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

Propriedades antioxidantes de clones do pedúnculo de caju
(*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e enzimas
participantes do sistema antioxidante de defesa do organismo animal

Elma Regina Silva de Andrade-Wartha

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Tit. Jorge Mancini Filho

São Paulo
2007

18.930

Elma Regina Silva de Andrade-Wartha

Capacidade antioxidante *in vitro* do pedúnculo de caju (*Anacardium Occidentale* L.) e efeito sobre as enzimas participantes do sistema antioxidante de defesa do organismo animal

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Tit. Jorge Mancini Filho
Orientador/Presidente

Profa. Dra. Roseane Fett
1º. examinador

Prof. Tit. Rui Curi
2º. examinador

Profa. Tit. Silvia Berlanga de Moraes Barros
3º. examinador

Profa. Assoc. Ursula Maria Lanfer Marquez
4º. examinador

São Paulo, 05 de setembro de 2007.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

A553p Andrade-Wartha, Elma Regina Silva de
Propriedades antioxidantes de clones do pedúnculo de caju
(*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e
enzimas participantes do sistema antioxidante de defesa do organismo
animal / Elma Regina Silva de Andrade-Wartha. -- São Paulo,
2007.

111p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental

Orientador: Mancini Filho, Jorge

1. Alimento : Composto fenólico : Ciência dos alimentos
2. Antioxidante : Ciência dos alimentos I. T. II. Mancini
Filho, Jorge, orientador

641 CDD

"Somente a vontade do homem
mede a distância entre
o possível e
o impossível".

Mário Quintana

"Jamais considere seus estudos
como uma obrigação, mas como
uma oportunidade invejável (...)
para aprender a conhecer a
influência libertadora
da beleza do reino do espírito,
para o seu próprio prazer pessoal
e para proveito da comunidade
à qual seu futuro trabalho
pertencer"

Albertein Einstein

A Edson, marido amado, pelo amor,
compreensão, demonstração de
carinho, de apoio e sempre
companheirismo.
Você foi muito importante na
realização deste trabalho.

À Maria José, mãe querida e sempre
companheira, pelos momentos de muito
afeto e de palavras sábias e de
conforto.

A Gilberto, pai orgulhoso, pelo grande
incentivo.

A Elme e Elna, irmãos maravilhosos, e
Aparecida, querida cunhada, pela
cumplicidade e grande apoio.

Aos meus sobrinhos, sempre
queridinhos da Tia Elma.

A Alessandro, amigo querido, que da
mesma forma escolhi como um
irmão nesta vida.

AGRADEÇO ...

Ao Prof. Jorge Mancini Filho, por além da orientação com muito profissionalismo, sabedoria e competência, também pela confiança, ensinamento, sobretudo profissional, pelo incentivo sempre com palavras de apreço e respeito, valorizando as nossas idéias e quando necessário equacionando-as.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de formação de pesquisador (Doutorado).

À EMBRAPA Agroindústria Tropical (CE), através dos pesquisadores Carlos Farley H. Moura e Ricardo Elesbão Alves pelo fornecimento dos pseudofrutos de caju, fundamentais na realização deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório e de curso, pela amizade, carinho e momentos de muito diálogo, em especial a Céphora Maria, Rogério Pedrosa, Aline Guimarães, Claudia Passos, Alessandro de Lima e Reginaldo Trindade, companheiros dos momentos do dia-a-dia.

À Priscila Broinizi pela dedicação ao trabalho de iniciação científica e por ter participação importante também neste estudo.

Às minhas irmãzinhas de coração Liliane e Ana Mara e à grande amiga Bárbara (Barô), a ajuda de vocês foi muito importante na realização deste trabalho. Amo vocês. À Cassiana Ganem, à Eliane Bonifácio e ao Rafael Barofaldi que também contribuíram e pela a amizade que se iniciou. Obrigada a todos pela dedicação!

Ao Anderson que se tornou um grande amigo de coração, por todo carinho e pelas intermináveis conversas agradáveis.

Ao Prof. Aléxis Vidal pela sua sabedoria, amizade e confiança a mim depositada, fez-me ver o trabalho científico com outros olhos.

À Profa. Ana Vlândia pelas orientações e a amizade sempre.

Aos técnicos Rosângela, Ivanir, Alexandre, Rosa, Lúcia e Renato pelo grande apoio e préstimos à realização deste trabalho. Além dos momentos de amizade que se fizeram presentes.

Aos professores do Programa de Ciência dos Alimentos e a de outros programas pelo trabalho de ensino, em especial, à Profa. Bernadette D. G. Melo Franco e ao Prof. Luiz Antonio Gioielli, em nome do grupo, pelo acolhimento,

incentivo e confiança perante a representação discente na Comissão de Pós-Graduação e no Comitê de Ética em Pesquisa.

Ao Prof. José Luís Guerra pelas análises histológicas e suporte técnico.

À Profa. Silvia Berlanga, que gentilmente cedeu o laboratório, Vanessa, Cristina e Tania Cristina, pelas valiosas sugestões e orientações fundamentais neste trabalho.

À Profa. Iolanda Midea Cuccovia pelo empréstimo de seu laboratório e principalmente, pelo crédito de me deixar responsável para o uso do espectrofotômetro.

A Marcos Ângelo Demasi pela gentileza e colaboração no uso da ultracentrífuga.

Aos funcionários, pessoas muito queridas, Elaine (Madrinha de Dissertação), Jorge de Lima, Lurdes Pedroza (Lurdinha), Edílson, Cléo, Mônica, Cida, Josefa, Daniella, Majô, Roseli, João (motorista) e Vítor, além da amizade, alegria e carinho, também pela boa vontade e eficiência no desempenho de seus trabalhos. Pessoas como vocês são de grande importância no dia-a-dia do andamento da Pós-Graduação. Muito obrigada por tudo!

Agradecimentos à EMBRAPA, através da Dra. Henriette Azerêdo, pelo apoio financeiro ao subprojeto 3: Avaliação da composição centesimal e propriedades antioxidantes dos polifenóis obtidos a partir do bagaço e extrato bruto do pedúnculo de caju clone CCP-76 (FCF/USP).

A todos amigos sejam os que estejam próximos e/ou distantes, de forma otimista e carinhosa contribuíram torcendo para a realização deste trabalho. Guardo-os todos com muito afeto no meu coração!

E por fim a Deus, que sempre me iluminou desde o início desta trajetória, deu-me muita serenidade, força e perseverança nas dificuldades encontradas pelo caminho e também pelas muitas coisas boas que aconteceram, traduzindo-se em felicidade.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE EQUAÇÕES.....	XVI
ABREVIATURAS E SIGLAS	XVII
RESUMO	XIX
ABSTRACT	XX
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 RADICAIS LIVRES	3
2.2 ENZIMAS ANTIOXIDANTES	4
2.3 ANTIOXIDANTES	7
2.4 COMPOSTOS FENÓLICOS	9
2.5 BIOTRANSFORMAÇÃO DE TETRACLORETO DE CARBONO NO FÍGADO	16
2.6 CAJU	17
3. OBJETIVOS.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 MATERIAL	23
4.1.1 Amostras.....	23
4.1.2 Animais	24
4.1.3 Reagentes e outros materiais.....	24
4.2 MÉTODOS	25
4.2.1 Análise do perfil lipídico do pedúnculo liofilizado e da farinha de castanha de caju	25
4.2.2 Preparação dos extratos etéreo, alcoólico e aquoso	26
4.2.3 Compostos fenólicos.....	27

4.2.3.1 Determinação dos fenólicos totais de extratos metanólicos	27
4.2.3.2 Extração, hidrólise, identificação e quantificação de ácidos fenólicos	28
4.2.4 Quantificação de sólidos (peso seco) dos extratos e frações	30
4.2.5 Atividade antioxidante em sistema modelo β -caroteno/ácido linoléico	30
4.2.6 Atividade antioxidante em modelo lipídico (Rancimat).....	32
4.2.7 Atividade antioxidante em sistema de varredura de radicais livres (DPPH•).....	33
4.2.8 Ensaio biológico I	33
4.2.8.1 Absorção e retenção aparente dos fenólicos	34
4.2.8.2 Separação do fígado e cérebro.....	35
4.2.8.3 Preparo dos homogeneizados dos tecidos cerebral e hepático.....	35
4.2.8.4 Medida da lipoperoxidação pela produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	36
4.2.8.5 Determinação das atividades das enzimas antioxidantes na fração citosólica dos tecidos cerebral e hepático	36
4.2.9 Ensaio biológico II	38
4.2.9.1 Avaliação de lesão hepática (ALT/AST)	39
4.2.9.2 Avaliação da atividade antioxidante	39
4.2.9.3 Estudos histopatológicos	40
4.2.10 Quantificação de proteínas nos tecidos.....	40
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	41
5.1.1 Composição centesimal	41
5.1.2 Ácidos graxos	42
5.1.3 Fenólicos totais	46
5.1.4 Ácidos fenólicos	47
5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO	49
5.2.1 Atividade antioxidante em sistema β -caroteno/ácido linoléico	50
5.2.1.1 Extratos aquoso, alcoólico e etéreo dos pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09, BRS-189 e CCP-76 tratado.....	50
5.2.1.2 Frações de ácidos fenólicos livres e de esterificados solúveis e insolúveis dos pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09, BRS-189 e CCP-76 tratado	57
5.2.2 Fator de proteção medido pela condutividade em Rancimat	65
5.2.2.1 Extratos aquoso e alcoólico dos pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09, BRS-189 e CCP-76 tratado.....	65

5.2.2.2 Frações de ácidos fenólicos livres e de esterificados solúveis e insolúveis dos pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09, BRS-189 e CCP-76 tratado	66
5.2.3 Atividade antioxidante dos extratos aquoso e alcoólico e frações de ácidos fenólicos do pedúnculo de caju clone CCP-76 em sistema de varredura de radical DPPH•	68
5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VIVO	69
5.4.1 Ensaio Biológico I.....	69
5.4.1.1 Influência da administração do extrato aquoso e fração de ácidos fenólicos livres do pedúnculo de caju no ganho de peso dos animais e consumo	70
5.4.1.2 Absorção aparente dos fenólicos	71
5.4.1.3 Influência do pedúnculo de caju clone CCP-76 na lipoperoxidação e enzimas antioxidantes	71
5.4.2 Ensaio biológico II	78
5.4.2.1 Efeito da administração de pedúnculo de caju clone CCP-76 sobre parâmetros bioquímicos plasmáticos em ratos com dano hepático induzido por CCl ₄	79
5.4.2.3 Efeito do pedúnculo de caju clone CCP-76 na lipoperoxidação e sobre as enzimas antioxidantes em ratos com dano hepático induzido por CCl ₄	81
 6. CONCLUSÕES	 94
 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 95
 8 ANEXOS	 110
 9 ANEXOS OBRIGATÓRIOS	 111

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismo de ação das enzimas superóxido dismutase e catalase. 6
- Figura 2.** Estruturas químicas de ácidos fenólicos. 11
- Figura 3.** Caju (*Anacardium occidentale* L.) clone CCP-76. 18
- Figura 4.** Principais características física e físico-química dos pedúnculos de caju clones CCP-09 e BRS-189, tendo como referência o clone CCP-76. 20
- Figura 5.** Pedúnculo de caju CCP-76 submetido a um tratamento conforme protocolo EMBRAPA. 24
- Figura 6.** Curva de decaimento da densidade ótica em sistema de co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico. 32
- Figura 7.** (A) Cromatograma de padrões de ácidos fenólicos, padrão interno (C17) e BSA: a) benzóico, b) BSA, c) salicílico, d) cinâmico e) *t*-cinâmico, f) vanílico, g) gentísico, h) *o*-cumárico, i) protocatecuíco, j) quínico, l) *p*-cumárico, m) gálico, n) C-17 (heptadecanoato), o) pirogálico, p) ferúlico, q) caféico, r) sinápico, s) clorogênico e t) elágico. (B) e (C). Cromatogramas característicos de fração de ácidos fenólicos livres e de esterificadas solúveis do pedúnculo do caju clone CCP-76. As letras iguais correspondem aos ácidos fenólicos que foram identificados a partir dos padrões de acordo com o tempo de retenção. 48
- Figura 8.** Atividade antioxidante dos extratos EAq dos pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09, BRS-189 e CCP-76 tratado em sistema β -caroteno/ácido linoléico. Extratos expressos em mg de amostra liofilizada. 51
- Figura 9.** Atividade antioxidante dos extratos EAic dos pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09 e BRS-189 e CCP-76 tratado em sistema β -caroteno/ácido linoléico. Extratos expressos em mg de amostra liofilizada. 51

- Figura 10.** Decaimento da atividade antioxidante dos extratos aquosos de pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09 e BRS-189, em sistema β -caroteno/ácido linoléico, no período de 2 h. Extratos expressos em mg de amostra liofilizada. 54
- Figura 11.** Decaimento da atividade antioxidante dos extratos alcoólicos de pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09 e BRS-189, em sistema β -caroteno/ácido linoléico, no período de 2 h. Extratos expressos em mg de amostra liofilizada. 55
- Figura 12.** Decaimento da atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos livre (AFL) e esterificadas solúvel (AFS) e insolúvel (AFI) do pedúnculo de caju clone CCP-76, em sistema β -caroteno/ácido linoléico, no período de 2 h. 60
- Figura 13.** Decaimento da atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos livre (AFL) e esterificadas solúvel (AFS) e insolúvel (AFI) do pedúnculo de caju clone CCP-09, em sistema β -caroteno/ácido linoléico, no período de 2 h. 61
- Figura 14.** Decaimento da atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos livre (AFL) e esterificadas solúvel (AFS) e insolúvel (AFI) do pedúnculo de caju clone BRS-189, em sistema β -caroteno/ácido linoléico, no período de 2 h. 62
- Figura 15.** Decaimento da atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos livre (AFL) e esterificadas solúvel (AFS) e insolúvel (AFI) do pedúnculo de caju clone CCP-76 tratado, em sistema β -caroteno/ácido linoléico, no período de 2 h. 63
- Figura 16.** Efeito da administração de NaCl (0,9 % – grupo controle), extrato aquoso (80 e 240 mg/kg v.o.) e fração de ácidos fenólicos livres (40 e 120 mg/kg v.o.) obtidos a partir do pedúnculo de caju clone CCP-76, na lipoperoxidação hepática (A) e cerebral (B) em ratos, durante 30 dias. Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão (n= 6 – 8). * $p < 0,05$, e ** $p < 0,001$, quando comparados com o grupo Controle. 73

Figura 17. Comportamento da atividade das enzimas catalase (CAT) (A), superóxido dismutase (SOD) (B), glutathionas peroxidase (GSH-Px) (C) e redutase (GSH-R) (D) – U/mg de proteína – frente à administração de NaCl (0,9 % – grupo controle), extrato aquoso (80 e 240 mg/kg v.o.) e fração de ácidos fenólicos livres (40 e 120 mg/kg v.o.) obtidos a partir do pedúnculo de caju clone CCP–76, em fígado de ratos, durante 30 dias. Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão (n = 4 – 8). * $p < 0,05$, quando comparados com o grupo Controle. 75

Figura 18. Comportamento da atividade das enzimas catalase (CAT) (A), superóxido dismutase (SOD) (B), glutathionas peroxidase (GSH-Px) (C) e redutase (GSH-R) (D) – U/mg de proteína – frente à administração de NaCl (0,9 % – grupo controle), extrato aquoso (80 e 240 mg/kg v.o.) e fração de ácidos fenólicos livres (40 e 120 mg/kg v.o.) obtidos a partir do pedúnculo de caju clone CCP–76, em cérebro de ratos, durante 30 dias. Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão (n = 4 – 8). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$, quando comparados com o grupo Controle. 76

Figura 19. Efeito do extrato aquoso (EAq) e da fração de ácidos fenólicos livres (AFL) mg/kg de peso corpóreo v.o, obtidos a partir do pedúnculo de caju clone CCP–76, sobre parâmetros bioquímicos plasmáticos, aminotransferase alanina (A) e aminotransferase aspartato (B), em ratos com dano hepático induzido por CCl₄. ... 80

Figura 20. Efeito do extrato aquoso (EAq) e da fração de ácidos fenólicos livres (AFL) mg/kg de peso corpóreo v.o, obtidos a partir do pedúnculo de caju clone CCP–76, sobre os níveis de peroxidação lipídica em fígado de ratos com dano hepático induzido por CCl₄. 82

Figura 21. Efeito do extrato aquoso (EAq) e da fração de ácidos fenólicos livres (AFL) mg/kg de peso corpóreo v.o, obtidos a partir do pedúnculo de caju clone CCP–76, sobre os níveis de antioxidantes enzimáticos em fígado de ratos com dano hepático induzido por CCl₄. 85

Figura 22. Fotomicrografias de cortes histológicos de fígados de ratos tratados ou não com CCl₄. (A) Grupo controle: o corte mostra arquitetura lobular preservada, disposição radial dos hepatócitos, veia centrolobular e sinusóides arquitetural e morfologicamente preservados. 40x e (B) detalhe em maior aumento, evidenciando espaço porta com seus componentes preservados, da mesma forma hepatócitos da região periportal e seus sinusóides. 100x. (C) Grupo CCl₄ (II): caracterização da hepatopatia induzida, demonstrando, em áreas focais, subversão da arquitetura lobular, inúmeros hepatócitos exibindo degeneração vacuolar macrogoticular, sobretudo aqueles localizados na região centro lobular e mediozonal. 40x e (D) detalhe em maior aumento, revelando, na parte mediozonal, numerosos hepatócitos com degeneração vacuolar macrogoticular, alguns com coalescência. 100x.. 87

Figura 23. Fotomicrografia de fígado de rato tratado com CCl₄. Nota-se veia hepática terminal (VHT) com eritrócitos em seu espaço luminal. Hepatócitos com degeneração vacuolar macro (DV) e microgoticular (DVM). Coloração: HE. 200x. 88

Figura 24. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de rato tratado com CCl₄, evidenciando, em negro, positividade para gordura nos vacúolos citoplasmáticos da região centrolobular. Coloração: *Sudan black*. Aumento: 200x..... 89

Figura 25. Histologia de tecido hepático de ratos tratados com EAq 480 (Grupo III) e AFL 40 e 120 (Grupos IV e V, respectivamente) contra a toxicidade pelo CCl₄. (A) O Grupo III demonstrou pouca degeneração vacuolar macrogoticular. 40x e (B) detalhe em maior aumento, mostrando hepatócitos ao redor da veia hepática terminal com macrovacúolos e na periferia, microvacúolos com núcleos e rede sinusoidal resguardados. 100x. (C) Grupo IV: Lobulação hepática preservada e, mormente, na região centrolobular e mediozonal, quadro de degeneração vacuolar microgoticular. 40x e (D) Veia hepática terminal, ao seu redor, numerosos hepatócitos com degeneração vacuolar microgoticular. 100x. (E) Grupo V – Lesões discretas, visualizando-se alguns hepatócitos com microvacúolos na região mediozonal, conferindo aspecto histológico muito próximo do grupo controle. 40x e (F) hepatócitos da região mediozonal e centrolobular com degeneração vacuolar microgoticular, sem distorção da arquitetura lobular hepática no grupo V. 100x..... 91

Figura 26. Efeito protetor da fração AFL 120 (120 mg/kg, v.o.: 30 dias antes da administração de CCl₄) contra a hepatopatia provocada por CCl₄. Ocorrência de hepatócitos com degeneração vacuolar microgoticular, conquanto verificam-se núcleos e rede sinusoidal preservados Coloração: HE. 200 x. 92

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Composição centesimal do bagaço de pedúnculo de caju de três tipos de clones, CCP-76, CCP-09 e BRS 189. 41
- Tabela 2.** Perfil lipídico de ácidos graxos da castanha de caju (*Anacardium occidentale*) clone CCP-76 e dos pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09 e CCP-76 tratado...43
- Tabela 3.** Conteúdo total de compostos fenólicos (mg de fenólicos/g de amostra) nos extratos polares presentes em pseudofrutos de caju (*Anacardium occidentale*) clones CCP-76, CCP-09, BRS-189 e CCP-76 tratado. 46
- Tabela 4.** Teor de ácidos fenólicos livres e de esterificados solúveis e insolúveis individuais presentes em pedúnculos liofilizados de caju (*Anacardium occidentale*) clones CCP-76, CCP-09, BRS-189 e CCP-76 tratado. 49
- Tabela 5.** Parâmetros cinéticos caracterizando a inibição da oxidação pelos extratos aquosos (EAq) e alcoólicos (EAlc) dos pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09 e BRS-189 em sistema β -caroteno/ácido linoléico. 56
- Tabela 6.** Atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos livre e de esterificadas solúvel e insolúvel do pedúnculo liofilizado de caju clone CCP-76 em sistema modelo β -caroteno/ácido linoléico. 57
- Tabela 7.** Atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos presentes nos pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09, BRS-189 e CCP-76 tratado em sistema modelo β -caroteno/ácido linoléico. 58
- Tabela 8.** Parâmetros cinéticos caracterizando a inibição da oxidação pelas frações de ácidos fenólicos dos pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09 e BRS-189 em sistema β -caroteno/ácido linoléico. 64
- Tabela 9.** Fator de proteção obtido para óleo de soja refinado sem antioxidante a partir de extratos aquoso e alcoólico de três diferentes clones de pseudofruto de caju comparado a um aditivo sintético (BHT) por meio do teste de Rancimat a 110 °C. . 65
- Tabela 10.** Fator de proteção obtido para óleo de soja refinado sem antioxidante a partir de frações de ácidos fenólicos livres e esterificadas de três diferentes clones de pseudofruto de caju comparado a um aditivo alimentício comum (BHT) por meio do teste de Rancimat a 110 °C. 67
- Tabela 11.** Atividade antioxidante dos extratos (aquoso e alcoólico) e frações de ácidos fenólicos livres e de esterificados (solúvel e insolúvel) do pedúnculo de caju CCP-76 em sistema de redução do radical DPPH•. 68
- Tabela 12.** Ganho de peso (g) e coeficiente de eficácia alimentar (CEA) de ratos suplementados com extrato aquoso ou fração de ácidos fenólicos livres do pedúnculo de caju clone CCP-76. 70

Tabela 13. Absorção aparente dos fenólicos totais pela avaliação da excreção nas fezes dos animais suplementados com extrato aquoso e fração de ácidos fenólicos livres do pedúnculo de caju clone CCP-76.	71
--	----

LISTA DE EQUAÇÕES

<i>% de Inibição da oxidação (1)</i>	31
<i>Fatores cinéticos (2)</i>	32
<i>Fator de proteção (3)</i>	33
<i>% de proteção DPPH (4)</i>	33
<i>Coeficiente de eficácia alimentar (CEA) (5)</i>	34

ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
AFI	Ácidos fenólicos insolúveis
AFL	Ácidos fenólicos livres
AFS	Ácidos fenólicos solúveis
AGMI	Ácidos graxos monoinsaturados
AGPI	Ácidos graxos poliinsaturados
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BHT	Butil hidroxi tolueno
BSA	N, O-bis (Trimetilsilil) acetamida
CAT	Catalase
CCl₃•	Radical livre triclorometil
CCl₄	Tetracloreto de carbono
CEA	Coeficiente de eficácia alimentar
CG	Cromatografia a gás
DPPH	2,2 difenil-1-picril-hidrazil
DV	Degeneração vacuolar macrogoticular
DVM	Degeneração vacuolar microgoticular
EAlc	Extrato alcoólico
EAq	Extrato aquoso
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
F1 e F2	Fatores cinéticos
FP	Fator de proteção
GSH	Glutathiona reduzida
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
GSH-R	Glutathiona redutase
GSSG	Glutathiona oxidada
HE	Hematoxilina-eosina
PI	Período de indução
sc.	Via subcutânea

SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
tg	Tangentes
THF	Tetrahidrofurano
TMP	1,1,3,3 –Tetrametoxipropano
v.o.	Via oral
VHT	Veia hepática terminal

ANDRADE-WARTHA, E. R. S. **Propriedades antioxidantes de clones do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e enzimas participantes do sistema antioxidante de defesa do organismo animal**. Tese de Doutorado [Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo], 2007.

RESUMO

Os compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas no reino vegetal, em particular nas frutas e em outros vegetais. Estes compostos, destacando-se flavonóides e os ácidos fenólicos, devido à estrutura molecular, podem apresentar a capacidade de inibir processos oxidativos. Além do mais, estão relacionados com a redução de risco de doenças crônicas não transmissíveis tais como: cardiovasculares, câncer, aterosclerose, entre outras. Considerando a elevada produção de caju em território brasileiro e a possibilidade da existência de compostos com potencial antioxidante no pedúnculo de caju, este trabalho teve por objetivo avaliar quantitativa e qualitativamente os compostos fenólicos, particularmente os ácidos fenólicos, e identificar a participação destes em processos metabólicos do organismo animal. Foram caracterizados quimicamente três clones distintos de pedúnculos de caju (CCP-76, CCP-09, BRS-189 e CCP-76 tratado) e na análise química, apresentaram um elevado teor de ácidos graxos monoinsaturados, predominando o ácido oléico, e de fenólicos totais. Os ácidos fenólicos identificados foram: gálico, protocatecuico, *p*-cumárico, ferúlico, caféico e salicílico. Foram obtidos extratos aquoso (EAq) e alcoólico (EAlc) e frações de ácidos fenólicos a partir dos pedúnculos e, avaliados em sistemas modelo β -caroteno/ácido linoléico e em Rancimat. As frações de ácidos fenólicos exibiram expressiva atividade antioxidante no primeiro sistema e os extratos, no segundo, demonstraram fatores de proteção superior ao antioxidante sintético BHT. Pôde-se também verificar a capacidade antioxidante dos extratos e frações do clone CCP-76 no sistema de varredura do radical DPPH. Em ensaio experimental com ratos, em condição normal, foi administrado EAq (80 e 240 mg/kg, v.o.) ou fração de ácidos fenólicos livres (40 e 120 mg/kg, v.o.) obtidos do pedúnculo de caju CCP-76. Neste estudo, não se observou potencialização de todos os antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase e redutase), contudo pôde-se verificar a redução dos níveis de lipoperoxidação no tecido cerebral dando indícios de aumento do estado antioxidante nos animais. Também foi avaliado o potencial antioxidante do EAq e da fração de ácidos fenólicos livres sobre o dano hepático em ratos tratados com tetracloreto (CCl_4) de carbono. A administração deste teve seu efeito corroborado pela avaliação dos parâmetros bioquímicos, ou seja, aumento exacerbado das enzimas hepáticas no plasma: alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST); decréscimo das atividades das enzimas antioxidantes no fígado e elevação da produção de peróxidos lipídicos no tecido hepático. Nos ratos que receberam EAq (480 mg/kg, v.o.) não se observou alteração comparando-os aos animais tratados apenas com CCl_4 . No entanto, a administração de fração de ácidos fenólicos livres, nas duas doses (40 e 120 mg/kg, v.o.), evidenciou pronunciado efeito contra a lesão hepática, com níveis reduzidos de ALT e AST plasmáticas, aumento da atividade das enzimas antioxidantes no fígado e prevenindo a lipoperoxidação hepática mediada pelo radical $\text{CCl}_3\cdot$ a partir do CCl_4 . Estudos histológicos do tecido hepático confirmaram as avaliações bioquímicas exibindo preservação tecidual, supressão de degeneração vacuolar macro e microgoticular e de sinais necróticos nos ratos tratados com a fração de ácidos fenólicos livres do pedúnculo de caju.

Palavras-chave: Atividade antioxidante, pedúnculo de caju, dano hepático induzido por CCl_4 , peroxidação lipídica e enzimas antioxidantes.

ANDRADE-WARTHA, E. R. S. **Antioxidant properties of cashew apple clones (*Anacardium occidentale* L.): effect on the lipoperoxidation and defense system antioxidant enzymes of the organism animal.** Tese de Doutorado [Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo], 2007.

ABSTRACT

Phenolic compounds are widely distributed in the plant kingdom, particularly fruits and vegetables. Due to their chemical structure, these compounds, in particular flavonoids and phenolic acids, are able to inhibit oxidative processes. Furthermore, can be used to reduce the risk of non-transmissible chronic diseases such as cardiovascular diseases, cancer and atherosclerosis. Taking into consideration the large production of cashew in Brazil and the possible existence of potentially antioxidant compounds present in the cashew apples, the aim of this study was to quantitatively and qualitatively evaluate the presence of phenolic compounds in cashew apple, particularly phenolic acids, and identify their role in metabolic processes in animals. The cashew apples of three distinct clones (CCP-76, CCP-09, BRS-189 and CCP-76 (processed)) were studied. The determination of fatty acids yielded a high concentration of monounsaturated fatty acids, mainly oleic acid, and of total phenolic compound. The phenolic acids found were: gallic, catechic, *p*-coumaric, ferulic, caffeic and salicylic acids. Both aqueous (EAq) and ethanolic (EAlc) extracts and phenolic acid fractions were obtained from the cashew apples and were evaluated in a β -carotene/linoleate model system and Rancimat test. The phenolic acid fractions presented an expressive antioxidant activity in the β -carotene/linoleate model system and the extracts, by the Rancimat test presented a protection factor higher than that of antioxidant additive, BHT. We also observed the antioxidant capacity of the extracts and fractions of the CCP-76 clone in the DPPH radical scavenging assay. In an experimental assay with rats, the EAq (80 and 240 mg/kg) or the free phenolic acid fraction (40 and 120 mg/kg) obtained from the cashew apple of CCP-76 clone was administered via the oral route. In this study, the enhancement of enzymatic antioxidants (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and reductase) was not observed, nevertheless, a decrease in the amount of lipoperoxidation in the brain tissue was observed, suggesting that the ingestion of cashew might increase the antioxidative state in animals. Also, the antioxidant activity of EAq and of the free phenolic acid fraction from the cashew apple of CCP-76 clone was verified on the liver damage induced by carbon tetrachloride. The liver damage caused by the administration of carbon tetrachloride was detected by biochemical parameters, namely, the increase in the serum concentrations of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) as well as a decrease in the activities of antioxidant enzymes and an increase in peroxidation in the liver. Rats who received EAq (480 mg/kg, p.o.) did not present alterations in any of the parameters evaluated, compared to the animals treated with carbon tetrachloride. On the other hand, the administration of free the phenolic acid fraction in doses of 40 and 120 mg/kg, p.o., had a pronounced effect in protecting against hepatic lesion, which was evidenced by the decrease in plasma ALT and AST, enhancing the activity of antioxidant enzymes and preventing lipoperoxidation mediated by the $\text{CCl}_3\cdot$ radical generated by carbon tetrachloride. Histological studies were able to confirm the biochemical alterations observed in that the liver tissue obtained from rats treated with phenolic acid fractions extracted from cashew apple of CCP-76 clone presented a preserved tissue structure and suppression of macro and microgoticular vacuolar degeneration as well as of signs of necrosis.

