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

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE SEMENTES DE MOSTARDA (*Brassica* alba, L.). I - IDENTIFICAÇÃO DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS RESPONSÁVEIS PELA INIBIÇÃO DA OXIDAÇÃO

Ana Vládia Bandeira Moreira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador: Prof. **Titular Jorge Mancini Filho**

SÃO PAULO
1999

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

Moreira, Ana Vládia Bandeira
M838a Avaliação da atividade antioxidante de sementes de mostarda (*Brassica alba*, L.). I - identificação dos principais compostos responsáveis pela inibição da oxidação / Ana Vládia Bandeira Moreira. -- São Paulo, 1999.
120p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Mancini Filho, Jorge

1. Antioxidante : Ciência dos alimentos 2. Especiarias : Manufatura I. T. II. Mancini Filho, Jorge, orientador.

641.19 CDD

Pensar sem aprender nos torna ineficientes;

e aprender sem pensar é um desastre

Confucio (Kung-Fu-Tsé) 551-478 a.c.

A Deus, pela vida.

Aos meus pais, pela caminhada
de sabedoria e autenticidade.

A meu irmão pela amizade, e lição de vida.

A meu "eterno namorado" e grande
amigo Márcio, pelo carinho, amor e
cumplicidade na conquista de ideais.

Aos amigos que conquistei, que por
felicidade tenho encontrado em todos
os momentos de minha vida.

A Dê Mafra, Karê, Tarcy, Lú e Manu
pela amizade cúmplice e eterna.

Ao "Batalhão Sertão", pelo referencial
de família, costumes e saudades.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Titular e orientador **Jorge Mancini Filho** pelo apoio, confiança, dedicação, amizade e compreensão, responsável pela continuidade de minha formação científica, mostrando-se acima de tudo, "um chefe" amável e solidário.

Ao **Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF/USP,** por ter me dado a opotunidade de ampliar meus conhecimentos da área e aplicá-los em minha prática profissional.

À **Universidade Estadual do Ceará**, pela oportunidade da formação acadêmica, início da carreira científica e apoio ao curso de Pós-Graduação.

Ao serviço de moradia **COSEAS** pela oportunidade de um espaço com convivências interculturais, alegres e espontâneas, que me proporcionou grande enriquecimento pessoal.

À **CAPES/PICDT/UECE** pelo apoio financeiro durante a minha Pós-Graduação.

À Bibliotecária **Adriana de Almeida Barreiros**, pela atenção e disponibilidade na revisão das referências bibliográficas.

À Professora **Eliana P. Miura**, pela compreensão e revisão cuidadosa do português deste trabalho.

Às Professoras **Úrsula Lanfer** e **Lígia Bicudo** pela oportunidade da prática do ensino, junto ao programa de aperfeiçoamento ao ensino (PAE).

Ao Professor **Fernando Moreno** pelo exemplo de disciplina e "amor" à arte do ensino".

À Professora **Sílvia Cozzolino**, pela atenção, carinho e amizade dispensadas em minha vivência no B14.

Ao Professor **Luiz Antônio Gioielli**, pelas ricas sugestões a este trabalho.

Aos demais Professores do B14, que serviram-me de estímulo a prática da Ciência dos Alimentos.

Às funcionárias **Ângela**, **Isabel** e **Mônica**, pela atenção sempre espontânea, funcional e alegre ao atendimento na secretaria, sendo o "cartão de entrada" do B14.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia, **Benedita (Benê)**, **Elaine (Elaáaine)** e **Jorge**, pelas informações, orientações e "dicas técnicas" sempre fornecidas com espontaneidade e atenção.

Às funcionárias **Lurdinha (Lú), Joana (Jú)** e **Sandrinha** pelo carinho e amizade.

Aos amigos do B14: **Gilberto, Dilina, Vanessa, Andréa Nicoletti, Selene, Patrícia, Luiz Henrique, Daniele, César, Fabiana, Alex, Rosa, Luiz** e **Rogério** pela amizade sincera e carinhosa. Obrigada!

À técnica de nível superior e grande amiga, **Rosângela (Rô),** pela disponibilidade e apoio incansável na execução das técnicas do laboratório.

Aos amigos do laboratório: **Nara, Denise, Flávia, Dora, Elaine, Léa, Sérgio Soares, Renatinha, Renata Basso, Sérgio (IO), Renata Assis, Fabiana** e **Mara**, pela convivência alegre, cheia de "troca de experiências" de vida e profissional.

As amigas, companheiras e referencial de luta e acolhimento em São Paulo: **Nara, Nágila, Soraya** e **Helena** pela amizade, apoio e exemplo de profissionalismo de uma carreira profissional tão nobre e cheia de desafios: o de " ser nutricionista".

Às amigas: **Anna Karenina, Tarciana, Manuela, Luciana** e **Sônia** (nossa mineirinha), que juntas formamos o "Batalhão Sertão", o nosso refúgio à terrinha... Obrigada pela amizade sincera e constante apoio!

Aos amigos **Van dokkun, Maryan, e Manar**, pelas trocas de culturas, pela sincera amizade e de poder mostrar um pouco da alegria contagiante de "ser brasileiro".

Aos amigos do Ceará, que sempre fizeram pequenos os 3000 Km de distância que nos separam.

Aos amigos: **Andréa, Ricardo, Aline, Eduardo, Gorete, Isabela, Raquel, "Serjão", Diogo, Erasmo, Rodolfo, Lú** (Marília), **Betinha, Marquinhos (Xii marquinhos), Pedro, Isabela Rosier e Joelma** pelos momentos descontraídos de amizade sincera, que deixarão saudades...

Às amigas e amigos de Natal: **Renata, Elma, Célia Márcia, Elaine, Vanuska, Filipe Bruno, Paulo, Ana, Lúcia e Vivaldo,** pelo apoio e amizade em meu futuro lar.

A meus familiares no Ceará: padrinhos, tios e primos pelo apoio e confiança.

A meus familiares de São Paulo: Tios e primos pelo carinho e acolhimento.

A família Marsolla: **Oracília, Adalberto, Amauri e Leni** e seus filhos **Loran, Vanessa, Jessica e Stefany** pelo carinho, atenção e acolhimento nas minhas idas e vindas à Campinas.

A **Denise Mafra**, pela amizade descontraída, cúmplice, cheia de aventuras, choros e risos, pelos amigos e famíla "Fortanopolitanos" conquistados, e acima de tudo por ser essa pessoa autêntica, de riso contagiante, onde "nem o céu é o limite"!

A minha "mainha" **Cleontina**, pelo seu SIM a maternidade e ter sido sempre essa pessoa de dedicação "ilimitada", amizade e cumplicidade; que junto ao meu "painho" **Solon** e ao meu irmão "**Dimi**" formamos uma família única, abençoada por Deus sem limites de distância. Obrigada por ser a "Aninha" de vocês, amada e protegida!

Ao meu "quase marido" **Márcio** pelo amor lapidado, cultivado e amadurecido para ser um alicerce sólido de um futuro cheio de "pedrinhas conquistadas". Obrigada por tornar meus dias tão especiais e inesquecíveis!

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, o meu sincero obrigada!

ÍNDICE

LISTA DE ILUSTRAÇÕES xii

RESUMO xviii

SUMMARY xx

1- INTRODUÇÃO 1

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 5

2.1- Oxidação lipídica em alimentos 5

2.2- Antioxidantes 10

2.2.1- Antioxidantes sintéticos X antioxidantes naturais 14

2.2.2- Antioxidantes sintéticos 17

2.2.3- Compostos fenólicos em alimentos 22

2.2.4- Antioxidantes fenólicos e radicais livres 25

2.2.5- Ácidos fenólicos, taninos e outras substâncias em mostarda 28

2.2.6- Perspectivas para a utilização de compostos fenólicos naturais em alimentos 33

3- OBJETIVO 37

4- MATERIAL E MÉTODOS 38

4.1- Material 38

4.1.1- Amostras 38

4.1.2- Reagentes

4.2 Métodos 39

4.2.1- Obtenção da farinha de sementes de mostarda 39

4.2.2- Determinação da composição centesimal 39

4.2.2.1- Determinação de umidade 39

4.2.2.2- Determinação de lipídeos totais 39

4.2.2.3- Determinação de proteína total 40

4.2.2.4- Determinação de cinza 41

4.2.2.5- Determinação da fração NIFEXT 41

4.2.3- Obtenção dos extratos 41

4.2.4- Determinação do peso seco dos extratos 42

4.2.5- Separação dos compostos fenólicos por CCD 42

4.2.6- Obtenção da fração lipídica 43

4.2.7- Determinação de ácidos graxos por CG 44

4.2.8- Determinação de compostos fenólicos 45

4.2.8.1- Fenólicos totais 45

4.2.8.2- Obtenção dos ácidos fenólicos livres, ligantes solúveis e insolúveis 46

4.2.8.2.1- Extrato de ácidos fenólicos livres 47

4.2.8.2.2- Extrato de ácidos fenólicos solúveis 47

4.2.8.2.3- Extrato de ácidos fenólicos insolúveis 48

4.2.8.3- Preparação da solução padrão de ácidos fenólicos 48

4.2.8.4- Silinização das frações livre, ésteres solúveis e ligantes insolúveis de ácidos fenólicos da farinha de semente de mostarda 49

4.2.9- Identificação dos ácidos fenólicos livres, ácidos fenólicos de ésteres solúveis e insolúveis por CG 50

4.2.10- Purificação de compostos fenólicos por cromatografia em camada delgada (CCD) para identificação por cromatografia a gás (CG) 50

4.2.11- Atividade antioxidante no sistema β-caroteno/ácido linoléico 51

4.2.12- Estudo cinético da atividade antioxidante no sistema β-caroteno/ácido linoléico 52

4.2.13- Atividade antioxidante em sistemas lipídicos 53

4.2.14- Efeito da concentração 54

4.2.15- Análise estatística 54

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO 55

5.1- Composição centesimal 55

5.2- Cromatografia em camada delgada (CCD) 56

5.3- Ácidos graxos de sementes de mostarda 60

5.4- Ácidos fenólicos 63

5.5- Ácidos fenólicos das frações livre, solúveis e insolúveis de sementes de mostarda identificados por CG 63

5.6- Atividade antioxidante 76

5.7 Atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos e seus ácidos isolados em sistemas lipídicos 94

6- CONCLUSÕES 101

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 103

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		Página
ESQUEMA 1	Esquema geral da autoxidação	07
ESQUEMA 2	Mudanças na cor, odor, textura, valor nutritivo e/ou toxidade dos alimentos	08
ESQUEMA 3	Pontos de intervenção por agentes quimiopreventivos, presentes nos antioxidantes naturais, no processo de carcinogênese	16
ESQUEMA 4	Estruturas do BHA e do BHT	17
ESQUEMA 5	Estruturas do TBHQ e do PG	18
ESQUEMA 6	Estruturas básicas de ácidos fenólicos de espécies de *Brassica*	29
ESQUEMA 7	Estruturas de unidades básicas de taninos condensados de espécies de *Brassica*	29
ESQUEMA 8	Procedimento de extração e separação de compostos fenólicos de frações livres, esterificadas e de resíduos de ácidos fenólicos para análises em coluna capilar de cromatografia gás-líquida	46
QUADRO 1	Especiarias com atividade antioxidante	36
QUADRO 2	Ácidos fenólicos utilizados para o preparo da solução padrão para análise cromatográfica	49
FIGURA 1	Possíveis mecanismos da participação dos lipídes nos danos ao endotélio e na produção de células espumosas ou "foam cell"	12
FIGURA 2	Modelo para cálculo de porcentagem de inibição da oxidação	52
FIGURA 3	Cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos da	58

	farinha de sementes de mostarda	
FIGURA 4	Cromatografia em camada delgada (CCD) das frações livre, solúvel e insolúvel da farinha de sementes de mostarda	59
FIGURA 5	Cromatograma dos principais ácidos graxos da farinha de sementes de mostarda	62
FIGURA 6	Cromatograma da fração livre da farinha de sementes de mostarda	70
FIGURA 7	Cromatograma da fração de ésteres solúveis da farinha de sementes de mostarda	71
FIGURA 8	Cromatograma da fração de ligantes insolúveis da farinha de sementes de mostarda	72
FIGURA 9	Cromatograma da fração livre de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda, purificada por cromatografia em camada delgada	73
FIGURA 10	Cromatograma da fração de ésteres solúveis de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda, purificada por cromatografia em camada delgada	74
FIGURA 11	Cromatograma da fração de ligantes insolúveis de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda, purificada por cromatografia em camada delgada	75
TABELA 1	Composição centesimal da farinha de sementes de mostarda	56
TABELA 2	Rf dos extratos da farinha de sementes de mostarda na CCD	58
TABELA 3	Rf das frações livre, ésteres solúveis e ligantes insolúveis da farinha de sementes de mostarda na CCD	59
TABELA 4	Composição dos ácidos graxos da fração lipídica da farinha de sementes de mostarda	61
TABELA 5	Concentração dos ácidos fenólicos identificados por cromatografia a gás	67

TABELA 6	Concentração dos ácidos fenólicos identificados por cromatografia a gás após separação prévia por cromatografia em camada delgada	69
TABELA 7	Porcentagem de inibição da oxidação dos extratos etéreo, alcoólico e aquoso da farinha de sementes de mostarda	77
TABELA 8	Porcentagem de inibição da oxidação dos antioxidantes sintéticos: BHT, BHA e Propil galato	78
TABELA 9	Porcentagem de inibição da oxidação das frações livre, ésteres solúveis e ligantes insolúveis de ácidos fenólicos 70da farinha de sementes de mostarda	80
TABELA 10	Atividade antioxidante das frações livre, ésteres solúveis e ligantes insolúveis, em comparação ao antioxidante sintéticos BHT, ao α-tocoferol e a uma mistura de padrões de ácidos fenólicos em diferentes concentrações	82
TABELA 11	Atividade antioxidante de alguns ácidos fenólicos presentes na farinha de sementes de mostarda	84
TABELA 12	Parâmetros cinéticos caracterizando a inibição da oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoléico pelos extratos da farinha de sementes de mostarda	93
TABELA 13	Parâmetros cinéticos caracterizando a inibição da oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoléico pelas frações de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda	94
TABELA 14	Valores dos índices de peróxidos, medidos pelo teste de *Schall*, da farinha de sementes de mostarda	96
TABELA 15	Valores dos índices de peróxidos, medidos pelo método do oxigênio ativo, da farinha de sementes de mostarda	97
TABELA 16	Valores das absorbâncias das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, medidos pelo teste de *Schall*, da farinha de sementes de mostarda	99

TABELA 17	Valores das absorbâncias das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, medidas pelo método do oxigênio ativo, da farinha de sementes de mostarda	99
GRÁFICO 1	Inibição da oxidação dos extratos etéreo, alcoólico e aquoso da farinha de sementes de mostarda	77
GRÁFICO 2	Inibição dos antioxidantes sintéticos: BHT, BHA e Propil galato em diferentes meios de solubilização	78
GRÁFICO 3	Inibição da oxidação das frações livre, ésteres solúveis e ligantes insolúveis da farinha de sementes de mostarda	81
GRÁFICO 4	Efeito da concentração dos ácidos fenólicos da fração livre no processo de inibição da oxidação	82
GRÁFICO 5	Atividade antioxidante das frações livre, solúvel e insolúvel em comparação a mistura de padrões de ácidos fenólicos, BHT e α-tocoferol em diferentes concentrações	83
GRÁFICO 6	Atividade antioxidante de alguns ácidos fenólicos presentes na farinha de sementes de mostarda	85
GRÁFICO 7	Atividade antioxidante do extrato etéreo da farinha de sementes de mostarda	87
GRÁFICO 8	Atividade antioxidante do extrato alcoólico da farinha de sementes de mostarda	87
GRÁFICO 9	Atividade antioxidante do extrato aquoso da farinha de sementes de mostarda	88
GRÁFICO 10	Atividade antioxidante da frações livre, solúvel e insolúvel da farinha de sementes de mostarda em comparação a mistura de padrões de ácidos fenólicos, BHT e o antioxidante natural α-tocoferol, em uma concentração de 5ppm	89
GRÁFICO 11	Atividade antioxidante da frações livre, solúvel e insolúvel da farinha de sementes de mostarda em comparação a mistura de padrões de ácidos fenólicos, BHT e o antioxidante natural	90

	α-tocoferol, em uma concentração de 10ppm	
GRÁFICO 12	Atividade antioxidante da frações livre, solúvel e insolúvel da farinha de sementes de mostarda em comparação a mistura de padrões de ácidos fenólicos, BHT e o antioxidante natural α-tocoferol, em uma concentração de 25ppm	90
GRÁFICO 13	Atividade antioxidante da frações livre, solúvel e insolúvel da farinha de sementes de mostarda em comparação a mistura de padrões de ácidos fenólicos, BHT e o antioxidante natural α-tocoferol, em uma concentração de 50ppm	
GRÁFICO 14	Atividade antioxidante da frações livre, solúvel e insolúvel da farinha de sementes de mostarda em comparação a mistura de padrões de ácidos fenólicos, BHT e o antioxidante natural α-tocoferol, em uma concentração de 100ppm	91
GRÁFICO 15	Atividade antioxidante da frações livre, solúvel e insolúvel da farinha de sementes de mostarda em comparação a mistura de padrões de ácidos fenólicos, BHT e o antioxidante natural α-tocoferol, em uma concentração de 200ppm	92
GRÁFICO 16	Atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda e de seus ácidos identificados idividualmente, pela medida do índice de peróxidos nas amostras de óleo de soja submetidas a oxidação pelo teste de *Schaal*	95
GRÁFICO 17	Atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda pela medida do índice de peróxidos nas amostras de óleo de soja medido pelo método do oxigênio ativo	95
GRÁFICO 18	Atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda e de seus ácidos identificados individualmente, pela presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nas amostras de óleo de soja	98

submetidos a oxidação pelo teste de *Schaal*

GRÁFICO 19 Atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda, pela presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nas amostras de óleo de soja submetidos a oxidação pelo método do oxigênio ativo 98

GRÁFICO 20 Atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda, pela formação de dienos conjugados, nas amostras de óleo de soja submetidas a oxidação pelo método do oxigênio ativo 100

RESUMO

Um dos principais problemas na conservação dos alimentos é a ocorrência de processos oxidativos. A oxidação dos alimentos se dá, principalmente, entre os lípides que os compõem.

O processo oxidativo induz à formação de substâncias que alteram as características sensoriais e nutricionais do alimento. Em estágios mais avançados a oxidação dos alimentos forma compostos que são prejudiciais ao organismo animal.

Entre as maneiras de se prevenir o processo oxidativo, destaca-se o emprego de antioxidantes. Estes, frequentemente, são substâncias sintéticas. Antioxidantes sintéticos são compostos fenólicos e a eles são atribuídas algumas particularidades indesejáveis, pois os mesmos podem interferir em alguns processos fisiológicos do organismo animal.

Com a perspectiva de substituição dos antioxidantes sintéticos, por substâncias naturais, diversos estudos têm sido realizados com os vegetais, usando a extração e identificação de compostos com atividade antioxidante.

Tendo em vista que os vegetais, das espécies de *Brassica*, apresentam elevadas concentrações de compostos fenólicos, este estudo teve por objetivo a detecção da presença da atividade antioxidante em diferentes extratos obtidos a partir de sementes de mostarda (*Brassica alba,* L.), onde o extrato aquoso foi apresentou melhor atividade antioxidante com 68,1% de inibição da oxidação. Em uma segunda etapa foi realizada a identificação dos ácidos fenólicos nas sementes de mostarda, aos quais se atribuiu a capacidade inibidora da oxidação. Foram identificados, através da cromatografia em fase gasosa, os seguintes ácidos fenólicos: salicílico, *trans* cinâmico, ρ-hidroxibenzóico, vanílico, gentíssico, quínico, ρ-cumárico, ferúlico, caféico, *cis* e *trans* sináptico e a catequina. O ácido ρ-hidroxibenóico foi o que apresentou maior em maior quantidade e com bom potencial de inibição da oxidação.

Os resultados obtidos, demonstraram a existência de elevada atividade antioxidante nas sementes de mostarda e infere-se, que no futuro, essa especiaria ou alguns de seus compostos isolados poderão vir a ser utilizados como antioxidantes no processamento de alimentos.

ABSTRACT

The oxidative process ia a problem in food conservation. It can occure frequently among the lipids and fatty acids.

Substances produced by the oxidative process promote modification in sensorial and nutritional food characteristics. During the oxidative process these substances may form compounds deleterious to animal organism.

Synthetic antioxidants are substances often used for the inhibition of the oxidation process. These substances are phenolic compounds and they can induce some toxic effects.

Many studies with vegetables have been done to identify natural antioxidants compounds by extracting and isolating these substances to replace them with sintetic antioxidants.

Once that *Brassica* species have high amounts of phenolic acids, the studies were focused on the phenolic acids evaluation with antioxidant activity in the extracts of mustard seeds (*Brassica alba*, L.), where the aqueous extract had the best antioxidant activity with 68,1% of oxidation inhibition. The second step was identify the phenolic acids in mustard seeds that have the capacity to inhibit oxidation. The phenolic acids found were: salycilic, *trans* cinnamic, ρ-hydroxybenzoic, vanilic, gentissic, quinic, ρ-coumaric, ferulic, caffeic, *cis* and *trans* sinapic and catequin. The ρ-hidroxybenzoic acid was identify with a high composition and with a good potential of oxidation inhibition.

The results obtained showed high antioxidant activity in mustard seeds. In the future this spice and its phenolic compounds might be used as antioxidants in food.

Introdução

1 - Introdução

Uma das maiores alterações que ocorre durante o processamento, distribuição, armazenamento e preparo dos alimentos é a oxidação. Dentre estas, a oxidação lipídica se destaca pois pode afetar a qualidade nutricional, segurança, cor, sabor, *flavor* e textura dos alimentos. As reações oxidativas, além de produzirem diminuição no valor nutricional dos alimentos, são também responsáveis pela formação de compostos potencialmente tóxicos e antinutricionais para os organismos humano e animal (KANAZAWA *et al.*, 1985; SHAHIDI & WANANSUNDARA, 1992).

No entanto existem substâncias com propriedades antioxidantes que são utilizadas no processamento de óleos e gorduras e em alimentos em geral que são capazes de retardar a oxidação lipídica. Os antioxidantes podem ser naturais, como o ácido ascórbico, o α-tocoferol e compostos fenólicos presentes nos alimentos, ou sintéticos como o hidroxianisolbutilado (BHA), o hidroxitoluenobutilado (BHT), os galatos de propila (PG), o terci-butilhidroquinona (TBHQ), entre outros.

Os antioxidantes sintéticos estão restritos a um máximo de 200 ppm pelos códigos bromatológicos de diversos países e seu uso tem sido, frequentemente monitorado, devido aos danos que os mesmos podem vir a provocar no organismo (BABICH, 1992).

Antioxidantes são substâncias que inibem a peroxidação lipídica, prevenindo a rancificação, podendo ser definidos como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, inibe, diminui ou previne a oxidação de substratos oxidáveis. O termo "substrato oxidável" inclui todas as substâncias encontradas em células, incluindo proteínas, lípides, carboidratos, DNA e outros componentes. (SIES, 1997).

Antioxidantes podem interferir no processo de oxidação por reagirem com radicais livres, quelando metais catalíticos e também por agirem como consumidores de oxigênio e doadores de hidrogênio. Compostos fenólicos podem interferir de forma eficiente na prevenção da oxidação; contudo, é pequeno o número compostos fenólicos sintéticos permitidos por lei como antioxidantes em alimentos, (SHAHIDI & WANANSUNDARA, 1992) pois, para sua aprovação pelos órgãos fiscalizadores são considerados, principalmente, seus potenciais de atividade e toxidade. Muitos fenólicos naturais vêm sendo aceitos como antioxidantes e são produzidos comercialmente, dentre estes estão os flavonóides (SHAHIDI & WANANSUNDARA, 1992).

