

O conceito mais recente estabelecido pela "*American Association of Cereal Chemists*" (AACC) e reconhecido pela FDA, é que a fibra alimentar é a parte comestível de vegetais ou carboidratos análogos que são resistentes à digestão no intestino delgado humano e que sofrem fermentação parcial ou completa no intestino grosso. Como fibra alimentar inclui-se polissacarídeos, lignina e substâncias vegetais associadas. A fibra alimentar promove efeitos fisiológicos benéficos, tais como efeito laxante e/ou atenuação de colesterol sangüíneo e/ou atenuação da glicose sangüínea (PROSKY 2001).

2.4.2. Efeitos fisiológicos

Os efeitos fisiológicos da fibra alimentar vão estar em função dos componentes químicos que a formam e, portanto, de suas características físico-químicas, assim como dos processos tecnológicos que foram submetidos os alimentos. As principais ações fisiológicas da fibra alimentar estão relacionadas com a sua degradação bacteriana, capacidade de retenção de água, formação de soluções viscosas e capacidade de retenção de moléculas orgânicas e cátions metálicos (HERNANDEZ et al., 1995).

A fibra dietética segundo SCHWEIZER & WÜRSCH (1991) pode exercer efeitos fisiológicos através do trato gastrointestinal. Muitos destes

efeitos fisiológicos estão inter-relacionados e são origem de muitas conseqüências metabólicas, como pode-se ver na figura 2

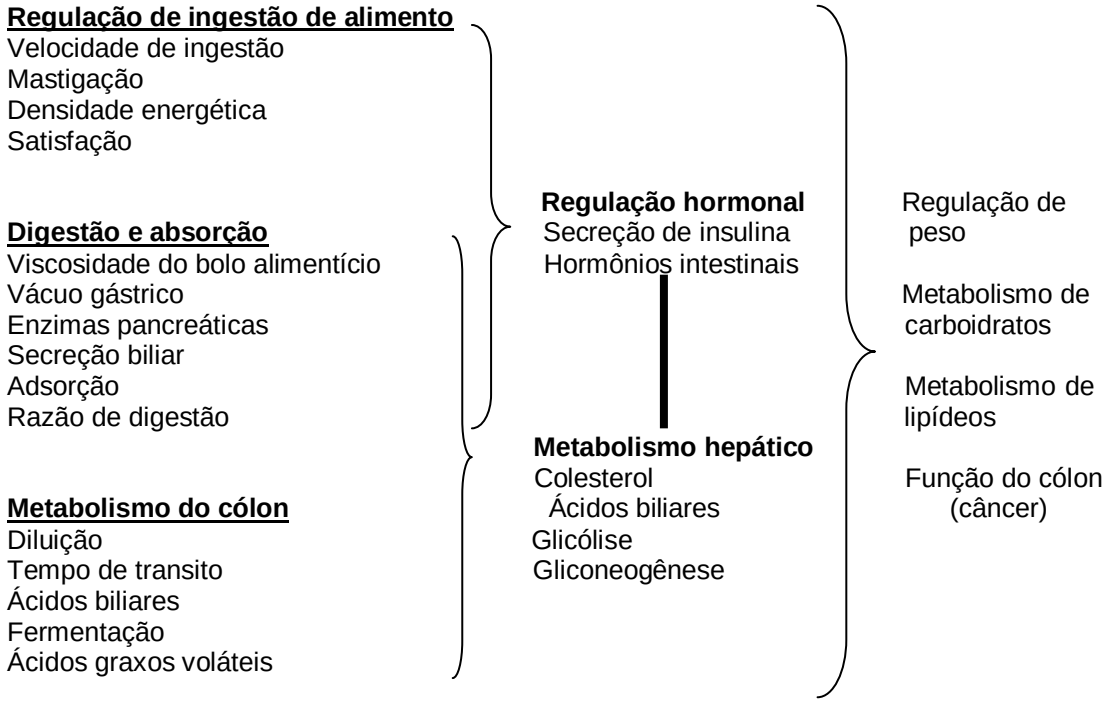


Figura 2. Efeitos fisiológicos da fibra dietética (SCHWEIZER & WÜRSCH, 1991)

2.4.3. Aspectos analíticos

A análise da fibra alimentar apresenta alguns problemas devido fundamentalmente ao fato da falta de unanimidade na definição de fibra, bem como à heterogeneidade dos seus componentes, que dificultam o desenvolvimento de métodos específicos para todos analitos e aplicáveis a todo tipo de alimento.

Os métodos de análises de fibra alimentar podem ser classificados em três grupos: químicos, enzimáticos–gravimétricos e enzimáticos–químicos. Todos eles têm em comum o pré tratamento da amostra, cuja finalidade é conseguir que a amostra esteja em condições adequadas para a

realização da análise; nesta etapa a amostra é submetida à moagem para assim assegurar a eficácia dos tratamentos enzimáticos e facilitar a centrifugação ou filtração dos extrato (HERNANDEZ et al., 1995; PROSKY, 2001).

Os métodos químicos são os métodos mais antigos e baseiam-se no tratamento dos alimentos com reagentes que solubilizam todos seus componentes, exceto a fibra, o qual é determinado gravimétricamente. Os métodos químicos utilizados são: fibra bruta e detergente neutro.

Os métodos enzimáticos-gravimétricos baseiam-se em submeter os alimentos a diversos tratamentos enzimáticos que permitam isolar e quantificar gravimétricamente o resíduo da fibra total ou da fibra solúvel e insolúvel.

Os métodos enzimático-químico são métodos desenhados para determinar a fibra alimentar mediante a análise do seus constituintes. Nestes métodos quantifica-se a fibra analisando, por um lado, os açúcares neutros e ácidos urônicos procedentes da fibra solúvel e, por outro analisando os açúcares neutros, os ácidos urônicos e a lignina obtidos da fibra insolúvel.

2.5. RADICAIS LIVRES

Radical livre é qualquer espécie química com capacidade de existência independente, que contém um ou mais elétrons não pareados ocupando orbitais atômicos ou moleculares. Os radicais livres são geralmente menos estáveis que os não radicais, embora a sua reatividade seja variável (PRYOR, 1966; GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1994; ARUOMA, 1998).

Quando dois radicais livres encontram-se, seus elétrons desemparelhados podem unir-se para formar espécies não radicalares. Porém, qualquer dos muitos radicais livres que são produzidos vão reagir

com as espécies não radicalares, formando novos radicais livres, e gerando as "reações em cadeia". (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; HALLIWELL et al., 1995; DONNELLI & ROBINSON, 1995).

A redução do oxigênio pode produzir dois radicais livres, o superóxido e o hidroxila, como pode-se ver nas reações apresentadas a seguir, (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1994; ARUOMA, 1998).

1. $O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\bullet -}$ (radical superóxido)
2. $O_2^{\bullet -} + 2H^+ + e^- \longrightarrow H_2O_2$ (peróxido de hidrogênio)
3. $H_2O_2 + e^- \longrightarrow OH^- + OH^\bullet$ (radical hidroxila)
4. $OH^\bullet + e^- \longrightarrow OH^-$ (íon hidroxila)
5. $2OH^\bullet + 2H^+ \longrightarrow 2H_2O$

Total $O_2 + 4H^+ \; 4e^- \longrightarrow 2H_2O$

O papel das reações dos radicais livres nas doenças, na toxicologia e na deterioração de alimentos, tem resultado em uma área de grande interesse. Considerando-se que nos alimentos estas reações são minimizadas pelo uso dos antioxidantes, os pesquisadores tem aumentado o interesse pelos mesmos, visando a proteção do organismo contra espécies reativas do oxigênio (ERO's) (FRANKEL, 1980; DIPLOCK, 1991; BLOCK et al., 1992; ARUOMA, 1993; ARUOMA, 1998).

2.6. ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO (ERO's)

A geração *in vivo* das espécies reativas de oxigênio são realizadas no citoplasma, mitocôndrias, retículo endoplasmático, membrana celular e núcleo de todas as células aeróbias (ABDALLA, 1993)

Os humanos e outros seres aeróbios, apresentam capacidade para tolerar ao oxigênio (O_2), já que ao mesmo tempo que os organismos foram desenvolvendo cadeias de transporte de elétrons e outros sistemas enzimáticos para utilizá-lo, também em forma paralela, desenvolveram-se defesas antioxidantes como proteção contra os efeitos tóxicos do O_2 (SIES, 1985; HALLIWELL, 1993; ARUOMA, 1998).

Os radicais livres de importância no organismo incluem hidroxila ($OH^{\bullet}$), superóxido ($O_2^{\bullet\ -}$), óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) e peroxila ($RO_2^{\bullet}$). O peroxinitrito ($ONOO^{-}$), o ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete ($^1O_2$) e ozônio (O_3), não são radicais livres mas podem ser facilmente guiados as reações de radicais livres nos organismos. O termo “espécies reativas do oxigênio” (ERO’s) é freqüentemente utilizado para incluir não somente as espécies radicalares $OH^{\bullet}$, $RO_2^{\bullet}$, $NO^{\bullet}$, e $O_2^{\bullet\ -}$, mas também as não radicalares HOCl, $^1O_2$, $ONOO^{-}$, O_3, e H_2O_2 (ARUOMA, 1998).

Portanto, a toxicidade do oxigênio decorre da formação dessas espécies reativas que podem interagir e lesar diversas biomoléculas e estruturas celulares (SAES PARRA, 1993).

2.6.1. Radical hidroxila ($OH^{\bullet}$)

O radical hidroxila $OH^{\bullet}$ é um composto de alta reatividade com uma vida média nas células estimada em 10^{-9} segundos, reage em forma rápida com inúmeras biomoléculas, danificando o alvo mais próximo do local onde foi gerado ou formando outras espécies de reatividade variada (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 1989; DIPLOCK, 1991; SPATZ & BLOOM, 1992; DE BONO, 1994; ARUOMA, 1998; ROSEN et al., 1995).

Existem duas principais vias de produção de radical hidroxila em sistemas biológicos: radiações ionizantes e interações entre metais de

transição, radical superóxido e peróxido de hidrogênio (SAES PARRA, 1993).

2.6.2. Radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$)

O superóxido é um radical livre centrado no oxigênio que resulta pela adição de um elétron a uma molécula de oxigênio com reatividade seletiva. Esta espécie é produzida por certos sistemas de enzimas, pelas reações de oxidação e por transferência não enzimática de elétrons que reduzem em forma univalente o oxigênio molecular. Em soluções aquosas o $O_2^{\bullet -}$ pode oxidar o ácido ascórbico. Também pode reduzir certos complexos de ferro tais como o citocromo e o ácido etilenodiaminotetracético-Fe (Fe^{3+}-EDTA). A superóxido dismutase (SOD) acelera a dismutação do $O_2^{\bullet -}$, convertendo este a H_2O_2 e O_2 (Mc CORD & FRIDOVIC, 1969; MICHELSON et al., 1977; GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1994; ARUOMA, 1994).

2.6.3. Óxidos de nitrogênio ($NO^{\bullet}$, $NO_2^{\bullet}$)

Ambos são radicais livres o $NO^{\bullet}$ é formado *"in vivo"* a partir do aminoácido L-arginina. O $NO_2^{\bullet}$ é formado quando o $NO^{\bullet}$ reage com o O_2 e encontra-se no ar poluído e fumaça resultante da queima da matéria orgânica, por exemplo fumaça de cigarro (HALLIWELL et al., 1995).

Deve assinalar-se que as células fagocíticas incluindo os neutrófilos, têm a capacidade de produzir óxido nítrico. A sua atividade poderia ser mediada pela formação do grupo nitrosotiol nas cadeias enzimáticas, dos grupos sulfidrilas, glutaniona oxidada ou redução de ferro, fazendo isto disponível, para a reação de Fenton. Muitas destas reações podem incrementar a produção de ERO's (ARUOMA, 1993).

2.6.4. Radicais peroxila ($RO_2^{\bullet}$)

Os radicais peroxila são espécies intermediárias que se formam nas reações em cadeia da oxidação lipídica, tais como a oxidação de gorduras poliinsaturadas, resultando na deterioração dos alimentos que contêm lípides. A peroxidação lipídica pode ser iniciada por qualquer espécie que tenha a reatividade suficiente para abstrair um átomo de hidrogênio da cadeia de um ácido graxo poliinsaturado (PUFA), tais como o ácido araquidônico e ácido linolênico, nos lipídeos das membranas. O ácido araquidônico é um precursor das prostaglandinas e leucotrienos. Este contém na sua cadeia carbonos metilênicos entre as duas duplas ligações os quais são propensos à perda de um átomo de hidrogênio (ARUOMA, 1998).

2.7. ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo ocorre em situações nas quais existe um desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes e a geração de espécies oxidantes, sendo que há predomínio destes últimos. Assim, a diminuição dos sistemas de defesa antioxidante ou o aumento da geração de espécies oxidantes, radicalares ou não, podem resultar em lesões oxidativas em macromoléculas e diversas estruturas celulares que, se não forem reparadas, alterarão a funcionalidade de células, tecidos e órgãos (SAES PARRA, 1993).

Os antioxidantes funcionam como o sistema de defesa contra os efeitos potencialmente destrutivos das espécies reativas de oxigênio (ERRO's) e diminuindo a sua ação (ARUOMA, 1993; GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1994; HALLIWEL et al., 1995).

2.8. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO's) E AS CONSEQÜÊNCIAS BIOLÓGICAS

Os organismos aeróbios desenvolveram mecanismos de defesa, principalmente contra a ação prejudicial, das espécies reativas de oxigênio geradas pelos mais diversos motivos durante o metabolismo.

Uma primeira linha de defesa é constituída por sistema enzimático composto pelas seguintes enzimas: catalase, superoxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase e algumas outras proteínas. A segunda linha de defesa é representada por uma série de compostos químicos de natureza diversa, onde sem dúvida se destacam os compostos fenólicos, desde os tocoferóis onde se inclui a vitamina E (α-tocoferol), até compostos polifenólicos como os taninos (LARSON, 1988).

Muitas células podem tolerar um grau brando de estresse oxidativo, pois estas apresentam um sistema de reparo que pode reconhecer e remover as moléculas destruídas pela oxidação, e estas são então repostas. Os principais constituintes das membranas são os lipídeos e as proteínas, a quantidade de proteína, aumenta com o número de funções que desempenha a membrana (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1994; HALLIWELL et al., 1995).

Os antioxidantes naturais estão ligados diretamente a processos de envelhecimento, por diminuição ou inibição de processos degenerativos, como estresse oxidativo, câncer e aterosclerose. Assim, vários nutrientes antioxidantes, principalmente os compostos fenólicos, contribuem para atividade antioxidante de membranas, e outros compartimentos celulares do corpo. Além do mais, uma combinação de antioxidantes com diferentes sítios de ação podem fornecer uma inibição mais efetiva do que um antioxidante utilizado isoladamente, sendo assim, um inibidor muito mais efetivo de doenças cronico-degenerativas (RAVEN & WITZUM, 1995; OWEN, et al., 1997)

2.8.1. Lípides

Lípide é o termo utilizado para descrever qualquer composto biológico que é solúvel em solventes orgânicos, tais como: éter etílico, clorofórmio, hexano. O termo inclui tanto moléculas que contêm ácidos graxos, como os triglicerídeos e fosfolipídeos, e moléculas que contêm estruturas de hidrocarbonetos cíclicos, como o colesterol, hormônios esteróides e algumas vitaminas lipossolúveis (HALLIWEL, 1994). A destruição das moléculas lipídicas manifesta-se pela peroxidação, a qual é definida como a deterioração oxidativa dos lipídeos poliinsaturados (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; SPATZ & BLOOM, 1992).

A oxidação lipídica está na origem do desenvolvimento do ranço, da produção de compostos responsáveis por "*off flavor*" e "*off odors*", e da ocorrência de um elevado número de reações de polimerização e de cisão. Estas reações não só diminuem o tempo de vida e o valor nutritivo dos produtos alimentícios, como podem gerar compostos nocivos ao organismo (SILVA et al.,1999b).

Os fenômenos de oxidação dos lípides dependem de mecanismos reacionais diversos e extremadamente complexos, os quais estão relacionados com o tipo de estrutura lipídica e o meio onde os lípides se encontram. O número e a natureza das insaturações presentes, o tipo de interface entre os lípides e o oxigênio, a exposição à luz e ao calor, a presença de pró-oxidantes ou de antioxidantes, são fatores determinantes para a estabilidade oxidativa dos lípides (SILVA et al.,1999b). O mecanismo para explicar a oxidação lipídica devido à reação com os ERO's, pode seguir o seguinte esquema (FARMER et al., 1942; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; ESTERBAUER et al., 1992):

Iniciação

Pelo ataque dos ERO's é removido um átomo de hidrogênio da cadeia poliinsaturada formando um radical livre, esta etapa é a iniciação.

$$L - H + R^{\bullet} \longrightarrow L^{\bullet}$$

Esta reação refere-se ao ataque de qualquer espécie que tenha suficiente reatividade para retirar um átomo de hidrogênio de um grupo metileno ($-CH_2-$), o radical hidroxila pode desencadear esta reação:

$$- CH_2 - + OH^{\bullet} \longrightarrow - {}^{\bullet}CH - + H_2O$$

Nesta etapa existe também um rearranjo da posição das duplas ligações formando dienos conjugados, quer dizer duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples. A retirada do hidrogênio alílico é energicamente favorecida sobre o hidrogênio metílico devido à baixa energia de ligação e, devido à ressonância de estabilização do radical intermediário.

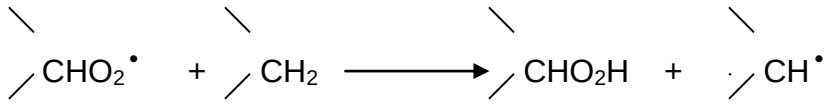
Propagação

A reação com o oxigênio gera o radical peroxila $ROO^{\bullet}$ (ou $RO_2^{\bullet}$) sob condições aeróbicas.

$$\diagdown\!\!\diagup CH^{\bullet} + O_2 \longrightarrow \diagdown\!\!\diagup CHO_2^{\bullet}$$

No entanto, baixas concentrações de O_2 podem favorecer a reação dos radicais centrados no carbono ou talvez a sua reação com outros componentes de membrana como proteínas.

Os radicais peroxila formados também podem reagir com um ácido graxo poliinsaturado intacto retirando um átomo de hidrogênio, gerando uma nova molécula de hidroperóxido e um radical de ácido graxo insaturado, resultando uma reação em cadeia.



O radical carbonil formado pode reagir com o O_2 para formar outro radical peroxila e assim, a reação em cadeia da peroxidação lipídica pode continuar.

Término

Nesta fase da peroxidação os radicais peroxila ($RO_2^{\bullet}$), e alcoxila ($RO^{\bullet}$) podem: a) sofrer uma clivagem β formando aldeídos, que podem formar uma ligação covalente com resíduos de aminoácidos da apoproteína-β; b) levar à fragmentação da apoproteína-β; c) Sofrer um rearranjo formando produtos secundários da lipoperoxidação (exemplo: derivados hidroxi-, ceto-, ceto-hidroxi- e epoxi-hidroxi-ácido graxo) ver Figura 3. A velocidade da peroxidação lipídica é limitada pela reação de propagação (HSIEH & KINSELLA, 1989; SPITELLER & SPITELLER, 1998).

O mecanismo de peroxidação pode ocorrer nos tecidos animais e vegetais e em produtos obtidos dos mesmos como os óleos e gorduras.

2.8.2. Peroxidação de outras moléculas lipídicas

Os ácidos graxos da fração lipídica das membranas não são as únicas moléculas encontradas nas células que contêm ligação >C=C<. Têm outras estruturas que podem sofrer peroxidação sob condições apropriadas.

Na corrente sangüínea tem-se muitos complexos de moléculas de proteínas com os lípides como são as lipoproteínas, como a LDL (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

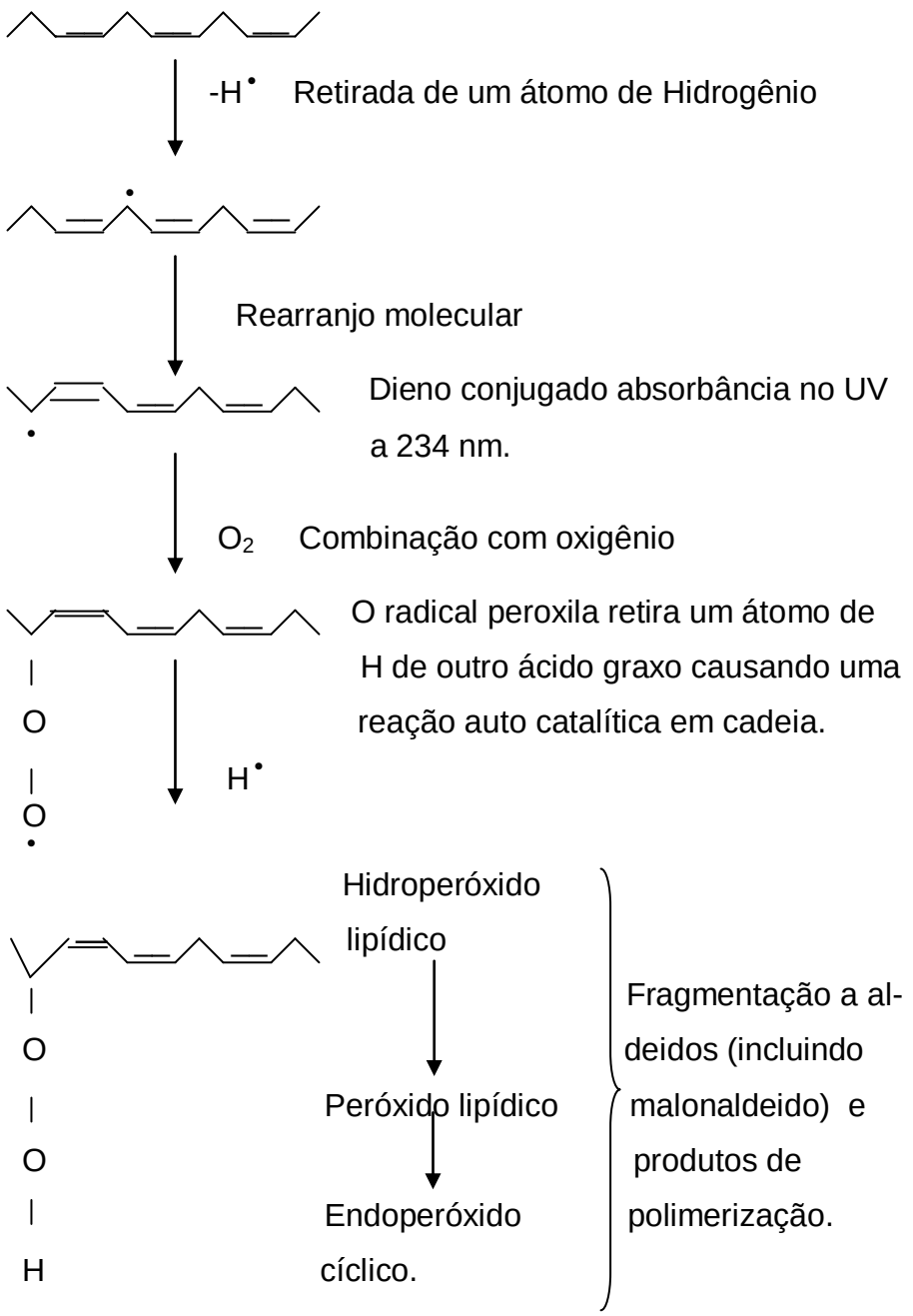


Figura 3. Peroxidação do ácido graxo com 3 duplas ligações

A oxidação da LDL tem sido aceita como um importante evento no desenvolvimento da aterosclerose. O aumento do nível de colesterol-LDL circulante no plasma, facilita os processos de oxidação não controlada, aumentando a carga negativa da apoproteína-100, a qual seria determinante no reconhecimento da lipoproteína modificada pelos receptores. Estas reações conduzem a uma variedade de novos compostos, tão diversos nos seus efeitos biológicos, que incluem propriedades aterogênicas (HENRIKSEN et al., 1981; RAVEN & WITZTUM, 1995).

2.8.3. Proteínas

O dano oxidativo nas proteínas *"in vivo"* pode afetar a função dos receptores, enzimas, transporte (de proteínas), e gerar novos antígenos que provoquem respostas imunes. O dano nas proteínas pela exposição aos radicais livres produz espécies relativamente inertes, e os produtos deste dano oxidativo pode contribuir para degenerações secundárias de outras biomoléculas (SIMPSON et al., 1992; STADTMAN, 1993; FU et al., 1995; HALLIWELL, 1996; ARUOMA, 1998).

As reações químicas que resultam do ataque dos ERO's nas proteínas são complexas, o ataque gera radicais a partir dos resíduos dos aminoácidos e os elétrons podem transferir-se entre os diferentes aminoácidos, como pode ser observado na Figura 4 (DEAN et al., 1991; HALLIWELL, 1996; HALLIWELL & ARUOMA, 1997; ARUOMA, 1998)

2.8.4. DNA

O tipo do dano no DNA, resulta em mudanças dos nucleotídeos da purina (adenina, guanina) ou da pirimidina (citosina, timina), assim como ataque no carboidrato (deoxiribose). A quebra da cadeia de DNA pode se dar em uma fita (rompimento fita-simples) ou em ambas (rompimento fita-

dupla) da dupla hélice do DNA (EZE et al., 1993; RAMOTAR & DEMPLE, 1993; GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1994).

Todos os componentes do DNA, podem ser atacados pelo $OH^{\bullet}$, o oxigênio singlete ataca de preferência a guanina; enquanto que o H_2O_2 e o $O_2^{\bullet -}$ não atacam o DNA (HALLIWELL et al., 1995).

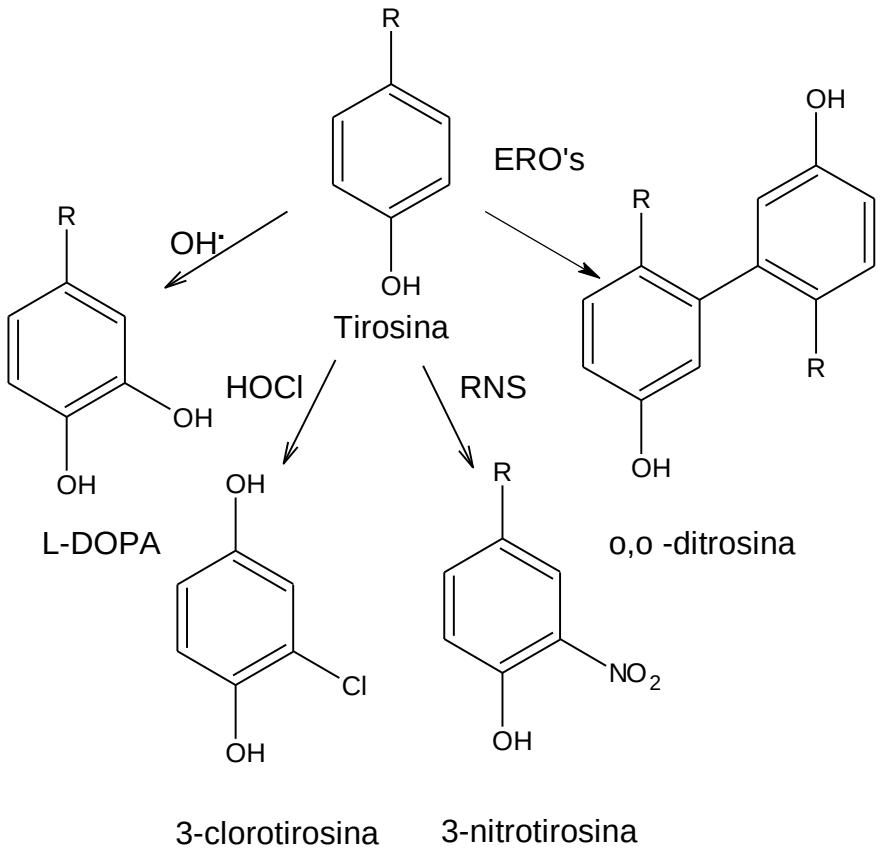


Figura 4. Ataque dos ERO's à proteína

DOPA = Diidroxifenilalanina.

2.9. ANTIOXIDANTES

A deterioração dos alimentos com o tempo é inevitável. Além do mais durante a produção, processamento, distribuição e armazenamento, os alimentos apresentam vários modos de deterioração que incluem mudanças biológicas provocadas pelos microorganismos normalmente encontrados no meio ambiente, como também pelas mudanças químicas e bioquímicas intrínsecas do alimento. Estas últimas representadas pelas oxidações enzimática e não enzimática de lipídeos e das substâncias fenólicas, as quais podem causar mudanças indesejáveis no aroma, sabor, aparência, estrutura física, valor nutricional e toxicidade. A desoxigenação, embalagem impenetrável ao ar e outras técnicas tem resolvido alguns destes problemas, mas o papel dos antioxidantes é preponderante, quer como constituintes do próprio alimento ou como aditivo (NAMIKI, 1990).

Entende-se como antioxidantes as substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, retardam ou inibem de forma significativa a oxidação do mesmo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989)

A regulamentação no Brasil para uso de antioxidantes em alimentos é controlado pela Resolução do Conselho Nacional de Vigilância Sanitaria (CNS) N° 04/88, de 24 de Novembro de 1988, publicado no Diário Oficial da União de 19/12/1988; no quadro 3 apresenta-se os limites máximos de uso de antioxidantes permitido, segundo esta resolução.

2.9.1. Antioxidantes em alimentos e sistemas biológicos

Os lípides presentes ao nível dos sistemas biológicos e alimentos são constituídos por uma mistura de tri-, di- e monoglicerídeos, ácidos graxos livres, glicolipídeos, fosfolipídeos, esteróis, etc. A maior parte destes constituintes é oxidável em diferentes graus, os ácidos graxos possuindo

uma ou duas duplas ligações não originam de partida os mesmos produtos de decomposição que os ácidos graxos poliinsaturados (BERSET & CUVELIER, 1996).

Quadro 3. Limite Máximo de uso de aditivo em alimentos no Brasil

ADITIVOS	ALIMENTOS EM QUE PODEM SER ADICIONADOS	LIMITE MÁXIMO g/100g – g/100mL
ÁCIDO ASCÓRBICO (ÁCIDO L-ASCÓRBICO E SEUS SAIS DE POTÁSSIO, SÓDIO E CÁLCIO)	Margarina	0,30
	Óleos e gorduras	0,03
ÁCIDO CÍTRICO	Margarinas	q.s.p
	Óleos e gorduras	q.s.p
ÁCIDO ISOASCÓRBICO OU ERITÓRBICO E SEU SAL DE SÓDIO	Margarinas	0,20
	Óleos e gorduras	0,03
ÁCIDO FOSFÓRICO	Gorduras e compostos gordurosos	0,01
	Margarina	0,01
BUTIL HIDROXIANISOL (BHA)	Margarina	0,02
	Óleos e gorduras	0,02
BUTIL HIDROXITOLUENO	Margarina	0,02
(BHT)	Óleos e gorduras	0,01
CITRATO DE MONOGLICERÍDEOS	Margarinas	0,01
	Óleos e gorduras	0,02
CITRATO DE MONOISOPROPILA	Margarinas	0,01
	Óleos e gorduras	0,01
EDTA - CÁLCICO DISSÓDICO (ETILENODIAMINOTETRACETATO CÁLCICO E DISSÓDICO)	Gorduras e compostos gordurosos	0,01
	Margarinas	0,01
GALATO DE PROPILA DE DUODECILA OU DE OCTIL	Margarina	0,01
	Óleos e gorduras	0,01
LECITINAS (FOSFOLIPÍDEOS, FOSFATÍDEOS E FOSFOLUTEÍNAS)	Margarinas	0,50
	Óleos e gorduras	0,20
PALMITATO DE ASCORBILA E ESTEARATO DE ASCORBILA	Margarinas	0,02
	Óleos e gordura	0,05
TERCI-BUTIL-HIDROQUINONA (TBHQ)	Óleos e gorduras	0,02
TOCOFERÓIS	Margarinas	0,03
	Óleos e gorduras	0,03

Fonte: Diário Oficial da União de 19/12/1988.

No quadro 4 resumem-se as funções dos antioxidantes em relação à formação e ação dos ERO's. Como radicais que atuam como quelantes, os antioxidantes fenólicos estão largamente distribuídos nas plantas e reagem como doadores de hidrogênio ou de elétrons (NAMIKI, 1990).

Entre os compostos com capacidade de decompor os peróxidos têm-se alguns fenóis, aminas e ácido ditiopropiônico. Alguns aminoácidos tais como o triptofano, histidina e metionina também atuam como antioxidantes, provavelmente como doadores de elétrons pelos átomos de nitrogênio ou enxofre e pela atividade quelante parcial de metais (NAMIKI, 1990; THOMAS, 1995; DONNELLI & ROBINSON, 1995).

Quadro 4 - Funções dos antioxidantes (NAMIKI, 1990)

Funções
1. Seqüestradores de radicais • Doador de hidrogênio • Doador de elétron 2. Decompor os peróxidos 3. Supressor do oxigênio singlete 4. Inibidor de enzimas 5. Sinergista • Agente quelante de metal: Agente de redução

O β-caroteno, o tocoferol e outros compostos podem eliminar oxigênio singlete. O ácido cítrico, ácido ascórbico e outros componentes de alimentos são quelantes de íons metálicos e reprimem a peroxidação catalisada pelos íons metálicos. O ácido ascórbico pode ser associado com tocoferol nos sistemas de reações bioquímicas redox e aumentar a ação antioxidante. Como é freqüente, o β-caroteno parece manter uma capacidade antioxidante maior que o α-tocoferol quando a concentração de oxigênio aproxima-se dos níveis fisiológicos. Outros compostos lipossolúveis como o ubiquinol e a

bilirrubina também têm demostrado ter boa atividade antioxidante. Os antioxidantes naturais, freqüentemente, apresentam múltiplas formas de ação que ainda não foram completamente elucidadas (NAMIKI, 1990; THOMAS, 1995).

2.9.2. Avaliação dos antioxidantes nos sistemas biológicos

A atividade de muitos antioxidantes nos alimentos tem sido examinada e avaliada, utilizando entre outros métodos o do valor de peróxido, TBA e/ou a formação de dienos conjugados, mas a sua atividade nos sistemas biológicos depende dos animais de teste e segundo NAMIKI, (1990), pode ser feita:

- No modelo da membrana eritrocítica, mede-se o efeito supressivo dos antioxidantes na peroxidação induzida, por exemplo, por compostos oxidados das membranas, dos eritrócitos, dos ácidos graxos das membranas dos ratos, através da medida com o ácido tiobarbitúrico (TBA).
- No sistema microssomal de fígado do rato é utilizado por conter alto teor de ácidos graxos insaturados, onde é possível medir a formação de produtos secundários da oxidação em malonaldeído. Neste caso a avaliação também pode ser realizada pelo método do TBA.
- Através das avaliações dos lipossomos das lipoproteínas, etc.

2.9.3. Natureza dos antioxidantes

Existem inúmeros compostos que apresentam atividade antioxidante, tanto naturais como sintéticos. Tendo em vista a importância que estes compostos apresentam tanto *"in vitro"* como *"in vivo"*, inúmeras pesquisas têm sido realizadas visando a identificação de substâncias com propriedades

antioxidantes. O seu uso em alimentos, como é freqüente, está limitado por certos requerimentos, já que, nem todos apresentam nível adequado de segurança. Entre os principais antioxidantes lipídicos usados em alimentos, destacam-se os fenóis monohídricos com variadas substituições nos anéis que, para uma melhor eficiência, estes antioxidantes primários são freqüentemente utilizados em combinação com outros antioxidantes fenólicos ou com vários agentes seqüestradores de metais (DONNELI & ROBINSON, 1995; NAWAR, 1996).