Keywords: Antioxidant activity, cashew apple, CCl_4 -induced hepatic injury; lipid peroxidation and antioxidant enzymes.

1. INTRODUÇÃO

A busca de novos produtos com propriedades antioxidantes oriundas de fontes naturais torna-se cada vez mais crescente. O conhecimento de substâncias com capacidade antioxidante presentes nos alimentos, das quais muitas ainda não foram suficientemente estudadas, se destaca tanto pela possibilidade de se ter aproveitamento como alimentos funcionais quanto pelo fornecimento de compostos que se enquadram como nutracêuticos.

Invariavelmente, a produção de radicais livres, moléculas ou fragmentos de moléculas que possuem elétrons livres ocorre constantemente pelos processos metabólicos normais do organismo humano (MELO e GUERRA, 2002). Os elétrons livres dessas moléculas são instáveis e, por conseguinte, torna-as bastante reativas (CHEESEMAM e SLATER, 1996). Sendo assim, os radicais livres, gerados *in vivo*, podem reagir com o DNA, RNA, proteínas, lipídios e outros elementos oxidáveis, propiciando danos que poderão contribuir para o envelhecimento e o aumento do risco de doenças crônicas não transmissíveis, como câncer, aterosclerose, artrite reumática, entre outras e aos processos inflamatórios (HALLIWELL, 1996; JACOB e BURRI, 1996; NAKIMI, 1990).

Um desequilíbrio no balanço das espécies reativas de oxigênio versus defesas antioxidantes define bem o quadro de estresse oxidativo (BECKMAN e AMES, 1997; DEAN *et al.*, 1997). Muitas das espécies reativas de oxigênio, incluindo: superóxidos, hidroxilas, peróxil e alcóxil e certos não radicais, tais como, HOCl, ozônio, peroxinitrito, O_2 e H_2O_2 , estão envolvidas no dano oxidativo, em um número expressivo de alterações fisiológicas e patológicas e nos processos de inflamação, envelhecimento, carcinogênese, ação de medicamentos e toxicidade (ESTERBAUER *et al.*, 1992). Em contrapartida, a redução dessas espécies reativas de oxigênio pode ser feita por alguns mediadores indicados a seguir (HUANG *et al.*, 1999):

- ✓ Inibição das enzimas que atuam na oxigenação lipídica;
- ✓ Bloqueio dos radicais livres por antioxidantes e/ou por enzimas antioxidantes como: superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase.

Em suma, os radicais livres bem como os antioxidantes são amplamente discutidos na literatura e o papel dos compostos fenólicos de plantas, especialmente flavonóides e ácidos fenólicos, tem sido de grande interesse a cerca de possíveis efeitos antioxidantes no organismo. Os antioxidantes, por sua vez, previnem a formação e interferem nas ações das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio associadas ao dano oxidativo.

Assim, frente às ações fisiológicas e deletérias dos processos oxidativos, a existência de compostos que possam controlar os mecanismos envolvidos nas reações de oxi-redução do organismo possui um papel fundamental. Estes compostos são conhecidos como antioxidantes que em concentrações específicas agem controlando os processos oxidativos em alimentos e organismos vivos.

Ênfase tem sido dada à identificação e purificação de novos compostos com atividade antioxidante, oriundos de fontes naturais, que possam agir sozinhos ou sinergicamente com outros aditivos, como uma forma de prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e restringir a utilização dos antioxidantes sintéticos. Os benefícios de frutas e outros vegetais e/ou da dieta do Mediterrâneo (rica em vegetais e pobre em gorduras saturadas) se devem, em geral, a muitos de seus componentes, tais como, fibra, micronutrientes e outros (GARCIA CLOSAS *et al.*, 2004; VISIOLI e GALLI, 2001; PAPAS, 1999). Também, incluem-se os antioxidantes, entre os maiores constituintes destes alimentos, que são apontados como prováveis agentes ativos na redução do risco de doenças crônicas (LOPEZ *et al.*, 2003).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Radicais livres

O radical livre, exaustivamente discutido na literatura clínica e nutricional, é qualquer espécie capaz de existir independente e que possui em um de seus orbitais atômico ou molecular um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL, 1996). Este desequilíbrio do elétron faz dos radicais livres espécies bastante instáveis e altamente reativas, capazes de oxidar lipídios, proteínas, DNA e carboidratos. Em geral, estes eventos causam ruptura nas membranas celulares, proporcionando a liberação de conteúdos celulares e apoptose (HU *et al.*, 2004). Este processo é biologicamente mais relevante em relação a estas espécies.

O elétron desemparelhado também pode abstrair um outro elétron ou ligar-se a outra molécula, ou se desprender completamente e novamente reagir com outra molécula, produzindo mais radicais livres. Normalmente estes radicais são neutralizados pela atividade enzimática ou por antioxidantes naturais (HU *et al.*, 2004). Exemplos de radicais livres são: superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila ($OH^{\cdot}$), peroxila ($RO_2^{\cdot}$), alcóxila ($RO^{\cdot}$) e hidroperoxilas ($HO_2^{\cdot}$), além de óxido nítrico (NO) e dióxido de nitrogênio ($NO_2^{\cdot}$). Os radicais livres de oxigênio e nitrogênio podem ser convertidos a outras espécies não radicalares, tais como peróxido (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), ozônio, O_3 e peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$). Espécies reativas de oxigênio (EROS) e de nitrogênio (ERNS) são produzidas em animais e seres humanos em condições fisiológicas e patológicas (FANG; YANG; WU, 2002; MATÉS, 2000; HALLIWELL, 1996).

EROS além de serem formadas pela cadeia de elétrons da mitocôndria e no decorrer da biotransformação de xenobióticos os quais utilizam o sistema citocromo P450, também podem ser produzidas após a exposição à radiação de raios ultravioletas A e B (GERSCHMAN *et al.*, 1954), no processo de fagocitose (BABIOR e WOODMAN, 1999), entre outros.

Os seres humanos são expostos à radiação do ambiente natural (como por exemplo raios gama) ou de fontes produzidas pelo próprio homem. A radiação eletro-magnética de baixo comprimento de onda pode promover radiólise da água do corpo para gerar radicais $OH^{\cdot}$. Já, os raios ultravioletas podem clivar a ligação covalente do H_2O_2 para produzir 2 $OH^{\cdot}$. Uma vez gerado este radical reage rapidamente com qualquer molécula que esteja próxima ao seu sítio de formação. Dessa forma, torna-se difícil desenvolver um composto sequestrador que possa

remover o $\text{OH}^\bullet$ *in vivo*. O sistema antioxidante de defesa contra o dano causado por este radical pode prevenir a formação e reparar o próprio dano que o $\text{OH}^\bullet$ provoca (HALLIWELL, 1996).

Muitas moléculas no organismo podem interagir com o O_2 e formar $\text{O}_2^\bullet$. Por exemplo, adrenalina, dopamina, tetrahydrofolatos e alguns componentes da mitocôndria e da cadeia de transporte de elétrons P450. Tais formações de $\text{O}_2^\bullet$ são inevitáveis visto que estas moléculas em um organismo necessitam de oxigênio (GIAVAROTTI, 2001; HALLIWELL, 1996). Somando-se a isto o radical $\text{O}_2^\bullet$ pode ser produzido deliberadamente. Por exemplo, em processos de fagocitose (neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos) na proteção a organismos ocorre a geração de grandes quantidades de $\text{O}_2^\bullet$ como parte do seu mecanismo de destruição. A ativação fagocitária excessiva em várias doenças (tais como artrite reumatóide e doença inflamatória do intestino) pode acarretar dano tecidual, favorecido pelas EROs e ERNs (HALLIWELL, 1996; BABIOR, 1990).

Estima-se que de 1 a 3 % do oxigênio que consumimos é parcialmente reduzido, formando componentes intermediários reativos, isto é as EROs, dentre elas, o $\text{O}_2^\bullet$. As etapas envolvidas neste processo originam basicamente estes intermediários da seguinte maneira (GIAVAROTTI, 2001; HALLIWELL, 1996):

Apesar de apresentar baixa reatividade, o $\text{O}_2^\bullet$ pode inativar enzimas, como a catalase e a glutathione peroxidase. O H_2O_2 não é um radical livre, mas sim uma ERO capaz de inativar enzimas, principalmente, pela oxidação de grupos tióis essenciais (FANG, YANG e WU, 2002).

2.2 Enzimas antioxidantes

Os antioxidantes intracelulares são moléculas que combatem os radicais livres e/ou espécies reativas de oxigênio, formados nesse meio, podendo ainda inibir as reações destes radicais com estruturas biológicas. Logo, a inativação desses componentes se dá pela oxidação dos próprios antioxidantes endógenos, principalmente moléculas seqüestradoras e redutoras. Estes sistemas antioxidantes incluem desde captadores, com baixo peso molecular, de espécies oxidadas a

enzimas que degradam superóxidos e hidroperóxidos (CHAUDIÈRE e FERRARI-ILIOU, 1999; HALLIWELL, 1994). São os chamados captadores não enzimáticos e enzimáticos.

Apesar dos seqüestrantes não enzimáticos serem essenciais na proteção dos componentes celulares ao dano oxidativo por EROS, o mesmo não acontece em relação aos radicais redutores, tais como superóxidos ou hidroperóxidos, os quais são suscetíveis à ação de enzimas antioxidantes específicas que exercem esta função (CHAUDIÈRE e FERRARI-ILIOU, 1999). Reforçando esta afirmação, merece destacar que as células vivas encontram-se num estado de manutenção conservado por vários processos reguladores, salientando-se dentre eles a regulação enzimática (BOZKAYA *et al.*, 2001).

A degradação do ânion superóxido é assegurada pela enzima superóxido dismutase, enquanto que os hidroperóxidos são destruídos pela catalase, glutathione peroxidase ou ascorbato peroxidase.

Superóxido dismutase (SOD)

A SOD exerce um importante papel na dismutação de um elétron dos ânions superóxidos gerados, transformando estes ânions em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 (McCORD e FRIDOVICH, 1969), conforme a reação a seguir:

Wang *et al.* (2005) referem em seu trabalho que a SOD remove o oxigênio singlete, assim como o $\text{O}_2^{\bullet -}$ (radical oxigênio), prevenindo a formação de $\text{OH}^{\bullet -}$, e é considerada uma barreira essencial contra a toxicidade potencial do oxigênio.

A pH fisiológico, a taxa da dismutação não enzimática de superóxido é significativa, contudo esta taxa aumenta consideravelmente na presença da SOD (CHAUDIÈRE e FERRARI-ILIOU, 1999).

Catalase (CAT)

É uma enzima que contém porfirina de alto peso molecular e degrada o H_2O_2 em concentração elevada, catalisando a dismutação de dois elétrons em oxigênio e água (SCHONBAUM e CHANCE, 1976):

Uma via alternativa é a CAT agir como peroxidase, numa concentração baixa de H_2O_2 , usando co-substratos redutores, tais como álcoois, incluindo ascorbato e fenóis:

Tanto a SOD quanto a CAT são enzimas consideradas linha de frente na proteção ao dano oxidativo. A Figura 1 ilustra esquematicamente o mecanismo de atuação dessas enzimas.

Figura 1. Mecanismo de ação das enzimas superóxido dismutase e catalase.

Glutationa peroxidase (GSH-Px)

A GSH-Px é uma selenoenzima que catalisa a redução de H_2O_2 reagindo com a glutathiona reduzida (GSH), oxidando-a e formando duas moléculas de água e glutathiona oxidada (GSSG). Os hidroperóxidos orgânicos (ROOH) são reduzidos a álcoois (CHAUDIÈRE e FERRARI-ILIOU, 1999; URSINI *et al.*, 1995):

Glutationa redutase (GSH-R)

A GSH-R promove a redução da GSSG para a forma tiol da GSH. Posteriormente, a GSH é utilizada pelas células na redução do H_2O_2 e outros

substratos oxidantes num ciclo catalítico acoplado a NADPH (ROGERS *et al.*, 2004), isto é:

Resumindo, a SOD exerce essencialmente a função de dismutação de ânion superóxido, o qual pode causar danos a membranas celulares e macromoléculas. Já, a CAT possui a capacidade de detoxificar H₂O₂ formados a partir das reações com a SOD. A liberação destes peróxidos promove a formação de inúmeras outras espécies oxidantes que promovem o estresse oxidativo. De outra maneira muito eficiente, a GSH-Px protege a membrana celular da lipoperoxidação, catalisando ainda a reação de hidroperóxidos com a glutathiona reduzida para a forma dissulfeto (MATÉS, 2000). As enzimas antioxidantes exercem um papel fundamental na proteção às organelas contra o dano oxidativo.

Diversos estudos recentes correlacionam positivamente a atividade dessas enzimas com o consumo de especiarias, frutas e outros vegetais que possuem compostos com potencial antioxidante (WANG *et al.*, 2005; CAPUTO *et al.*, 2004; JIMÉNEZ-ESCRIG *et al.*, 2003; JIAO e WANG, 2000).

2.3 Antioxidantes

O mecanismo de defesa antioxidante do organismo humano consiste em antioxidantes endógenos e exógenos que juntos exercem a função de proteção das membranas celulares, lipoproteínas e DNA contra os efeitos prejudiciais dos radicais livres e EROS (HALIWELL e GUTTERIDGE, 1989). Os antioxidantes endógenos além do ácido úrico, metaloproteínas entre outras, envolvem a participação das enzimas antioxidantes. Já, os exógenos incluem nutrientes e não nutrientes que são provenientes da dieta ou não.

Os antioxidantes podem ser sintéticos, como o butil hidroxianisol (BHA) e o butil hidroxitolueno (BHT) e o *t*-butil hidroquinona (TBHQ), os quais são amplamente utilizados pela indústria de alimentos, e naturais que são os compostos bioativos, ou seja, organossulfurados, vitaminas C (ácido ascórbico) e E (tocoferol), carotenóides

e compostos fenólicos e terpenos, constituintes de uma ampla variedade de vegetais (KITTS, 1994).

Como se sabe, os antioxidantes podem agir retardando ou prevenindo a oxidação do substrato envolvido nos processos oxidativos (HALLIWELL *et al.*, 1995). Embora, não possam reverter o processo oxidativo e nem evitar a rancidez hidrolítica (RAJALAKSHMI e NARASIMHAN, 1995).

Durante a oxidação lipídica, os antioxidantes podem agir de várias maneiras: ligando-se a íons metálicos, fazendo a varredura de radicais e/ou decompondo peróxidos e doando prótons H^+ (MOURE *et al.*, 2001). Frequentemente, mais de um mecanismo ocorre simultaneamente no processo de inibição da oxidação, podendo assim promover o sinergismo. Como citado por Sant'ana e Mancini-Filho (1995) em sua revisão, a remoção do oxigênio é o primeiro mecanismo de proteção à oxidação. A inativação de enzimas, proteção contra luz e a remoção de íons metálicos são de suma importância, mas estas medidas nem sempre são aplicadas em processos tecnológicos. Todavia, o bloqueio das reações oxidativas pode ocorrer pela adição de antioxidantes, podendo ser considerada a mais adequada na indústria alimentícia.

No século passado, a partir dos anos 80, teve início o interesse pelos antioxidantes naturais, face aos problemas averiguados em animais de laboratório, consumindo dietas contendo antioxidantes sintéticos, comprovando efeitos deletérios causados por doses elevadas de BHT, BHA e t-BHQ (DURAN e PADILLA, 1993). Além dos possíveis riscos que o uso irregular e/ou indiscriminado pode acarretar ao homem e também à rejeição generalizada aos aditivos alimentares sintéticos.

Ênfase tem sido dada à identificação e purificação de novos compostos com atividade antioxidante, oriundos de fontes naturais, que possam agir sozinhos ou sinergicamente com outros aditivos, como uma forma de prevenir a deterioração oxidativa dos alimentos e restringir a utilização dos antioxidantes sintéticos.

Há evidências de que os efeitos benéficos sobre o sistema imune podem ser atribuídos a compostos antioxidantes naturais presentes em alimentos, os quais têm sido relacionados com o controle das espécies reativas de oxigênio produzidas pelas células fagocíticas, e da síntese de prostaglandinas e leucotrienos; limitando, deste modo, os danos teciduais decorrentes da resposta inflamatória, mencionados anteriormente (CINTRA e MANCINI-FILHO, 1998).

Vegetais, em particular frutas, contêm substâncias antioxidantes distintas, cujas atividades têm sido bem comprovadas nos últimos anos. A presença de compostos fenólicos, tais como flavonóides, ácidos fenólicos, antiocianinas, além dos já conhecidos vitaminas C, E e carotenóides contribuem para os efeitos benéficos destes alimentos (AJAIKUMAR *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2004; KÄHKÖNEN *et al.*, 2001; GORINSTEIN *et al.*, 2000 e GORINSTEIN *et al.*, 1999).

2.4 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são fitoquímicos que estruturalmente possuem um anel aromático com uma ou mais hidroxilas e, freqüentemente, apresentam propriedades antioxidantes. Os flavonóides e os ácidos fenólicos são os que mais se destacam e, são considerados os antioxidantes fenólicos mais comuns de fontes naturais.

Estas substâncias estão amplamente distribuídas no reino vegetal; sendo, desta maneira, encontradas em vegetais, particularmente frutas, que são considerados boas fontes de antioxidantes, ocorrendo em todas as partes da planta (apesar de ter uma distribuição quantitativa diferenciada entre os diversos órgãos, assim como entre espécies distintas) (KARAKAYA, 2004; CINTRA e MANCINI-FILHO, 1998; VAN BUREN, 1970). Os compostos fenólicos são classificados de acordo com a natureza de seu esqueleto carbônico. As principais categorias são os ácidos fenólicos, flavonóides e os menos comuns estilbenos e lignanos.

O termo composto fenólico refere-se às principais classes de metabólitos secundários presentes nas plantas. Milhares de moléculas têm sido identificados e encontram-se intimamente relacionados à qualidade nutricional e sensorial dos vegetais.

Reforçando o que já foi anteriormente comentado, os compostos fenólicos, em baixas concentrações, podem agir como antioxidantes protegendo os alimentos da deterioração oxidativa. Também podem contribuir para a saúde humana, por seus múltiplos efeitos biológicos, exaustivamente relatados na literatura, incluindo atividade antioxidante, anticarcinogênica e/ou antimutagênica e ação antiinflamatória. A mais, evidências epidemiológicas demonstram correlação inversa entre doenças cardiovasculares e consumo de alimentos fonte de substâncias fenólicas (KARAKAYA, 2004). Contudo, estes compostos ou seus produtos de oxidação em quantidades elevadas podem interagir com proteínas, carboidratos e minerais, causando danos ao organismo.

Vários estudos já demonstraram que os compostos fenólicos são antioxidantes potentes (AJAIKUMAR *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2004; LEONTOWICZ *et al.*, 2002; KÄHKÖNEN *et al.*, 1999). Em contrapartida, ainda existem várias controvérsias, frente às associações, do consumo de fenólicos (que melhora alguns parâmetros relacionados ao estresse oxidativo) e o risco reduzido de doenças (SCALBERT *et al.*, 2005; KARAKAYA, 2004). Questiona-se muito, se os efeitos *in vitro* seriam realmente benéficos na mesma proporção *in vivo*.

Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos apresentam-se divididos em duas classes principais: os derivados de ácido benzóico e os derivados de ácido cinâmico. As estruturas químicas destes compostos estão representadas na Figura 2.

No grupo dos ácidos hidroxibenzóicos, encontram-se os ácidos protocatecuíco, vanílico, siríngico, gentísico, salicílico, elágico e gálico. Em geral, o conteúdo destes ácidos nos vegetais é muito reduzido. Na natureza, a ocorrência dos ácidos hidroxicinâmicos é mais comum, destacando-se os ácidos *p*-cumárico, ferúlico, caféico e sinápico. Eles ocorrem nos alimentos principalmente na forma de ésteres com ácidos orgânicos, açúcares e lípides, como por exemplo, o ácido clorogênico (éster do ácido quínico) cuja molécula é composta pelo ácido quínico esterificado ao ácido caféico (KARAKAYA, 2004; MANACH *et al.*, 2004; MELO e GUERRA, 2002).

As frutas e bebidas representam uma fonte significativa de ácidos hidroxicinâmicos (MEYER *et al.*, 1998). Estes ácidos raramente encontram-se na sua forma livre, entretanto, a sua ocorrência em frutas é predominantemente na forma esterificada com ácido quínico, glicose ou ácido tartárico (HERRMANN, 1989).

No início da década de 1970, foi verificada a atividade antioxidante destes dois grupos de compostos fenólicos (HARBONE, 1973). Atualmente, já está bem fundamentada a associação dos derivados de ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos à inibição da oxidação por parte destes compostos (LI *et al.*, 2005; MORTON *et al.*, 2000).

Ácidos hidrobenzóicos

$R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$: Ácido protocatequínico
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Ácido gálico

Ácidos hidroxicinâmicos

$R_1 = OH$: Ácido cumárico
 $R_1 = R_2 = OH$: Ácido caféico
 $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$: Ácido ferúlico

Figura 2. Estruturas químicas de ácidos fenólicos. Adaptado de Artajo *et al.* (2006) e Manach *et al.* (2004).

De maneira mais abrangente, segundo estudos revisados por Scalbert *et al.* (2005), os polifenóis constituem os antioxidantes mais abundantes na dieta e estão amplamente distribuídos em frutas, cereais, legumes *in natura*, chocolate e bebidas,

tais como chá, café ou vinho. Vale ressaltar que o chá é uma fonte importante de ácido gálico. A ingestão pela dieta é de aproximadamente 1 g/dia, sendo bem maior do que todos os outros antioxidantes dietéticos já conhecidos, cerca de 10 vezes mais elevada do que a vitamina C, e 100 vezes maior do que a vitamina E e carotenóides (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000).

Em especiarias, encontra-se comprovada a efetividade dos compostos fenólicos no processo de modulação da resposta inflamatória (CINTRA e MANCINI-FILHO, 1998). Uma infusão preparada com uma mistura de especiarias (mostarda, canela e erva-doce) inibiu a atividade das enzimas LOX e COX *in vitro* e atuou sobre o metabolismo lipídico de ratos, diminuindo os níveis da lipoperoxidação (MOREIRA e MANCINI-FILHO, 2004).

Utilizando extratos de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em filés de peixe da espécie pacu (*Piaractus mesopotamicus*), em estudos entre 1998 e 1999, Sant'ana e Mancini-Filho confirmaram a capacidade de proteção desta especiaria contra a oxidação, embora o grau de ação antioxidante dependa do perfil de ácidos graxos dos filés, tão logo demonstrando a importância da dieta nos processos oxidativos *in vivo*. Em estudo usando canela (*Cinnamomum zeylanicum*, Breyne), foi averiguado que uma determinada fração obtida de extrato aquoso desta especiaria, além de demonstrar uma significativa ação antioxidante, inibiu a replicação do vírus influenza em culturas de células MDCK (Madin Darby Canine) e VERO (*African Green Monkey*) (MANCINI *et al.*, 1999).

Determinadas ervas aromáticas, usadas em muitos produtos alimentícios, são ricas em ácido rosmarínico, um potente antioxidante (ZHENG e WANG, 2001). Recentemente, Ninfali *et al.* (2005) reafirmaram o potencial antioxidante destas ervas ao determinar a atividade antioxidante de sálvia, erva cidreira, manjerona, alecrim e tomilho, introduzindo-as em diferentes saladas; com isso, verificaram o aumento da capacidade antioxidante de uma porção de salada. A erva cidreira e a sálvia, a uma concentração de 1,5 % v/v elevaram em 150 e 200 %, respectivamente, o potencial antioxidante de uma porção de salada.

No que diz respeito a frutas, uma elevada quantidade de compostos biologicamente ativos foi encontrada em frutas tropicais e subtropicais (GORINSTEIN *et al.*, 1999). Neste trabalho, foi observado o conteúdo de ácido gálico na goiaba, lichia, manga, abacaxi, rabotam, jambo e caqui, com média entre 147,4 a 397,4 mg/100g de fruta fresca. No ano seguinte, este mesmo grupo de

pesquisadores realizou um ensaio biológico com ratos alimentados com uma ração rica em colesterol, e suplementada com caqui, para comparar os efeitos antioxidantes e hipolipidêmicos da fruta. Os resultados demonstraram que a fortificação com caqui melhorou os níveis de colesterol e exerceu um efeito antioxidante. Logo, concluíram que o potencial antioxidante desta fruta estaria correlacionado, primordialmente, aos compostos fenólicos presentes (GORINSTEIN *et al.*, 2000).

Em outra pesquisa, envolvendo ratos alimentados com alto teor de colesterol, Leontowicz *et al.* (2002) realizaram um estudo comparativo do conteúdo de compostos bioativos em maçãs, pêssegos e pêras, e a influência destes sobre os lipídios e a capacidade antioxidante nos animais. Os autores observaram valores elevados na quantidade de ácidos fenólicos nestas frutas, incluindo ácidos caféico (mais expressivo), *p*-cumárico e ferúlico. Também, foi encontrada uma boa correlação entre os polifenóis totais e seu potencial antioxidante, atribuindo-se as propriedades antioxidantes destas frutas aos compostos fenólicos presentes. As dietas suplementadas com maçãs, e em menor magnitude, com pêssegos e pêras, apresentaram efeitos hipolipemiantes e aumentaram o potencial antioxidante plasmático, em particular, no grupo de animais alimentados com ração rica em colesterol.

Outros pesquisadores também demonstraram a existência de ácidos hidroxicinâmicos em frutas como maçã, groselha preta e vermelha, framboesa, jamelão e polpa de marmelo, sugerindo que estes compostos sejam os principais antioxidantes, dando indícios de que as frutas seriam boas fontes de antioxidantes naturais na nossa dieta (SILVA *et al.*; 2004; KÄHKÖNEN; HOPIA; HEINONEN, 2001).

Ajaikumar *et al.* (2005), administrando extrato metanólico (70 %) da casca da romã em animais com úlcera grave, induzida por injúria, verificaram o efeito protetor desse extrato na mucosa gástrica. Isto foi notado devido à redução do índice ulcerativo, ao aumento dos níveis de enzimas antioxidantes, diminuição da lipoperoxidação e à ação citoprotetora contra a ulceração induzida por etanol e aspirina. Estes autores sustentam, ainda, que a atividade antioxidante *in vivo* e anti-ulcerativa da romã estaria correlacionada ao conteúdo de fenólicos presentes e em menor grau, aos alcalóides.

De acordo com Wanasundara *et al.* (1994), os ácidos sinápico, ferúlico e *p*-cumárico possuem uma atividade antioxidante mais ativa do que os derivados do

ácido benzóico, tais como ácido protocatecuíco, siríngico e vanílico. Determinado o potencial antioxidante de alguns ácidos hidroxicinâmicos, Soobrattee *et al.* (2005) verificaram que a ordem de maior atividade antioxidante se deu da seguinte maneira: ácido rosmarínico > ácido clorogênico > ácido cafeico > ácido ferúlico > ácido cumárico.

Vale salientar que as frutas cítricas são conhecidas por conter antioxidantes naturais no óleo, na polpa e na casca. Neste sentido, Pereira e Mancini-Filho (1994) realizaram, no Laboratório de Lípidos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, a avaliação antioxidante em sementes de frutas cítricas e observaram a presença de compostos com atividade antioxidante. Ainda, neste mesmo laboratório, foi notado que o macambo ou cacau do Peru (*Theobroma bicolor* L.), fruto originário da Amazônia, possui atividade antioxidante e nas frações fenólicas obtidas a partir desta fruta, foram identificados vários ácidos fenólicos, dentre eles o ácido salicílico, em maior quantidade, que esteve presente em todas as frações (TORRES *et al.*, 2002).

Como já foi dito, os ácidos fenólicos parecem estar relacionados à atividade antioxidante. Em outros estudos, foi constatada a ação antioxidante de microalga *Spirulina maxima* (MIRANDA *et al.*, 1998) e de alga marinha roxa (NOVOA *et al.*, 2001). Nesta, foram identificados os ácidos fenólicos: *p*-cumárico, trans-cinâmico e ferúlico e, na primeira, os ácidos salicílicos, trans-cinâmico, sinápico, clorogênico, quínico e caféico.

Biodisponibilidade dos ácidos fenólicos

Apesar das vastas pesquisas no campo dos antioxidantes provenientes de fontes naturais, em particular, demonstrando o potencial antioxidante dos compostos fenólicos e seus efeitos biológicos, pouco se sabe a respeito da absorção destes no organismo.

Os estudos de absorção de alguns destes ácidos fenólicos têm sido realizados tanto de forma direta assim como indireta. Evidências indiretas da absorção destes compostos que ultrapassam a barreira do intestino são observadas pelo aumento da capacidade antioxidante do plasma após o consumo de alimentos ricos em polifenóis. De outra maneira, a biodisponibilidade obtida diretamente compreende a mensuração das concentrações de compostos fenólicos puros ou provenientes de alimentos (com o conteúdo já conhecido dos compostos em

questão) no plasma e na urina. A estrutura química irá determinar a proporção e extensão de absorção e a natureza dos metabólitos circulantes no plasma (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000).

No que se refere à absorção de ácidos clorogênico e caféico, foi observado que apenas pequenas quantidades destes foram encontradas na urina de pacientes ileostomizados, além de traços da molécula intacta do ácido clorogênico, dando indícios de que estes ácidos seriam intensamente metabolizados (OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001). Além do mais, os autores verificaram também que a absorção do ácido caféico esterificado com ácido quínico (clorogênico) é três vezes mais baixa do que o ácido caféico na sua forma livre. Eles sugerem que uma parte do ácido clorogênico poderia ser absorvida intacta, e a outra, metabolizada no fígado. Não obstante, a absorção passiva no estômago, bem como o mecanismo de transporte ativo no intestino poderia exercer um importante papel na absorção do ácido caféico em seres humanos.