Os mecanismos de ação antioxidante podem incluir:

- ☑ Remoção de O_2;
- ☑ Seqüestro de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio;
- ☑ Inibição da formação de EROS (substâncias reativas ao oxigênio) e/ou ERNS (substâncias reativas ao nitrogênio);
- ☑ Ligação com íons metálicos necessários para a catálise da formação de EROS;
- ☑ Regulação de defesas antioxidantes endógenas.

Quando EROS/ERNS são formadas *in vivo*, muitos antioxidantes podem participar, inibindo suas ações. A importância dos antioxidantes como agentes protetores dependem de (SIES, 1997):

- ☑ Quais os tipos de EROS/ERNS são formados;
- ☑ Como as EROS são geradas;
- ☑ Onde as EROS são geradas;
- ☑ Por qual alvo de destruição as EROS podem ser medidas.

Os compostos fenólicos em plantas têm sido muito estudados, por apresentarem atividades bioquímicas, farmacológicas, antinutricionais, anticarciongênicas (PLUMB *et al.*, 1996 & ABU-AMSHA *et al.*, 1996), e mais

especificamente a capacidade de inibir a oxidação e a proliferação de fungos (NAGEN *et al.*, 1992 & GAMACHE, 1993); assim como por participarem dos processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma em diversos alimentos (WHITING & COGGINS, 1975).

Atualmente, estudos vêm sendo direcionados para uso de antioxidantes naturais como, por exemplo, os compostos fenólicos presentes em especiarias (em substituição ou diminuição do uso dos antioxidantes sintéticos) com o objetivo de diminuir a possível formação de substâncias indesejáveis nos alimentos (PRATT, 1992).

Alguns trabalhos já relataram a importância de certas especiarias na preservação de lípides, como, por exemplo, o alecrim na prevenção da oxidação e aumento do tempo de exposição de pescados nas prateleiras (SANT'ANA, 1998).

Muitos trabalhos vêm sendo realizados para a identificação e caracterização desses compostos fenólicos, porém, existem vários problemas metodológicos, pois trata-se de uma gama muito grande de substâncias (fenóis simples, cumarinas, ácidos fenólicos, ligninas, taninos e flavonóides), que geralmente, são substâncias polares e, conseqüentemente, reativas e suscetíveis à ação de enzimas (MURPHY, 1978).

Os ácidos fenólicos pertencem ao grupo de compostos fenólicos. Há muitas dificuldades relacionadas com a sua análise: desde a extração até a escolha de uma metodologia adequada para separação, identificação e quantificação dos mesmos.

Os compostos fenólicos naturais apresentam elevado potencial antioxidante para serem utilizados na indústria alimentícia, uma vez que tanto impedem o processo oxidativo de nutrientes (como os lipídes de dietas), quanto inibem ou bloqueiam os processos oxidativos em sistemas biológicos. Há, portanto, a necessidade de um estudo mais claro dos compostos fenólicos presentes nas substâncias consumidas naturalmente, como as especiarias, nas quais se

encontram as do gênero *Brassica.*

A mostarda (*Brassica alba*, L.) A mostarda — planta do gênero *Brassica* — possui substâncias que conferem sabor aos alimentos. Devido a essa característica, possui amplo uso na indústria alimentícia como condimento e molhos especiais. O óleo de sua semente possui compostos com princípios farmacológicos de ação antineoplásica, porém apresenta substâncias irritantes e tóxicas ao organismo. A aplicação adequada dessas substâncias isoladas e purificadas na indústria alimentícia poderá determinar um maior ou menor consumo da mesma como produto industrializado de característica condimentar.

Revisão Bibliográfica

2 - Revisão Bibliográfica

2.1 - Oxidação lipídica em alimentos

Os lipídes são um grupo heterogêneo de compostos, que apresentam a propriedade de serem relativamente insolúveis na água e solúveis em solventes não polares como: éter, clorofórmio, hexano. Essas substâncias são constituintes importantes da dieta, não só pelos seus elevados valores energéticos, como também pelo transporte de vitaminas lipossolúveis e pelo fornecimento de ácidos graxos essenciais. Os lipídes, juntamente com proteínas e carboidratos, constituem a maioria dos compostos estruturais de todas as células vivas (MAYES, 1994). Porém, durante décadas, têm sido um centro de controvérsias sobre problemas nutricionais e seu papel na origem de certas doenças, muitas delas provindas de processos oxidativos (NAWAR, 1996).

Os triglicerídeos são as unidades fundamentais dos lipídes e são representados por ésteres de ácidos graxos com o glicerol. Os ácidos graxos que ocorrem nos triglicerídeos dos óleos e nas gorduras, usualmente, contêm número par de átomos de carbono, porque são formados por unidades de dois carbonos e derivados de cadeia linear. A cadeia pode estar saturada (sem a presença de duplas ligações) ou insaturada (contendo uma ou mais duplas ligações) (MAYES, 1994).

Os ácidos graxos formam um grupo de substâncias de grande susceptibilidade aos processos oxidativos, devido principalmente, a presença de insaturações, que devido a maior concentração eletrônica nos carbonos onde estão localizados, promove menor atração dos hidrogênios nos carbonos adjacentes. Esses hidrogênios podem ser retirados, mais facilmente, da cadeia dos ácidos graxos, levando a formação de um radical livre (KANNER *et al.* 1987).

A autoxidação é descrita como uma reação em cadeia, via radical livre, com as seguintes etapas: iniciação, propagação e término (esquema 1). Ela é uma das

maiores causas de degradação de alimentos. Essa característica é de grande interesse econômico para a industria alimentícia, devido a formação de odores desagradáveis (ranço), perda do valor nutricional e formação de produtos tóxicos ao organismo. Por outro lado, um certo grau de oxidação lipídica, em algumas condições, é por vezes desejável, como por exemplo, na produção de certos queijos ou aroma de fritura de alguns alimentos como batata frita ou churrascos (NAWAR, 1996).

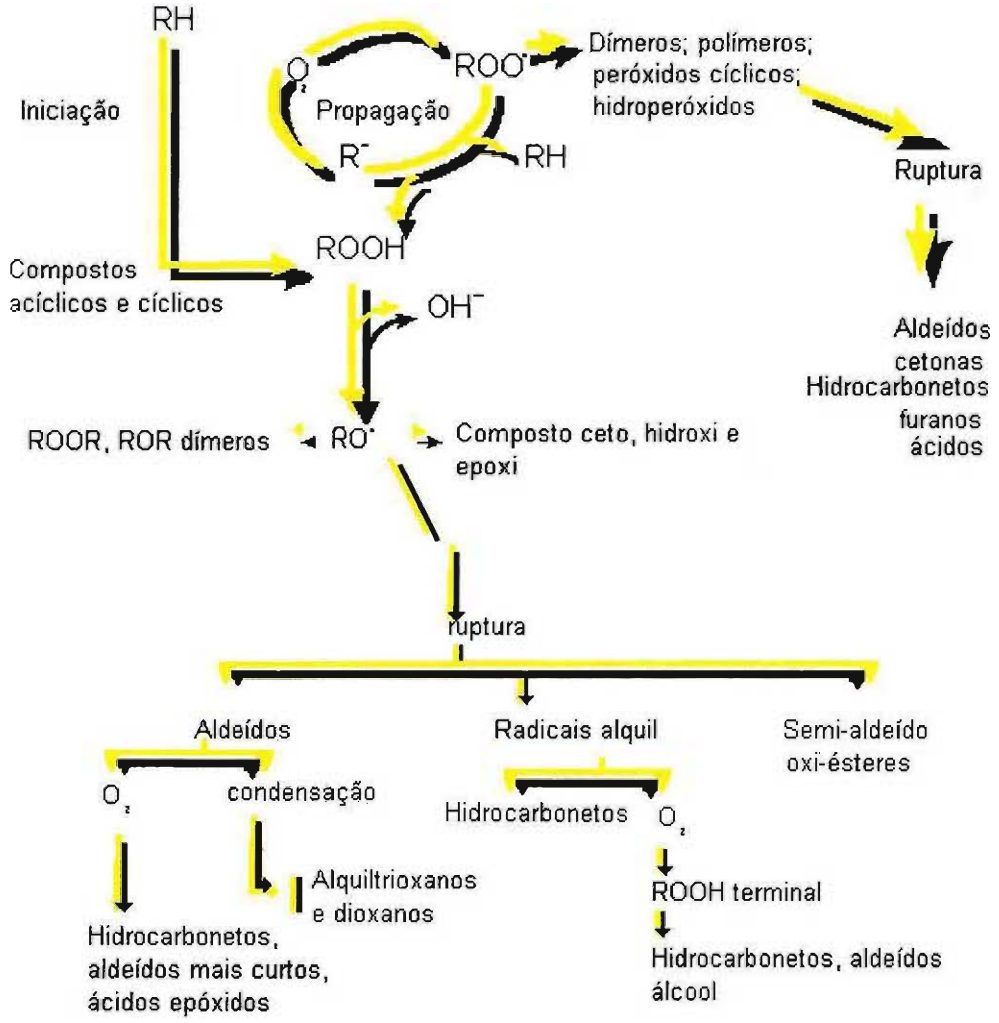
A rancificação é uma transformação que ocorre em lípides que contenham ácidos graxos insaturados e que podem sofrer oxidação, degradação e polimerização por um mecanismo de radicais livres. Desta transformação resultam aldeídos, cetonas, ácidos, álcoois, hidrocarbonetos, entre outros, responsáveis pelas características sensoriais e físico-químicas associadas a este tipo de rancificação. Na primeira fase (iniciação) em que não há cheiro ou gosto de ranço, formam-se os primeiros radicais livres; a segunda fase ou de propagação já apresenta cheiro e sabor e tendem a aumentar rapidamente. Também há um aumento da quantidade dos peróxidos e de seus produtos de decomposição; a terceira fase ou término, caracteriza-se por cheiros e sabores fortes, alterações da cor e da viscosidade dos lipídes, bem como da sua composição.

Ainda que a inibição completa da rancificação oxidativa não tenha sido até agora conseguida, é possível retardar essa transformação por períodos longos, de modo a permitir o consumo dos lipídes ou dos alimentos que os contêm, mesmo após seu armazenamento por muitos meses (BOBBIO & BOBBIO, 1992).

A autoxidação de lípides ocorre via mecanismo típico de radical livre, caracterizada pela existência de uma espécie que possa atacar e abstrair um átomo de hidrogênio de um grupamento metileno, deixando um elétron desemparelhado no carbono, dando início ao processo oxidativo (ERENEL *et al.*, 1993, SANT'ANA, 1998).

Após a iniciação, com a produção da espécie radicalar $R^{\bullet}$, ocorre a adição do oxigênio, resultando na produção de radical peroxila $ROO^{\bullet}$ e, esse em um processo

sequencial, retira hidrogênio de grupos α-metilênicos, de outras moléculas RH, para formar o hidroperóxido ROOH e um outro radical R•. O novo radical R• reage com o oxigênio e a reação se repete, caracterizando o processo de propagação da reação em cadeia da autoxidação lipídica (esquema 1) (NAWAR, 1996).



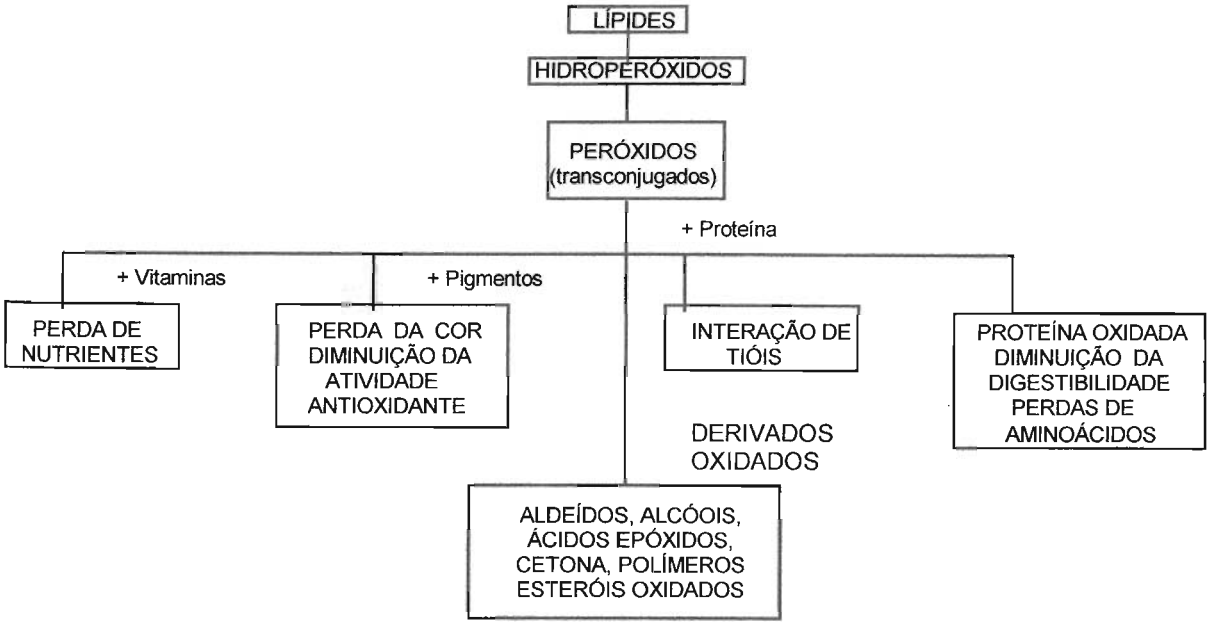
Esquema 1 - Esquema geral da autoxidação (NAWAR, 1996).

Um dos fatores mais discutidos na oxidação lipídica é a fonte primária de radicais iniciadores da peroxidação *in vivo* ou da autoxidação *in vitro* (PRYOR, 1978; KANNER & KINSELLA, 1983; KANNER *et al.*, 1987), que leva a formação de hidroperóxidos (produtos iniciais primários da autoxidação lipídica) que são altamente instáveis. Eles fazem parte de um número de reações complexas,

envolvendo degradação e interação com substratos (lípides, proteínas), resultando em compostos de vários pesos moleculares (NAWAR, 1996).

A autoxidação ocorre por dois caminhos: pela ativação do oxigênio, por um iniciador , com conseqüente formação de oxigênio "*singlet*" e incorporação desse na dupla ligação (LEE & MIN, 1990) e, pela formação das espécies reativas do oxigênio. Os termos "espécies reativas" do oxigênio e do nitrogênio, incluem então, radicais livres como: radical hidroxila ($^{\bullet}OH$); radical óxido nítrico ($^{\bullet}NO$); radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$); radical peroxila ($LOO^{\bullet}$), e não radicais, como: peróxido de hidrogênio (H_2O_2); ácido hipocloroso (HCLO); oxigênio "*singlet*" ($^1O_2$) e ozônio (O_3) (ARUOMA, 1993).

Os efeitos da oxidação lipídica em alimentos (esquema 2) podem ser resumidos em dois pontos básicos: as modificações de suas características sensoriais (cor, textura, sabor e odor) e bioquímicas, causando perda de nutrientes e/ou a formação de substâncias que podem ter ação tóxica, como aldeídos, álcoois, ácidos epóxidos, cetonas, polímeros e esteróis oxidados (FINLEY & GIVEN, 1986; KANNER, 1994; MIRANDA, 1997).



Esquema 2 - Mudanças na cor, odor, textura, valor nutritivo e/ou toxidade dos alimentos (MIRANDA, 1997). FONTE: FINLEY & GIVEN, 1986.

Há muitos fatores que influenciam a oxidação lipídica em alimentos: composição de ácidos graxos, concentração de oxigênio, temperatura, área de superfície, umidade, orientação molecular, estado físico, emulsificação, mobilidade molecular, transição vítrea, fatores pró-oxidantes, radiação e fatores antioxidantes.

O número, posição e geometria das duplas ligações afetam o processo oxidativo. Por exemplo, a proporção de oxidação para os ácidos araquidônico, linolênico, linoléico e oléico é aproximadamente 40:20:10:1, respectivamente. Já os ácidos de isomeria *Cis*, são mais reativos do que os de isomeria *Trans* e, os de duplas ligações conjugadas, são mais reativos do que os não conjugados. Autoxidação de ácidos graxos saturados é extremamente baixa à temperatura ambiente, permanecendo praticamente estáveis quando a rancidez oxidativa dos ácidos graxos insaturados passa a ser detectada (NAWAR, 1996).

Quando a concentração do oxigênio é alta, o processo oxidativo independe de sua concentração, mas em baixas concentrações, a velocidade deste processo passa a ser proporcional a concentração do oxigênio. Contudo, o efeito da concentração de oxigênio, também está influenciada, por outros fatores, como temperatura e área de superfície. Em geral a oxidação é proporcional à temperatura, que por sua vez, depende da pressão parcial de oxigênio. Esse fato é devido a baixa solubilidade do oxigênio em lípides em baixas temperaturas. A oxidação também está relacionada com a superfície de contacto sendo que, quanto maior a área do lipíde exposto ao ar, maior a sua susceptibilidade à deterioração oxidativa.

Em sistemas lipídicos, porém, a razão de oxidação depende fortemente da atividade de água ($A\omega$). Em alimentos desidratados (com baixo conteúdo de umidade) a $A\omega$ é inferior a 0.1 e, consequentemente, o processo oxidativo se dá rapidamente. Aumentando a atividade de água para 0.3 (valor protetor da monocamada) ocorre diminuição desta reação. Todavia, com atividades de água superiores a monocamada ($A\omega$ = 0.55 - 0.85) devido provavelmente, a uma maior mobilidade catalítica (água livre para as reações) a reação oxidativa, volta a aumentar.

Como visto nos dados de literatura, a reação de oxidação dos lipídes, mesmo para os insaturados, tem uma energia de ativação alta e sua ocorrência seria pouco provável, se não fosse pela presença de substâncias ou de fatores físicos que especificamente baixam esse nível ou permitem a transmissão de energia às moléculas, permitindo que a reação ocorra com relativa frequência e rapidez. Assim agem os prooxidantes, entre os quais temos: metais, pigmentos fotossensíveis e determinadas radiações, como a radiação γ (BOBBIO & BOBBIO, 1992).

Metais de transição, como cobre, cobalto, ferro, magnésio e níquel, que possuem dois ou mais estados de valência e bom potencial de oxi-redução, são efetivos pró-oxidantes. E quando estão presentes mesmo em baixas concentrações, podem aumentar o processo oxidativo. Metais pesados encontrados em óleos, podem ser provenientes do solo (oriundos da matéria-prima do óleo, como a soja) ou de equipamentos metálicos, utilizados no processamento ou durante o armazenamento. Entretanto, eles podem estar presentes naturalmente, em alimentos como ovos, leite e sucos de frutas, apresentando-se de maneira livre ou ligada (NAWAR, 1996).

Para controle desse processo, existem medidas químicas e físicas que servem de parâmetro de qualidade dos alimentos. Dentre os métodos mais utilizados, podemos citar: o índice de peróxidos, teste do ácido tiobarbitúrico, medida de compostos voláteis, espectrofotometria ultravioleta, índice de iodo, métodos cromatográficos (como a cromatografia em camada delgada), método do oxigênio ativo, teste de *Schaal* e métodos subjetivos, como análise sensorial, que mede, com precisão, alterações nas características organolépticas dos alimentos que sofreram oxidação.

2.2 - Antioxidantes

Uma substância antioxidante pode ser definida como composto ou substância química que inibe a oxidação ou, qualquer substância que, quando presente em

baixa concentração comparada à do substrato oxidável, diminui ou inibe significativamente a oxidação do mesmo (ABDALLA, 1993).

Métodos modernos de processamento de alimentos necessitam da adição de substâncias químicas para melhorar a qualidade e aumentar a vida de prateleira, os antioxidantes fazem parte de uma classe de substâncias químicas importante na adição em alimentos, tanto aqueles *in natura* como os processados. Eles não melhoram a qualidade do produto, mas permitem a prevenção da oxidação de componentes lábeis a oxidação sendo efetivos em baixas concentrações para a inibição de reações com radicais livres.

O processo oxidativo altera a qualidade final do alimento, além de formar compostos que podem ser nocivos ao organismo animal, daí a preocupação no estudo de substâncias que inibam ou diminuam a formação dessas substâncias.

Vários estudos vêm sendo desenvolvidos e mostram que os produtos da dieta podem ser absorvidos pelo organismo. MARQUEZ-RUIZ e colaboradores (1992) estudaram em ratos os efeitos de óleo de oliva termoxidados e concluíram que há diminuição tanto da digestibilidade, como na absorção das gorduras e aumento da excreção de insaponificáveis. Mais recentemente, MONAHAN *et al* (1994) observaram que suínos que consumiram na dieta óleo de milho oxidado, apresentaram maior peroxidação dos microssomas do que o controle e menor fluidez da membrana. Dos produtos de oxidação, os óxidos de colesterol são os que apresentam maiores efeitos biológicos, sendo associados diretamente como causa de patologias como a aterosclerose. O 25 hidroxicolesterol é o mais aterogênico de todos os óxidos do colesterol. Autores afirmam que o colesterol puro não é aterogênico e sim o 25 hidroxicolesterol, o α- e β-epóxidos, 5α-6β-triol e o β-colestano são altamente aterogênicos. Os possíveis mecanismos da participação dos lipídeos oxidados nos danos ao endotélio e na produção de células espumosas ou " foam cells", estão ilustrados na figura 1 (SCHWENKE, D.C., 1998).

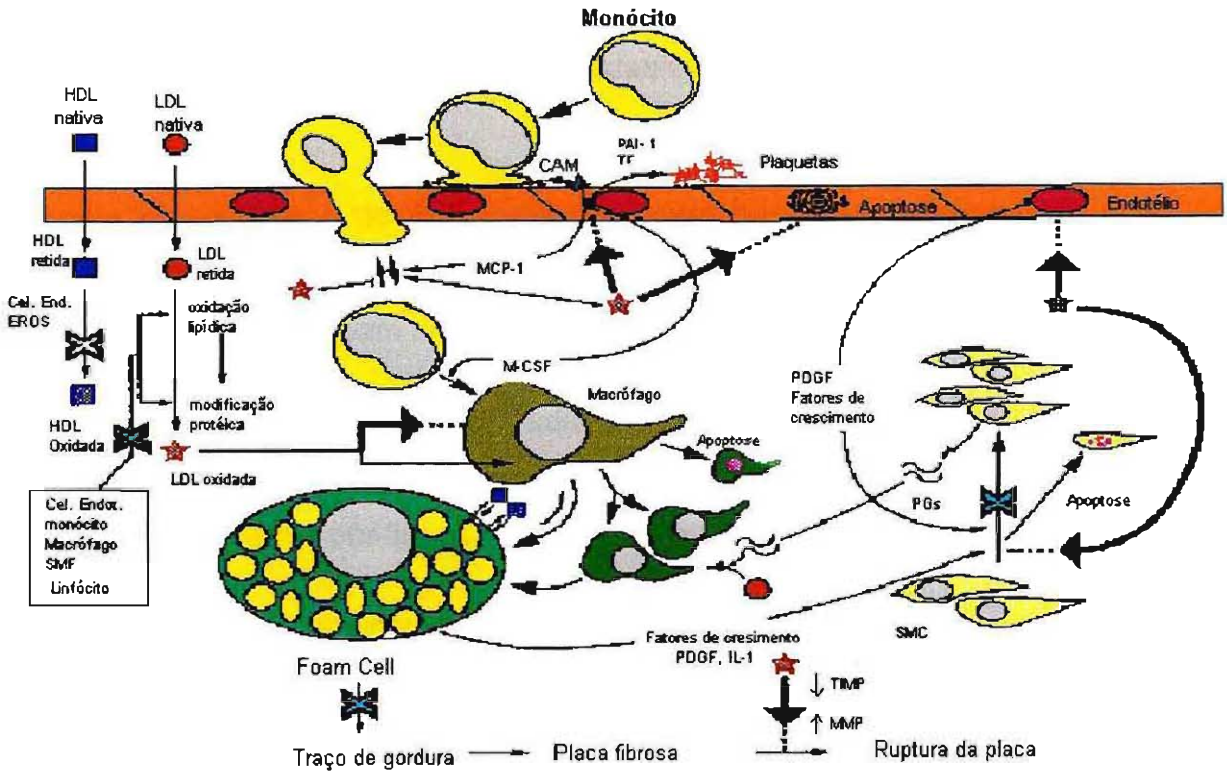


Figura 1 - Possíveis mecanismos da participação dos lipídeos oxidados nos danos ao endotélio e na produção de células espumosas ou " foam cell". FONTE: SCHWENKE, D.C., 1998.