O hidroxibutiltolueno (BHA), o hidroxibutilanisol (BHT) e propilgalato (PG), são os antioxidantes sintéticos que têm demostrado eficácia em vários sistemas alimentícios, além de alta estabilidade, baixo custo e outras vantagens práticas. No entanto, a utilização destes compostos em alimentos têm decrescido devido à suspeita de serem agentes nocivos ao organismo, somado à rejeição dos consumidores pelos aditivos sintéticos nos alimentos. Os derivados do tocoferol e ácido ascórbico, utilizados como substitutos dos antioxidantes sintéticos, são menos efetivos como antioxidantes de alimentos e, a descoberta de novos antioxidantes naturais é desejável, embora até o momento estes não sejam ainda comparáveis com os sintéticos (NAMIKI, 1990; CHEN et al., 1992).

2.9.4. Fontes dos antioxidantes naturais

Os antioxidantes naturais são encontrados nas diversas partes das plantas, como sementes, frutos, folhas, casca do caule e na raiz; nas especiarias, algas, produtos microbianos de fermentação e da reação de Maillard, entre outros. Sendo que as principais fontes de antioxidantes, foram inicialmente pesquisadas nas especiarias (CHIPAULT et al., 1952; INATANI et al., 1982; 1983; NAKATANI & INATANI, 1984; HOULIHAN et al., 1984, 1985; NAMIKI, 1990; CINTRA, 1999).

As moléculas típicas de antioxidantes são derivadas das formas isoméricas dos polifenólicos, flavonas, isoflavonas, flavonóis, catequinas, eugenol, cumarina, tocoferóis, ácido cinâmico, fosfatídeos, ascorbatos, ácidos orgânicos e outros (MARINOVA & YANISHLIEVA, 1994; JOHNSON, 1995).

Os flavonóides ocorrem em muitos frutos, hortaliças, folhas e flores e, consequentemente nos constituintes da dieta diária (HSIEH & KINSELLA, 1989). Entre estes a quercitina é um dos mais importantes, ocorrendo no chá da Índia, maçãs e cebolas, entre os alimentos mais comuns. A mircitina ocorre menos nestes alimentos, estando presente geralmente em alimentos de cor escura como uvas pretas, favas, bem como em algumas bebidas como vinhos tintos, cervejas e sucos de uva (HERTOGH, et al., 1992; HERTOGH, et al., 1993).

As frações fenólicas, como frações da família da catequina, presentes nos vinhos tintos, cervejas e sucos de frutas, fazem com que estas bebidas apresentem possíveis efeitos antioxidantes (ABU-AMSHA et al., 1996; TEISSEDRE et al., 1996).

KÄHKÖNEN et al., (1999), pesquisaram a atividade antioxidante de 92 extratos fenólicos usando materiais de plantas comestíveis e não comestíveis, entre estas estudaram 18 frutos e bagas, que apresentaram um teor total de fenólicos, que variava de 11,9 a 50,8 mg de GAE (conteúdo de fenólicos expressos como equivalente em ácido gálico/material seco).

As pesquisas na área de antioxidantes naturais tem como objetivos a identificação de novas fontes de antioxidantes e identificação química dos compostos responsáveis por essa propriedade, com a perspectiva de se ampliar a utilização dos antioxidantes naturais em alimentos (LÖLLIGER, 1991).

Os compostos fenólicos de plantas superiores podem atuar como antioxidantes, contribuindo como agente de mecanismos anticarcinogênicos

ou ação cardioprotetora. Os flavonóides constituem uma classe de compostos amplamente distribuídos em plantas, contendo grupos fenólicos hidroxilados anexados à estrutura do anel, conferindo-lhe a atividade antioxidante (RICE-EVANS et al., 1996).

FRANKEL et al., (1995); TEISSEDRE et al., (1996); MAYER et al., (1997) trabalhando com os compostos fenólicos extraídos de diferentes variedades de uvas identificaram elevada atividade antioxidante *"in vitro"* sobre a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) de humanos. SAITO et al., (1998) destacam que os compostos fenólicos presentes nas sementes de uva, atuam como agentes antimutagênicos e antivirais.

LIBERATORE et al., (2001) trabalhando com extrato metanólico/água (60:40) de 10 amostras de óleo de oliva virgem, procedentes da região de Abruzzo (Italia) identificaram pelo método da cromatografía gasosa acoplada à espectrometria de massa, oito compostos fenólicos que são o tirosol, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido protocatequínico, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e ácido caféico.

QUETTIER-DELEU et al., (2000) identificaram nos extratos metanol:acetona:água (70:70:30; v/v/v) e metanol:água 2/8 (v/v) da casca e farinha da semente do cereal "buckwheat" os seguintes compostos: a epicatequina (1,143; 3,395 mg/100g); a rutina (5,205; 2,275 mg/100g); a quercitina (0,608; 0,153 mg/100g) e a procianidina (48,943; 51,881 mg/100g). IHME et al., (1996) demostraram que a rutina e seus derivados hemisintéticos exercem diferentes efeitos farmacológicos como: normalização da permeabilidade vascular e proteção contra o edema

CZINNER et al., (2000) afirmam que as propriedades farmacológicas que possui a infusão da inflorescência da *Helichrysum arenarium* (L) Moench são atribuídas aos compostos fenólicos que possuem, entre eles: o ácido caféico,o ácido clorogênico, a quercetina e outros. WOJCICKI et al., (1995); VAN ACKER et al., (1996) descrevem que a rutina é um bom antioxidante e tem efeito hipotensivo e antinflamatório.

DELIORMAN et al., (2000) demonstraram o efeito protetor sobre o sistema vascular que possuem os extratos etanólico, etéreo, butanólico, e os compostos fenólicos isolados através do extrato butanólico das folhas de *V.album* ssp*. Album*. OWEN et al., (2000) demonstraram que os antioxidantes fenólicos presentes no óleo de oliva, são potentes inibidores de geração de radicais livres pela matriz fecal; e indicam que este resultado mostra que estudos da inter-relação entre espécies reativas de oxigênio e antioxidantes dietéticos é uma área promissora para elucidar mecanismos de carcinogênese coloretal e possíveis futuras estratégias químiopreventivas.

2.10. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são geralmente encontrados tanto em plantas comestíveis como nas não comestíveis, entre os quais são conhecidos mais de 8000 compostos, e têm sido relatado que apresentam múltiplos efeitos biológicos, incluindo a atividade antioxidante. Os extratos de frutas, ervas, vegetais, cereais e outras partes das plantas ricas em compostos fenólicos, tem despertado interesse na indústria de alimentos, devido à propriedade de retardar a degradação oxidativa dos lípides e consequentemente aumentar a qualidade e o valor nutricional do alimento. Assim mesmo, estes compostos estão estreitamente associados com os atributos sensoriais dos alimentos frescos e processados (MEYER, et al 1998; PETROVIC, et al., 1999; HAKKINEN, et al., 1999; HASLAM, 1999; JU & BRAMLAGE, 1999; KÄHKONEN, et al., 1999; DREOSTI, 2000).

Segundo BRAVO (1998) e WOLLGAST & ANKLAM (2000), os polifenóis podem ser divididos pelo menos em 10 diferentes classes dependendo de sua estrutura básica. Os flavonóides, os quais constituem um grupo simples mas de grande importância, apresenta mais de 5000 compostos têm a estrutura básica de difenilpropano (C_6C_3 C_6), dois anéis aromáticos ligados a três átomos de carbono.

Para mencionar alguns compostos fenólicos têm-se as flavonas e flavononas que geralmente encontram-se juntos em frutos cítricos; as antocianinas, considerado um importante grupo de pigmentos solúveis em água, responsáveis pela cor vermelha do vinho; as catequinas no chá e procianidinas na semente de cacau entre outras (WOLLGAST & ANKLAM, 2000; DREOSTI, 2000). Os ácidos fenólicos, que apresentam a estrutura básica C_6-C_1, pertencem a outro grupo também importante junto aos flavonóides por suas propriedades antioxidantes, por exemplo têm-se os ácidos gálico, elágico e *p*-hidroxibenzóico encontrados em bagas e frutos de diferentes espécies (HAKKINEN, et al., 1999; JU & BRAMLAGE, 1999).

2.11. METABOLISMO DOS POLIFENÓIS

Muitos estudos têm assinalado que os flavonóides glicosídicos podem passar diretamente ao sistema circulatório intatos, incluindo as antocianinas, com os efeitos terapêuticos correspondentes (KURESH et al. 2000).

Segundo BRAVO (1998) parece evidente que alguns compostos polifenólicos são metabolizados no trato gastrointestinal. As agliconas e compostos fenólicos simples, flavonóides (quercitinas, genisteína) e ácidos fenólicos podem ser absorvidos diretamente através da mucosa do intestino delgado. WOLFFRAM et al., (1995) demonstraram, em experimentos realizados com ratos tanto *"in vitro"* como *"in vivo"*, que os compostos fenólicos livres são absorvidos através do trato gastrointestinal. WILLIAMS, (1964) afirma que os glicosídeos dos polifenóis podem ser hidrolisados a suas correspondentes agliconas antes da absorção. Têm-se demonstrado que a absorção parcial dos glicosídeos da quercitina ocorre na parte superior do intestino, provavelmente devido à ação das glicosidases das bactérias presentes na porção terminal do íleo (HACKETT, 1986; KING et al., 1996; HOLLMAN, 1997). Muitos glicosídeos dos polifenóis, como é freqüente, passam através do intestino onde eles são hidrolisados pela microflora cecal produzindo agliconas livres. A fermentação bacteriana dos carboidratos pode

também liberar compostos fenólicos unidos à fibra da dieta, os quais podem ser metabolizados em forma parecida aos polifenóis extraíveis (SIMIC & JAVANOVIC, 1994; BRAVO, 1998).

No cólon as agliconas são absorvidas através do epitélio do intestino e metiladas e/ou conjugadas com ácidos glicurônicos ou com sulfato no fígado. O principal órgão envolvido no metabolismo dos polifenóis é o fígado, embora a participação de outros órgãos tais como os rins ou a mucosa intestinal não podem ser deixados de lado, já que eles contêm as enzimas envolvidas no metabolismo dos polifenóis (HACKETT, 1986).

Os compostos fenólicos conjugados e derivados dos 3'-O- metilados têm sido detectados no plasma de ratos alimentados com flavonóis (como catequina, quercetina, rutina) e isoflavonas (como a genisteina). Estes metabólitos são secretados na urina ou na bíle. Neste caso, eles podem entrar no ciclo enterohepático, quando desconjugados, pela ação da microflora colônica e reabsorvidos. Alternativamente, eles podem ser completamente metabolizados e convertidos em ácidos fenólicos simples depois da hidrólise da estrutura correspondente à flavona (abrindo o heterociclo) mediado pelas enzimas bacterianas. Os ácidos fenólicos formados como produtos de fissão, tais como fenólicos livres, são absorvidos através da mucosa intestinal e excretados pela urina (MARTIN, 1982; HACKETT, 1986; HOLLMAN, 1997).

Pesquisas com ratos sobre a absorção e metabolismo dos polifenóis, indicam que só ocorre absorção parcial. Utilizando marcadores fenólicos-^{14}C, como a quercitina –^{14}C, observou-se 20% da absorção, 30% foi excreção e 50% foi metabolizado, produzindo ácidos fenólicos e CO_2 (UENO et al., 1983). KING et al., (1996) reportaram absorção de 20% das isoflavonas de soja administradas em ratos, com excreção nas fezes de aproximadamente 21% da dose ingerida. Em pesquisas com humanos, também obtiveram-se resultados similares. HOLLMAN et al.,(1995) trabalhando com indivíduos sadios encontrou que a absorção variou entre 24 a 52% para a absorção de agliconas e glicosideos respectivamente. As

isoflavonas da soja administradas a voluntários sadios apresentaram uma variação na absorção na faixa de 9 a 21%, dependendo do tipo de isoflavona (XU et al. 1994). VAN HET HOF KH et al., (1998) encontraram teores de catequina de 0,17μmol/Lt. após a ingestão de chá preto e até 0,55 μmol/lt após a ingestão de chá verde. Estes pesquisadores encontraram que os níveis máximos ocorreram 2 horas depois da ingestão do chá e que a vida média de eliminação variou entre 4, 8 e 6, 9 horas para as catequinas do chá verde e preto respectivamente.

3. OBJETIVOS

1. Objetivos Gerais:

- Caracterização bromatológica das polpas dos frutos do chope (*Gustavia augusta* L.), da sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) e da semente do macambo (*Theobroma bicolor*).
- Avaliação dos extratos e das frações fenólicas da farinha dos frutos em estudo como novas fontes de antioxidantes naturais.

2. Objetivos Específicos:

- Análise bromatológica das farinhas dos frutos, com destaque das frações fibras.
- Perfil de ácidos graxos da fração lipídica das respectivas amostras.
- Avaliação da atividade antioxidante "*in vitro"* dos extratos etéreo, alcoólico, aquoso e das frações fenólicas obtidas das farinhas do chope, da sacha mangua e da semente do macambo
- Avaliação da atividade antioxidante "*in vivo"* dos extratos que apresentaram maior atividade antioxidante.
- Identificação e quantificação das substâncias antioxidantes nos extratos e nas frações fenólicas das amostras.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Frutos

Os frutos de chope(*Gustavia augusta* L.), da sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) e do macambo (*Theobroma bicolor)* têm sido coletados de diferentes locais da cidade de Iquitos-Perú. Estes frutos foram descascadas e de eles retiradas as sementes manualmente, as polpas de chopé e da sacha mangua foram fatiadas com a finalidade de favorecer o processo de secagem e com o mesmo objetivo foi retirado o tegumento das sementes do macambo. O material assim obtido foi colocado em estufa ventilada a 60ºC até que todas as amostras estiveram secas, depois foram acondicionadas em frascos âmbar de boca larga sob atmosfera de nitrogênio e estocadas em *freezer* a uma temperatura de - 18°C.

4.1.2. Animais

Foram utilizados 32 ratos machos albinos da linhagem Wistar, (*Rattus novergicus* variedade Albinus Rodentia), recém desmamados obtidos a partir da colônia mantida no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP).

4.1.3. Reagentes

- Os reagentes Sigma® e Merck® utilizados foram:

α-amilase termoressistente, A-3306; protease, P-3910; lã de vidro; amiloglicosidase, A-9913; β-caroteno, C-9750; ácido linoléico L-2376; ácido heptadecanóico H-3500; ácido salicílico; ácido *t*-cinâmico; ácido vanílico

ácido *p*-hidroxibenzóico; ácido *o*-cumárico; ácido protocatequínico; ácido quínico; ácido *p*-cumárico; ácido gálico; ácido ferúlico; ácido caféico; ácido sinápico; catequina; clorogênico; chrisitina; quercetina; daidzeína; daidzina; catecol; glicitina; gliciteína; hidroquinona; rutina; resveratrol; N,O-bis (trimetilsilil)-acetamida (BSA) T-4377; 1,1,3,3-tetramethoxipropano (TMP) T-1642; albumina sérica bovina; ácido tiobarbitúrico (TBA) t-5500; extran MA01-alcalino Art. 7555; ciclohexano; bicarbonato de sódio Art. 6329; cloreto de amónio Art. 21503; etilendiamino tetraacético (EDTA).

- Os demais reagentes foram de grau analitico:

Hexano; tetraidrofurano; metanol; acetato de etila; hidróxido de sódio; ácido clorídrico; sulfato de sódio anidro; n-butanol; tartarato duplo de sódio e potássio; sulfato de cobre penta hidratado; carbonato de sódio; reativo de Bradford; éter etílico; ácido sulfúrico; éter de petróleo; etanol absoluto; acetona; Na_2HPO_4, NaH_2PO_4 e o óleo refinado de soja sem antioxidante, fornecido pela Cargill Agrícola S/A.

4.2. Métodos

4.2.1. Obtenção da farinha para as análises

Os frutos foram descascados, despolpados e retiradas as sementes, manualmente. As polpas dos frutos de *chope, sacha mangua* e as sementes do *macambo*, foram secas a 60ºC em estufa ventilada. Parte deste material foi colocada em frascos com atmosfera de nitrogênio e armazenada em *freezer* a -18°C; a outra parte foi triturada em *mixer* à temperatura ambiente (24 ± 1ºC) e tamisada (Tamis 32-*Mesh*). As farinhas assim obtidas foram acondicionadas em frascos âmbar sob atmosfera de nitrogênio e estocadas em *freezer* a -18ºC, até a realização de cada uma das determinações.

4.2.2. Determinação da composição centesimal

4.2.2.1. Determinação da umidade

O teor de umidade foi determinado em triplicata por gravimetria, segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1976). Foram pesados 5g de cada amostra em cápsula de porcelana que, posteriormente, foi colocada em estufa ventilada a 105ºC, seguido de pesagens regulares até peso constante. Os resultados foram expressos em g/100g de amostra.

4.2.2.2. Determinação de lípides totais

Esta determinação foi realizada em triplicata pelo método de Soxhlet de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1976). Os balões coletores previamente limpos, desengordurados e mantidos por uma hora em estufa a 105ºC, foram resfriados em dessecador, para fazer as taras respectivas. Após pesagem das amostras secas (2g) em cartuchos previamente tarados, os lípides foram extraídos utilizando-se o éter etílico como solvente. Os resultados foram expressos em g/100 g de amostra integral.

4.2.2.3. Determinação da proteína total

Foi determinada pelo método de microkjeldahl segundo AOAC, (1984). Pesou-se 0,1 g da farinha seca e desengordurada de cada amostra, foram adicionadas 2 g de sulfato de potássio, 50 mg de sulfato de cobre e 3 mL de ácido sulfúrico concentrado. Nesta etapa se realizou o processo de digestão protéica, catalisada a 350ºC, até obter-se uma coloração esverdeada, a qual indica a fase final da digestão. Após resfriado ao sistema, foi adicionado água destilada para dissolver os sólidos presentes. Logo, foi realizado o processo de destilação, com 15 mL de hidróxido de

sódio a 40%. O destilado foi coletado em um *erlenmeyer* de 125 mL, contendo 5 mL de ácido bórico saturado e 4 gotas da solução indicadora para proteína (vermelho de metila + azul de metileno), até atingir um volume total de 50 mL. O destilado foi, titulado com HCl 0,02 N até obter a viragem da cor da solução, de verde a violeta. Os resultados foram expressos em g/100g de amostra integral, e o fator conversão foi de 6,25.

4.2.2.4. Determinação das cinzas

A fração das cinzas foi determinada por gravimetria e em triplicata, segundo às Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1976). Em cadinhos previamente tarados pesou-se 1 g da farinha de cada uma das três amostra secas, as quais foram submetidas à incineração em mufla a 550ºC por uma noite. Os cadinhos com as cinzas foram resfriados no dessecador para finalmente serem pesados. Os resultados foram expressos em g/100g de amostra integral.

4.2.2.5. Determinação das frações fibra

Nas farinhas secas e desengorduradas do *chope, sacha mangua* e *macambo*, foram determinadas as fibras alimentares: Insolúvel (FAI) e solúvel (FAS), de acordo com o método enzimático–gravimétrico (985.29) da AOAC (1995); Filisetti, T.M.C.C. (1998).

4.2.2.5.1. Tratamento dos cadinhos

Os cadinhos, antes de iniciar a análise, foram lavados com água destilada, deixados em extran a 2% por 24h, enxaguados com água destilada e, posteriormente com mais água destilada no sentido oposto ao da filtração com o auxílio de vácuo, secos em estufa, e a seguir foram

incinerados em mufla a 525°C por 5h. Após o resfriamento foram lavados com 5 x 20 mL de ácido clorídrico 0,5N, e com água destilada até neutralização. Em seguida, filtrou-se 3 x 20mL de água destilada no sentido oposto ao da filtração, secou-se em estufa a 105°C por uma noite, resfriou-se no dessecador e pesou-se. Após todo tratamento os cadinhos foram revestidos com uma camada de 1 g de lã de vidro tratada, novamente foram dessecados em estufa a 105°C por uma noite, resfriados em dessecador e pesados.

4.2.2.5.2. Tratamento da lã de vidro

A lã de vidro foi incinerada a 525°C durante 5h., lavada com 5 porções de 20 mL de HCl 0,5N e enxaguada com água destilada em funil de *Büchner* com auxílio de vácuo até a neutralização e seca em estufa a 105°C por uma noite.

4.2.2.5.3. Preparo do hidrolisado

Em um béquer de 250mL., pesou-se exatamente 1g. de cada amostra seca e desengordurada na qual foram adicionados 50 mL de tampão fosfato pH 6,0 ± 0,2 e 0,1mL de alfa-amilase termoressistente. Os béqueres foram tampados com folha de alumínio e colocados em banho-maria em ebulição, por 30 minutos, com agitação a cada 5 minutos. As amostras foram resfriadas à temperatura ambiente, acertando-se o pH para 7,5 ± 0,1. Em seguida foi acrescentado 0,1 mL de protease (5mg/0,1mL). Os béqueres com as amostras foram novamente tampados e incubados a 60°C por 30 minutos com agitação horizontal (100 rpm.). Logo resfria-se à temperatura ambiente ajustou-se o pH em 4,5 ± 0,3, acrescentou-se 0,3 mL de amiloglicosidase, tampou-se com folha de alumínio e incubou-se a 60°C por 30 minutos com agitação horizontal (100 rpm.). A partir deste hidrolisado

foram determinados os teores de fibra alimentar insolúvel (FAI) e a fibra alimentar solúvel (FAS). Para cada ensaio foi realizado paralelamente, em quadruplicata, uma prova em branco.

4.2.2.5.4. Determinação da fibra alimentar insolúvel

Lavou-se, com água destilada e com o auxílio de vácuo, 8 cadinhos (sendo 4 para as amostras e 4 para os ensaios em branco). Transferiu-se quantitativamente o hidrolisado contendo o resíduo para os cadinhos com auxílio de vácuo, lavou-se os resíduos com 2 x 20mL de água. O filtrado e a água de lavagem, foram reservados para posterior determinação da (FAS).

Os resíduos foram lavados com 2 x 20mL de etanol a 95% e 2 x 20mL de acetona, secos em estufa a 105 °C durante a noite e finalmente, estes resíduos resultantes da análise da amostra e do ensaio em branco, corresponderam respectivamente ao Resíduo Insolúvel (RI) e ao Resíduo Insolúvel do Branco (BI_B). Após, dois cadinhos da amostra e dois do ensaio em branco foram levados à mufla a 525 °C por 5 h para determinar a cinza no RI e RI_B. Os outros quatro cadinhos (dois para amostra e dois para o ensaio em branco) foram utilizados para determinar a proteína do RI e RI_B. Os resultados foram expressos em g/100g de amostra.

4.2.2.5.5. Determinação da fibra alimentar solúvel

O filtrado e as águas de lavagem, tanto da amostra quanto do branco, contidas no *Kitasato* foram transferidas quantitativamente para uma proveta onde mediu-se o volume. Em seguida, foram transferidos para béquer de 600mL e adicionados 4 volumes de etanol 98% a 60 °C, (o volume do etanol foi medido antes de ser aquecido). As amostras foram deixadas em repouso à temperatura ambiente por 1 h para que toda a FAS se precipitasse.

Lavou-se com etanol a 78% com auxílio de vácuo 8 cadinhos revestidos com lã de vidro e tarou-se (4 para a amostra e 4 para o ensaio em branco). Filtrou-se quantitativamente o hidrolisado contendo o precipitado formado, em seguida este precipitado foi lavado com 2 x 20mL de etanol a 78%, 2 x 20mL etanol a 95% e 2 x 20mL de acetona e secou-se em estufa a 105 °C durante a noite.

Os resíduos assim obtidos, corresponderam ao Resíduo Solúvel (RS) e Resíduo Solúvel do Branco (RS_B). Após, dois cadinhos da amostra e dois do ensaio em branco, foram levados à mufla a 525 °C por 5 h para determinar a cinza no RS e RS_B.

Os outros quatro cadinhos (dois para amostra e dois para o ensaio em branco) foram utilizados para determinar a proteína do RS e RS_B. Os resultados foram expressos em g/100g de amostra.

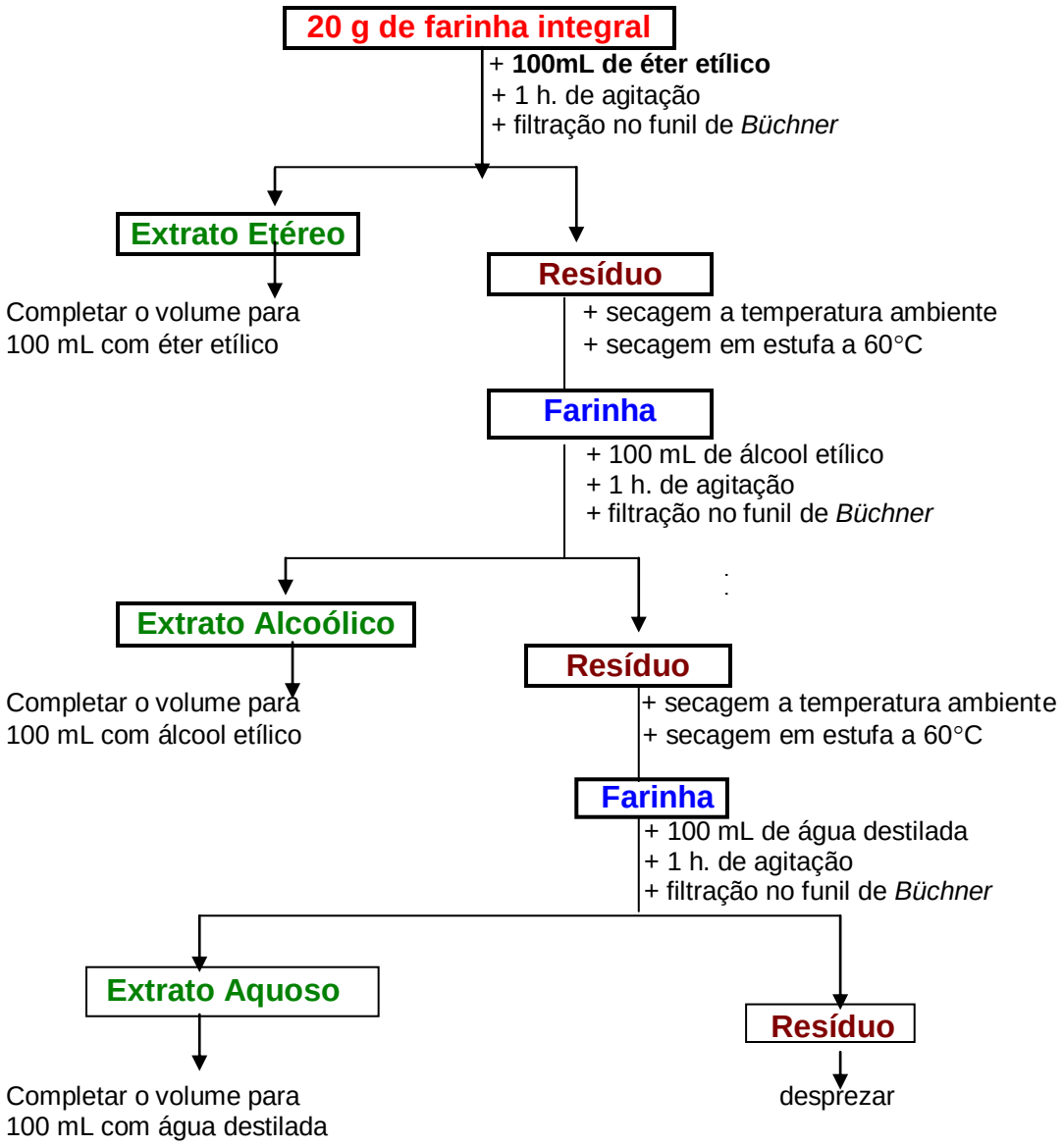
4.2.2.6. Determinação dos carboidratos

O teor de carboidratos foi obtida por diferença através da somatória das determinações de umidade, lípides, proteína, cinzas e fibra alimentar, subtraídas de 100, completando a análise da composição centesimal.

4.2.3. Obtenção dos extratos

Os extratos etéreo, etanólico e aquoso, das farinhas de *chope, sacha mangua* e *macambo*, foram obtidos através do processo de extração seqüencial, (ver esquema 1).

Foram pesados 20 gramas de farinha de cada uma das três amostras adicionados 100 mL de éter etílico e agitados no homogeneizador por uma hora, à temperatura ambiente (24 ± 1ºC). Em seguida a solução foi filtrada em funil de *Büchner*, e completado o volume até 100 mL com éter



Esquema N° 1. Obtenção dos extratos etéreo, alcoólico e aquoso da farinha dos frutos de chope, sacha mangua e macambo

etílico. Os resíduos foram recuperados através da secagem em estufa a 60ºC, foram pesados e calculado para a obtenção dos demais extratos alcoólico e aquoso, seguindo o mesmo procedimento da obtenção do extrato etérico, na mesma proporção de 1:5. Os extratos foram colocados em frascos âmbar, com atmosfera de nitrogênio e armazenados no *freezer* à -18ºC para a realização das respectivas análises.

4.2.4. Determinação do teor de matéria seca dos extratos e das frações

Essa determinação tem por objetivo avaliar o teor de sólidos nos extratos e nas frações fenólicas das amostras. Para tal utiliza-se vidros relógios bem lavados, colocados na estufa a 105ºC, resfriados no dessecador e tarados. Em seguida, foram colocados 1 mL de extrato e 1 mL das frações fenólicas de cada amostra nos vidro relógios tarados e colocados em estufa a 105ºC por 2 horas para a evaporação do solvente. Em seguida os vidros relógios foram resfriados no dessecador e pesados até peso constante (Adolfo Lutz, 1976).

4.2.5. Obtenção da fração lipídica

A obtenção da fração lipídica das farinhas das amostras e do material biológico, foi realizada de acordo com o método descrito por FOLCH et al., (1957).

Foram pesadas 1g das amostras para ser homogeneizada por 2 minutos com 10 mL de metanol. Em seguida foram adicionados 20 mL de clorofórmio e a mistura é novamente homogeneizada por 5 minutos. A parte sobrenadante foi filtrado em funil de *Büchner* e o resíduo foi extraído novamente por 1 minuto com 30 mL da mistura de clorofórmio/metanol (1:1). O filtrado foi recolhido em proveta de 250 mL e ¼ deste volume foi adicionado solução aquosa de KCl 0,88% agitado manualmente e deixado em repouso até separação das fases. A parte superior foi aspirada à vácuo e desprezada. O volume foi mais uma vez medido para ser adicionado ¼ da mistura de metanol/água (1:1). A mistura foi novamente homogeneizada manualmente e deixada em repouso até separação das fases. A fase superior foi eliminada por aspiração a vácuo, sendo que a fase inferior foi filtrada em sulfato de sódio anidro com a utilização de um balão com fundo

redondo e levado ao rota evaporador à temperatura de 40ºC para a evaporação do solvente.

A fração lipídica foi ressuspensa em 5 mL de clorofórmio, colocada em frasco âmbar e armazenada no *freezer* à –18 °C para posterior esterificação.

4.2.6. Esterificação e identificação dos ácidos graxos

A esterificação dos ácidos graxos, foi realizada segundo a técnica proposta por HARTMAN & LAGO, (1973).

Em tubos de esterificação foram colocados 0,1 mL das frações lipídicas obtidas no item (4.2.5.) e o solvente foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio. Em seguida foram adicionados 2 mL de NaOH metanólico 0,5N e levados ao banho maria a 100ºC por 5 minutos. Após esfriados foram adicionados 6 mL da mistura de esterificação e levado novamente ao banho maria a 100ºC por 3 minutos. Após esfriados foram adicionados 5 mL de água destilada e agitados. A fração dos ésteres metílicos foi extraída com três porções sucessivas de 2 mL de hexano. Na fase orgânica superior extraída foram adicionados 5 mL de uma solução de bicarbonato de sódio saturada onde ocorreu separação em duas fases. A fase superior foi transferida a outro tubo e evaporado o solvente em rota evaporador com temperatura monitorada a 40ºC, o resíduo foi ressuspenso em 1 mL de hexano.

A identificação dos ácidos graxos das amostras foi realizada em um cromatógrafo à gás marca VARIAN GC modelo 3400CX equipado com detector de ionização de chama, conectado a um integrador CG modelo 300, com coluna capilar de sílica fundida VA-WAX (polietilenoglicol) de 30m. de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interior, o gás de arraste foi o hélio com fluxo de 1mL/minuto. A programação de temperatura na coluna foi isotérmica a 150ºC por 11 minutos e a velocidade de aquecimento 3ºC/min até 210ºC,

permanecendo por 5 minutos; sendo que a temperatura de vaporização foi de 250ºC e a do detector 280ºC. A identificação do ácidos graxos foram realizadas com base na comparação dos tempos de retenção com padrões de ácidos graxos (Sigma®) e a quantificação foi realizada em base ao percentagem de área dos picos, consequentemente os resultados foram expressos em percentagem. Para o perfil de ácidos graxos do material biológico foi utilizado o cromatógrafo a gás marca *Shimadzu*, modelo CG17A, nas mesmas condições que no cromatógrafo marca VARIAM CG modelo 3400CX.

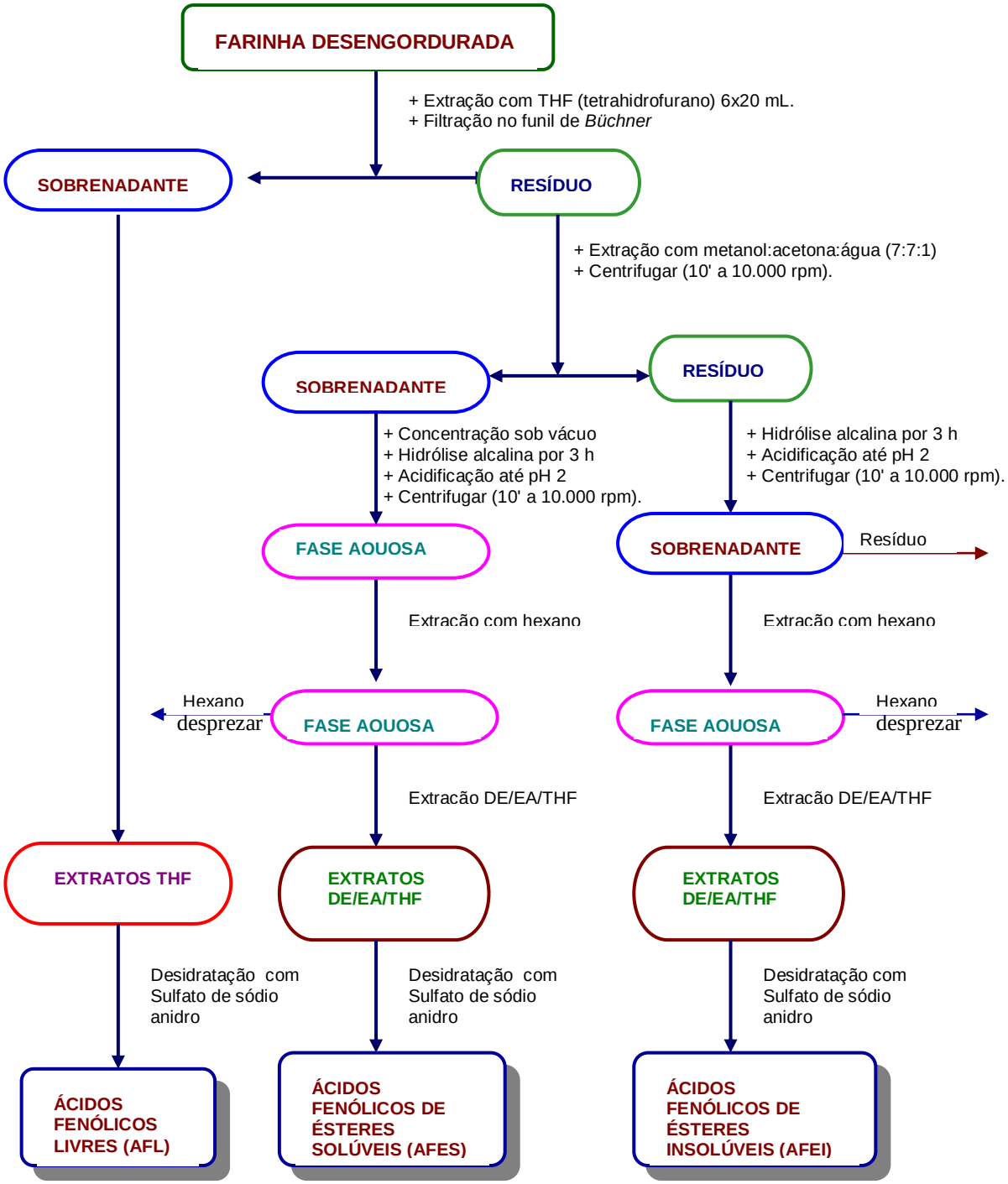
4.2.7. Determinação de compostos fenólicos

4.2.7.1. Obtenção de ácidos fenólicos livres e seus ésteres

Para a obtenção dos ácidos fenólicos livres, solúveis e insolúveis de ácidos fenólicos, seguiu-se a metodologia propostas por KRYGIER, et al., (1982) ver detalhes no esquema 2.