Há relatos na literatura de que a absorção dos ácidos p-cumárico, caféico e ferúlico se dá nesta mesma ordem de seqüência (CHEN *et al.*, 2004). Além do mais, por meio de ensaios *in vivo* foi demonstrado que a eficiência de absorção do ácido p-cumárico é muito maior do que a do ácido gálico e vanílico (NARDINI *et al.*, 2006; RECHNER *et al.*, 2002). Também os ácidos p-hidroxibezóico e sinápico encontram-se biodisponíveis (CHEN *et al.*, 2004; SCALBERT e WILLIAMSON, 2000). Nardini *et al.* (2006) verificaram que os ácidos fenólicos, após o processo de absorção, são amplamente conjugados a sulfatos e glicuronados. Porém, o grau de conjugação varia de acordo com as características químicas de cada ácido fenólico.

Com alguns ácidos fenólicos ocorre O-metilação e glicuronidação no fígado. Por exemplo, o ácido gálico não esterificado pode ser absorvido no intestino delgado e então transportado para o fígado, no qual é O-metilado ou glicurinado e à vista disso, excretado (NARDINI, *et al.*, 2006; KONISHI; HITOMI; YOSHIOKA, 2004).

Portanto, conforme os trabalhos citados anteriormente, os ácidos fenólicos seriam absorvidos no trato gastrointestinal e poderiam ser encontrados na corrente sanguínea depois de serem metabolizados para a forma conjugada de glicuronados e sulfatados.

Além de sua capacidade antioxidante, a aplicação de ácidos fenólicos na área clínica médica é de grande importância, por apresentar característica inibitória sobre as enzimas que participam na síntese dos eicosanóides, portanto, estes compostos

poderiam influenciar na resposta antiinflamatória. Outrossim, as substâncias fenólicas com propriedades antioxidantes também poderiam potencializar as enzimas CAT, SOD e GSH-Px, elevando o estado antioxidante no mecanismo de defesa do organismo.

Os componentes fenólicos das plantas constituem uma mistura complexa e por enquanto, em apenas um número reduzido de frutas estes constituintes foram determinados sistematicamente. Deste modo, considerando o potencial antioxidante e os efeitos biológicos dos compostos fenólicos, há a necessidade de maiores investigações quantitativas e qualitativas de frutos ricos em substâncias fenólicas.

2.5 Biotransformação de tetracloreto de carbono no fígado

Além da função principal do fígado que é de captação, armazenamento e metabolização de nutrientes (aminoácidos, carboidratos, lipídios e algumas vitaminas), cabe a este a maioria do metabolismo de produtos endógenos, como esteróides e eicosanóides, entre outros, e a biotransformação de xenobióticos. O termo biotransformação refere-se geralmente à conversão enzimática de substâncias estranhas ao organismo, hidrofóbicas, em derivados hidrossolúveis, de fácil excreção biliar e urinária (GIAVAROTTI, 2001).

Várias são as enzimas participantes desta biotransformação, contudo pode-se destacar que o sistema monooxigenase dependente de citocromo P450 é o sistema enzimático mais importante neste processo.

Inúmeros reagentes químicos, incluindo o tetracloreto de carbono (CCl_4), são categoricamente usados em modelos com roedores a fim de investigar mecanismos de hepatotoxicidade relevante à exposição humana. O CCl_4 é bioativado pelas enzimas Citocromo P450 de fase I para o radical triclorometil ($\text{CCl}_3^\bullet$). A toxicidade resultante deste metabólito reativo é multifatorial e inclui a formação de estresse oxidativo e estado redox celular alterado (ALEKSUNES, 2005).

Em suma, o processo de metabolização do CCl_4 pelo sistema monooxigenase (P450 2E1) gera o radical $\text{CCl}_3^\bullet$ que imediatamente se transforma em peróxido triclorometil (Cl_3COO^-). Estes radicais proporcionam a oxidação lipídica de ácidos graxos poliinsaturados constituintes das membranas celulares, originando radicais peróxidos lipídicos, hidroperóxidos lipídicos e outras substâncias, todos atuantes como agentes oxidantes ativos. Por conseguinte, a estrutura e organelas

intracelulares da membrana celular é completamente deteriorada, expandindo o dano estrutural hepático (OZERCAN *et al.*, 2006).

Por fim, com a autooxidação caracterizada dos ácidos graxos, presentes nos fosfolípidos das membranas citoplasmáticas, pelo $\text{CCl}_3^{\bullet}$, ocorrem mudanças morfológicas e funcionais na membrana da célula (JIN *et al.*, 2005). Além de diminuição dos níveis das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutationa peroxidase) e liberação de enzimas hepáticas na corrente sanguínea, isto é, elevando os níveis de ALT, AST e fosfatase alcalina, como também de bilirrubina que são indicadores convencionais de dano hepático.

Portanto, a ação de antioxidantes exerceria um papel importante na proteção contra o dano hepatocelular promovido pelo CCl_4 .

2.6 Caju

O caju (*Anacardium occidentale* L.), pertencente à família Anacardiaceae, encontra-se nas regiões costeiras do Norte-Nordeste do Brasil (CARDOSO *et al.*, 1999). O verdadeiro fruto, ou seja, a castanha de caju, é pequeno, de coloração escura e consistência dura, podendo atingir até 2 cm de comprimento, sustentado pelo pseudofruto, de coloração amarela, vermelha ou alaranjada, conhecido popularmente como o próprio caju (PHANI KUMAR *et al.*, 2002), ilustrados na Figura 3. A cor do pedúnculo está correlacionada ao teor de antocianinas e flavonóides amarelos presentes na película que são relativamente baixos, 37,4 e 112 mg/100g, respectivamente (MOURA *et al.*, 2001).

O pseudofruto ou pedúnculo é utilizado em poucos países, comparativamente à castanha de caju que é bastante popular. No Brasil, o pedúnculo de caju é utilizado para a elaboração de suco, doces, caju cristalizados, refrigerante gaseificado, a cajuína, e bebidas alcoólicas, perfazendo cerca de 30 produtos que podem ser industrializados, em pequena, média e grande escala e com tecnologia disponível para uso imediato (MOURA, 1998; CECCHI e RODRIGUES-AMAYA, 1981). Outrossim, o Brasil compõe um dos maiores exportadores, entre os países de destaque da produção de castanha de caju, depois da Índia (PARAMASHIVAPPA *et al.*, 2001).

Figura 3. Caju (*Anacardium occidentale* L.) clone CCP-76.

A castanha de caju apresenta uma concentração elevada de lípides na sua composição. Calder *et al.* (1995) observaram neste fruto um conteúdo de aproximadamente 60 % de ácido oléico e 20 % de ácido linoléico. A sua casca contém uma elevada concentração de lipídios fenólicos. Phani Kumar *et al.* (2002) citam que conforme o tipo de extração pode-se obter até 60-65 % de ácido anacárdico, 15-20 % de cardol e 10 % de cardonol, principais constituintes fenólicos do líquido da casca da castanha de caju (PARAMASHIVAPPA *et al.*, 2001). O ácido anacárdico tem a capacidade de inibir determinadas enzimas, dentre elas, a Lipoxigenase envolvida em processos inflamatórios (SHOBBA *et al.*, 1994). Pesquisa realizada, em uma comunidade rural do estado de Pernambuco – BR, para avaliar os padrões de uso de recursos de plantas medicinais, verificou que das 48 espécies de plantas estudadas (56,5% nativas da região da Caatinga) foi citado o uso da casca do caule de caju com fins antiinflamatórios e para contusão (ALBUQUERQUE, 2006).

Também, Mendonça *et al.* (2005) analisando óleo de várias plantas, incluindo o óleo da castanha de caju, sugerem uma aplicação deste no controle do vetor da dengue e febre amarela.

O extrato do broto de caju inibiu a oxidação de LDL de ratos em aproximadamente 93 %, mantendo-se em um bom nível de proteção por até 3^h de

ensaio; exibindo, portanto, uma correlação positiva com a formação de dienos conjugados ($R^2 = 0,70$) (SALLEH *et al.*, 2002).

Em estudo realizado no Laboratório de Lípidos da FCF/USP por Melo (1989), verificou-se que extratos metanólicos de castanha de caju possuem atividade antioxidante. Conquanto, não foram identificados o(s) composto(s) fenólico(s) nesta pesquisa. Melo e Mancini-Filho (1991), além da castanha do caju, constataram, também, a capacidade antioxidante do extrato metanólico da castanha do Brasil.

O crescimento do consumo de pedúnculo de cajueiro-anão-precoce (*Anarcadium occidentale* L., var. *nanum*) como fruta de mesa aumenta consideravelmente a cada safra. Este fato se deve tanto pela abertura de novos mercados, quanto pela consolidação dos mercados tradicionais (FIGUEIRAS e ALVES, 2001). Além do que, isto ocorreu devido ao melhoramento do cajueiro com a introdução do cajueiro-anão-precoce no plantio, que por apresentar porte baixo, permite a colheita manual com maior aproveitamento e redução de perdas (PAIVA *et al.*, 1998). O uso do clone CCP-76 tem sido estimulado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Agroindústria tropical em virtude da facilidade de cultivo, colheita e produção de frutos com melhores características para o consumo. No século passado, a partir de 1975, o programa de melhoramento com o cajueiro foi intensificado, e em 1983, resultou no lançamento do clone anão-precoce CCP-76, com produção média superior em até 3,5 vezes à do cajueiro comum, além das vantagens de uniformização do peso da castanha e pedúnculo e do porte reduzido da planta (EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL, 2007).

Além do CCP-76, já existe uma variedade de clones de caju desenvolvidos também pela EMBRAPA. Como exemplo, temos o CCP-09 e o BRS-189 que apresentam características fenotípicas (tamanho, cor, forma e peso) e físico-químicas (teor de sólidos totais, acidez, vitamina C e taninos) diferentes em relação ao CCP-76.

Estes clones fizeram parte do Programa de Melhoramento da Embrapa/Agroindústria Tropical, e os primeiros recomendados para o plantio comercial foram CCP-06, CCP-09 e CCP-76. Além da maior produtividade, esses clones, apresentam como vantagem o porte baixo, já que os pedúnculos podem ser colhidos diretamente da planta, distinguindo-se do cajueiro comum, em que a colheita é feita após a queda dos caju ou com vara longa, prejudicando sensivelmente o aproveitamento industrial e inviabilizando-os para o mercado de

mesa (MOURA, 1998). A seguir relacionamos as principais características dos clones já descritas na literatura (Figura 4):

O CCP-76 apresenta cor laranja escuro e peso médio do fruto inteiro 151 g. Classifica-se como tipo 4 (correspondente à quantidade de frutos na bandeja para comercialização) de maior valor comercial. O peso médio da castanha representa 9,0 g e o comprimento médio do fruto inteiro é de 7,5 cm, possuindo formato piriforme que facilita o arranjo dos frutos nas bandejas para comercialização *in natura* (MOURA *et al.*, 2001). Caracteriza-se por maior intensidade de aroma doce, gosto doce, sabor caju, maciez e suculência (GARRUTI *et al.*, 2002).

O CCP-09 apresenta cor amarelo-alaranjado, peso médio do fruto inteiro 100 g, sendo classificado como tipo 5 e/ou 6 (cajus/bandeja), comprimento médio 6,0 cm e os pedúnculos são mais firmes texturalmente e possui formato mais arredondado (MOURA *et al.*, 2001). Possui maior adstringência e irritação na garganta (GARRUTI *et al.*, 2002).

O BRS-189 exibe cor laranja a vermelho intenso e peso médio do fruto inteiro 143 g. A classificação é expressa pelo tipo 4 (cajus/bandeja). O peso médio da castanha 10,2 g e o comprimento médio do fruto inteiro é de 7,6 cm e apresenta formato cilíndrico (MOURA *et al.*, 2001). Caracteriza-se por forte aroma doce (GARRUTI *et al.*, 2002).

Figura 4. Principais características física e físico-química dos pedúnculos de caju clones CCP-09 e BRS-189, tendo como referência o clone CCP-76.

O CCP-09 teve sua origem na clonagem da planta matriz de cajueiro CCP-06, foi lançado para o plantio comercial no ano de 1987. Já, o BRS-189 originou-se da seleção fenotípica individual do cruzamento entre os clones de cajueiro-anão precoce CCP-1001 e CCP-76, seguida de avaliação clonal dos genótipos selecionados, no Campo Experimental de Pacajus, CE. Foi distribuído para o plantio comercial, em cultivo irrigado, no estado do Ceará, no ano de 2000 (EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL, 2007b).

De acordo com citações no trabalho de Moura (1998), a qualidade do pedúnculo para consumo *in natura* está relacionada aos seguintes aspectos: teor de açúcar da polpa, adstringência e coloração externa (vermelha ou amarela). Além de que as características físicas (cor, peso, forma, etc.) são de fundamental importância para uma boa aceitação do produto por parte do consumidor.

Moraes *et al.* (2002) citam que até recentemente os pedúnculos de caju eram vendidos exclusivamente em feiras locais, mas nos dias atuais, chegam até aos supermercados de várias partes do país, localizados a mais de 4000 km do local de produção, podendo ser mantidos em boas condições por até quinze dias após a colheita.

A colheita é realizada manualmente e quando armazenado em temperatura ambiente a vida útil pós-colheita nessa condição não ultrapassa 48 horas, logo o pedúnculo do caju é altamente perecível (EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL, 2007a). No tocante à conservação, transporte e comercialização de caju *in natura* faz-se uso da refrigeração associada à atmosfera modificada, 5 °C e 85 a 90% de umidade relativa (MORAIS *et al.*, 2002).

O pedúnculo de caju, frequentemente, representa um produto de descarte, pois o seu consumo e a produção de suco são reduzidos frente ao expressivo volume da produção da castanha.

Diante da perspectiva de maiores estudos sobre antioxidantes naturais em frutos e um maior conhecimento tanto químico, como biológico para aplicações, o presente trabalho teve como finalidade buscar maiores informações sobre a participação dos compostos fenólicos com a atividade antioxidante do pedúnculo de caju sobre a lipoperoxidação e as enzimas participantes de processos inibidores da oxidação no organismo animal.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as propriedades antioxidantes *in vitro* e *in vivo* dos compostos fenólicos presentes no pedúnculo de caju e o efeito destas substâncias sobre a lipoperoxidação e as enzimas participantes do sistema antioxidante de defesa no organismo.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Caracterização química dos pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-76 tratado, CCP-09 e BRS-189, determinando:
 - composição centesimal;
 - perfil de ácidos graxos;
 - conteúdo de fenólicos totais e
 - perfil de ácidos fenólicos;
- ✓ Avaliação da atividade antioxidante de extratos obtidos a partir de solventes de diferentes polaridades e frações de ácidos fenólicos dos pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-76 tratado, CCP-09 e BRS-189 em sistemas modelo β -caroteno e lipídico em teste Rancimat;
- ✓ Elaboração de curvas cinéticas e cálculo de fatores cinéticos para verificar a eficiência da ação antioxidante dos extratos e das frações em sistema β -caroteno/ácido linoléico;
- ✓ Determinação da capacidade antioxidante em sistema de varredura do radical DPPH dos extratos e frações de ácidos fenólicos do pedúnculo de caju clone CCP-76;
- ✓ Estudo do efeito antioxidante em ratos, em condições normais, com administração oral de extrato ou de fração de ácidos fenólicos do pedúnculo de caju clone CCP-76;
- ✓ Avaliação bioquímica e histológica do nível de proteção pela administração oral de extrato aquoso ou de fração de ácidos fenólicos do pedúnculo de caju clone CCP-76 em ratos submetidos a estresse oxidativo induzido por tetracloreto de carbono.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Amostras

Foram avaliados três tipos de clones de caju provenientes da EMBRAPA, Estação Experimental de Pacajus/CE. Os clones são CCP-76, CCP-09 e BRS-189 e um último, CCP-76 submetido a um tratamento especial, a fim de reduzir o teor de taninos.

Tendo em vista os resultados promissores obtidos com o pedúnculo de caju clone CCP-76, analisado inicialmente neste trabalho, e pela parceria do laboratório de lípidos junto à EMBRAPA/CE, resolvemos ampliar a caracterização a outros clones de caju (CCP-09 e BRS-189) desenvolvidos por este órgão e utilizados comercialmente. Além disso, aproveitamos para fazer as análises do clone CCP-76 submetido a um tratamento especial, o qual fez parte do projeto temático: “Desenvolvimento de alimentos funcionais a partir da adição de carotenóides e polifenóis extraídos do bagaço de caju” (PRODETAB Nº 104-02/01), cujo laboratório de lípidos participou com o subprojeto intitulado “Avaliação da composição em polifenóis e das propriedades antioxidantes dos extratos em bagaço de caju”.

Os pedúnculos (pseudofrutos), exceto o clone CCP-76 tratado, foram prensados manualmente e logo em seguida, congelados em nitrogênio líquido, a fim de minimizar processos oxidativos e outras alterações químicas e/ou enzimáticas, além de mudança de cor. Posteriormente, as amostras preparadas foram liofilizadas, em liofilizador modelo EC-Super Modulyo (EDWARDS®, Crawley, UK), durante um período de aproximadamente 64 h, trituradas em moinho analítico (modelo IKA A11 *basic*, Wilmington, USA) e mantidas em *freezer* -20 °C até posteriores análises. As castanhas (frutos) dos clones CCP-76 foram retiradas de suas respectivas cascas, secas em estufa ventilada a 60 °C por 12 h e em seguida, moídas em moinho analítico. As amostras, já trituradas, foram mantidas também em *freezer* a -80 °C até o momento de serem analisadas.

O pedúnculo CCP-76 tratado seguiu protocolo experimental desenvolvido pela EMBRAPA. Este foi submetido à exaustiva lavagem e maceração de acordo com o fluxograma que se segue (Figura 5). A amostra foi enviada congelada (-20 °C) e mantida em *freezer* até posteriores análises.

Figura 5. Pedúnculo de caju CCP-76 submetido a um tratamento conforme protocolo EMBRAPA.

4.1.2 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), recém-desmamados, pesando entre 60 e 70 g, provenientes do Biotério da FCF/USP.

4.1.3 Reagentes e outros materiais

Ácido linoléico, β -caroteno, BHT emulsificante monopalmitato sorbitano polioxietileno – Tween 40, DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e N, O-bis (Trimetilsilil) acetamida (BSA) (todos da Sigma[®]), tetracloreto de carbono (CCl₄) e Folin Ciocalteau (Merck), ácido salicílico, trans-cinâmico, *p*-hidroxibenzóico, vanílico, gentísico, protocatecuíco, quínico, *o*-cumárico, *m*-cumárico, *p*-cumárico, gálico, ferúlico, caféico, sinápico e clorogênico, (padrões de ácidos fenólicos – Sigma[®]), éster metila de ácido heptadecanóico (padrão interno – Sigma[®]), ácidos graxos láurico, mirístico, palmítico, palmitoléico, margárico, heptadecenóico, esteárico, oléico, vacênico, linoléico, α -linolênico, araquídico, eicosanóico, beênico e lignocérico (Padrões – Sigma), xantina, glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG), glutathiona redutase, citocromo C, β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), ácido tiobarbitúrico (TBA) e 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP), xantina oxidase (todos Sigma[®]), dodecil sulfato de sódio – SDS (USB). Os demais reagentes foram de grau analítico.

4.2 Métodos

4.2.1 Análise do perfil lipídico do pedúnculo liofilizado e da farinha de castanha de caju

Inicialmente, foram obtidas as frações lipídicas, tanto dos pedúnculos liofilizados assim como da farinha de castanha de caju, pela metodologia descrita por Folch, Lees e Stanley (1957). Posteriormente, as amostras foram esterificadas seguindo o método de Hartman e Lago (1973). As condições cromatográficas seguiram os procedimentos descritos por Moreira e Mancini-Filho (2003).

Obtenção da fração lipídica

Para extração dos lípidos totais, pesou-se 1 g de amostra (dos pedúnculos liofilizados ou da farinha da castanha de caju), foram adicionados 10 mL de metanol e homogeneizado por 1 minuto, em homogeneizador MA 102 (MARCONI). Em seguida, foram adicionados 20 mL de clorofórmio, novamente homogeneizando por 2 minutos. A mistura foi, então, filtrada a vácuo em funil de *Büchner* acoplado a um kitassato. O resíduo formado foi separado e ressuspenso com 30 mL de uma solução de clorofórmio/metanol (2:1 v/v) e homogeneizado por 3 minutos. Esta solução foi filtrada em funil de *Büchner*, combinados os filtrados e transferidos para proveta de 100 mL. O volume foi aferido, adicionado $\frac{1}{4}$ deste volume de KCl (0,88%) e agitado manualmente. A fase superior foi aspirada a vácuo. Novamente, aferiu-se o volume e acrescentou-se $\frac{1}{4}$ de metanol/água (1:1), agitando-se manualmente. Mais uma vez, a camada superior foi aspirada a vácuo e a solução restante foi filtrada e desidratada com sulfato de sódio anidro. Posteriormente, o solvente presente foi evaporado, em evaporador rotativo sob vácuo a 40 °C, até a obtenção apenas do extrato etéreo para extração dos ésteres metílicos de ácidos graxos.

Obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos

A esterificação foi feita transferindo-se 0,3 mL e 1,5 mL do extrato etéreo das farinhas das castanhas e dos pedúnculos liofilizados de caju, respectivamente, em triplicata para tubos de vidro com tampa. Dois mL de KOH metanólico (0,5 M) foram acrescentados às frações lipídicas, os tubos foram agitados em agitador automático JK (IKA® – WORKS, Wilmington, USA) e levados ao banho-maria fervente por 5 minutos. Após resfriamento (temperatura de aproximadamente 40 °C), foram adicionados 6 mL da mistura de esterificação e novamente, os tubos foram

colocados em banho-maria fervente por 3 minutos. A seguir, 5 mL de solução saturada de NaCl foram misturados a solução, agitando-se veemente. Posteriormente, foram realizadas três extrações com 2 mL de hexano (para cada extração). Ao final, transferiu-se a fase orgânica (superior) para outro tubo (homogeneizando-o) e em seguida, foram colocados novamente 5 mL de solução saturada de NaCl (desta vez, tomando-se o cuidado de não agitar para não formar emulsão) e de novo, a camada superior foi transferida para outro tubo e evaporada com nitrogênio gasoso. Por fim, os ésteres metílicos de ácidos graxos foram ressuspensos em 1 mL de hexano e acondicionados em *freezer* até o momento da análise cromatográfica.

Equipamentos

As análises cromatográficas foram feitas em cromatógrafo a gás GC 17A (SHIMADZU) com *software* Class GC. A coluna utilizada foi de sílica fundida SUPELCOWAX 10 (polietilenoglicol, 30 m de comprimento; 0,25 mm d.i. e 0,25 μ de fase estacionária).

Condições cromatográficas

A programação usada foi a seguinte:

- Gradiente de temperatura: a temperatura inicial foi 170 °C, e o aquecimento se deu a 1 °C/minuto até 225 °C, permanecendo nesta temperatura por 10 minutos;
- Temperatura do vaporizador : 250 °C;
- Temperatura do detector : 270 °C;
- Gás de arraste: He;
- Fluxo: 1 mL/min;
- Razão de divisão da amostra no injetor: 1/50.

A identificação dos ácidos graxos das amostras foi realizada em comparação aos espectros dos padrões de ácidos graxos determinados nas mesmas condições.

4.2.2 Preparação dos extratos etéreo, alcoólico e aquoso

Foram obtidos de forma sequencial, os extratos etéreo, alcoólico e aquoso, a partir dos pedúnculos liofilizados, segundo Moreira e Mancini-Filho (2003).

Inicialmente, foi feita extração com éter etílico na proporção de 1:5 (g da amostra:solvente) durante 1 h em agitador magnético (modelo RO15 power, IKA®, Staufen, Alemanha), à temperatura ambiente. A solução foi filtrada a vácuo em funil Büchner e o resíduo obtido (após secagem à temperatura ambiente) foi extraído com álcool etílico, na mesma proporção de 1:5, também sob agitação por 1 h e depois filtrado a vácuo para se obter o extrato alcoólico (EAlc). Por fim, o resíduo recuperado foi seco e extraído, desta vez com água destilada sob as mesmas condições dos extratos anteriores; obtendo, assim, o extrato aquoso (EAq).

4.2.3 Compostos fenólicos

4.2.3.1 Determinação dos fenólicos totais de extratos metanólicos

As amostras dos pedúnculos clones CCP-76, CCP-76 tratado, CCP-09 e BRS-189 contendo os fenólicos foram previamente preparadas de acordo com o método de Fantozzi e Montedoro (1978). Os fenólicos totais foram determinados seguindo a metodologia descrita por Swain e Hills (1959).

2 g foram pesados, de cada amostra, e homogeneizados com 100 mL de uma solução contendo metanol/água (80/20) em homogeneizador MA 102 (MARCONI) por 1 h. O sobrenadante produzido foi filtrado e o volume final foi corrigido para 100 mL com metanol.

Após o preparo da amostra (filtrado final), foi tomado 0,5 mL desta, adicionados 8 mL de H₂O destilada e 0,5 mL de reagente *Folin Ciocalteu*. A solução foi homogeneizada e, após 3 minutos, colocado 1 mL de solução saturada de NaCO₃. Decorrido 1 h de repouso da solução, foram realizadas as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro SPECTRONIC[®] 20 GENESYS[™] (Rochester, USA), a 720 nm. Paralelamente, foi feita uma curva padrão com ácido gálico, nas concentrações de 2; 5; 10; 15 e 20 µg.

Os fenólicos totais dos extratos EAq e EAlc também foram quantificados diretamente destes.

4.2.3.2 Extração, hidrólise, identificação e quantificação de ácidos fenólicos

Extração

Os ácidos fenólicos livres e das frações esterificadas (solúveis e ligantes insolúveis) obtidos a partir dos pedúnculos liofilizados de caju clones CCP-76, CCP-76 tratado, CCP-09 e BRS-189 foram identificados por cromatografia a gás (CG) empregando a metodologia descrita por Drabrowski e Sosulski (1984), com modificações realizadas por Moreira e Mancini-Filho (2003) descritas a seguir:

Um grama de amostra liofilizada foi extraído 6 vezes em Ultra-Turrax (modelo DI 25 basic, IKA®, Staufen, Alemanha) por 1 minuto com 20 mL de THF à temperatura ambiente e protegido da luz. As frações obtidas foram combinadas, desidratadas com sulfato de sódio anidro e o solvente existente foi evaporado em evaporador rotativo (B525, Micronal, São Paulo, Brasil) sob vácuo, a 30°C, o concentrado foi ressuspensão em 5 mL de metanol e transferido para frasco âmbar. Esta fração foi analisada para os ácidos fenólicos livres (AFL).

O resíduo restante foi novamente extraído 6 vezes em Ultra-Turrax com uma solução de metanol:acetona:água (1:1:1) à temperatura ambiente, em seguida as frações obtidas foram filtradas. Os filtrados combinados foram evaporados em evaporador rotativo sob vácuo a 40 °C até a fase aquosa. A suspensão aquosa e novamente o resíduo formado foram hidrolisados com volume igual e 20 mL de NaOH 4 N, respectivamente, por 4 h sob fluxo de nitrogênio, à temperatura ambiente e protegidos da luz, posteriormente, o pH das soluções foi ajustado com HCl 6 N para 2. Após a acidificação, os sobrenadantes foram extraídos 5 vezes com hexano com a finalidade de remover ácidos graxos livres e outros lipídios contaminantes. Os ácidos fenólicos liberados da fração solúvel e insolúvel foram, então, re-extraídos separadamente 6 vezes com éter etílico:acetato de etila:THF (1:1:1). Ao final de cada extração, as frações foram combinadas, desidratadas com sulfato de sódio anidro, filtradas, evaporadas em evaporador rotativo sob vácuo a 40 °C e em seguida, ressuspensas em 5 mL de metanol, as quais foram analisadas para ácidos fenólicos liberados das frações de ésteres solúveis (AFS) e de insolúveis (AFI).

Todas as frações permaneceram em *freezer* (-20 °C) até posteriores análises cromatográficas e determinação da atividade antioxidante.

Derivatização

Os ácidos fenólicos liberados das frações obtidas (0,25 mL) foram transferidos para *vials* contendo 0,1 mL de padrão interno (éster metila de ácido heptadecanóico) e o metanol foi evaporado com nitrogênio, antes do processo de sililação realizado pela adição de BSA (0,2 mL). Este processo de derivatização fez-se necessário a fim de esterificar os ácidos fenólicos para uma melhor separação por cromatografia gasosa. Para a completa sililação, a solução foi incubada a 60 °C por 30 minutos; obtendo-se, portanto, as amostras prontas para serem injetadas no cromatógrafo.

Equipamento

As determinações cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a gás (modelo GC 17 A, Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com detector de ionização de chama.

A separação foi feita em coluna capilar de sílica fundida J&W (DB5 – 5 % fenil-metilpolisiloxano: 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, USA).

Condições cromatográficas

As condições para a identificação dos ácidos fenólicos obedeceram a seguinte programação:

- Gradiente de temperatura: iniciou-se com 150 °C, permanecendo isotérmica durante 3 minutos. Finalizado este período, a temperatura foi programada para aumentar, aquecendo 5 °C/minuto, até 300 °C, permanecendo isotérmica, nesta mesma temperatura, por mais 3 minutos;
- Temperatura da câmara injetora: 310 °C;
- Temperatura do detector: 320 °C;
- Gás de arraste: He ;
- Fluxo: 1 mL/minuto;
- Razão de divisão da amostra no injetor (Split): 1/50;
- Volume de injeção: 1 µL.

As áreas dos picos foram calculadas por um integrador GC Workstation Class-GC-10 (Shimadzu).

Identificação dos picos

As áreas dos picos foram calculadas por um integrador modelo GC Workstation Class-GC-10 (Shimadzu, Kyoto, Japão). Os ácidos fenólicos foram identificados comparando os tempos de retenção com os dos padrões (quando disponíveis) e baseando-se no padrão interno.

4.2.4 Quantificação de sólidos (peso seco) dos extratos e frações

Para se calcular as concentrações, o conteúdo de sólidos tanto nos extratos quanto nas frações foi determinado por gravimetria.

Alíquotas de 0,5 e 1 mL, em triplicata, das frações e extratos, respectivamente, foram transferidas para vidros de relógio (tarados), pesadas e secas estufa a 105 °C por 1 h. A seguir, os vidros de relógio foram pesados até peso constante e efetuado o cálculo do resíduo seco, a partir dos pesos inicial e final, encontrando-se o percentual seco de extrato.

4.2.5 Atividade antioxidante em sistema modelo β -caroteno/ácido linoléico

Os procedimentos de análise foram realizados de acordo com o método descrito por Miller (1971), adaptado por Moreira e Mancini-Filho (2003). O método original se baseia na oxidação (descoloração) do β -caroteno em uma determinada emulsão, a qual foi observada diretamente em colorímetro.