Legenda: HDL- lipoproteína de alta densidade; LDL- lipoproteína de baixa densidade; CAM- molécula de adesão celular;PAI-1- inibidor 1 ativador de plasminogênio e TF-fato de atividade tecidual (liberados pelas células endotelias devido a presença da LDL oxidada); MCP-1- proteína quimiotática de monócitos; M-CSF- fator estimulante a colônia de monócitos; Pgs- proteoglicanas (formadas a partir da proliferação das células musculares lisas, levando a maior captação de LDL oxidada pelos macrófagos); SMC- células musculares lisas; PDGF e IL-1- fatores de crescimentos celular; MMP- metaloproteínas; TIMP- inibidor de metaloproteínas (quando diminuido pode promover ruptura de placas ateroscleróticas).

Os antioxidantes podem ser dividos em duas classes: os com atividade enzimática e os sem atividade. No primeiro grupo estão os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio. No segundo grupo estão moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação. Neste grupo incluem os antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos.

Com a finalidade de prevenir a autoxidação ou minimizar seus efeitos deteriorativos, pode se fazer uso de antioxidantes que podem ser classificados em três tipos:

- Tipo I - Bloqueadores de radicais livres, entre os quais, encontram-se como exemplos o BHA , o BHT, o propil galato e o α-tocoferol. Estes são compostos fenólicos simples que doam hidrogênio ao radical.

- Tipo II - Inibidores da formação de radicais, tais como agentes quelantes como o EDTA, o ácido cítrico, a lecitina e várias formas do ácido ascórbico. Estes últimos agem, principalmente, por ligação a metais catalíticos.

- Tipo III - Fatores ambientais: diminuição da pressão parcial de oxigênio nas embalagens de alimentos desidratados, atividade de água, temperatura e luz, entre outros.

Os antioxidantes do tipo I agem por quebra da reação em cadeia, através da remoção dos radicais alquil ou peroxil. Entre os antioxidantes dessa classe, encontram-se os compostos sintéticos que são utilizados, normalmente, na alimentação humana. No entanto, um dos problemas do emprego dessas substâncias está relacionado com a característica de solubilidade desses antioxidantes tanto no meio aquoso como no lipídico, podendo ter uma melhor atividade conforme o meio em que estejam presentes. O BHT (um antioxidante sintético hidrofílico), devido à sua grande estabilidade, é um bom sinergista quando combinado ao BHA. O tocoferol (antioxidante natural hidrofóbico) é encontrado em várias concentrações em alimentos, especialmente em plantas. E, dependendo da composição do alimento, pode-se utilizar um antioxidante que possua uma melhor estabilidade no meio.

Já os antioxidantes do tipo II, para uso em alimentos, agem quelando traços de metais e tornado-os menos reativos. A presença de metais em alimentos ou sistemas lipídicos reduz a energia de ativação para a iniciação. Isso tende a aumentar a reação de oxidação. Daí a importância da inativação ou remoção de

metais que apresentam mais de um estado de valência no processamento de alimentos. Um dos exemplos clássicos deste tipo de reação com metais é a reação catalizada pelo ferro:

$$Fe^{+2} \longleftrightarrow Fe^{+3} + e^{-} \qquad AH^{\bullet}$$

Por outro lado, os antioxidantes do tipo III não são utilizados para diminuir a reação de compostos específicos, e sim para controlar fatores ambientais. Por exemplo: a redução de níveis de oxigênio tem um efeito antioxidante, pois diminui a sua disponibilidade para a cinética oxidativa. Em adição a outros fatores ambientais (como umidade e temperatura), que também afetam a reação. Esses são fatores importantes para o controle da oxidação, principalmente, para as condições de armazenamento dos alimentos (LABUZA, 1971).

Como visto os antioxidantes sintéticos, são utilizados na prevenção dos processos oxidativos. Contudo, esses compostos podem agir de maneira pro-oxidativa, em certas condições. A atividade antioxidante ou prooxidante dos antioxidantes é dependente de fatores químicos e/ou físicos que determinem sua ação, como temperatura, solubilidade, potencial de redução de metais, entre outros. O controle desses fatores é que determinará o potencial antioxidante e uma melhor aplicação dessas substâncias em processos de conservação dos alimentos.

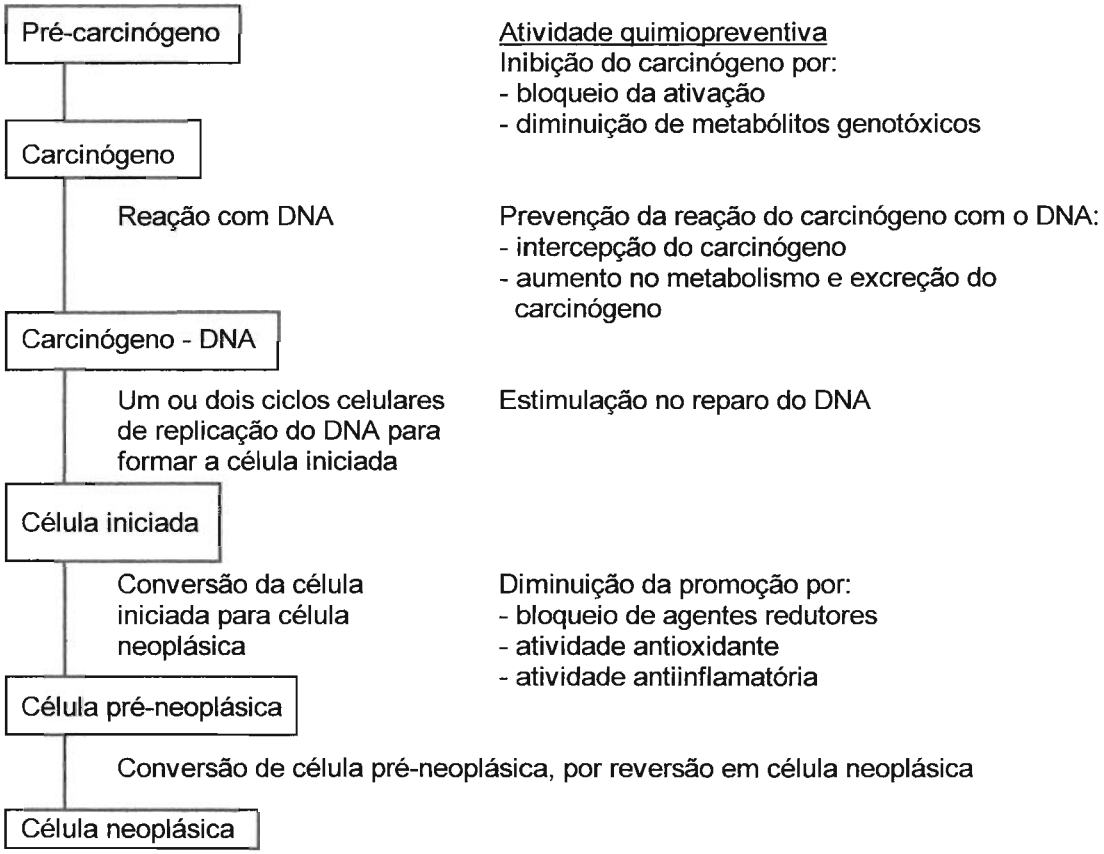
2.2.1 - Antioxidantes sintéticos X antioxidantes naturais

Como já descrito, antioxidantes são substâncias que retardam ou diminuem a velocidade da oxidação de materiais oxidáveis. Eles podem ser naturais ou sintéticos e, para serem utilizados em alimentos, devem cumprir certos requisitos, como ser seguro para a saúde. Os principais antioxidantes são os tocoferóis, ácidos fenólicos, ascorbato, β-caroteno, propil galato, BHA (hidroxianisolbutilado), BHT (hidroxi-toluenobutilado) e TBHQ (terci-butilhidroquinona). A eficácia dos antioxidantes está relacionada com: energia de ativação, constantes de velocidade e potencial de óxido-redução (NAWAR, 1996).

Uma substância, como um antioxidante, retarda as reações de oxidação quando inibe a formação de radicais livres (iniciação) ou quando interrompe a propagação das cadeias de radicais livres. A etapa de indução pode ser retardada por antioxidantes que desagregam peróxidos, antioxidantes complexantes ou por antioxidantes inibidores do oxigênio "*singlet*" (NAWAR, 1996).

PRATT & BIRAC (1979) sugeriram a utilização de compostos fenólicos naturais, já que os mesmos agem como aceptores de radicais livres, interrompendo a reação em cadeia provocada por esses radicais e, além disso, agem também nos processos oxidativos catalisados por metais. Para a tecnologia de óleos e gorduras, os compostos fenólicos naturais apresentam bom potencial antioxidante, podendo ser utilizados associados a antioxidantes sintéticos ou mesmo, substituí-los. DÚRAN & PADILLA (1993), vêm realizando estudos para verificar o potencial antioxidante dos fenólicos, com a tentativa de substituir os antioxidantes sintéticos, como o BHA, BHT, TBHQ e propil-galato. Diversas pesquisas tiveram por objetivo, encontrar produtos naturais com atividade antioxidante que permitissem substituir antioxidantes sintéticos (ou fazer associações entre eles), com o intuito de diminuir a quantidade dos mesmos (BRANEN, 1975; HIROSE *et al.*, 1986; OKUBO, 1997).

A literatura discute o fato da toxicidade aguda do BHT poder ser identificada somente em doses muito superiores àquelas consumidas normalmente pelo ser humano. Porém, pequenas doses sendo consumidas sistematicamente podem apresentar efeito cumulativo, induzindo a uma toxidez crônica em vários órgãos e sistemas, principalmente no fígado, provocando hipertrofia e hiperplasia, e nos pulmões, ali apresentando, além dos efeitos observados no fígado, uma desorganização generalizada dos componentes celulares (JORI, 1983; KEHRER & DIGIOVANNI, 1990). Por outro lado, os agentes quimiopreventivos (esquema 3) isolados de antioxidantes naturais, agem prevenindo lesões teciduais que poderiam levar à diferenciação celular (NAMIKI, 1990; HO, 1992).

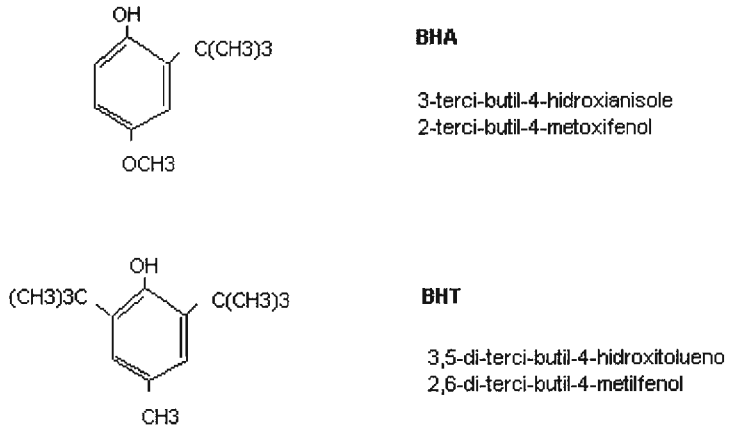


Esquema 3 - Pontos de intervenção por agentes quimiopreventivos, presentes em antioxidantes naturais, no processo de carcinogênese. FONTE: HO, 1992.

Tendo em vista os problemas observados em testes com animais que consumiram dietas contendo antioxidantes sintéticos e os riscos que o uso regular e/ou indiscriminado dessas substâncias pode oferecer ao ser humano, além de uma rejeição generalizada dos aditivos alimentares sintéticos, tem crescido o interesse de diversos centros de pesquisa em relação ao isolamento e à identificação de antioxidantes naturais, com a perspectiva da substituição parcial ou até mesmo total dos antioxidantes sintéticos em alimentos lipídicos. (PRATT & WATTS, 1964; TIAN & WHITE, 1994; YEN & CHEN, 1995; MIRANDA, 1997).

2.2.2 - Antioxidantes sintéticos

Os antioxidantes sintéticos mais usados na indústria de alimentos são: hidroxianisolbutilado (BHA), hidroxi-toluenobutilado (BHT), terci-butilhidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG).



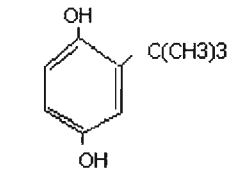
Esquema 4 - Estruturas do BHA e BHT. FONTE: SHAHIDI, 1992.

Inicialmente, o BHT foi sintetizado para ser utilizado na indústria de refinação de petróleo a fim de inibir o processo de oxidação. Atualmente, tanto o BHT como BHA são antioxidantes amplamente empregados em óleos e alimentos lipídicos. Apesar de serem eficientes e de seu baixo custo, esses antioxidantes possuem limitações devido a sua instabilidade em altas temperaturas e sua toxicidade pouco esclarecida (NAMIKI, 1990).

O emprego de antioxidantes sintéticos, como o BHT, vêm sendo questionado em função de suas possíveis ações deletérias ao organismo. Alguns estudos estão sendo direcionados para garantir a segurança, como também verificar as possíveis ações mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas dos antioxidantes sintéticos em alimentos, com resultados ainda controversos, dificultando assim o estabelecimento

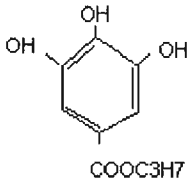
de um valor adequado para ingestão diária aceitável (IDA) (BRANEN, 1975; JORI, 1983; KEHRER & DIGIOVANNI, 1990; SHIBATA *et al.*, 1993; WILLIAMS, 1992).

O BHA e o BHT são considerados seguros dentro da classificação estabelecida pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos; o mesmo ocorrendo com o TBHQ e PG, desde que o total do antioxidante ou da mistura dos antioxidantes, no alimento, não seja superior a 200 ppm do conteúdo lipídico (COULTER, 1988). Contudo, outros trabalhos têm direcionados os efeitos de cada um dos antioxidantes sintéticos tradicionalmente utilizados na indústria alimentícia (WURTZEN, 1990), porém faz-se necessário uma avaliação individualizada para a determinação da ingestão diária aceitável — IDA.



TBHQ

Terci-butilhidroquinona



PG

3,4,5-trihidroxipropilbenzoato

Esquema 5 - Estruturas do TBHQ e PG. FONTE: SHAHIDI, 1992.

VAN der HEIJDEN e colaboradores (1986) concluíram que não há evidências da ação mutagênica ou carcinogênica do galato de propila. Todavia, foi verificado uma sensibilização da pele e casos de dermatites após seu consumo repetido (WURTZEN, 1990). A Ingestão diária aceitável para o galato de propila foi estabelecida — em 1987, pela FAO/WHO *Join Expert Committee on Food Aditives* (JECFA) — de 0-2,5 mg/kg peso vivo/dia. No mesmo período, o *European Economic Comunity Scientific Committee for Food* (SCF) estabeleceu uma IDA de 0-0,5 mg/kg

peso vivo/dia, para todos os galatos, com mesmo fator de segurança (WURTZEN, 1990).

Outro antioxidante sintético, o TBHQ, foi estudado por HAGEMAN e colaboradores (1988), onde sua mutagenicidade não foi detectada (quando em quantidades inferiores a 100 ppm) no teste da Salmonella induzida com microssomo hepático de linhagens de ratos mais sensíveis.

Por sua vez, o BHA através de estudos em estômago de roedores (SHIBATA, 1993; WHYSNER, 1994), teve sua IDA estabelecida em 0-0.5 mg/kg peso vida/dia, pelo JECFA, no ano de 1989 (WURTZEN, 1990). Embora tenha sido reconhecido como seguro, experimentos com este antioxidante têm demonstrado resultados controversos no que se refere ao seu potencial mutagênico e carcinogênico. A mutagenicidade do BHA, testada por HAGEMAN (1988) e WILLIAMS (1992) não foi comprovada em testes *in vitro*. Entretanto, SHELEF & CHIN (1980) verificaram que o BHA, assim como o BHT, quando usados em concentração superior a 200 ppm, aumentaram significativamente a atividade mutagênica, mesmo em baixas concentrações da aflatoxina B1 sobre linhagens de *Salmonella typhimurium*.

O potencial tóxico do BHA parece estar relacionado não ao BHA em si, mas aos produtos do seu metabolismo no organismo. A ativação metabólica do BHA para a forma hidroquinona eleva a produção de espécies reativas de oxigênio, principalmente do íon superóxido (KAHL *et al.*, 1989; SGARAGLI *et al.*, 1993). Em decorrência de peroxidação lipídica, nas células epiteliais, a estrutura do DNA é alterada e, em alguns casos, leva à subseqüente morte celular e aumento compensatório da síntese de DNA. Muitos dos danos de DNA levam a um início de processos de diferenciação celular (HO, 1992).

Considerando que os humanos não apresentam estômago anterior e que o epitélio desse órgão se assemelha ao do esôfago, estudos foram realizados observando o efeito do BHA na indução de tumores no esôfago e pode-se concluir que a mucosa esofageana responde pouco em termos de mudança hiperplásicas e neoplásicas induzidas pelo BHA, possivelmente, devido à rápida velocidade de

trânsito do alimento. No entanto, apesar da concentração, ser centenas de vezes maior que a ingestão diária aceitável de BHA, sem efeito visível para hiperplasia da mucosa esofageana, outros estudos se fazem necessários para uma avaliação toxicológica mais segura para humanos (GRICE, 1988).

Estudos de SGARAGLI e colaboradores (1993) sobre os efeitos tóxicos do BHA na musculatura intestinal, quando administrado intraperitonealmente. Os resultados mostram uma perda de atividade contrátil que pode chegar a interromper o trânsito intestinal. Tal fato, segundo os autores, se deve ao efeito deste composto no esqueleto de células musculares lisas, isto é, fragmentação miofibrilar e necrose celular.

De acordo com WHYSNER e colaboradores (1994), muitos estudos disponíveis envolvendo epitélio esofageano foram de duração insuficiente para descartar a hipótese de efeito indutor à tumorigênese do BHA. Outro aspecto importante é destacado por VERHAGEN e colaboradores (1989) que, ao estudar comparativamente o metabolismo do BHA em ratos e humanos concluíram haver diferenças metabólicas consideráveis entre eles, o que impede a extrapolação de resultados de um organismo para outro. Segundo esses autores, a concentração plasmática de BHA não diferiu significativamente quando da administração por via oral de 200 mg BHA/kg de peso vivo para ratos e de 0,5 mg BHA/kg de peso vivo (400 vezes menos) para humanos, o que demonstra a absorção mais eficiente do BHA nesses últimos. Isso também é verificado na recuperação do BHA e metabólitos após quatro dias da administração por via oral, que chega a 95% + 10% para ratos e 49% + 7% para humanos.

BABICH (1992) avaliou a ação teratogênica do BHT em ratos e verificou que esse não causa malformações esqueléticas no feto, podendo, contudo, causar alterações comportamentais, reduzindo significativamente o desenvolvimento somático e neurológico, com níveis decrescentes de serotonina e da atividade da colinesterase cerebral, substâncias responsáveis por reações como sono reduzido, hiperatividade dos recém-nascidos, elevada agressividade e severa deficiência de aprendizagem.

Tanto para o BHT como para o BHA, os resultados experimentais provenientes do uso de animais de laboratório não podem ser simplesmente extrapolados para seres humanos. Nesse sentido, VERHAGEN e colaboradores (1989) também estudaram o metabolismo do BHT em ratos e em humanos, concluindo que há diferenças metabólicas entre roedores e humanos, o que impossibilita uma recomendação segura do consumo de BHT para humanos a partir de ensaios com roedores.

Em estudos experimentais, de clivagem de DNA por metabólitos do BHT *in vitro*, foi verificado que o complexo BHT-quinona apresenta efeito mutagênico, através da produção de espécies reativas de oxigênio, e que tal fato pode ser relevante para a genotoxicidade do BHT *in vivo* (NAGAI *et al,* 1993). Nos pulmões, a ativação metabólica do BHT leva também à produção de espécies reativas de oxigênio, com conseqüentes danos ao órgão, principalmente, hiperplasia e fibrose pulmonar (BOLTON *et al.*, 1993; KEHRER & DIGIOVANNI, 1990). Segundo estes autores, a pneumotoxicidade e atividade tumorigênica do BHT requerem necessariamente a biotransformação *in vivo*.

Outros compostos fenólicos como TBHQ (terci-butilhidroquinona) DTBHQ (2,5, di-terci-butilhidroquinona), assim como o próprio BHA (3-terci-butil-4-hidroanisol) têm sido examinados como preventivos de danos do DNA (OKUBO *et al.*, 1997). Devido a esses resultados, um tanto divergentes em suas ações deletérias e/ou preventivas, têm-se também pesquisado muito sobre antioxidantes fenólicos naturais, com a perspectiva da substituição parcial ou até mesmo total dos antioxidantes sintéticos em alimentos lipídicos.

2.2.3 - Compostos fenólicos em alimentos

Compostos fenólicos são uns dos maiores grupos de componentes dietéticos, não essenciais, que têm sido associados com a inibição da oxidação em alimentos e em sistemas biológicos, por inibição da aterosclerose e câncer (HUANG & FERRARO, 1992). Essa ação em sistemas *in vivo* e *in vitro*, é devido a capacidade destes compostos de quelarem metais, inibir lipoxigenases e sequestrar radicais livres (DECKER, 1997).

MORGAN *et al* (1997) estudando ácidos fenólicos em feijões, verificou que a inibição da oxidação em certos sistemas (método ferrozina), não é verdade para todos os sistemas, explicando o fato de que os ácidos fenólicos, como muitos antioxidantes naturais, são específicos em alguns sistemas, depedendo do meio de seu local de ação. A atividade antioxidante dessas substâncias está relacionada a alguns fatores como o pH (MORGAN, 1997), solubilidade (FRANKEL, 1994) e do grau de insaturação em meio lipídico (YANISHLIEVA & MARINOVA, 1994).

Além da classificação dos compostos fenólicos frente as condições de pH, solubilidade e grau de insaturação, há a classificação clássica de RIBÉREAU - GAYON (1968) que separou os compostos fenólicos em três grupos: a) família dos compostos fenólicos pouco distribuídos na natureza; b) família dos compostos fenólicos presentes na natureza na forma de polímeros; c) compostos fenólicos largamente distribuídos na natureza. Eles se caracterizam pela presença de um anel benzênico com uma ou mais hidroxilas e/ou outros grupamentos ligados

O primeiro grupo, os dos poucos presentes na natureza, estão os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona e o resorcinol. A essa família também pertencem os aldeídos derivados dos ácidos benzóicos que são constituintes dos óleos essenciais (ρ-hidroxibenzóico aldeído, vanilina e aldeído siríngico). Também podem ser encontrados os álcoois derivados dos ácidos benzóicos (álcool salicílico e gentíssico).

No segundo grupo, na forma de polímeros estão os taninos e as ligninas. Os primeiros conferem ao alimento a sensação de adstringência. Já as ligninas são polímeros complexos de grande rigidez e resistência mecânica. Por outro lado, os flavonóides e derivados e ácidos fenólicos (ácido benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas, são compostos fenólicos amplamente presentes na natureza, constituindo o terceiro grupo de compostos fenólicos, que por vezes, podem estar presentes, todos, em uma única planta.

Os compostos fenólicos estão associados à qualidade sensorial e nutricional dos alimentos. O escurecimento enzimático, catalizado pela enzima polifenoloxidase, é um exemplo importante para o processamento de frutas e hortaliças, devido a formação de cores e sabores desagradáveis no produto acabado, além da perda de nutrientes (HO, 1992).

Estudos da efetividade de ácidos fenólicos em sistema lipídicos (YANISHLIEVA & MARINOVA, 1995) constataram que os ácidos fenólicos como o ρ-hidroxibenzóico, ferúlico, sináptico e caféico, possuem potenciais distintos nos meios lipídicos testados, no óleo de girassol e no metil éster de óleo de girassol. Os autores concluem que a atividade antioxidante destes compostos está relacionado com a insaturação dos ácidos graxos dos triacilgliceróis testados, onde os ácidos fenólicos mostraram maior efetividade na inibição da oxidação de triglicerídeos do que de metil ésteres, devido a contribuição dos radicais iniciadores e propagadores da reação oxidativa ser menor para os triglicerídeos.