4.2.7.1.1. Extração de ácidos fenólicos livres

Para a obtenção da fração de ácidos fenólicos livres (AFL) foi pesada 1g de cada amostra de farinha previamente seca e desengordurada. Os fenólicos livres foram extraídos 6 veces com porções de 20mL de tetraidrofurano, através de homogeneização por 5 minutos em vortex. Os sobrenadantes das 6 extrações foram recombinados e filtrados através de sulfato de sódio anidro. A fração resultante do filtrado foi evaporada em rota evaporador sob vácuo a 40ºC e ressuspensa em 5mL de tetraidrofurano. O extrato contendo a fração de ácidos fenólicos livres foi colocado em frasco âmbar com atmosfera de nitrogênio, e armazenado no *freezer* a -18ºC para as realizações das análises cromatográfica e atividade antioxidante.



Esquema 2- Extração e separação das frações dos ácidos fenólicos, nas farinhas de chope, sacha mangua e macambo: ácidos fenólicos livres, ácidos fenólicos de ésteres solúveis e ácidos fenólicos de ésteres insolúveis para análises em cromatografia gasosa. (éter etílico - acetato de etila - tetraidrofurano, 1:1:1 = DE/EA/THF)

4.2.7.1.2. Tratamento do resíduo dos ácidos fenólicos livres

O resíduo dos ácidos fenólicos livres foi submetido a 6 extrações com adição de 20mL da mistura metanol-acetona-água (7:7:6) em cada extração, através de homogeneização por 5 minutos em vortex. Em seguida a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm obtendo-se o sobrenadante e o resíduo.

4.2.7.1.3. Extração de ácidos fenólicos de ésteres solúveis

Para a obtenção dos ácidos fenólicos de ésteres solúveis (AFES) foi utilizado o sobrenadante do resíduo dos ácidos fenólicos livres. Inicialmente foi feita a evaporação, em rota evaporador, sob vácuo a 40ºC dos solventes presentes no sobrenadante até a obtenção da fase aquosa. Foi medido o volume e adicionado igual volume de hidróxido de sódio 4N. Após 3 horas de hidrólise alcalina à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e com agitação o pH foi corrigido para 2 com ácido clorídrico 6N, seguido de centrifugação a 10.000rpm por 10 minutos.

Para a eliminação dos ácidos graxos livres e outros contaminantes, o sobrenadante foi transferido para um funil de separação e tratado com igual volume de hexano seguida de agitação manual esta operação foi repetida por 6 vezes. Para a extração dos fenólicos da fase aquosa foi adicionado igual volume da mistura de éter etílico-acetato de etila-tetraidrofurano (1:1:1). Foi feita a agitação manual no próprio funil de separação e retirado o sobrenadante e colocado em *erlenmeyer*. Essa operação foi repetida por 6 vezes. A parte inferior foi filtrada com auxilio de um funil revestido com papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro, para um *erlenmeyer* de 250mL coberto com papel alumínio. Essa fração extraída foi evaporada em rota-evaporador a 40ºC e, ressuspensa em 5mL de tetraidrofurano. O procedimento de armazenamento e identificação dos ácidos fenólicos de ésteres solúvel das amostras seguiu o mesmo protocolo dos ácidos fenólicos livres.

4.2.7.1.4. Extração de ácidos fenólicos de ésteres insolúveis

Para a obtenção desta fração fenólica das amostras usou-se o resíduo da extração dos fenólicos de ésteres solúveis o qual foi hidrolisado diretamente com 20 mL de hidróxido de sódio 4N. A partir desta fase seguiu-se o mesmo procedimento para a obtenção dos ésteres solúveis dos ácidos fenólicos da farinha das amostras (item 4.2.7.1.3).

4.2.7.2. Padrões dos compostos fenólicos

Os padrões dos compostos fenólicos utilizados no CG-EM para a identificação dos compostos fenólicos presentes nas amostras foram obtidas da Sigma® e são os seguintes: ácido salicílico, ácido *t*-cinâmico, ácido *p*-hidrobenzóico, ácido vanílico, ácido gentísico, ácido protocatequínico, ácido quínico, ácido *o*-cumárico, ácido *p*-cumárico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido caféico, ácido sinápico, catequina, ácido clorogênico, quercetina, rutina, chrisina, catecol, hidroquinona, glicitina, genisteína, gliciteína, genistina, resveratrol, daidzina, daidzeína, pruretina, equol.

4.2.7.3. Silanização dos padrões, das frações fenólicas e dos extratos

Para o processo de silanização foram tomadas alíquotas de 1 mL de cada solução padrão, dos extratos e das frações fenólicas em seguida foi adicionada 0,5 mL do padrão interno (éster metílico do ácido heptadecanoato Sigma® 0,25 mg/mL) o solvente foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio. Adicionou-se 0,5 mL de BSA [N, O-bis (trimetilsilil)-acetamida] (Sigma®). A seguir, as amostras foram mantidas em banho maria a 60ºC por 30 minutos. Após este procedimento as amostras foram injetadas no cromatógrafo em fase gasosa.

4.2.8. Identificação dos compostos fenólicos nas amostras

Para a identificação dos compostos fenólicos nos extratos e nas frações fenólicas das amostras utilizou-se o cromatógrafo a gás marca HP modelo 6890 versão A 03.03, e o cromatógrafo a gás marca *Shimadzu* modelo GC17A acoplados aos espectros de massa HP modelo 5973, e *Shimadzu* QP5000 respectivamente. A coluna capilar empregada foi a semipolar DB5 estrutura química de polimetilfenilsiloxana com 30 metros de comprimento e 0,25mm de diâmetro interior. As condições cromatográficas utilizadas foram:

- ✓ A temperatura inicial de 150ºC isotérmica por 3 minutos, seguida de aquecimento de 5ºC por minuto até 300ºC permanecendo nesta temperatura por 3 minutos.
- ✓ A temperatura do injetor foi de 310ºC.
- ✓ A temperatura do detetor foi de 320ºC.
- ✓ A razão da divisão da amostra no injetor foi de 1:50.
- ✓ Gás de arraste: hélio (1mL/min)
- ✓ Volume de injeção da amostra: 1μL

A identificação dos ácidos fenólicos presentes nas amostras foi realizada com base nas bibliotecas (NIST12.LIB, NIST62.LIB E USP.LIB) incorporadas ao programa e confirmada pelo tempo de retenção dos padrões dos compostos fenólicos do item 4.2.7.2.

A quantificação dos ácidos fenólicos foi feita por padronização interna e os resultados foram expressos em mg/g de amostra.

4.2.9. Atividade antioxidante em sistema aquoso

A determinação da atividade antioxidante foi realizada "*in vitro*" segundo MARCO (1968) e modificado por MILLER (1971) empregando-se como substrato a solução de β-caroteno/ácido linoléico preparada com 0,2 mL de β-caroteno (20 mg/mL) + 0,8 mL de cloroformio + 20 mg de ácido linoléico (1 gota) e 3 gotas de *Tween* 60 como emulsificante, em seguida foi evaporado o solvente sob atmosfera de nitrogênio e adicionou-se água destilada tratada com O_2 durante 30 minutos. Esse sistema foi mantido a 50ºC e medidas espectrofotométricas de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro *Bausch & Lomb,* modelo *Spectronic* 20 D, a 470ηm, a cada 15 minutos, durante 2 horas; sendo que a primeira leitura foi realizada a temperatura ambiente (24 ± 1ºC).

Diferentes volumes de extratos e das frações fenólicas das amostras foram medidos para que ao serem colocados em 5mL de solução de β-caroteno/ácido linoléico atinjam uma concentração de 50 e 100 ppm. Todas as determinações foram feitas com repetição e acompanhadas por um controle sem antioxidante e outro com solução de BHT nas mesmas concentrações. A avaliação do efeito sinergista da atividade antioxidante dos extratos e das frações fenólicas foi realizada através da associação com o antioxidante sintético BHT na proporção de 1:1. As percentagens de inibição da oxidação foram calculadas da seguinte forma: o decaimento da densidade ótica do controle (D.O. inicial - D.O. final) foi considerado como 100% de oxidação. A queda na leitura da densidade ótica das amostras foi correlacionada com o controle e estabeleceu-se a percentagem de inibição da oxidação, subtraindo-se a percentagem de oxidação de cada amostra de 100, de acordo a seguinte fórmula:

$$\% \text{ AA} = 100 - \frac{\text{(decaimento de absorbância da amostra)}}{\text{(decaimento de absorbância do controle)}} \text{ X } 100$$

Onde:

%AA = Porcentagem da atividade antioxidante.

4.2.10 - Estudo cinético da atividade antioxidante em sistema aquoso

Para estimar a eficiência da atividade antioxidante dos extratos e das frações fenólicas das amostras foi utilizado o método das tangentes em duas partes das curvas cinéticas, segundo modificação do método descrito por YANISHILIEVA & MARINOVA (1995).

Para obter o primeiro fator foi medida, na curva (entre 15 e 45 minutos após o início da reação), a eficiência do antioxidante para bloquear a reação em cadeia através da interação com os radicais peróxido. Essa eficiência é medida pela relação entre as tangentes das curvas cinéticas apresentadas pelo meio contendo o extrato e o controle sem antioxidante. Os valores obtidos foram denominados fator 1 (F1):

$$F_1 = \frac{\text{tg extrato ou fração}}{\text{tg controle}}$$

Na segunda parte da curva (entre 75 e 105 minutos após o início da reação) é medida a possibilidade do antioxidante participar nas reações de formação de aldeídos, cetonas, hidroxiácidos, hidrocarbonetos e polímeros, os quais são designados produtos secundários já que são formados na etapa de propagação do processo oxidativo. Essa medida é obtida pela relação entre as tangentes das curvas cinéticas apresentadas pelo meio contendo o extrato e o controle sem antioxidante. Os valores encontrados foram denominados de fator 2 (F2):

$$F_2 = \frac{\text{tg extrato ou fração}}{\text{tg controle}}$$

4.2.11. Atividade antioxidante em sistemas lipídicos

4.2.11.1. Método da estufa "Shall test"

A capacidade antioxidante das frações de ácidos fenólicos do macambo foi medida pelo método experimental da estufa ventilada a 60ºC conhecida como o "Shall teste". O substrato utilizado neste experimento foi o óleo de soja sem antioxidante (Cargill Agricola S/A), a concentração das frações fenólicas, no meio foi de 100 ppm.

Os volumes dos extratos foram medidos e colocados em béqueres, o solvente foi evaporado com nitrogênio e ressuspenso em 1 mL de metanol, juntamente com 3 gotas de *Tween* 80® e 100g de óleo de soja sem antioxidante. De cada amostra foi retirada uma alíquota de 5 mL para as análises do tempo zero. Em seguida o material foi colocado na estufa ventilada a temperatura de 60ºC. As amostras foram mantidas nessas condições por 10 dias, sendo que, alíquotas de 5 mL foram coletadas a cada 24 horas para monitoramento do processo oxidativo através da determinação do índice de peróxidos (AOAC, 1990); das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (SINNHUBER et al, 1958) e medida de dienos conjugados. Para a análise dos dienos conjugados as amostras foram diluídas em iso-octano na proporção de (1:3), e em seguida foram lidas as absorbâncias no espectrofotômetro UV-Visível, Hitachi, modelo U-3410 a um comprimento de onda de 234 ηm,

Além das frações, foram realizados os testes sem adição de amostras (controle) e com o uso de um antioxidante sintético (BHT), na mesma concentração aplicada às frações.

4.2.11.2. "Método do Rancimat"

A atividade antioxidante dos extratos das amostras de chope (*Gustavia augusta* L.), sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) e macambo

(*Theobroma bicolor*) foi determinada com o método de RANCIMAT, usando-se o aparelho Rancimat 743, marca *Metrohm*, ligado ao programa PC: 743 Rancimat 1.0, pela medida do período de indução do óleo de soja sem antioxidante e óleo de soja contendo os extratos, usando o teste *Swift* automatizado (HADORN AND ZÜRCHER, 1974). O principio deste teste é o burbulhamento de ar através do óleo aquecido e o monitoramento da condutividade da água na qual os gases são captados. Os volumes dos extratos foram previamente calculados em base o peso seco dos extratos, para que as concentrações dos mesmos no substrato, óleo de soja sem antioxidante da Cargill Agrícola S/A, fossem de 100 e 200 ppm.

Foram medidos os volumes de cada extrato e colocados nos 8 tubos do Rancimat. O solvente dos estratos das amostras foi evaporado com nitrogênio. Em seguida foi adicionado 5 mL de óleo de soja sem antioxidante a mistura foi homogeneizada por 15 minutos no aparelho de ultra-som. Após, os tubos foram colocados no Rancimat até que a curva de condutividade vezes tempo de reação fosse completada para se calcular o Período de Indução com a seguinte programação: temperatura de 110ºC; Δ T = 1,5ºC;. fluxo do ar de 20 L/h.

Além das frações foram realizados os testes sem adição das amostras (branco) e com o uso de um antioxidante sintético o BHT nas mesmas concentrações aplicadas às amostras. Os resultados foram expressos em percentagem de aumento do período de indução em relação ao branco, segundo a fórmula seguinte:

$$\% \, PI = 100 - \frac{(PI_{amostra})}{(PI_{controle})} \times 100$$

Onde: % PI = Período de Indução

$PI_{amostra}$ = Período de Indução do óleo de soja + o extrato da amostra

$PI_{controle}$ = Período de indução do óleo de soja.

4.2.12- Procedimento experimental *"in vivo"*

O procedimento experimental foi realizado seguindo as seguintes etapas:

a. Preparo dos extratos. Os extratos aquosos do *chope*, *sacha mangua* e *macambo* foram obtidas de acordo com o item 4.2.3., e utilizados nos animais dos grupos respectivos tratamentos

b. Preparo da solução aquosa da glicose 1%, concentração equivalente ao teor de açúcar dos extratos testados. Para ser utilizada com os animais do grupo controle, esta solução foi estocada em *freezer* a uma temperatura de –18 °C.

c. Experimento com os animais de laboratório.

Foram utilizados 32 ratos machos albinos, recém desmamados da linhagem Wistar (*Rattus novergicus,* variedade Albinus Rodentia), obtidos a partir de colônia mantida no biotério da FCF/USP; os ratos foram pesados no início do experimento e a cada sete dias. Foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de 8 animais e colocados em gaiolas de aço inoxidável. As mesmas que foram identificadas como "controle", "chope", "sacha mangua" e "macambo, os animais do grupo controle receberam diariamente por gavagem, durante 28 dias, 200 μL de solução de glicose a 1 %; igualmente os animais dos grupos "chope", "sacha mangua" e "macambo receberam os 200 μL dos respectivos extratos. A temperatura da sala foi de 23 ± 2°C; a alimentação foi "ad libitum" tanto para a água com para a ração comercial para roedores adquirida no comércio da cidade da São Paulo, obedecendo o seguinte protocolo experimental:

No final do experimento, os animais foram sacrificados e coletados as seguintes amostras: sangue, o qual foi coletado em tubo de centrífuga contendo 200 μL de EDTA 5%; o fígado, o cérebro e o tecido adiposo de cada animal foram acondicionados individualmente em papel alumínio, em

seguida colocados em um recipiente com nitrogênio líquido. No laboratório, cada tubo que continha o sangue dos ratos foi pesado e em seguida centrifugado em centrífuga Sorval Instrument modelo RC5C, a 4.000 rpm a uma temperatura de 4ºC por 20 minutos. O plasma de cada tubo foi coletado e acondicionado em *eppendorf* foram etiquetados e armazenados junto com as demais amostra biológicas no *freezer* a uma temperatura de –80ºC, para análises posteriores.

Grupos experimentais	***Tratamentos***
Controle	8 animais recebendo 200μL de glicose 1%
Chope	8 animais recebendo 200μL de extrato aquoso de chope (5,06 mg)
Sacha mangua	8 animais recebendo 200μL de extrato aquoso de sacha mangua (1,84 mg)
Macambo	8 animais recebendo 200μL de extrato aquoso de macambo (1,06 mg)

4.2. 13. Avaliação da capacidade antioxidante no sistema “in vivo”

A avaliação da capacidade antioxidante no sistema “in vivo” foi realizada através de:

- ✓ Determinação do perfil de ácidos graxos no fígado, cérebro, tecido adiposo e plasma dos animais que receberam os 4 tratamentos, esta determinação foi realizada de acordo com os itens (4.2.5 e 4.2.6), sendo que para a determinação dos ácidos graxos neste caso foi utilizado o cromatógrafo a gás *Shimadzu* modelo GC 17 A.

- ✓ Análise da peroxidação lipídica nos fígados dos animais que receberam os 4 tratamentos. Homogenatos dos fígados foram preparados e em

seguida foi realizada a avaliação da peroxidação lipídica através da medida da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando o método descrito por WINTERBOURN et al., (1985).

Pesou-se 0,3 ± 0,01g de fígado ao qual foi adicionado tampão fosfato de sódio (10mM), pH 7,4, na proporção de 1:10 (p/v). Em seguida, a mistura foi homogeneizada, centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos em centrífuga Sorval Instrument modelo RC5C a uma temperatura de 4ºC.

Alíquotas de 500μl foram tomadas do sobrenadante e colocadas em tubo. Acrescentou-se 500μL de HCl 25% (v/v), 45μL de 2,6-di-*t*-butil-4-hidroxitolueno (BHT) 2% em etanol, 500μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1% (p/v) em NaOH 0,05M. A mistura foi homogeneizada em agitador para tubos. Os tubos foram tampados e levados a banho maria fervente por 10 minutos. Em seguida foram resfriados em gelo e acrescentou-se 1,5 mL de n-butanol, a mistura foi homogeneizada vigorosamente, depois centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos onde desenvolveu-se uma cor rósea-avermelhada. Finalmente, tomou-se o sobrenadante para ser realizada a leitura da absorbância em espectrofotómetro Hitachi modelo U-3410 em um comprimento de onda de 532 ηm. O experimento foi realizado em triplicata e a leitura da absorbância foi realizada contra um branco que foi preparado com TBA + HCl + solução salina 0,9%, na proporção de 1:1:1.

Para a quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), foi utilizado como padrão a 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP). Preparou-se uma solução estoque de (TMP) na concentração de 6×10^{-6} mol/L. A partir desta solução preparou-se uma outra solução mil vezes mais diluída a qual foi usada na elaboração da curva padrão de TMP para ser relacionada com as concentrações obtidas nas amostras analisadas.

4.2. 14. Quantificação do conteúdo de proteína

Para a quantificação da proteína no homogenato de fígado dos diferentes grupos experimentais foi realizado pelo método de BRADFORD (1985) utilizando-se albumina bovina como padrão.

O homogenato do fígado foi diluído 50 vezes. Tomou-se uma alíquota de 20 μL do homogenato diluído, em triplicata e adicionou-se 1 mL de reagente de BRADFORD, previamente homogeneizado e filtrado e a seguir foram lidas as absorbâncias no espectrofotômetro Hitachi modelo U-3410 a um comprimento de onda de 595 ηm.

Além das amostras foram realizados os brancos com 20 μL de água destilada e acrescentada 1 mL de reagente de BRADFORD. Os resultados foram expressos em mg/mL.

Para relacionar as leitura das amostras, foi realizada a curva padrão (0 – 0,5 mg/mL com 7 pontos). Tomou-se uma alíquota de 20 μL da mistura preparada segundo o protocolo abaixo mostrado, e em triplicata, as quais foram tratadas da mesma forma que as amostras:

***[PTN*]* (mg/mL)**	***Padrão de. Albumina (μL)***	***Tampão $(PO_4)^{3-}$ (μL)***
0	0	1000
0,0461	50	950
0,0922	100	900
0,1844	200	800
0,2766	300	700
0,3688	400	600
0,4610	500	500
0,5532	600	400

***PTN – Proteína**

4. 2. 15. Cálculo das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

O cálculo das concentrações das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico formadas e das proteínas nas amostras nos diferentes tecidos, foi determinado através da equação da reta (y = ax + b) baseada nas curvas padrão de TMP (tetrametoxipropano) e albumina. Em seguida, foram relacionadas com as absorbâncias lidas, para relacionar as concentração do MDA das amostras com a concentração da proteína.

X = Absorbância do MDA das amostras/ equação da reta padrão do TMP.

Y = Absorbância da proteína/ equação da reta do padrão de proteína (albumina)

X/Y = μ mol de MDA/ mg de proteína.

4.2.16 - Análise estatística

Os resultados estão apresentados como médias $\pm$ desvio padrão. As variações detectadas nos grupos experimentais, foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) e do teste de Tukey. O teste de comparação entre as médias obtidas das amostras foi o teste *t student* para amostras pareadas, onde fixou-se em todos os cálculos um nível de significância com $p < 0,05$. Os *software* utilizados para execução dos testes foram o EXCEL (versão 5.0) e o INSTAT (versão 2.0).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Composição centesimal

Os resultados das análises da composição centesimal, em base úmida, dos mesocarpos dos frutos de chopé e sacha mangua e da semente do macambo, são apresentados na tabela 1. Destacam nestes frutos os altos teores de lípides, fibras alimentares insolúveis (FAI) e proteínas. FLORES PAYTAN (1979) trabalhando com frutos da sacha mangua, encontrou 18,30% de lípides, 33,84% nas fibras e 7,47% de proteína, em matéria seca; para os frutos de chope encontrou 29,95% de lípides, 6,4% nas fibras e 6,92% de proteínas; no caso do macambo, trabalhando com a mistura polpa-semente, observou-se 9,20% de lípides, 6,20 de proteína. Pelos resultados pode-se observar o significado nutricional que têm estes frutos, para as populações regionais, considerando-se o teor de lipídeos, e das proteínas, assim como o alto teor de fibras (FAI, FAS), complexos muito importantes porque exercem efeitos fisiológicos diretos através do trato gastrointestinal (SCHWEIZER & WÜRSCH, 1991).

Tabela 1. Determinações da composição centesimal da farinha da polpa dos frutos do chopé (*Gustavia augusta* L.), e sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) e das sementes do fruto de macambo (*Theobroma bicolor)*

Determinações (%)	Chopé	Sacha Mangua	Macambo
Umidade	60,46 ± 0,15	74,64 ± 0,26	35,58 ± 0,18
Lípides	13,08 ± 0,25	10,07 ± 0,23	32,95 ± 0,23
Cinzas	1,31 ± 0,02	1,00 ± 0,03	0,84± 0,02
Proteínas bruta	5,78 ± 0,11	1,79 ± 0,06	13,30 ± 0,06
(FAI)	12,74± 0,11	10,96 ± 0,06	9,90 ± 0,12
(FAS)	0,38 ± 0,11	0,23 ± 0,02	2,30 ± 0,00
Carboidratos	6,24 ±0,48	1,31 ± 0,41	5,13 ± 0,37

FAI = fibra alimentar insolúvel
FAS = fibra alimentar solúvel

5.2. Análise da composição dos ácidos graxos dos lípides.

De acordo com a tabela 2, onde são apresentados os teores de ácidos graxos da fração lipídica dos frutos do chopé e sacha mangua e da semente do macambo, observa-se que entre os ácidos graxos saturados, destacam-se os teores de ácido palmítico no chopé e na sacha mangua, o ácido esteárico no macambo, e em relação aos ácidos graxos insaturados os três frutos apresentam elevado teor em ácido oléico, sendo que na sacha mangua destaca-se também o ácido linoléico. O ácido linolênico está presente em pequenas quantidades nas três amostras.

Os nossos resultados são similares aos obtidos por FLORES PAYTAN (1997) que, trabalhando com amostras provenientes da Amazônia peruana, encontrou teores de 29,92% de ácido palmítico e 53,71% de ácido oléico na fração lipídica da polpa do chopé.

Do mesmo modo os teores de ácidos graxos da fração lipídica da semente do macambo não apresentou diferenças com os encontrados por JEE (1984) que trabalhou com amostras procedentes de Equador e com os resultados obtidos por SOTELO et al., (1990) em amostras mexicanas. Os valores que eles encontraram para os ácidos graxos são: ácido esteárico 42,9% e 50,44%; e o ácido oléico de 45,1% e 39,38 %, respectivamente.

Outras espécies do gênero *Theobroma*, são o cacau (*T. cacau*) e o cupuaçu (*T. grandiflorum*), os quais tem sido amplamente estudados podem ser considerados como referência, pois o cacau apresenta 25,8% de ácido palmítico, 35,9% de ácido esteárico e 33,3% de ácido oléico (JEE, 1984). Enquanto que, DA SILVA, (1988) trabalhando com o cupuaçu reporta 7,2% de ácido palmítico, 30,8% de ácido esteárico e 43,9% de ácido oléico; observando-se neste gênero a maior incidência de ácido oléico. Estes resultados são muito similares a os que nós obtivemos para o perfil de ácidos graxos das sementes de macambo cujos valores para o ácido palmítico foi de 6,09%, para o ácido esteárico 49,63%, para o ácido oléico em 39,72% e para o ácido linoléico 2,13%.

Outra observação de destaque é a somatória dos ácidos graxos insaturados no chopé é o dobro da somatória dos ácidos saturados; na sacha mangua essa relação é similar e no macambo os ácidos graxos insaturados é levemente menor. A presença de elevados teores de ácidos insaturados nos três frutos sugere a existência nos frutos de mecanismos de proteção destes ácidos graxos para que se possa prevenir processos oxidativos, isto é a presença de compostos que possuem atividade antioxidantes.

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos da fração lipídica da polpa dos frutos do chopé (*Gustavia augusta* L.), sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) e das sementes do fruto do macambo (*Theobroma bicolor)*

Ácidos graxos (%)	**Chopé**	**Sacha Mangua**	**Macambo**
C 16:0	25,73 ± 0,47	47,93 ± 0,07	6,09 ± 0,04
C 17:0	0,18 ± 0,00	—	0,14 ± 0,01
C 18:0	5,56 ± 0,06	2,62 ± 0,03	49,63 ± 0,08
C 20:0	0,31 ± 0,04		2,08 ± 0,18
Σ Ácidos Graxos Saturados	**31,78**	**50,55**	**57,94**
C 16:1	1,73 ± 0,01	—	—
C 17:1	0,31 ± 0,01	—	—
C 18:1	58,57 ± 0,61	19,20 ± 0,03	39,72 ± 0,30
C 18:2	6,18 ± 0,13	29,44 ± 0,14	2,13 ± 0,00
C 18:3	1,45 ± 0,03	0,81 ± 0,08	0,18 ± 0,01
Σ Ácidos Graxos Insaturados	**68,24**	**49,45**	**42,03**

5.3. Concentração de matéria seca

Os teores de matéria seca dos extratos das farinhas das polpas de chopé e sacha mangua e das sementes de macambo estão apresentados na tabela 3, observando-se que a maior concentração, nas três amostras, corresponde ao extrato etéreo, o que indica a maior presença de compostos

de baixa polaridade. Sendo que, os menores valores corresponderam ao extrato alcoólico, estes resultados são diferentes quando comparados com os obtidos por MOURE, et al.,(2000) que trabalhando com extratos aquoso, metanólico, etanólico e etéreo da avelã *Gevuina avellana* encontraram valores de 25,3 mg/g no extrato aquoso, 27,5 mg/g para o metanólico, 19,3 mg/g para o etanólico e 11,0 mg/g para o extrato etérico.

Tabela 3.- Teor de matéria seca dos extratos da farinha da polpa dos frutos do chopé (*Gustavia augusta* L.), sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) e das sementes do fruto do macambo (*Theobroma bicolor)*

Extratos	Chopé (mg/mL)	Sacha Mangua (mg/mL)	Macambo (mg/mL)
Etéreo	44,0 ± 0,04	41,5 ± 0,03	54,2 ± 0,04
Alcoólico	6,8 ± 0,02	6,1 ± 0,01	3,2 ± 0,01
Aquoso	25,3 ± 0,02	9,2 ± 0,03	5,3 ± 0,01

5.3.1. Atividade antioxidante em sistema aquoso

Como já comentado anteriormente a presença de altos teores de ácidos graxos insaturados nas amostras faz supor a existência de substâncias que possam participar de um sistema de proteção do processo oxidativo, pois estes são suscetíveis ao ataque pelos ERO's (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

Na tabela 4, estão apresentados os resultados de inibição da oxidação dos extratos dos frutos em estudo no sistema β-caroteno/ácido linoléico. Pode-se observar que as porcentagens de inibição da oxidação dos extratos etéreo e alcoólico do chopé e sacha mangua, tanto com 50 ppm como com 100 ppm, são menores que o obtido com o BHT nas mesmas concentrações; mas o extrato aquoso apresentou valores maiores quando comparadas com o BHT. Alem disso, os três extratos das três amostras,

quando misturados com o BHT, na proporção 1:1, apresentaram valores maiores que os obtidos com os mesmos extratos e o BHT individualmente, indicando com isso, que houve sinergismo.

Para o macambo, o extrato etéreo tanto com 50 ppm como com 100 ppm e os extratos alcoólico e aquoso com 100 ppm, apresentaram valores menores quando comparados com o BHT nas mesmas concentrações; no entanto os extratos alcoólico e aquoso com 50 ppm, apresentaram valores maiores quando comparados com o BHT nas mesmas condições.

Como exemplos para comparar nossos resultados pode-se mencionar a atividade antioxidante de extratos de sementes ou especiarias, tais como a reportada por AMAROWICZ, et al., (2000) que trabalhando com semente de canola e casca de semente de colza relatam ter encontrado boa atividade antioxidante no extrato metanólico da canola (0,04%) maior do que o obtido pelo extrato metanólico da casca da semente de colza (0,04%); mas o valor foi menor do que o obtido pelo antioxidante sintético (hidroxibutilanisol) BHA (0,01%). MOURE, et al., (2000) trabalhando com extratos da casca da avelã *Gevuina avellana* aquoso (1.800 mg/L), etéreo (2.500 mg/L), metanólico (1.100 mg/L) e etanólico (4.400 mg/L) encontraram valores para o Coeficiente da Atividade Antioxidante (AAC) do extrato etanólico = 767,13 e metanólico = 183,98, sendo que estes extratos foram os que apresentaram maior atividade antioxidante do que os demais extratos; mas os valores são menores quando comparados com o BHT (AAC = 693) e BHA (AAC = 901), cujas concentrações são muito menores 350 e 230 mg/L respectivamente. JAYAPRAKASHA, et al., (2001) trabalhando com amostras de sementes de uva nos extratos acetônico, etil acetato, metanólico e mistura de etil acetato (EtOAc)/água em proporção de 9:1, 17:3 e 4:1 observaram que à concentração de 100 ppm a atividade antioxidante destes extratos foi de 65 – 90 %, sendo que as misturas de EtOAc/água mostraram a maior atividade antioxidante quando comparados com o BHA na mesma concentração.

Tabela 4. Porcentagem de inibição da oxidação dos extratos da farinha da polpa dos frutos do chopé (*G. augusta* L.), sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) e das sementes do fruto do macambo (*Theobroma bicolor)*

Extratos	Extrato 50ppm	BHT 50ppm	Extr.+BHT 25 ppm+25ppm	Extrato 100ppm	BHT 100ppm	Extr.+BHT 50 ppm+50ppm
Chopé						
Etéreo	43,54	65,94	73,39	56,01	70,49	80,72
Alcoólico	40,64	63,60	64,57	52,91	69,34	75,13
Aquoso	72,54	65,92	76,89	79,22	76,63	83,81
Sacha M.						
Etéreo	24,63	62,76	59,58	34,30	60,70	66,27
Alcoólico	27,84	64,64	60,85	44,60	66,12	71,05
Aquoso	72,10	66,59	71,94	84,42	71,88	83,75
Macambo						
Etéreo	60,42	64,59	53,74	58,29	70,77	72,41
Alcoólico	71,19	66,91	81,77	76,74	80,13	85,96
Aquoso	67,06	65,04	80,44	63,67	71,61	81,85

SHAHRZAD & BITSCH, (1996); MAYER et al., (1997) destacam que muitos ácidos fenólicos, por exemplo os ácidos caféico, clorogênico, ferúlico, gálico e elágico, os quais ocorrem naturalmente, são inibidores da carcinogênese. HÄKKINEN et al., (1999) afirmam que atualmente acredita-se que os flavonóides e os ácidos fenólicos exercem efeito cardioprotetor em humanos, através de sua capacidade em inibir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL). Além disso, SCHROETER et al., (2000), depois de trabalhar com células de neurônios de camundongo, sugerem um possível papel dos flavonóides em diminuir a neurodegeneração associada com perturbações crônicas no qual o estresse oxidativo está implicado.

Como conseqüência dos resultados obtidos, na avaliação da atividade antioxidante dos extratos etéreo, alcoólico e aquoso das amostras de chopé, sacha mangua e macambo, concluiu-se que o ensaio *in vivo* deveria ser realizado com os extratos aquosos de cada uma das amostras por apresentarem maior atividade antioxidante frente aos demais extratos.

Feita a identificação dos extratos com maior atividade antioxidante e na procura da caracterização dos compostos fenólicos, devido ao alto potencial antioxidante nas frações onde estes poderiam estar presentes, foi realizado um fracionamento das farinhas das amostras para a obtenção das frações livre, solúveis e insolúveis de ácidos fenólicos, de acordo com o esquema de KRYGIER, et al., (1982).

As frações foram submetidas ao sistema β-caroteno/ácido linoléico para verificação do potencial de inibição da oxidação, de forma semelhante ao que foi realizado com os diferentes extratos das farinhas das amostras. Para uma melhor visão do mecanismo de ação antioxidante dos compostos fenólicos presentes na farinha das polpas do chopé e sacha mangua e semente de macambo foram realizadas as curvas da cinética da inibição da oxidação dos extratos etéreo, alcoólico e aquoso das farinhas em estudo, assim como das frações dos ácidos fenólicos livres, ácidos fenólicos de ésteres solúveis e ácidos fenólicos de ésteres insolúveis comparados com o antioxidante sintético BHT.