Para o preparo do meio emulsionado, adicionou-se 0,02 mL de solução β -caroteno (20 mg/mL de clorofórmio), 0,04 mL de ácido linoléico e 530 mg de emulsificador *Tween* 40 e 1 mL de clorofórmio (para completa homogeneização). Posteriormente, o clorofórmio foi totalmente evaporado com nitrogênio gasoso. Por fim, foram acrescidos 100 mL de água destilada previamente saturada com oxigênio num período de 30 minutos, agitando-se vigorosamente. O meio apresentou-se límpido com absorbância entre 0,6 e 0,7 em 470 nm. Alíquotas de 5 mL desta emulsão foram transferidas para tubos espectrofotométricos contendo os extratos (EAq e EAlc) ou as frações (AFL, AFS e AFI) dos pedúnculos estudados, em diferentes concentrações. O BHT foi utilizado como padrão-referência, na concentração de 10 mg/100 mL MeOH. Da mesma forma, à solução emulsificante (5 mL) foi acrescida ao BHT juntamente com cada amostra (1:1), com a finalidade de verificar sinergismo ou não com o suposto antioxidante natural presente nos extratos

ou frações. Todas as determinações foram feitas em triplicata e acompanhadas de um controle sem antioxidantes. Os valores da densidade ótica foram obtidos no período de 120 minutos a intervalos de 15 minutos, enquanto as amostras eram mantidas em banho-maria a 50 °C, em espectrofotômetro (modelo SPECTRONIC® 20, GENESYS™, Rochester, USA). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de oxidação, dados pelo seguinte cálculo: o decaimento da densidade ótica do controle ($Abs_{c0} - Abs_{cf}$) foi considerado como 100 % de oxidação. A partir desta relação, o decréscimo na leitura da absorbância das amostras foi correlacionado com o controle; estabelecendo-se deste modo o percentual de inibição da oxidação das amostras antioxidantes (Equação 1):

Onde:

$$\% \text{ de Oxidação} = (Abs_{\text{amostra}} \times 100) / Abs_{\text{controle}}$$

$$\% \text{ de Inibição da oxidação} = 100 - \% \text{ de Oxidação} \quad (1)$$

Abs amostra: Diferença das absorbâncias de cada amostra ($Abs_{am_i} - Abs_{am_f}$)

Abs controle: Diferença das absorbâncias de cada controle ($Abs_{c0} - Abs_{cf}$)

Fatores cinéticos (F1 e F2) para caracterização da inibição da oxidação

A eficiência da ação antioxidante dos extratos e frações no sistema β -caroteno/ácido linoléico foi também estimada a partir das tangentes (tg) de dois intervalos das curvas cinéticas, para tal calculou-se os fatores cinéticos conforme o método descrito por Yanishlieva e Marinova (1995).

Na parte inicial da curva (período entre 15 e 45 minutos de incubação) é mensurada a eficiência do antioxidante em bloquear a reação em cadeia (F1 – fator de estabilização) por meio de interação com os radicais peróxidos. Seriam os chamados antioxidantes primários. No intervalo final da curva (período entre 75 e 105 minutos), infere-se a possibilidade do antioxidante participar de outras reações durante o processo oxidativo, como por exemplo, decomposição dos hidroperóxidos com oxigênio, produzindo espécies radicalares que aceleram a oxidação no sistema (Figura 6). Estas medições foram usadas para estabelecer uma relação entre as tangentes das curvas cinéticas das amostras e do controle (Equação 2):

Figura 6. Curva de decaimento da densidade ótica em sistema de co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico. A relação entre as tangentes representa os fatores cinéticos F1 e F2, nos quais, (a) e (A) são os catetos opostos, obtidos pela diferença das leituras das absorbâncias da amostra e do branco, respectivamente; (b) e (B) são os catetos adjacentes, obtidos pela diferença entre os tempos da amostra e do branco, respectivamente. Adaptado de Jardini (2005).

$$F1 = \text{tg amostra}_{(15\ 45)} / \text{tg controle}_{(15\ 45)} \quad F2 = \text{tg amostra}_{(75\ 105)} / \text{tg controle}_{(75\ 105)} \quad (1)$$

Finalmente, se a razão entre essas tangentes (F1 ou F2) excederem ao valor acima de 1, indica haver uma ação pró-oxidante do composto por participar de reações tais como:

4.2.6 Atividade antioxidante em modelo lipídico (Rancimat)

O princípio da determinação da condutividade no teste Rancimat se baseia na resistência da medição da solução dos ácidos voláteis produzidos (MÉNDEZ *et al.*, 1996). A capacidade antioxidante dos extratos e frações dos pedúnculos de caju, deste estudo, para manter a vida de prateleira de óleo de cozinha comercial foi determinada pela medição do tempo de indução para autooxidação de óleo de soja comercial sem antioxidante (fornecido pela Cargill Agrícola S.A.) usando um analisador Rancimat® (modelo 743, Metrohm Ltd., Herisau, Suíça) com o software PC 743 Rancimat 1.0. Amostras de 5 g. do óleo contendo EAq e EAlc e/ou frações

de ácidos fenólicos dos diferentes pedúnculos de caju nas concentrações de 100 e 200 ppm foram submetidos à oxidação a 110 °C (fluxo de oxigênio 20 L/h). Todos foram comparados ao BHT nas mesmas concentrações. Os períodos de indução - PI (h) foram registrados automaticamente. Os fatores de proteção (FP) foram calculados de acordo com a fórmula (Equação 3):

$$FP = PI_{(amostra)} / PI_{(controle)} \quad (2)$$

4.2.7 Atividade antioxidante em sistema de varredura de radicais livres (DPPH•)

A atividade antioxidante dos extratos e das frações do pedúnculo clone CCP-76 foi também avaliada pelo ensaio DPPH• segundo Blois (1958) e Brand-Williams (1995), que tem por base a redução do radical [2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•)]. Ao fixar um H•, removido do antioxidante em estudo, observa-se uma diminuição da absorbância, o que permite calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50 % o radical DPPH•. Uma alíquota de 0,5 mL de amostra, contendo diferentes concentrações de extratos ou frações, foi adicionada a 1,5 mL de solução metanólica de DPPH• 6×10^{-5} mol/L. Todas as determinações foram acompanhadas de um controle sem as amostras antioxidantes. A redução do radical DPPH• foi medida a 515 nm em espectrofotômetro (SPECTRONIC® 20 GENESYS™, Rochester, USA) logo após 30 minutos de repouso. O decréscimo nos valores de densidade ótica das amostras foi correlacionado com os do controle e estabelecida a percentagem de descoloração do radical DPPH•, isto é, o seqüestro de radicais livres, expressa pela Equação 4:

$$\% \text{ de proteção} = (Abs_{controle} - Abs_{amostra}) / Abs_{controle} \quad (3)$$

4.2.8 Ensaio biológico I

Os procedimentos descritos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, por estarem de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimental Animal (COBEA) (vide Anexo 1).

Animais

Foi administrado oralmente EAq ou fração AFL, obtidos a partir do pedúnculo de caju clone CCP-76, em ratos. Apenas a fração AFL foi submetida a um tratamento prévio para ser administrada aos animais. O solvente THF foi eliminado em evaporador rotativo sob vácuo a 40 °C e em seguida, a fração foi ressuspensa em água destilada e para uma melhor solubilização foi adicionado propileno glicol (2%).

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e alimentados com ração comercial (Nuvital) e água *ad libitum*, à temperatura de 22 °C $\pm$ 2 °C, em ciclo claro/escuro de 12 h. Durante uma semana, ficaram em período de adaptação. Os ratos foram divididos em quatro grupos tratados e um controle. Cada grupo continha 8 (oito) animais. A administração foi feita por gavagem.

O grupo controle foi tratado com solução fisiológica 0,9%. Para os grupos que receberam EAq foram administradas três doses diferentes de extrato equivalentes a 80, 240 e 480 mg/kg de peso do animal, respectivamente. O grupo tratado com fração AFL se deu em duas doses diferentes, 40 e 120 mg/kg de peso corpóreo.

A ingestão da dieta e o peso dos animais foram monitorados durante todo o ensaio, com a finalidade de verificar o ganho de peso e o coeficiente de eficácia alimentar (CEA). O CEA foi obtido de acordo com a seguinte relação (Equação 5):

$$\text{CEA} = \frac{\text{ganho de peso do animal (g)}}{\text{Consumo de ração (g)}} \quad (4)$$

Decorridos 30 dias para cada animal, os mesmos foram sacrificados e então, retirados os tecidos cerebral e hepático e analisados para atividade das enzimas antioxidantes e substâncias reativas ao TBA. Vale salientar ainda, que à véspera do sacrifício, os animais foram submetidos a jejum de 12 h com acesso à água *ad libitum*.

4.2.8.1 Absorção e retenção aparente dos fenólicos

Durante o período experimental, foram coletadas as fezes para verificar a absorção e retenção aparente dos fenólicos dos diferentes grupos experimentais. A coleta de fezes foi realizada a cada semana e a concentração de fenólicos foi analisada segundo o método espectrofotométrico proposto Swan e Hills (1959),

descrito no item **4.2.3.1**. A absorção aparente foi calculada como porcentagem de fenólicos absorvidos relativa ao total ingerido.

4.2.8.2 Separação do fígado e cérebro

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de hidrato de cloral (500 mg/mL) na dose de 400 mg/kg de peso do animal.

O abdômen foi aberto por uma incisão na linha média e o cérebro e fígado foram perfundidos através da injeção de solução de NaCl 0,9 % no coração. Tanto o tecido cerebral quanto o hepático foram separados para a quantificação da atividade enzimática e da lipoperoxidação.

4.2.8.3 Preparo dos homogeneizados dos tecidos cerebral e hepático

Homogeneizado de cérebro

O cérebro retirado foi pesado e homogeneizado, em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem, com um volume de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 igual a quatro vezes o valor absoluto da massa da amostra. O homogeneizado foi centrifugado a 1.010 x g por 20 minutos à temperatura de 4 °C e o sobrenadante, empregado na avaliação da lipoperoxidação. Foi retirado 1 mL do sobrenadante e novamente centrifugado a 11.000 x g por 15 minutos a 4 °C, empregando-se o novo sobrenadante para a determinação da atividade enzimática da CAT, SOD, GSH-Px e GSH-R.

Homogeneizado de fígado

O fígado perfundido foi retirado do animal, pesado e, em solução salina 0,9 % reduzido a pequenos fragmentos com auxílio da tesoura. Os fragmentos foram então homogeneizados, em homogeneizador (igual ao citado anteriormente), com tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 igual a três vezes o valor absoluto da massa da amostra. O homogeneizado foi centrifugado também a 1.010 x g por 20 minutos à temperatura de 4 °C. Em seguida, foi tomado 1mL do sobrenadante e novamente, centrifugado a 11.200 x g por 20 minutos a 4 °C. O novo sobrenadante obtido foi agora centrifugado em ultracentrífuga a 105.000 x g por 60 minutos a 4 °C, obtendo-se a fração citosólica para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes: CAT, SOD, GSH-Px e GSH-R.

4.2.8.4 Medida da lipoperoxidação pela produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para a determinação da medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi usado o método descrito por Winterbourn, Gutteridge e Halliwell (1985). Foram preparados os homogeneizados descritos no item **4.2.8.3**.

Foi tomado 0,3 mL do homogeneizado do cérebro (diluído 1:10) ou do fígado (dilução 1:2) e o volume, completado para 0,5 mL com tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0. Seguidamente, foram adicionados 0,5 mL de HCl (25 %), 45 µL de BHT etanólico (2 %) e 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (1 % p/v em NaOH 0,05 M), seguido de resfriamento em banho de gelo. Feito isto, foi acrescido 1,5 mL de *n*-butanol, agitou-se e centrifugou-se a 1.500 x g. Após a centrifugação, foi coletada a fase superior e analisada espectrofotometricamente (espectrofotômetro HITACHI, modelo U-3410) a 532 nm. Todas as determinações foram em triplicata e o branco contendo apenas *n*-butanol. Para obtenção dos cálculos foi feita uma curva padrão com TMP (6×10^{-6} mol/L).

Os resultados foram expressos em µMol de equivalentes de TBARS/mg de proteína.

4.2.8.5 Determinação das atividades das enzimas antioxidantes na fração citosólica dos tecidos cerebral e hepático

Foi verificada a atividade enzimática na fração citosólica do fígado e do cérebro conforme a preparação no item **4.2.8.3**.

Determinação da atividade da SOD

A atividade da SOD citoplasmática foi avaliada de acordo com a metodologia de McCord e Fridovich (1969), que verifica a formação do ânion superóxido produzido pela xantina oxidase em presença da xantina. O ânion superóxido reduz o citocromo c e esta redução é medida pelo aumento da densidade ótica a 550 nm numa temperatura a 25 °C.

O volume de xantina oxidase a ser utilizado na reação é determinado em um branco, na ausência da SOD, desta maneira obtendo-se uma variação na absorbância, a 500 nm, entre 0,0250 a 0,0300/minuto.

O meio de reação é composto por citocromo c 100 μM , xantina 500 μM , EDTA 1 mM e KCN 200 μM em tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,8. A 1 mL do meio, em cubeta de vidro, foram adicionados a xantina oxidase (volume encontrado no branco) e 15 μL da fração citosólica de cada tecido. A medição foi feita em duplicata.

Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

Entende-se por uma unidade (U) a atividade da enzima que promove 50 % de inibição da reação da xantina a 25 °C em pH 7,8.

Determinação da atividade da CAT

A catalase propicia a oxidação do peróxido de hidrogênio a H_2O e O_2 . A metodologia empregada foi a descrita por Beutler (1975), quantificando a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima mediante o decréscimo da densidade ótica a 230 nm (coeficiente de extensão molar 0,0071 $\text{nM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) a 37 °C.

O meio de reação é composto por H_2O_2 10 mM (10 μL de peridrol 30 % em 10 mL de H_2O miliQ) e tampão Tris HCl 1M EDTA 5 mM pH 8,0. Para a reação, foram utilizadas duas diluições, ou seja, 15 μL do homogeneizado mais 985 μL do meio e 20 μL também do homogeneizado adicionado a 980 μL do meio. As amostras (frações citosólicas) foram incubadas a 37°C e realizadas leituras das absorbâncias a cada um minuto durante 6 minutos.

Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

Uma unidade (U) da catalase corresponde a atividade da enzima que realiza a hidrólise de 1 μmol de H_2O_2 por minuto a 37 °C em pH 8,0.

Determinação da GSH-Px

A atividade da GSH-Px foi determinada pela metodologia padronizada por Sies (1979).

Este método fundamenta-se na medição do decaimento da densidade ótica, a 340 nm, promovido pela oxidação do NADPH a 30 °C (Coeficiente de extinção molar igual a 6,22 $\text{nM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) durante a redução da glutatona oxidada (GSSG) catalisada pela GSH-R.

O meio de reação contém GSH 1 mM, glutatona redutase 0,1 U/mL, NADPH 20 mM, EDTA 5 mM pH 7,0 e tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0. Inicialmente, tomou-se 1 mL deste meio, acrescentando-se 10 μL de cada amostra (fração

citossólica), em triplicata, incubando esta solução a 30 °C durante um minuto. Após este tempo, foram adicionados à solução 10 µL de peróxido de terc-butila 0,5 mM (apenas em duas cubetas), e novamente, a solução foi incubada e as leituras realizadas a cada minuto num período de 6 minutos.

Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

Uma unidade (U) da enzima define-se como atividade da enzima que oxida 1 µmol de NADPH por minuto a 30 °C em pH 7,0.

Determinação da GSH-R

A GSH-R catalisa a redução da GSSG pela oxidação do NADPH, a medição é feita em espectrofotômetro a 340 nm em 37 °C (coeficiente de extinção molar 6,22 nM⁻¹.cm⁻¹ (SIES, 1979).

O meio de reação é composto tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0, EDTA 5 mM, GSSG 0,1M e NADPH 20 mM. O ensaio foi realizado em duplicata e foram tomados 50 µL da amostra e adicionados a 970 µL de meio, incubados a 30 °C e realizadas leituras a cada minuto durante seis minutos.

Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

Uma unidade (U) de enzima é definida como a atividade da enzima que oxida 1 µmol de NADPH por minuto, em pH 7,0.

4.2.9 Ensaio biológico II

A fim de confirmar a avaliação da capacidade antioxidante do pedúnculo de caju clone CCP-76 foi realizado um novo experimento biológico induzindo hepatopatia aguda nos animais pela administração de CCl₄. Para tal, foram mantidas as concentrações e preparação da fração AFL e para o EAq, contudo, foi administrada uma dose maior do que as usadas anteriormente, mediante os resultados obtidos.

Animais

Os animais foram mantidos em gaiolas e alimentados com ração comercial (Nuvital) *libitum*, à temperatura de 22 °C ± 2 °C, em ciclo claro/escuro de 12 h. Durante uma semana, ficaram em período de adaptação. Os ratos foram divididos em cinco grupos, três tratados e um controle negativo e outro positivo. Cada grupo continha 8 (oito) animais. A administração oral foi realizada por gavagem.

Os grupos I (controle normal) e II (controle de indução por CCl₄) receberam solução fisiológica 0,9 %, o grupo III foi tratado com EAq (dose de 480 mg/kg de peso do animal) e finalmente, os grupos IV e V foram tratados com fração AFL (40 e 120 mg/kg de peso corpóreo, respectivamente) por um período de 30 dias. Após este intervalo de tempo, foram injetados 5mL de CCl₄ (diluição 1:1 com azeite de oliva), sc., nos grupos II, III, IV e V, conforme o protocolo realizado por Sanmugapriya e Venkataraman (2006), com pequenas modificações. Após 48 h da indução, os animais foram sacrificados sob efeito anestésico de hidrato de cloral (400 mg/kg i.p) e então, coletados o plasma e o tecido hepático. Destaca-se ainda, que à véspera do sacrifício, os animais foram submetidos a jejum de 12 h com acesso à água *ad libitum*.

A ingestão da dieta e o peso dos animais foram monitorados durante todo o ensaio, com a finalidade de verificar o ganho de peso e o coeficiente de eficácia alimentar (CEA) de acordo como descrito no item 4.2.8.

4.2.9.1 Avaliação de lesão hepática (ALT/AST)

O sangue foi retirado através da aorta abdominal e coletado em heparina. Posteriormente, o plasma foi obtido por centrifugação (3000 rpm), 4 °C por 5 minutos. A atividade das enzimas, marcadoras de dano hepático, aminotransferase alanina (ALT) e aminotransferase aspartato (AST) foram avaliadas por meio de Kit (Labtest®, Lagoa Santa, Brasil).

4.2.9.2 Avaliação da atividade antioxidante

O fígado foi coletado e perfundido de acordo com os procedimentos mencionados nos itens 4.2.8.2 e 4.2.8.3. O homogeneizado obtido foi usado para a avaliação da atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD, GSH-Px e GSH-R (item 4.2.8.5) e também para a quantificação do nível de lipoperoxidação por TBARS.

Nível de peróxidos lipídicos pela produção de substâncias reativas ao TBA

A determinação da medida das TBARS, deste segundo ensaio, foi realizada de acordo com o método descrito por Ohkawa *et al.* (1979) com algumas modificações.

Foi tomado 0,2 mL do homogeneizado do tecido hepático (1:3 p/v) e, adicionados 0,2 mL de SDS (8,1 %), 1,5 mL de solução de ácido acético (20 %) pH 3,5 (ajustado com NaOH) e 1,5 mL de TBA. O volume da mistura reativa foi ajustado para 4 mL com água deionizada e então, aquecida em banho-maria a 95 °C por 1 h. Após resfriamento em água corrente, 1 mL de água deionizada e 3 mL da mistura de *n*-butanol e piridina (15:1 v/v) foram acrescentados e agitados vigorosamente em vortex. Em seguida, o material foi centrifugado a 2000 x g por 10 minutos, a camada orgânica (superior) foi removida e sua absorbância foi medida a 532 nm em espectrofotômetro. O TMP foi usado como padrão externo, e o nível de peróxidos lipídicos foi expresso como μmol de TBARS/mg de proteína.

4.2.9.3 Estudos histopatológicos

O tecido hepático foi coletado e imediatamente fixado em formalina (10 %). Seções de (5 μm) foram preparadas e então, coradas com hematoxilina-eosina (HE) para observações fotomicroscópicas.

4.2.10 Quantificação de proteínas nos tecidos

A determinação do conteúdo de proteínas presente nos tecidos cerebral e hepático foi realizada segundo o método de Bradford (1985). Foi feita uma curva padrão de proteína com solução padrão de albumina.

4.3 Análise estatística

Empregou-se a análise de variância (ANOVA) e o teste Tukey usando o software Prism 4,0 (GraphPad). Os dados foram expressos como média e desvio-padrão. O valor de *p* menor do que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização química

5.1.1 Composição centesimal

A Tabela 1 apresenta a composição centesimal dos pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09 e BRS-189. O clone CCP-76 apresentou o maior teor protéico (12,61 %) em relação aos demais que variou entre aproximadamente 9 e 10 %. Com relação ao conteúdo de lipídios e resíduo mineral fixo, os percentuais foram muito próximos para todos os clones, representando de 3 a 4 % e 1,3 a 1,8 %, respectivamente.

Tabela 1. Composição centesimal do bagaço de pedúnculo de caju de três tipos de clones, CCP-76, CCP-09 e BRS 189*.

	<i>Pseudofrutos (Clones)</i>		
	CCP-76	CCP-09	BRS-189
Umidade (%)	50,3 ± 0,8 ab	48,7 ± 2,7 a	54,0 ± 0,1 b
Proteína (%)	12,5 ± 0,1 a	9,8 ± 0,1 b	8,9 ± 0,2 c
Lipídios (%)	4,8 ± 0,3 a	3,9 ± 0,1 b	3,0 ± 0,2 c
Resíduo mineral fixo (%)	1,8 ± 0,1 a	1,8 ± 0,1 a	1,3 ± 0,1 b
Carboidratos totais por diferença	39,7	40,7	45,8

† A composição centesimal se refere ao pseudofruto sem o suco. As análises foram realizadas em triplicata. Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

* Média e desvio padrão

O pedúnculo de caju contém um percentual elevado de água. Mesmo após a sua prensagem manual para a retirada do suco, o teor de umidade representou em torno de 50 % das amostras estudadas. Valores igualmente elevados foram obtidos por Souza Filho (1987) que analisou outros clones de pedúnculo de caju, dentre os quais o CCP-76, e encontrou ao redor de 86 % de umidade para o pedúnculo *in natura*.

Lima, García e Lima (2004) determinaram o conteúdo total de fibras do pedúnculo de caju clone CCP-76 correspondendo a 13,25 % de fibra dietética solúvel e 47,96 % insolúvel, totalizando aproximadamente 61 %; constituindo, dessa maneira, uma boa fonte de fibras dietéticas. No resíduo mineral fixo do pedúnculo de caju foram determinados os seguintes minerais: K (37,9%); S (6,3%); P (1,3%); Mg (1,2%); Si (0,2%) e Al (0,076%) por Santos *et al.* (2007).

Sendo assim, o pedúnculo de caju pode ser considerado uma excelente fonte de fibras e de minerais podendo ser consumido *in natura*, usado em produtos de panificação e até para ração animal, etc. Fibras obtidas do pedúnculo de caju foram usadas para o enriquecimento de *cookies*, adicionaram-se aos biscoitos bagaços desidratados do pedúnculo de 5, 10 e 15 %. As formulações com 10 % de bagaço desidratado apresentaram os maiores índices de aceitabilidade com relação ao sabor, 84,9 %, maior do que biscoitos formulados com 5 % de bagaço de goiaba (81,8 %) (MATIAS *et al.*, 2005).

Apesar dos clones de caju pertencerem à mesma família e gênero, com o melhoramento genético podem ocorrer variações na composição centesimal, daí as diferenças na composição dos pedúnculos estudados. Paiva *et al.* (1998) destacam que, na seleção do clone para a produção de pedúnculos com características comerciais, a qualidade do produto é de extrema importância. O melhoramento genético cada vez mais contribui com a preferência que agrada bastante ao consumidor, ou seja, pedúnculos de cor laranja a vermelha e de tamanho grande visualmente são mais apetitosos.

5.1.2 Ácidos graxos

Foi realizada a análise do perfil de ácidos graxos dos pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09 e CCP-76 tratado e da castanha de caju clone CCP-76.

Na castanha de caju, houve a predominância dos ácidos graxos: oléico (56,5 %) e linoléico (22,9 %), seguidos de ácido palmítico (9,2 %) e esteárico (9,0 %). Para o pedúnculo clone CCP-76, os ácidos oléico (56,6 %) e palmítico (17,6 %) apresentaram-se em maior concentração. Foram identificados e quantificados, ainda, os ácidos graxos vacênico, linoléico, α -linolênico, esteárico e eicosenóico, contudo em teores mais baixos, 6,5 %, 5,9 %, 3,8 %, 2,6 % e 1,9 %, respectivamente. Nos dois tipos de amostras foram encontrados traços dos seguintes ácidos graxos: margárico, palmitoléico, mirístico, araquídico, eicosenóico, beênico, erúcico, lignocérico e outros não identificados. O conteúdo de ácidos graxos destas amostras encontra-se na Tabela 2. Como se pode verificar ocorre a predominância de ácidos graxos insaturados tanto na castanha quanto no pedúnculo, os quais são muito sensíveis aos processos oxidativos.

Tabela 2. Perfil lipídico de ácidos graxos da castanha de caju (*Anacardium occidentale*) clone CCP-76 e dos pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09 e CCP-76 tratado.

Ácido graxo	Fórmula	Castanha de caju CCP-76	Distribuição %*		
			Pedúnculos		
			CCP-76	CCP-76 tratado	CCP-09
Mirístico	C14:0	-	0,2 ± 0,01	0,0	0,2 ± 0,03
Palmítico	C16:0	9,2 ± 0,03	17,6 ± 0,11	15,6 ± 0,09	17,1 ± 0,14
Palmitoléico	C16:1(n-7)	0,3 ± 0,00	1,7 ± 0,03	0,9 ± 0,02	1,6 ± 0,02
Margárico	C17:0	0,4 ± 0,42	0,3 ± 0,57	-	-
Heptadecenóico	C17:1(n-7)	0,04 ± 0,0	-	-	-
Esteárico	C18:0	9,0 ± 0,00	2,6 ± 0,01	1,6 ± 0,03	3,2 ± 0,08
Oléico	C18:1(n-9)	56,5 ± 0,03	56,6 ± 0,34	60,3 ± 0,27	58,7 ± 0,34
Vacênico	C18:1(n-7)	0,5 ± 0,18	6,5 ± 0,06	6,1 ± 0,04	6,3 ± 0,03
Linoléico	C18:2 (n-6)	22,9 ± 0,02	5,9 ± 0,06	3,4 ± 0,01	4,2 ± 0,1
α-Linolênico	C18:3 (n-3)	0,1 ± 0,09	3,8 ± 0,02	2,2 ± 0,04	2,9 ± 0,04
Araquídico	C20:0	0,5 ± 0,06	0,6 ± 0,02	0,4 ± 0,02	0,4 ± 0,01
Eicosenóico	C20:1	0,1 ± 0,01	1,9 ± 0,03	0,3 ± 0,01	2,1 ± 0,03
Beênico	C22:0	0,1 ± 0,00	0,5 ± 0,03	0,5 ± 0,05	0,4 ± 0,02
Dosocadienóico	C22:2	0,1 ± 0,01	-	0,4 ± 0,02	0,3 ± 0,04
Erúcico	C22:2	-	0,2 ± 0,01	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,01
Lignocérico	C24:0	-	1,0 ± 0,07	0,6 ± 0,01	0,8 ± 0,05
Nervônico	C24:1(n-9)	0,1 ± 0,02	-	-	0,0
Não identificados		0,1	0,6	1,5	7,4
Total	Saturados	19,2	22,8	18,1	22,1
	Monoinsaturados	57,5	66,7	61,6	68,7
	Poliinsaturados	23,2	5,9	6,3	7,7

* Média e desvio padrão

Um estudo com genótipos de soja encontrou um valor médio para a taxa de ácidos graxos monoinsaturados:poliinsaturados (AGMI:AGPI), um indicador de estabilidade de óleos (ácidos linolênico e linoléico oxidam 10 e 21 , respectivamente, mais rápido do que o ácido oléico), de 0,44, valor menor do que óleo de canola (1,95), amendoim (1,65) e oliva (4,0), indicando que o óleo de soja é menos estável à oxidação. O teor de ácidos graxos foi 11 % de palmítico, 4 % de esteárico, 25 % de

oléico, 53 % de linoléico e 7 % de linolênico (RANI *et al.*, 2007). O valor de AGMI:AGPI para a castanha de caju do clone CCP-76 foi de 0,40.

As castanhas são conhecidas como fonte de nutrientes com um elevado conteúdo de lipídios saudáveis, declaradas pelo U.S. FDA como “saudáveis para o coração”. Shahidi, Alasalvar & Liyana-Pathirana (2007) observaram a eficácia de extratos etanólicos de avelãs contra o processo de oxidação em vários sistemas *in vitro*, além de identificar ácidos fenólicos como gálico, caféico, *p*-cumárico, ferúlico e sinápico, os quais participam do potencial antioxidante destas castanhas.

A composição de ácidos graxos da castanha de caju mostrou que os ácidos oléico e linoléico constituem em torno de 79 % do total (Tabela 2). Estes resultados estão de acordo com os valores reportados por Ryan *et al.* (2007), 57,2 e 20,8 % para os ácidos oléico e linoléico, respectivamente. Além do mais, foram identificados os ácidos palmítico e esteárico com valores similares aos quantificados no nosso trabalho, 9,9 e 8,7 %, respectivamente. Um estudo anterior também demonstrou que a castanha de caju continha conteúdo de ácidos graxos oléico (60,3 %) e linoléico (21,5 %) relativamente elevado e o teor de ácidos graxos saturados totalizava aproximadamente 17 %, entre eles os principais foram palmítico e esteárico (LIMA, GARCÍA e LIMA, 2004).