Entretanto, outros estudos direcionados para compostos fenólicos em sistemas lipídicos (oléo), através de métodos empregando o Rancimat®, verificaram que os ácidos protocatequínico, cafeíco, ferúlico, gálico e sináptico possuem boa atividade antioxidante nesse sistema (PRATT, 1992). No entanto, tais ácidos fenólicos possuem baixa solubilidade em sistemas lipídicos, limitando (parcialmente) sua utilização e seu potencial antioxidante. Contudo, esses compostos podem ser modificados para que se tornem lipossolúveis através de métodos de alquilação ou esterificação com ácidos graxos de cadeia longa ou álcoois (PRATT, 1992).

Estudos direcionados para comparação de atividade antioxidante do ácido caféico com BHA e BHT mostraram que este ácido fenólico, isolado da fração polar do óleo de oliva extra virgem, apresentou atividade antioxidante significativamente maior que o BHT (PAPADOPOULOS & BOSKOU, 1991). Também foram realizados estudos para avaliar o potencial antioxidante de ácidos fenólicos presentes em extratos de casca de batata. Todos os extratos obtidos apresentaram atividade antioxidante, porém, potencialmente menor em comparação ao BHT. (ONYENEHO & HETTIARACHCHY, 1993).

Outra característica importante para o potencial protetor dos compostos fenólicos, é atribuída a suas estruturas. Uma delas é a presença de grupos hidroxila e de anéis aromáticos , que estabilizam estas substâncias no processo oxidativo. A catequina e a quercetina são compostos fenólicos muito estudados pelo seu potencial antioxidante e, por serem de fontes natuais como frutas cítricas (maçã), vegetais (cebola) e especiarias(mostarda), com uma IDA de 20mg a 1g/dia. Estes flavonóides agem principalmente na inativação de radicais peroxila, prevenindo as consequências deletérias de suas reações, inibindo os efeitos da peroxidação lipídica e da oxidação da LDL *in vivo*, as quais são as principais causas de processos crônico-degenerativos, como a aterosclerose (RICE-EVANS, 1996). Por outro lado, os ácidos fenólicos possue sua atividade antioxidante, também relacionada a presença de hidroxilas, anel benzênico e de suas posições isoméricas, que são distintas para um determinado ácido nas posições ρ (para), o (orto) ou ***m*** (meta), como o ácido cumárico, que possuem potencial de inbição da oxidação distintos nessas posições, sendo mais efetivo na posição o (orto) ou ***m*** (meta) (RICE-EVANS, 1996).

Muitos aditivos alimentares, de uso específico como a *Spirulina maxima* (uma microalga rica em proteína e outros nutrientes essenciais, usada como inibidor do apetite) teve seu potencial antioxidante testado *in vitro* e *in vivo*, mostrando bom potencial antioxidante em ambos os sitemas testados (MIRANDA *et al,* 1998).

Embora essas substâncias tenham seus efeitos comprovados pela literatura, mais estudos de biodisponibilidade precisam ser realizados, para que se tenha

novos dados mais precisos sobre suas aplicações. Nesse sentido, estudo recente de biodisponibilidade, foi realizado com extratos de alecrim e de orégano, onde foram obtidos valores reais da atividade antioxidante *in vivo* (em ratos) destes componentes alimentares (CINTRA, 1999).

2.2.4 - Antioxidantes fenólicos e radicais livres

Estudos comparando hábitos alimentares de alguns países da Europa e do Mediterrâneo em relação a morbidade e mortalidade por doenças coronarianas, apontam que na dieta do Mediterrâneo, onde há consumo regular de vinho, pode-se verificar diminuição da incidência de doenças coronarianas. O consumo de vinho, nestas populações, está justificado pela presença de compostos fenólicos que podem atuar como seqüestradores de radicais livres e inibir a peroxidação lipídica *in vitro* e *in vivo*. Dos compostos fenólicos presentes no vinho, destacam-se os flavonóides, que mostraram inibir a oxidação da LDL, a síntese de eicosanóides, a agregação plaquetária e promoveram a formação do fator de relaxamento endotelial dependente de óxido nítrico (ABU-AMSHA *et al.*, 1996; LUGASI, 1997).

Os antioxidantes naturais estão ligados diretamente a processos de envelhecimento, por diminuição ou inibição de processos degenerativos, como estresse oxidativo, câncer e aterosclerose.

Dietas ricas em componentes naturais como raízes, especiarias, frutas, cereais, verduras, ervas e cascas são típicos de países como Japão, onde há dados epidemiológicos que mostram que essas populações apresentaram baixos índices de doenças ligadas ao envelhecimento precoce (RAMARATHNAM *et al*, 1995).

Uma característica das dietas orientais é o alto consumo de chá verde (bebida típica do Japão e originária da China a 800 anos Ac) que além da presença de ácidos fenólicos e taninos, há a presença de flavonóides, que tiveram seus efeitos comprovados na inibição de câncer e aterosclerose. Seu componente principal é a catequina, que foi identificada e quantificada no seu extrato e testada

em experimentos *in vivo* e *in vitro* para verificar seu potencial antioxidante (RAMARATHNAM *et al*, 1995).

Teoflavinas (dímeros da catequinas formadas durante o processamento do chá preto) são outros componentes identificados na dieta do mediterrâneo e de países orientais, que possuem forte potencial antioxidante por inibição de lesões de DNA (RAMARATHNAM *et al*, 1995, ABU-AMSHA *et al.*, 1996).

Juntamente aos componentes dos chás, há os ácidos fenólicos presentes em cereais e especiarias, que tiveram seu consumo aumentado, após efeito comprovado na prevenção de doenças cronico-degenerativas (RAMARATHNAM *et al*, 1995).

Outro composto fenólico em estudo é a curcumina, que foi indicada como um antioxidante fenólico com atividade anti-inflamatória, anti-carcinogênica e inibidora da indução da óxido nítrico sintetase em macrófagos ativados e atuam também como um potente seqüestrador de radicais livres (SOSULSKI, 1979). Fratexina é um antioxidante fenólico que também foi investigado, como protetora da oxidação da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa selênio peroxidase (GR). O tratamento com fraxetina, como antioxidante, indicada como protetor a atuação dos radicais livres, diminuindo as doenças degenerativas da idade (OKUBO *et al.*, 1997). Estudos relacionando efeitos dose-dependente indicaram que o ácido caféico foi o antioxidante mais ativo com um índice de concentração (IC) 50<1 mμmol/l para a oxidação da LDL induzida por cobre. O ácido caféico (1mumol/L) inibiu significativamente a formação de hidroperóxidos lipídicos, enquanto retardava o consumo de α-tocoferol (KATO, 1996).

A atividade antioxidante do cravo (*Pimenta officinalis,* L.) foi determinada por inibição de MDA (malonaldeído) da 2-deoxiribose e da hidroxilação do benzoato na reação de Fenton em membranas de eritrócitos de coelhos (OYA, 1997).

Produtos finais da reação de escurecimento não enzimático, como os produtos de *Amadori*, na reção de glicação no diabetes mellitus, estão sendo

postulados como marcadores fisiológicos da reação de *Maillard* em sistemas biológicos. Algumas espécies radicais, inclindo oxigênio, pode participar desses processos (OYA, 1997). Além dos produtos de *Amadori* (reação de *Maillard*) há outros marcadores fisiológicos utilizados para regulação da peroxidação lipídica *in vitro* e *in vivo* como MDA, LDL oxidada, isoprotanos, formas oxidada de colesterol (7-ketocolesterol e 7β-hidroxicolesterol) estado redox de ubiquinol-10 e autoanticorpo para LDL oxidada (SCHWENKE, 1998).

Esses componentes inibidores de peroxidação lipídica têm ação direta com enzimas em sistemas biológicos, as quais agem previnindo a decomposição de hidroperóxidos por radicais livres, assim reduzindo a oxidação (glutationa peroxidase). Outras enzimas porém, são importantes na redução de níveis do oxigênio ativo com potencial para iniciar a peroxidação lipídica (superóxido dismutase e catalase). A superóxido dismutase citossólica, dependente de cobre e zinco e, superóxido dismutase mitocondrial dependente de magnésio, converte o ânion superóxido a peróxido de hidrogênio, enquanto a catalase, dependente do ferro, converte o peróxido de hidrogênio a água (SCHWENKE, 1998).

Componentes como o β-caroteno agem inibindo o oxigênio *singlet* e interage, sinergicamente, com a vitamina E para inibir a peroxidação lipídica. Outros constituintes fenólicos em alimentos, tais como, flavonóides, podem também, reduzir o estresse oxidativo (SCHWENKE, 1998).

Para que os compostos fenólicos sejam considerados antioxidantes e desempenhem seu papel biológico é necessário, portanto, que eles obedeçam a duas condições básicas: primeiro (quando presente em baixas concentrações), que sejam capazes de inibir, retardar, prevenir a autoxidação ou oxidação mediada por radicais livres; segundo, que o produto formado após o seqüestro do radical seja estável (RICE-EVANS *et al.*,1996).

Assim, vários nutrientes antioxidantes, principalmente os compostos fenólicos, contribuem para atividade antioxidante de membranas, citossol, e outros compartimentos celulares do corpo. Além do mais, uma combinação de

antioxidantes com diferentes sítios e mecanismos de ação podem fornecer uma inibição mais efetiva do que um antioxidante utilizado isoladamente e assim ser mais um inibidor efetivo de doenças cronico-degenerativas e favorecer a saúde.

2.2.5 - Ácidos fenólicos, taninos e outras substâncias em mostarda

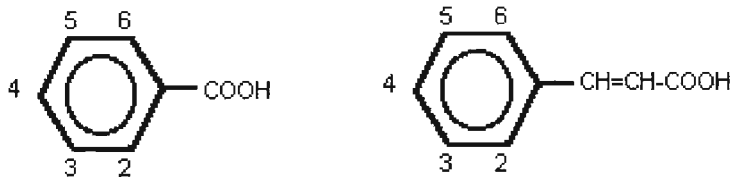
Compostos fenólicos, incluindo fenóis simples e ácidos fenólicos, derivados de ácido hidroxicinâmico e flavonóides, são substâncias bioativas que ocorrem amplamente em alimentos de origem vegetal. Usualmente são associados à qualidade nutricional e características sensoriais de alimentos *in natura* e industrializados. Muitos compostos fenólicos em plantas são bons suprimentos de antioxidantes naturais. O maior interesse em seu estudo é que muitas dessas substâncias (em alimentos) possuem efeitos inibitórios em mutagênese e carcinogênese (HO, 1992).

Em óleos de sementes de *Brassica,* os compostos fenólicos ocorrem na forma de ácidos fenólicos (esquema 1) e taninos polifenólicos (esquema 3). Além disso, eles podem estar presentes nas formas livre ou conjugada, tão bem como na forma de ésteres e glicosídios. O ácido sináptico é o fenólico presente em maior concentração nas sementes desengorduradas de canola e mostarda, sendo encontrado, principalmente, sob a forma esterificada. (SHAHIDI & NACZK,1988).

Compostos fenólicos em óleos de sementes possuem fortes propriedades antioxidantes e, quando usados, juntos com ingredientes de alimentos processados contendo lípides, podem exercer um efeito positivo na redução da oxidação lipídica e deterioração (SHAHIDI *et al*, 1992).

Muitas dos produtos industrializados fazem uso de especiarias para condimentar, ressaltando o sabor e aumentar a vida de prateleira dos alimentos. Como exemplo podemos citar os *Pickles,* que são produtos que utilizam especiarias no seu processamento. Devido ao seu amplo uso, foram verificados os efeitos pro-

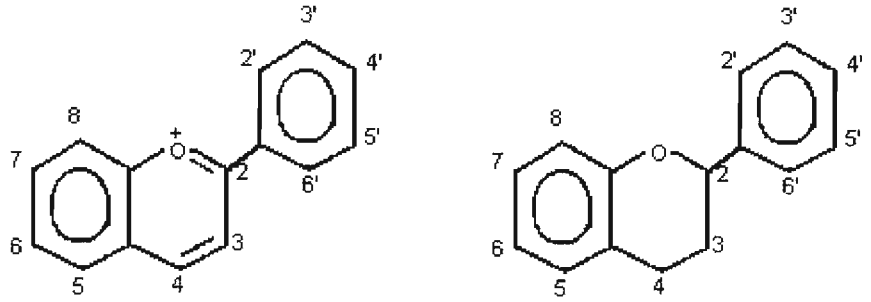
oxidativos e antioxidativos dos ingredientes de *pickles*, no sistema da lipoxigenase (reação de oxidação enzimática do ácido linoléico) e do sistema da metahemoglobina (sistema oxidante não enzimático do ácido linoléico) onde pode-se observar que a mostarda preta apresentou significativo efeito inibitório em ambos os sistemas (MI-JI-JANG *et al*, 1995).



Ácido benzóico
Ácido p-hidroxibenzóico: 4-OH
Ácido vanílico: 4-OH, 3-OCH_3
Ácido siríngico: 4OH, 3,5-diOCH_3
Ácido gálico: 3,4,5-triOH

Ácido cinâmico
Ácido cumárico: 4OH
Ácido caféico: 3,4diOH
Ácido ferúlico: 4-OH, 3-OCH
Ácido sináptico: 4-OH, 3,5-diOCH
Ácido clorogênico: 3,4-diOH, éster com ácido quínico

Esquema 6- Estruturas básicas de ácidos fenólicos de espécies de *Brassica*



Pelargonidina: 3,5,7,4'-tetraOH
Cianidina: 3,5,7,3',4'-pentaOH

Catequina: 3,4,7,3',4'-pentaOH
Leucocianidina: 3,4,5,7,3',4'-hexaOH

Esquema 7 - Estruturas de unidades básicas de taninos condensados de espécies de *Brassica*.

Mostarda é uma especiaria muito utilizada em *pickles* e saladas e o alto consumo de algumas espécies como a mostarda preta (*Brassica* nigra) e a mostarda branca (*Sinapis* alba) estão associadas a prevenção de muitas doenças como as do

trato respiratório. Devido a esses fatos, a mostarda vêm sendo objeto de diversos estudos, como a determinação da fração mineral das *Brassica nigra* e *Sinapis alba* (LÓPEZ-ARGÜELLO *et al,* 1998), da fração lipídica da *Brassica carinata* (VELASCO *et al,* 1997) e dos antioxidantes da *Brassica alba* (SHAHIDI *et al,* 1994, MANCINI-FILHO *et al,* 1998).

A mostarda preta (*Brassica nigra*) e a mostarda branca (*Sinapis alba*) são especiarias importantes para características de *flavor* nos alimentos. Essas são utilizadas na forma de ingredientes de *pickles* e tiveram sua fração mineral determinada (LÓPEZ-ARGÜELLO *et al,* 1998) no molho, na semente, na farinha e no molho com grãos íntegros. O potássio foi o macroelemento presente em maior concentração, enquanto o cálcio e o magnésio apresentaram-se em menor quantidade (PÉREZ-BUENO, 1994). Os resultados obtidos com as sementes e farinhas analisadas, demonstraram que o potássio, o cálcio e o magnésio são indicadores da origem da mostarda. Potássio e sódio estiveram em altos níveis nos molhos de mostarda, devido a adição de sais durante a preparação. Os valores de sódio encontram-se em média entre 1400mg a 200mg/100g de mostarda (LÓPEZ-ARGÜELLO, 1998). Dos microelementos identificados, o ferro e o zinco, apresentaram-se em maior concentração com 10,1mg a 12,4mg para o ferro e de 6,45mg a 8,60mg para o zinco. Os valores desses minerais nos molhos são semelhantes. Por outro lado, cobre e magnésio apresentaram baixas concentrações em todas a s amostras analizadas (LÓPEZ-ARGÜELLO, 1998).

VELASCO *et al* (1997) estimaram a composição de ácidos graxos do óleo da *Brassica carinata,* uma espécie de mostarda típica da região da Etiópia, por espectofotometria de infravermelho onde os ácidos palmítico, esteárico, oléico, linoléico, linolênico, eicosanóico e erúcico foram identificados e quantificados. Dos ácidos identificados, o ácido erúcico foi o que apresentou-se em maior concentração (40-49%), sendo o ácido graxo característo das espécies de *Brassica* (VELASCO *et al*, 1998).

SHAHIDI e colaboradores (1994) determinaram, por cromatografia em camada delgada, as substâncias responsáveis pela inibição da oxidação de extratos

etanólicos de mostarda de pouca adstringência, onde alguns ácidos fenólicos foram identificados como o ácido sináptico, o qual apresentou-se em maior concentração na espécie estudada. A quantificação do ácido sináptico foi obtido por método espectofotométrico em diferentes meios de polaridade: em hexano e em uma mistura de metanol/amônia/água, onde constituiu 65-86% na fração livre e 71-97% na fração esterificada dos ácidos fenólicos presentes nas espécies de *Brassica napus* e *Brassica juncea* (NACZK *et al*, 1992). Outros ácidos fenólicos de outras espécies de *Brassica* (*Brassica campestris* e *Brassica juncea*) foram isolados e identificados por cromatografia a gás onde o ácido sináptico, o *trans*-ferúlico e o ρ-hidroxibenzóico estiveram presentes em maior concentração nessas espécies (KAZIMIERZ *et al*, 1984).

Em uma avaliação da atividade antioxidante de algumas especiarias consumidas no Brasil foi verificado que extratos metanólicos da salvia, orégano e mostarda apresentaram bom potencial antioxidante no sistema β-caroteno/ácido linoléico (MANCINI-FILHO *et al*, 1996). Resultados paralelos com os extratos etanólicos da mostarda foram obtidos com bons potenciais antioxidantes e tiveram compostos purificados por cromatografia líquida (em coluna) e identificados por cromatografia em camada delgada com dados confirmados por espectofotometria UV (AMAROWICZ *et al*, 1996). Esses resultados são decorrentes de outros estudos onde foi verificado a estabilidade da oxidação utilizando extratos metanólicos de sementes de mostarda (SALEEMI *et al*, 1993)

As propriedades organolépticas de sementes de *Brassica,* podem estar em função além do conteúdo de ácidos fenólicos como também, pelo seu conteúdo de taninos que causam adstringência nos alimentos processados. Os taninos também são responsáveis pela precipitação de proteínas e também, por conferir a cor escura nos alimentos (SHAHIDI & NACZK, 1989).

Enquanto alguns compostos fenólicos possuem efeitos terapêuticos benéficos em altas doses, os fenólicos e taninos são, geralmente, considerados, isoladamente, como fatores antinutricionais, pois reduzem a utilização de outros componentes alimentares (SHAHIDI *et al*, 1992).

Fenólicos livres e seus produtos de oxidação são conhecidos por interagirem com proteínas em alimentos e inibirem atividade de enzimas tais como, oxidases, tripsina e lipases. As interações com fenólicos podem ser reversíveis ou irreversíveis. Grupos fenólicos de taninos podem, também, interagir com proteínas via ponte de hidrogênio ou por ligação hidrofóbica resultante de co-ligação de grupos fenólicos de taninos com os lados de cadeias aromáticas de proteínas. (SOSULSKI, 1979).

Efeitos antinutricionais de polifenóis em animais monogástricos indicam a presença de taninos. Trabalhos realizados com essas substâncias demonstraram que a digestibilidade foi afetada parcialmente somente pelo ácido tânico, ao passo que a catequina reduziu, realmente, a digestibilidade. Além do mais, a atividade *in vitro* da lipase foi reduzida pelo ácido tânico. Contudo, a atividade de enzimas proteolíticas foi diminuída tanto pelo ácido tânico quanto pela catequina. Como resultado, o alto conteúdo de taninos diminuiu o ganho de peso de ratos, como também, *in vitro*, demonstrou uma redução na digestibilidade de proteína (SHAHIDI & NACZK, 1989).

Interação de amilose e amilopectina, e de amidos de diferentes suprimentos indicam que ambos, ácido tânico e catequina, formando complexos com moléculas de amido, assim reduzindo sua digestibilidade, como também, interagem com fibras e açúcares solúveis (SHAHIDI, 1992).

Os efeitos benéficos de flavonóides como seqüestadores e queladores de radicais livres, ainda não estão esclarecidos. Entretanto alguns compostos fenólicos podem ter propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas. Como exemplo, o ácido eládico (um dímero do ácido gálico), tem sido sugerido como substância desta categoria de anticarcinogênicos. Por outro lado, muitos fenólicos têm sido indicados como inibidores na formação de nitrosamina, substância carcinogênica, sendo caracterizada a inibição da nitrosamina, segundo a seguinte ordem: ácido caféico > ácido ferúlico > ρ-cumárico > ácido ascórbico > ácido cinâmico (SHAHIDI, 1992).

Apesar destes efeitos antinutricionais observados nos compostos isolados de espécies de *Brassica*, estudos priorizam a utilização desses tipos de especiarias diretamente das fontes naturais como frutas, ervas, especiarias e verduras, para minimizar os efeitos antinutricionais e proporcionar efeitos interativos dos antioxidantes naturais (SCHWENKE, 1998).

2.2.6 - Perspectivas para a utilização dos compostos fenólicos naturais em alimentos

A utilização de fenólicos vêm sendo diversificada em diferentes campos. ABU-AMSHA (1996) realizou estudos em compostos fenólicos em vinhos e observou o efeito antiaterogênico desses compostos por diminuição da oxidação de lipoproteínas. Observou também seu efeito anticarcinogênico por diminuição ou bloqueio de reações oxidativas. PLUMB (1996) e KASSIE (1996) observaram que fenólicos e flavonóides diminuem os efeitos de aberrações cromossômicas e genotóxicos. Tais compostos também possuem poucos efeitos antinutricionais, quando comparados com polímeros de taninos (SOSULSKI, 1984).

Há largo uso de substâncias fenólicas na indústria alimentícia, principalmente no uso de especiarias; dentre elas, glicosídios de ácidos sinápticos em espécies de *Brassica* (FENTON, 1978, SALEEMI *et al*, 1993, AMAROWICZ *et al*, 1996).

Extratos de especiarias têm sido de grande interesse devido a possibilidade de serem adicionados em óleos e gorduras. Muitos extratos possuem um forte *flavor* e assim são de uso limitado ma indústria alimentícia. Extratos de salvia (*Salvia officianalis* L.) e alecrim (*Rosmarinus officianalis* L.), apresentam grande potencial antioxidante e com pouco *flavor* da especiaria original, após serem adicionados em alimentos processados (CHIPAULT *et al.*, 1952, 1956). Os extratos de orégano (*Origanum vulgare* L.) também possuem atividade antioxidante e têm sido utilizados comercialmente (NAKATANI & KIKUZAKI, 1987). Outros vegetais como a pimenta preta (*Piper nigrum*) (NAKATANI *et al.*, 1994); a cebola (*Allium cepa* L.)

(HERRMANN, 1976); a batata (*Ipomea batatas*) (HAYS & KATO, 1984) e a aveia (*Avena sativa* L.) (SCHULER, 1990) foram estudados visando a identificação de seu potencial antioxidante.

O óleo de oliva possui componentes fotossensíveis (clorofila) que poderiam promover a autoxidação, mas a presença de compostos fenólicos inibem ou retardam esse processo (RAHMANI & CSALLANY, 1998). Com essa perspectiva, pesquisas vêm sendo conduzidas para investigar componentes endógenos de alimentos que possuem antividade antioxidante para serem utilizados em substituição aos antioxidantes sintéticos. Resultados desses estudos foram conduzidos em extratos de diferentes polaridades e verificaram que extratos de óleo de sementes apresentaram bom potencial antioxidante em solventes polares (PRZYBYLSKI *et al*, 1998). Muitos desses compostos com atividade antioxidante no óleo de oliva como os ácidos vanílico e siríngico foram identifcados e associados na estabilidade da oxidação, estando presentes mesmo nos óleos processados (FERNÁNDEZ-BOLÕES *et al,* 1998).