A atividade antioxidante dos extratos etéreo, alcoólico e aquoso das farinhas das amostras foi avaliada em 120 minutos através do sistema β-caroteno/ácido linoléico frente ao BHT, em concentrações de 50 ppm e 100 ppm e os resultados desta avaliação junto as tangentes das curvas da cinética da atividade antioxidante estão apresentadas nas tabelas 5, 6 e 7.

Nas figuras 5 a 13 estão representadas as curvas da cinética da atividade antioxidante dos extratos etéreo, alcoólico e aquoso das farinhas das polpas de chopé e sacha mangua e da semente do macambo.

Nas figuras 5, 6 e 7 apresentam-se as curvas da cinética da atividade antioxidante do extrato etéreo das amostras em estudo observa-se nas três um decaimento similar, embora seja mais pronunciado na sacha mangua a 50 ppm e melhora a 100 ppm.; mas quando são misturadas com o BHT na proporção (1:1), o chopé e a sacha mangua apresentam melhor atividade antioxidante que o macambo na concentração de 25 ppm.

Nas figuras 8, 9 e 10 são apresentadas as curvas da atividade antioxidante dos extratos alcoólico das amostras em estudo observa-se que a maior proteção foi obtida nos extratos do macambo, tanto a 50 ppm como a 100 ppm, em comparação com as outras duas amostras, também observa-se que a sacha mangua após os 45 minutos apresenta uma forte queda nas curvas, sendo menor para o chopé e muito leve para o macambo. Além disso, as três amostras apresentam boa atividade antioxidante quando misturadas com o BHT na proporção (1:1).

Nas figuras 11, 12 e 13 são apresentadas as curvas da atividade antioxidante dos extratos aquosos das três amostras, onde pode-se observar uma excelente atividade antioxidante apresentadas pelas amostras quando comparadas com os extratos alcoólico e etéreo tanto a 50 ppm como a 100 ppm. Além disso, pode-se observar resposta similar quando os extratos aquosos foram misturados com o BHT na proporção (1:1), embora exista um destaque destas últimas para o chopé e sacha mangua. A mistura do extrato aquoso do macambo com o BHT (1:1).na concentração de 25 ppm, apresenta uma pequena elevação da atividade antioxidante.

Com os resultados das curvas de cinética, acima indicados, foi possível elaborar as tabelas 5, 6 e 7, onde estão apresentados os fatores calculados a partir das tangentes das curvas cinéticas. O fator F_1 representa a efetividade do antioxidante em bloquear as reações em cadeia ocasionadas pelos radicais peróxila, enquanto o fator F_2, representa a possibilidade do antioxidante participar de outras reações, como da decomposição dos hidroperóxidos com oxigênio, formando espécies radicalares que acelerem o processo oxidativo do sistema e se o valor desta razão for maior do que 1, é por que deve existir uma atividade pro-oxidante no extrato (YANISHLIEVA &MARINOVA, 1995).

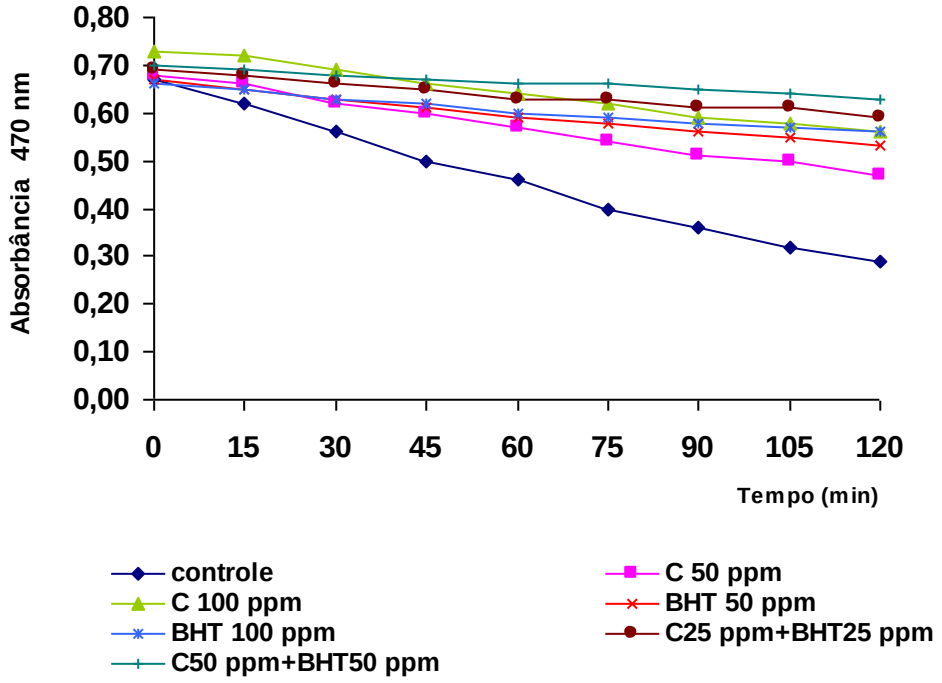


Figura 5. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etéreo da farinha da polpa de chopé (c) no sistema β-caroteno/ácido linoléico.

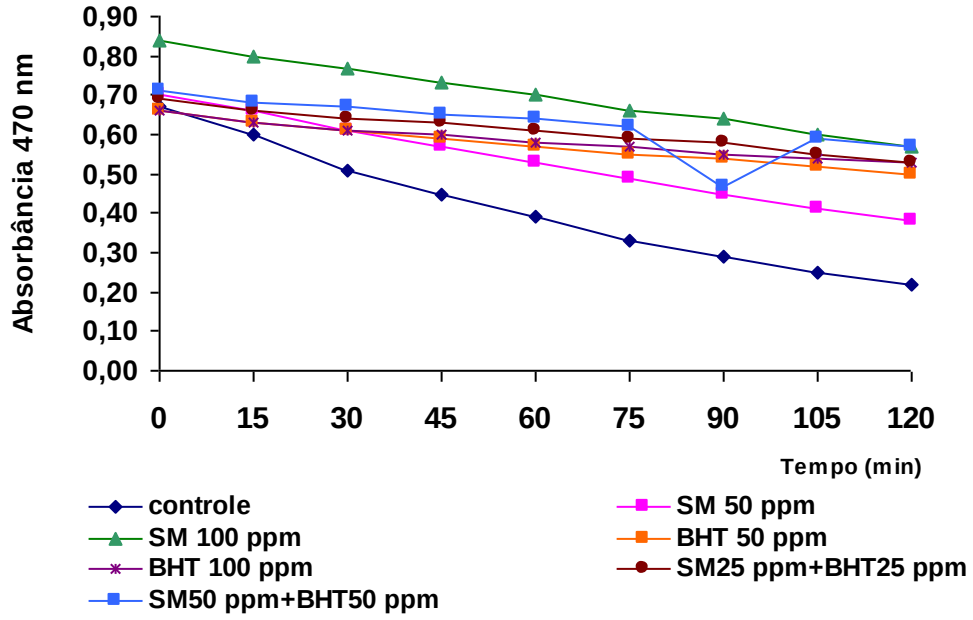


Figura 6. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etéreo da farinha da polpa de sacha mangua (SM) no sistema β-caroteno/ácido linoléico.

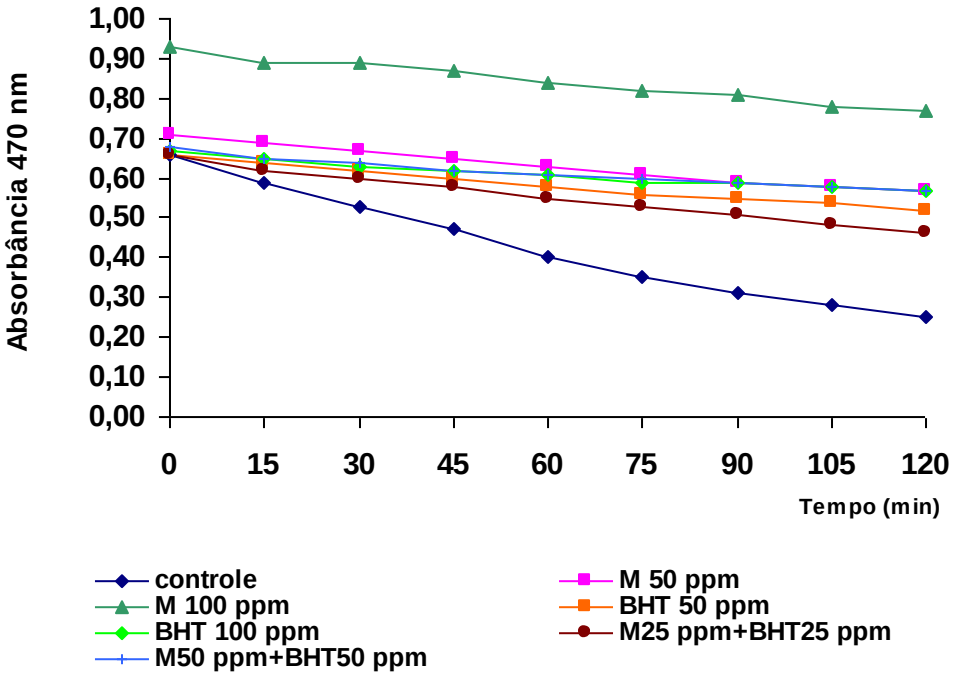


Figura 7. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etéreo da farinha das sementes de macambo (M) no sistema β-caroteno/ácido linoléico.

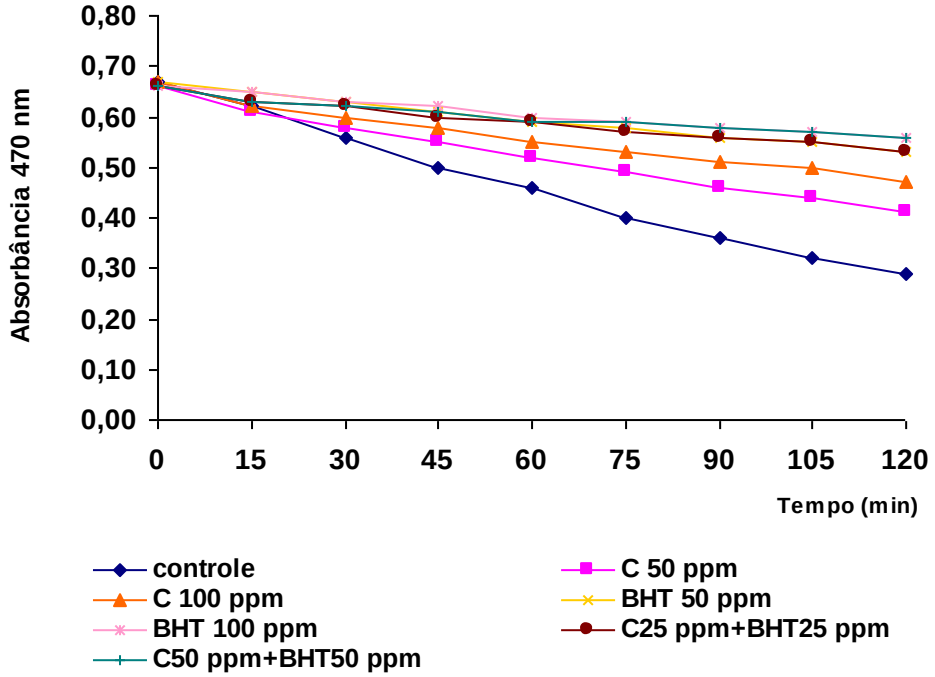


Figura 8. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato alcoólico da farinha da polpa de chopé (C) no sistema β-caroteno/ácido linoléico.

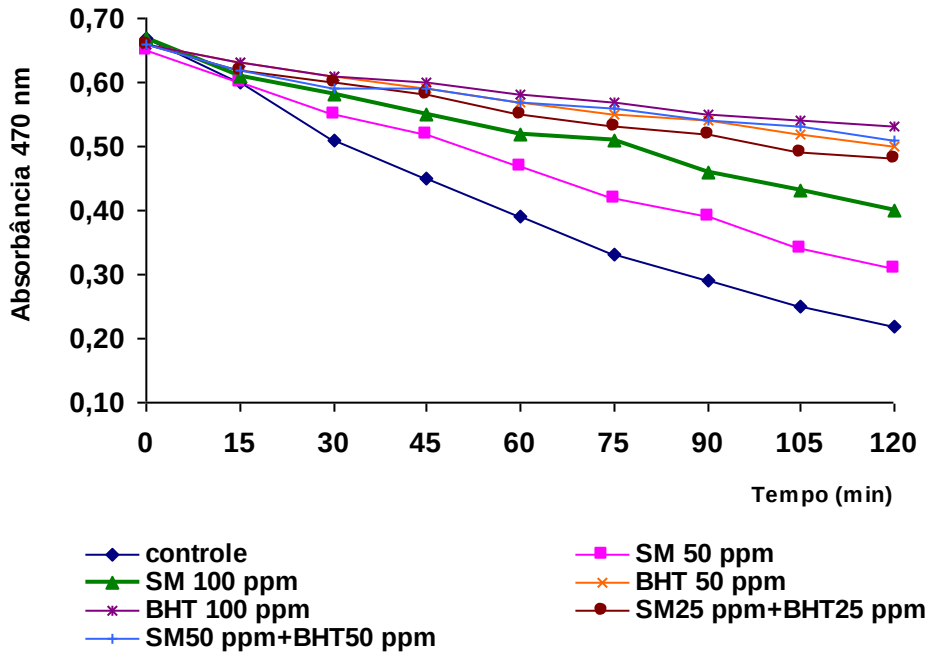


Figura 9. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato alcoólico da farinha da polpa de sacha mangua (SM) no sistema β-caroteno/ácido linoléico.

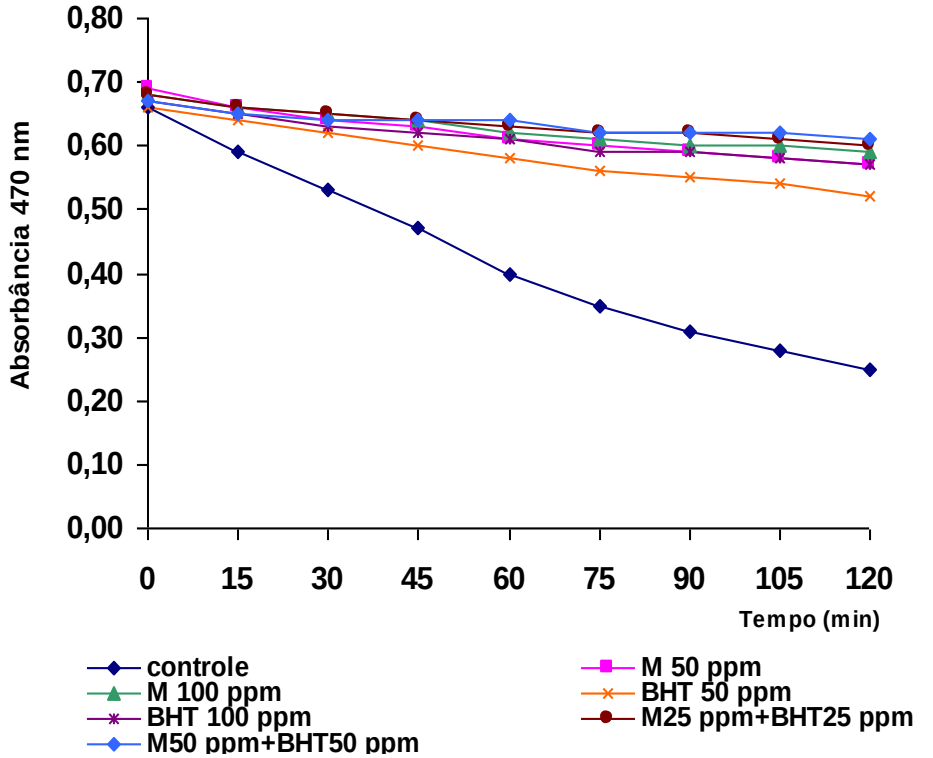


Figura 10. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato alcoólico da farinha das sementes de macambo (M) no sistema β-caroteno/ácido linoléico.

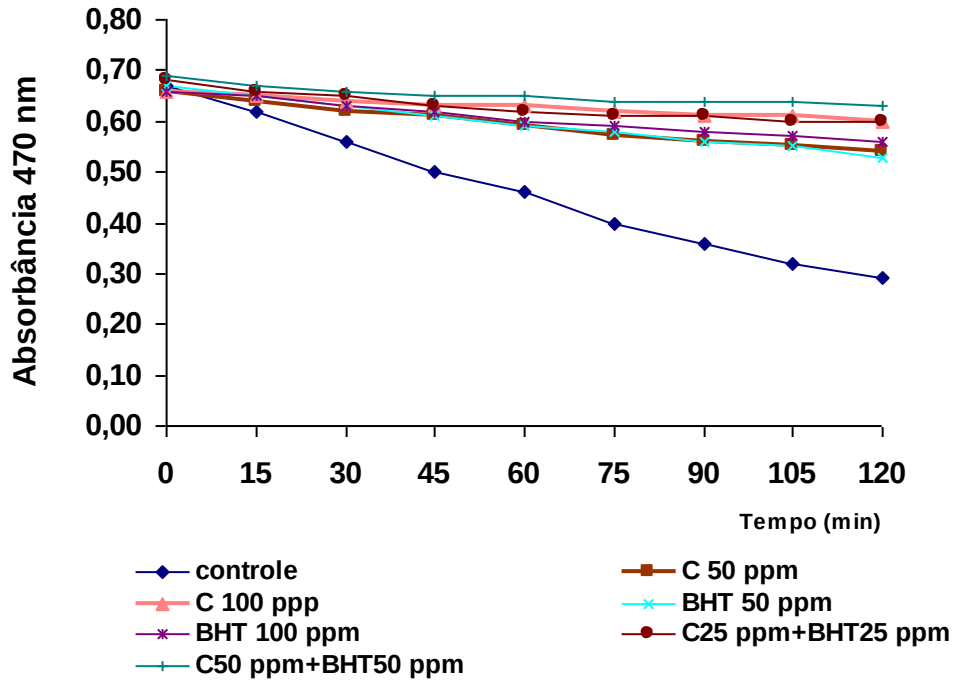


Figura 11. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso da farinha da polpa de chopé (C) no sistema β-caroteno/ácido linoléico.

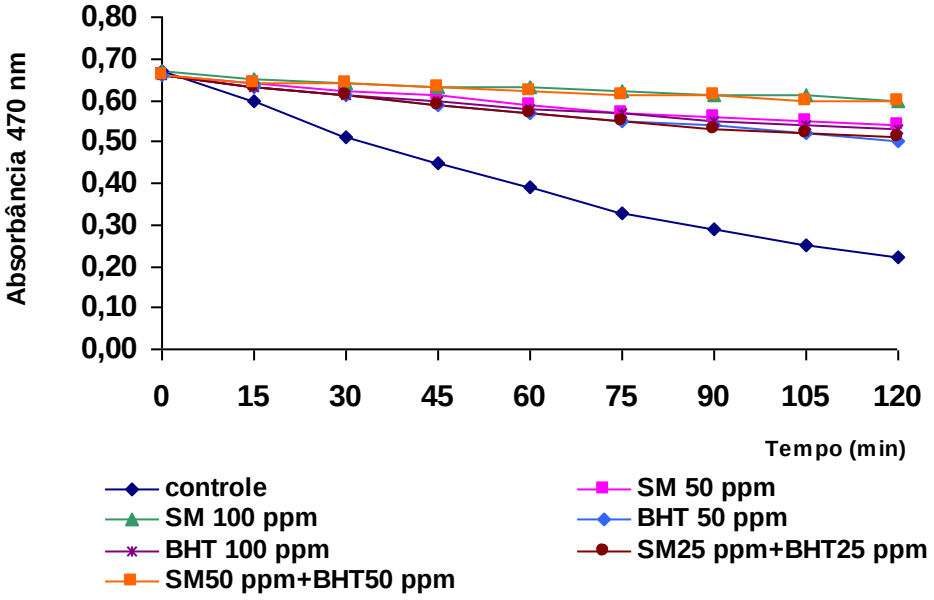


Figura 12. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquosa da farinha da polpa de sacha mangua (SM) no sistema β-caroteno/ácido linoléico.

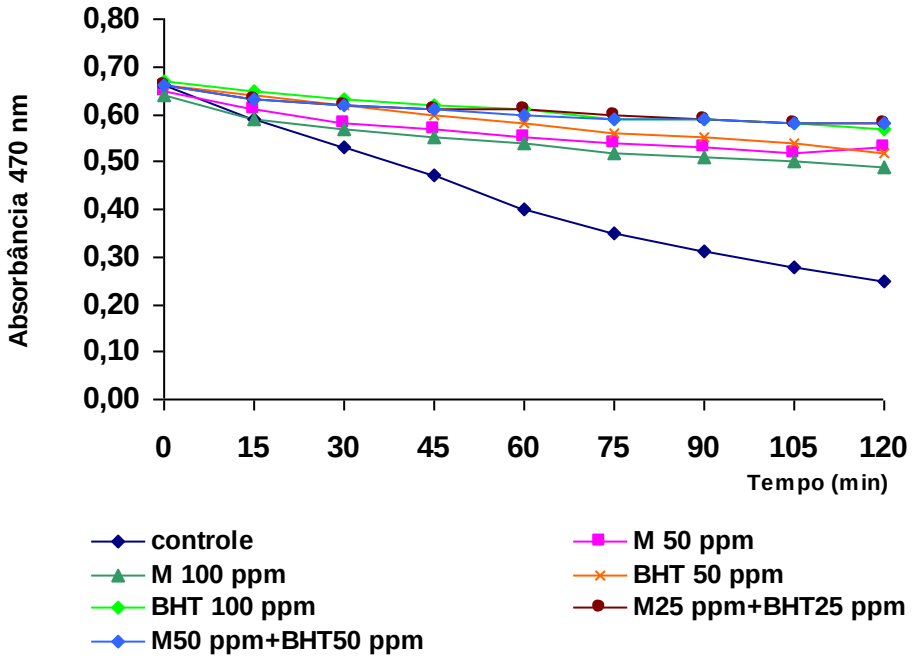


Figura 13. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquosa da farinha das sementes de macambo (M) no sistema β-caroteno/ácido linoléico.

De acordo com os resultados apresentados nas tabelas 5, 6 e 7 pode-se avaliar os valores dos F_1 e F_2 comparando os valores obtidos pelas amostras com os valores obtidos pelo BHT nas mesmas condições.

Para os extratos etéreos a melhor resposta foi a do macambo tanto com 50 ppm como com 100 ppm, em seguida estão o chopé e a sacha mangua, embora estes melhorem quando misturadas com o BHT na proporção (1:1) na concentração de 100 ppm.

Para os extratos alcoólicos o macambo também apresentou a melhor atividade quando comparadas com os resultados obtidos para o chopé e a sacha mangua nas mesmas concentrações, mas comparando com o BHT os resultados são muito similares, além disso, quando este extrato das três amostras foram misturadas com o BHT na proporção de (1:1) apresentaram sinergismo.

Para o caso dos extratos aquosos as melhores respostas foram encontradas para o chopé e sacha mangua nas concentrações de 50 ppm e 100 ppm quando comparadas com o BHT nas mesmas concentrações, embora os valores obtidos pelo extrato aquoso do macambo sejam muito similares aos valores obtidos pelo BHT nas mesmas concentrações. Os extratos das três amostras apresentam uma excelente atividade antioxidante e sinergismo quando associados ao BHT.

Dos valores cinéticos apresentados nas tabelas 5, 6 e 7 como resultado da análise de variância (ANOVA) pode-se verificar que dos extratos etéreos dos três frutos estudados o extrato do macambo apresentou diferença significativa para o valor de F1 em comparação com aos extratos de chopé e sacha mangua indicando com isso que foi o extrato mais efetivo para inibir o período de indução da oxidação. Por outro lado, para valores de F2 na mesma concentração (50ppm) o extrato da Sacha mangua foi o que apresentou maior resposta com diferença significativa significativa ($p<0,005$), mostrando que este extrato foi o menos efetivo para estabilizar as reações de propagação. Para a concentração de 100 ppm F1 não teve diferença significativa entre os extratos, porém para F2 na mesma concentração (100 ppm) apenas o extrato do Chopé apresentou diferença significativa, mostrando que em uma concentração maior, mas dentro dos valores limites exigidos pela legislação Brasileira, este extrato apresentou resposta menor e significativamente diferente em relação aos extratos das outra amostras.

Já o estudo cinético para os extratos alcoólicos dos frutos em concentrações de 50 ppm e 100 ppm o macambo foi o mais efetivo dos três extratos e apresentou diferença significativa na inibição do período de indução. Por outro lado, nas reações de propagação da reação oxidativa (F2) todos os extratos apresentaram-se significativos entre si, em ambas as concentrações. Estudando porém os extratos aquosos destes frutos, em ambas concentrações e fatores cinéticos (iniciação e propagação da cadeia oxidativa) o extrato do macambo foi o único que apresentou diferença significativa.

Tabela 5. Parâmetros cinéticos do potencial antioxidante no sistema β-caroteno/ácido linoléico do extrato etéreo da farinha da polpa de chopé, sacha mangua e semente de macambo.

Extrato etéreo	Concentração			
	50 ppm		100 ppm	
	F1	F2	F1	F2
Chopé	0,5	0,5	0,4	0,5*
Sacha mangua	0,6	1,0*	0,5	0,8
Macambo	0,3*	0,4	0,3	0,6
BHT (Chopé)	0,4	0,4	0,2	0,3
BHT (Sacha mangua)	0,3	0,4	0,3	0,4
BHT (Macambo)	0,3	0,3	0,3	0,1*
BHT + Chopé	0,2	0,3*	0,2	0,3
BHT + Sacha mangua	0,3	0,5	0,3	0,4
BHT + Macambo	0,4	0,7	0,3	0,3

F1, F2 = Fatores cinéticos
(*) Foram consideradas significantes as diferenças para $P \leq 0,05$. Teste : Análise de variância

Tabela 6. Parâmetros cinéticos do potencial antioxidante no sistema β-caroteno/ácido linoléico do extrato alcoólico da farinha da polpa de chopé, sacha mangua e semente de macambo.

Extrato alcoólico	Concentração			
	50 ppm		100 ppm	
	F1	F2	F1	F2
Chopé	0,6	0,6*	0,5	0,4*
Sacha mangua	0,6	1,0**	0,5	1,0**
Macambo	0,3*	0,3***	0,2*	0,1***
BHT (Chopé)	0,4	0,4	0,2	0,3
BHT (Sacha mangua)	0,3	0,4	0,3	0,4
BHT (Macambo)	0,3	0,3	0,3	0,1*
BHT + Chopé	0,4	0,2	0,3	0,3
BHT + Sacha mangua	0,4	0,5*	0,3	0,4
BHT + Macambo	0,2	0,1	0,2	0,01*

F1, F2 = Fatores cinéticos
(*) Foram consideradas significantes as diferenças para $P \leq 0,05$. Teste : Análise de variância

Tabela 7. Parâmetros cinéticos do potencial antioxidante no sistema β-caroteno/ácido linoléico do extrato aquoso da farinha da polpa de chopé, sacha mangua e semente de macambo.

Extrato aquoso	Concentração			
	50 ppm		100 ppm	
	F1	F2	F1	F2
Chopé	0,3	0,2	0,2	0,1
Sacha mangua	0,2	0,2	0,2	0,1
Macambo	0,4	0,3	0,5*	0,3*
BHT (Chopé)	0,4	0,4	0,2	0,3
BHT (Sacha mangua)	0,3	0,4	0,3	0,4
BHT (Macambo)	0,3	0,3	0,3	0,1*
BHT + Chopé	0,3	0,1*	0,2	0,01*
BHT + Sacha mangua	0,3	0,4	0,1	0,1
BHT + Macambo	0,3	0,3	0,3	0,1

F1, F2 = Fatores cinéticos
(*) Foram consideradas significantes as diferenças para $P \leq 0,05$. Teste : Análise de variância

Na tabela 8, estão apresentadas os teores de matéria seca, das frações fenólicas das farinhas das amostras em estudo, observa-se que as maiores concentrações foram obtidas pelas frações de ácidos fenólicos livres (AFL), da sacha mangua; ácidos fenólicos de ésteres solúveis (AFES) do chopé; porém, o menor valor foi para a fração de ácidos fenólicos de ésteres insolúveis (AFEI) do chope e da sacha mangua.

Tabela N° 8.- Teor de matéria seca das frações fenólicas da farinha da polpa dos frutos do chopé (*Gustavia augusta* L.), sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) e das sementes do macambo (*Theobroma bicolor*)

Frações	Chopé (mg/mL)	Sacha Mangua (mg/mL)	Macambo (mg/mL)
AFL	4,5 ± 0,13	28,7 ± 0,24	2,8 ± 0,03
AFES	28,3 ± 0,60	4,0 ± 0,20	5,0 ± 0,05
AFEI	0,7 ± 0,03	0,7 ± 0,03	1,0 ± 0,00

AFL = ácidos fenólicos livres
AFES = ácidos fenólicos de ésteres solúveis
AFEI = ácidos fenólicos de ésteres insolúveis

Na tabela 9 estão apresentados os resultados das porcentagens de inibição da oxidação das frações fenólicas das farinhas em estudo no sistema β-caroteno/ácido linoléico. Para as três frações fenólicas das três amostras, tanto com 50 ppm como com 100 ppm, os valores obtidos foram maiores quando comparados com os valores do BHT nas mesmas concentrações, com exceção da fração de ácidos fenólicos de ésteres solúveis (AFES) do chope com 100 ppm que não teve variação. Estas frações quando associadas com volumes equivalentes do BHT apresentaram atividade sinergista, sendo que esta atividade foi mais acentuada nas três frações de ácidos fenólicos da sacha mangua e do macambo assim como, a fração de ácidos fenólicos livres (AFL) do chopé nas mesmas concentrações segue a mesma tendência. As frações de ácidos fenólicos de ésteres solúveis (AFES) e a de ácidos fenólicos de ésteres insolúveis (AFEI) do chope nas mesmas concentração apresentaram menor efeito sinergista.

Os resultados destas observações são confirmados quando realizam-se as curvas da cinética das atividades antioxidantes das frações de ácidos fenólicos livres (AFL), ácidos fenólicos de ésteres solúveis (AFES) e ácidos fenólicos de ésteres insolúveis (AFEI) somando-se aos resultados obtidos no sistema β-caroteno/ácido linoléico após 120 minutos. Estas curvas são mostradas nas figuras 14 a 22.

Nas figuras 14, 15 e 16 são apresentadas as curvas da cinética da atividade antioxidante da fração dos ácidos fenólicos livres (AFL) das amostras em estudo. Observa-se que esta fração tanto com 50 ppm como com 100 ppm nas três amostras permaneceram muito estáveis quando comparadas com o controle e com o BHT. Quando os extratos das amostras foram associadas com volumes equivalentes de BHT também pode-se observar a mesma tendência.

Tabela 9. Porcentagem de inibição da oxidação das frações fenólicas da farinha da polpa dos frutos do chopé (*Gustavia. augusta* L.), sacha mangua (*Grias. neuberthii* Macbr.) e das sementes do fruto do macambo (*Theobroma. bicolor*)

Frações	Fração 50ppm	BHT 50ppm	Fraç.+BHT 25 ppm+25ppm	Fração 100ppm	BHT 100ppm	Fraç.+BHT 50 ppm+50ppm
Chopé						
AFL	89,07	71,96	91,20	88,35	79,24	85,74
AFES	82,91	68,78	70,46	75,74	75,95	67,51
AFEI	87,30	67,05	73,68	79,18	75,34	77,10
Sacha mangua						
AFL	83,13	52,78	88,18	86,39	76,36	84,71
AFES	86,20	69,95	88,53	80,36	75,49	87,63
AFEI	82,39	69,58	81,20	85,19	73,74	86,27
Macambo						
AFL	87,08	60,77	91,86	82,58	69,89	89,40
AFES	84,56	70,01	82,98	85,02	77,00	85,23
AFEI	91,92	63,91	90,09	93,10	70,46	91,71

AFL = ácidos fenólicos livres
AFES = ácidos fenólicos de ésteres solúveis
AFEI = ácidos fenólicos de ésteres insolúveis

Nas figuras 17, 18 e 19 estão apresentadas as curvas da cinética da atividade antioxidante da fração dos ácidos fenólicos de ésteres solúveis (AFES) do chope, sacha mangua e macambo. Pode-se observar que nas amostras de chope, sacha mangua e macambo apresentam um decaimento similar, mas sempre menores do que o apresentado pelo BHT, nas concentrações de 50 ppm e 100 ppm. Além disso, quando os extratos das amostras são associados com volumes equivalentes com o BHT nas mesmas concentrações o decaimento da atividade antioxidante foi similar aos apresentados pelo extrato das amostras isoladamente.

Nas figuras 20, 21 e 22 estão apresentadas as curvas cinéticas da atividade antioxidante da fração dos ácidos fenólicos de ésteres insolúveis (AFEI) das três amostras em estudo. Pode-se observar que nas amostras de chope e sacha mangua, o decaimento da atividade antioxidante foi muito similar ao apresentado pelo BHT tanto com 50 ppm como com 100 ppm sendo este fato também observado quando a fração foi associada com o BHT em volumes equivalentes nas nas mesmas concentrações. Já no caso

do macambo o decaimento da atividade antioxidante da fração foi similar, tanto com 50 ppm como com 100 ppm, ao decaimento apresentado pela mistura do extrato com o BHT na proporção (1:1). No entanto, estes resultados são melhores que os obtidos pelo controle e pelo BHT nas mesmas concentrações.

Já que alguns efeitos benéficos vem sendo associados aos compostos fenólicos, tais como: ação antioxidante, a prevenção de câncer, doenças cardiovasculares, entre outras, pode-se atribuir a esses compostos a elevada atividade antioxidante encontrada nas frações fenólicos do chopé, da sacha mangua e do macambo. Os resultados obtidos são similares como os reportados por MOREIRA et al., (2001). Mc DONALD et al., (2001) trabalhando com semente de algarroba e frutas secas de oliva, encontraram elevada atividade antioxidante inibindo a oxidação entre 75% a 95% e 72% a 90% respectivamente. No entanto, AMAROWICZ et al., (2000) trabalhando com sementes de colza encontraram valores de inibição da oxidação que variam de 15% a 35% valores que são muito menores aos nossos.

Além do mais, FRANKEL et al., (1995); TEISSEDRE et al., (1996) MAYER et al., (1997); demonstraram que compostos fenólicos extraídos de diferentes variedades de uvas apresentam excelente atividade antioxidante "in vitro" para inibir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade de humanos (LDL).

Com os resultados obtidos das curvas cinéticas da atividade antioxidante das frações fenólicas das três amostras foi elaborada as tabelas 10, 11 e 12, onde estão apresentados os fatores cinéticos (F_1 e F_2), calculados a partir das tangentes das curvas cinéticas, da mesma forma que foi feito para os diferentes extratos das amostras, e pode-se assim, analisar os valores dos F_1 e F_2 em comparação com o BHT no mesmo meio.

As frações de ácidos fenólicos livres (AFL), das três amostras, foram semelhantes e apresentaram boa estabilidade tanto com 50 ppm como com 100 ppm e também quando associadas com o BHT. Destacando-se que

estes resultados das amostras foram melhores do que os apresentados pelo BHT.

As frações de ácidos fenólicos de ésteres solúveis (AFES)das três amostras apresentaram respostas semelhantes e com boa estabilidade tanto com 50 ppm como com 100 ppm assim como quando foram associadas ao BHT na proporção de (1:1). Além disso, pode-se observar que os resultados obtidos pelas amostras foram melhores do que os obtidos pelo BHT nas mesmas concentrações.