O perfil de ácidos graxos dos clones CCP-09 e CCP-76 tratado, semelhante ao clone CCP-76, analisado anteriormente, exibiu também elevado conteúdo de ácidos graxos insaturados, como pode ser observado na Tabela 2. Predominando o ácido graxo oléico o qual perfaz praticamente 60 % do conteúdo lipídico nas amostras, seguindo-se o ácido palmítico que contribui com aproximadamente 16,5 %. Não foram encontrados dados na literatura que se reportassem ao perfil de ácidos graxos do pedúnculo de caju. Todavia, vimos que os ácidos oléico, palmítico e linoléico são os predominantes em frutas, tal qual valores encontrados por Moreno *et al.* (2003) no abacate, no qual estes ácidos encontram-se acima de 50, 21 e 13 %, respectivamente. De oito cultivares de maçãs, procedentes da China, foi determinado o perfil de ácidos graxos, os ácidos palmítico, oléico, linoléico e α -linolênico foram dominantes constituindo 70–80% do total (WU *et al.*, 2007).

As fontes primárias de ácidos graxos na dieta humana provêm das plantas. Os AGPI, como o linoléico e o α -linolênico, são nutrientes essenciais tanto na dieta humana assim como animal e seus inúmeros benefícios à saúde já são bem reconhecidos. Também têm sido tradicionalmente considerados como moléculas

bastante suscetíveis a situações de estresse oxidativo, devido à presença das duplas ligações e aos carbonos metilênicos (HUANG e WANG, 2004; HENRY *et al.*, 2002). Dessa forma, as concentrações elevadas de ácidos graxos insaturados encontradas na castanha e em todos os pedúnculos de caju estudados dão indícios de que haja correlação entre a presença de compostos fenólicos com atividade antioxidante que, provavelmente, participam de processos de proteção dos ácidos graxos insaturados desta fruta. Visto que estes ácidos graxos são altamente sensíveis aos processos oxidativos.

Já bastante discutido na literatura, sabe-se que a proporção de AGPI para ácidos graxos saturados de 3:1 traz benefícios à saúde humana, o consumo de dietas com elevadas quantidades de AGPI tem sido associado à redução do risco de doenças cardiovasculares (WEBER; SELIMI; HUBER, 2006). Portanto, o consumo de castanha de caju poderia contribuir positivamente na saúde humana.

Por sua vez os AGMI, particularmente ácido oléico, mediante mecanismos de ações distintas diminuem a intensidade de alguns processos inflamatórios, pelo decréscimo da produção de mediadores quimioestáticos de inflamação, como por exemplo, redução do risco de desenvolvimento de nefropatias (GARCÍA; GARCÍA; HERNÁNDEZ, 2006). Dietas ricas em AGMI também promovem a redução das concentrações plasmáticas de LDL (lipoproteína de baixa densidade) e, o aumento da HDL (lipoproteína de alta densidade) em indivíduos normais, sugerindo que estas dietas têm grande potencial em reduzir o risco de doenças cardiovasculares (LAPOINTE; COUILLARD; LEMIEUX, 2006; LÓPEZ-MIRANDA *et al.*, 2006).

Além disso, AGMI, em especial o ácido oléico, e AGPI de cadeia longa ω -3 possuem propriedades antiinflamatórias sobre a doença inflamatória do intestino devido à modulação da síntese de mediadores inflamatórios, principalmente citoquinas e eicosanóides (GARCÍA; GARCÍA; HERNÁNDEZ, 2006).

Quiles *et al.* (2006) referem que a ingestão de AGMI estaria correlacionada significativamente com um melhor desempenho cognitivo ao longo dos anos de vida. Esta afirmação confirma estudos recentes demonstrando igualmente que o consumo elevado de AGMI possibilita à proteção contra a doença de Alzheimer (MORRIS *et al.*, 2003).

Os ácidos graxos têm sido o destaque de diversos estudos metabólicos, pois a eles estão direcionadas diversas propriedades, todavia, muitas questões ainda devem ser elucidadas visando melhor caracterização destas substâncias.

5.1.3 Fenólicos totais

O teor de fenólicos totais determinado nos pedúnculos liofilizados de caju (*Anacardium occidentale*) clones CCP-76, CCP-09, BRS-189 e CCP-76 tratado, e nos seus respectivos extratos EAq e EAlc está representado na Tabela 3.

Os fenólicos totais contidos nos clones liofilizados variaram entre aproximadamente 10 e 19 mg/g em equivalentes de ácido gálico, evidenciando a presença de quantidades bastante significativas nos diferentes pedúnculos. O pedúnculo liofilizado CCP-76 apresentou uma média do conteúdo de fenólicos totais de $16,6 \text{ mg} \pm 0,2$ em equivalentes de ácido gálico/g, enquanto que para a amostra do pedúnculo liofilizado CCP-76 submetido ao tratamento, o teor de fenólicos foi $10,1 \text{ mg} \pm 0,4$ em equivalentes de ácido gálico/g, diferenciando-se significativamente ($P < 0,05$) quando comparados entre si. Representando, desta forma, uma redução de 40 % do total de compostos fenólicos, estando este resultado de acordo com a proposta experimental da EMBRAPA e possivelmente, relacionado com a redução de taninos.

Tabela 3. Conteúdo total de compostos fenólicos (mg de fenólicos/g de amostra) nos extratos polares presentes em pseudofrutos de caju (*Anacardium occidentale*) clones CCP-76, CCP-09, BRS-189 e CCP-76 tratado.

Pseudofrutos de caju Clones	mg de fenólicos/ g de pedúnculo de caju liofilizado*		
	Extrato metanólico (80%)	EAq	EAlc
CCP-76	$16,6 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,02$	$2,4 \pm 0,02$
CCP-09	$14,6 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,03$	$2,5 \pm 0,08$
BRS-189	$19,2 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,04$	$2,1 \pm 0,02$
CCP-76 tratado	$10,1 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,05$	$1,7 \pm 0,02$

† Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico/g de amostra.

* Média e desvio padrão.

Os menores teores de fenólicos foram obtidos nos extratos etéreos de todos os pedúnculos (entre 0,5 e 1 mg de equivalente em ácido gálico/g de amostra liofilizada).

Os pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09, BRS-189 e CCP-76 tratado apresentaram conteúdo de compostos fenólicos elevados. Da mesma forma, Gorinstein *et al.* (1999) encontraram um alto teor de polifenóis totais em frutas tropicais, tais como manga, goiaba e lichia. Estudos revisados por Scalbert *et al.* (2005) demonstraram que os compostos fenólicos constituem os antioxidantes mais

abundantes na dieta e estão amplamente distribuídos em frutas, outros vegetais, cereais, legumes *in natura*, chocolate e bebidas, tais como chá, café ou vinho.

A determinação do conteúdo total de fenólicos (equivalente de ácido gálico em mg/g de peso seco) em frutas apresentou os seguintes teores: maçã *golden delicious* – 14,9; groselha vermelha – 18,1; casca de laranja – 22,8 e toranja vermelha – 15,1 (STRATIL, KLEJDUS E KUBÁŇ, 2007). Já, a quantidade de fenólicos totais em frutas cítricas cultivadas em Taiwan variou de $37,3 \pm 1,53$ a $75,9 \pm 3,87$ mg de equivalentes de ácido gálico/g em base seca. O teor mais elevado foi determinado no limão (WANG; CHUANG; KU, 2007).

5.1.4 Ácidos fenólicos

Foram identificados os principais ácidos fenólicos presentes nas frações AFL, AFS e AFI dos pedúnculos estudados por CG.

A Figura 7 B mostra um cromatograma típico de CG dos ácidos fenólicos presentes na fração AFL do clone CCP-76: salicílico, protocatecuíco, *p*-cumárico, gálico, ferúlico e caféico.

Os ácidos predominantes nesta fração são salicílico, protocatecuíco e gálico (466, 302 e 110 mg/100g de amostra, respectivamente). Os demais se apresentam como traços, demonstrados na Tabela 4. Gorinstein *et al.* (1999) também determinou ácido gálico em frutas tropicais (143 mg/100g para abacaxi e 154 mg/100g para maçã) com valores muito próximos ao que encontramos no pedúnculo clone CCP 76.

Analisando um cromatograma característico para a fração AFS do pedúnculo de caju clone CCP-76 (Figura 7 C) em comparação com o perfil cromatográfico obtido para os ácidos cinâmicos e fenólicos (Figura 7 A), usado como referência, foi possível identificar a presença dos ácidos salicílico, cinâmico, gentísico, protocatecuíco, quínico, gálico, ferúlico e caféico. Os ácidos salicílico e gálico predominaram nesta fração, com valores de 823 e 77 mg/100g de amostra, respectivamente. A fração AFI apresentou ácido salicílico (436 mg/100g de amostra) bem como traços de pirogálico, ferúlico e caféico (Tabela 4).

Por fim, as frações de ácidos fenólicos dos outros clones do pedúnculo de caju (CCP-09, BRS-189 e CCP-76 tratado) apresentaram em sua composição diferentes concentrações dos ácidos salicílico, gálico, protocatecuíco e traços de ferúlico e caféico, como pode ser visto na Tabela 4.

Figura 7. (A) Cromatograma de padrões de ácidos fenólicos, padrão interno (C17) e BSA: a) benzóico, b) BSA, c) salicílico, d) cinâmico e) *t*-cinâmico, f) vanílico, g) gentísico, h) *o*-cumárico, i) protocatecuíco, j) quínico, l) *p*-cumárico, m) gálico, n) C-17 (heptadecanoato), o) pirogálico, p) ferúlico, q) caféico, r) sinápico, s) clorogênico e t) elágico. **(B)** e **(C)**. Cromatogramas característicos de fração de ácidos fenólicos livres e de esterificadas solúveis do pedúnculo do caju clone CCP-76. As letras iguais correspondem aos ácidos fenólicos que foram identificados a partir dos padrões de acordo com o tempo de retenção.

Tabela 4. Teor de ácidos fenólicos livres e de esterificados solúveis e insolúveis individuais presentes em pedúnculos liofilizados de caju (*Anacardium occidentale*) clones CCP-76, CCP-09, BRS-189 e CCP-76 tratado*.

<i>Pedúnculos</i> <i>Ácidos Fenólicos</i>	<i>CCP-76</i>			<i>CCP-76 tratado</i>			<i>CCP-09</i>			<i>BRS-189</i>		
	<i>AFL</i>	<i>AFS</i>	<i>AFI</i>	<i>AFL</i>	<i>AFS</i>	<i>AFI</i>	<i>AFL</i>	<i>AFS</i>	<i>AFI</i>	<i>AFL</i>	<i>AFS</i>	<i>AFI</i>
Salicílico	466	823	436	1270	984	610	67	113	384	64	392	559
Cinâmico	-	0,03	-	-	0,1	-	-	-	-	-	0,03	-
Gentísico	-	0,1	-	-	0,1	-	-	-	-	-	0,04	-
Protocatecuico	0,2	0,04	-	-	0,2	-	6,5	0,05	-	-	0,1	-
Quínico	-	0,05	-	-	0,03	-	-	-	-	11	0,04	-
p-cumárico	302	-	-	20	0,1	0,01	0,01	-	-	0,01	0,1	-
Gálico	110	77	-	0,04	36	0,1	8,5	21	-	12	145	-
Ferúlico	0,05	0,1	0,4	0,02	0,05	0,03	0,03	0,2	0,1	0,02	0,2	0,1
Caféico	0,05	0,1	0,1	0,1	0,04	0,04	0,02	0,1	0,1	0,02	0,1	0,1

* Resultados expressos em mg/100g de amostra liofilizada.

5.2 Atividade antioxidante *in vitro*

A lipoperoxidação não é apenas uma das principais razões de deterioração dos produtos alimentícios durante o processamento e armazenamento, mas também, encontra-se associada ao envelhecimento, injúria das membranas, doenças cardiovasculares, câncer, entre outras enfermidades. Os antioxidantes além de reduzir o risco destas enfermidades por meio de sua ingestão, também aumentam o tempo de prateleira de muitos alimentos, retardando os processos oxidativos (ANSORENA e ASTIASARAN, 2004, HUANG e WANG, 2004, UKASZEWICZ; SZOPA; KRASOWSKA, 2004).

Nos últimos anos, muito tem se discutido acerca do uso de antioxidantes sintéticos nos alimentos em decorrência de sua genotoxicidade e pela possibilidade da promoção de células tumorais em ratos (UMEMURA *et al.*, 2002). Logo, contribuindo para rejeição de aditivos sintéticos por parte dos consumidores, em particular, indústrias alimentícias. Esta discussão acirrada a despeito dos possíveis efeitos deletérios dos antioxidantes sintéticos, e ainda o interesse crescente da população por aditivos naturalmente presentes nos alimentos têm contribuído, sem se medir esforços, para o desenvolvimento de antioxidantes alternativos de origem natural (HUANG e WANG, 2004).

5.2.1 Atividade antioxidante em sistema β -caroteno/ácido linoléico

5.2.1.1 Extratos aquoso, alcoólico e etéreo dos pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09, BRS-189 e CCP-76 tratado

A inibição da oxidação dos extratos hidrofílicos e alcoólicos dos três diferentes clones de pedúnculo de caju, bem como o BHT foi medida pela descoloração do β -caroteno e os percentuais de inibição estão ilustrados nas Figuras 9 e 10.

O mecanismo de clareamento do β -caroteno é um fenômeno mediado por radical livre resultante do hidroperóxido produzido pelo ácido linoléico. O β -caroteno neste sistema sofre rapidamente descoloração na ausência de antioxidante. Visto que o radical livre do ácido linoléico abstrai o hidrogênio da molécula insaturada do β -caroteno, oxidando-a e provocando a quebra das ligações duplas. Desta maneira, o composto perde a sua cor laranja característica; podendo, assim, ser monitorada espectrofotometricamente (JAYAPRAKASHA; SINGH; SAKARIAH, 2001). Por fim, apresentando decréscimo nos valores da densidade ótica versus tempo, redução esta indicada pela taxa de peroxidação. A presença de antioxidante pode retardar o clareamento do β -caroteno por meio da neutralização do radical livre linoleato e outros radicais livres produzidos neste modelo. Por conseguinte, os valores da absorbância decrescem lentamente com o tempo, perfazendo o potencial antioxidante.

Para a inibição do percentual de oxidação pelo EAq e EAlc de cada clone, ilustrada nas Figuras 8 e 9, pôde-se observar que os extratos apresentaram atividade antioxidante. A variação na concentração de cada um se deu em função das avaliações terem sido realizadas a partir de 100, 200 e 400 μ L e posteriormente, foram determinados os valores em massa correspondente a cada uma das diluições. Os percentuais de inibição da oxidação variaram de aproximadamente 25 a 60%.

Os extratos etéreos de todos os pedúnculos não apresentaram atividade antioxidante. Foram testados nas concentrações desde 2,5 mg até aproximadamente 10 mg (de extrato seco), neste sistema, e não houve praticamente inibição da oxidação. Com o aumento destas quantidades, as amostras tornaram o substrato β -caroteno/ácido linoléico turvo, desta forma, impossibilitando a realização das leituras pelo espectrofotômetro. Não sendo, portanto, analisados nesse modelo.

Figura 8. Atividade antioxidante dos extratos EAc dos pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09, BRS-189 e CCP-76 tratado em sistema β -caroteno/ácido linoléico. Extratos expressos em mg de amostra liofilizada.

Figura 9. Atividade antioxidante dos extratos EAlc dos pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09 e BRS-189 e CCP-76 tratado em sistema β -caroteno/ácido linoléico. Extratos expressos em mg de amostra liofilizada.

Destacamos a importância de se trabalhar com este sistema de avaliação da atividade antioxidante, o qual foi utilizado por Velioglu *et al.* (1998) no estudo de diversas frutas. Estes autores também avaliaram o conteúdo de compostos correlacionando-o com o percentual de inibição da oxidação medido pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico. Da mesma forma, o trabalho realizado por Jayaprakasha *et al.* (2001), no qual foi estabelecida a capacidade antioxidante de diferentes extratos de semente de uvas com propriedades antioxidantes.

Os extratos de diferentes polaridades obtidos a partir dos pedúnculos de caju demonstraram percentuais de atividades antioxidantes abaixo do BHT, contudo deve-se ressaltar que o BHT é um composto isolado, sintético e um antioxidante que oferece um bom potencial mesmo em concentrações reduzidas. Além de que, o pedúnculo de caju clone CCP-76, submetido a um tratamento especial, por exaustiva maceração e lavagem conforme protocolo da EMBRAPA, apesar de ter sido tratado, manteve a atividade antioxidante em patamares de detecção analítica. Sendo assim, a capacidade antioxidante de compostos fenólicos depende de vários fatores que vão desde o sistema de oxidação, grau de glicolisação à concentração e aos parâmetros mensurados (HASSIMOTO; GENOVESE; LAJOLO, 2005). Neste trabalho, os autores avaliaram a atividade antioxidante de diferentes frutas e puderam verificar que não houve nenhuma correlação entre os compostos fenólicos, vitamina C e a atividade antioxidante, sugerindo que o potencial antioxidante é o resultado da combinação de diferentes compostos existentes nas frutas e outros vegetais.

Shahidi, Alasalvar e Liyana-Pathirana (2007) observaram a eficácia de extratos etanólicos de avelãs e seus subprodutos contra o processo de oxidação em vários sistemas *in vitro*, incluindo o sistema β -caroteno/ácido linoléico. A partir de uma curva cinética da atividade antioxidante dos extratos comparando-os com a catequina (composto referência), foi observado que o padrão exibiu maior estabilidade no sistema, ou seja, uma maior proteção, também por ser um composto isolado com um potencial antioxidante já bem definido.

Visando a um melhor entendimento do mecanismo de ação antioxidante dos extratos nesse sistema de oxidação, foram construídas curvas cinéticas da inibição de oxidação dos mesmos. Como se pode verificar nas Figuras 10 e 11, nas concentrações iniciais, a atividade antioxidante dos extratos tanto EAq bem como EAlc de todos os pedúnculos, após 15 minutos, apresentaram um decaimento das

densidades óticas um pouco mais acentuado do que o BHT, porém, à medida que se ia duplicando estas quantidades, os extratos mantinham-se estáveis até ao final do período dos 120 minutos.

Sendo assim, os pedúnculos de caju além de possuírem elevados conteúdos de compostos fenólicos totais, estes ainda demonstram ação antioxidante em sistema de co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico. Também utilizando este mesmo sistema de oxidação com extratos de sementes de uva, a partir de solventes e mistura de solventes em várias concentrações (acetato de etila e água; metanol e acetona), Jayaprakasha *et al.* (2001) verificaram que os diferentes extratos demonstraram 65-90 % de atividade antioxidante, atribuindo os diferentes percentuais de inibição da oxidação à composição distinta de compostos fenólicos nos extratos.

Da mesma forma, Hassimotto, Genovese e Lajolo (2005) verificaram a atividade antioxidante numa série de frutas e outros vegetais, incluindo polpa congelada de pedúnculo de caju, em sistema β -caroteno. Eles utilizaram o extrato metanólico da polpa, nas concentrações de 10 e 50 μ M de equivalente de ácido gálico, e os percentuais de inibição da oxidação foram de aproximadamente 43 e 59 %, semelhantes aos obtidos neste trabalho nos diferentes clones de pedúnculos de caju.

Complementando a avaliação da ação antioxidante *in vitro* dos extratos, ainda foi verificada a sua eficiência, estimada a partir das tangentes de duas partes das curvas cinéticas, calculando-se os fatores cinéticos conforme o método descrito por Yanishlieva e Marinova (1995), item **4.2.5**.

Foram calculados os fatores cinéticos por meio das curvas cinéticas (Figuras 10 e 11) atribuídas à atividade antioxidante dos extratos EAq e EAlc dos diferentes pedúnculos. A Tabela 5 exhibe os valores de F1 e F2, já calculados.

Figura 10. Decaimento da atividade antioxidante dos extratos aquosos de pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09 e BRS-189, em sistema β -caroteno/ácido linoléico, no período de 2 h. Extratos expressos em mg de amostra liofilizada.

Figura 11. Decaimento da atividade antioxidante dos extratos alcoólicos de pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09 e BRS-189, em sistema β -caroteno/ácido linoléico, no período de 2 h. Extratos expressos em mg de amostra liofilizada.

Tabela 5. Parâmetros cinéticos caracterizando a inibição da oxidação pelos extratos aquosos (EAq) e alcoólicos (EAlc) dos pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09 e BRS-189 em sistema β -caroteno/ácido linoléico.

Amostras	Fatores cinéticos		Amostras	Fatores cinéticos	
	F1	F2		F1	F2
BHT	0,1	0,3	BHT	0,1	0,7
EAq CCP-76	0,7	1,0	EAlc CCP-76	0,3	1,8
2,3 mg			2,4 mg		
4,5 mg	0,5	0,9	4,9 mg	0,3	1,5
9,0 mg	0,3	0,6	9,7 mg	0,3	1,6
EAq CCP-09	0,7	0,8	EAlc CCP-09	0,7	0,8
3,4 mg			3,0 mg		
6,8 mg	0,5	0,8	6,0 mg	0,5	0,8
13,5 mg	0,5	0,8	13,2 mg	0,5	0,8
EAq BRS-189	0,4	1,3	EAlc BRS-189	0,4	1,3
3,8 mg			1,2 mg		
7,6 mg	0,4	1,2	2,5 mg	0,4	1,2
15,3 mg	0,3	0,9	5,0 mg	0,3	0,9

$F_1 < 1$ indica que os antioxidantes são capazes de inibir os radicais livres durante o período de indução;

$F_2 < 1$ indica que os antioxidantes podem regenerar o radical antioxidante formado;

F_1 e $F_2 \geq 1$ indicam atividade pró-oxidante.

Verifica-se que, em todos os extratos nas diversas concentrações estudadas, os fatores cinéticos F1 foram inferiores a 1 e próximos ao obtido pelo BHT. Em contrapartida, o EAq (na menor concentração) e EAlc do clone CCP-76 bem como EAq (3,8 e 7,6 mg) e EAlc, (1,2 e 2,5 mg) do clone BRS-189 apresentaram valores de $F_1 < 1$ e $F_2 > 1$ (Tabela 5), dando indícios de que sejam apenas antioxidantes primários e que ainda, a concentração de cada extrato possa influenciar diretamente na sua propriedade antioxidante.

De acordo com os resultados (Tabela 5), a atuação dos compostos fenólicos como antioxidantes foi mais eficiente no bloqueio da formação de peróxidos (F1), lembrando que, quanto mais próximos os valores de F1 e F2 estiverem de 1, menor é a atividade antioxidante (DUARTE-ALMEIDA, 2006).

Esta metodologia também foi utilizada por Nascimento *et al.* (2005). Trabalhando com a erva *Turnera ulmifolia*, puderam estabelecer os valores de F1 e F2 para diferentes concentrações de extratos hidroalcoólicos. Os resultados foram comparados com o α -tocoferol também nas mesmas concentrações, esses autores

constataram pelos valores de F1 e F2 que os extratos tais qual o α -tocoferol apresentaram a mesma capacidade antioxidante. Jardini e Mancini-Filho (2007) também demonstraram pelos valores de F1 e F2 que os extratos EAq e EAlc do fruto e da semente da romã foram eficientes na proteção à oxidação tanto quanto o antioxidante sintético BHT.

5.2.1.2 Frações de ácidos fenólicos livres e de esterificados solúveis e insolúveis dos pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09, BRS-189 e CCP-76 tratado

As frações de ácidos fenólicos AFL e de esterificados (AFS e AFI) dos pedúnculos de caju em questão, obtidas conforme o item 5.2.2.2, foram testadas a fim de verificar o percentual de atividade antioxidante.

Inicialmente, determinou-se a atividade antioxidante com 50, 100 e 200 ppm das três frações de ácidos fenólicos do pedúnculo de caju clone CCP-76 e foi observado que nestas concentrações a porcentagem de inibição da oxidação era bastante elevada e provavelmente, a partir da concentração de 100 ppm, a atividade antioxidante parecia encontrar-se saturada no sistema. Partiu-se, então, para a determinação da atividade de proteção utilizando-se concentrações mais baixas, tais como 10, 20 e 40 ppm. Na Tabela 6, encontram-se os valores referentes à atividade antioxidante de todas as frações. De acordo com os resultados obtidos, resolvemos trabalhar com as concentrações de 10, 20 e 50 ppm.

Tabela 6. Atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos livre e de esterificadas solúvel e insolúvel do pedúnculo liofilizado de caju clone CCP-76 em sistema modelo β -caroteno/ácido linoléico.

Frações	% de inibição da oxidação do pedúnculo liofilizado de caju					
	Concentração em ppm					
	10	20	40	50	100	200
AFL	83,6	87,6	89,4	91,9	100,0	93,5
AFS	84,5	92,7	94,2	92,3	94,8	100,0
AFI	69,7	83,1	83,4	100,0	91,6	100,0

† Frações de ácidos fenólicos livres (AFL) e de esterificados solúveis (AFS) e insolúveis (AFI) do pedúnculo de caju clone CCP-76.

Foram realizadas novas determinações da atividade antioxidante das frações AFL, AFS e AFI do pedúnculo de caju CCP-76, bem como dos clones CCP-09, BRS-189 e CCP-76 tratado, nas concentrações de 10, 20 e 50 ppm, comparando-as com o antioxidante sintético BHT. Pode-se constatar que tanto as frações AFL assim como as AFS exerceram uma elevada atividade (praticamente igual ou maior do que 70%) com valores superiores ao BHT ($p < 0,05$), o que caracteriza um expressivo potencial antioxidante dos ácidos fenólicos isolados nestas frações (Tabela 7).

Tabela 7. Atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos presentes nos pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09, BRS-189 e CCP-76 tratado* em sistema modelo β -caroteno/ácido linoléico.

	% inibição da oxidação								
	AFL			AFS			AFI		
	10 ppm	20 ppm	50 ppm	10 ppm	20 ppm	50 ppm	10 ppm	20 ppm	50 ppm
CCP-76	84 $\pm$ 2,0	90 $\pm$ 0,1	91 $\pm$ 0,1	92 $\pm$ 0,7	95 $\pm$ 1,7	98 $\pm$ 0,6	70 $\pm$ 0,3	84 $\pm$ 9,8	76 $\pm$ 0,6
CCP-09	77 $\pm$ 1,7	87 $\pm$ 0,4	92 $\pm$ 0,5	87 $\pm$ 5,8	95 $\pm$ 0,8	99 $\pm$ 0,3	66 $\pm$ 1,3	74 $\pm$ 2,2	83 $\pm$ 1,1
BRS-189	78 $\pm$ 2,3	85 $\pm$ 0,2	88 $\pm$ 0,1	89 $\pm$ 5,0	95 $\pm$ 0,3	96 $\pm$ 0,3	62 $\pm$ 9,9	70 $\pm$ 0,8	80 $\pm$ 1,3
CCP-76 tratado	70 $\pm$ 0,3	75 $\pm$ 0,6	80 $\pm$ 0,7	73 $\pm$ 2,0	85 $\pm$ 2,3	90 $\pm$ 1,1	41 $\pm$ 0,6	55 $\pm$ 1,3	65 $\pm$ 0,2
BHT	25 $\pm$ 7,5	52 $\pm$ 3,1	69 $\pm$ 6,8						

* Média e desvio padrão.

† Frações de ácidos fenólicos livres (AFL) e de esterificadas solúveis (AFS) e insolúveis (AFI).

A elevada atividade antioxidante *in vitro* encontrada nas frações de ácidos fenólicos, presentes nos pedúnculos de caju dos diferentes clones, indica a expressiva capacidade antioxidante das substâncias responsáveis por esta atividade, as quais foram identificadas por CG, representadas pelos gálico, *p*-cumárico, protocatecuíco, caféico, ferúlico e ácidos salicílico.

Os derivados de ácidos cinâmicos, dentre eles, ácido caféico e protocatecuíco, e derivados de ácidos benzóicos, ácido gálico, demonstraram um excelente potencial antioxidante em ensaios utilizando íons de Cu^{2+} para a catálise da LDL oxidada (MORTON *et al.*, 2000). Novoa *et al.* (2001) verificaram, *in vitro*, elevada atividade antioxidante em algas marinhas vermelhas (*Bryothamnion triquetrum*), associaram a inibição da oxidação aos ácidos ferúlico, cumárico e trans-cinâmico. Ainda, em estudo realizado por Schroeter *et al.* (2000), foi observado que os ácidos ferúlico e *p*-cumárico apresentaram atividade antioxidante maior do que o

ácido ascórbico. De acordo com a Tabela 4, os clones do pedúnculo de caju estudados também apresentaram estes ácidos fenólicos.

Somando-se a isto, que já se encontra bem documentada a propriedade do ácido ferúlico como seqüestrante de radicais livres, até mesmo em concentrações muito reduzidas (HSIEH; YEN; CHEN, 2005, MEYER *et al.*, 1998, WANASUNDARA *et al.*, 1994, CUVELIER e BERSET, 1992). O que dá subsídio para se supor que a elevada atividade antioxidante em todas as frações de ácidos fenólicos dos distintos pedúnculos estaria também correlacionada com a presença do ácido ferúlico em todas as frações de ácidos fenólicos, presente como traço (de 0,02 a 0,4 mg/ 100g de amostra seca).

No nosso estudo, o ácido gálico foi identificado e quantificado em todas as frações AFL e AFS dos pedúnculos, sendo o segundo ácido predominante. O ácido gálico também possui um potencial antioxidante bem caracterizado. Num estudo realizado em ratos com senescência acelerada e suplementados com ácido gálico, verificou-se que, além de elevar a atividade das enzimas antioxidantes CAT e GSH-Px, houve redução do nível aumentado de peroxidação lipídica, levando à diminuição significativa da quantidade de TBARs no fígado, cérebro e rim (LI *et al.*, 2005).

Yeh e Yen (2003) verificaram que a atividade antioxidante de ácidos hidrobenzóicos se deu na seguinte ordem de maior efetividade de quelação para o radical ABTS⁺: ácido gálico > *p*-hidrobenzóico > vanílico > siríngico > protocatecuico > gentísico. Os resultados também apontaram para a capacidade antioxidante dos ácidos hidroxinâmicos na ordem de: ácido ferúlico > *p*-cumárico > sinápico > caféico > clorogênico.

Já, o ácido salicílico é encontrado abundantemente em plantas, e várias evidências sustentam o envolvimento deste no mecanismo de defesa da planta contra o estresse oxidativo (RAO *et al.*, 1997). Moreira e Mancini-Filho (2004) identificaram numa infusão, a partir de uma mistura de especiarias (mostarda, canela e erva-doce) os ácidos fenólicos salicílico e caféico. Este chá à base de ervas apresentou um percentual de inibição da oxidação significativo em torno de 90 %.