Das muitas especiarias estudadas, os extratos de alecrim são os mais utilizados comercialmente (MADSEN, BERTELSEN, 1995). A sálvia, outra planta da família *Labitae* possui componentes antioxidantes similares ao alecrim, mas não é utilizada em escala comercial devido a pequena disponibilidade e ao seu alto custo (LOLIGER, 1991). Atualmente, estudos vêm sendo conduzidos em especiarias como a *Aframomum danielli* que faz parte da família da Zingiberaceae (mesma família do gengibre) onde apresentou-se mais efetiva para a inibição da oxidação do que o antioxidante sintético BHT e o antioxidante natural α-tocoferol. Essa atividade está associada a compostos fenólicos trihidroxi (ADEGOKE & KRISHNA, 1998).

No quadro 1 apresentam-se as especiarias com atividade antioxidante pesquisadas por diversos autores (KAZIMIERZ *et* al, 1984; NAKATANI, 1992; SHAHIDI & WANASUNDARA, 1992; NACZK *et al,* 1992; NAKATANI, 1994; MADSEN & BERTELSEN, 1995; AMAROWICZ, 1996; VELASCO *et al,* 1997; VELASCO *et al,* 1998; MANCINI-FILHO *et al*, 1996; ADEGOKE & KRISHNA, 1998).

Herbalox® é o nome comercial dos extratos de alecrim na forma de oleoresina produzido pela empresa Kalsec, nos Estados Unidos (KALSEC, 1993). A atividade antioxidante do Herbalox® tem sido testada em vários sistemas alimentares, tais como óleos vegetais (PALIC & DIKANOVIC-LUCAN, 1995), comparando-se sua eficiência contra oxidação com os seguintes antioxidantes: BHA, tocoferol e TBHQ. Estudo recente, *in vivo,* demonstrau a efetividade do extrato de alecrim em pescados, onde foi observado boa resposta a processos deteriorativos (oxidação lipídica), com maior tempo de prateleira das amostras testadas (SANT'ANA, 1998).

Na obtenção de produtos com atividade antioxidante é importante a retenção de um sabor mínimo, para que ele seja comercializado como flavorizante (SIX, 1994).

Muitas pesquisas de antioxidantes vêm sendo direcionadas para uma maior perspectiva de sua utilização em alimentos e na manutenção da saúde. Estudos dos efeitos de tocoferóis, ascorbil palmitato e lecitina vêm sendo utilizados para inibição da oxidação de óleo de peixe (HAMILTON *et al,* 1998). Outros estudos complementam a aplicação de antioxidantes naturais, como carotenóides e tocoferóis, na estabilidade da oxidação de óleo de açafrão (HENRY *et al,* 1998). No sistema testado o β-caroteno apresentou-se mais estável na inibição da oxidação do éleo testado (HENRY *eta al,* 1998).

Diante dessas linhas de pesquisa e da aplicação desses compostos, há estudos direcionados para determinações de metodologias que melhor os quantifiquem e qualifiquem. KRYGIER (1982) desenvolveu um procedimento para fracionamento dos constituintes fenólicos totais de farinhas livres; ésteres solúveis; formas de resíduos hidrolizados e, depois, de hidrólise e determinação das porções relativas de ácidos fenólicos por cromatografia gás líquida (GLC). Outros estudos também relatam que os compostos fenólicos podem ser quantificados diretamente por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ONG & NAGEL, 1978).

Quadro 1 - Especiarias e óelos com atividade antioxidante

Família	Espécie	Nome comum	Parte da planta
Crussiferae	*Brassica alba*, L.	Mostarda	Óleo da farinha
	Brassica nigra	Mostarda preta	de semente
	Sinaps alba	Mostarda branca	
	Brassica carinata	Mostarda da Etiópia	
	Brassica napus	*"Tower"*	
	Brassica campestris	*"Candle"*	
	Brassica juncea	Mostarda "*Domo*"	
Labiatae	*Origanum vulgare* L.	Orégano	Folhas
	Rosmarinus officinalis L.	Alecrim	Folhas
	Salvia officinalis L.	Sálvia	Folhas
	Thymus vulgaris L.	Tomilho	Folha
Laureaceae	*Cinnamomun zeylanicum*	Canela	Casca
			Caule
Myrtaceae	*Eugenia caryophylata Thumb.*	Cravo da Índia	Flores
Pedaliaceae	*Sesamun indicum* L.	Gergelim	Semente
Solanaceae	*Capsicum frutescens* L.	Pimenta malagueta	Frutos
	Capsicum annum L.	Pimenta vermelha	Frutos
Zingiberaceae	*Zingiber officinalle Roscoe*	Gengibre	Rizomas
	Aframomum danielli	-	-

REFERÊNCIAS: KAZIMIERZ *et* al, 1984; NAKATANI, 1992; SHAHIDI & WANASUNDARA, 1992; NACZK *et al,* 1992; NAKATANI, 1994; MADSEN & BERTELSEN, 1995; AMAROWICZ, 1996; VELASCO *et al,* 1997; VELASCO *et al,* 1998; MANCINI-FILHO *et al*, 1996; ADEGOKE & KRISHNA, 1998.

Objetivos

3 - Objetivos

Tendo em vista a presença de compostos fenólicos em sementes de mostarda (*Brassica alba*, L.) e a importância dos antioxidantes naturais com a perspectiva de substituição total ou parcial dos antioxidantes sintéticos, no processamento de alimentos, neste trabalho, nos propusemos a

uma avaliação da atividade antioxidante de sementes de mostarda (*Brassica alba*, L.) e a caracterização dos principais compostos participantes do processo de inibição da oxidação,

quanto associar os extratos obtidos das sementes de mostarda, com antioxidantes sintéticos, como o BHT, e avaliar a aplicação das frações de ácidos fenólicos da mostarda e de seus ácidos fenólicos (identificados como antioxidantes), verificando seu comportamento diretamente no alimento (óleo).

Material e Métodos

4. Material e Métodos

4.1 - Material

4.1.1 - Amostras

Para a realização de nosso trabalho foram utilizadas sementes de mostarda (*Brassica alba*, L.), adquiridas no comércio local da cidade de São Paulo.

4.1.2 - Reagentes

Para a produção dos extratos das sementes de mostarda (*Brassica alba*, L.), foram utilizados éter etílico, álcool etílico e água destilada. Para obtenção dos ácidos fenólicos livres, ligantes solúveis e insolúveis, foram utilizados tetrahidrofurano, metanol, hexano, acetato de etila, hidróxido de sódio, ácido clorídrico e sulfato de sódio anidro, todos de padrão P.A.. Como padrões dos ácidos fenólicos para cromatografia a gás (salicílico, trans-cinâmico, ρ-hidroxibenzóico, vanílico, gentíssico, protocatequínico, quínico, o-cumárico, m-cumárico, ρ-cumárico, gálico, ferúlico, caféico, sináptico, catequina, quercetina,clorogênico e metilheptadecanoato como padrão interno) foram utilizados reagentes da Sigma® e como solvente foi utilizado o tetrahidrofurano PA - Synth®. O padrão usado nos testes de inibição da oxidação foi o BHT (hidroxitoluenobutilado), onde no sistema continha β-caroteno e ácido linoléico. Ácido acético, η-butanol (Merck®) e Sílica Gel 60G (Merck®) foram empregados na cromatografia em camada delgada (CCD).

4.2. Métodos

4.2.1 - Obtenção da farinha de sementes de mostarda

Sementes de mostarda foram trituradas em *mixer* a temperatura ambiente e tamisadas (Tamis 32 Mesh). A farinha de sementes de mostarda foi acondicionada em fracos ambar e mantida à temperatura ambiente (20-25°C), até a realização de cada uma das determinações.

4.2.2 - Determinação da composição centesimal

4.2.2.1 - Determinação da umidade

Seguindo o protocolo das Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1976), o teor de umidade foi determinado por gravimetria das amostras. Foram pesados 5g de amostra em cápsula de porcela que, posteriormente, foi submetida a estufa ventilada a 70°C, seguido de pesagens regulares de duas em duas horas até peso constante. O percentual de umidade foi obtido pela fórmula:

$$\frac{Pi - Pf \times 100}{g} = \% \text{ de umidade}$$

Onde Pi é o peso inicial; Pf é o peso final e g (peso da amostra em gramas).

Os resultados foram expressos em g/100g de amostra.

4.2.2.2 - Determinação de lípides totais

De acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1976) o balão coletor previamente limpo e desengordurado permaneceu uma hora em estufa a 105°C. Em seguida, depois do resfriamento em dessecador, foi feita a tara do balão.

Após pesagem da amostra seca (2g a 3g) em cartucho previamente tarado, foi feita a extração dos lípides utilizando-se éter etílico como solvente. O cálculo da percentagem foi realizado empregando-se a seguinte fórmula:

$$\frac{Pf - Pi \times 100}{g} = \text{\% de gordura (\% de amostra seca)}$$

Onde Pi é o peso inicial; Pf é o peso final e g (peso da amostra em gramas)

Os resultados de umidade (% de amostra seca) foram corrigidos, acrescentado-se o peso da água (cálculo obtido na umidade), para obtenção da % de gordura total final, onde foram expressos em g/100g de amostra.

4.2.2.3 - Determinação da proteína total

Obedecendo às Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1976) a determinação de proteína total doi iniciada a partir de 50 mg da farinha de sementes de mostarda, desengordurada, juntamente a 2 g de sulfato de potássio (K_2SO_4), a 50 mg de sulfato de cobre ($CuSO_4$) e a 3 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Esta etapa caracterizou-se pelo processo de digestão protéica, catalizada a 350°C, até obter-se uma coloração esverdeada (fase final de digestão).

O produto da digestão, após resfriado, foi adicionado de 1 a 2 mL de água destilada (H_2O) para dissolver os sólidos presentes. Em seguida, foi seguido o processo de destilação, inicialmente, com 15 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 40%. Iniciado o processo de destilação, 50 mL do destilado foi coletado em um *erlenmayer* de 125 mL, contendo 5 mL de ácido bórico saturado e 4 gotas da solução indicadora de fenoftaleína. O destilado foi, por conseguinte, titulado com HCl 0,02 N até chegar-se a uma coloração violeta.

O cálculo da proteína total foi obtido através da fórmula:

$$\%N = \frac{(\text{mL HCl amosta} - \text{mL HCl branco} \times N_{HCl} \times 14{,}007 \times 100}{\text{mg de amostra}}$$

onde: N_{HCl}= Normalidade do Hcl x fator de correção; Proteína total=%N x 6,25.

Os resultados foram expressos em g/100g de amostra.

4.2.2.4 - Determinação de cinza

A fração de cinza foi determinada por gravimetria, baseada na determinação da perda de peso das amostras submetidas a aquecimento a 500ºC. (Instituto Adolfo Lutz, 1976).

4.2.2.5 - Determinação da fração NIFEXT

A fração NIFEXT foi obtida por diferença através da somatória das determinações de umidade, proteína, cinzas e extrato etéreo, subtraídas de 100, completando a análise da composição centesimal.

4.2.3 - Obtenção dos extratos

Os extratos etéreo (baixa polaridade), alcoólico (polaridade intermediária) e aquoso (alta polaridade), da mostarda, foram obtidos através do processo de extração sequencial.

Para obtenção dos extratos foram pesados inicialmente 20 gramas de farinha de mostarda e adicionados 100 mL de éter etílico; agitou-se no homogeneizador por 1 hora, à temperatura ambiente (temperatura entre 23-25ºC). Após 1 hora, filtrou-se a solução em funil de *Büchner*, completando-se o volume para 100 mL com éter etílico. O resíduo foi recuperado, seco em estufa a 60°C, e as perdas foram pesadas e calculadas para a obtenção dos demais extratos com álcool etílico e água destilada, seguindo o mesmo procedimento para obtenção do extrato etéreo, na mesma proporção de 1:5.

4.2.4 - Determinação do peso seco dos extratos e frações

Para se avaliar o teor de sólidos, para o cálculo da concentração, foi medida uma alíquota de 0,2mL a 1mL de extrato, a qual foi colocada em vidro-relógio para evaporação do solvente; depois de evaporado, permaneceu em estufa a 105°C por 2 horas. Após a estufa, o vidro de relógio foi pesado até peso constante e o cálculo do resíduo seco foi obtido através da fórmula:

$$\frac{Pi - Pf \times 100}{g} = \% \text{ de resíduo seco}$$

Onde Pi é o peso inicial, Pf é o peso final e g é a quantidade em ml de cada extrato.

4.2.5- Separação dos compostos fenólicos por cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada começou a ser empregada no lugar da cromatografia em papel, devido a algumas vantagens apresentadas por este método, como a possibilidade da utilização de reagentes mais agressivos na eluição e revelação das placas e a redução no tempo de análise (COPIUS-PEEREBOOM & BEEKES, 1964). Por outro lado, há a possibilidade da variação do material adsorvente que recobre a placa, como a sílica gel, celite, hidróxido de cálcio, fosfato de magnésio, poliamida, Sephadex e celulose, visando uma melhor separação desses compostos (JAYAPRAKASAM & SIVAKUMAR, 1989).

Para a separação dos compostos fenólicos dos extratos, foi utilizada a técnica de IZMAILOV e SHRAIBER (1938), que consiste na separação dos componentes da amostra através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente, retido sobre uma superfície plana.

O adsorvente ulilizado foi a Sílica Gel 60G Merk com espessura de 0,25 mm

e como superfície plana, foram utilizadas placas de vidro 20 x 20 cm.

Para confecção de 5 placas, foram empregadas 25 gramas de sílica diluída em 50 ml de H_2O.

Durante os experimentos, utilizou-se os três extratos, nos seguintes volumes: 20 μL dos extratos etéreo, alcoólico e aquoso e o mesmo volume para as frações livre, solúvel e insolúvel dos fenólicos da mostarda.

Na revelação dessas placas, foram usados os reagentes cromatográficos em *spray* descritos a seguir:

- caroteno = 45 mg de β-caroteno dissolvidos em 15 mL de clorofórmio + 20 μL de ácido linoléico em 30 ml de etanol;
- Cloreto férrico e ferricianeto de potássio = 50 mL de solução aquosa $FeCl_3$ 1% + 50 mL de solução aquosa $K_3Fe(CN)_6$ 1%;
- Cloreto férrico = 2g de $FeCl_3$ em 100 mL de etanol.
- Nitrato de prata amoniacal = 30 mL de NH_4OH em 70 mL de H_2O + 3,4 g de $AgNO_3$ em 100 mL de H_2O.

4.2.6 - Obtenção da fração lipídica

Para a obtenção da fração lipídica, foi seguido o método descrito por FOLCH *et al.* (1957).

Foi tomado um grama de farinha de sementes de mostarda para ser homogeneizada com 10 mL de clorofórmio. Em seguida, foram adicionados 20 mL de clorofórmio e a mistura foi homogeneizada por mais 5 minutos. O sobrenadante foi filtrado em funil de *Bückher* e o precipitado foi lavado com 20 mL da mistura de clorofórmio/metanol (1:1). O filtrado foi recolhido em proveta de 250 mL e teve seu volume aferido em proveta para adicionar ¼ deste volume medido de KCl 0,88% em

água. A fase superior foi desprezada por aspiração à vácuo. O volume foi mais uma vez aferido para ser adicionado ¼ da mistura de metanol/água (1:1). A mistura foi homogeneizada manualmente. A fase superior foi eliminada por aspiração à vácuo, sendo a fase superior inferior filtrada em sulfato de sódio anidro (em um balão) e evaporado em rota-evaporador, com temperatura monitorada a 40°C.

4.2.7 - Determinação de ácidos graxos por cromatografia a gás

A determinação dos ácidos graxos totais da farinha de sementes de mostarda (*Brassica alba*) foi feita seguindo-se a técnica da cromatografia gasosa.

Como descrito no método para esterificação para posterior análise cromatográfica (HARTMAN & LAGO, 1973), foram tomados 0,1 mL do extrato etéreo, posteriormente evaporado em atmosfera de nitrogênio. Em seguida, foram adicionados 2 mL de KOH metanólico, e a amostra homogeneizada e mantida em banho-maria fervente por 5 minutos. Depois da amostra esfriada, adicionaram-se 6 mL da mistura de esterificação e, em seguida, a mistura foi levada ao banho fervente por mais 3 minutos. Após esse procedimento, foram adicionados 5 mL de água destilada e a mistura foi homogeneizada em um agitador de tubos. A fração dos metil ésteres foi extraída com três porções sucessivas de 2 mL de hexano. Na fase superior extraída, foram adicionados 5 mL de uma solução de bicarbonato de sódio saturada, onde ocorreu separação em duas fases: a fase superior que foi evaporada em rota-evaporador, com temperatura monitorada a 40°C, e adicionado 1 mL de hexano para determinação dos ácidos graxos por cromatografia a gás; e, a fase inferior foi desprezada.

A identificação foi realizada em um cromatógrafo a gás CG modelo 500, equipado com detector de ionização em chama, conectado a um integrador CG modelo 300. A coluna utilizada foi a *super carbowax* 30 com 30 metros de comprimento e 0,25 mm de diâmetro. A programação utilizada foi uma temperatura

inicial da coluna de 150°C a 230°C, a uma velocidade de 6°C/min. Já a temperatura da câmara injetora foi de 230°C e a do detector, 250°C.

A identificação e quantificação do ácidos graxos presentes na farinha de sementes de mostarda foi realizada com base nos tempos de retenção relativa e quantificados com base no padrão interno e na concentração dos ácidos graxos da solução padrão (C:12/C:22 - Sigma®). Os resultados foram expressos em percentagem.

4.2.8 - Determinação de compostos fenólicos

4.2.8.1 - Determinação de fenólicos totais

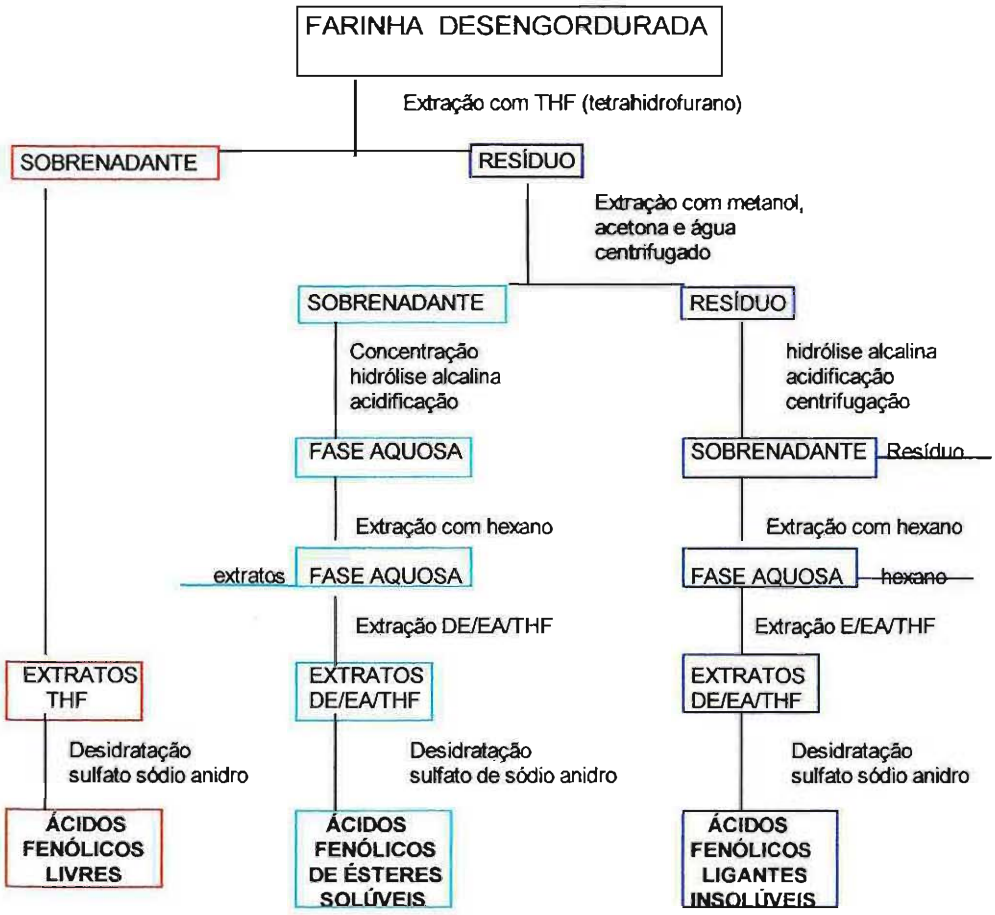
Os extratos contendo os compostos fenólicos foram preparados segundo o método descrito por FANTOZZI & MONTEDORO (1978). Pesaram-se 2 gramas de farinha de sementes de mostarda, que foram homogeneizadas com 100 mL de uma mistura de metanol/água (80/20) por uma hora. Após homogeneização a mistura foi filtrada e o volume novamente corrigido para 100 mL com metanol.

Os fenólicos totais foram determinados, espectrofotometricamente, pelo método descrito por SWAN & HILLS (1959), utilizando-se o reagente de Folin-Denis e a catequina como padrão, com leituras a uma absorbância de 720 ηm.

O método colorimétrico de *Folin-Denis* (SWAIN & HILLS, 1959) é o mais utilizado para determinação de compostos fenólicos totais em alimentos, sendo baseado na redução dos ácidos fosfomolíbdco e fosfotúngstico em solução alcalina. A cor azul produzida pela redução do reativo de *Folin-Denis* pelos fenólicos é medida espectrofotometricamente na faixa de absorção de 720 nm. Este é um método pouco específico, pois são determinados ao mesmo tempo ácidos fenólicos, flavonóides e taninos. Além disso o maior incoveniente do método é a reação concomitante com outros constituintes do alimento como xantinas, aminoácidos, proteínas, ácido ascórbico e peróxidos de hidrogênio (BRUNE *et al.*, 1991).

4.2.8.2 - Obtenção de ácidos fenólicos livres, ligantes solúveis e insolúveis

Para obtenção dos ácidos fenólicos livres, ésteres solúveis e ligantes insolúveis de ácidos fenólicos, para sua identificação por cromatografia a gás, seguiu a técnica de KRYGIER & SOSULSKI (1982), com algumas modificações para a farinha de semente de mostarda. O esquema geral de extração, segue abaixo:



Esquema 8- Procedimento de extração e separação de compostos fenólicos de frações livres, esterificadas e de resíduos de ácidos fenólicos para análises em coluna capilar de cromatografia gás-líquida (DE/EA/THF= éter etílico - acetato de etila - tetrahidrofurano, 1:1:1).

4.2.8.2.1 - Extrato de ácidos fenólicos livres

Foi pesada 1g de amostra previamente desengordurada e extraiu-se por 6 vezes com porções de 20 mL de tetrahidrofurano e através de homogeneização por 3 minutos em vortex e centrifugação por 10 minutos a 10.000rpm. Os sobrenadantes das 6 extrações foram recombinados, filtrados e desidratados através de sulfato de sódio anidro. A fração, resultante do filtrado, foi evaporada em evaporador rotativo, sob vácuo a 40°C e resuspendida em 5 mL de tetrahidrofurano. O extrato contendo a fração de ácidos fenólicos livres foi, então, armazenado sob refrigeração a uma atmosfera de nitrogênio para realização de análise cromatográfica e análise da atividade antioxidante.

4.2.8.2.2 - Extrato de ácidos fenólicos solúveis

O resíduo proveniente da extração dos ácidos fenólicos livres foi submetido a novo processo de extração. Os fenólicos solúveis foram extraídos 6 vezes com 20 mL de solução metanol-acetona-água (7:7:6). As amostras foram homogeneizadas por 3 minutos e a seguir, centrifugadas (como descrito para a fração livre dos ácidos fenólicos). No final da extração os sobrenadantes foram recombinados e evaporados em rotaevaporador, sob vácuo a 40°C, até a fase aquosa. Para liberação dos ésteres solúveis, que se encontram esterificados com proteínas ou polipeptídeos, foi adicionado igual volume de hidróxido de sódio 4N. Após 3 horas de hidrólise, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, o pH foi corrigido para 2, com ácido clorídrico 6N, seguido de centrifugação a 10.000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um funil de separação e extraído com igual volume de hexano (1:1), para eliminação dos ácidos graxos livres e outros contaminantes e posterior extração dos fenólicos da fase aquosa com a mistura de éter etílico-acetato de etila-tetrahidrofurano (1:1:1), na proporção de 1:1 solvente-água, por 6 vezes, através de agitação no próprio funil de separação. A fração extraída foi filtrada e desidratada com sulfato de sódio anidro, evaporada em

rotaevaporador a 40°C e, ressuspendida em 5 mL de tetrahidrofurano. O procedimento de armazenamento da fração solúvel de ésteres de ácidos fenólicos da farinha de semente de mostarda, seguiu o mesmo protocolo dos ácidos fenólicos livres.