A fração de ácidos fenólicos de ésteres insolúveis (AFEI) apresentou melhor resposta nas sementes do macambo tanto na concentração de 50 ppm como com 100 ppm assim como também quando esta fração foi associada ao BHT na proporção de (1:1). Para o chope os valores de F_1 e F_2 quando esta fração foi associada ao BHT apresentou resposta semelhante ao do BHT com 50 ppm.

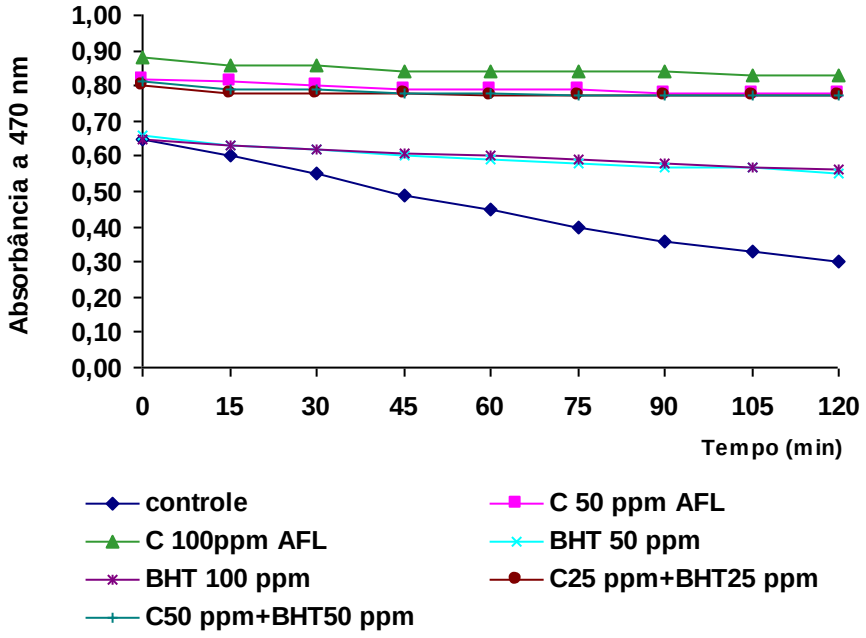


Figura 14. Curva cinética do potencial antioxidante da fração livre de ácidos fenólicos (AFL) da farinha da polpa de chope (C) no sistema β-caroteno/ácido linoléico.

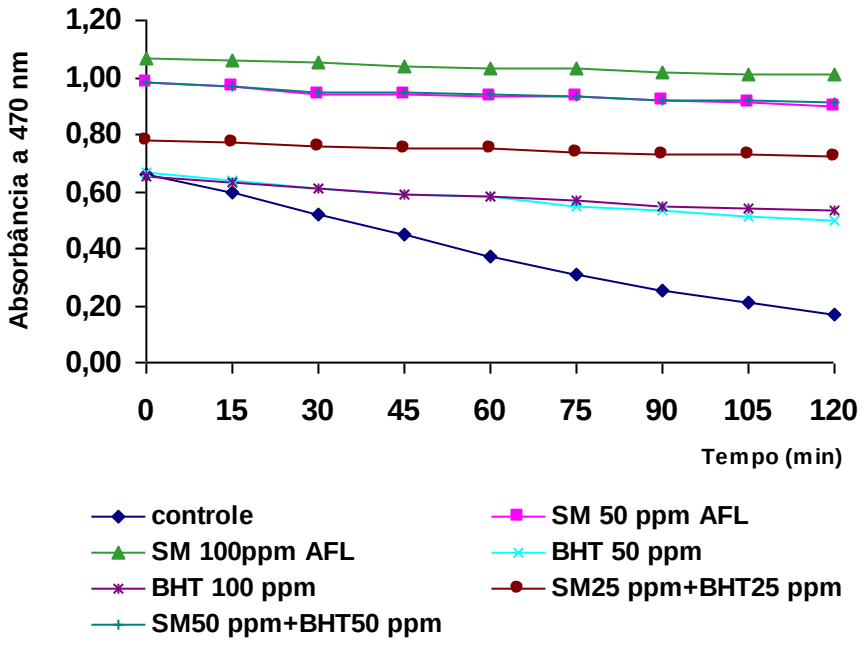


Figura 15. Curva cinética do potencial antioxidante da fração livre de ácidos fenólicos (AFL) da farinha da polpa da sacha mangua (SM) no sistema β-caroteno/ácido linoléico.

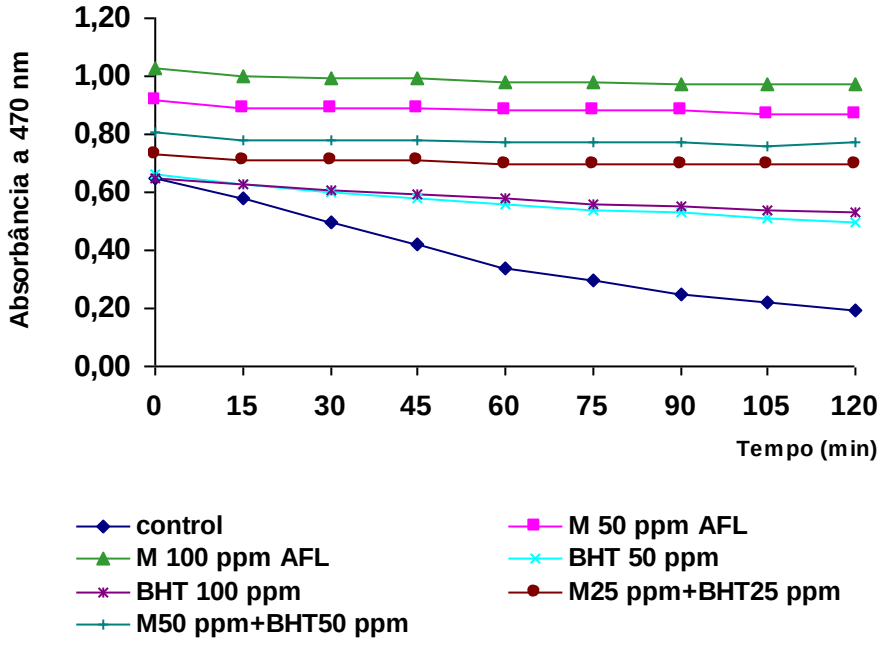


Figura 16. Curva cinética do potencial antioxidante da fração livre de ácidos fenólicos (AFL) da farinha das sementes de macambo (M) no sistema β-caroteno/ácido linoléico.

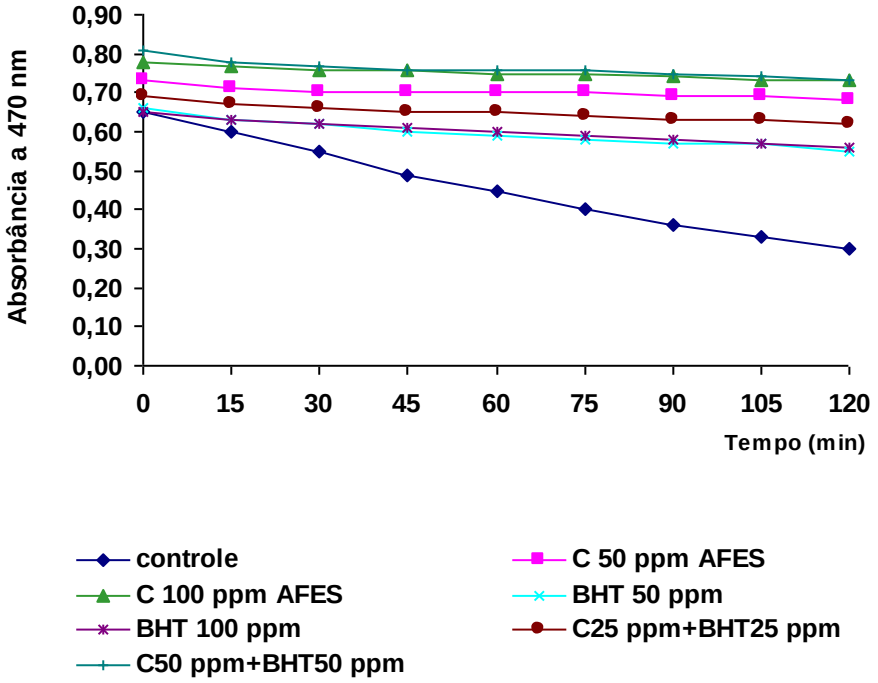


Figura 17. Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ésteres solúveis de ácidos fenólicos (AFES) da farinha da polpa de chope (C) no sistema β-caroteno/ácido linoléico.

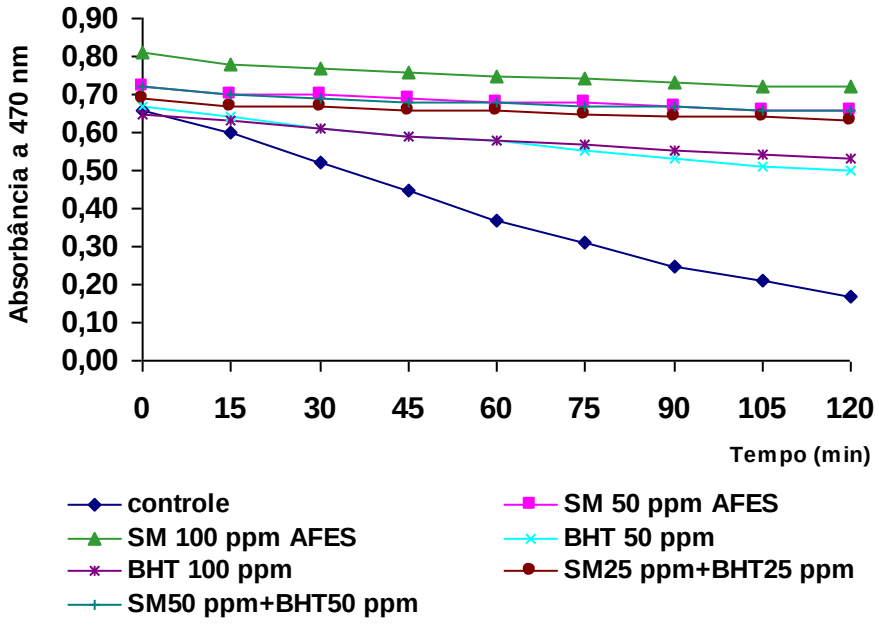


Figura 18. Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ésteres solúveis de ácidos fenólicos (AFES) da farinha da polpa da sacha mangua (SM) no sistema β-caroteno/ácido linoléico.

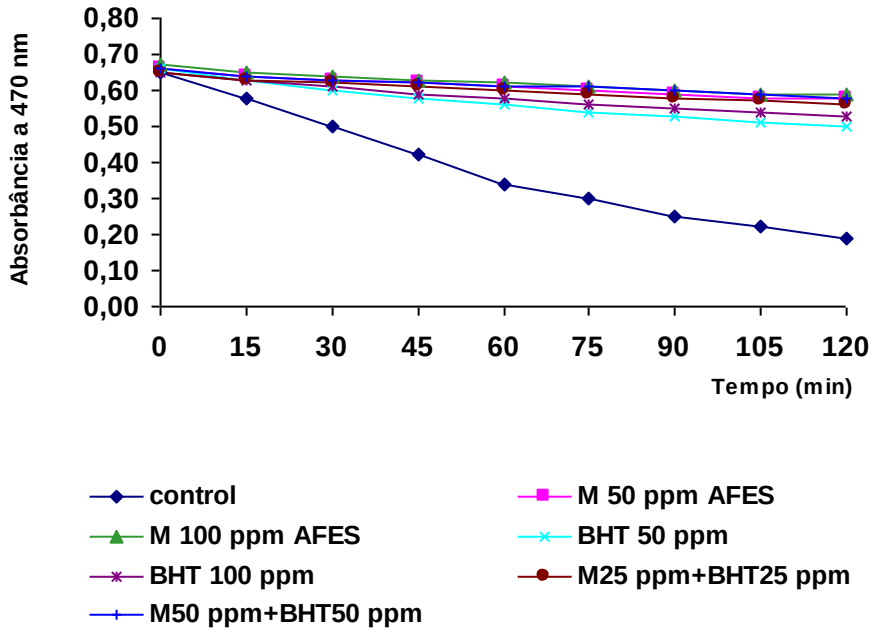


Figura 19. Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ésteres solúveis de ácidos fenólicos (AFES) da farinha das sementes de macambo (M) no sistema β-caroteno/ácido linoléico.

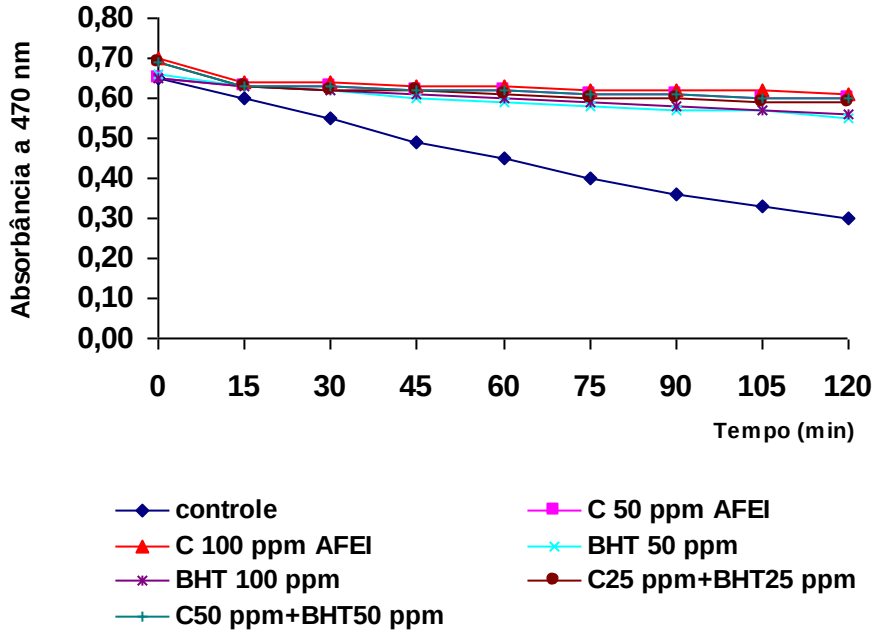


Figura 20. Curva cinética do potencial antioxidante da fração insolúvel de ácidos fenólicos (AFEI) da farinha da polpa do chope (C) no sistema β-caroteno/ácido linoléico.

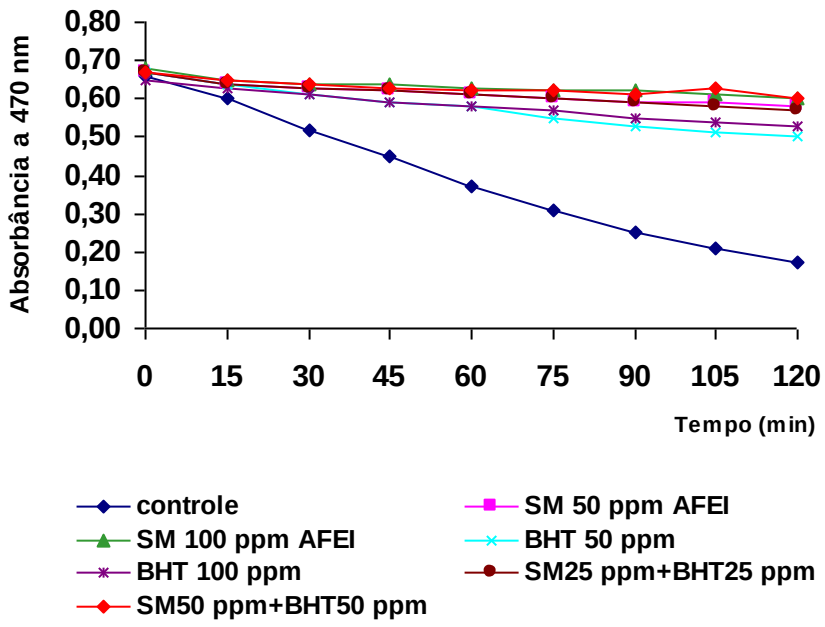


Figura 21. Curva cinética do potencial antioxidante da fração insolúvel de ácidos fenólicos (AFEI) da farinha da polpa da sacha mangua (SM) no sistema β-caroteno/ácido linoléico.

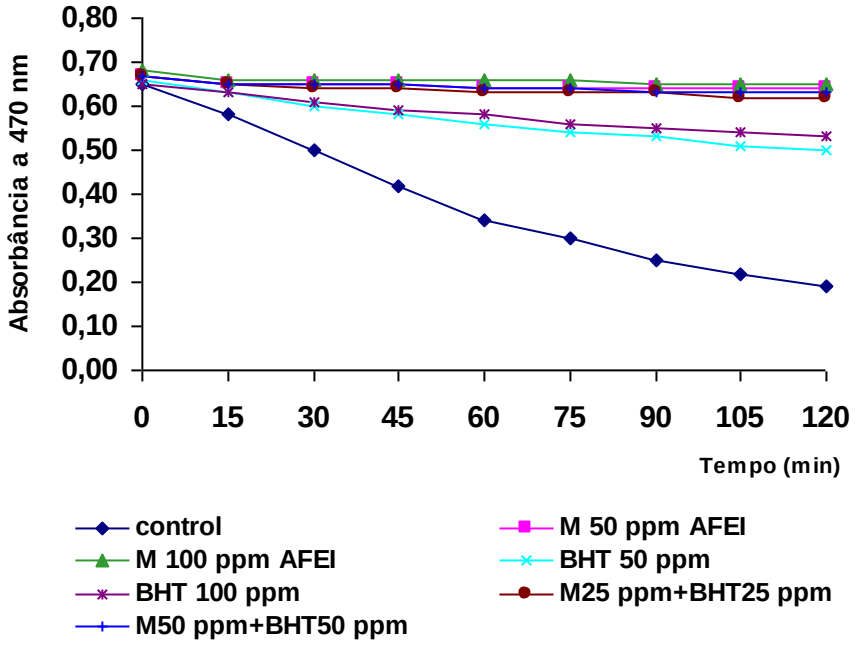


Figura 22. Curva cinética do potencial antioxidante da fração insolúvel de ácidos fenólicos (AFEI) da farinha das sementes do macambo (M) no sistema β-caroteno/ácido linoléico.

Após a avaliação estatística dos valores de inibição da oxidação obtidos pelas frações apresentados nas tabelas 10, 11 e 12, observa-se que nas frações livres dos frutos estudados os valores obtidos foram excelentes e não houve diferença significativa tanto para F_1 quanto para F_2 assim como também quando estas frações foram associados ao antioxidante sintético BHT, para as mesmas concentrações. Já para as frações solúveis de todos os frutos não houve diferença significativa entre si para $P \leq 0,05$, como também quando associados ao antioxidante sintético BHT. No entanto, quando analisou-se a fração insolúvel destes frutos, pode-se observar que em uma concentração de 50 ppm, todos os frutos somente foram estatisticamente significativos na etapa de inibição da propagação da reação oxidativa (F2) e na concentração de 100 ppm, em ambas as etapas oxidativas (inibição e propagação) todos as frações dos frutos apresentaram diferença significativa entre si para $P \leq 0,05$, mostrando que estes resultados confirmam as expressões gráficas das figuras 14 a 22 anteriormente apresentadas.

Tabela 10. Comparação dos parâmetros cinéticos do potencial antioxidante, no sistema β-caroteno/ácido linoléico das frações de ácidos fenólicos livres da farinha da polpa do chope, sacha mangua e da semente de macambo com o BHT

Fração livres	**Concentração**			
	50 ppm		**100 ppm**	
	F1	**F2**	**F1**	**F2**
Chopé	0,2	0,1	0,3	0,1
Sacha mangua	0,2	0,2	0,1	0,2
Macambo	0,1	0,1	0,2	0,1
BHT (Chopé)	0,1	0,1*	0,2	0,1
BHT (Sacha mangua)	0,4	0,4	0,3	0,3
BHT (Macambo)	0,3	0,4	0,3	0,3
BHT + Chopé (1:1) (25 e 50ppm)	0,1	0,01	0,2	0,1
BHT + Sacha mangua (1:1) (25 e 50ppm)	0,1	0,1*	0,1	0,1
BHT + Macambo (1:1) (25 e 50ppm)	0,1	0,01	0,1	0,1

F1, F2 = Fatores cinéticos

(*) Foram consideradas significantes as diferenças para $P \leq 0,05$. Teste : Análise de variância

Tabela 11. Parâmetros cinéticos do potencial antioxidante, no sistema β-caroteno/ácido linoléico das frações de ácidos fenólicos de ésteres solúveis da farinha da polpa do chope, sacha mangua e da semente de macambo

Fração de ésteres solúveis	Concentração			
	50 ppm		100 ppm	
	F1	F2	F1	F2
Chopé	0,2	0,1	0,1	0,3
Sacha mangua	0,1	0,2	0,2	0,2
Macambo	0,2	0,3	0,2	0,3
BHT (Chopé)	0,4	0,1*	0,3	0,3
BHT (Sacha mangua)	0,4	0,4	0,3	0,3
BHT (Macambo)	0,3	0,4	0,3	0,3
BHT + Chopé (1:1) (25 e 50ppm)	0,2	0,1	0,3	0,3
BHT + Sacha mangua (1:1) (25 e 50ppm)	0,1	0,1	0,2	0,1
BHT + Macambo (1:1) (25 e 50ppm)	0,2	0,3	0,2	0,3

F1, F2 = Fatores cinéticos
(*) Foram consideradas significantes as diferenças para $P \leq 0,05$. Teste : Análise de variância

Tabela 12. Parâmetros cinéticos do potencial antioxidante, no sistema β-caroteno/ácido linoléico das frações de ácidos fenólicos de ésteres insolúveis da farinha da polpa do chope, sacha mangua e da semente de macambo.

Fração de ésteres insolúveis	Concentração			
	50 ppm		100 ppm	
	F1	F2	F1	F2
Chopé	0,2	0,1	0,4*	0,01*
Sacha mangua	0,2	0,1	0,2	0,1
Macambo	0,1	0,01*	0,1*	0,1
BHT (Chopé)	0,4	0,1*	0,3	0,3
BHT (Sacha mangua)	0,4	0,4	0,3	0,3
BHT (Macambo)	0,3	0,4	0,3	0,3
BHT + Chopé (1:1) (25 e 50ppm)	0,4*	0,1	0,4*	0,1
BHT + Sacha mangua (1:1) (25 e 50ppm)	0,2	0,2	0,2	0,1
BHT + Macambo (1:1) (25 e 50ppm)	0,1*	0,1	0,1*	0,1

F1, F2 = Fatores cinéticos
(*) Foram consideradas significantes as diferenças para $P \leq 0,05$. Teste : Análise de variância

5.3.2. Compostos fenólicos identificados por cromatografia em fase gasosa associada ao espectro de massa

5.3.2.1. Nos extratos das amostras

Nas tabelas 13, 14 e 15 estão apresentados os compostos fenólicos identificados pela cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectro de massa nos extratos etéreo, alcoólico e aquoso das farinhas da polpa de chopé e sacha mangua e da semente do macambo. Observa-se que nos extratos de chopé e sacha mangua a presença de maior número dos compostos fenólicos esta no extrato alcoólico. Já para os extratos da semente de macambo o maior número está na fração aquosa. Além disso pode-se observar que o ácido sinápico foi o composto fenólico que atingiu maior valor nos três extratos das três amostras.

Dos 13 compostos fenólicos identificados nos extratos das amostras o ácido caféico e ácido sinápico estão presentes nos três extratos das três amostras como podem ser observados nos cromatogramas com os espectros dos ácidos mais representativos no tempo real no CG-EM onde podem ser observados nos anexos 1 a 9. Os três extratos do chopé apresentaram o maior número (10) de compostos fenólicos. Além disso, pode-se observar a diferença que existe entre as amostras com respeito aos compostos fenólicos identificados no seus diferentes extratos, assim temos que para o chopé foi identificado a rutina, hidroquinona, resveratrol e a daidzina, para a sacha mangua foi o ácido *t*-cinâmico e a chrisitina e para o macambo além de apresentar o catecol, ácido ferúlico, ácido caféico, ácido sinápico e a daidzeína, compostos que são comuns para as três amostras, apresenta a glicitina que foi identificada também para o chopé

Alguns picos em todas as amostras foram ora identificados pelo tempo de retenção, ora estão presentes e não foram identificados pelos tempos de retenção dos padrões presentes mas que apresentaram áreas bastante pronunciadas. Este fato, pode ser devido aos extratos não terem

sofrido processo de purificação e estes picos podem ter sido mascarados por contaminantes lipídicos ou estes últimos terem saído no mesmo tempo de retenção de algum composto fenólico. Este fato foi observado em trabalhos de extratos de mostarda e também observados por MOREIRA & MANCINI-FILHO (1998).

Comparando os resultados obtidos com os encontrados na literatura destaca-se a de LIBERATORE et al., (2001) que trabalhando com extrato metanólico/água (60:40) de 10 amostras de óleo de oliva virgem procedentes da região de Abruzzo (Italia) relataram a identificação de oito compostos fenólicos que são o tirosol, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido protocatequínico, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e ácido cafeico utilizando o método da cromatografía gasosa acoplada ao espectro de massa, diferindo com nossos resultados só na identificação do tirosol e do siríngico nas suas amostras. QUETTIER-DELEU et al., (2000) trabalhando com extratos metanol:acetona:água (70:70:30; v/v/v) e metanol:água 2/8 (v/v) da casca e farinha da semente do cereal “buckwheat” identificaram a epicatequina (1,143; 3,395 mg/100g); rutina (5,205; 2,275 mg/100g); quercitina (0,608; 0,153 mg/100g) e procianidina (48,943; 51,881 mg/100g) respectivamente, estes resultados são similares aos encontrados nas nossas amostras com referência à rutina e quercetina. CZNNER et al., (2000) afirmam que as propriedades farmacológicas que possui a infusão da inflorescência da *Helichrysum arenarium* (L) Moench é atribuída aos compostos fenólicos que possuem e que foram identificados, dentre eles o ácido caféico, ácido clorogênico, quercetina entre outros.

OWEN et al., (2000) utilizando o método da cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa detectaram a presença do ácido *p*-cumárico, ácido vanílico, ácido *p*-hidroxibenzóico, e ácido *o*-cumárico em baixas concentrações no extrato metanólico do óleo de oliva, sendo que estes resultados coincidem com os nossos resultados encontrados no extrato alcoólico das amostras.

Tabela 13. Compostos fenólicos identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectro de massa nos extratos da farinha da polpa do fruto do chopé (*Gustavia augusta* L.)

Compostos fenólicos	Composição (mg/g)		
	Etéreo	Alcoólico	Aquoso
Catecol	nd	0,03	0,34
Hidroquinona	nd	nd	0,07
Glicitina	nd	nd	0,13
Ácido ferúlico	nd	0,04	nd
Ácido caféico	1,37	0,16	0,49
Ácido sinápico	4,76	2,82	2,91
Rutina	nd	0,05	nd
Resveratrol	1,40	nd	nd
Daidzina	nd	0,27	nd
Daidzeína	3,04	0,19	nd
ni.	1,22	1,47	4,30

ni = não identificado; nd = não detectado

Tabela 14. Compostos fenólicos identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectro de massa nos extratos da farinha da polpa do fruto da sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.)

Compostos fenólicos	Composição (mg/g)		
	Etéreo	Alcoólico	Aquoso
Catecol	nd	0,03	0,07
Gliciteína	nd	nd	0,18
Ácido *t*-cinâmico	nd	0,04	nd
Ácido Ferúlico	0,09	0,04	nd
Ácido Caféico	0,19	0,20	0,72
Ácido Sinápico	0,30	1,92	2,92
Chrisitina	Nd	0,08	nd
Daidzeína	1,14	0,10	nd
ni	3,48	1,30	3,40

ni = não identificado; nd = não detectado

Tabela 15. Compostos fenólicos identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectro de massa nos extratos da farinha das sementes do fruto do macambo (*Theobroma bicolor*)

Compostos fenólicos	Composição (mg/g)		
	Etéreo	Alcoólico	Aquoso
Catecol	Nd	nd	0,13
Gliciteína	Nd	0,28	0,26
Glicitina	Nd	nd	0,17
Ácido ferúlico	0,12	nd	nd
Ácido caféico	0,13	0,39	0,71
Ácido sinápico	0,28	2,00	3,33
Daidzeína	0,39	nd	nd
ni.	5,87	7,72	2,60

ni = não identificado; nd = não detectado

5.3.2.2 Nas frações fenólicas das amostras

A identificação dos compostos fenólicos nas frações AFL, AFES e AFEI das farinhas das polpas de chopé e sacha mangua e da semente de macambo, foram realizadas utilizando a cromatografia gasosa acoplado ao espectro de massa (CG-EM), sendo os resultados apresentados nas tabelas 16, 17 e 18.

O chopé e a sacha mangua são os frutos que apresentam um maior número de compostos fenólicos identificados (10) seguidos pelo macambo (8). Sendo que, o ácido salicílico foi identificado nas três frações das três amostras; o ácido *t*-cinâmico foi identificado nas três frações do chopé e nas frações AFL e AFES da sacha mangua e do macambo, assim como também foram identificados o ácido *p*-hidrobenzóico, ácido protocatequínico ácido gálico e ácido sinápico nas três amostras. Além disso, o ácido vanílico e o ácido *o*-cumárico foram identificados no chopé e na sacha mangua; assim como a quercetina na sacha mangua e no macambo. Uma caraterística importante é que os três apresentam alto teor de ácido salicílico nas três frações. Sendo o chopé e a sacha mangua espécies pertencentes à mesma

família Lecythidaceae pode-se dizer que eles apresentam alguns ácidos fenólicos semelhantes, embora o chopé não apresente o ácido quínico e a quercetina, e na sacha mangua estão ausentes o ácido ferúlico e o ácido caféico.

O macambo apesar de ser de família Sterculiaceae apresenta em termos gerais os mesmos compostos fenólicos e em comparação com o chopé ele não contém o ácido vanílico, ácido *o*-cumárico, ácido ferúlico e ácido caféico. Já comparando com a sacha mangua o macambo não apresenta o ácidos vanílico, ácido *o*-cumárico e ácido quínico, embora o macambo apresente a catequina a qual não está presente na sacha mangua nem no chopé. Além disso, nas três frações fenólicas do macambo foram identificados o ácido salicílico, ácido *p*-hidroxibenzóico e ácidos sinápico; já o ácido *t*-cinâmico e a quercetina foram identificado nas frações AFL e AFES; o ácido gálico estão presentes nas frações AFES e AFEI; e o ácido protocatequínico foi identificado na fração AFES.

Estes valores diferem dos encontrados em outros vegetais quando comparados com os obtidos em diferentes pesquisas com ervas e sementes, podemos destacar a JUSTESEN & KNUTHSEN, (2001) que trabalhando com 15 ervas identificaram a quercetina na *lovage* (170mg/100g) e na *dill* (48-110 mg/100g). XING & WHITE, (1997) encontraram 2,3 mg/Kg na casca da aveia e MOREIRA & MANCINI-FILHO (1998) encontraram 2,3 % na semente de mostarda. Enquanto os derivados hidroxilados do ácido benzóico e cinâmico, também foram observados em morango por KÄHKÖNEN et al (1999). HÄKKINEN et al., (1999) nos extratos metanólicos de 19 espécies de morango, identificaram o kaempferol, quercetina, miricetina, ácido *p*-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico e ácido *p*-hidroxibenzóico.

O caso da presença do ácido *t*-cinâmico é muito interessante pois este composto toma parte na biossíntese das antocianinas e proantocianinas as quais apresentaram-se em teores elevados na semente do cacau espécie do gênero *Theobroma* como o macambo (WOLLGAS & ANKLAM, 2000).

Tabela 16. Compostos fenólicos identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectro de massa nas frações fenólicas da farinha da polpa do fruto de chopé (*Gustavia augusta* L.)

Compostos fenólicos	Composição (mg/g)		
	AFL	AFES	AFEI
Ácido salicílico	9,50	24,02	5,80
Ácido *t*-cinâmico	0,02	0,06	0,06
Ácido *p*-hidroxibenzóico	0,03	0,06	nd
Ácido Vanílico	nd	0,41	nd
Ácido *o*-cumárico	nd	0,06	nd
Ácido protocatequínico	nd	0,09	nd
Ácido gálico	0,05	0,33	0,03
Ácido ferúlico	0,01	nd	nd
Ácido caféico	0,01	nd	nd
Ácido sinápico	0,20	0,05	0,03
ni	1,88	1,01	0,25

ni = não identificado; nd = não detectado; AFL = ácidos fenólicos livres
AFES = ácidos fenólicos de ésteres solúveis; AFEI = ácidos fenólicos de ésters insolúveis

Tabela 17. Compostos fenólicos identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectro de massa nas frações fenólicas da farinha das sementes do fruto do macambo (*Theobroma bicolor*)

Compostos fenólicos	Composição (mg/g)		
	AFL	AFES	AFEI
Ácido salicílico	11,84	17,29	2,68
Ácido *t*-cinâmico	0,04	0,03	nd
Ácido p-hidroxibenzóico	0,02	0,04	0,02
Ácido protocatequínico	nd	0,65	nd
Ácido gálico	nd	0,03	0,01
Ácido sinápico	0,18	0,03	0,02
Catequína	0,02	nd	nd
Quercetina	0,03	0,05	nd
ni	0,34	0,12	0,15

ni = não identificado, nd = não detectado; AFL = ácidos fenólicos livres,
AFES = ácidos fenólicos de ésteres solúveis; AFEI = ácidos fenólicos de ésters insolúveis

Tabela 18. Compostos fenólicos identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectro de massa nas frações fenólicas da farinha da polpa do fruto da sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.)

Compostos fenólicos	Composição (mg/g)		
	AFL	AFES	AFEI
Ácido salicílico	1,60	16,59	10,04
Ácido *t*-cinâmico	0,004	0,04	nd
Ácido *p*-hidroxibenzóico	nd	0,14	0,02
Ácido vanílico	nd	1,22	nd
Ácido *o*-cumárico	nd	0,15	0,02
Ácido protocatequínico	nd	1,11	0,04
Ácido quínico	nd	0,05	nd
Ácido gálico	0,14	0,46	0,06
Ácido sinápico	0,01	nd	0,02
Qercetina	nd	nd	0,23
ni	0,17	1,80	0,45

ni = não identificado, nd = não detectado; AFL = ácidos fenólicos livres
AFES = ácidos fenólicos de ésteres solúveis; AFEI = ácidos fenólicos de ésters insolúveis

5.4. Atividade antioxidante em sistemas lipídicos

Depois de se ter observado uma boa atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos das amostras em estudo no sistema β-caroteno/ácido linoléico, e na procura de uma melhor aplicação na indústria de alimentos foi testado nos sistemas lipídicos a atividade antioxidante das frações fenólicas da semente de macambo por ser a que apresentou a melhor atividade. Assim como os extratos etéreo, alcoólico e aquoso das três amostras foram testados pelo método de Rancimat a 110°C

No teste de *Shall* como substrato utilizou-se o óleo de soja sem antioxidante (Cargil Agrícola S/A); as frações fenólicas foram adicionadas no óleo na concentração de 100 ppm e a avaliação foi realizada através da

determinação do índice de peróxido, pela presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e na formação de dienos conjugados.