Devemos destacar que a elevada atividade antioxidante nas frações não se deve apenas a um ácido fenólico, mas possivelmente a associação deles, a qual conduz a uma potencialização desta atividade. As Figuras 12, 13, 14 e 15 demonstram a capacidade antioxidante das frações dos pedúnculos de caju, pelas curvas cinéticas no decorrer de 120 minutos, comprovando a estabilidade das

frações dos ácidos fenólicos no sistema. A partir destas curvas, foi avaliada a eficiência antioxidante das frações expressa pelos fatores cinéticos que foram calculados (Tabela 8).

Figura 12. Decaimento da atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos livre (AFL) e esterificadas solúvel (AFS) e insolúvel (AFI) do pedúnculo de caju clone CCP-76, em sistema β -caroteno/ácido linoléico, no período de 2 h.

Figura 13. Decaimento da atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos livre (AFL) e esterificadas solúvel (AFS) e insolúvel (AFI) do pedúnculo de caju clone CCP-09, em sistema β -caroteno/ácido linoléico, no período de 2 h.

Figura 14. Decaimento da atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos livre (AFL) e esterificadas solúvel (AFS) e insolúvel (AFI) do pedúnculo de caju clone BRS-189, em sistema β -caroteno/ácido linoléico, no período de 2 h.

Figura 15. Decaimento da atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos livre (AFL) e esterificadas solúvel (AFS) e insolúvel (AFI) do pedúnculo de caju clone CCP-76 tratado, em sistema β -caroteno/ácido linoléico, no período de 2 h.

Tabela 8. Parâmetros cinéticos caracterizando a inibição da oxidação pelas frações de ácidos fenólicos dos pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09 e BRS-189 em sistema β -caroteno/ácido linoléico.

	Fatores cinéticos								
	AFL (ppm)*			AFS (ppm)			AFI (ppm)		
	10	20	50	10	20	50	10	20	50
CCP-76									
F1	0,1	0,03	0,2	0,04	0,01	0,01	0,03	0,04	0,14
F2	0,7	0,3	0,8	0,5	0,3	0,1	5,6	2,0	1,4
CCP-09									
F1	0,1	0,1	0,01	0,02	0,02	0,01	0,2	0,3	0,09
F2	0,9	0,6	0,3	0,9	0,5	0,2	2,0	1,5	0,9
BRS-189									
F1	0,1	0,1	0,06	0,03	0,01	0,01	0,5	0,2	0,1
F2	0,8	0,5	0,4	1,0	0,4	0,4	3,2	1,3	0,9
CCP-76 tratado									
F1	0,5	0,2	0,1	0,2	0,1	0,05	0,2	0,1	0,07
F2	2,2	1,1	0,6	1,2	0,9	0,7	1,1	0,9	0,3
BHT									
	0,5	0,3	0,2						
	3,1	2,1	3,1						

* Frações de ácidos fenólicos livres (AFL) e esterificadas solúveis (AFS) e insolúveis (AFI).

$F_1 < 1$ indica que os antioxidantes são capazes de inibir os radicais livres durante o período de indução;

$F_2 < 1$ indica que os antioxidantes podem regenerar o radical antioxidante formado;

F_1 e $F_1 \geq 1$ indicam atividade pró-oxidante.

Todas as frações resultaram em valores de F_1 inferiores a 1, próximos ou abaixo dos obtidos pelo antioxidante sintético BHT.

Os valores de F_1 determinados para os extratos e frações, de todas as concentrações analisadas, evidenciaram prontamente a sua capacidade de bloqueio da formação inicial dos radicais livres *in vitro*. Nesta fase inicial do processo de oxidação, os extratos e as frações, em todas as concentrações analisadas, foram mais efetivos do que o BHT, apresentando valores de F_1 mais baixos do que o antioxidante sintético. Estes resultados são importantes, pois demonstram o bloqueio do processo oxidativo na sua fase inicial; impedindo, desta maneira, a propagação da oxidação e a formação de compostos como aldeídos e cetonas. Portanto, esta observação, juntamente com outras avaliações, pode propiciar a utilização dos

compostos fenólicos dos pedúnculos do caju na conservação de alimentos em substituição aos antioxidantes sintéticos.

5.2.2 Fator de proteção medido pela condutividade em Rancimat

5.2.2.1 Extratos aquoso e alcoólico dos pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09, BRS-189 e CCP-76 tratado

O óleo de soja sem antioxidante (controle) é oxidado após 6,9 h. Contudo, o tempo necessário para induzir à oxidação do óleo foi maior quando os extratos e o aditivo (BHT) foram adicionados. A capacidade antioxidante (expressa como valores de FP ou índice antioxidante) está ilustrada na Tabela 10 e 11.

Os valores de FP dos extratos EAq e EAlc variaram de 1,05 a 1,19 (vide Tabela 9). Os extratos EAq dos clones CCP-09 (200 ppm), BRS-189 (200 ppm) e CCP-76 tratado (100 ppm) apresentaram valores de FP superiores (1,19 e 1,15, respectivamente) ao BHT (1,0) ($p < 0,05$). Contudo, os demais extratos não diferiram estatisticamente do antioxidante sintético ($p > 0,05$).

Tabela 9. Fator de proteção obtido para óleo de soja refinado sem antioxidante a partir de extratos aquoso e alcoólico de três diferentes clones de pseudofruto de caju comparado a um aditivo sintético (BHT) por meio do teste de Rancimat a 110 °C.

Pseudofrutos de caju (Clones)	Fator de proteção (FP)			
	EAq*		EAlc	
	100 ppm	200 ppm	100 ppm	200 ppm
CCP-76	1,05 ± 0,02a	1,09 ± 0,03a	1,10 ± 0,02a	1,09 ± 0,01 ^a
CCP-09	1,10 ± 0,01a	1,14 ± 0,03b	1,06 ± 0,02a	1,09 ± 0,003 ^a
BRS-189	1,11 ± 0,004a	1,19 ± 0,004b	1,10 ± 0,004a	1,10 ± 0,006 ^a
CCP-76 tratado	1,15 ± 0,02b	1,13 ± 0,02a	1,10 ± 0,002a	1,09 ± 0,01a
BHT (200 ppm)	1,08 ± 0,001a	-	-	-

* Extrato aquoso (EAq) e alcoólico (EAlc), resultados expressos em média e desvio-padrão, em triplicata. As comparações foram realizadas em relação ao antioxidante sintético BHT, $p < 0,05$ difere estatisticamente deste aditivo.

Os resultados obtidos demonstram a capacidade antioxidante dos extratos (EAq e EAlc) dos três diferentes clones de pedúnculos de caju além do tratado quando comparados ao BHT, notando-se, principalmente na maior concentração (200 ppm), um fator de proteção igual ou maior do que o antioxidante sintético.

Frutas tropicais, tais como manga, mamão, abacate, maracujá, abacaxi, carambola e banana, apresentaram FP acima de 1,1, maior do que os antioxidantes sintéticos BHT e BHA (em torno de 1,0) valores próximos dos encontrados neste trabalho (MURCIA; JIMÉNEZ; MARTÍNEZ-TOME, 2001).

A estabilidade expressa pelo tempo de indução de óleo de semente de pinhão (*Pinus halepensis*) foi de aproximadamente 24,5h. Este período de tempo foi abaixo do verificado em outro tipo de semente (cultivar Deglet *nour*), que pode estar associado ao maior conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados (ácidos linoléico e oléico representam mais de 76 % do total de ácidos graxos) presentes no pinhão e também ao menor teor de compostos fenólicos (186 $\mu\text{g/g}$) quando comparados a esta outra semente, 526 $\mu\text{g/g}$ (CHEIKH-ROUHOU *et al.*, 2006). Conforme Farag *et al.* (2003), compostos fenólicos em óleos vegetais geralmente exercem um efeito de proteção sobre sua estabilidade oxidativa.

Segundo Peschel *et al.* (2006), a possibilidade de recuperar elevadas quantidades de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes oriundos de resíduos de frutas e outros vegetais não somente pode ter aplicações na indústria alimentícia, mas também de cosméticos. Dessa forma, os resultados encontrados no nosso estudo abrem a perspectiva da utilização desses extratos pela indústria alimentícia.

5.2.2.2 Frações de ácidos fenólicos livres e de esterificados solúveis e insolúveis dos pedúnculos de caju clones CCP-76, CCP-09, BRS-189 e CCP-76 tratado

A fração AFL do pedúnculo CCP-76 foi a única que apresentou um FP maior do que o aditivo ($p < 0,05$). Todavia, destacamos que, excetuando-se a AFL CCP-09 (200 ppm), as frações livres restantes exibiram proteção antioxidante igual ao BHT ($p > 0,05$).

As frações AFI dos pedúnculos avaliados demonstraram menores valores de FP (de 0,85 a 0,99) quando correlacionados com o BHT ($p < 0,05$), e também em relação às frações AFL e AFS. Os resultados encontram-se na Tabela 10.

Proestos *et al.* (2006) examinaram os valores de FP para padrões de ácidos fenólicos (ácidos gentísico, caféico, *p*-cumárico, vanílico, siríngico, ferúlico, *p*-hidrobenzóico (adição de 0,02 %) para óleo de girassol e verificaram uma média

de variação de 1,2 a 1,5, excetuando-se para o ácido gálico que foi de 4,5. Estes valores corroboram o potencial antioxidante de extratos metanólicos e de matéria seca de plantas aromáticas da Grécia ricas nestes compostos fenólicos.

Tabela 10. Fator de proteção obtido para óleo de soja refinado sem antioxidante a partir de frações de ácidos fenólicos livres e esterificadas de três diferentes clones de pseudofruto de caju comparado a um aditivo alimentício comum (BHT) por meio do teste de Rancimat a 110 °C.

Pseudofrutos de caju (Clones)	Fator de proteção (FP)					
	AFL* (ppm)		AFS (ppm)		AFI (ppm)	
	100	200	100	200	100	200
CCP-76	1,06±0,01 ^a	1,08±0,02 ^a	0,92±0,04 ^b	0,94±0,04 ^b	1,02±0,02 ^a	0,96±0,03 ^a
CCP-09	1,03±0,004 ^a	0,98±0,01 ^b	1,01±0,03 ^a	1,00±0,04 ^a	0,99±0,02 ^b	0,91±0,03 ^b
BRS-189	1,05±0,01 ^a	1,06±0,03 ^a	1,08±0,01 ^a	1,08±0,02 ^a	0,95±0,03 ^b	0,85±0,01 ^b
CCP-76 tratado	1,04±0,04 ^a	1,13±0,01 ^b	1,06±0,03 ^a	0,78±0,04 ^b	0,89±0,01 ^b	1,09±0,01 ^a
BHT (200 ppm)	1,08±0,001 ^a	-	-	-	-	-

* Fração de ácidos fenólicos (AFL) e de esterificados solúvel (AFS) e insolúvel (AFI), resultados expressos em média e desvio-padrão, em triplicata. As comparações foram realizadas em relação ao antioxidante sintético BHT, $p < 0,05$ difere estatisticamente deste aditivo.

Analisando a atividade antioxidante de 14 cafés (três preparações distintas) de vários países em teste de Rancimat, usando como matriz a manteiga, Parras *et al.* (2007) verificaram que o café expresso demonstrou valores de FP entre 1,48 e 3,33 e o café italiano, entre 1,20 e 3,14. Estes valores foram maiores do que a infusão filtrada de café (FP entre 2,21 e 0,83). O padrão de ácido caféico apresentou melhor proteção (PF = 2,78) do que os outros dois mais abundantes (*p*-cumárico e cafeoilquinico) nesta bebida.

Em estudo com óleo de oliva utilizando também padrões de ácidos fenólicos (nas concentrações de 40 a 320 mg/kg de óleo), o período de indução variou de 1,0 a 10,5. Os ácidos gálico e caféico mostraram maior proteção com valores de 10,5 e 4,6, respectivamente, na maior concentração (ARTAJÓ *et al.*, 2006). Neste mesmo trabalho, foi verificado que a relação entre a estabilidade oxidativa e a concentração de fenólicos foi positiva ($r^2 > 0,96$).

Especiarias como orégano grego (*Oregano Vulgare* L. ssp. *Hirtum*) e sálvia (*S. fruticosa*), fontes de compostos fenólicos antioxidantes tais como: ácidos rosmarinico e caféico, apigenina, luteolina e quercetina, exibiram FP em teste de

Rancimat de 1,2 e 1,4 (para extratos etanólicos) e 1,7 e 2,2 (para extratos cetônicos), respectivamente.

Apesar das frações de ácidos fenólicos obtidas, em nosso estudo, conterem constituintes com expressivo potencial antioxidante em Rancimat reportados na literatura, provavelmente os valores mais baixos de FP seja devido a fatores tais como: processo de extração e solubilização no óleo.

5.2.3 Atividade antioxidante dos extratos aquoso e alcoólico e frações de ácidos fenólicos do pedúnculo de caju clone CCP-76 em sistema de varredura de radical DPPH•

A capacidade de seqüestrar o radical DPPH (expressa em percentual de inibição) exibida pelos EAq e frações de ácidos AFL e de esterificados do pedúnculo de caju clone CCP-76 encontra-se na Tabela 11. Este método se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH•, que ao se reduzir perde sua coloração púrpura. Desta forma, avalia apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar um elétron se oxida, e por este motivo, não detecta substâncias pró-oxidantes (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

Todos os extratos, diferentemente das frações, apresentaram comportamento distinto daquele observado no sistema β -caroteno/ácido linoléico, mostrando efetiva atividade de varredura do radical, principalmente na maior concentração (0,4 mg), com percentuais 87 e 94 % para o EAq e EAlc, respectivamente (Tabela 11). Destaca-se, também nos resultados a proporcionalidade entre as relações dose *versus* atividade.

Tabela 11. Atividade antioxidante dos extratos (aquoso e alcoólico) e frações de ácidos fenólicos livres e de esterificados (solúvel e insolúvel) do pedúnculo de caju CCP-76 em sistema de redução do radical DPPH•.

Atividade de varredura do radical DPPH• (%)							
Extratos ($\mu\text{g/mL}$)*			Frações ($\mu\text{g/mL}$)*				
100	200	400	25	50	100		
EAq	44 $\pm$ 1,5	73 $\pm$ 3,9	87 $\pm$ 0,5	AFL	47 $\pm$ 1,3	69 $\pm$ 1,5	83 $\pm$ 1,7
EAlc	44 $\pm$ 1,4	68 $\pm$ 2,2	94 $\pm$ 0,7	AFS	73 $\pm$ 2,4	91 $\pm$ 0,4	95 $\pm$ 0,1
				AFI	76 $\pm$ 3,3	88 $\pm$ 0,23	92 $\pm$ 0,1

* Os resultados estão expressos como média e desvio-padrão (n = 3).

Os ácidos fenólicos das frações apresentaram uma expressiva capacidade antioxidante, principalmente se levar em consideração a quantidade usada que foi praticamente 4 vezes menor do que os extratos, na concentração de 0,1 mg, o percentual de inibição da oxidação foi acima de 83 %.

Com base nestes dados, evidencia-se que os compostos bioativos presentes tanto nos extratos como nas frações podem agir como seqüestradores de radicais pela capacidade de atuar como doador de hidrogênio (SHAHIDI, ALASALVAR e LIYANA-PATHIRANA, 2007).

Mahattanatawee *et al.* (2006) verificaram uma correlação positiva ($r = 0,96$) entre a atividade antioxidante em sistema DPPH e o teor elevado de compostos fenólicos totais de goiaba vermelha e carambola, sugerindo que estas substâncias, provavelmente, sejam contribuintes significativos na capacidade antioxidante em extratos de frutas.

5.4 Atividade antioxidante *in vivo*

5.4.1 Ensaio Biológico I

O ensaio biológico proposto neste trabalho (vide item 5.2.6) teve como finalidade verificar o potencial antioxidante do EAq do pedúnculo de caju bem como a fração AFL do pedúnculo de caju clone CCP-76 contra os radicais livres em organismo animal. A escolha, em particular, desse extrato foi devido ao uso do pedúnculo de caju ser normalmente *in natura* e não associado a bebidas alcoólicas, representando desta maneira o mais próximo possível à forma que a população o consome, e também pelo seu conteúdo total de fenólicos que representa em torno de 2 mg/g de extrato seco.

Já, a fração AFL foi a escolhida, pois além de apresentar expressiva atividade antioxidante *in vitro* (em sistema de co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico e DPPH), possui compostos com potencial antioxidante (ácidos gálico, ferúlico e caféico) de melhor absorção. O ácido caféico na sua forma livre é absorvido numa quantidade três vezes maior do que na sua forma esterificada com ácido quínico, ou seja, o ácido clorogênico (OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001).

Dentro da perspectiva de proteger o organismo animal do processo oxidativo, os organismos lançam mão de sistemas de reparo e defesa antioxidante, contudo estes mecanismos com frequência são inadequados a uma prevenção total a esse dano, acarretado pela formação de radicais livres. Para se referir a este efeito,

usualmente aplica-se o termo estresse oxidativo (HU, 2004; SIMIC, 1988). Deste modo, produtos como fontes naturais de antioxidantes podem ser utilizados para auxiliar na redução do estresse oxidativo normal no corpo humano.

5.4.1.1 Influência da administração do extrato aquoso e fração de ácidos fenólicos livres do pedúnculo de caju no ganho de peso dos animais e consumo

Quando se calculou o CEA, obtendo o valor de 0,2 para todos os grupos, nenhuma diferença foi observada ($p > 0,05$) (Tabela 12).

Tabela 12. Ganho de peso (g) e coeficiente de eficácia alimentar (CEA) de ratos suplementados com extrato aquoso ou fração de ácidos fenólicos livres do pedúnculo de caju clone CCP-76.

Grupos	Ingestão alimentar total (g/29 dias)	Ganho de peso corporal (g/29 dias)	Coeficiente de Eficácia alimentar (CEA)
Controle	705 ± 19	140 ± 2,0	0,2
EAq 80	726 ± 22	141 ± 2,6	0,2
EAq 240	702 ± 18	140 ± 1,8	0,2
EAq 480		144,7 ± 21,7	0,2
AFL 40	677 ± 17	128 ± 3,4	0,2
AFL 120	671 ± 19	137 ± 1,9	0,2

* Valores expressos em média e desvio-padrão de oito animais. $p > 0,05$.

O pedúnculo de caju, em particular a administração com a fração AFL, não afetou a ingestão de ração e nem o ganho de peso dos animais. Esses resultados, nas concentrações utilizadas, sugerem que os compostos fenólicos presentes no pedúnculo de caju não interferem com o aproveitamento dos nutrientes da ração. Gonthier *et al.* (2003) suplementaram ratos com vinho tinto contendo pró-antociandinas, ácidos fenólicos, flavanóis, antocianinas e flavonóis com o propósito de medir os metabólitos produzidos na microbiota dos animais. Uma das observações realizadas neste trabalho foi similar a nossa, pois da mesma forma a ingestão alimentar e o ganho de peso dos ratos foram semelhantes, sem interferências da administração no consumo alimentar.

5.4.1.2 Absorção aparente dos fenólicos

Os valores absolutos de compostos fenólicos absorvidos e a proporção em relação ao total ingerido, assim denominada absorção aparente, foram obtidos com a finalidade de se avaliar um possível fator interferente na capacidade antioxidante *in vivo* do caju.

O balanço de compostos fenólicos demonstrou que a absorção destas substâncias se deu acima de 75 % durante as semanas de tratamento com o EAq e fração AFL do pedúnculo de caju clone CCP-76 administrados por gavagem aos ratos (Tabela 13).

Tabela 13. Absorção aparente dos fenólicos totais pela avaliação da excreção nas fezes dos animais suplementados com extrato aquoso e fração de ácidos fenólicos livres do pedúnculo de caju clone CCP-76.

Grupos	% Fenólicos totais absorvidos			
	1ª Semana	2ª Semana	3ª Semana	4ª Semana
EAq 80 (G1)	85	79	78	76
EAq 240 (G2)	84	81	75	76
AFL 40 (G3)	84	83	75	79
AFL 120 (G4)	87	86	78	82

EAq - Extrato aquoso (80 e 240 mg/kg v.o.) e AFL - fração de ácidos fenólicos (40 e 120 mg/kg v.o.).

* Valores expressos em média, n = 08.

A absorção dos compostos fenólicos pelo sistema digestivo é fundamental para avaliar o efeito destas substâncias no organismo animal. Existem compostos que apresentam atividade antioxidante *in vitro*, como por exemplo, os taninos os quais também são encontrados em frutas e outros vegetais, no entanto pela sua estrutura molecular não são absorvidos pelo organismo (SANTOS-BUELGA e SCALBERT, 2000).

5.4.1.3 Influência do pedúnculo de caju clone CCP-76 na lipoperoxidação e enzimas antioxidantes

Lipoperoxidação

Nesse estudo, o índice de estresse oxidativo causado normalmente pelas EROS no organismo foi determinado pela peroxidação lipídica. A lipoperoxidação se caracteriza por ser um marcador importante do estresse oxidativo e também um dos

principais fatores envolvidos no dano celular causado pelos radicais livres (BALU *et al.*, 2005).

Verificamos que, no tecido hepático, houve uma redução do índice da lipoperoxidação dos animais tratados com a maior dose da fração AFL (120 mg/kg de peso animal) de aproximadamente 67 % quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$), ilustrada na Figura 16 A. Para os demais grupos não foram observadas diferenças estatísticas, entretanto percebe-se uma tendência à diminuição da produção de TBARS nos ratos suplementados do grupo G1 ($p = 0,1$).

No cérebro, os produtos resultantes da peroxidação lipídica tiveram uma redução de TBARS de 2,3 μ moles/mg de proteína (no grupo controle) para 1,2 ($p < 0,05$), 0,8 ($p < 0,01$) e 1,4 ($p < 0,05$) μ moles/mg de proteína nos grupos tratados G2, G3 e G4, respectivamente, representando cerca de 40 a 65 % de proteção à oxidação. Os animais do G1 apresentaram tendência à redução da formação de TBARS ($p = 0,06$). Dados mostrados na Figura 16 B.

Quando avaliada a inibição da oxidação lipídica no cérebro, constatou-se que o EAq na maior dose (G2) e as duas frações AFL (G3 e G4) foram efetivas na diminuição de TBARS, caracterizando proteção ao estresse oxidativo. Em estudo realizado por Choi e Hwang (2005) com a administração de extratos de plantas medicinais (*Piper cubeba*, *Physalis angulata* e *Rosa hybrida*), na dose de 0,2 g/kg de peso corporal, também foi observado um decréscimo significativo na concentração de TBARS.

Em um outro estudo para comparar os efeitos antioxidantes e hipolipidêmicos de duas dietas (à base de colesterol), uma enriquecida com o fruto inteiro do caqui e a outra com o caqui livre de compostos fenólicos (contendo apenas fibras), Gorinstein *et al.* (2000) observaram que, após 4 semanas de ingestão, ocorreram mudanças no nível de peróxidos lipídicos. Os grupos que ingeriram a ração controle (à base de colesterol) e a ração colesterol mais caqui livre de fenólicos tiveram aumento significativo na lipoperoxidação, superior ao do grupo que recebeu ração colesterol mais fruto inteiro do caqui, indicando que os compostos fenólicos constituintes das frutas exercem um efeito antioxidante.

Portanto, o tratamento feito com o EAq e fração AFL dá indícios de que a ingestão dos compostos fenólicos presentes no pedúnculo de caju propicie à inibição da oxidação lipídica, reduzindo o acúmulo tecidual de peróxidos lipídicos e seus produtos da oxidação.

Figura 16. Efeito da administração de NaCl (0,9 % – grupo controle), extrato aquoso (80 e 240 mg/kg v.o.) e fração de ácidos fenólicos livres (40 e 120 mg/kg v.o.) obtidos a partir do pedúnculo de caju clone CCP-76, na lipoperoxidação hepática (A) e cerebral (B) em ratos, durante 30 dias. Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão (n= 6 – 8). * $p < 0,05$, e ** $p < 0,001$, quando comparados com o grupo Controle.

Enzimas antioxidantes

Considerando que o consumo de frutas e outros vegetais pode promover proteção contra várias enfermidades, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, esta proteção pode ser explicada pela capacidade antioxidante

que estes produtos naturais exibem. Capacidade esta de sequestrar radicais livres (os quais já têm ação bastante conhecida por promover a oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos), potencializar a atividade e/ou induzir a expressão gênica das enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GSH-Px e GSH-R) e também inibir a ação da xantina oxidase e NADPH oxidase (enzimas geradoras de EROS) (YEH e YEN, 2006, LI *et al.*, 2005, NIJVELDT *et al.*, 2004).

Além do mais, o dano oxidativo endógeno desses radicais também pode ser um fator etiológico importante no envelhecimento (DUVE e WHITE, 1991, RAO; XIA; RICHARDSON, 1990, BREIMER, 1988).

A atividade das enzimas antioxidantes no fígado não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) quando comparada ao grupo controle (Figura 17). Contudo, no tecido cerebral, a CAT apresentou um aumento bastante pronunciado ($p < 0,05$) de sua atividade enzimática nos grupos que receberam a fração AFL nas duas concentrações (2,9 e 4,0 U de atividade enzimática/mg de proteína para G3 e G4, respectivamente) quando comparada com o grupo controle (1,4 U de atividade enzimática/mg de proteína), como pode ser observado na Figura 18 B. Ainda neste mesmo órgão, não foram notadas diferenças ($p > 0,05$) na atividade das enzimas SOD, GSH-Px e GSH-R entre o grupo controle e os demais tratamentos (Figura 20 A, C e D).

Diferentemente dos resultados do nosso estudo, Yeh e Yen (2006) observaram aumento não somente da atividade enzimática da CAT como da SOD e GSH-Px no tecido hepático de ratos suplementados, via oral, com ácidos fenólicos sintéticos (gentísico, gálico, ferúlico e *p*-cumárico).

Ainda, observando a Figura 18 A, pode-se verificar que, apesar de não se diferenciar estatisticamente ($p > 0,05$), a atividade enzimática da SOD no cérebro dos animais dos grupos G1, G2 e G4, com valores de 11,0, 10,3 e 11,3 U de atividade enzimática/mg de proteína, respectivamente, mostrou-se muito próxima a do controle (10 U de atividade enzimática/mg de proteína).

Assim, na investigação do potencial antioxidante do pedúnculo de caju clone CCP-76 *in vivo* (animal em condição normal), foi observado no cérebro que as frações AFL (G3 e G4) potenciaram apenas a CAT, pelo aumento de sua atividade após a administração por 30 dias. Por outro lado, o EAq e as frações não induziram as enzimas antioxidantes no tecido hepático. Provavelmente, este fato se deva às frações de ácidos fenólicos livres do pedúnculo de caju possuírem efeitos distintos

nos diversos órgãos, potencializando as enzimas ou funcionando como bloqueadores diretos na formação de radicais livres; preservando, desta maneira, o sistema antioxidante endógeno.

Figura 17. Comportamento da atividade das enzimas catalase (CAT) (A), superóxido dismutase (SOD) (B), glutathione peroxidase (GSH-Px) (C) e redutase (GSH-R) (D) – U/mg de proteína – frente à administração de NaCl (0,9 % – grupo controle), extrato aquoso (80 e 240 mg/kg v.o.) e fração de ácidos fenólicos livres (40 e 120 mg/kg v.o.) obtidos a partir do pedúnculo de caju clone CCP-76, em fígado de ratos, durante 30 dias. Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão (n = 4 – 8). * $p < 0,05$, quando comparados com o grupo Controle.

Figura 18. Comportamento da atividade das enzimas catalase (CAT) (A), superóxido dismutase (SOD) (B), glutathionas peroxidase (GSH-Px) (C) e redutase (GSH-R) (D) – U/mg de proteína – frente à administração de NaCl (0,9 % – grupo controle), extrato aquoso (80 e 240 mg/kg v.o.) e fração de ácidos fenólicos livres (40 e 120 mg/kg v.o.) obtidos a partir do pedúnculo de caju clone CCP-76, em cérebro de ratos, durante 30 dias. Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão (n = 4 – 8). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$, quando comparados com o grupo Controle.

Ratos tratados com extrato fermentado de soja demonstraram efeitos diversos sobre as enzimas CAT, SOD e GSH-Px nos tecidos hepático, renal e cerebral: no fígado, estas três enzimas estiveram aumentadas; já no rim, a atividade da SOD

reduziu e a da CAT e da GSH-Px se manteve igual ao controle; no cérebro, todavia, a atividade da SOD e GSH-Px diminuiu (HU *et al.*, 2004).

Balu *et al.* (2005), ao suplementar ratos jovens e velhos com extrato de semente de uva, verificaram que, nos animais jovens, este extrato não influenciou a atividade das enzimas antioxidantes, ao contrário dos mais velhos que, em diversas regiões do cérebro, aumentou a atividade das enzimas antioxidantes que se encontrava reduzida devido ao envelhecimento.

Sendo assim, tanto o EAq quanto as frações AFL do pedúnculo de caju clone CCP-76 apontam para uma ação antioxidante direta, como seqüestradores de EROs, por não potencializarem todas as enzimas antioxidantes. Além dos ácidos fenólicos, com capacidade de quelar radicais livres, estes compostos antioxidantes podem induzir e/ou potencializar enzimas antioxidantes, seja pelo aumento de sua atividade ou de sua expressão gênica (YEH e YEN, 2006, LI *et al.*, 2005).

Iwai *et al.* (2002) realizaram um ensaio biológico utilizando fermentado de soja em ratos, sem indução de qualquer estresse oxidativo, alimentados por 3 semanas. O estudo demonstrou que as enzimas não foram induzidas pelo fermentado. Entretanto, eles observaram a produção de TBARs reduzida, sugerindo que o fermentado tenha inibido a peroxidação lipídica no plasma e em outros tecidos e a oxidação da LDL; possuindo, desse modo, uma ação antioxidante direta, por não ter havido a indução das enzimas antioxidantes por parte deste fermentado. Resultados estes muito semelhantes aos encontrados no nosso ensaio experimental com os fenólicos do pedúnculo de caju clone CCP-76.

Contudo, é provável que a dose oferecida aos animais no nosso estudo não tenha sido suficiente para exercer maior efeito sobre as enzimas antioxidantes avaliadas nos tecidos hepático (já que a CAT e a SOD apresentaram tendência ao aumento de sua atividade) e cerebral. Yeh e Yen (2006) administraram oralmente ácidos gentísico, gálico, ferúlico e *p*-cumárico com a dosagem de 100 mg/kg de peso corporal de ratos e ao contrário do nosso experimento, eles notaram que os ácidos fenólicos não só elevaram a atividade das enzimas SOD, CAT e GSH-Px bem como os seus níveis de RNAm. Em outro estudo, Li *et al.* (2005) administraram ácido gálico, purificado de rosa rugosa (*Hamanasu rosaceae*) e isolado por HPLC, em ratos com senescência acelerada a uma dose de 80 mg/kg de peso corpóreo, este composto fenólico potencializou as enzimas CAT e GSH-Px, além de diminuir a lipoperoxidação no fígado, sangue e cérebro dos animais.