4.2.8.2.3 - Ácidos fenólicos insolúveis

O resíduo da extração dos fenólicos solúveis foi hidrolisado diretamente com 25 mL de hidróxido de sódio 4N, durante 3 horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O extrato contendo os ésteres insolúveis de ácidos fenólicos teve seu pH corrigido para 2, com ácido clorídrico 6N, seguindo de centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. A partir dessa fase, seguiu-se o mesmo procedimento do filtrado para os ésteres solúveis dos ácidos fenólicos da farinha de semente de mostarda (item 4.2.8.2.2).

4.2.8.3 - Preparação da solução padrão de ácidos fenólicos

A solução padrão de ácidos fenólicos foi preparada com 16 ácidos fenólicos da Sigma® dissolvidos em 10 mL de tetrahidrofurano. A concentração dos ácidos fenólicos utilizados para essa mistura, apresenta-se no quadro 2.

Uma alíquota de 0,2 mL da solução padrão de ácidos fenólicos foi combinada a 0,1 mL do padrão interno: ácido metil éster de ácido heptadecanoato (Sigma®) em uma concentração de 0,25 mg/mL. Tal mistura foi preparada para seguir o procedimento de silinização e posterior análise cromatográfica.

Quadro 2 - Ácidos fenólicos utilizados para o preparo da solução padrão para análise cromatográfica.

ÁCIDO	CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	RF
salicílico	0,98	0,12
trans-cinâmico	0,99	0,20
p-hidroxibenzóico	0,98	0,60
vanílico	1,00	0,09
gentíssico	1,37	1,22
protocatecuico	0,95	0,16
quínico	0,99	1,20
o-cumárico	0,98	0,37
m-cumárico	0,97	0,23
p-cumárico	0,99	0,77
gálico	0,99	0,26
ferúlico	0,99	0,74
caféico	0,98	0,49
sináptico	0,99	5,45
catequina	0,99	7,80
clorogênico	0,99	8,07

4.2.8.4 - Silinização das frações livre, ésteres solúveis e insolúveis de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda

As frações livre, solúvel e insolúvel sofreram processo de silinização para esterificação dos ácidos fenólicos presentes, para uma melhor separação por cromatografia gasosa. Nesta etapa, as frações foram totalmente evaporadas sob atmosfera de nitrogênio. Foi adicionado 0,1 mL do padrão interno: metil éster de ácido heptadecanoato. Em seguida, foram adicionados 0,2 mL de BSA [N, O,-bis (trimetilsilil)-acetamida] e depois as amostras foram para um banho-maria a 60°C, por 30 minutos. Após este procedimento, elas já estavam prontas para a análise cromatográfica.

4.2.9 - Identificação dos ácidos fenólicos livres, ésteres solúveis e insolúveis de ácidos fenólicos por cromatografia a gás

As análses cromatográficas também foram realizadas em cromatógrafo a gás HP (modelo 6890 com detector de ionização de chama), conectado a um computador HP Chemsatation B 02.05 como integrador, com parâmetros controlados pelo software windows NT workstation 4.0. A coluna empregada foi a semipolar DB5 (J & W®), com 25 metros de comprimento por 0,25mm de diâmetro. A programação de temperatura utilizada foi a seguinte: temperatura inicial de 112°C, isotérmica por 3 minutos e programada de 112°C até 290°C, a uma velocidade de aquecimento de 10°C por minuto; isotérmica a 290°C, por 10 minutos. A temperatura da câmara injetora foi de 290°C e a temperatura do detector, 300°C e, o gás de arraste utilizado foi o hidrogênio.

A identificação dos ácidos fenólicos foi realizada com base nos tempos de retenção relativa das amostras com base no padrão interno e na concentração dos compostos da solução padrão (quadro 2).

4.2.10 - Purificação de compostos fenólicos por cromatografia em camada delgada (CCD) para identificação por cromatografia a gás (CG)

A purificação dos compostos fenólicos por cromatografia em camada delgada, foi realizada por meio de placa preparatória com espessura de 0,50 mm, em que o preparo seguiu o protocolo descrito no item 4.2.5.

Para a revelação utilizou-se cloreto férrico e ferricianeto de potássio a 1% em 1/5 da placa, com a finalidade de localizar a(s) banda(s) de compostos fenólicos e cálculo do(s) RF. O restante da placa, na altura da banda revelada, foi separada por sucção à vácuo, com auxílio de uma pipeta *pasteur* e a banda foi coletada em um

tubo.

Os fenólicos presentes na sílica coletada no tubo, foram solubilizados com tetrahidrofurano (THF), solvente utilizado como fase móvel na cromatografia a gás. Após a separação da sílica por decantação, o sobrenadante foi coletado, evaporado e silinizado como descrito no item 4.2.8.4, para identificação dos compostos fenólicos presentes como descrito no item 4.2.8.

4.2.11 - Atividade antioxidante em sistema β-caroteno/ácido linoléico

A atividade antioxidante foi determinada pelo método *in vitro*, desenvolvido por MARCO (1968) e modificado por MILLER (1971), empregando-se o ácido linoléico, *Tween* 60 e β-caroteno. Esse sistema foi mantido a 50 °C, e medidas espectrofotométricas de absorbância foram feitas em espectrofotômetro *Bausch & Lomb,* modelo Spectronic 20, a 470ηm, a cada 15 minutos, durante 2 horas. Diferentes volumes de extratos (0.05 mL e 0.1 mL) foram adicionados de 5mL de solução de β-caroteno com ácido linoléico:1,5 mL de β-caroteno + clorofórmio (20 mg/mL), 20 mg de ácido linoléico (1 gota) e 60 mg de Tween 40 (3 gotas), como emulsificante, e foram evaporados através da passagem de nitrogênio. A seguir adicionou-se 90 mL de água destilada, tratada com O_2 durante 30 minutos. A solução inicial deve estar límpida e apresentar densidade ótica entre 0.6 e 0.7 na absorbância de 470 ηm. Todas as determinações foram feitas nove vezes e acompanhadas por um controle sem antioxidante e um outro, com 0,05 e 0,1 mL de solução de BHT, a uma concentração de 100 ppm. As percentagens de inibição da oxidação foram calculadas da seguinte forma: o decaimento da densidade ótica do controle (D.O. inicial - D.O. final) foi considerado como 100% de oxidação. A queda na leitura da densidade ótica das amostras foi correlacionada com o controle e estabeleceu-se a percentagem de inibição da oxidação, subtraindo-se a percentagem de oxidação de cada amostra de 100.

Primeiramente, foi verificada a ação antioxidante dos extratos e depois o

efeito sinergista da atividade dos extratos somados aos antioxidantes sintéticos, da seguinte forma: 0.025 mL da amostra + 0.025 mL de BHT. A atividade antioxidante também foi aplicada aos ácidos fenólicos, obtidos no item 4.2.7. (figura 2).

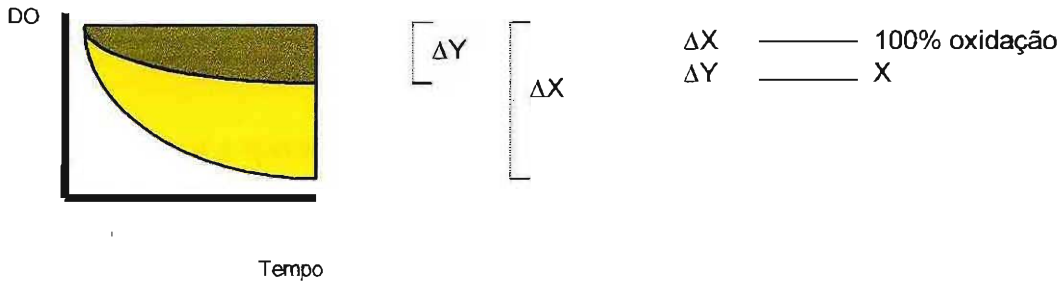


Figura 2 - Modelo para cálculo de porcentagem de inibição da oxidação (PEREIRA, 1996).

4.2.12 - Estudo cinético da atividade antioxidante no sistema β-caroteno/ácido linoléico

A eficiência da atividade antioxidante dos extratos foi estimada pelo método das tangentes em duas partes das curvas cinéticas, segundo modificação do método descrito por YANISHILIEVA & MARINOVA (1995).

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

$$F1 = \frac{\text{tg extrato ou fração}}{\text{tg controle}}$$

Na segunda parte da curva (entre 75 e 105 minutos após o início da reação) é medida a possibilidade do antioxidante participar de outras reações durante o processo oxidativo. Essa medida é obtida pela relação entre as tangentes das

curvas cinéticas apresentadas pelo meio contendo o extrato e o controle sem antioxidante. Os valores encontrados foram denominados de fator 2 (F2):

$$F2 = \frac{\text{tg extrato ou fração}}{\text{tg controle}}$$

4.2.13 - Atividade antioxidante em sistemas lipídicos

Afim de medir a capacidade antioxidante das frações de ácidos fenólicos da mostarda e de seus ácidos fenólicos identificados, foi utilizado um método experimental em estufa ventilada a 60°C ("teste de Schaal") e o método do oxigênio ativo (AOCS, 1990), no intuito de comparar os tipos de oxidação: em baixa temperatura por um longo período e, em alta temperatura, por um tempo reduzido; comparando-se paralelamente a capacidade antioxidante das frações de fenólicos da mostarda nesses dois sistemas.

Para o experimento em estufa, com amostras de óleo de soja sem antioxidante (Cargill Agricola S/A), foram pesadas (50 g) em *béquer* e para cada amostra adicionou-se volumes das frações e ácidos fenólicos purificados (Sigma®) para a concentração única de 0,02% solubilizadas em tetrahidrofurano, juntamente com 1% do emulsificante *Tween* 80®. As amostras foram colocadas em estufa ventilada a temperatura de 60°C. As amostras foram mantidas nessas condições por 80 horas, sendo que em tempos programados (0, 2, 8, 20, 28, 36, 52 e 80 horas), alíquotas de 5 g foram coletadas, para monitoramento do processo oxidativo através da determinação do índice de peróxidos (AOCS, 1990) e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (SINNHUBER et al, 1958). Além das frações, foram realizados os testes sem adição de amostras (controle) e com o uso de um antioxidante sintético (BHT), na mesma concentração aplicada às frações.

Para o método do oxigênio ativo (AOCS, 1990), tendo como substrato o óleo de soja isento de antioxidantes (Cargill Agricola S/A), seguiu-se o mesmo protocolo experimental para a estufa ventilada, sendo que, as misturas (óleo, amostras e *Tween* 80®) foram coletadas em tubos de aeração e homogeneizadas previamente

em agitadores por 30 minutos. Os tubos foram imersos em banho maria a 80°C e conectados a saída de ar com um fluxo de 10L/h. As amostras foram mantidas nessas condições por 10 horas, sendo que a cada 2 horas, alíquotas de 5g foram coletadas, para o monitoramento da oxidação através do índice de peróxidos (AOCS, 1990), das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SINNHUBER *et al.*, 1958) e medida de dienos conjugados por espectofotometria UV. Nesta análise as amostras foram solubilizadas em isoctano, e a absorbância foi medida em 234ηm (absorbância por perfomace do espectro de varredura). Assim como para o protocolo da estufa ventilada, além das frações, foram realizados os testes sem adição de amostras (controle) e com o uso de um antioxidante sintético (BHT) na mesma concentração aplicada às frações.

4.2.14 - Efeito da concentração

A fração livre obtida no item 4.2.8.2.1. foi utilizada nos volumes de 0,001 mL a 0,1 mL, para avaliação da atividade antioxidante. Para tanto usou-se o sistema ácido linoleíco/β-caroteno, como descrito no ítem 4.2.11. O cálculo da concentração foi obtido em μg/mL, correspondente a matéria seca de cada um dos volumes utilizados.

4.2.15 - Análise estatística

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

Resultados e Discussão

5 - Resultados e Discussão

Como já destacamos na Introdução existem muitas mudanças de ordem química e estrutural que ocorrem durante o processamento, distribuição e preparação final dos alimentos. Uma delas é o processo oxidativo que afeta as características organolépticas e nutricionais dos alimentos. Os antioxidantes naturais, presentes em especiarias, por exemplo, vêm sendo estudados como fatores inibidores do processo oxidativo.

Nosso trabalho avaliou a atividade antioxidante de extratos obtidos a partir da farinha de sementes de mostarda, identificando os principais compostos fenólicos responsáveis pela inibição da oxidação.

5.1- Composição centesimal

A metodologia para obtenção da composição centesimal foi descrita no item 4.2.2 e os resultados apresentam-se na tabela 1. Os resultados laboratoriais foram comparados a tabela de composição de alimentos: *Handbook of the nutritional contents of foods* (1975). Como pode ser verificado na tabela 1 o teor de lípides, obtido experimentalmente, é elevado (33,0%) e não confirma os dados da literatura, como apresentados na tabela. Os demais constituintes (exceto cinza e fração *nifext*) também apresentaram valores diferentes quando comparados aos valores da tabela apresentada.

Os dados experimentais de cinza, não foram comparados com os dados de literatura, pois esses não representam o percentual total da fração inorgânica, mas somente a soma de cinco minerais: cálcio, fósforo, ferro, sódio e potássio. A literatura traz dados referentes a análises da fração mineral da farinha de sementes de mostarda branca (*Sinapis alba*) e preta (*Brassica nigra*) no grão íntegro e em molhos, onde foram identificados e quantificados o sódio, potássio, cálcio,

magnésio, ferro, zinco, manganês e cobre, com uma concentração de 398,79 mg/100g no grão íntegro e de 674,2 mg/100g no molho, sendo este aumento devido à adição de sais de sódio e potássio, durante as preparações(LÓPEZ-ARGÜELLO *et al,* 1998). Estes resultados, também não confirmam os dados da fração mineral (cinza) apresentados na tabela.

Tabela 1 - Composição centesimal da farinha de semente de mostarda

Composição (g/100 g)	**Dados laboratoriais***	**Dados de literatura ****
Umidade	5,8	28,3
Lipídes	33,0	20,1
Proteína	29,8	21,3
Cinza	4,6	1,3 (+)
Nifext	26,8	29,0 (-)
Total	100,0	100,0

* Média de três determinações
** Handbook of the nutritional contents of foods - prepared for "*The United States Department of Agriculture*", 1975
(+) Soma dos minerais: cálcio, fósforo, ferro, sódio e potássio
(-) Valores de hidratos de carbono

5.2- Cromatrografia em camada delgada (CCD)

Constatadas as vantagens da cromatografia em camada delgada, como um método rápido, sensível e de boa resolução, estabelecemos as condições de trabalho para a purificação e identificação de ácidos fenólicos em extratos e frações de fenólicos das sementes de mostarda (*Brassica alba*, L.). Os resultados se apresentam na figura 3 e tabela 2 (extratos etéreo, alcoólico e aquoso) e na figura 4 e tabela 3 (frações livre, solúvel e insolúvel).

Como pode-se verificar, o extrato aquoso foi o único a apresentar uma banda reconhecida com atividade antioxidante (revelação no sistema β-caroteno), com um Rf 0,86, sendo que a mesma foi caracterizada a existência de compostos fenólicos

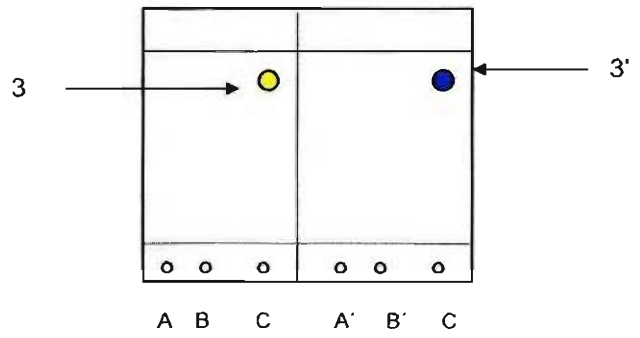
(sistema revelador ferricianeto/cloreto férrico) com um Rf de 0,85.

Por outro lado, após fracionamento das amostras para obtenção das frações livre, solúvel e insolúvel, foi possível pela cromatografia em camada delgada verificar a presença de compostos fenólicos que, apresentaram Rf distintos com valores que variaram de 0,32 a 0,87.

Esses resultados foram contrários ao trabalho de SHAHIDI *et al* (1994) que constataram, seguindo diferentes condições experimentais, que o extrato etanólico da farinha de sementes de mostarda apresentou atividade antioxidante na cromatografia em camada delgada. A diferença nos resultados pode ser justificada pela diferança nas condições experimentais. A metodologia seguida por SHAHIDI *et al.* (1994), utilizou cromatografia em camada delgada, posteriormente, a cromatografia líquida, para separação e identificação de compostos tri-hidroxi com atividade antioxidante em modelo de oxidação de carnes (SHAHIDI *et al.*, 1992). No estudo de SHAHIDI (1994), estes compostos fenólicos apresentaram bom potencial de inibição da oxidação e o modelo experimental utilizado foi adequado para a identificação dos mesmos. No entanto, nosso trabalho utilizou cromatografia em camada delgada, como procedimento preliminar de identificação e purificação de bandas de compostos fenólicos presentes na farinha de sementes de mostarda, antes de uma análise mais precisa de identificação e quantificação destas substâncias fenólicas, por cromatografia a gás após procedimento de extração das frações pela técnica desenvolvida por KRYGIER & SOSULSKI (1982), com algumas condições modificadas por MOREIRA & MANCINI-FILHO (1998).

A presença de duas bandas na fração de ésteres solúveis de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda (figura 4), identificadas pelo revelador de fenólicos, o ferricianeto de potássio/cloreto férrico, sendo caracterizadas como compostos di- e tri- hidroxi e confirmados pela cromatografia a gás onde apresentou um pico predominante nesta fração identificado como o ácido ρ-hidroxibenzóico, como apresentado no cromatogramas nas figura 7 e 10. Este sistema revelador confirma resultados de literatura para identificação de compostos di ou tri-hidroxi em cromatografia em camada delgada (SHAHIDI *et al.*, 1994).

A cromatografia em camada delgada para identificação e purificação de ácidos fenólicos é um parâmetro seguro quando utilizada com diferentes sistemas reveladores, como sugerido por SHAHIDI *et al.* (1992), para identificação e purificação de ácidos fenólicos, principalmente de compostos fenólicos hidroxi, como o ácido ρ-hidroxibenzóico e o ácido sináptico.

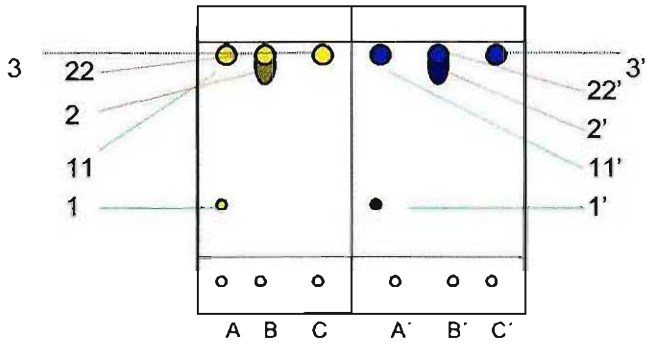


A/A' = Extrato Etéreo
B/B' = Extrato Alcoólico
C/C' = Extrato Aquoso

Figura 3- Cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos da farinha de semente de mostarda mostarda

Tabela 2 - Rf dos extratos da farinha de semente de mostarda na CCD

Mancha	Revelação	Cor	Rf
3 (Extrato Aquoso)	β-caroteno/Clorofórmio	Amarela	0.86
3''(Extrato Aquoso)	Ferricianeto/Cloreto Férrico	Azul/laranja	0.85



A/A´= Ácidos Fenólicos Livres
B/B´= Ácidos Fenólicos de Ésteres Solúveis
C/C´= Ácidos Fenólicos de Ésteres Insolúveis

Figura 4 - Cromatografia em camada delgada (CCD) das frações livre, solúvel e insolúvel da farinha de semente de mostarda

Tabela 3 - Rf das frações livre, solúvel e insolúvel de fenólicos da mostarda em CCD

Mancha	Revelação	Cor	Rf
1	β-caroteno/clorofórmio	Amarelo	0.32
11	β-caroteno/clorofórmio	Amarelo	0.83
2	β-caroteno/clorofórmio	Amarelo escuro	0.80
22	β-caroteno/clorofórmio	Amarelo	0.83
3	β-caroteno/clorofórmio	Amarelo	0.87
1'	Ferricianeto/Cloreto Férrico	Verde	0.32
11'	Ferricianeto/Cloreto Férrico	Azul	0.87
2'	Ferricianeto/Cloreto Férrico	Azul escuro	0.83
22'	Ferricianeto/Cloreto Férrico	Azul	0.87
3'	Ferricianeto/Cloreto Férrico	Azul	0.87

5.3 - Ácidos Graxos de sementes de mostarda

A análise do perfil lipídico dos componentes alimentares revela a presença de ácidos graxos, presença de insaturações, comprimento da cadeia e isomerias (*cis, trans*) que definem as propriedades físicas dos lípides (MAYES, 1994).

A cromatografia a gás é a técnica mais utilizada para identificar e quantificar o perfil de ácidos graxos da porção lipídica de um alimento e, assim, definir as suas propriedades físicas e químicas.

A farinha de sementes de mostarda teve seu perfil lipídico determinado pela técnica de HARTMAN & LAGO (1973) como descrito no item 4.2.7. Como podemos observar na tabela 4 e figura 5, a farinha de semente de mostarda apresentou elevado percentual de ácidos graxos insaturados: ácido oléico, ácido linoléico e ácido linolênico, os quais apresentam grande importância fisiológica (CHRISTIE, 1982), e ácido erúcico que, perfizeram juntos, uma concentração de 80,3%. Já os ácidos graxos saturados apresentaram 16,76%. A composição dos ácidos graxos identificados foram confirmados pelos resultados de literatura (VELASCO *et al,* 1997).

Como visto através da análise utilizando-se a cromatografia em camada delgada, pode-se identificar a presença de compostos fenólicos nos extratos e frações da farinha de sementes de mostarda, que possivelmente, participam de processos de proteção dos ácidos graxos insaturados presentes nas sementes de mostarda. Esse fato foi observado por PRATT & HUDSON (1990), que verificaram que muitos óleos de sementes contêm fenólicos que retardam a oxidação em sementes natívas, tão bem como em seu óleo extraído, podendo agir como antioxidantes primários, sinergistas ou queladores de metais, protegendo os alimentos que os contenham.

O uso isolado do óleo de sementes de mostarda, deve ser feito com cautela, pois apesar de apresentar fatores protetores à oxidação e presença de ácidos graxos essencias, há uma elevada percentagem do ácido erúcico em sua fração lipídica, dado confirmado por trabalhos em outras espécies de *Brassica* que apresentaram também, alto teor dessa substância (VELASCO *et al*, 1998). Esse ácido graxo, composto de 22 unidades de carbono e uma insturação no carbono 9, é tóxico ao organismo, podendo levar a distúrbios neurológicos, como dismielinização das células nervosas com consequente distúbio do impulso nervoso. Por outro lado, um tratamento químico adequado, poderá minimizar esse efeito por eliminação parcial ou total deste ácido graxo.