Os resultados obtidos das medições do índice de peróxido das frações fenólicas do macambo estão apresentados na tabela 19 e figura 23, onde pode-se observar que o óleo de soja sem a presença de antioxidantes, apresentou uma maior velocidade de oxidação, mostrando que todas as frações de ácidos fenólicos da farinha da semente de macambo conferem boa proteção ao óleo. As frações de ácidos fenólicos livres (AFL) e de ácidos fenólicos de ésteres solúveis (AFES) mostraram maior proteção que a fração de ácidos fenólicos de ésteres insolúveis (AFEI) e do que o BHT. Esta diferença pode-se observar a partir das 144 horas de iniciado o experimento, embora das 24 às 144 horas, todos os componentes apresentaram o mesmo comportamento na formação de peróxidos. Esta tendência pode ser atribuída à ausência da quercetina e do ácido *t*-cinámico na fração AFEI da amostra. No entanto, estes resultados mostram que as frações fenólicas do macambo apresentaram excelente estabilidade oxidativa ao óleo de soja.

De forma similar ao observado para a curva de peróxidos, as curvas formadas pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (tabela 20 e figura 24) acompanharam a formação de peróxidos, embora a maior inflexão das curvas tenha sido na faixa de 96 – 120 horas. Deste modo confirma-se os resultados destes componentes como antioxidantes para proteger da oxidação os produtos alimentícios.

Pelos resultados e pela curva da formação de dienos conjugados (tabela 21, figura 25) observa-se pouca diferença entre as frações fenólicas testadas da amostra quando comparadas com o controle, já que apresentam respostas muito similares à formação de dienos conjugados; sendo que, dentre as frações da amostra não está presente o ácido caféico este resultado concorda com o trabalho de MC DONALD et al., (2001) que demonstram que o ácido caféico é o mais efetivo antioxidante no sistema lipídico; SANCHEZ-MORENO et al., (2000) trabalhando com vinhos de diferentes tipos (vermelho, rosé e branco) destacam que a formação de

dienos conjugados, de hidroperóxidos e a formação de hexanal é acelerada depois de 3 dias, sendo estes resultados semelhantes aos nossos.

Tabela 19. Capacidade antioxidante das frações fenólicas do macambo em óleo de soja medido através do índice de peróxido no método da estufa a 60°C

Frações	Tempo (horas)														
	0	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264	288	312	336
AFL*	0	1	1	1,5	1,5	2,0	3,0	3,5	6,5	13,5	21,0	28,3	40,0	54,0	64,0
AFES*	0	0,5	1	2	1,5	2,0	2,5	6,5	11,0	19,0	26,5	33,8	38,8	54,0	66,8
AFEI*	0	0,5	0,5	1,5	2,0	2,5	2,5	8,0	14,5	25,0	37,3	48,5	62,8	76,5	95,5
BHT*	0	1,5	1,5	2,5	2,5	3,0	3,5	6,0	11,0	21,3	33,0	45,3	58,8	73,0	95,0
CON.	0	1,5	2	2,5	2,5	2,5	3,0	6,0	12,5	23,5	36,3	51,3	64,8	84,0	99,0

AFL = ácidos fenóliocos livres; AFES = ácidos fenólicos de ésteres solúveis AFEI = ácidos fenólicos de ésters insolúveis; CON. = controle; * = 100 ppm; BHT = hidroxitolueno butilado.

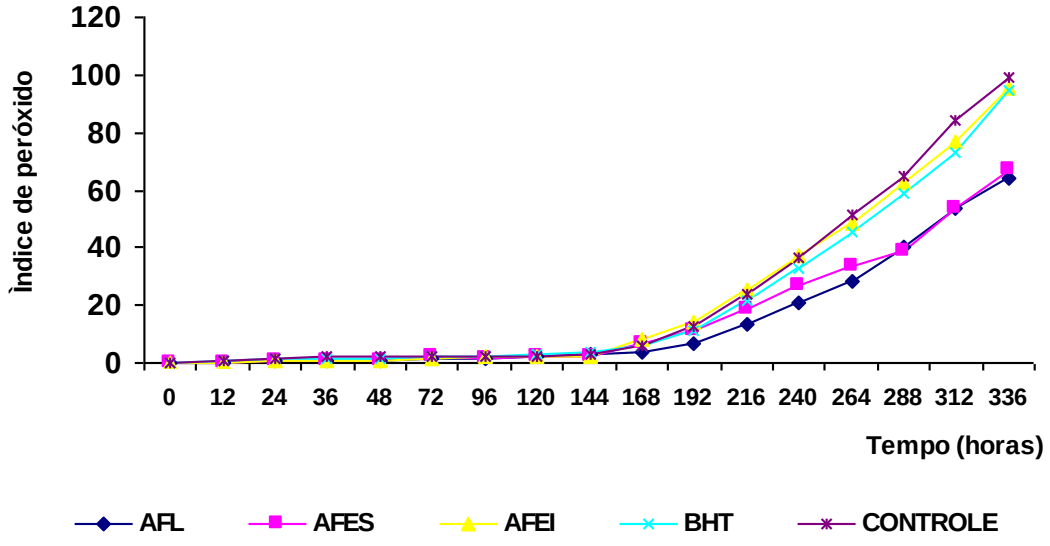


Figura 23. Capacidade antioxidante das frações fenólicas do macambo em óleo de soja medido através do índice de peróxido no método da estufa a 60°C

Tabela 20. Capacidade antioxidante das frações fenólicas do macambo em óleo de soja medida pela presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no método da estufa a 60°C

Frações	Tempo (horas)												
	0	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264	288
AFL	0,005	0,005	0,006	0,008	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,016	0,016	0,032	0,050
AFES	0,001	0,001	0,006	0,007	0,017	0,018	0,018	0,021	0,022	0,021	0,026	0,048	0,048
AFEI	0,001	0,001	0,001	0,002	0,018	0,020	0,020	0,022	0,017	0,021	0,032	0,054	0,061
BHT	0,005	0,005	0,006	0,006	0,014	0,016	0,020	0,020	0,023	0,021	0,026	0,032	0,044
CON.	0,005	0,004	0,006	0,006	0,014	0,014	0,016	0,020	0,022	0,021	0,031	0,034	0,072

AFL = ácidos fenóliocos livres
AFES = ácidos fenólicos de ésteres solúveis
AFEI = ácidos fenólicos de ésters insolúveis
CON. = controle

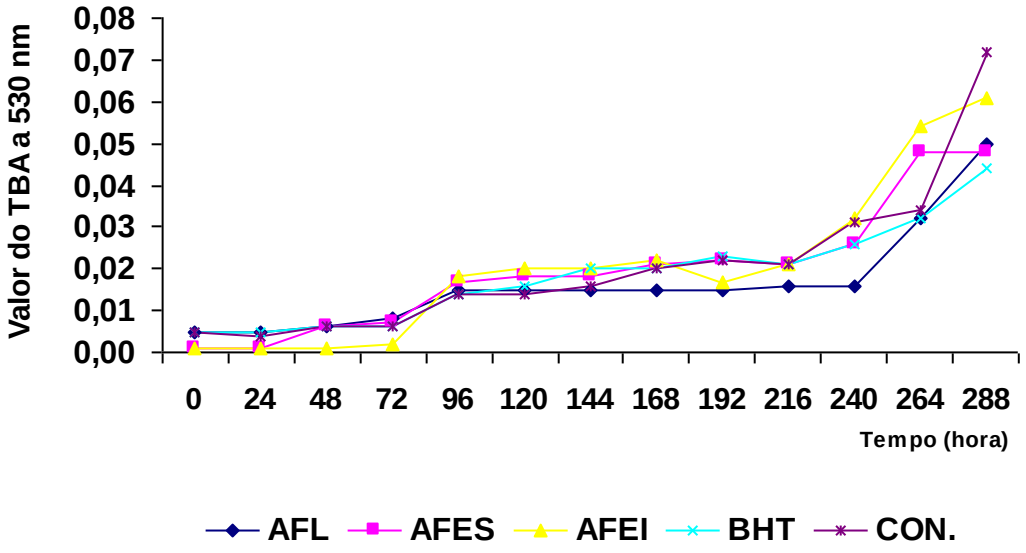


Figura 24. Capacidade antioxidante das frações fenólicas do macambo em óleo de soja medida pela presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no método da estufa a 60°C

Tabela 21. Capacidade antioxidante das frações fenólicas do macambo em óleo de soja medida pela formação de dienos conjugados no método da estufa a 60°C

	Tempo (horas)														
	0	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**	**144**	**168**	**192**	**216**	**240**	**264**	**288**	**312**	**336**
AFL	0,21	0,37	0,78	0,83	0,84	0,94	0,96	0,95	0,92	0,63	0,52	0,54	0,57	0,52	0,51
AFES	0,15	0,40	0,77	0,81	0,84	0,95	0,94	0,96	0,96	0,61	0,51	0,52	0,57	0,44	0,51
AFEI	0,07	0,41	0,73	0,79	0,82	0,82	0,97	0,97	0,97	0,54	0,51	0,53	0,57	0,48	0,52
BHT	0,28	0,44	0,73	0,80	0,85	0,99	0,98	0,98	0,95	0,50	0,52	0,48	0,57	0,50	0,52
COM.	0,32	0,43	0,75	0,75	0,84	0,84	0,87	0,93	0,91	0,53	0,51	0,50	0,52	0,53	0,46

AFL = ácidos fenóliocos livres
AFES = ácidos fenólicos de ésteres solúveis
AFEI = ácidos fenólicos de ésters insolúveis
CON. = controle

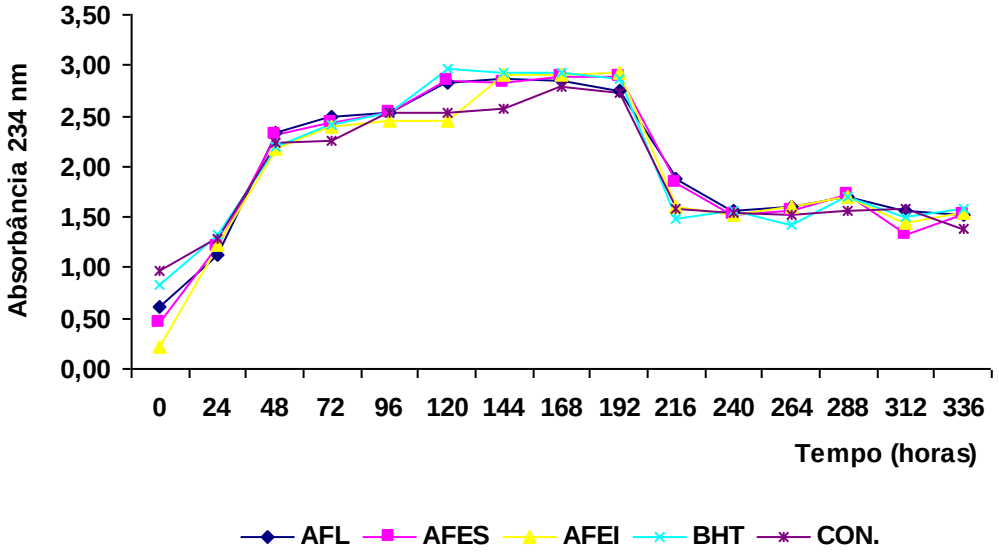


Figura 25. Capacidade antioxidante das frações fenólicas do macambo em óleo de soja medida pela formação de dienos conjugados no método da estufa a 60°C

Os nossos resultados foram similares aos encontrados por ABDALLA & ROOZEN, (1999) que observaram que o extrato metanólico da salvia (600 e 1200 ppm) inibiu a formação de dienos conjugados em óleo de girassol a 60°C; sendo que nos extratos de tomilho e limão essa inibição foi menor, porém, os extratos de “catnip e hyssop” (600ppm) aumentaram a formação de dienos conjugados quando comparados com o óleo controle. AZIZAH et al., (1999) trabalhando com concentrações muito maiores do que as nossas, demonstraram que o extrato metanólico (1000, 2000 e 3000 ppm) de três tipos de cacau possuem elevada atividade antioxidante medida através do método de formação de dienos conjugados.

Na tabela 22 e figuras 22, 23 e 24 estão apresentados os resultados da porcentagem de aumento do período de indução com os extratos das amostras adicionadas ao óleo de soja refinado utilizando-se o método do Rancimat a 110°C.

Observa-se que o melhor aumento do período de indução (21,3%) em porcentagem foi para o extrato alcoólico em concentração de 200 ppm do chopé seguido pelo mesmo extrato do macambo, sendo este resultado superior ao observado para a mesma concentração de 200 ppm de BHT.

VON GADOW et al., (1997) trabalhando com os compostos fenólicos extraídos do *Rooibos tea* (*Aspalathus linearis*) encontraram que os compostos fenólicos possuem elevado período de indução quando medido pelo método de Rancimat a 90º C sendo maior do que o BHA e o BHT. ARUOMA, O.I. et al., (1996) também demostraram que extratos etanólicos de alecrim e a mistura de extrato de especiarias (alecrim, salvia, tomilho e orégano) em uma concentração de 0,02% v/v apresentaram boa atividade antioxidante com o teste de Rancimat a 110° C cujos valores são muito semelhantes aos encontrados com as nossas amostras nas mesmas condições. GU & WENG, (2001) trabalhando com ervas chineses, encontraram valores do período de indução de 2 a 4 horas, sendo estes valores muito menores aos nossos resultados.

Tabela 22. Porcentagem do período de Indução, em óleo de soja refinado, dos extratos de chopé, sacha mangua e macambo a 110°C: Método de Rancimat

Extratos	Tempo (%)* - (Horas)		
	CHOPÉ	SACHA MANGUA	MACAMBO
Branco	0,0 – 5,99	0,0 – 5,99	0,0 – 5,99
BHT 100ppm	12,20 – 6,72	12,20 – 6,73	12,20 – 6,72
BHT 200ppm	15,62 – 6,92	15,62 – 6,92	15,62 – 6,92
Etéreo 100ppm	12,45 – 6,73	15,54 – 6,92	13,62 – 6,80
Etéreo 200ppm	18,13 – 7,07	14,37 – 6,85	9,86 – 6,58
Alcoólico 100ppm	19,3 – 7,14	14,62 – 6,86	20,38 – 7,21
Alcoólico 200ppm	21,3 – 7,26	13,53 – 6,80	20,47 – 7,21
Aquoso 100 ppm	11,7 – 6,69	11,11 – 6,65	13,95 – 6,82
Aquoso 200 ppm	12,87 – 6,76	11,19 – 6,66	13,37 – 6,79

* média de três determinações

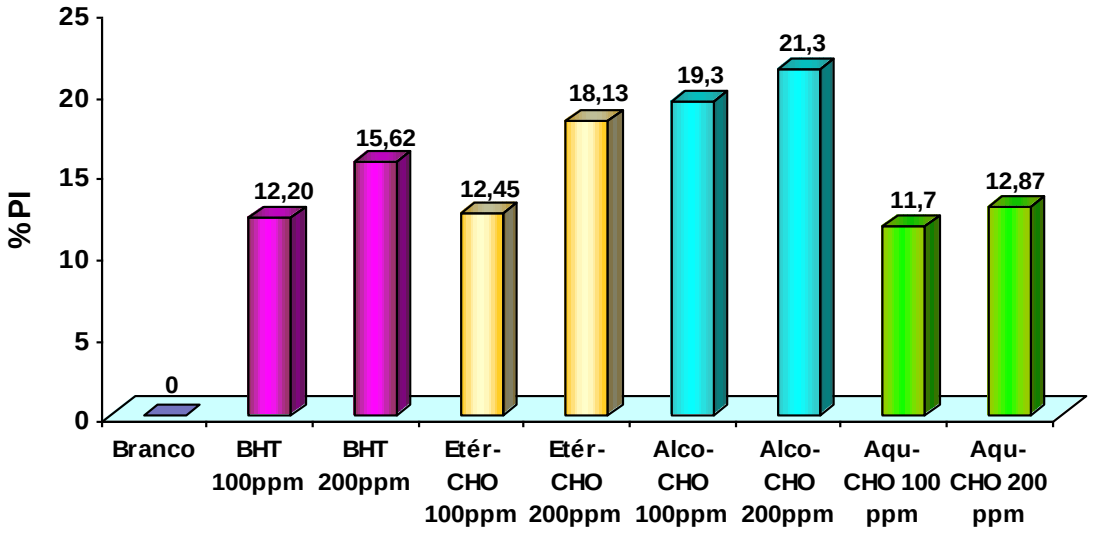


Figura 26. Porcentagem do período de indução dos extratos de chopé (CHO) medido pelo método do Rancimat a 110°C

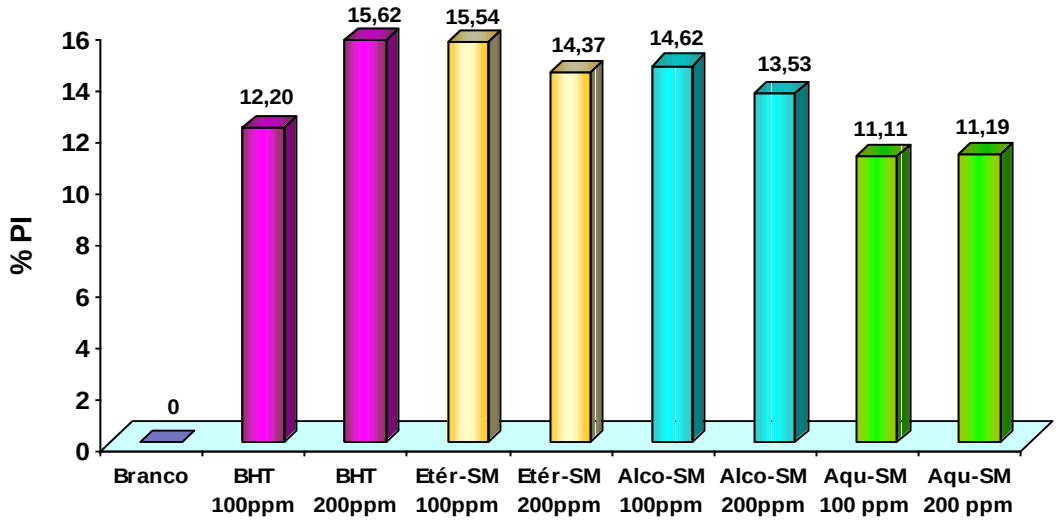


Figura 27. Percentagem do período de indução dos extratos de sacha mangua (SM) medido pelo método do Rancimat a 110°C

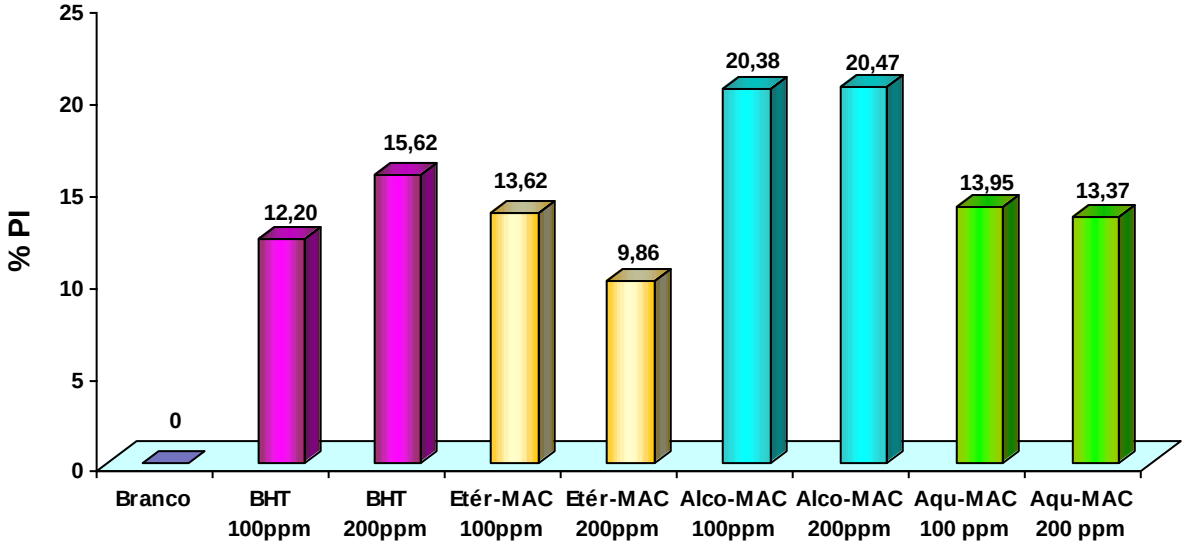


Figura 28. Percentagem do período de indução dos extratos de macambo (MAC) medido pelo método do Rancimat a 110°C

5. 5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE “IN VIVO” NA COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS

De acordo com a literatura, os ácidos graxos ingeridos na dieta, que encontram-se na posição Sn-2 dos triacilgliceróis são os mais importantes do ponto de vista nutricional. Sendo que o destino dos Sn-2 monoacilgliceróis resultantes da digestão vai depender das características fisicoquímicas do ácido graxo. Se este for saturado e de cadeia longa (de pequena ocorrência na posição Sn-2, com exceção do ácido esteárico) não vai ser solúvel sendo arrastado nas fezes e se for um ácido graxo monoinsaturado ou poliinsaturado o Sn-2 monoacilglicerol será absorvido e reesterificado nas células intestinais nas suas posições livres (Sn-1, Sn-3) pelos ácidos graxos de origem endógena, e os triacilgliceróis resultantes serão levados à circulação como quilomícrons (MILLER & SMALL, 1987; VALENZUELA, 1999).

Os ácidos graxos insaturados são mais suscetíveis de sofrerem alterações por reações oxidativas que ocorrem tanto *in vitro* como *in vivo*. Os contínuos ataques das espécies reativas do oxigênio produzem injúrias nas células, tecidos e organismos os quais para neutralizar estes danos produzem como defesa compostos antioxidantes. O sistema de defesa por antioxidantes não é perfeito pelo fato das biomoléculas celulares poderem ser oxidadas pelo envelhecimento e por diversas doenças (MECOCCI et al., 2000).

Existem muitos estudos que verificaram a atividade antioxidante dos compostos fenólicos *in vitro*. Entretanto, os benefícios para a saúde associados com a ingestão na dieta destes compostos não estão totalmente comprovados devido sobretudo à absorção e a efetividade em aumentar o mecanismo de proteção, assim como os níveis adequados da ingestão na dieta (CASTRELLARI et al., 2000; SKIBOLA & SMITH, 2000).

O estudo por nós desenvolvido tem um papel importante à medida que se pretendeu avaliar a ação *in vivo* dos antioxidantes naturais.

5.5.1. Influência dos compostos fenólicos "in vivo" presentes nas amostras

Na tabela 23 são apresentadas as médias e porcentagens de ganho de peso dos ratos do grupo controle e dos ratos que receberam 200 μL dos extratos aquosos de chopé, sacha mangua e macambo durante 28 dias. Observa-se que o maior ganho de peso foi nos ratos do grupo que recebeu o extrato do chopé.

Os animais apresentaram um desenvolvimento dentro do esperado demonstrando assim que não há efeitos antinutricionais nos extratos estudados que possa comprometer o crescimento dos animais.

Tabela 23. Médias da porcentagem no aumento do peso dos ratos controle e dos ratos que foram administrados 200 μL do extrato aquoso dos frutos de chopé, sacha mangua e macambo durante 28 dias

Dias	Controle	Chopé	Sacha mangua	Macambo
0	56,85 ± 4,10	53,76 ± 11,83	58,79 ± 2,57	57,98 ± 3,70
7	83,65 ± 7,35	86,51 ± 6,18	84,51 ± 3,83	86,99 ± 5,38
14	109,86 ± 10,02	116,46 ± 8,55	114,74 ± 9,92	117,35 ± 8,46
21	129,29 ± 11,81	148,09 ± 11,65	146,67 ± 11,62	141,80 ± 13,68
28	158,19 ± 15,65	173,94 ± 19,37	168,74 ± 16,24	164,10 ± 16,76
ganho de peso (g.)	**101,34[a]**	**120,18[a]**	**109,95[a]**	**106,12[a]**

[a] = Não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5%.

5.5.2. Atividade antioxidante *"in vivo"* no tecido adiposo

Na tabela 24 apresenta-se o perfil de ácidos graxos do tecido adiposo dos ratos do grupo controle e dos ratos dos grupos experimentais que receberam os extratos aquosos das amostras de chopé, da sacha mangua e do macambo.

TABELA 24. Perfil de ácidos graxos do tecido adiposo dos ratos controle e dos ratos que foram administrados 200 μL do extrato aquoso dos frutos durante 28 dias

ÁC. GRAXO	CONTROLE	CHOPÉ	SACHA MANGUA	MACAMBO
C 10:0	0,14 ± 0,09[a]	0,09 ± 0,04[a]	0,11 ± 0,05[a]	0,16 ± 0,08[a]
C 12:0	0,36 ± 0,21 [a]	0,26 ± 0,12 [a]	0,29 ± 0,09 [a]	0,40 ± 0,16 [a]
C 14:0	1,67 ± 0,15 [a]	1,57 ± 0,23 [a]	1,52 ± 0,25 [a]	1,61 ± 0,15 [a]
C 15:0	0,26 ± 0,05 [a]	0,25 ± 0,02 [ab]	0,26 ± 0,06 [abc]	0,33 ± 0,08 [ac]
C 16:0	24,84 ± 1,97 [a]	24,10 ± 1,96 [a]	23,31 ± 2,18 [a]	23,03 ± 0,92 [a]
C 17:0	0,25 ± 0,04 [a]	0,25 ± 0,02 [ab]	0,25 ± 0,04 [abc]	0,30 ± 0,06 [ac]
C 18:0	3,96 ± 0,51 [a]	3,83 ± 036 [a]	3,77 ± 0,58 [a]	3,82 ± 0,64 [a]
C 20:0	0,09 ± 0,01 [a]	0,07 ± 0,01 [a]	0,07 ± 0,02 [a]	0,07 ± 0,01 [a]
∑ SATURADOS	**31,57**	**30,42**	**29,58**	**29,72**
C 16:1	4,98 ± 0,91 [a]	4,95 ± 1,16 [a]	4,56 ± 1,55 [a]	4,42 ± 0,93 [a]
C 17:1	0,26 ± 0,12 [a]	0,22 ± 0,03 [a]	0,23 ± 0,04 [a]	0,28 ± 0,07 [a]
C 18:1	24,87 ± 1,16 [a]	25,65 ± 1,10 [ab]	24,77 ± 0,98 [abc]	24,17 ± 0,49 [ac]
C 20:1	0,38 ± 0,06 [a]	0,34 ± 0,04 [a]	0,37 ± 0,08 [a]	0,37 ± 0,06 [a]
∑ MONOINSAT.	**30,49**	**31,16**	**29,93**	**29,24**
C 18:2	30,75 ± 1,77 [a]	**33,74 ± 3,09 [ab]**	**35,92 ± 3,41[b]**	**35,84 ± 1,42[b]**
C 18:3	2,01 ± 0,21 [a]	1,99 ± 0,31 [a]	**2,10 ± 0,37 [a]**	**2,17 ± 0,26 [a]**
C 20:3	0,26 ± 0,14 [a]	0,23 ± 0,03 [a]	0,21 ± 0,04 [a]	0,22 ± 0,02 [a]
C 20:4 (n-6)	1,35 ± 0,30 [a]	1,28 ± 0,26 [a]	1,19 ± 0,33 [a]	1,32 ± 0,26 [a]
C 20:5	0,09 ± 0,02 [a]	0,11 ± 0,02 [a]	0,08 ± 0,03 [a]	0,10 ± 0,02 [a]
C 22:5	0,17 ± 0,04 [a]	0,17 ± 0,06 [a]	0,12 ± 0,05 [a]	0,13 ± 0,04 [a]
C 22:6	0,35 ± 0,09 [a]	0,32 ± 0,08 [a]	0,30 ± 0,10 [a]	0,34 ± 0,07 [a]
∑ POLINSATU.	**34,98**	**37,84**	**39,92**	**40,12**
nd	2,96	0,58	0,57	0,92

NOTA:

- Os valores estão expressos em média ± desvio padrão.
- nd = não detectado
- [a,b,c] Médias na mesma linha seguidas de letras diferentes, diferem estatisticamente entre si ao nível de 5%, comparando as amostras com o grupo controle.

Pode-se observar uma maior incidência de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados. Verifica-se ainda que dentre estes o ácido linoléico apresentou-se em maior quantidade nos animais que receberam extratos aquosos dos frutos em relação ao grupo controle. É possível que este efeito esteja relacionado à ação protetora dos compostos fenólicos nos extratos administrados.

As somatórias dos ácidos graxos poliinsaturados foram superiores nos animais que receberam os extratos aquosos de macambo, sacha mangua e chopé quando comparadas com o grupo controle, indicando assim que existe um possível efeito protetor dos extratos sobre os ácidos graxos poliinsaturados.

5.5.3. Atividade antioxidante *"in vivo"* no fígado

Nos tecidos periféricos o quilomícron é hidrolisado pela enzima lipase lipoprotéica (LPL) que encontra-se aderida à superfície das células que formam o epitélio dos vasos sangüíneos. Esta enzima hidrolisa os ácidos graxos das posições Sn-1 e Sn-3 dos triacilgliceróis. A atividade hidrolítica da LPL sobre o quilomicron reduz seu conteúdo de triacilgliceróis (que converte-se a Sn-2 monoacilgliceróis) e em conseqüência seu tamanho e densidade transformando-o em um quilimicron remanescente. Têm-se proposto que a ação hidrolítica da LPL complementa a ação da lipase hepática. O destino dos ácidos graxos das posições Sn-1 e Sn-3 liberados pela lipase hepática e pela LPL são utilizados em sua maioria pelas células dos tecidos periféricos como o músculo e tecido adiposo (ZIVERSMIT, 1979; OLIVECRONA & BENGGTSSON-OLIVECRONA, 1987; DIARD et al., 1994).

O fígado absorve os monoacilgliceróis Sn-2 que permanecem no quilomícron remanescente, portanto os ácidos graxos inicialmente nesta posição ingeridos através da dieta terão também como destino o fígado uma

vez que não foram hidrolisados durante a digestão ou pela LPL nos tecidos periféricos (KUBOM, 1996).

Nos hepatócitos os ácidos graxos são metabolizados. No caso dos ácidos graxos essenciais serão convertidos em ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa ou ainda em outros derivados metabolicamente ativos tais como prostaglandinas, prostaciclinas, tromboxanos e leucotrienos.

Qualquer alteração estrutural ou química sobre estes ácidos graxos poderá levar a uma perda funcional dos seus derivados em função das modificações das suas propriedades físico-químicas. A oxidação dos ácidos graxos essenciais impediria a formação destes produtos.

O estresse oxidativo hepático estudado em animais experimentais pode ser avaliado pelo aumento dos índices da peroxidação lipídica através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e/ou quimioluminescência espontânea (FRAGA et al., 1988; RIBEIRO-DO-VALLE & CKLESS, 1999; SAWADA et al., 1999).

TABELA 25. Peroxidação lipídica dos fígado dos ratos controle e dos ratos que foram administrados 200 μL do extrato aquoso dos frutos durante 28 dias

GRUPOS	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (μ Mol de MDA/mg de proteína)
CONTROLE	$0,11 \pm 0,01^{a}$
CHOPÉ	$0,09 \pm 0,02^{b}$
SACHA MANGUA	$0,08 \pm 0,03^{b}$
MACAMBO	$0,06 \pm 0,01^{c}$

NOTA:
- Os valores estão expressos em médias ± desvio padrão.
- [a,b,c] Médias na coluna seguidas de letras diferentes, diferem estatisticamente entre si ao nível de 5 % (P<0.05) comparando as amostras com o grupo controle.

De acordo a tabela 25 onde são apresentados os resultados da peroxidação lipídica dos fígados dos ratos, tanto do grupo controle como dos grupos experimentais observa-se que houve uma diferença estatísticamente significativa em relação ao grupo controle, e a melhor proteção foi para o macambo (0,06 μMol de MDA/mg de proteína) que apresentou resultados diferenciados dos outros dois extratos.

Pode-se atribuir esta diferença à ação dos compostos fenólicos dos extratos administrados uma vez que atuariam como antioxidantes dos ácidos graxos.

Associando as informações entre o perfil dos ácidos graxos dos fígados (tabela 26) e a medida da peroxidação lipídica (tabela 25) verificamos que houve incremento no teor dos ácidos linoléico, ácido araquidônico, e docosahexaenóico nos grupos experimentais em relação ao controle e menor concentração de malonaldeído pode-se inferir que há uma forte evidência da ação inibidora dos compostos fenólicos dos extratos sobre o processo oxidativo no tecido.

Além disso, pode-se observar também a presença de ácidos graxos de cadeia longa, tais como o C20:4 (n-3) e C20:5 produtos da elongação e dessaturação dos ácidos graxos essenciais, os quais são altamente suscetíveis ao processo oxidativo pelo elevado numero de duplas ligações, sendo esta mais uma evidência da inibição da oxidação dos compostos fenólicos presente nos extratos das amostras.

Não foi verificada diferença estatística nos teores do DHA e do EPA, mas houve um aumento nos seus teores dos grupos experimentais, faz-se necessário portanto, investigar se tanto o aumento no tempo de consumo como a concentração dos extratos possam ter uma maior ação antioxidante sobre os ácidos graxos dos tecidos.

TABELA 26. Perfil de ácidos graxos dos fígados dos ratos controle e dos ratos que foram administrados 200 μL do extrato aquoso dos frutos durante 28 dias

ÁC. GRAXO	CONTROLE	CHOPÉ	SACHA MANGUA	MACAMBO
C 12:0	0,48 ± 0,08	nd	nd	nd
C 14:0	0,61 ± 0,26 [a]	0,31 ± 0,04[b]	0,34 ± 0,06[b]	0,36 ± 0,09[b]
C 15:0	0,36 ± 0,05 [a]	0,41 ± 0,08 [a]	0,37 ± 0,09 [a]	0,43 ± 0,10 [a]
C 16:0	16,67 ± 1,77 [a]	16,83 ± 0,68 [a]	16,15 ± 1,79 [a]	16,56 ± 0,98 [a]
C 17:0	0,78 ± 0,06 [a]	0,73 ± 0,21 [a]	0,68 ± 0,12 [a]	0,90 ± 0,21 [a]
C 18:0	15,70 ± 2,51 [a]	17,04± 1,10 [a]	14,81 ± 1,42 [ab]	17,33 ± 0,81 [ac]
∑ SATURADOS	**34,6**	**35,32**	**32,35**	**35,58**
C 16:1	1,22 ± 0,45 [a]	0,68± 0,23[b]	0,74 ± 0,26 [a]	0,79 ± 0,09[b]
C 17:1	nd	**0,27 ± 0,11 [a]**	**nd**	**0,28 ± 0,07 [a]**
C 18:1	13,82 ± 2,71 [a]	10.16 ± 0,55[b]	11,15 ±1,96 [a]	10,38 ± 0,94[b]
C 20:1	nd	nd	nd	**0,27 ± 0,07**
∑ MONOINSAT.	**15,04**	**11,11**	**11,89**	**11,72**
C 18:2	20,48 ± 1,25 [a]	**22,52 ± 1,52 [a]**	**21,61 ± 1,95 [a]**	**21,84 ± 1,71 [a]**
C 18:3	0,67 ± 0,21	0,55 ± 0,09	0,62 ± 0,21	0,54 ± 0,13
C 20:2	nd	nd	**1,26 ± 0,77**	**0,75 ± 0,14**
C 20:3	0,77 ± 0,13 [a]	**0,76 ± 0,11[a]**	**0,70 ± 0,21 [a]**	nd
C 20:4 (n-6)	17,79 ± 2,65 [a]	**21,40 ± 1,79[b]**	**18,21 ± 2,28**	**22,37 ± 1,91[b]**
C 20:4 (n-3)	nd	**0,30 ± 0,09**	**2,07 ± 0,89**	**0,33 ± 0,09**
C 20:5	nd	**0,29 ± 0,05**	nd	**0,26 ± 0,05 [a]**
C 22:3	nd	nd	**2,43 ± 1,00**	nd
C 22:5	0,62 ± 0,14 [a]	**0,80 ± 0,11 [a]**	**0,81 ± 0,25 [a]**	**0,79 ± 0,13 [a]**
C 22:6	3,28 ± 0,52 [a]	**3,84 ± 0,26 [a]**	**3,40 ± 0,53 [a]**	**3,41 ± 0,50 [a]**
∑ POLINSATU.	**43,61**	**50,46**	**51,11**	**50,29**
nd	6,75	3,11	4,65	2,41

NOTA:

- Os valores estão expressos em média ± desvio padrão.
- nd = não detectado
- [a,b,c] Médias na mesma linha seguidas de letras diferentes, diferem estatisticamente entre si ao nível de 5%, comparando as amostras com o grupo controle.