Portanto, a administração oral de EAq e fração AFL do pedúnculo de caju clone CCP-76, apesar de não potencializar todas as enzimas antioxidantes investigadas, aumentou o estado antioxidante nos animais pela redução dos níveis dos produtos finais da lipoperoxidação encontrada no cérebro.

5.4.2 Ensaio biológico II

Com o intuito de confirmar o potencial antioxidante do EAq do pedúnculo de caju CCP-76 bem como a fração AFL contra os radicais livres em organismo animal, proposto no delineamento experimental inicial (vide item 5.2.7), foi avaliado o efeito da administração desse extrato e frações sobre a injúria hepática aguda induzida pelo CCl₄. Visto que o estresse oxidativo é bem caracterizado neste modelo animal, dessa forma podendo melhor esclarecer como atua o EAq e a fração AFL no organismo animal.

Conforme os resultados obtidos no ensaio biológico I (item 5.4.3), foram mantidas as concentrações de AFL (40 e 120 mg/kg v.o), contudo a de EAq foi dobrada em relação à dose maior inicial (480 mg/kg v.o.). Análogo ao primeiro ensaio, mesmo com o aumento da concentração do EAq, não houve diferenças significativas entre o CEA calculado para todos os grupos. A administração com o EAq nesta concentração não afetou o consumo de ração e nem o ganho de peso dos animais.

Em teste subagudo de trinta dias com ratos, foi verificado que o extrato hidroetanólico (70 %) de folhas de cajueiro (*Anacardium occidentale*) clone CCP-76, em concentrações de até 2000 mg/kg de peso corpóreo, não afetou o aumento do peso corporal, e sequer na ingestão alimentar e consumo de água. Da mesma forma, nas análises bioquímicas de funções hepatobiliares o extrato foi bem tolerado pelos animais, isto confirmado por exames histopatológico e hematológico (KONAN *et al.*, 2007).

Devido à similaridade das alterações associadas à injúria hepática induzida por CCl₄ com às da hepatite viral aguda (SUJA *et al.*, 2004), a hepatotoxicidade mediada por CCl₄ vem sendo bastante utilizada como modelo experimental (SANMUGAPRYIA e VENKATARAMAN, 2006; OZERCAN *et al.*, 2006; NEVIN e VIJAYAMMAL, 2005). Esta hepatotoxicidade induzida por CCl₄ se dá pela formação do metabólito triclorometil (CCl₃•), um radical livre que alquila proteínas celulares e outras macromoléculas,

afetando simultaneamente ácidos graxos poliinsaturados, na presença de oxigênio, para produzir peróxidos lipídicos, acarretando o dano hepático (BISHAYEE *et al.*, 1995).

5.4.2.1 Efeito da administração de pedúnculo de caju clone CCP-76 sobre parâmetros bioquímicos plasmáticos em ratos com dano hepático induzido por CCl₄

A necrose hepatocelular eleva marcadores enzimáticos séricos e/ou plasmáticos, os quais são liberados do fígado para o sangue. Os níveis elevados de ALT, AST, alcalina fosfatase e bilirrubina no sangue são indicadores convencionais de injúria hepática (SANMUGAPRIYA & VENKATARAMAN, 2006).

Os níveis plasmáticos da ALT e AST encontram-se ilustrados na Figura 19. O dano hepático causado pelo CCl₄ aumentou significativamente ($p < 0,001$) os marcadores enzimáticos, neste estudo, quando comparados aos do grupo controle.

A administração de AFL (40 e 120 mg/kg, v.o.), nas duas doses, atenuou os níveis elevados da ALT, ao redor de 59 a 62 % respectivamente, proporcionando uma recuperação subsequente pela normalização dos índices em comparação ao grupo induzido CCl₄ (Figura 19 A). Contudo, o EAq não apresentou efeito hepatoprotetor.

Em relação à AST, da mesma forma a fração AFL acarretou o decréscimo dos índices enzimáticos para $68,0 \pm 8,0$ e $80,2 \pm 2,6$ U/mL, na menor e maior dose respectivamente, como pode ser observado na Figura 19 B. Não houve resposta positiva quando se administrou o EAq.

Um complexo de fosfolípido-naringenina (composto flavanona), na dose de 100 mg/kg, v.o. durante 10 dias, reduziu os níveis plasmáticos elevados de ALT e AST em ratos intoxicados por CCl₄ (MAITI *et al.*, 2006).

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Figura 19. Efeito do extrato aquoso (EAq) e da fração de ácidos fenólicos livres (AFL) mg/kg de peso corpóreo v.o, obtidos a partir do pedúnculo de caju clone CCP-76, sobre parâmetros bioquímicos plasmáticos, aminotransferase alanina (**A**) e aminotransferase aspartato (**B**), em ratos com dano hepático induzido por CCl₄. Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão (n= 6 – 8).

Os níveis séricos de ALT e AST elevados em cultura de hepatócitos de ratos (em período neonatal) com injúria induzida por CCl_4 foram reduzidos pelo tratamento com flavonóides totais obtidos da erva chinesa *Laggera alata*; atenuando, por conseguinte, o dano hepático induzido por CCl_4 . Assim como, a avaliação histopatológica revelou que a hepatopatia melhorou com este tratamento (WU *et al.*, 2006). O efeito de outro composto fenólico (epigallocatequina-3-galato) isolado foi avaliado neste mesmo sistema modelo. Semelhante ao esperado, os níveis séricos de ALT e AST aumentaram com a indução por CCl_4 , e os animais que receberam a epigallocatequina reduziram estes índices enzimáticos, apesar de não recuperá-los em sua totalidade (ZHEN *et al.*, 2007).

5.4.2.3 Efeito do pedúnculo de caju clone CCP-76 na lipoperoxidação e sobre as enzimas antioxidantes em ratos com dano hepático induzido por CCl_4

Lipoperoxidação

O CCl_4 é metabolizado pelo sistema monooxigenase mitocondrial (P450 2E1). No decorrer do processo, o radical $\text{CCl}_3^\bullet$ é gerado e, rapidamente, se transforma em Cl_3COO^- (peróxido triclorometil) (RECKNAGEL *et al.*, 1989). Os radicais originados provocam a peroxidação nos ácidos graxos dos fosfolípidios de membrana, resultando em radicais peróxidos lipídicos, hidroperóxidos lipídicos e outros produtos, atuando como agentes oxidantes ativos. Sendo assim, as estruturas de membranas celulares ou de organelas intracelulares são degradadas, aumentando o dano estrutural. Portanto, a peroxidação lipídica exerce um papel fundamental na hepatopatia causada pelo CCl_4 (OZERCAN *et al.*, 2006).

Os efeitos do EAq (480 mg/kg, v.o.) e da AFL (nas duas concentrações, 40 e 120 mg/kg, v.o.) sobre a lipoperoxidação no dano hepático induzido pelo CCl_4 estão apresentados na Figura 20. A hepatopatia provocada aumentou significativamente ($p < 0,01$) os índices de lipoperoxidação nos animais controles induzidos por CCl_4 , (grupo II), a partir da formação de TBARS de $0,65 \pm 0,05 \mu\text{moles/mg}$ de proteínas, quando comparados aos do grupo controle normal ($0,43 \pm 0,04 \mu\text{mol/mg}$ de proteínas). Já demonstrando os efeitos deletérios do CCl_4 sobre os fosfolípidios de membrana.

O EAq (Grupo III) não reduziu os níveis de lipoperoxidação pela diminuição de TBARS ($0,55 \pm 0,04 \mu\text{mol/mg}$ de proteínas), $p > 0,01$, em comparação ao grupo II

(CCl₄). Em contrapartida, as frações AFL (Grupos IV e V), em ambas as concentrações, diminuíram a produção de TBARS para aproximadamente $0,18 \pm 0,08$ e $0,17 \pm 0,04$ $\mu\text{mol/mg}$ de proteína, respectivamente, em relação ao grupo II, corroborando a efetivação da capacidade antioxidante destas frações nesse estudo.

Figura 20. Efeito do extrato aquoso (EAq) e da fração de ácidos fenólicos livres (AFL) mg/kg de peso corpóreo v.o, obtidos a partir do pedúnculo de caju clone CCP-76, sobre os níveis de peroxidação lipídica em fígado de ratos com dano hepático induzido por CCl₄. Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão (n= 6 – 8).

O estresse oxidativo é a principal causa do dano do fígado induzido pelo CCl₄ (Zhen *et al.*, 2007) devido à formação dos radicais livres de CCl₃[•] que podem propiciar a lipoperoxidação.

Pesquisas envolvendo compostos fenólicos com atividade antioxidante contra a toxicidade hepática desse solvente demonstram resultados positivos à prevenção deste dano. Estudos sobre o café têm como foco principal a sua atividade antioxidante, devido aos seus vários compostos, dentre eles, ácidos fenólicos tais como caféico, *p*-cumárico e cafeoilquinico (Parras *et al.*, 2007). A prevenção do dano hepático induzido por CCl₄ por esta bebida foi avaliada por Ozercan *et al.* (2006). Usando café instantâneo em um período de 17 dias, os autores constataram que

houve redução da concentração de TBARS, demonstrando a prevenção do dano hepático pelo CCl_4 .

Extrato aquoso de bolota (*Quercus aliena* do carvalho), contendo primordialmente ácido gálico, digálico e galotanino, exibiu função protetora contra a hepatotoxicidade provocada pelo CCl_4 idêntica ao de silimarina (flavonóide extraído de *Silybum marianum*), um controle positivo, prevenindo a lipoperoxidação (JIN *et al.*, 2005).

Já, o principal polifenol do chá verde, epigallocatequina-3-galato, foi utilizado em um ensaio experimental crônico (7 semanas) em modelo rato com fibrose hepática por CCl_4 . Houve redução significativa dos peróxidos lipídicos formados pelos radicais $\text{CCl}_3^\bullet$ gerados. Assim, prevenindo o desenvolvimento da fibrose hepática (Zhen *et al.*, 2007).

Além da concentração e da solubilidade, a estrutura química exerce um papel fundamental nas propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos. A presença de grupos hidroxilas e de anéis aromáticos estabiliza estas substâncias em processos de oxidação. A fração AFL, constituída de ácido gálico, ferúlico, caféico, protocatecuico e *p*-cumárico (já identificadas, item 5.1.4), preveniu a peroxidação lipídica contra o efeito tóxico do CCl_4 no fígado de ratos, caracterizando o potencial antioxidante frente ao estresse oxidativo, potencial este que não havia sido bem definido no ensaio experimental I (animais em condições normais).

Enzimas Antioxidantes

As atividades dos antioxidantes enzimáticos, avaliados nesse estudo, apresentam-se na Figura 21.

No tecido hepático, houve uma redução significativa das enzimas SOD ($p < 0,05$), CAT ($p < 0,05$) e GSH-Px ($p < 0,001$) do grupo controle induzido CCl_4 (II) – 34,4, 91,6 e 0,69 U de atividade enzimática/mg de proteína, respectivamente – em comparação ao controle normal (I) – $44,1 \pm 2,2$, 166 ± 52 e $0,96 \pm 0,04$ U de atividade enzimática/mg de proteína, respectivamente (Figura 21 A e B). Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos relatados na literatura. O CCl_4 é bioativado pelas enzimas de fase I citocromo P450 a radicais livres $\text{CCl}_3^\bullet$. A toxicidade resultante desta molécula reativa é multifatorial e inclui a promoção do desequilíbrio entre a produção de EROS x defesas antioxidantes, por conseguinte originando o estresse oxidativo e modificando o estado redox celular. Entre outros marcadores, as

atividades reduzidas do sistema antioxidante enzimático, SOD, CAT e GSH-Px, indicam o dano hepático causado nos ratos tratados com CCl_4 (SANMUGAPRIYA e VENKATARAMAN, 2006, ALEKSUNES *et al.*, 2005).

Como já fora exposto anteriormente, provavelmente uma das principais causas da lesão hepática induzida pelo CCl_4 seja a formação de peróxidos lipídicos pelos radicais livres $\text{CCl}_3^{\cdot}$. Portanto, a atividade antioxidante ou a inibição da geração destes radicais livres é fundamental ao efeito protetor contra a hepatopatia desenvolvida por este reagente extremamente tóxico (CASTRO *et al.*, 1974).

Os animais tratados com EAq (Grupo III) não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) quando comparado ao grupo II, não demonstrando efeito hepatoprotetor. Observando a Figura 21 A e C, percebe-se, ainda, um discreto aumento nas atividades da CAT (113 ± 19) e GSH-Px ($0,81 \pm 0,09$), mas não suficientes para potencializar estas enzimas e promover o efeito antioxidante. Também, é notada uma modesta redução na lipoperoxidação (Figura 22), mas não satisfatória para a sua prevenção.

Por outro lado, a AFL (Grupo IV – 40 mg/kg, v.o.) elevou os índices da atividade antioxidante da SOD [$(48,1 \pm 4,4$ U de atividade enzimática/mg de proteína ($p < 0,01$)), CAT [154 ± 18 U de atividade enzimática/mg de proteína ($p < 0,05$)] e GSH-Px [$(1,01 \pm 0,1$ U de atividade enzimática/mg de proteína ($p < 0,001$)] quando comparado ao grupo II. Igualmente, a AFL na maior dose (Grupo V – 120 mg/kg, v.o.) aumentou a atividade da SOD [$(43,2 \pm 3,1$ U de atividade enzimática/mg de proteína ($p < 0,05$), CAT [177 ± 39 U de atividade enzimática/mg de proteína ($p < 0,01$)] e GSH-Px [$(0,89 \pm 0,1$ U de atividade enzimática/mg de proteína ($p < 0,05$)] em comparação ao grupo controle induzido II (Figura 21).

O CCl_4 não interferiu na atividade da GSH-R em relação aos grupos II, III, IV e V ($p > 0,05$), resultados ilustrados na Figura 21 D, comparando-os com o grupo controle (I).

Srinivasan *et al.* (2005) avaliando a capacidade antioxidante do ácido ferúlico atestou que é um protetor natural contra a toxicidade de CCl_4 . Isto foi evidenciado pela diminuição dos índices de TBARS em ratos com hepatopatia crônica (90 dias) induzida que receberam o ácido ferúlico (20 mg/kg, v.o.). Ainda, reafirmando o potencial antioxidante, houve recuperação das atividades da SOD, CAT e GSH-Px que se encontravam diminuídas.

A avaliação de um complexo fosfolípido de naringenina, elaborado com a finalidade de potencializar a eficácia terapêutica desta flavanona, reduziu os níveis

de TBARS e aumentou as atividades da CAT, SOD e GSH-Px depletadas (MAITI *et al.*, 2006).

Figura 21. Efeito do extrato aquoso (EAq) e da fração de ácidos fenólicos livres (AFL) mg/kg de peso corpóreo v.o, obtidos a partir do pedúnculo de caju clone CCP-76, sobre os níveis de antioxidantes enzimáticos em fígado de ratos com dano hepático induzido por CCl4. Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão (n= 4 – 8).

Efeito hepatoprotetor de extrato aquoso obtido a partir de sementes de *Strychnos potatorum* Linn em ratos com dano hepático agudo induzido por CCl₄ foi verificado por Sanmugapriya & Venkataraman (2006), o extrato reduziu os níveis das enzimas marcadoras séricas (ALT e AST), conforme o que foi verificado em nosso estudo. Quanto à ação antioxidante, os autores observaram que o extrato potencializou todas as enzimas antioxidantes com o aumento da atividade e diminuiu a lipoperoxidação (SANMUGAPRIYA e VENKATARAMAN, 2006), tal qual a elevação dos índices antioxidantes enzimáticos e redução dos níveis de peróxidos lipídicos observados no nosso experimento pela fração AFL (40 e 120 mg/kg, v.o.).

Estudos histológicos

A análise histológica de fígados dos animais tratados com CCl₄ exibiram alterações morfológicas evidentes, em nível de hepatócitos, caracterizadas por degeneração vacuolar (Figura 22 C e D), quando comparados com ratos controles não tratados (Figura 22 A e B).

A administração aguda de CCl₄ em ratos induz necrose centrolobular e esteatose hepática (OZERCAN *et al.*, 2006), incluindo, entre outros efeitos, elevação de enzimas séricas hepáticas, alteração do sistema antioxidante enzimático endógeno e aumento dos níveis de peroxidação lipídica.

O grupo controle demonstrou lobulação hepática preservada, ou seja, hepatócitos com núcleo em posição central com cromatina frouxa, nucléolo evidente e citoplasma eosinofílico e homogêneo. Os sinusóides se mantiveram preservados, isto é, não dilatados e com endotélio representado por monocamada de células endoteliais, sobre as quais se observam, esparsamente distribuídas, as células de *Kupffer*. Não foram verificadas alterações em nível de espaço porta, assim como na veia hepática terminal que se apresentou morfolologicamente preservada (Figura 22 A e C). Por outro lado, como era esperado, o tecido hepático do grupo II (CCl₄) revelou lesões caracterizadas por degeneração vacuolar macro e microgoticular (núcleo centralizado e algumas vezes, figuras de degeneração nuclear, principalmente, picnose) como pode ser observado na Figura 23; o conjunto desses achados, de forma resumida, é compatível com o quadro lesional que se desenvolveu pela ação dos metabólitos do CCl₄.

Figura 22. Fotomicrografias de cortes histológicos de fígados de ratos tratados ou não com CCl_4 . (A) Grupo controle: o corte mostra arquitetura lobular preservada, disposição radial dos hepatócitos, veia centrolobular e sinusóides arquitetural e morfologicamente preservados. 40x e (B) detalhe em maior aumento, evidenciando espaço porta com seus componentes preservados, da mesma forma hepatócitos da região periportal e seus sinusóides. 100x. (C) Grupo CCl_4 (II): caracterização da hepatopatia induzida, demonstrando, em áreas focais, subversão da arquitetura lobular, inúmeros hepatócitos exibindo degeneração vacuolar macrofotocitária, sobretudo aqueles localizados na região centro lobular e mediozonal. 40x e (D) detalhe em maior aumento, revelando, na parte mediozonal, numerosos hepatócitos com degeneração vacuolar macrofotocitária, alguns com coalescência. 100x. Seções transversais coradas com HE.

Figura 23. Fotomicrografia de fígado de rato tratado com CCl_4 . Nota-se veia hepática terminal (VHT) com eritrócitos em seu espaço luminal. Hepatócitos com degeneração vacuolar macro (DV) e microgótica (DVM). Coloração: HE. 200x.

A avaliação histológica utilizando-se *Sudan black* (Figura 24) evidencia positividade para gordura nos vacúolos citoplasmáticos; caracterizando, portanto, esteatose, desenvolvida pelo CCl_4 . Estes resultados corroboram a efetividade do modelo experimental usado.

No estudo de Sanmugapryia e Venkataraman (2006), no qual nos baseamos para a realização deste ensaio, os ratos submetidos à lesão hepática por CCl_4 , apresentaram células necróticas. Resultados, estes, idênticos aos que obtivemos.

Em relação ao grupo III que recebeu EAq (480 mg/kg, v.o), o quadro histológico observado assemelhou-se ao grupo II (CCl_4) com degeneração vacuolar macro e microgótica, nas regiões mediozonal e/ou zona 2 do ácino hepático (Figura 25 A), às vezes até com intensidade de lesão leve e/ou discreta. Portanto, sugerindo não ter havido efeito de proteção antioxidante desse extrato na dose oferecida.

Figura 24. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de rato tratado com CCl_4 , evidenciando, em negro, positividade para gordura nos vacúolos citoplasmáticos da região centrolobular. Coloração: *Sudan black*. Aumento: 200x.

Nos animais do grupo IV (AFL 40 mg/kg, v.o.) pode-se visualizar, na Figura 25 C e D, lobulação hepática preservada, não obstante, há inúmeros hepatócitos, em localização centrolobular e mediozonal com degeneração vacuolar macro e microgoticular, cuja intensidade subjetiva de grau de lesão não chega a ser tão proeminente. Estes resultados dão indícios de haver proteção antioxidante desta fração ao tecido hepático lesionado pelo estresse oxidativo agudo causado por CCl_4 .

A avaliação histológica do efeito da fração AFL na maior dose (120 mg/kg, v.o.) destacou lobulação hepática preservada, como pode ser visto na Figura 25 E e F, a angioarquitetura lobular e os hepatócitos exibiram sinais fidedignos de que tenha havido efeito protetor no aparecimento e evolução de esteatose. Também houve degeneração vacuolar macrogoticular discreta no citoplasma dos hepatócitos, com ausência de figuras de degeneração nuclear. Comparando-se ao grupo controle observa-se que houve nitidamente menor intensidade de comprometimento por meio de avaliação subjetiva. Ademais, foi observada a degeneração vacuolar microgoticular

em alguns hepatócitos da região centrolobular com numerosos hepatócitos necróticos, além de infiltrado de mononucleares de entremeio às células necróticas. Vale ressaltar que a presença de numerosas células necróticas, evidencia o fato de não se tratar de apoptose, visto que há inúmeras células inflamatórias presentes no local. Enfatizamos que quando há morte por apoptose não há resposta inflamatória no local.

Pode-se ver na Figura 26, a ocorrência de hepatócitos com degeneração vacuolar microgoticular, conquanto verificam-se núcleos e rede sinusoidal preservados; confirmando, enfaticamente, o efeito antioxidante da fração AFL na concentração de 120 mg/kg, v.o. contra o efeito deletério dos radicais livres gerados pelo CCl₄.

Em estudo a fim de se verificar efeitos protetores da melatonina, Zavodnik *et al.* (2005) também notaram que o número de hepatócitos com distrofia hidrópica foi comprovadamente reduzido, porém, havia células isoladas com um elevado grau de distrofia gordurosa. As alterações necróticas foram discretas com poucos focos isolados aparecendo células com necrose. Embora, infiltrações intralobulares de leucócitos foram observadas, similares aos ratos controles. Estes resultados aliados às medições bioquímicas foram sugestivos de um efeito hepatoprotetor substancial da melatonina.

A necrose celular e a inflamação aumentadas pelo CCl₄, em ratos, tiveram um decréscimo significativo com a administração, via oral, de café instantâneo, contudo sem afetar a esteatose, dando indícios deste café possuir função protetora, mesmo não revertendo totalmente o processo da hepatopatia. Como foi mencionado anteriormente, nesse mesmo trabalho verificou-se também a prevenção da lipoperoxidação (OZERCAN *et al.*, 2006).

A capacidade antioxidante de epigallocatequina-3-galato, flavonóide presente no chá verde, preveniu o desenvolvimento de fibrose hepática em modelo de esteatose em rato tratado com CCl₄. Além da mensuração do conteúdo de hidroxiprolina hepática, parâmetros bioquímicos (ALT e AST), peroxidação lipídica e níveis de glutathiona reduzida, o potencial antioxidante foi confirmado pela avaliação histológica a qual exibiu a redução das alterações tais como: desarranjo da arquitetura tecidual, formação de septos fibrosos, formação de pseudolóbulos e acúmulo de colágeno (ZHEN *et al.*, 2007).

Figura 25. Histologia de tecido hepático de ratos tratados com EAq 480 (Grupo III) e AFL 40 e 120 (Grupos IV e V, respectivamente) contra a toxicidade pelo CCl_4 . (A) O Grupo III demonstrou pouca degeneração vacuolar macrogoticular. 40x e (B) detalhe em maior aumento, mostrando hepatócitos ao redor da veia hepática terminal com macrovacúolos e na periferia, microvacúolos com núcleos e rede sinusoidal resguardados. 100x. (C) Grupo IV: Lobulação hepática preservada e, mormente, na região centrolobular e mediozonal, quadro de degeneração vacuolar microgoticular. 40x e (D) Veia hepática terminal, ao seu redor, numerosos hepatócitos com degeneração vacuolar microgoticular. 100x. (E) Grupo V – Lesões discretas, visualizando-se alguns hepatócitos com microvacúolos na região mediozonal, conferindo aspecto histológico muito próximo do grupo controle. 40x e (F) hepatócitos da região mediozonal e centrolobular com degeneração vacuolar microgoticular, sem distorção da arquitetura lobular hepática no grupo V. 100x. Seções transversais coradas com HE.

Figura 26. Efeito protetor da fração AFL 120 (120 mg/kg, v.o.: 30 dias antes da administração de CCl_4) contra a hepatopatia provocada por CCl_4 . Ocorrência de hepatócitos com degeneração vacuolar microgoticular, conquanto verificam-se núcleos e rede sinusoidal preservados. Coloração: HE. 200 x.

O sistema modelo utilizado para desencadear um estresse oxidativo em ratos, com a finalidade de se explicitar melhor o possível potencial antioxidante do pedúnculo de caju clone CCP-76, visto que no ensaio experimental I (ratos em condição normal) restaram dúvidas quanto ao efeito do extrato e da fração administrados, foi eficaz. A administração de CCl_4 , na dose de 5mL de CCl_4 (diluição 1:1 com azeite de oliva), sc., causou danos as membranas celulares dos hepatócitos, efeitos observados pela elevação dos níveis de ALT e AST plasmáticos, depleção das enzimas do sistema antioxidante endógeno (CAT, SOD e GSH-Px) e aumento da lipoperoxidação pelos radicais livres $\text{CCl}_3\cdot$ formados. Por fim, o dano hepático foi confirmado pela avaliação morfológica que mostrou desarranjo na arquitetura lobular, degeneração vacuolar macro e microgoticular e necrose celular, confirmando a lesão que ocorre pela ação dos metabólitos do CCl_4 .

O EAq não demonstrou efeito protetor contra a lesão hepática, contudo os valores discretamente diminuíram a lipoperoxidação e elevaram os valores dos antioxidantes enzimáticos e o dano hepático não foi tão lesivo quando comparado ao grupo induzido II (CCl_4), sendo assim, é provável que a dose não tenha sido suficiente o bastante para prevenir o dano hepático.

Em contrapartida, as frações AFL (40 e 120 mg/kg, v.o.) evidenciaram os efeitos benéficos de seus ácidos fenólicos, bastante reportados na literatura acerca do potencial antioxidante, na redução de parâmetros bioquímicos presentes no sangue em hepatopatia aguda, prevenção da peroxidação lipídica e potencialização das enzimas antioxidantes endógenas.

6. CONCLUSÕES

O pedúnculo de caju CCP-76 demonstrou capacidade antioxidante em diferentes sistemas *in vitro* e *in vivo*, as frações de ácidos fenólicos livres presentes comprovaram o potencial antioxidante revelando efeito hepatoprotetor e antioxidante à prevenção do dano oxidativo causado por CCl₄ em ratos, dessa forma podemos tecer as seguintes considerações:

- ✓ Os pedúnculos de caju são excelentes fontes de ácidos graxos insaturados (ácido oléico) e possui elevada quantidade de compostos fenólicos;
- ✓ Os extratos e frações demonstraram atividade antioxidante em três sistemas distintos: β -caroteno, teste Rancimat e DDPH. O elevado potencial antioxidante das frações também está relacionado com o seu conteúdo de ácidos fenólicos tais como: gálico, caféico, ferúlico, protocatequínico e salicílico;
- ✓ Os efeitos hepatoprotetor e antioxidante, apresentados pelas frações de ácidos fenólicos do pedúnculo de caju, estão associados à presença de ácidos fenólicos com atividade antioxidante e a sua prevenção na lipoperoxidação e aumento da atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GSH-Px). Esta atividade antioxidante impediu os efeitos deletérios de radicais livres gerados a partir de CCl₄, influenciando na integridade da membrana por meio da prevenção e/ou inibição da peroxidação de membranas celulares.

Esses resultados abrem a perspectiva para o uso do pedúnculo de caju na indústria como antioxidantes ou mesmo como ingredientes funcionais ou nutracêuticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJAIKUMAR, K. B.; ASHEEF, M.; BABU, B. H.; PADIKKALA, J. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) methanolic extract. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.96, n. 1/2, p.171-176, 2005.

ALBUQUERQUE, U.P. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.2, n.30, p.1-10, 2006.

ALEKSUNES, L. M.; SLITT, A. M.; CHERRINGTON, N. J.; THIBODEAU, M. S.; ASSEN, C. D.; MANAUTOU, J. E. Differential expression of mouse hepatic transporter genes in response to acetaminophen and carbon tetrachloride. **Toxicological Sciences**, Cary, v.83, n.1, p.44-52, 2005.

ANSORENA, D.; ASTIASARAN, I. Effect of storage and packaging on fatty acid composition and oxidation in dry fermented sausages made with added olive oil and antioxidants. **Meat Science**, Barking, v.67, n.2, p.237-244, 2004.

ARTAJO, L. S.; ROMERO, M. P.; MORELLÓ, J. R.; MOTILVA, M. J. Enrichment of Refined Olive Oil with Phenolic Compounds: Evaluation of Their Antioxidant Activity and Their Effect on the Bitter Index. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.54, p.6079-6088, 2006.

ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC**, 13 ed., 858p, 1980.

BABIOR, B. M.; WOODMAN, R.C. Chronic granulomatous disease. **Seminars in hematology**, Philadelphia, v.27, p.247-5, 1990.

BALU, M.; SANGEETHA, P.; HARIPRIYA, D.; PANNEERSELVAM, C. Rejuvenation of antioxidant system in central nervous system of aged rats by grape seed extract. **Neuroscience Letters**, Limerick, v.383, p.295-300, 2005.

BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. Oxidative decay of DNA. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.272, n.32, 19633-36, 1997.

BEUTLER, E. Red Cell Metabolism. In: **Manual of Biochemical Methods**. 2 ed. New York: Grune & Stratton, 1975, p.89-90.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BREST, C. Use of Free Radical Method Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**, London, v.28, p.25-30, 1995.

BOZKAYA, L. A.; OZTURK-UREK, R.; AYDEMIR, T.; TARHAN, L. Effects of Se, Cu and Se plus vitamin E deficiency on the activities of CuZnSOD, GSH-Px, CAT and LPO levels in Chicken Erythrocytes. **Cell Biochemistry and Function**, Chichester, v.19, n.3, p.153-157, 2001.

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

BREIMER, L. H. Ionizing radiation-induced mutagenesis. **British Journal of Cancer**, London, v.57, p.6-18, 1988.