Tabela 4 - Composição dos ácidos graxos da fração lipídica da farinha de semente de mostarda

ÁCIDOS GRAXOS	**COMPOSIÇÃO (%)**
Palmítico - C 16: 0	4,37
Esteárico - C 18: 0	0,69
Oléico - C 18: 1	20,23
Linoléico - C 18: 2	8,30
Linolênico - C 18: 3	11,65
Eicosanóico - C 20: 0	11,70
Erúcico - C 22: 1	40,12
Total de ácidos graxos saturados	16,76
Total de ácidos graxos insaturados	80,3
Total de ácidos graxos identificados	97,06
Total de ácidos graxos não identificados	2,94
Total	100,00

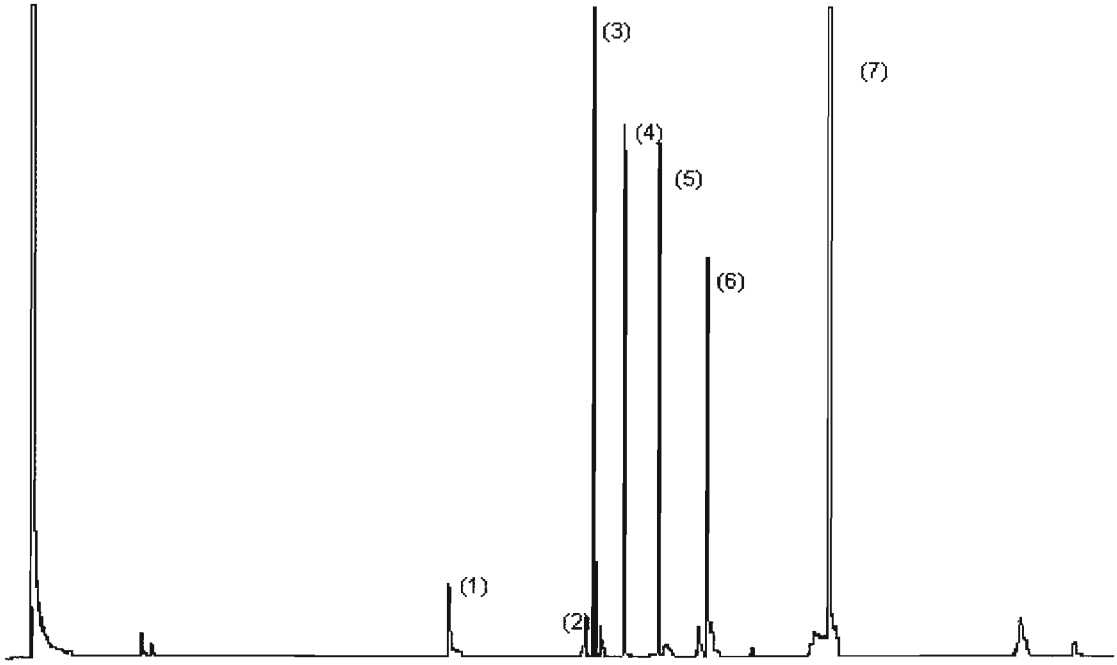


Figura 5 - Cromatograma dos principais ácidos graxos da farinha de mostarda (1) C 16:0; (2) C 18:0; (3) C 18:1; (4) C 18:2; (5) C 18:3; (6) C 20:0 e (7) C 22:1

5.4 - Ácidos fenólicos

A metodologia para a análise de ácidos fenólicos em alimentos pode ser dividida em dois procedimentos experimentais: o primeiro visa a determinação de compostos fenólicos totais, onde são dosados todos os compostos sem distinção, e um outro mais específico, normalmente empregando-se métodos cromatográficos, visando uma avaliação qualitativa e quantitativa mais precisa dos ácidos fenólicos presentes.

Apesar da limitação do uso do método colorimétrico de *Folin-Denis* (SWAIN & HILLS, 1959), vários autores utilizam-no como ponto de partida para seus estudos ou empregam-no como um meio de monitoramento de processos analíticos mais sofisticados (TORRES *et al.*, 1987; MONTEDORO *et al.*, 1992).

A metodologia de fenólicos totais de *Folin-Denis* está descrita no item 4.2.8.1 (p.45) e o resultado do teor de fenólicos totais da farinha de sementes de mostarda apresentou uma concentração elevada de 70,07 mg/g com um desvio padrão de 0,06, resultado justificado pela presença dessas substâncias em todas as frações testadas na cromatografia em camada delgada (figura 4).

5.5 - Ácidos fenólicos das frações livres, solúveis e insolúveis da mostarda identificados por cromatografia a gás.

Como foi visto anteriormente, a cromatografia em camada delgada é uma técnica muito útil e acessível para a análise qualitativa de ácidos fenólicos em extratos vegetais. Esse método ainda é muito utilizado como um primeiro passo na separação ou purificação dos ácidos fenólicos antes da realização de investigações mais específicas. No últimos anos, devido ao grande avanço na instrumentação analítica, métodos como a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) são freqüentemente, empregados na análise qualitativa e quantitativa de ácidos fenólicos, pois são rápidos e de grande eficiência para esta finalidade. A cromatografia gasosa é o método mais popular para este fim, devido a

sua alta eficiência na separação dos compostos, rapidez, sensibilidade e baixo custo (TESAROVÁ & PACÁKOVÁ, 1983).

Há várias metodologias descritas sobre a análise de ácidos fenólicos por cromatografia a gás baseados nas suas características de polaridade. Os ácidos fenólicos são substâncias que possuem alta polaridade e baixa pressão de vapor. Tais características levaram alguns autores a descrever processos distintos para derivação e condições de análises cromatográficas, objetivando uma melhor técnica de isolamento e caracterização destes compostos. Nosso trabalho seguiu a metodologia utilizada por DABROWSKI & SOSULSKI (1984a), na qual os autores identificaram compostos fenólicos como o ácido ρ-hidroxibenzóico, ácido caféico, ácido sináptico, entre outros, em algumas especiarias, dentre elas, espécies de *Brassica*.

Para a identificação dos compostos fenólicos presentes na farinha de sementes de mostarda partiu-se da análise da presença de ácidos fenólicos através de métodos cromatográficos, como a cromatografia a gás. Trabalhos que utilizaram cromatografia gasosa, verificaram que os ácidos fenólicos são a principal classe de compostos fenólicos presentes em sementes vegetais (FENTON *et al.*, 1980; DABRONSKI & SOSUSKI, 1984a, 1984b).

Os fenólicos de menor peso melecular e maior volatilidade, podem ser separados diretamente por CG, não sendo necessário um pré-tratamento de derivação da amostra. Contudo, compostos maiores, principalmente os poli-hídricos, necessitam ser derivados devido a presença de grupamentos hidroxila que causam dificuldades na análise — como interações com a fase estacionária da coluna cromatográfica — não permitindo uma boa resolução. A derivação dos compostos causa uma diminuição tanto da polaridade, quanto do ponto de ebulição, podendo ser diminuída, conseqüentemente, a temperatura de análise.

Vários tipos de derivação foram propostos para os ácidos fenólicos, como a metilação, etilação e aquilação, mas a trimetilsilinização dos ácidos fenólicos apresentou-se como sendo a mais eficiente no processo de derivação. TULLBERG

et al. (1976), mostraram que os fenólicos trimetilsilil-derivados possuem boa estabilidade na temperatura ambiente, porém se decompõem na presença de água. Ademais, estes derivados praticamente não são retidos pelas colunas, aumentando o potencial de separação e recuperação e permitindo assim, análises quantitativas mais precisas em colunas semipolares como a DB 5 (J & W®), por nós utilizada para a separação dos ácidos fenólicos da mostarda.

Muitas substâncias podem ser empregadas na silinização de ácidos fenólicos, como o hexametidilsilazano com N,N-dimetilformamida (1+1), o N,O bis (trimetilsilil) acetamida (BSA) e o N-trimetilsililimidazol. PRATER *et al.* (1980), empregaram o BSA na derivação de vários compostos fenólicos e verificaram que a reação de derivação foi completada em 15 minutos, à temperatura ambiente, ficando estáveis por alguns dias nestas condições. Em nosso estudo, por exemplo, utilizamos para silinização dos ácidos fenólicos da mostarda o BSA, por nos fornecer um período estável de sete dias à temperatura ambiente, para as análises cromatográficas.

Nas fases estacionárias utilizadas na CG, podem ser empregadas colunas empacotadas ou capilares, contendo desde substâncias apolares, até aquelas com alto grau de polaridade. Nas colunas apolares, a separação é governada pelo tamanho das moléculas, assim como pelas forças não polares existentes entre as moléculas e a fase estacionária. Já nas colunas polares e semipolares o mais importante é a interação existente entre as hidroxilas dos ácidos fenólicos com os sítios eletronegativos da fase estacionária. Através do aumento da polaridade da fase estacionária ou com o aumento dos grupamentos hidroxila das moléculas, tem-se um aumento da seletividade, ou seja, uma melhor separação. Apesar disso, há uma maior preferência pelo uso de colunas polares ou semipolares para a separação de ácidos fenólicos, pois o uso de colunas apolares normalmente traz picos assimétricos ou com grande quantidade de ruídos (TESAROVÁ & PACACOVÁ, 1993). A coluna DB 5, que utilizamos, é uma coluna semipolar, permitindo uma separação dos fenólicos da mostarda como visualizadas nas figuras 6,7 e 8.

As análises de ácidos fenólicos por CG apresenta como principal problema a interferência de ácidos graxos de cadeia longa, remanescentes do desengorduramento das amostras, das quais se originaram os extratos. Os ácidos graxos com 16 e 18 carbonos possuem um tempo de retenção muito próximo ao dos ácidos ferúlico e sináptico, respectivamente. Alguns autores, portanto, sugerem métodos de purificação destes fenólicos por cromatografia em camada delgada como forma de impedir a contaminação desses ácidos graxos, durante a separação dos ácidos fenólicos (FENTON *et al.*, 1980).

Como o objetivo deste trabalho foi a identificação dos principais compostos responsáveis pela inibição da oxidação, utilizamos como metodologias para determinação de fenólicos em sementes de mostarda, métodos de óxido redução (*Folin-Denis*), para a determinação de fenólicos totais, cromatografia em camada delgada, para identificação e purificação de bandas com compostos fenólicos e de cromatografia a gás para separação, identificação e quantificação dos principais fenólicos presentes nas sementes de mostarda.

Para obtenção dos cromatogramas das frações livre, ésteres solúveis de ácidos fenólicos e ligantes insolúveis de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda, como apresentados nas figuras 6, 7 e 8 e na tabela de concentração dos ácidos fenólicos identificados, apresentados na tabela 5, foram seguidas as condições cromatográficas descritas no item 4.2.9.

Como pode ser verificado na tabela 5, os ácidos salicílico, *trans* cinâmico, ρ-hidroxibenzóico e vanílico, foram identificados e quantificados nas três frações, livre, ésteres solúveis e ligantes insolúveis de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda, perfazendo juntos um percentual de aproximadamente 40% (40%, 39,7% e 37,4% para as frações livre, solúvel e insolúvel, respectivamente). O ácido ρ-hidroxibenzóico foi o que se apresentou em maior concentração (38,6%; 39,2% e 33,7% para a fração livre, solúvel e insolúvel, respectivamente), confirmando as bandas cromatográficas identificadas na cromatografia em camada delgada, reveladas pelo sistema ferricianeto de potássio/cloreto férrico, que reconhece, principalmente, bandas de compostos hidroxi, como o ácido ρ-

hidroxibenzóico (SHAHIDI *et al.*, 1994).

Os dados da literatura confirmam a presença dos ácidos ρ-hidroxibenzóico, vanílico, gentíssico, protocatecuico, siríngico, ρ-cumárico, ferúlico e caféico em espécies de *Brassica: B. napus, B. campestris* (KRYGIER *et al.*, 1982). Os dados de identificação dos ácidos *cis* sináptico, obtidos nesse trabalho, confirmam os da literatura, onde apresentam-se principalmente, na fração esterificada com 37,8% (FENTON *et al.*, 1978). No entanto, para o ácido *trans* sináptico verificou-se uma maior quantidade na fração livre com 21.6%. Só estão contrários aos dados de NACK (1988), onde se apresenta o ácido sináptico como o de maior concentração nas espécies de *Brassica*, sendo que em nossos resultados, pelas condições analisadas, encontramos o ácido ρ-hidroxibenzóico em valores superiores e presentes nas três frações.

Tabela 5 - Concentração dos ácidos fenólicos identificados por cromatografia a gás

ÁCIDOS FENÓLICOS	COMPOSIÇÃO (%)		
	Fração Livre	**Fração de Ésteres Solúveis**	**Fração de ligantes insolúveis**
Salicílico	0,9 + 0,3	0,1 + 0,01	2,3 + 0,3
trans cinâmico	0,4 + 0,02	0,4 + 0,03	0,3 + 0,02
ρ-hidroxibenzóico	38,6 + 2,5	39,2 + 3,7	33,7 + 1,5
vanílico	0,1 + 0,01	0,4 + 0,05	1,1 + 0,1
gentíssico	-	0,5 + 0,2	-
quínico	1,0 + 0,0	2,4 + 0,3	-
ρ-cumárico	-	-	-
ferúlico	3,8 + 0,3	0,5 + 0,2	-
caféico	0,3 + 0,0	0,4 + 0,1	-
cis sináptico	6,5 + 0,2	37,8 + 0,6	-
trans ferúlico	0,3 + 0,1	-	-
trans sináptico	21,6 + 0,2	4,9 + 0,1	-
Total de ácidos fenólicos identificados (%)	73,5	86,6	37,4
Total de ácidos fenólicos não identificados (%)	26,5	13,4	62,6
Total (%)	100,0	100,0	100,0

NOTA: os valores estão expressos em médias ± desvio padrão
os valores estão corrigidos para fatores de resposta específico para cada ácido (ver quadro 2)
CONCENTRAÇÃO: 0,04μg/mL (AFL); 0,02μg/mL (AFES); 0,008μg/mL (AFEI)

Objetivando a eliminação dos ácidos graxos de cadeia longa (com 16 ou 18 carbonos), que possuem tempo de retenção muito próximo aos ácidos ferúlico e sináptico e uma melhor separação e purificação dos ácidos fenólicos presentes na farinha de sementes de mostarda, foi realizada cromatografia em camada delgada com placas preparatórias, para purificação de bandas de compostos fenólicos presentes nas mesmas. A metodologia segue o protocolo descrito no item 4.2.10. e, os cromatogramas identificados apresentam-se nas figuras 9, 10 e 11 e tabela 6.

Com pode ser verificado na tabela 6, os ácidos: salicílico, *trans* cinâmico, ρ-hidroxibenzóico, vanílico, ρ-cumárico, ferúlico, caféico, *cis* sináptico, *trans* sináptico e a catequina foram identificados em todas as frações purificados pela cromatografia em camada delgada, onde juntos, perfizeram um percentual de 67,7%, 75,1% e 43,2% para a fração livre, ésteres solúveis e ligantes insolúveis de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda, respectivamente. Os ácidos quínico e ρ-cumárico foram apenas identificados na fração esterificada. A catequina, segundo a literatura (HO et al, 1992), fez-se presente em espécies de *Brassica* e somente após a purificação em cromatografia em camada delgada, foi possível sua identificação e quantificação nas frações da farinha de semente de mostarda (*Brassica alba*), em valores de 6,3%, 11,7% e 2,3% para as frações livre, ésteres solúveis e ligantes insolúveis da farinha de semente de mostarda.

Apesar da literatura não trazer resultados específicos da *Brassica alba* (espécie estudada no presente trabalho), houve a comparação de nossos resultados com os da literatura presente, com a confirmação das metodologias utilizadas. Nenhum dos trabalhos citados, apresentaram a cromatografia em camada delgada como um método prévio de purificação de ácidos fenólicos, e neste ponto nosso trabalho sugere, esse procedimento, como parte do procedimento experimental para purificação, identificação e quantificação de ácidos fenólicos (principalmente em componentes alimentares com alto percentual de lípides), como mostra o esquema mostrado a seguir:

Extração das frações livres,
ésteres solúveis e ligantes insolúveis
de ácidos fenólicos (item 4.2.7)

↓

Purificação das frações
por cromatografia em camada delgada
em placa preparatória (item 4.2.9)

↓

Identificação dos ácidos fenólicos
das frações livre, solúvel e insolúvel
por cromatografia a gás (item 4.2.8)

Tabela 6 - Concentração dos ácidos fenólicos identificados nos cromatogramas após purificação prévia por cromatografia em camada delgada

ÁCIDOS FENÓLICOS	COMPOSIÇÃO (%)		
	Fração Livre	Fração de Ésteres Solúveis	Fração de ligantes insolúveis
Salicílico	0,5 + 0,03	0,4 + 0,02	0,1 + 0,03
trans cinâmico	0,6 + 0,02	1,0 + 0,03	0,5 + 0,03
ρ-hidroxibenzóico	48,3 + 2,5	46,7 + 3,2	32,1 + 1,5
vanílico	0,2 + 0,01	0,1 + 0,05	0,1 + 0,01
gentíssico	-	0,7 + 0,2	-
quínico	-	1,2 + 0,3	-
ρ-cumárico	0,5 + 0,01	0,6 + 0,02	0,3 + 0,01
ferúlico	0,4 + 0,01	0,7 + 0,01	0,3 + 0,01
caféico	0,3 + 0,01	0,9 + 0,02	0,5 + 0,01
cis sináptico	7,6 + 0,3	7,1 + 0,3	5,0 + 0,1
trans sináptico	3,0 + 0,2	4,0 + 0,1	2,0 + 0,5
catequina	6,3 + 0,5	11,7 + 0,8	2,3 + 0,5
Total de ácidos fenólicos identificados (%)	67,7	75,1	43,2
Total de ácidos fenólicos não identificados (%)	32,3	24,9	56,8
Total (%)	100,0	100,0	100,0

NOTA: os valores estão expressos em médias ± desvio padrão
os valores estão corrigidos para fatores de resposta específico para cada ácido (ver quadro 2)
CONCENTRAÇÃO: 0,04μg/mL (AFL); 0,02μg/mL (afes); 0,008μg/mL (AFEI)

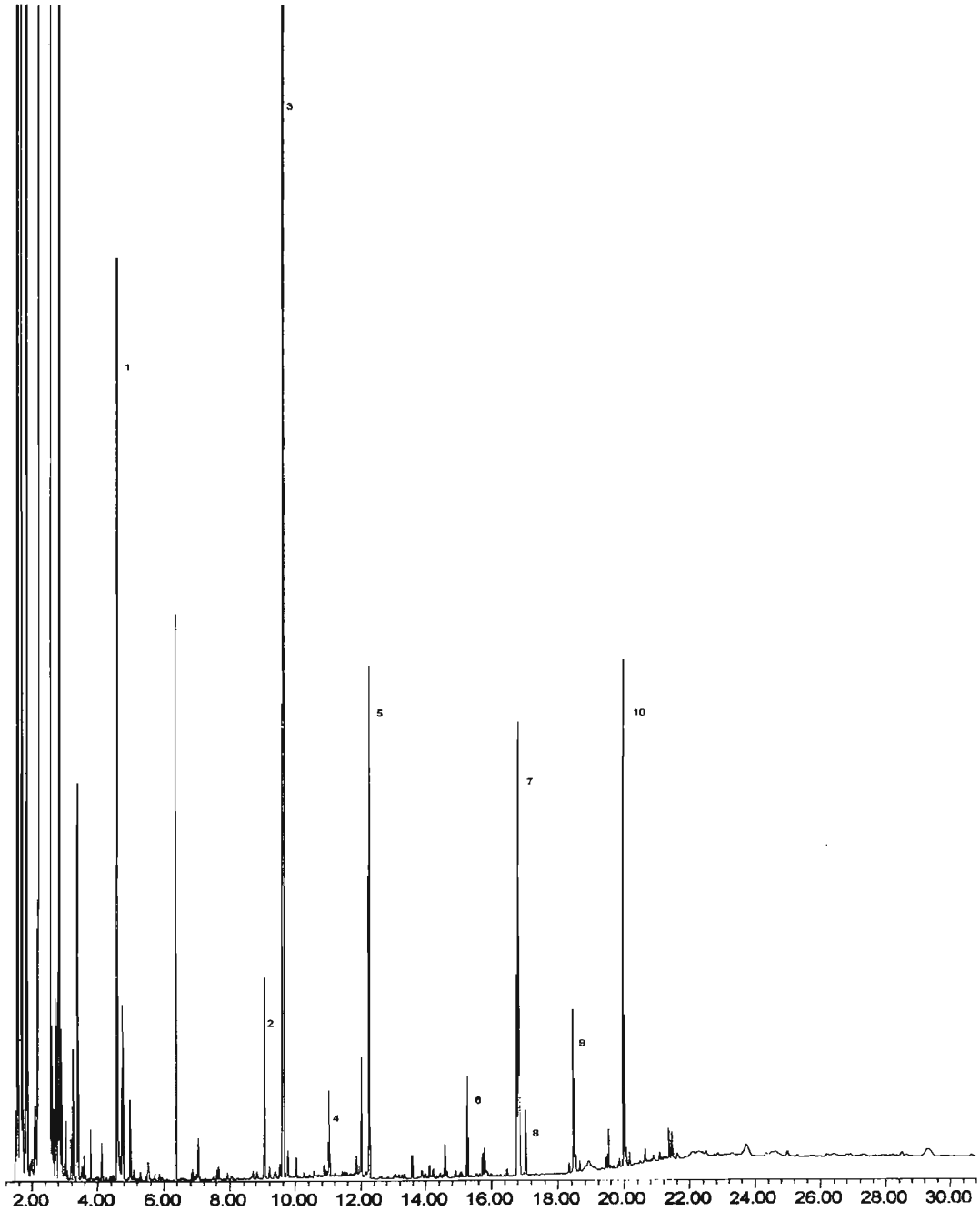


Figura 6 - Cromatograma da fração livre da farinha de sementes de mostarda. Ácidos: (1) salicílico; (2) *trans* cinâmico; (3) p-hidroxibenzóico; (4) vanílico; (5) quínico; (6) ferúlico; (7) caféico; (8) *cis* sináptico; (9) *trans* ferúlico; (10) *trans* sináptico.

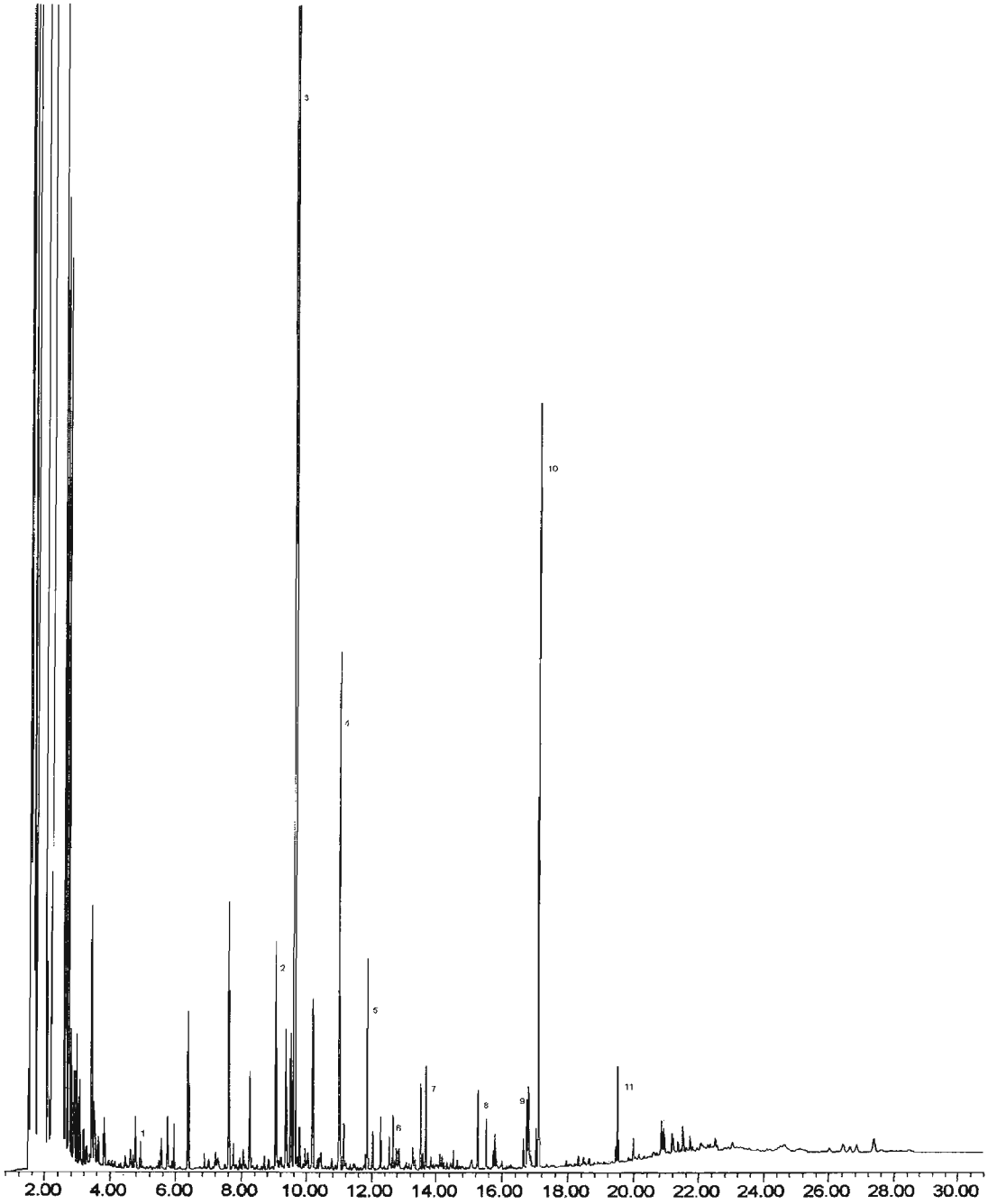


Figura 7 - Cromatograma da fração de ésteres solúveis da farinha de sementes de mostarda. Ácidos: (1) salicílico; (2) *trans* cinâmico; (3) ρ-hidroxibenzóico; (4) vanílico; (5) quínico; (6) gentíssico; (7) ρ-cumárico; (8) ferúlico; (9) caféico; (10) *cis* sináptico; (11) *trans* sináptico.