5.5.4. Atividade antioxidante *"in vivo"* no cérebro

O cérebro é especialmente susceptível à destruição pelos radicais livres por diversos motivos: apresenta alto teor de ácidos graxos poliinsaturados, têm relativamente baixa capacidade antioxidante e têm uma alta taxa de utilização do oxigênio. Em testes de laboratório a destruição do cérebro pela oxidação lipídica é muito rápida (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1994; VASCONCELLOS et al., 1999).

De acordo com os dados do perfil de ácidos graxos dos cérebros dos ratos do grupo controle e dos ratos dos grupos experimentais apresentados na tabela 27 pode-se observar que nos grupos experimentais sacha mangua e macambo houve um incremento no teor de ácido oléico, assim como o ácido linoléico teve a mesma tendência para os grupos chopé e sacha mangua, sendo que este incremento não foi estatísticamente significativo quando comparado com o grupo controle. No entanto foi observada a presença de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa como C20:5 e C22:5 nos grupos experimentais. Tais ácidos graxos são resultantes da síntese à partir do ácido linoléico fazendo-se supor que também no cérebro os extratos administrados aos ratos apresentaram ação antioxidante do ácido linoléico permitindo-se assim que houvesse a síntese desses compostos. Acentuando a evidência da ação protetora dos compostos fenólicos dos extratos testados

SANT'ANA & MANCINI-FILHO, (2000) trabalhando com dietas contendo 100 ppm de α-tocoferol, 100 ppm de BHT e 1,4 gr de extrato de alecrim fornecidos a peixes (pacu) em cativeiro demonstraram que o uso de antioxidantes na dieta alterou a composição de ácidos graxos nos files do "pacu", sendo que os valores de TBARS e a irradiação confirmaram o papel importante dos antioxidantes para proteger aos ácidos graxos frente à oxidação lipídica concordando com nossos resultados.

TABELA 27. Perfil de ácidos graxos dos cérebros dos ratos controle e dos ratos que foram administrados 200 μL do extrato aquoso dos frutos durante 28 dias

ÁC. GRAXO	CONTROLE	CHOPÉ	SACHA MANGUA	MACAMBO
C 14:0	0,16 ± 0,03[a]	0,15 ± 0,02[ac]	0,28 ± 0,16[b]	0,16 ± 0,03[ac]
C 16:0	19,32 ± 0,46[a]	19,99 ± 0,89[ab]	19,23 ± 0,93[a]	18,74 ± 0,60[ab]
C 17:0	0,29 ± 0,06[a]	0,40 ± 0,3[a]	0,26 ± 0,03[a]	0,31 ± 0,03[a]
C 18:0	21,68 ± 0,40[a]	21,31 ± 0,6[a] 3	21,66 ± 0,20[a]	21,55 ± 0,17[a]
C 20:0	0,42 ± 0,12[a]	0,30 ± 0,05[a]	0,35 ± 0,06[a]	0,35 ± 0,09[a]
C 22:0	0,29 ± 0,06[a]	nd	nd	nd
∑ SATURADOS	**42,16**	**42,15**	**41,78**	**41,11**
C 16:1	0,53 ± 0,05[a]	0,51 ± 0,08[ac]	0,38 ± 0,05[bd]	0,57 ± 0,12[ac]
C 17:1	4,42 ± 0,15[a]	4,26 ± 0,13[a]	4,39 ± 0,25[a]	4,49 ± 0,20[a]
C 18:1	21,27 ± 0,96[a]	20,09 ± 0,90[ac]	**21,55 ± 0,81[ab]**	**21,77 ± 1,00[ab]**
C 20:1	1,87 ± 0,43	1,54 ± 0,40	**2,06 ± 0,41**	**2,10 ± 0,58**
∑ MONOINSAT.	**28,09**	**26,40**	**28,38**	**28,93**
C 18:2	1,17 ± 0,31[a]	**1,29 ± 0,48[a]**	**1,37 ± 0,64[a]**	1,02 ± 0,15[a]
C 20:2	0,14 ± 0,05[a]	0,53 ± 0,19[a]	nd	0,39 ± 0,09
C 20:3	0,20 ± 0,09[a]	0,19 ± 0,03[a]	nd	nd
C 20:4 (n-6)	9,99 ± 0,47[a]	9,96 ± 0,68[a]	9,54 ± 0,49[a]	9,59 ± 0,69[a]
C 20:5	nd	**0,25 ± 0,05**	**0,29 ± 0,05**	**0,31 ± 0,05**
C 22:5	nd	**0,45 ± 0,12**	**0,36 ± 0,06**	**0,40 ± 0,08**
C 22:6	11,40 ± 0,50	**11,60 ± 0,38[a]**	**11,25 ± 0,26[a]**	11,18 ± 0,47[a]
∑ POLINSATU.	**22,90**	**24,27**	**22,81**	**22,89**
nd	6,85	7,18	7,03	7,07

NOTA:

- Os valores estão expressos em média ± desvio padrão.
- nd = não detectado
- [a,b,c,d] Médias na mesma linha seguidas de letras diferentes, diferem estatisticamente entre si ao nível de 5%, comparando as amostras com o grupo controle.

5.5.5. Atividade antioxidante *"in vivo"* no plasma

PAGANGA & RICE-EVANS (1997) detectaram no plasma humano os compostos fenólicos: glucosides da quercitina e rutinócidos em indivíduos que não receberam suplemento destes na dieta. A metodologia utilizada no estudo não distingue entre um glucosídeo do flavonol e um glucorônido do flavonol produzido em forma endógena a partir da aglicona, portanto existem dúvidas quanto aos resultados deste trabalho.

MECOCCI et al., (2000) observaram altos teores de compostos antioxidantes no plasma de indivíduos centenários. Os compostos foram vitamina C (ácido ascórbico), ácido úrico, vitamina E (α-Tocoferol), vitamina A (retinol) e carotenóides entre outros, o que demostra a presença de antioxidantes no plasma humano. SILVA et al., (1999a) trabalhando com ratos suplementados na ração com quercitina observaram uma maior resistência do plasma à oxidação do que o plasma do grupo controle analisadas em amostras tomadas a 1 e 6 horas depois da ingestão.

Na tabela 28 estão apresentados os ácidos graxos do plasma dos ratos controle e dos animais experimentais. Observam-se maiores teores dos ácidos graxos insaturados em comparação com os ácidos graxos do plasma do grupo controle (39,92%). Destacando-se os ácidos graxos insaturados dos animais que receberam extrato de macambo (48,57%) e do chopé (48,14%) e com menor teor da sacha mangua (47,12%). Da mesma forma, como já comentado nos outros experimentos, a manutenção da integridade dos ácidos graxos insaturados se deve a diversos mecanismos, sendo um deles a capacidade antioxidante que o organismo apresenta. Dentre os fatores que possam estimular esta propriedade no organismo estão os antioxidantes consumidos.

Individualmente destaca-se o ácido linoléico (C18:2) das três amostras cujos teores foram significativamente superiores aos do grupo controle. Vale ressaltar ainda a diferença produzida também para os teores do ácido araquidônico (C20:4). Estes valores aumentados sugerem que os

compostos fenólicos puderam ser absorvidos e transportados através do plasma para alcançar os tecidos estudados o fígado, o tecido adiposo e o cérebro, tendo uma ação protetora durante todo o processo fisiológico e metabólico dos animais.

TABELA 28. Perfil de ácidos graxos do plasma dos ratos controle e dos ratos que foram administrados 200 μL do extrato aquoso dos frutos durante 28 dias

ÁC. GRAXO	CONTROLE	CHOPÉ	SACHA MANGUA	MACAMBO
C 12:0	0,33 ± 0,10 [a]	0,38 ± 0,08 [a]	0,40 ± 0,10 [a]	0,39 ± 0,14 [a]
C 14:0	2,86 ± 0,78 [a]	2,49 ± 0,37 [a]	2,56 ± 0,43 [a]	2,38 ± 0,32 [a]
C 15:0	0,58 ± 0,17 [a]	0,56 ± 0,09 [a]	0,64 ± 0,11 [a]	0,65 ± 0,08 [a]
C 16:0	22,50 ± 1,44 [a]	18,82 ± 0,98 [b]	19,43 ± 0,99 [b]	18,86 ± 1,17 [b]
C 17:0	0,95 ± 0,52 [a]	1,17 ± 0,57 [c]	1,06 ± 0,42 [a]	1,53 ± 1,43 [a]
C 18:0	8,23 ± 1,68 [a]	9,93 ± 0,99 [b]	9,61 ± 0,76 [ab]	9,96 ± 0,66 [b]
∑ SATURADOS	**35,45**	**33,35**	**33,70**	**33,77**
C 16:1	1,81 ± 0,63 [a]	1,55 ± 0,33 [a]	2,08 ± 0,31 [a]	1,62 ± 0,47 [a]
C 17:1	0,63 ± 0,27 [a]	0,93 ± 0,38 [ab]	0,87 ± 0,25 [ab]	0,49 ± 0,08 [ac]
C 18:1	13,54 ± 1,65 [a]	12,92 ± 1,20 [a]	13,57 ± 1,41 [a]	13,18 ± 1,21 [a]
∑ MONOINSAT.	**15,98**	**15,40**	**16,52**	**15,29**
C 18:2	23,07 ± 1,17 [a]	**27,50 ± 2,09 [b]**	**28,73 ± 1,82 [b]**	**28,94 ± 1,59 [b]**
C 18:3	1,26 ± 0,57 [a]	1,05 ± 0,29 [a]	1,10 ± 0,19 [a]	1,00 ± 0,15 [a]
C 18:4	0,67 ± 0,20 [a]	0,50 ± 0,19 [a]	0,57 ± 0,04 [a]	nd
C 20:2	1,22 ± 0,45 [a]	0,88 ± 0,22 [ab]	1,15 ± 0,25 [ab]	0,67 ± 0,46 [b]
C 20:4 (n-6)	12,57 ± 2,66 [a]	**16,86 ± 1,16 [b]**	**14,41 ± 2,52 [ab]**	**16,51 ± 1,87 [b]**
C 22:6	1,13 ± 0,27 [a]	**1,35 ± 0,12 [b]**	**1,16 ± 0,22 [ab]**	**1,45 ± 0,19 [b]**
∑ POLINSATU.	**39,92**	**48,14**	**47,12**	**48,57**
nd	8,65	3,11	2,66	2,37

NOTA:
- Os valores estão expressos em média ± desvio padrão.
- nd = não detectado
- [a,b,c] Médias na mesma linha seguidas de letras diferentes, diferem estatisticamente entre si ao nível de 5%, comparando as amostras com o grupo controle.

Tendo em vista os resultados promissores obtidos nos diferentes experimentos deste trabalho percebe-se a necessidade da realização de outros estudos nesta mesma linha, visando uma adequação da dose com o efeito, e obtenção de maiores informações voltadas à segurança no consumo de antioxidantes naturais por humanos.

6. CONCLUSÕES

1. Pela determinação da composição centesimal dos frutos do chopé e da sacha mangua e das sementes do macambo pode-se verificar elevados teores de fibras, encontrando-se igualmente as maiores porcentagens da fração fibra alimentar insolúvel.

2. A sacha mangua, macambo e o chopé possuem altos teores de ácidos graxos insaturados, correspondendo a aproximadamente a metade dos ácidos graxos totais; sendo que no chopé esse valor é superior aos demais.

3. Os extratos de chopé, sacha mangua e macambo apresentaram atividade antioxidante, e quando foram associados ao BHT apresentaram efeito sinergista.

4. As frações fenólicas isoladas das três amostras apresentaram elevada atividade antioxidante maior do que o BHT nas mesmas concentrações. De acordo as análises cromatográficas dos ácidos fenólicos, dos extratos das farinhas dos três frutos, pode-se observar que o catecol, ácido ferúlico, ácido caféico ácido sinápico e a isoflavona daidzeína estão presentes nas três amostras. Pode-se observar também elevados teores de ácido salicílico, sendo maior na fração de ácidos fenólicos de ésteres solúveis (AFES) das três amostras.

5. As frações fenólicas do macambo apresentaram excelente proteção ao óleo de soja refinado quando este foi submetido ao teste de estufa.

6. Os extratos das amostras apresentaram maior período de indução quando comparado com o BHT ao serem submetidos em óleo de soja refinado ao teste de Rancimat a 110°C, destacando-se os extratos alcoólico do chope e do macambo e o extrato etérico da sacha mangua.

7. Pelo aumento do peso dos ratos que receberam os extratos aquosos dos três frutos pode-se concluir que os animais desenvolveram-se

normalmente, demostrando assim que as amostras não apresentaram efeitos antinutricionais aparentes.

8. As melhores “proteções” dos extratos aquosos das amostras sobre os ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados “in vivo” com respeito ao controle foram:

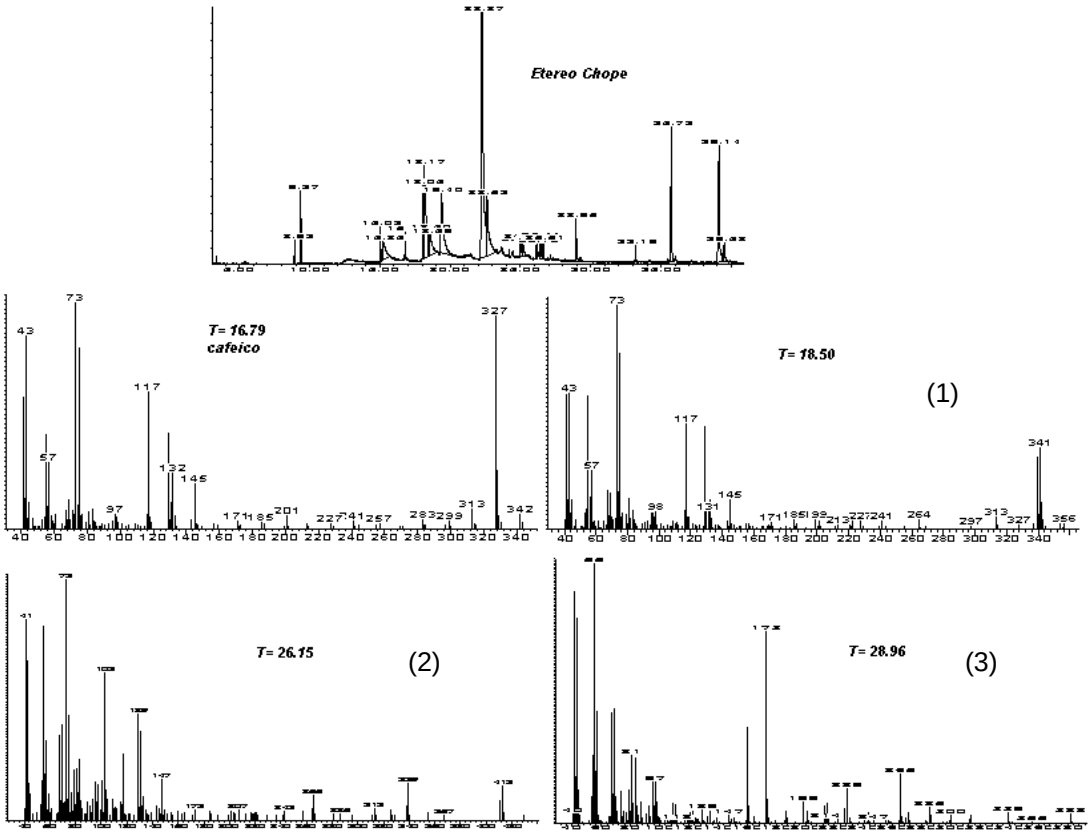
   a. No tecido adiposo os extratos das três amostras apresentaram boa proteção.

   b. No cérebro os extratos apresentaram boa proteção sendo detectado os ácidos graxos de cadeia longa nos grupos experimentais, tais como o C 20:5 e C 22:5

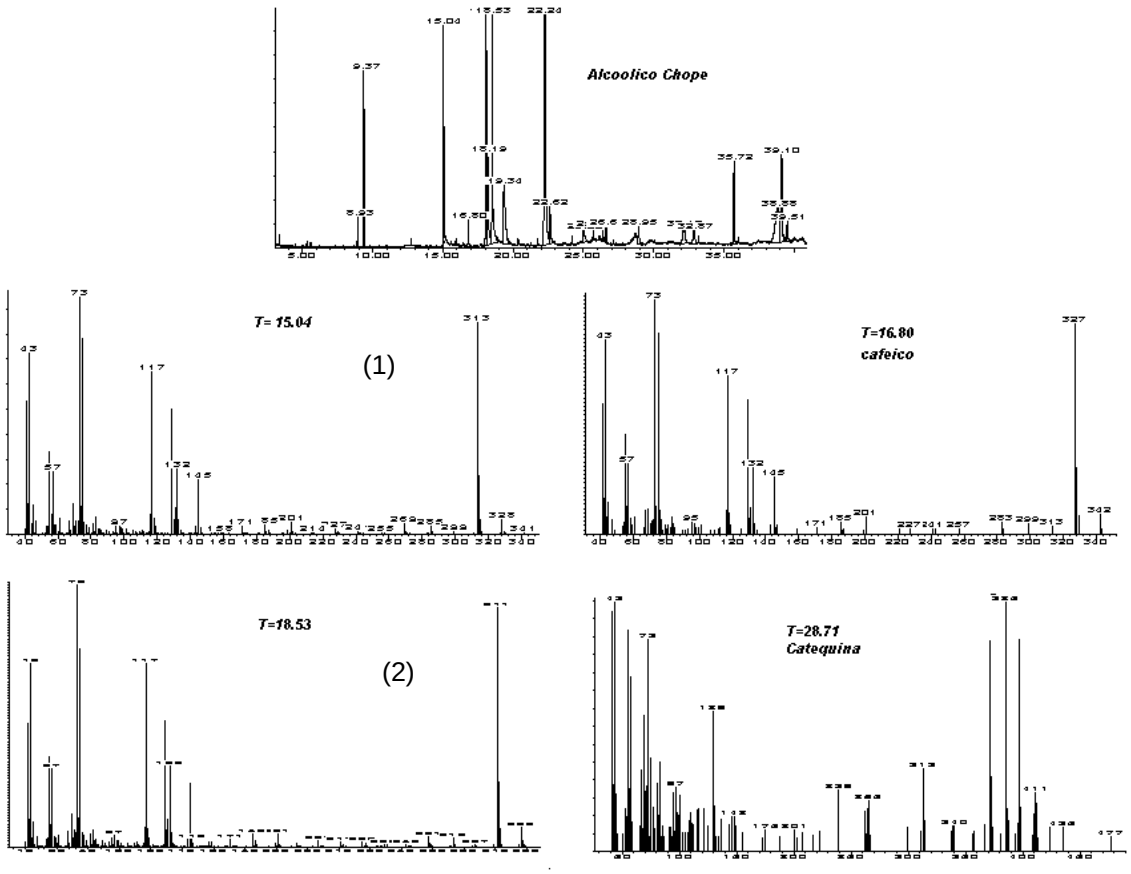
   c. No plasma os extratos apresentam boa proteção e preservação dos ácidos graxos poliinsaturados, tais como o C 18:2 (ω-6), C 20:4 (ω-6) e C.22:6 (ω-3).

   d. No fígado órgão que desempenha importante papel na metabolização dos compostos fenólicos e dos ácidos graxos, destaca-se a elevada proteção frente a oxidação, sendo que o valor da TBARS foi menor para o grupo experimental “macambo”. Além disso, observou-se o aparecimento de ácidos graxos de cadeia longa nos grupos experimentais, tais como o C 20:4 (ω-6), C 20:5 (ω-3) nos grupos do “chopé” e do “macambo” e C 22:3 (ω-3) no grupo da “sacha mangua”.

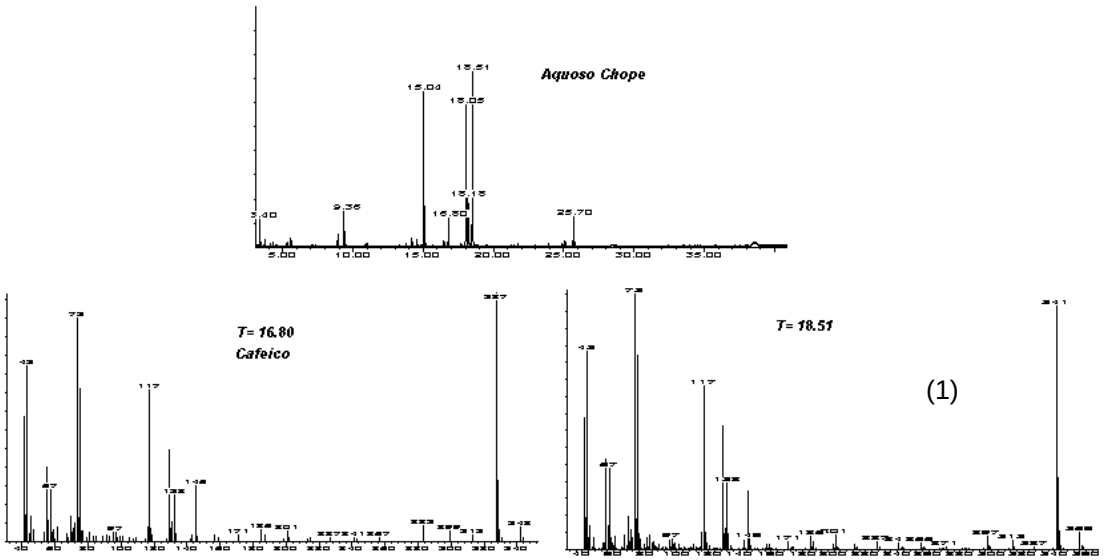
7. ANEXOS



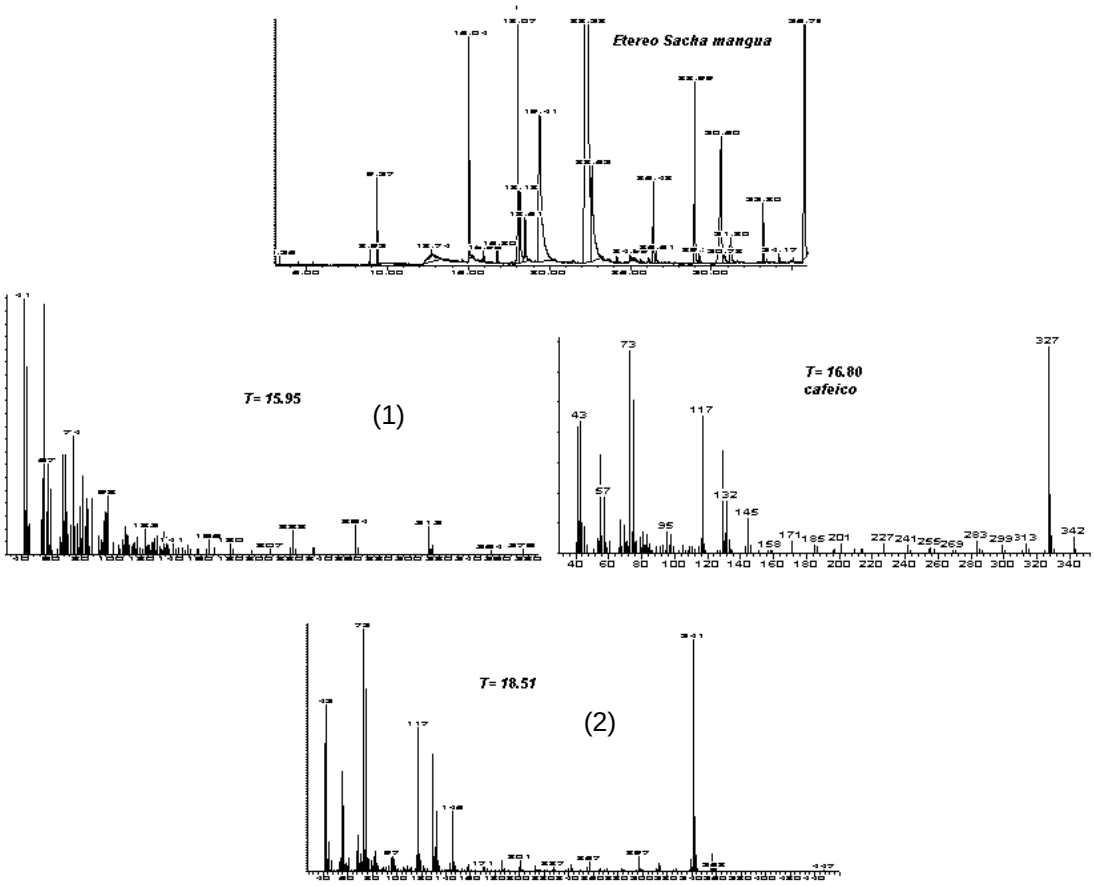
Anexo 1 – Cromatograma e espectros de massa de compostos fenólicos presentes no extrato etéreo do chopé (*Gustavia augusta* L.) identificados somente pelo tempo de retenção: (1) ácido sinápico; (2) resveratrol; (3) daidzeína



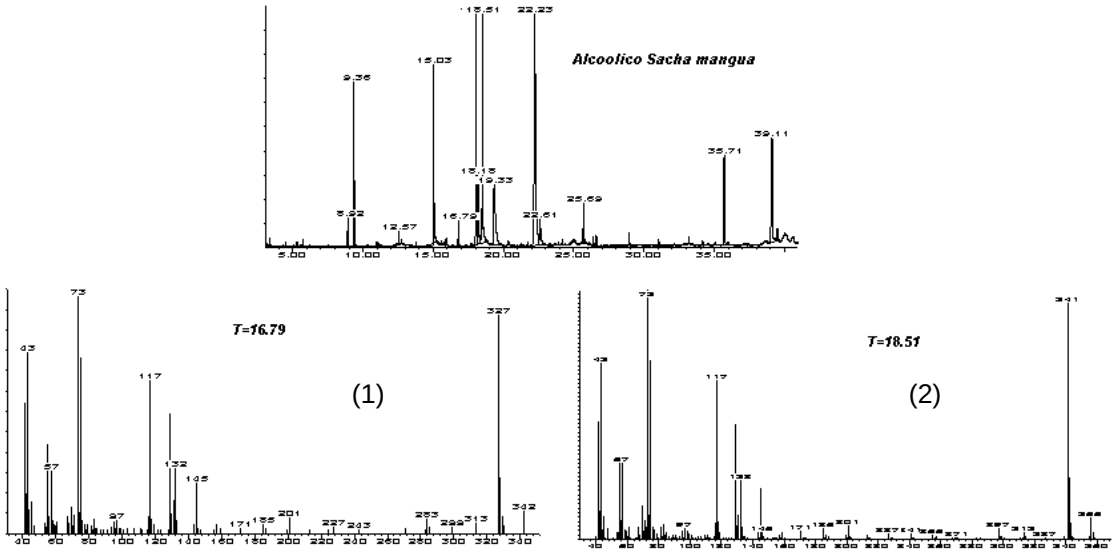
Anexo 2 – Cromatograma e espectros de massa de compostos fenólicos presentes no extrato alcoólico do chopé (*Gustavia augusta* L.) identificados somente pelo tempo de retenção: (1) ácido ferúlico; (2) ácido sinápico



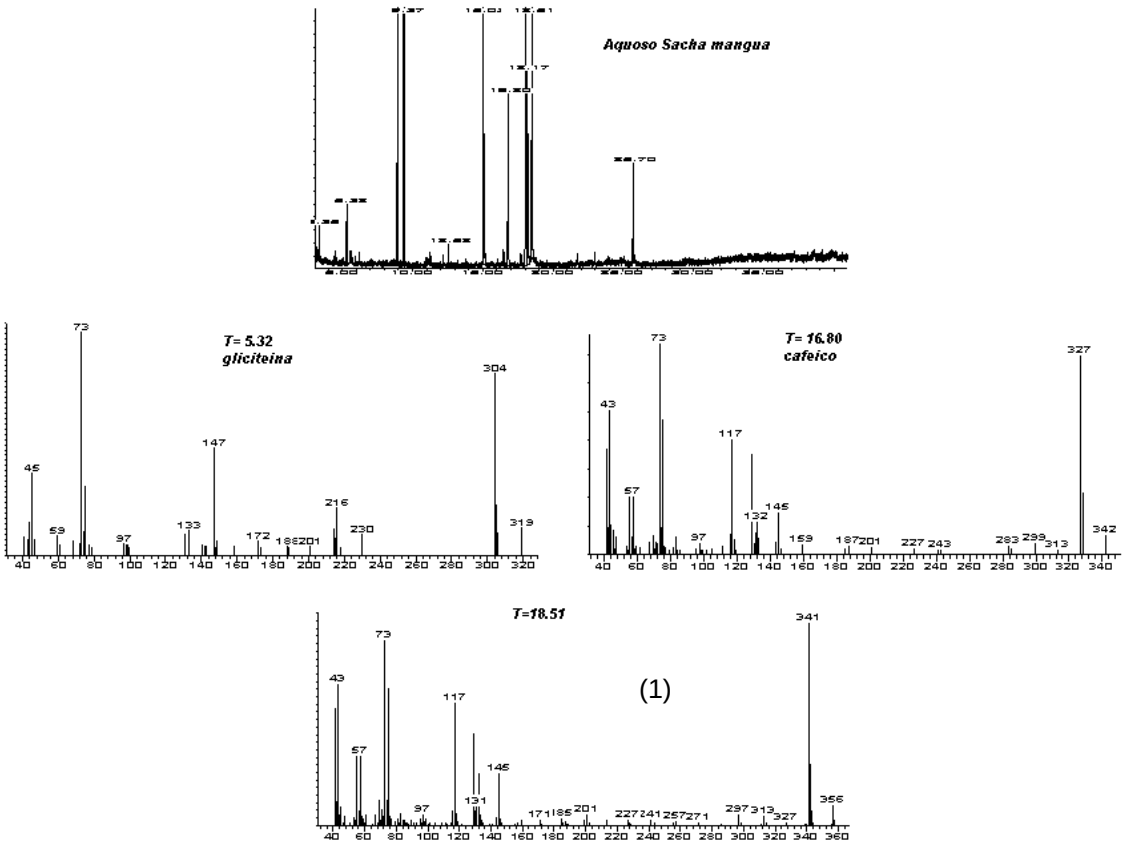
Anexo 3 – Cromatograma e espectros de massa de compostos fenólicos presentes no extrato aquoso do chopé (*Gustavia augusta* L.) identificados somente pelo tempo de retenção: (1) ácido sináptico



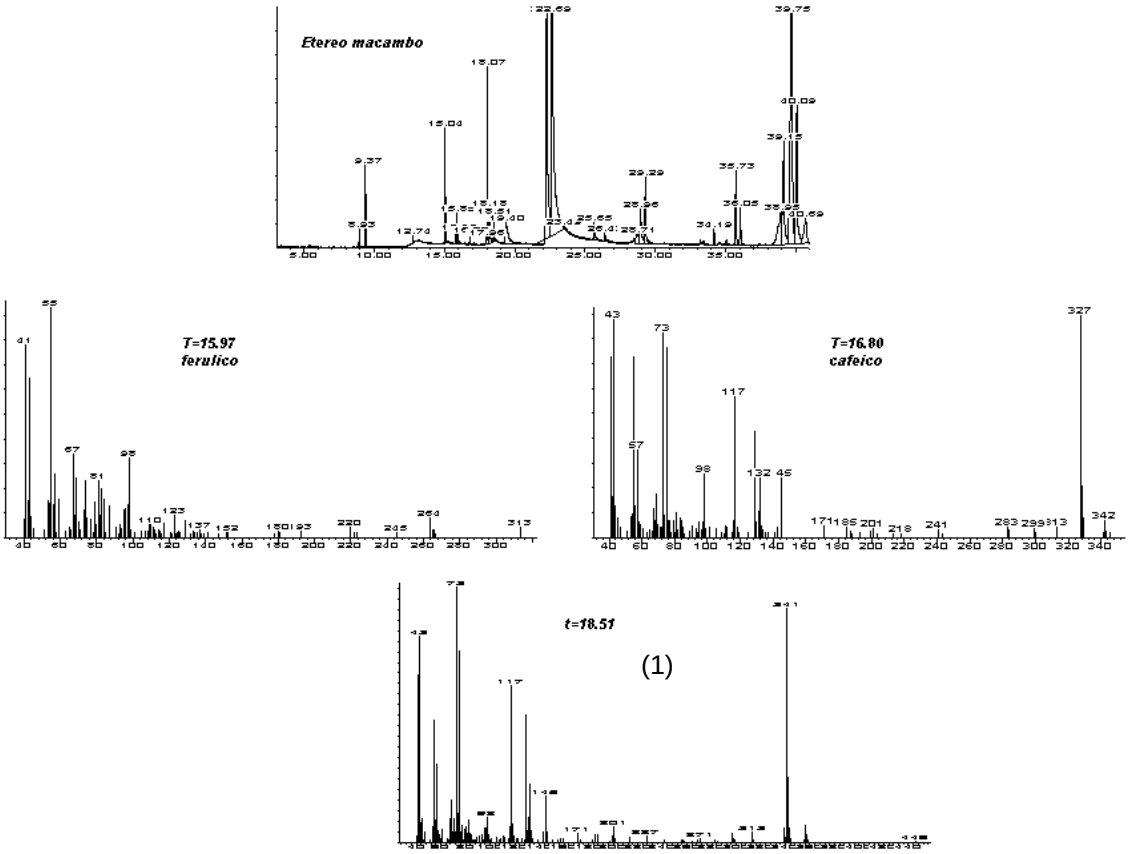
Anexo 4 – Cromatograma e espectros de massa de compostos fenólicos presentes no extrato etéreo do sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) identificados somente pelo tempo de retenção: (1) ácido ferúlico; (2) ácido sináptico