CALDER, P. C.; COSTA-ROSA, L. F. B. P.; CURI, R. Effects of feeding lipids of different fatty acid compositions upon rat lymphocyte proliferation. **Life Sciences**, Oxford, v. 56, n.6, p.455-463, 1995.

CAPUTO, M.; SOMMELLA, M. G.; GRAZIANI, G.; GIORDANO, I.; FOGLIANO, V.; PORTA, R.; MARINIELLO, L. Antioxidant profiles of Corbara small tomatoes during ripening and effects of aqueous extracts on J774 cell antioxidant enzymes. **Journal of Food Biochemistry**, Malden, v.28, n.1, p.1-20, 2004.

CARDOSO, J. E.; CAVALCANTI, J. J. V.; CAVALCANTE, M. J. B.; ARAGÃO, M. L.; FELIPE, E. M. Genetic resistance of dwarf cashew (*Anacardium occidentale* L.) to anthracnose, black mold, and angular leaf spot. **Crop Protection**, Willoughby, v. 18, p.23-27, 1999.

CASTRO, J. A.; FERRY, G. C.; CASTRO, C. R.; SASAME, H.; FENOS, O. M.; GILLETE, J. R. Prevention of carbon tetrachloride-induced necrosis by inhibitors of drug-metabolism - further studies on their mechanism of action. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v.23, n.2, p.295-302, 1974.

CECCHI, H. M.; RODRIGUES-AMAYA, D. B. Carotenoid composition and vitamin A value of fresh and pasteurized cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice. **Journal of Food Science**, Champaign, v.46, p.147-149, 1981.

CHEIKH-ROUHO, S.; HENTATI, B.; BESBES, S.; BLECKER, C.; DEROANNE, C.; ATTIA, H. Chemical Composition and Lipid Fraction Characteristics of Aleppo Pine (*Pinus halepensis* Mill.) Seeds Cultivated in Tunisia. **Food Science and Technology International**, Tsukuba, v.12, 407-415, 2006.

CHEN, C. Y.; MILBURY, P. E.; KWAK, H. K.; COLLINS, W.; BLUMBERG, J. B. Avenanthramides and phenolic acids from oats are bioavailable and act synergistically with vitamin c to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.134, p.1459-66, 2004.

CHOI, E. M.; HWANG, J. K. Effect of some medicinal plants on plasma antioxidant system and lipid levels in rats. **Phytotherapy Research**, Chichester, v.19, p.382-386, 2005

CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, Kilmington, v.37, p.949-962, 1999.

CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T. F. Uma introdução à bioquímica dos radicais livres. In: CHEESEMAN, K.H., SLATER, T.F. (Ed.). **Radicais livres em medicina**. Rio de Janeiro: Interlivros, p.1-13,1996.

CINTRA, R. M. G. C.; MANCINI-FILHO, J. O sistema imunológico e a atividade antioxidante de substâncias naturalmente presentes nos alimentos. **Laes & Haes**, São Paulo, v.114, p.156-163, 1998.

CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: Structure activity relationship. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v.56, p.324-325, 1992.

DEAN, R. T.; FU, S.; STOCKER, R.; DAVIES, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **The Biochemical Journal**, London, v.324, p.1-18, 1997.

DRABROWSKI, K. J.; SOSULSKI, F. W. Quantification of free and hydrolysable phenolic acids in seeds by capillary gas-liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.32, p.123-127, 1984.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.2, p.446-52, 2006.

DURAN, R. M.; PADILLA, R. B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v.44, n.2, p.101-106, 1993.

DUVE, K. J.; WHITE, P. J. Extraction and identification of antioxidants in oats. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.61, n.6, p.365-370, 1991.

EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL. Aspectos da colheita, pós-colheita e transformação industrial do pedúnculo do caju (*Anacardium Occidentale* L.). Arquivo/Artigos por M.S.M. Souza Filho; A.O. Aragão; R.E. Alves; H.A.C. Filgueiras. Disponível em: http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_3097.pdf. Acesso em: 18 abr. 2007.

EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL. Portfólio. Produzido por L. M. Barros; J. R. Paiva; J. J. V. Cavalcanti e J. R. Cris. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/home/portfolio/gt.php?id=8>. Acesso em: 18 abr. 2007a.

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

FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. **Nutrition**, v.18, p.872-879, 2002.

FANTOZZI, P.; MONTEDORO, G. Dosage des composés phénoliques dans les drups d'olives à différents stades de maturation. **Industries Alimentaires**, Paris, v.95, n.12, p.1335-1339, 1978.

FARAG, R. S.; EL-BAROTY, G. S.; BASUNY, A. M. The influence of phenolic extracts obtained from the olive plant (cvs. Picual and Kronakii), on the stability of sunflower oil. **International Journal of Food Science and Technology**, Tsukuba, v.38, p.81–87, 2003.

FIGUEIRAS, H. A. C.; ALVES, R. E. S. Cashew apple for fresh consumption in Brazil. In: WORLD CASHEW CONGRESS, 1, 2001, Kochi (India). **Cashew – the millennium nut**: Kochi: CEPC, 2001. P53-55.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.226, p.497, 1957.

GARCIA-ALONSO, M.; PASCUAL-TERESA, S.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS, G. J.C. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. **Food Chemistry**, Barking, v.84, p.13-18, 2004.

GARCÍA, M. M. D.; GARCÍA A. C. M.; HERNÁNDEZ, G. A. Importance of lipids in the nutritional treatment of inflammatory diseases. **Nutrición Hospitalaria**, Madri, v.21, n., p. 28-41, 2006.

GARRUTI, D. S.; AGOSTINICOSTA, T. S.; PADILHA, V. A.; LIMA, M. V. Caracterização sensorial de pedúnculos de clones de cajueiro anão-precoce cultivados sob sequeiro e irrigação, para consumo in natura. **Anais SBCTA**, p. 1898-1901, 2002. XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2002 apresentado em Porto Alegre, RS.

GERSCHMAN, R.; GILBERT, D. L. NYE, S. W.; DWYER, P.; FENN, W. O. Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. **Science**, Washington, v.119, p.623-626, 1954.

GIAVAROTTI, K., A, S. **Estudo do Estresse Oxidativo Hepático Induzido por Lindano em um Modelo de Hipertireoidismo Experimental**. 2001, 148f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2001.

GONTHIER, M. P.; CHEYNIER, V.; DONOVAN, J. L.; MANACH, C.; MORAND, C.; MILA, I.; LAPIERRE, C.; RÉMÉSY, C.; SCALBERT, A. Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.133, p.461–467, 2003.

GORINSTEIN, S.; KULASEK, G. W.; BARTNIKOWSKA, E.; LEONTOWICZ, M.; ZEMSER, M.; MORAWIEC, M.; TRAKHTENBERG, S. The effects of diets, supplemented with either whole persimmon or phenol-free persimmon, on rats fed cholesterol. **Food Chemistry**, Barking, v.70, p. 303-308, 2000.

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

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 16, p.33-50, 1996.

HALLIWELL, B. Free radicals antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, Washington, v.52, n.8, p.253-265, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**, ed.2, Oxford: Clarendon Press, 1989.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROUMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food Chemical Toxicology**, Exeter, v.33, n.7, p.601-617, 1995.

HARBONE, J. B. **Phytochemical Methods**. London: Chapman and Hall, 1973. p.33-88.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. **Laboratory practice**, London, v.22, p.475-476, 1973.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, I. S.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.53, p.2928-2935, 2005.

HENRY, G. E.; MOMIN, R. A.; NAIR, M. G.; DEWITT, D. L. Antioxidant and Cyclooxygenase activities of fatty acids found in food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.50, p.2231-2234, 2002.

HERRMANN, K. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v.28, p.315-347, 1989.

HSIEH, C. L.; YEN, G. C.; CHEN, H. Y. J. Antioxidant activities of phenolic acids on ultraviolet radiation-induced erythrocyte and low density lipoprotein oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p.6151-6155, 2005.

HU, C. C.; HSIAO, C. H.; HUANG, S. Y.; FU, S. H.; LAI, C. C.; HONG, T. M.; CHEN, H. H.; LU, F. J. Antioxidant activity of fermented soybean extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.52, p.5735-39, 2004.

HUANG, L. H.; WANG, B. G. Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the Qingdao coastline. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.58, p.4993-4997, 2004.

HUANG, H. S.; CHEN, C. J.; SUZUKI, H.; YAMAMOTO, S.; CHANG, W. C. Inhibitory effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase on the activity of lipoxygenases and cyclooxygenases. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, New York, v.58, p.65-75, 1999.

IWAI, K.; NAKAYA, N.; KAWASAKI, Y.; MATSUE, H. Antioxidative functions of natto, a kind of fermented soybeans: effect on LDL oxidation and lipid metabolism in cholesterol-fed rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.50, p.3597-3601, 2002.

JACOB, R. A.; BURRI, B. Oxidative damage and defense. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.63(s), p.985-990(s), 1996.

JARDINI, F. A. **Avaliação da atividade antioxidante da romã (*Punica granatum*, L.) – Participação das frações de ácidos fenólicos no processo de inibição da oxidação**. 2005, 118f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

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

JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro, **Food Chemistry**, Barking, v.73, n.3, p.285-290, 2001.

JIAO, H.; WANG, S. Y. Correlation of antioxidant capacities to oxygen radical scavenging enzyme activities in blackberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.48, p.5672-5676, 2000.

JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; DRAGSTED, L. O.; DANESHVAR, B.; PULIDO, R.; SAURACALIXTO, F. In vitro antioxidant activities of edible artichoke (*cynara scolymus* L.) And effect on biomarkers of antioxidants in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.51, p.5540-5545, 2003.

JIN, Y. S.; HEO, S. I.; LEE, M. J.; RHEE, H. I.; WANG, M. H. Free radical scavenging and hepatoprotective actions of *Quercus aliena* acorn extract against CCl₄-induced liver. **Free Radical Research**, London, v.39, n.12, p.1351-1358, 2005.

KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; HEINONEN, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.49, p.4076-4082, 2001.

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

KANOFISKY, J. R.; AXELROD, B. Singlet oxygen production by soybean lipoxygenase isozymes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.261, p.1099-1104, 1986.

KARAKAYA, S. Bioavailability of Phenolic Compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v.44, n.6, p.453-464, 2004

KITTS, D. D. Bioactive substance in food: identification and potential use. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v.72, p.423-434, 1994.

KONAN, N. A.; BACCHI, E. M.; LINCOPAN, N.; VARELA, S. D.; VARANDA, E. A. Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.110, p.30-38, 2007.

KONISHI, Y.; HITOMI, Y.; YOSHIOKA, E. Intestinal absorption of p-coumaric and garlic acids in rats after oral administration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.52, p. 2527-32, 2004.

KRYGIER, K.; SOSULSKI, F.; HOGGER, L. Free, sterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.30, n.2, p.330-334, 1982.

LAPOINTE, A.; COUILLARD, C.; LEMIEUX, S. Effects of dietary factors on oxidation of low-density lipoprotein particles. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v.17, p.645-658, 2006.

LEONTOWICZ, H.; GORINSTEIN, S.; LOJEKC, A.; LEONTOWICZ, M.; MILAN, C.; SOLIVA-FORTUNY, R.; PARK, Y.; JUNG, S.; TRAKHTENBERG, S.; MARTIN-BELLOSO, O. Comparative content of some bioactive compounds in apples, peaches and pears and their influence on lipids and antioxidant capacity in rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v.13, n.10, p.603-610, 2002.

LI, L.; NG, T. B.; GAO, W.; LI, W.; FU, M.; NIU, S. M.; ZHAO, L.; CHEN, R. R.; LIU, F. Antioxidant activity of garlic acid from rose flowers in senescence accelerated mice. **Life Sciences**, Oxford, v.77, p.230-240, 2005.

LIMA, A. C.; GARCÍA, N. H. P.; LIMA, J. R. Obtenção e caracterização dos principais produtos do caju. **Boletim CEPPA**, Fortaleza, v.22, n.1, p.133-144, 2004.

LOPEZ, M.; MARTINEZ, F.; DEL VALLE, C.; FERRIT, M.; LUQUE, R. Study of phenolic compounds as natural antioxidants by a fluorescence method. **Talanta**, Oxford, v.60, n.2-3, p.609-616, 2003.

LÓPEZ-MIRANDA, J.; BADIMON, L.; BONANOME, A.; LAIRON, D.; KRIS-ETHERTON, P. M.; MATA, P.; PÉREZ-JIMÉNEZ, F. Monounsaturated Fat and Cardiovascular Risk. **Nutrition Reviews**, Washington, v.64, n.10, p.S2-S12, 2006.
LUKASZEWICZ, M.; SZOPA, J.; KRASOWSKA, A. Susceptibility of lipids from different flax cultivars to peroxidation and its lowering by added antioxidants. **Food Chemistry**, Barking, v.88, n.2, p. 225-23, 2004.

MAHATTANATAWEE, K.; MANTHEY, J. A.; TALCOTT, S. T.; GOODNER, K.; BALDWIN, E. A. Total Antioxidant Activity and Fiber Content of Select Florida-Grown Tropical Fruits. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.54, p.7355-7363, 2006.

MAITI, K.; MUKHERJEE, K.; GANTAIT, A.; SAHA, B. P.; MUKHERJEE, P. K. Enhanced therapeutic potential of naringenin–phospholipid complex in rats. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 58, p. 1227–1233, 2006.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.79, n.5, p.727-747, 2004.

MANCINI, D. A. P.; DIAS, A. L. F.; PINTO, J. R.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidantes do extrato aquoso da canela (*Cinnamomum zeylanicum*, Blume) como inibidores do vírus influenza. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.35, n.1, 1999.

MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, Limerick, v.153, p.83-104, 2000.

MATIAS, M. F. O.; OLIVEIRA, E. L.; GERTRUDES, E.; MAGALHÃES, M. M. A. Use of fibres obtained from the cashew (*Anacardium occidentale*, L) and guava (*Psidium guayava*) fruits for enrichment of food products. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.48, p. 143-150, 2005.

MC CORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase, an enzyme function for erythrocuprein (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.244, 6049-6055, 1969.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Bol. Sbcta**, Campinas, v.36, n.1, p.1-11, 2002.

MELO, M. S. O. M. Antioxidantes naturais da castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.R.), da castanha do caju (*Anarcadium occidentale*, L.) e do fruto do dendezeiro (*Elaeis guinnensis*, Jacq.). São Paulo, 1989. 84p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas).

MELO, M. S. O. M.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidantes naturais da castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.R.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 11, n.2, p.252-263, 1991.

MENDONÇA, F. A. C.; SILVA, K. F. S.; SANTOS, K. K.; RIBEIRO JÚNIOR, K. A. L.; SANT'ANA, A. E. G. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, Netherlands, v.76, p.629– 636, 2005.

MEYER, A. S.; DONOVAN, J. L.; PERSON, D. A.; WATERHOUSE, A. L.; FRANKEL, E. N. Fruit hidroxicinnamic acids inhibit human low density lipoprotein oxidation in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.46, p.1783-1787, 1998.

MILLER, H. E. Simplified method for evaluation of antioxidants. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.48, n.2, p.91, 1971.

MIRANDA, M. S.; MANCINI-FILHO, J. Conseqüência dos radicais livres em alimentos. **Laes & Haes**, São Paulo, v.104, P.110-117, 1997.

MIRANDA, M. S.; CINTRA, R. G.; BARROS, S. B. M.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.31, n.8, 1998.

MIYASAKA, C. K.; SOUZA, J. A. A.; TORRES, R. P.; MANCINI-FILHO, J.; LAJOLO, F. M.; CURI, R. Effect of the administration of fish oil by gavage on activities of antioxidant enzymes of rat lymphoid organs. **General Pharmacology**, Exeter, v.30, n.5, p.759-762, 1998.

MORAIS, A. S.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C.; MOURA, C. F. H. Armazenamento refrigerado sob atmosfera modificada de pedúnculos de cajueiro-anão-precoce dos clones CCP-76, end-157, end-183 e end-1891. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24 n.3, 2002.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.17, n.4, p.411-424, 2004.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva-doce, em sistemas aquoso e lipídico (CN 136). **Nutrire**, São Paulo, v.25, p.45-60, 2003.

MORENO, A. O.; DORANTES, L.; GALINDEZ, J.; GUZMAN, R. I. Effect of different extraction methods on fatty acids, volatile compounds, and physical and chemical properties of avocado (*Persea americana* mill.) oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.51, n.8, p.2216-2221, 2003.

MORRIS, M. C.; EVANS, D. A.; BIENIAS, J. L.; TANGNEY, C. C.; BENNETT, D. A.; AGGARWAL, N.; SCHEIDER, J.; WILSON, R. S. Dietary fats and the risk of incident Alzheimer disease. **Archives of Neurology**, Chicago, 60, p. 194-200, 2003.

MORTON, L. W.; CACETTA, R. A.; PUDEEY, I. B.; CROFT, K. D. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Oxford, v.27, 152-159, 2000.

MOURA, C. F. H. **Qualidade de pedúnculos de clones de cajueiro anão-precoce (*Anacardium occidentale* L. var. *nanum*) irrigados**. 1998. 96 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.

MOURA, C. F. H.; ALVES, R. E.; INNECCO, R.; FILGUEIRAS, H. A. C.; MOSCA, J. L.; PINTO, S. A. A. Características físicas de pedúnculos de cajueiro para comercialização in natura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.537-540, 2001.

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

MURCIA, M. A.; JIMÉNEZ, A. M.; MARTÍNEZ-TOME, M. Evaluation of the antioxidant properties of Mediterranean and tropical fruits compared with common food additives. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.64, n.12, p.2037–2046, 2001.

NAKIMI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **CRC-Critical Review in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v.29, p.273-300, 1990.

NARDINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C.; GISHELLI, A. Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v.17, p.14-22, 2006.

NASCIMENTO, M. A.; SILVA, A. K.; FRANÇA, L. C. B.; QUIGNARD, E. L. J.; LÓPEZ, J. A.; ALMEIDA, M. G. Turnera ulmifolia (Turneraceae): Preliminary study of its antioxidant activity. **Bioresource Technology**, Barking, 2005. Disponível em www.sciencedirect.com.

NEVIN, K. G.; VIJAYAMMAL, P. L. Effect of *Aerva lanata* against hepatotoxicity of carbon tetrachloride in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v.20, p.471-477, 2005.

NINFALI, P.; MEA, G.; GIORGINI, S.; ROCCHI, M.; BACCHIOCCA, M. Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. **The British Journal of Nutrition**, Wallingford, v.93, n.2, p.257-66, 2005.

NIVJELDT, R. J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D. E.; BOELEN, P. G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P. A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential application. **The American Journal Clinical of Nutrition**, Bethesda, v.74, p.418-25, 2004.

NOVOA, A. V.; MOTIDOME, M.; MANCINI-FILHO, J.; LINARES, A. F.; TANAE, M. M.; TORRES, L. M. B.; LAPA, A. J. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.37, n.3, 2001.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v.95, p.351–358, 1979.

OZERCAN, I. H.; DAGLI, A., F.; USTUNDAG, B.; OZERCAN, M. R.; BAHCECIOGLU, I. H.; ÇELİK, H.; YALNIZ, M.; POYRAZOGLU, O. K.; ATASEVEN, H. Does instant coffee prevent acute liver injury induced by carbon tetrachloride (CCl₄)? **Hepatology Research**, Amsterdam, v.35, p.163–168, 2006.

PAIVA, J. R.; ALVES, R. E.; BARROS, L. M.; CAVALCANTI, J. J. V.; ALMEIDA, J. H. S.; MOURA, C. H. F. **Produção e qualidade de pedúnculos de clone de cajueiro-anão-precoce sob cultivo irrigação**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 1998. 5p. (Comunicado técnico, 19).

PAPAS, A. M. Diet and antioxidant status. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.37, p.999-100, 1999.

PARAMASHIVAPPA, R.; PHANI KUMAR, P.; VITHAYATHIL, P. J.; SRINIVASA RAO, A. Novel method for isolation of major phenolic constituents from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.49, p.2548-2551, 2001.

PARRAS, P.; MARTÍNEZ-TOMÉ, M.; JIMÉNEZ, A. M.; MURCIA, M. A. Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. **Food Chemistry**, Barking, v.102, p.582–592, 2007.

PEREIRA, R. B.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em sementes de frutas cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.14, n.2, p.160-167, 1994.

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

PHANI KUMAR, P.; PARAMASHIVAPPA, R.; VITHAYATHIL, P. J.; SUBBA RAO, P. V.; SRINIVASA RAO, A. Process for isolation of cardanol from technical cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.50, p.4705-4708, 2002.

PROESTOS, C.; BOZIARIS, I. S.; NYCHAS, G. J. E.; KOMAITIS, M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. **Food Chemistry**, Barking, v.95, p.664–671, 2006.

QUILES, J. L.; BARJA, G.; BATTINO, M.; MATAIX, J.; SOLFRIZZI, V. Role of Olive Oil and Monounsaturated Fatty Acids in Mitochondrial Oxidative Stress and Aging. **Nutrition Reviews**, Washington, v.64, n.10, p.S31-S39, 2006.

RAJALAKSHMI, D.; NARASIMHAN, S. Food antioxidants: sources and methods of evaluation. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. (Ed.) **Food Antioxidants** – technological, toxicological and health perspectives. New York: Marcel Dekker, Inc., p.65-157, 1995.

RANI, A.; KUMAR, V.; VERMA S. K.; SHAKYA, A. K.; CHAUHAN, G. S Tocopherol Content and Profile of Soybean: Genotypic Variability and Correlation Studies. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 84, p.377–383, 2007.

RECHNER, A. R.; KUHNLE, G.; BREMNE, R. P.; HUBBARD, G. P.; MOORE, K. P. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.33, n.2, p.220–35, 2002.

RAO, G.; XIA, E.; RICHARDSON, A. Effect of age on the expression of antioxidant enzymes in male Fischer F344 rats. **Mechanisms of Ageing and Development**, Limerick, p.49-60, 1990.

RAO, M. V.; PALIYATH, G.; ORMROD, P.; MURR, D. P.; WATKINS, C. B. Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress and H₂O₂ –metabolizing enzymes. **Plant Physiology**, Lancaster, v.115, p.137-149, 1997.

RECKNAGEL, R. O.; GLENDE, E. A.; DOLAK, J. A.; WALLER, R. L. Mechanisms of carbon-tetrachloride toxicity. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v.43, n.1, p.139-154, 1989.

RYAN, E.; GALVIN, K.; O'CONNOR, T. P.; MAGUIRE, A. R.; O'BRIEN, N. M. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, Abingdon, v.57, n.3/4, p. 219-228, 2006.

SALLEH, M. N.; RUNNIE, I.; ROACH, P.; MOHAMED, S.; ABEYWARDENA, M. Y. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and up-regulation of low-density lipoprotein receptor in HepG2 cells by tropical plant extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p.3693-3697, 2002.

SANT'ANA, L. S.; MANCINI-FILHO, J. Ação antioxidante de extratos de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em filés de peixes da espécie pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.2, n.1, p.27-31, 1999.

SANT'ANA, L. S.; MANCINI-FILHO, J. Efeito da adição de antioxidantes *in vivo* na composição em ácidos graxos de filés de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) cultivados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.34, n.1, p.29-32, 1998.

SANT'ANA, L. S.; MANCINI-FILHO, J. Mecanismos da proteção oxidativa na utilização de antioxidantes *in vivo* em músculos animais. **Cadernos de Nutrição**, São Paulo, v.10, p.48-63, 1995.

- SANTOS, R. P.; SANTIAGO, A. A. X.; GADELHA, C. A. A.; CAJAZEIRAS, J. B.; CAVADA, B. S.; MARTINS, J. L.; OLIVEIRA, T. M.; BEZERRA, G. A.; SANTOS, R. P.; FREIRE, V. N. Production and characterization of the cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse ashes. **Journal of Food Process Engineering**, Malden, v.79, p.1432–1437, 2007.
- SANMUGAPRIYA, E.; VENKATARAMAN, S. Studies on hepatoprotective and antioxidant actions of *Strychnos potatorum* Linn. seeds on CCL₄-induced acute hepatic injury in experimental rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.105, p.154-160, 2006.
- SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.80, p.1094-1117, 2000.
- SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.130, p.2073S-2085S, 2000.
- SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols and the Prevention of Diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v.45, n.4, p.287-306, 2005.
- SCHONBAUM, G. R.; CHANCE, B. Catalase. In: CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, Killington, v.37, p.949-962, 1999.
- 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 Biology and Medicine**, New York, v.29, n.12, p.1222-1233, 2000.
- SHAHIDI, F.; ALASALVAR, C.; LIYANA-PATHIRANA, C. M. Antioxidant Phytochemicals in Hazelnut Kernel (*Corylus avellana* L.) and Hazelnut Byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, Publicado na Web: 24/01/2007.
- SIES, H.; KOCH, O. R.; MARTINO E.; BOVERIS A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.103 p287–290, 1979.
- SILVA, B. M.; ANDRADE, P. B.; VALENTAO, P.; FERRERES, F.; SEABRA, R. M.; FERREIRA, M. A. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: Antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.52, n.15, p.4705-4712, 2004.
- SIMIC, M. G. Mechanisms of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. In: LI, L.; NG, T. B.; GAO, W.; LI, W.; FU, M.; NIU, S. M.; ZHAO, L.; CHEN, R. R.; LIU, F. Antioxidant activity of garlic acid from rose flowers in senescence accelerated mice. **Life Sciences**, Oxford, v.77, p.230-240, 2005.

SRINIVASAN, M.; RUKKUMANI, R.; SUDHEER, A. R.; MENON, V. P. Ferulic acid, a natural protector against carbon tetrachloride-induced toxicity. **Publishing Fundamental & Clinical Pharmacology**, Oxon, v.19, p.491-496, 2005.

SOBRATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutation Research**, Amsterdam, v.579, p.200-13, 2005.

SOUZA FILHO, M. S. M. Aspectos da avaliação física, química, físico-química e aproveitamento industrial de diferentes clones de caju (*Anacardium occidentale*, L.). Dissertação de mestrado [Universidade Federal do Ceará]. 1987, 196p.

SOUZA, J. A. A.; OLIVERIA, H. R.; MIYASAKA, C. K.; GACEK, F.; TORRES, R. P.; MANCINI-FILHO, J.; CURI, R. Changes in the activities of antioxidant enzymes of the lymphoid organs of 21-day pregnant rats due to administration of fish oil by gavage. **General Pharmacology**, Exeter, v.29, n.4, p.551-555, 1997.

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

SWAIN, T.; HILLS, W. E. The phenolic constituents of *Punus domestica*. I-quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v.19, p.63-68, 1959.

TORRES, D. E. G.; MANCINI, D. A. P.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant activity of macambo (*Theobroma bicolor* L.) extracts. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v.104, p.278-281, 2002.

URSINI, F.; MAIORINO, M.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; AUMANN, K. D.; ROVEIRI, A.; SCHOMBURG, D.; FLOHÉ, L. Diversity of glutathione peroxidases. **Methods in Enzymology**, New York, v.252, p.38-53, 1995.

VAN BUREN, J. Fruit phenolics. In: HULME, A. C. (Ed.). **The Biochemistry of Fruits and their Products**. London: Academic Press, v.1, 1970, p.269-304.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.46, n.10, p. 4113-4117, 1998.

VISIOLI, F.; GALLI, C. The role of antioxidants in the Mediterranean diet. **Lipids**, Champaign, v.36, Suppl. S, p.S49-S52, 2001.

WANASUNDARA, U.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Isolation and identification of an antioxidative component in canola. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.42, n.6, p.1285-1290, 1994.

WANG, Y. C.; CHUANG, Y. C.; KU, Y. H. Quantitation of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan. **Food Chemistry**, Kidlington, v.102, p.1163–1171, 2007.

- WANG, S. Y.; FENG, R. T.; LU, Y. J.; BOWMAN, L.; DING, M. Inhibitory effect on activator protein-1, nuclear factor-kappa B, and cell transformation by extracts of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.53, n.10, p.4187-4193, 2005.
- WEBER, H. S.; SELIMI, D.; HUBER, G. Prevention of cardiovascular diseases and highly concentrated n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs). *Herz*, Munchen, v.31, n S3, p.24-30, 2006.
- WILLIAMS, J. T. The painless synergism of aspirin and opium. **Nature**, Basingstoke, v.390, p.557-559, 1997.
- WINTERBOURN, C.; GUTTERIDGE, J. M.; HALIWELL, B. Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O₂. **Journal of Free Radical Biological Medicine**, New York, p.43-49, 1985.
- WU, J.; GAO, H.; ZHAO, L.; LIAO, X.; CHEN F.; WANG, Z.; HU, X. Chemical compositional characterization of some apple cultivars. **Food Chemistry**, Barking, v.103, p. 88-93, 2007.
- YANISHLIEVA, N. V. I.; MARINOVA, E. M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food Chemistry**, Barking, v.54, n.4, p.377-382, 1995.
- YEH C. T.; YEN, G. C. Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, 136, p.11-15, 2006.
- YEH, C. T.; YEN, G. C. Effects of phenolics acids on human phenolsulfotransferases in relation to their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.51, p.1474-1479, 2003.
- ZAVODNIK, L. B.; ZAVODNIK, I. B.; LAPSHINA, E. A.; BELONOVSKAYA, E. B.; MARTINCHIK, D. I.; KRAVCHUK, R. I.; BRYSEWSKA, M.; REITER, R. J. Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats. **Cell Biochemistry and Function**, Chichester, v.23, n.5, p.353-359, 2005.
- ZHEN, M. C.; WANG Q.; HUANG, X. H.; CAO, L. Q.; CHEN, X. L., SUN, K.; LIU, Y. J.; LI, W.; ZHANG, L. J. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits oxidative damage and preventive effects on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, 2007. [Epub ahead of print].
- ZHENG, W., WANG, S. Y. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.49, p. 5165-5170, 2001.
- ZSCHOCKE, S.; DREWES, S. E.; PAULUS, K.; BAUER, R.; VAN STADEN, J. Analytical and pharmacological investigation of *Ocotea bullata* (black stinkwood) bark and leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.71, n.1-2, p.219-230, 2000.

8. ANEXOS

CEEA nº 24/2005

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Efeito de compostos fenólicos com atividade antioxidante do caju (Anacardium occidentale, L.) sobre o metabolismo lipídico de ácidos graxos polinsaturados” (Protocolo CEEA nº70), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). Elma Regina Silva de Andrade Wartha e do orientador(a) Jorge Mancini Filho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 20/06/2005.

São Paulo, 20 de junho de 2005.

*Profª. Associada Elfriede Marianne Bacchi
Coordenadora da CEEA*