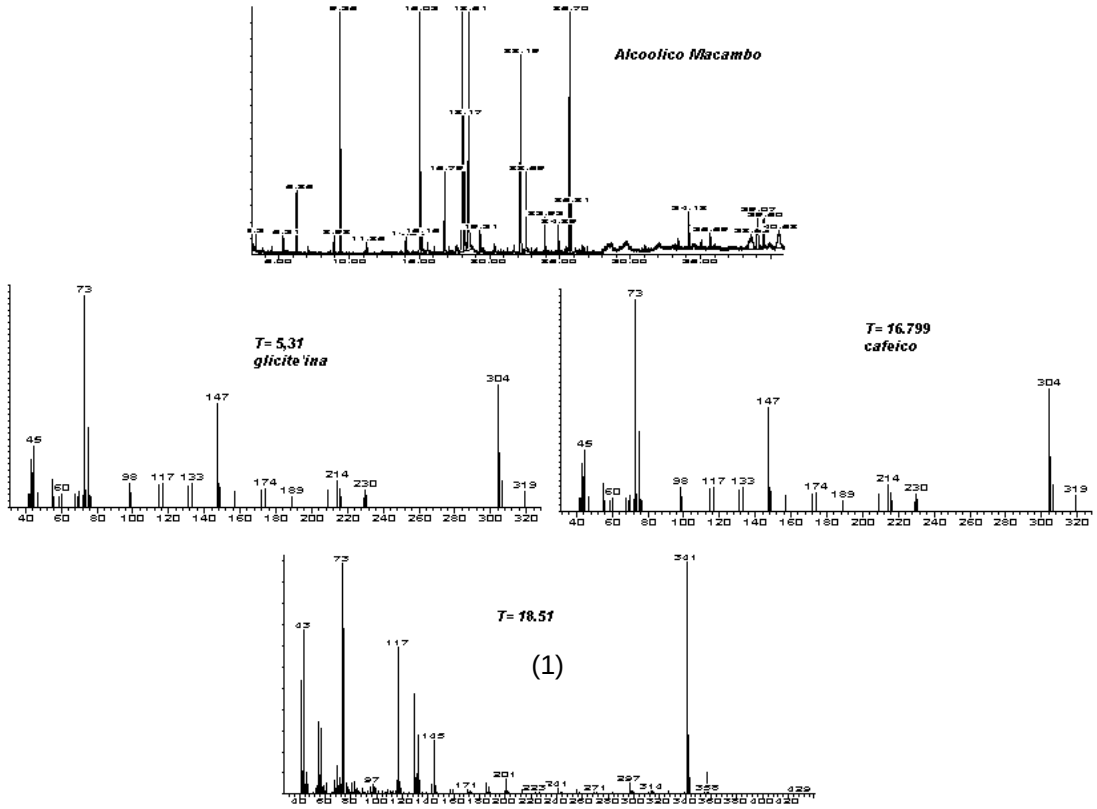
Anexo 5 – Cromatograma e espectros de massa de compostos fenólicos presentes no extrato alcoólico sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) identificados somente pelo tempo de retenção: (1) ácido caféico; (2) ácido sináptico



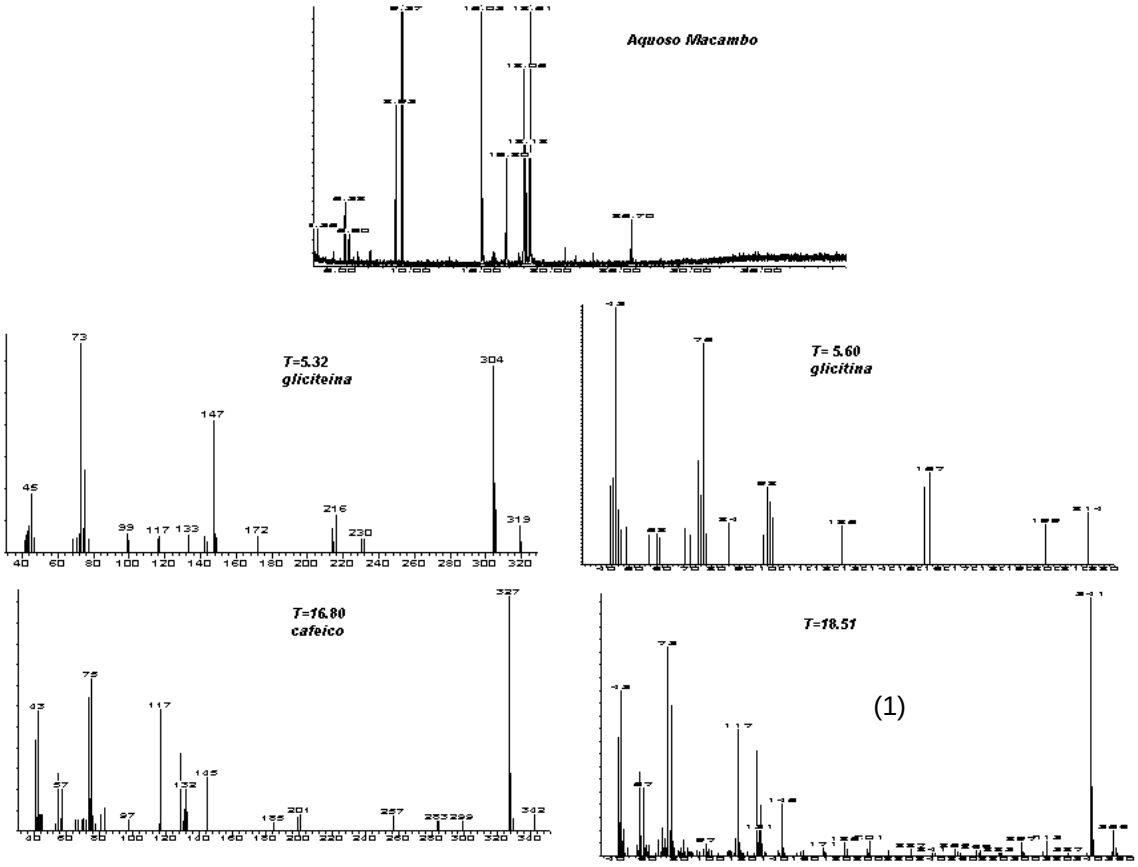
Anexo 6 – Cromatograma e espectros de massa de compostos fenólicos presentes no extrato aquoso sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) identificados somente pelo tempo de retenção: (1) ácido sináptico



Anexo 7 – Cromatograma e espectros de massa de compostos fenólicos presentes no extrato etéreo macambo (*Theobroma bicolor*) identificados somente pelo tempo de retenção: (1) ácido sináptico



Anexo 8 – Cromatograma e espectros de massa de compostos fenólicos presentes no extrato alcoólico do macambo (*Theobroma bicolor*) identificados somente pelo tempo de retenção: (1) ácido sináptico



Anexo 9 – Cromatograma e espectros de massa de compostos fenólicos presentes no extrato aquoso do macambo (*Theobroma bicolor*) identificados somente pelo tempo de retenção: (1) ácido sináptico

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, A.E., ROOZEN, J.P. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. **Food Chem.**, Amsterdam, v.64, p.232-329, 1999.

ABDALLA, D.S.P. Antioxidantes: conceitos básicos e perspectivas terapêuticas. **ARS CVRANDI: Rev. Clin. Med.**, v.26, n.10, p.142-164, 1993.

ABU–AMSHA, R., CROFT, R.D., PUDLEY, I.B., PROUDFOOT, J.M., BEILIN, I.J. Phenolic content of various beverrages determines the extent of inhibition of human serum and low density lipoprotein oxidation in vitro: identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine. **Clin. Sci.**, Essex, v.91, n.4, p.449-458, 1996.

AMAROWICZ, R., NACZK, M., SHAHIDI, F. Antioxidant activity of crude tannins of canola and rapeseed hulls. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.77, n.9, p.957-961, 2000.

ARUOMA, O.I. Free radicals and foods. **Chem. Br.**, London, v.29, n.3, p.210–214, 1993.

ARUOMA, O.I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.32, p.671-683, 1994.

De acordo com a NBR 6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira deNormas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997[Cd-rom].

ARUOMA, O.I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.75, n.2, p.199–212, 1998.

ARUOMA, O.I., SPENCER, J.P.E., ROSSI, R., AESCHBACH, R., KHAN, A., MAHMOOD, N., MUNOZ, A., MURCIA, A., BUTLER, J., HALLIWELL, B. An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary, and provencal herbs. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.34, p.449-456, 1996.

ASP, N.G. Dietary fibre, definition: chemistry and analytical determination. **Mol. Aspects. Med.**, Amsterdam, v.9, p.17–29, 1987.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS*. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14.ed. Washington: AOAC, 1984. v.2, p.114.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15.ed. Arlington: AOAC., 1990. p.1105-1106.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS*. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 16.ed. Washington: AOAC, 1995. v.2, p.70-72.

AZIZAH, A.H., NIK RUSLAWATI, N.M., SWEE TEE, T. Extracttion and characterization of antioxidant from cocoa by-products. **Food Chem.**, Amsterdam, v.64, p.199-202, 1999.

BERSET, C., CUVELIER, M.E. Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidant activity. **Sci. Aliments**, Cachan, v.16, p.219-245, 1996.

BLOCK, G., PATTERSEN, B., SUBAR, A. Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. **Nutr. Cancer**, Mahwah, v.18, p.1–29, 1992.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutr. Rev.**, New York, v.56, n.11, p.317-333, 1998.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.72, p.677-685, 1985.

CAREY, M., SMALL, D.M., BLISS, C.M. Lipid digestion and absortion. **Annu. Rev. Physiol.**, Palo Alto, v.45, p.655-677, 1983.

CASTELLARI, M., MATRICARDI, L., ARFELLI, G., GALASSI, S., AMATI, A. Level of single bioactive phenolics in red wine as a function of the oxigen supplied during storage. **Food Chem.**, Amsterdam, v.69, p.61-67, 2000.

CAVALCANTE, P.B. *Frutas comestíveis da Amazônia*. 4.ed. Belém: MCT, CNPq, 1988. p.65-66, 93. (Museu Paranaense Emílio Goeldi. Coleção Adolpho Ducke).

CHEN, Q., HUANG, S., HO, C.T. Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.69, n.10, p.999–1006, 1992.

CHIPAULT, J.R., MIZUNO, G.R., LUNDBERG, W.O. The antioxidant properties of natural spices. **Food Res.**, Champaign, v.17, p.46-55, 1952.

CINTRA, R.M.G.C. Efeito antioxidante de especiarias: avaliação da salsa (*Petroselium sativum* Hoffm.), cebolinha verde (*Allium shoenoprasum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). São Paulo, 1999. 132p. (Tese Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

CROGHAN, M. Novelose, almidón resistente: una novedad en el sector de las fibras funcionales. **Alimentaria**, Madrid, v.33, p.37, 1995.

CUMMINGS, J.H. Dietary fiber. **Br. Med. Bull.**, London, v.37, p.65–70, 1981.

CZINNER, E., HAGYMÁSI, K., BLÁZOVICS, A., KÉRY, Á., SZŐKE, É., LEMBERKOVICS, É. *In vitro* antioxidant properties of *Helichrysum arenarium* (L) Moench. **J. Ethnopharmacol.**, Shannon, v.73, p.437-443, 2000.

DA SILVA, G.W. Gordura de cupuaçu “sucedâneo de manteiga de cacau”. São Paulo, 1988. 122p. (Tese Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

DE BONO, D.P. Free radical and antioxidants in vascular biology: the roles of reaction kinetics, environment and substrate turnover. **Q. J. Med.**, Oxford, v.87, p.445–453, 1994.

DEAN, R.T., HUNT, J.V., GRANT, A.J., YAMAMOTO, Y., NIKI, E. Free radical demage to proteins: the influence of relation localization of radical generation, antioxidants and target proteins. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.11, p.161–168, 1991.

DELIORMAN, D., ÇALIŞ, I., ERGUN, F., SÖNMEZ UYDEŞ DOĞAN, B., KEMAL BUHARALIOĞLU, C., KANZIK, I. Studies on the vascular effects of the fractions and phenolic compounds isolated from *Viscum album* ssp. *Album.* **J. Ethnopharmacol.**, Shannon, v.72, p.323-329, 2000.

DIARD, P., MALEWIAK, M., LAGRANGE, D., GRIGLIO, S. Hepatic lipase may act as ligand in the uptake of artificial chylomicron remnant-like particles by isolated rat hepatocytes. **Biochem. J.**, Essex, v.299, p.889-894, 1994.

DIPLOCK, A.T. Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.53, p.1895–1935, 1991.

DONNELLI, J.K., ROBINSON, D.S. Inveted review. Free radical in foods. **Free Radical Res.**, Amsterdam, v.22, n.2, p.147–176, 1995.

DREOSTI, J.E. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. **Nutrition**, New York, v.16, n.7/8, p.692-694, 2000.

DUKE, J.A., VASQUEZ, R. *Amazonian ethnobotanical dictionary*. Boca Raton: CRC, 1994. p.82, 84, 140, 142.

ESTERBAUER, H., GEBICKI, J., PUHL, H., GUNTHER, J. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.13, n.4, p.341-390, 1992.

EZE, M.O., HUNTING, D.J., OGUN, A.V. Reaction oxygen associated with parasitic and other tropical infections: carcinogenic potentied. In: ARUOMA, O.I., ed. *Free radicals in tropical diseases.* Chur: Harwood Academic, 1993. p.111-136.

FARMER, E.H., BLOOMFIELD, D.F., SUNDRALINGAN, A., SUTTON, D.A. The course and mechanism of autoxidation reactions in olefinic and polyolefinic substances, including rabber. **Trans. Faraday Soc.**, London, v.38, p.348–356, 1942.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. Trans fatty acid in nutrition labeling, nutrient content claims, and health claims. Disponível em: http://www.cfsan.fda.gov/label.html Acesso em: 12 set. 2001.

FILISETTI, T.M.C.C. *Método de determinação de fibra alimentar*. São Paulo: FCF/USP, 1998. 8p. [Apostila].

FLORES PAYTAN, S. *Cultivo de frutales nativos amazónicos*: manual para el extensionista. Lima: Secretaría Pro Tempore, 1997. 307p. [Tratado de Cooperación Amazónica].

FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.226, p.497-509, 1957.

FRAGA, C.G., LEIBOWITZ, B.E., TAPPEL, X.L. Lipid peroxidation, measured as thiobarbituric acid – reactive substances in tissue slice: characterization and comparison with homogenates and microsomes. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.4, p.155–161, 1988.

FRANKEL, E.N. Lipid oxidation. **Prog. Lipid Res.**, Amsterdam, v.19, p.1–22, 1980.

FRANKEL, E.N., WATERHAUSE, A.L., TUSSEDRE, P.L. Principle phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoprotein. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.43, p.890-894, 1995.

FU, S., HICK, L.A., SHEIL, M.M., DEAN, R.T. Structural identification of valinehydroperoxides and hydroxides on radical-damage amino ácido, peptide, and protein molecules. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.19, n.3, p.281-292, 1995.

GENTRY, A.H. *A Field guide to the families an genera of woody plants of Northwest South America (Colombia, Ecuador, Perú)*. Chicago: University of Chicago, 1996. p.42, 815.

GOMBERG, M. An Incidence of trivalent carbon trimethylphenyl. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.22, p.757–771, 1990.

GU, L. & WENG, X. Antioxidant activity and components of *Salvia plebeia* R.Br. _ a chinese herb. **Food Chem.,** Amsterdam, v.73, p. 299–305, 2001.

GUTTERIDGE, J.M.C., HALLIWELL, B. *Antioxidants in nutrition, health, and disease.* Oxford, New York: Oxford University, 1994. 143p.

HACKETT, A.M. The metabolism of flavonoid compounds in mammals. In: CODY, V., MIDDLETON Jr., E., HARBORNE, J.B., eds. *Plant flavonoids in biology and medicine*: biochemical, pharmacological, structure-activity relationships. New York: Alan R. Liss, 1986. p.177-197.

HADORN, H., ZÜRCHER, K. Determination of the oxidation stability of oils and fats. **Dtsch. Lebensm.-Rundsch.**, Stuttgart, v.70, p.57-65, 1974.

HÄKKINEN, S., HEINONEN, M., KÄRENLAMPI, H., RUUSKANEN, J., TÖRRÖNEN, R. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v.32, p.345-353, 1999.

HALLIWELL, B. The biochemistry of oxygen free radical. In: ARUOMA, O.I., ed. *Free radicals in tropical diseases*. London: Harwood Academic, 1993. p.1-12.

HALLIWELL, B. Free radicals antioxidants: a personal view. **Nutr. Rev.**, New. York, v.52, n.8, p.253–261, 1994.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine.* 2.ed. Oxford: Clarendon, 1989. p.366–415.

HALLIWELL, B. Oxidative stress, nutrition and health: experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. **Free Radical Res.**, Amsterdam, v.25, p.57-74, 1996.

HALLIWELL, B., ARUOMA, O.I. Free radicals and antioxidantes: the need for in vivo markers of oxidative stress. In: ARUOMA, O.I., CUPPETT, S., eds. *Antioxidant methodology*: *in vivo* and *in vitro* concepts. Champaign: AOCS, 1997. p.1-22.

HALLIWELL, B., MURCIA, M.A., CHIRICO, S., ARUOMA, O.I. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: what they do and how they work. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Fort Lauderdale, v.35, n.1/2, p.7–20, 1995.

HARTMAN, L., LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab. Pract.**, London, v.22, p.475-477, 1973.

HASLAM, E. Practical poliphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action. **Trends Food Sci. Technol.**, Oxford, v.10, p.339, 1999.

HEINONEN, M., HAILA, K., LAMPI, A.-M., PIIRONEN, V. Inhibition of oxidation in 10% oil-in-water emulsions by β- carotene with α- and γ-

tocopherols. **J. Am. Chem. Oil Soc.**, Champaign, v.74, n.9, p.1047-1052, 1997.

HENRIKSEN, T., MAHONEY, E.M., STEINBERG, D. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetyled low density lipoprotein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.78, p.6499-6503, 1981.

HERNANDEZ, T., HERNANDEZ, A., MARTINEZ, C. Fibra alimentaria: concepto, propiedades y métodos de análises. **Alimentaria**, Madrid, v.261, p.19–30, 1995.

HERTOGH, M.G.L., HOFFMANN, P.C., KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetable and 9 fruits comonly consumed in the Netherlands. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.40, p.2379–2383, 1992.

HERTOGH, M.G.L., FRESKENSE, E.J.M., HOLLMAN, P.C.H., KATAN, M.B., KROMHOUT, D.D. Dietary antioxidative flavonods and risk of coronary heart disease: the zutpehen elderly study. **Lancet**, London, v.342, p.1007–1011, 1993.

HOLLMAN, P.C.H. Bioavailability of flavonoids. **Eur. J. Clin. Nutr.**, Basingstoke, v.51, suppl.1, p.66-69, 1997.

HOLLMAN, P.C.H., De VRIES J.H.M., VAN LEEUWEN, S.D. Absorption of dietary quercetin glicosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.62, p.1276-1282, 1995.

HOULIHAN, C.M., HO, C.T., CHANG, S.S. Elucidation of a chemical structure of a novel antioxidant, rosmaridiphenol, isolated from rosmary. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.61, p.1036, 1984.

HOULIHAN, C.M., HO, C.T., CHANG, S.S. The structure of rosmarquinone a new antioxidant isolated from *Rosmarinus officialis* L. **J. Am. Chem. Oil Soc.**, Champaign, v.62, p.96, 1985.

HSIEH, R.J., KINSELLA, J.E. Oxidation of polyunsaturated fatty acid: machanisms, products, and inibition with emphasis on fish. **Adv. Food Nutr. Res.**, San Diego, v.33, p.233-341, 1989.

IHME, N., KIESEWETTER, H., JUNG, F., HOFFMANN, K.H., BIRK, A., MÜLLER, A., GRÜTZNER, K.I. Leg oedema protectionfrom buckwheat herb tea in patients with chronic venous insufficiency: a single-center, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v.50, p.443-447, 1996.

INATANI, R., NAKATANI, N., FUWA, H. Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their derivatives. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.47, p.521, 1983.

INATANI, R., NAKATANI, N., SETO, H. Structure of a new antioxidative phenolic diterpene isolated from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.46, p.1661, 1982.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 2.ed. São Paulo, 1976. v.1, 371p.

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

JEE, M.H. Composition of the fat extracted from the seeds of *Theobroma bicolor*. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.61, n.4, p.751-753, 1984.

JOHNSON, L.E. Food technology of the antioxidants nutrients. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Fort Lauderdale, v.35, n.1/2, p.149–153, 1995.

JU, Z., BRAMLAGE, W.J. Phenolics and lipid-soluble antioxidants in fruit cuticle of apples and their antioxidant activities in model systems. **Postharvest Biol. Technol.**, Amsterdam, v.16, p.107-118, 1999.

JUSTESEN, U., KNUTHSEN, P. Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use os herbs in traditional Danish dishes. **Food Chem.**, Amsterdam, v.73, p.245-250, 2001.

KÄHKÖNEN, M.P., HOPIA, A., VUORELA, H.J., RAUHA, J.P., PIHLAJIA, K., KUJALA, T., HEINONEN, M. Antioxidant activity of plants extracts containing phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.47, n.10, p.3954-3962, 1999.

KING, R.A., BROADBENT, J.L., HEAD, R.J. Absorption of the soy isoflavone genistein in rats. **J. Nutr.**, Bethesda, v.126, p.176-182, 1996.

KRYGIER, K., SOSULSKI, F.W., HOGGE, L. Free, esterified and insoluble-bound phenolic acids. I. Extraction and purification procedure. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.30, p.330-334, 1982.

KUBOW, S. The influence of positional distribution of fatty acids in native, interesterified and structure-specific lipids on lipoprotein metabolism and atherogenesis. **Nutr. Biochem.**, New York, v.7, p.530-541, 1996.

KURESH, A., YOUDIM, A.M., JAMES, A.J. Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.29, n.1, p.51-60, 2000.

LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.27, n.4, p.969–978, 1988.

LIBERATORE, L., PROCIDA, G., D'ALESSANDRO, N., CICHELLI, A. Solid – phase extraction and gas chromatographic analysis of phenolic compounds in virgin olive oil. **Food Chem.**, Amsterdam, v.73, p.119-124, 2001.

LÖLLIGER, J. The use of antioxidants in foods. In: ARUOMA, O.I., HALLIWELL, B., eds. *Free radicals and food additives*. London: Taylor and Francis, 1991. p.121-150.

LORENZI, H. *Árvores brasileiras:* manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: Plantarum, p.138-139, 1992.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FAAR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.193, p.265-275, 1951.

McDONALD, S., PRENZLER, P., ANTOLOVICH, M., ROBARDS, K. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. **Food Chem.**, Amsterdam, v.73, p.73-84, 2001.

MARCO, G.J.A. Rapid method for evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, Champaign, v.45, p.594-598, 1968.

MARINOVA, E.M., YANISHLIEVA, N.V. Effect of lipid unsaturation on the antioxidative activity of some phenolic acids. **J. Am. Oil Chem. Soc.** Champaign, v.71, p.427–447, 1994.

MARTIN, A.K. The origin of urinary aromatic compounds excreted by ruminants. 2. The metabolism of phenolic cinnamic acids to benzoic acid. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.47, p.155-164, 1982.

MAYER, A.S., OCK-SOOK, Y., PERSON, D.A., WATERHOUSE, A.L., FRANKE, E.N. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidant in grapes (*vitis vinifera*). **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.45, p.1638-1643, 1997.

Mc CORD, J.M., FRIDOVIC, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erytrocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.294, p.6049-6055, 1969.

MECOCCI, P., OLIDORI, M.C., TROIANO, L., CHERUBINI, A., CECHETTI, R., PINI, R., STRAATMAN, M., MONTI, D., STAHL, W., SIES, H., FRANCESCHI, C., SENIN, U. Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.28, n.8, p.1243-1248, 2000.

MEYER, A.S., HEINONEN, M., FRANKEL, E.N. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. **Food Chem.**, Amsterdam, v.61, n.1/2, p.71-75, 1998.

MICHELSON, A.M., Mc CORD, J.M., FRIDOVICH, I. *Superoxide and superoxide dismutases.* London: Academic, 1977. 189p.

MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.48, p.91, 1971.

MILLER, K.W., SMALL, D.M. Structure of triglyceride-rich lipoproteins: an analysis of core and surphase phases. In: GOTTO Jr., A. *New comprehensive biochemistry*: plasma lipoproteins. New York: Elsevier, 1987. p.1-75.

MOREIRA, A.V.B., MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante da mostarda (*Brassica alba*, L.) I. Identificação dos principais compostos participantes da inibição da oxidação. **Anais SBCTA,** Rio de Janeiro, v.2, p.1077-1080, 1998.

MOREIRA, A.V.B., SANTOS, A.H.A.M., SALES, M.P.,MANCINI-FILHO, J. antioxidant activity and digestibility *in vitro* of algaroba seeds. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.** São Paulo, v.37, Supl.1, p.28, 2001.

MORI, S.A., PRANCE, G.T. Lecythidaceae. Part. II. The zygomorphic-flowered new world genera (Couroupita, Corythophora, Bertholletia, Couratari, Eschweilera, and Lecythis). **Flora Neotrop.**, New York, v.21, n.2, p.1-376, 1990.

MOURE, A., FRANCO, D., SINEIRO, J., DOMÍNGUEZ, H., NÚÑEZ, M.J., LEMA, J.M. Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. **J. Agric. Food Chem.,** Columbus, v.48, n.9, p.3890-3897, 2000.

NAKATANI, N., INATANI, R. Two antioxidative diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) revised structure for rosmanol. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.48, p.2081, 1984.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagenics in food. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Fort Lauderdale, v.29, n.4, p.273–300, 1990.

NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O.R., ed. *Food chemistry*. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p.189–244.

OLIVECRONA, T., BENGTSSON-OLIVECRONA, G. Lipoprotein lipase from milk: the model enzyme in lipoprotein lipase research. In: BORENSZTAJN, J., ed. *Lipoprotein lipase*. Chicago: Elsiever, 1987. p.15-58.

OWEN, R.W., GIACOSA, A., HULL, W.E., HAUBNER, R., SPIEGELHALDER, B., BARTSCH, H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v.36, p.1235-1247, 2000.

PAGANGA, G., RICE-EVANS, C. The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.401, p.78-82, 1997.

PETROVIC, S.D., LÖSCHER, R., GORUNOVIC, M.S., MERFORI, J. Flavonoid and phenolic acid patterns in seven *hieracium* species. **Biochem. Syst. Ecol.**, Amsterdam, v.27, p.651-656, 1999.

PROSKY, L. Measurement of dietary fibre and dietary fibre components In: McCLEARY, B.V., PROSKY, L. *Advanced dietary fibre technology*: Malden: Blackwell Science, 2001. p.63-76.

PRYOR, W. *Free radicals*. New York: Mac Graw Hill, 1966. p.5-13.

QUETTIER-DELEU, C., GRESSIER, B., VASSEUR, J., DINE, T., BRUNET, C., LUYCKX, M., CAZIN, M., CAZIN, J.C., BAILLEUL, F., TROTIN, F. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. **J. Ethnopharmacol.**, Shannon, v.72, p.35-42, 2000.

RAMOTAR, D., DEMPLE, B. Enzymes that repair oxidative damage to DNA. In: HALLIWELL, B., ARUOMA, O.I., eds. *DNA and free radicals*. London: Ellis Horwood, 1993. p.166-191.

RAVEN, P.D., WITZUM, J.L. The role of oxidation of LDL in atherogenesis. **Endocrinologist**, Baltimore, v.5, p.44-54, 1995.

RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PACANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.20, n.7, p.933-956, 1996.

RIBEIRO-DO-VALLE, R.M., CKLESS, K. Evaluation of oxidative damages induced by CCl_4 in liver and plasma treated rats: an *in vivo* oxidative stress model. In: MEETING OF SOUTH AMERICAN GROUP FOR FREE RADICAL RESEARCH, 1, Florianópolis, 1999. **Abstracts**. Florianópolis: CCB/UFSC, 1999. p.51.

ROSEN, G.M., POV, S., RAMOS, C.L., COHEN, M.S., BRITAN, B.E. Free radicals and phagocytic cells. **FASEB J.**, Bethesda, v.9, p.200–209, 1995.

SAITO, M., HOSOYAMA, H., ARIGA, T., KATAOKA, S., YAMAJI, N. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.46, p.1460-1464, 1998.

SANCHEZ-MORENO, C., SATUÉ-GARCIA, M.T., FRANKEL, E.N. Antioxidant activity of selected spanish wines in corn oil emulsions. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.48, p.5581-5567, 2000.

SANT'ANA, L.S., MANCINI-FILHO, J. Influence of the adition of antioxidants *in vivo* on the fatty acid composition of fish fillets. **Food Chem.**, Amsterdam, v.68, p.175-178, 2000.

SAWADA, T.C.H., SILVA, V.V., BARROS, S., RÖPKE, C.D., BERNUSSO, L.C., BARROS, S.B.M. Participation of 5-aminolevulinic acid in the hepatic oxidative stress induced by hexachlorobenzene. In: MEETING OF SOUTH AMERICAN GROUP FOR FREE RADICAL RESEARCH, 1, Florianópolis, 1999. **Abstracts**. Florianópolis: CCB/UFSC, 1999. p.65.

SCHROETER, H., WILLIAMS, R.J., MATIN, R., IVERSEN, L., RICE-EVANS, C.A. Phenolic antioxidants attenuate neuronal cell death following uptake of oxidized low-density lipoprotein. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.29, n.12, p.1222-1233, 2000.

SCHWEIZER, T.F., WÜRSCH, P. The fisiological and nutritional importance of dietary fibre. **Experientia**, Basel, v.47, p.81–86, 1991.

SHAHRZAD, S., BITSCH, I. Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.741, p.223-231, 1996.

SIES, H. *Oxidative stress*. London: Academic, 1985. 570p.

SILVA, E.L., PISKULA, M., YAMAMOTO, N., MOON, J.-H., TERÃO, J. Inhibitory effect of quercitin metabolites on rat plasma lipid peroxidation. In: MEETING OF SOUTH AMERICAN GROUP FOR FREE RADICAL RESEARCH, 1, Florianópolis, 1999. **Abstracts**. Florianópolis: CCB/UFSC, 1999a. p.155.

SILVA, F.A.M., BORGES, M.F.M., FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Quim. Nova**, São Paulo, v.22, n.1, p.94-103, 1999b.

SIMICM, M.G., JAVANOVIC, S.V.I. Activation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. In*:* HO, C.T., OSAWA, T.,

HUANG, M.T., ROSEN, R.T., eds. *Food phytochemicals for cancer prevention I*. Washington: ACS, 1994. p.20–33. (ACS Symposium Series, n.346).

SIMPSON, J.A., NARITA, S., DIESEG, S., GABICKS, S., GEBICKI, J.M., DEAN, R.T. Long – lived reactive species on free radical damaged proteins. **Biochem. J.**, London, v.282, p.621–624, 1992.

SINNHUBER, R.O., YU, T.C., YU, TE CHANG. Characterization of the red pigment formed in the 2- thiobarbituric acid determination of the oxidative rancidity. , Champaign, v.23, p.626-634, 1958.

SKIBOLA, C., SMITH, M.T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.29, n.3/4, p.375-389, 2000.

SOTELO, A., LUCAS, B., GARZA, L., GIRAL, F. Characteristics and fatty acid content of the fat of seeds of nine wild mexican plants. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.38, p.1503-1505, 1990.

SPATZ, I., BLOOM, A.D., eds. *Biological consequences of oxidative stress: implications for cardiovascular disease and carcinogenesis*. New York: Oxford University, 1992. 270p.

SPITELLER, P., SPITELLER, G. Strong dependence of lipid peroxidation product spectrum whether Fe^{2+}/O_2 or Fe^{3+}/O_2 is used as oxidant. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1392, p.23-40, 1998.

STADTMAN, E.R. Oxidation of free aminoacids and amino acid residues in proteine by radiolysis and catalized reactions. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v.62, p.797-821, 1993.

TEISSEDRE, P.L., FRANKEL, E.N., WATERHAUSE, A.L., PELEG, H., GERMAN, J.B. Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidant from grapes and wines. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.30, p.55-61, 1996.

TEISSEDRE, P.L., FRANKEL, E.N., WATERHOUSE, A.L., PELEG, H., GERMAN, J.B. Inhibition of *in vitro* human LDL oxidation by phenolic antoxidants from grapes and wines. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.70, n.1, p.55–61, 1996.

THEANDER, O., AMAN, P. Dietary fibres and their main constituentes. In: JAMES, W.P.T., THEANDER, O., eds. *The analysis of dietary fiber in food.* New York: Marcel Dekker, 1981. p.51–71.

THOMAS, M.J. The role of free radicals and antioxidants: how do wee know that they are working? **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Fort Lauderdale, v.35 n.1/2, p.21–39, 1995.

TROWEL, H. Definition of fibre. **Lancet**, London, v.1, p.503, 1974.

TROWEL, H., SOUTHGATE, D.A.T., WALEEVER, T.M.S., LEEDS, A.I.R., GUSSULL, M.A., JANKINS, D.A. Dietary fibre redefined. **Lancet**, London, v.1, p.967, 1976.

UENO, I., NAKANO, N., HIRONO, I. Metabolic fate of [^{14}C] quercetin in the ACI rat. Jpn. **J. Exp. Med.**, New York, v.53, p.41-50, 1983.

VALENZUELA, A. Digestión de los triglicéridos. **PUFA infocus: LC-polyunsaturated fatty acids**, Santiago, n.2, p.2-4, 1999.

VAN ACKER, S.A.B.E., VAN DEN BERG, D.-J., TROMP, M.N.J.L., GRIFFIOEN, D.H., VAN BENNEKOM, W.P.,VAN DER VIJGH, W.J.F., BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.20, p.331-342, 1996.

VAN HET HOF, K.H., KIVITS, G.A.A., WESTTRATE, J.A., TIJBURG, L.B.M. Bioavailability of catechins from tea: the effect of milk. **Eur. J. Clin. Nutr.**, Basingstoke, v.52, p.356-359, 1998.

VASCONCELLOS, A.P., MANOLLI, L.P., SILVEIRA, P.P., GAMARO, G.D., TORRES, I.L.S., DALMAZ, C. Effect of two different models of chronic

stress on oxidative stress in cerebral cortex and hippocampus of rats. In: MEETING OF SOUTH AMERICAN GROUP FOR FREE RADICAL RESEARCH, 1, Florianópolis, 1999. **Abstracts**. Florianópolis: CCB/UFSC, 1999. p.69.

Von GADOW, A., JOUBERT, E., HANSMANN, C.F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α-tocopherol, BHT, and BHA. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.45, p.632-638, 1997.

WILLIAMS, R.T. Metabolism of phenolic in animals. In: HARBORNE, J.B., ed. *Biochemistry of phenolic compounds*. London, New York: Academic, 1964. p.205-248.

WINTERBOURN, C.C., GUTTERIDGE, J.M., HALLIWEL, B. Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O_2. **J. Free Radical Biol. Med.**, New York, v.1, p.43-49, 1985.

WOJCICKI, J., SAMOCHOWIEC, L., GONET, B., JUZWIAK, S., DABROWSKA-ZAMOJCIN, E., KATDONSKA, M., TUSTANOWSKI, S. Effect of buckwheat extracts on free radical generation in rabbits administered high-fat diet. **Phytother. Res.**, Bognor Regis, v.9, p.323-326, 1995.

WOLFFRAM, S., WEBER, T., GRENACHER, B., SCHARRER, E.A. Na^+-dependent mechanism is involved in mucosal uptake of cinnamic acid across the jejunal brush border in rats. **J. Nutr.**, Bethesda, v.125, p.1300-1308, 1995.

WOLLGAST, J., ANKLAM, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v.33, p.423-427, 2000.

XING, Y., WHITE, P.J. Identification and function of antioxidants from oat groats and hulla. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.74. n.3, p.303-307, 1997.

XU, X., WANG, H.J., MURPHY, P.A. Daidzen is a more available isoflavone than is genistein in adult women. **J. Nutr.**, Bethesda, v.124, p.825-832, 1994.

YANISHILIEVA, N.V.I., MARINOVA, E.M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food Chem.**, Amsterdam, v.54, n.4, p.377-382, 1995.

ZILVERSMIST, D.B. Aterogenesis: a postprandial phenomenon. **Circulation**, Baltimore, v.60, p.473-485, 1979.