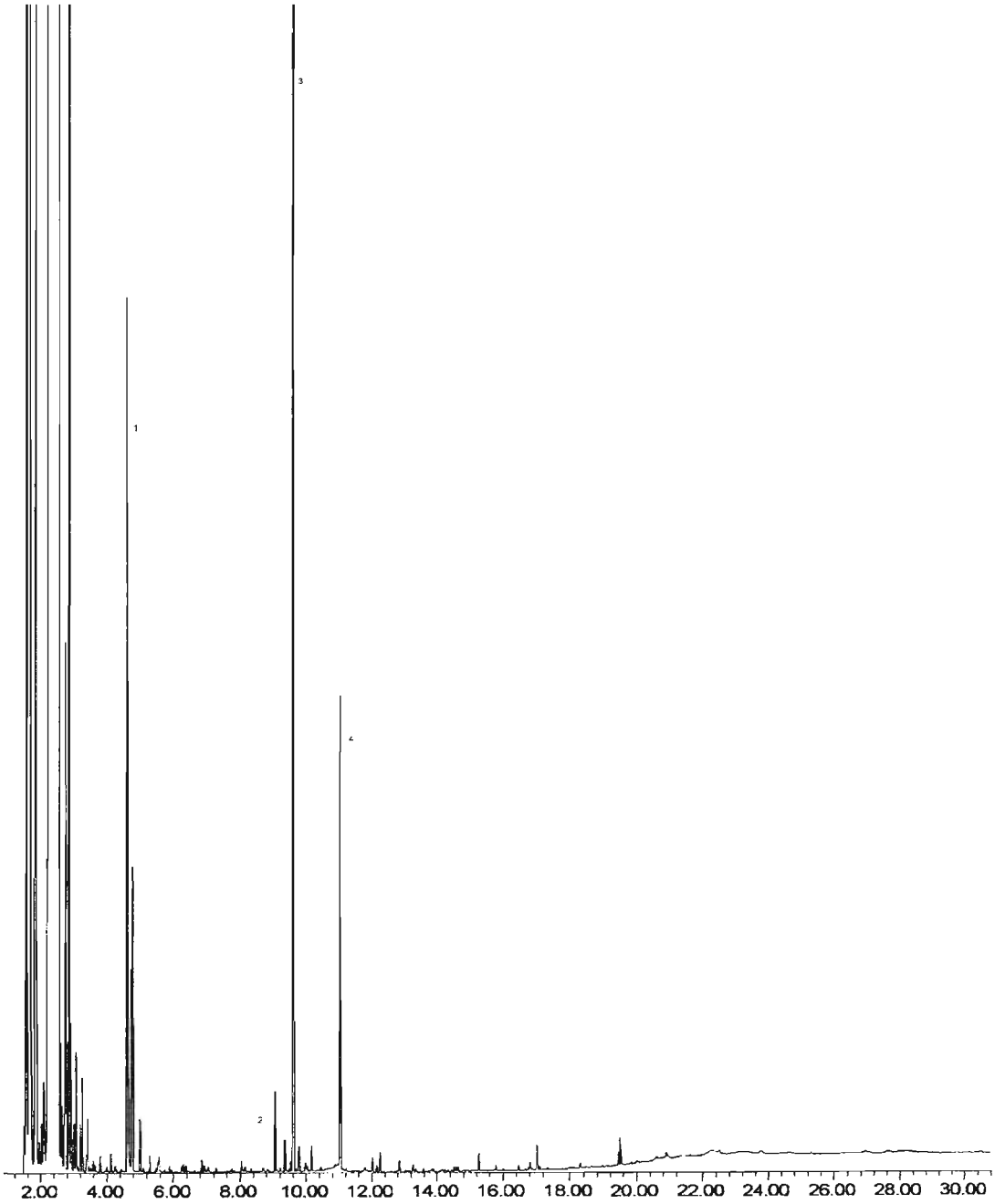


Figura 8 - Cromatograma da fração de ligantes insolúveis da farinha de sementes de mostarda. Ácidos: (1) salicílico; (2) *trans* cinâmico; (3) ρ-hidroxibenzóico; (4) vanílico.

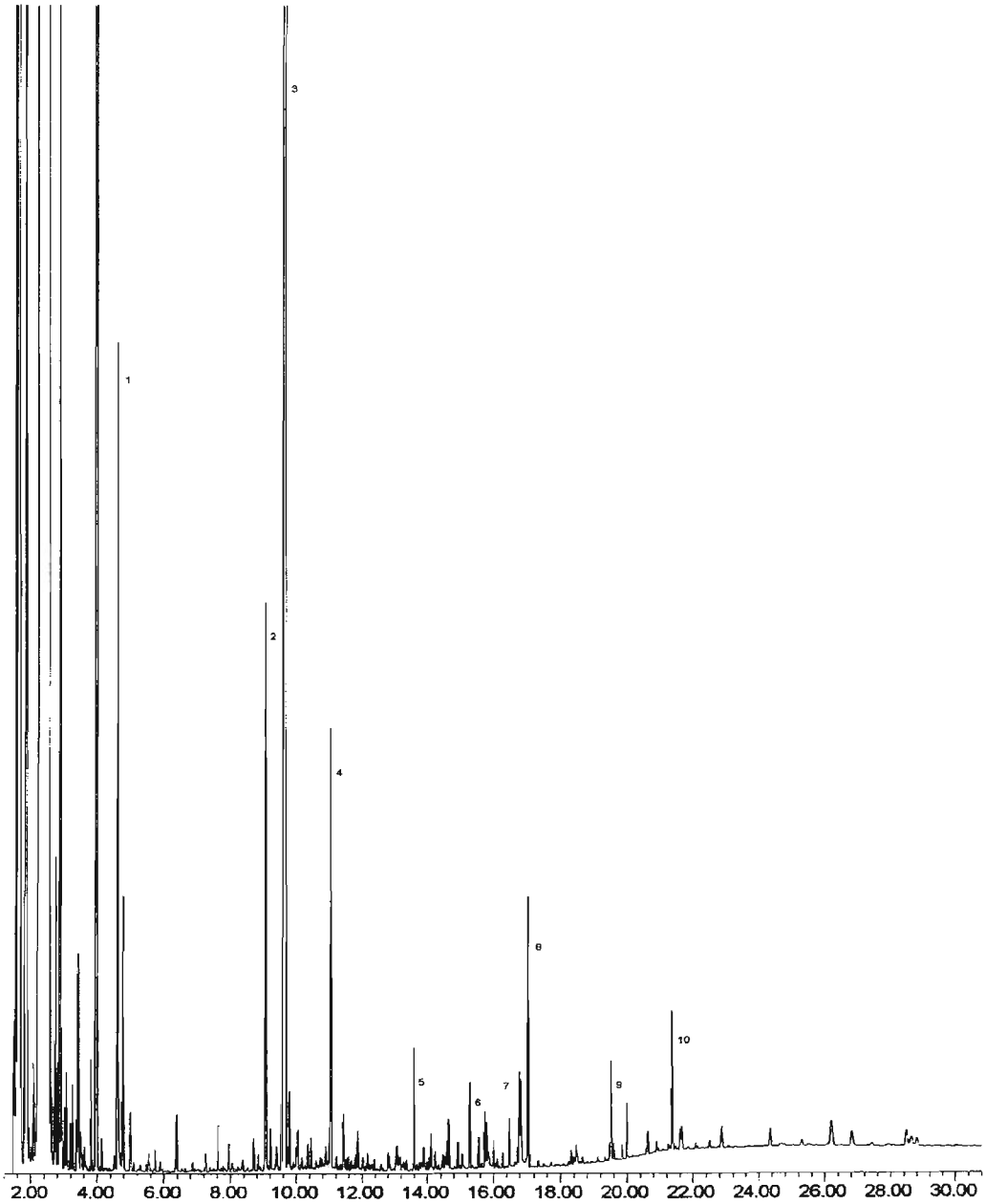


Figura 9 - Cromatograma da fração livre da farinha de semente de mostarda, purfificada por cromatografia em camada delgada. Ácidos: (1) salicílico; (2) *trans* cinâmico; (3) ρ-hidroxibenzóico; (4) vanílico; (5) ρ-cumárico; (6) ferúlico; (7) caféico; (8) *cis* sináptico; (9) *trans* sináptico; (10) catequina.

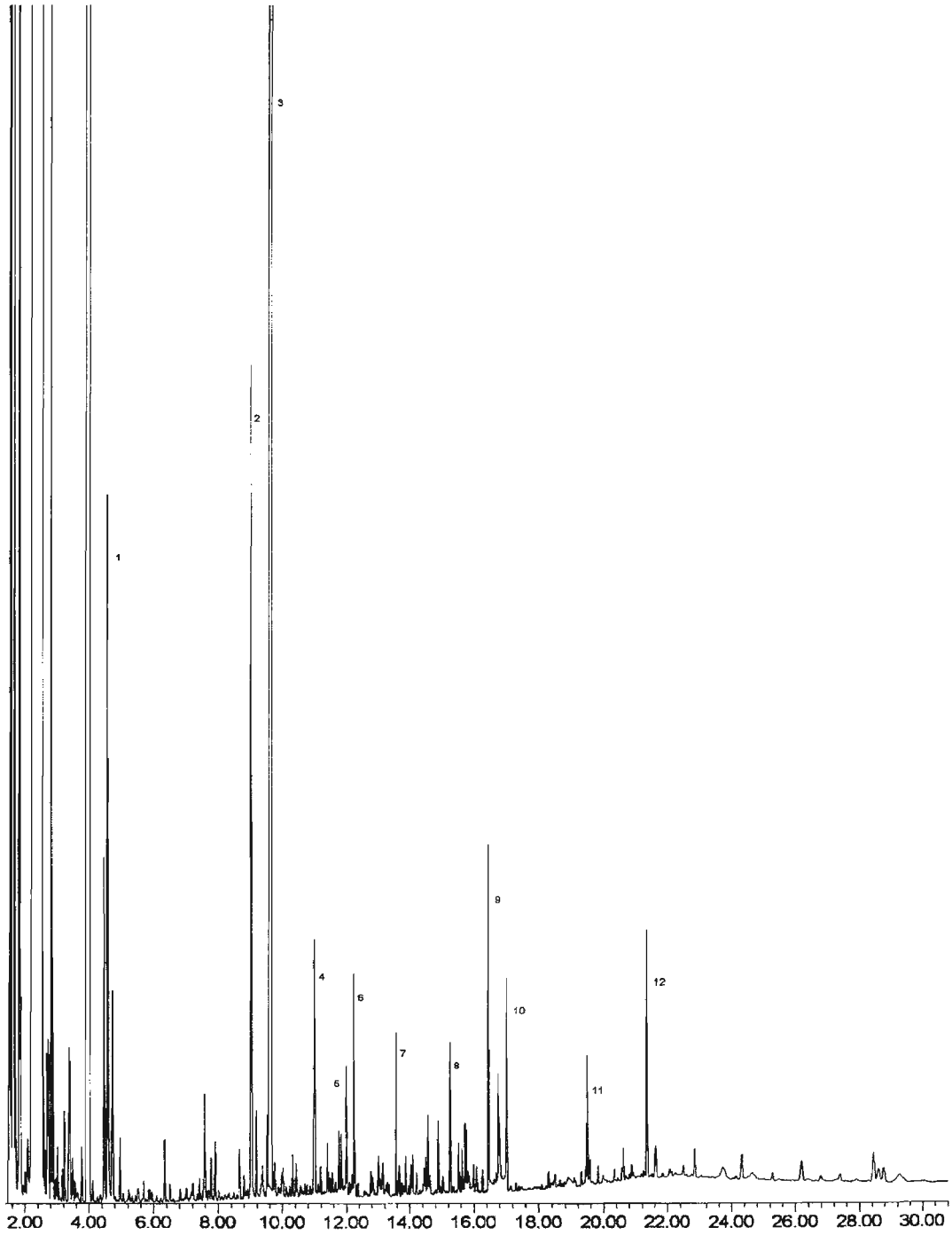


Figura 10 - Cromatograma da fração de ésteres solúveis da farinha de sementes de mostarda, purificada por cromatografia em camada delgada. Ácidos: (1) salicílico; (2) *trans* cinâmico; (3) ρ-hidroxibenzóico; (4) vanílico; (5) gentíssico; (6) quínico; (7) ρ-cumárico; (8) ferúlico; (9) caféico; (10) *cis* sináptico; (11) *trans* sináptico (12) catequina.

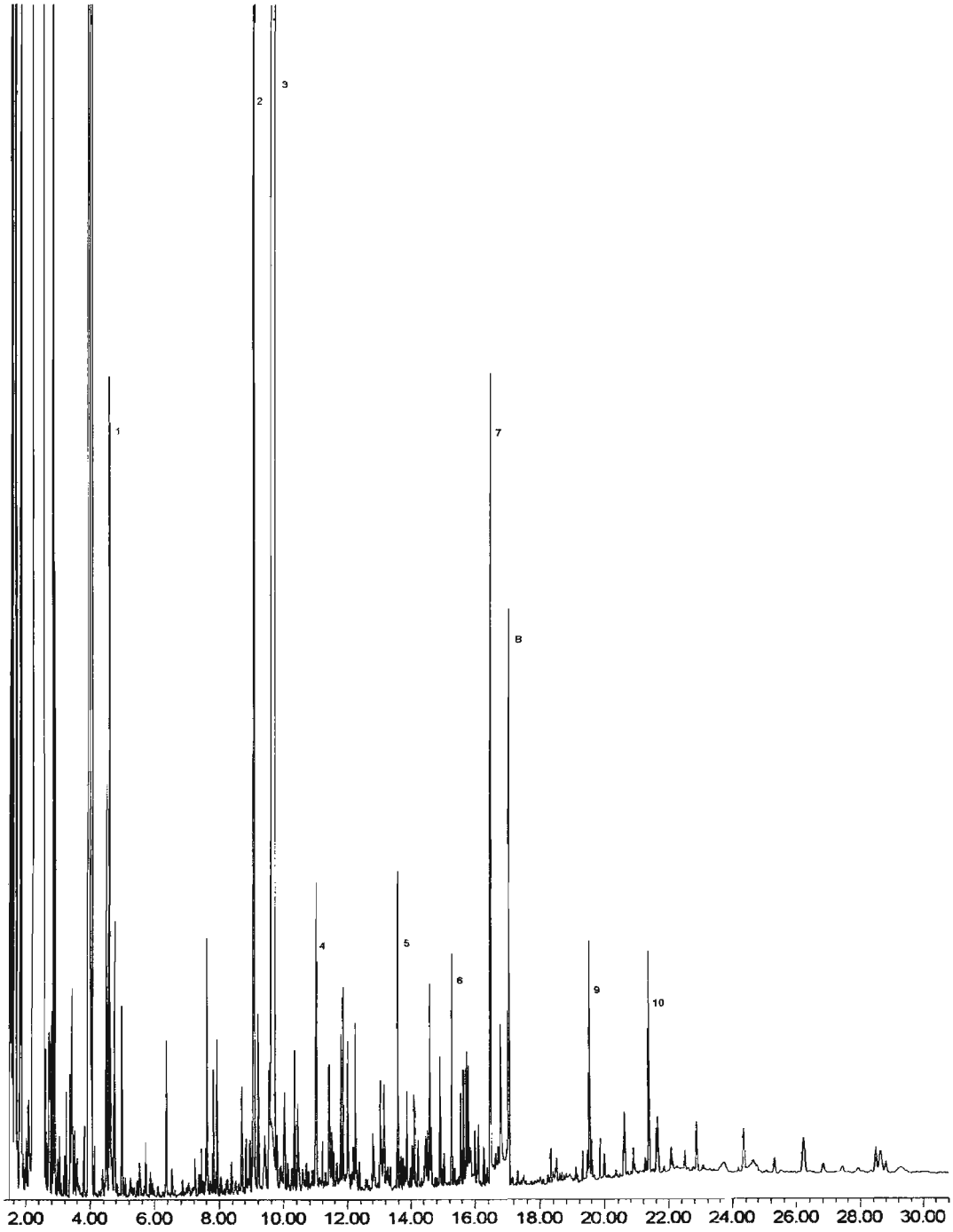


Figura 11 - Cromatograma da fração de ligantes insolúveis da farinha de sementes de mostarda, purificados por cromatografia em camada delgada. Ácidos: (1) salicílico; (2) *trans* cinâmico; (3) ρ-hidroxibenzóico; (4) vanílico; (5) ρ-cumárico; (6) ferúlico; (7) caféico; (8) *cis* sináptico; (9) *trans* sináptico (10) catequina.

5.6- Atividade antioxidante no sistema β-caroteno/ácido linoléico

O consumo de lípides na alimentação humana é relativamente elevado, pois atinge, em algumas regiões, até 45% do total das calorias ingeridas. Devido a ampla complexidade dos lípides, os mesmos estão sujeitos a uma série de reações que podem levar a alterações estruturais, causados por processos oxidativos, com comprometimento do seu valor nutricional (NAWAR, 1996).

Nosso trabalho apresenta resultados de atividade antioxidante de extratos e frações de fenólicos de sementes de mostarda(*Brassica alba*), suportando possíveis aplicações em estudos *ex vivo* e *in vivo* dos extratos e compostos fenólicos identificados e purificados da farinha de semente de mostarda (*Brassica alba*).

Os resultados da atividade antioxidante das sementes de mostarda estão apresentados nas tabelas 7, 8, 9 e 10 e nos gráficos 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Tais resultados foram expressos de acordo com a porcentagem de inibição da oxidação no sistema β-caroteno/ácido linoléico, em relação à concentração desses extratos.

Como podemos observar na tabela 7 o extrato aquoso foi o que demonstrou possuir a maior percentagem de inibição da oxidação, 68,2%, apresentando-se significativamente maior do que os extratos etéreo e alcoólico com percentagens de 40,8% e 16,2%, respectivamente, em relação ao 100% de oxidação do controle sem antioxidantes. Por outro lado, comparando com os dados de inibição da oxidação com o antioxidante sintético BHT, os valores de todos os extratos apresentaram-se inferiores, com média de 20% a menos da inibição da oxidação. No entando, comparando os valores do BHT, nos meios solúveis em éter etílico, álcool etílico e água, foi observado que o BHT possui melhor atividade antioxidante, quando solubilizado em éter etílico ou água, com porcentagens de inibição de 83,6% e 85,2%, respectivamente, em relação a 100% de oxidação do controle. A menor atividade foi observada quando o BHT foi solubilizado em álcool etílico, apresentando apenas 60,4% de inibição da oxidação, em relação a 100% de oxidação do controle sem antioxidantes.

Tabela 7 - Porcentagem de inibição da oxidação dos extratos etéreo, alcoólico e aquoso da farinha de sementes de mostarda

PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DA OXIDAÇÃO DA MOSTARDA (*B. alba*)						
EXTRATOS	mostarda 50 ppm	BHT 50 ppm	mostarda 25 ppm + BHT 25 ppm	mostarda 100 ppm	BHT 100 ppm	mostarda 50 ppm + BHT 50ppm
Etéreo	40,8 ± 0,7	86,6 ± 0,6	50,8 ± 0,6	52,0 ± 1,2	85, 0 ± 0,8	70,7 ± 0,4
Alcoólico	16,2 ± 0,3	64,4 ± 0,6	36, 8 ± 0,2	31, 8 ± 1,7	68,8 ± 0,8	62,6 ± 0,4
Aquoso	68,1 ± 0,4	85,2 ± 0,6	80,6 ± 0,4	71,4 ± 1,0	87,5 ± 0,8	86,6 ± 0,5

NOTA: os valores estão expressos em médias ± desvio padrão

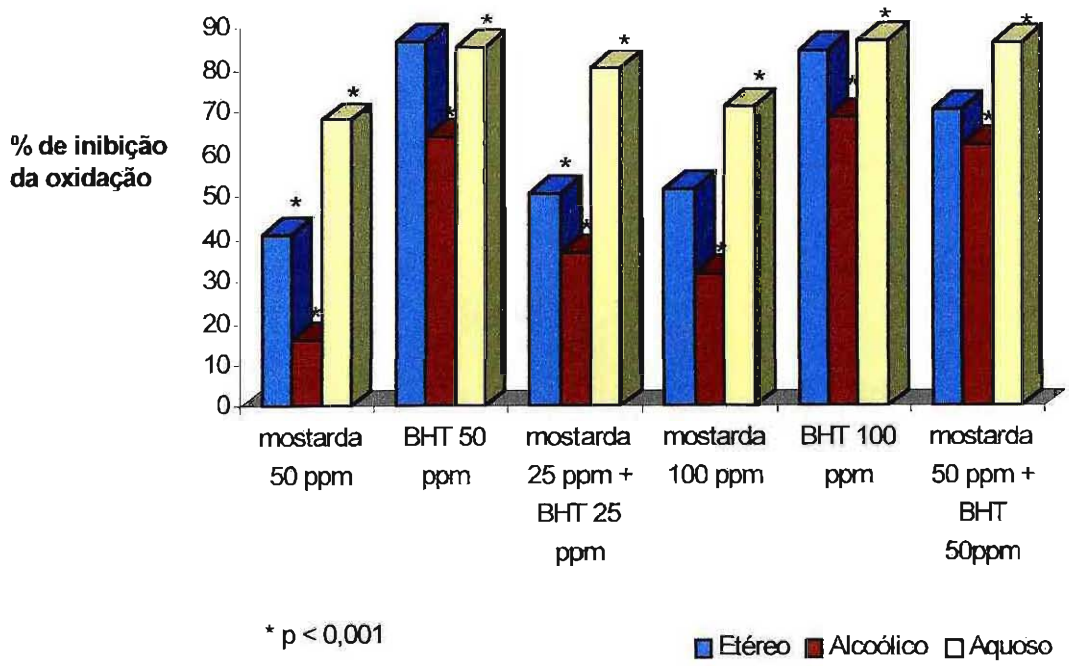


Gráfico 1 - Inibição da oxidação dos extratos etéreo, alcoólico e aquoso da farinha de sementes de mostarda

Os resultados de inibição da oxidação dos extratos e frações de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda, foram todos correlacionados com os

dados de inibição da oxidação do antioxidante sintético BHT, devido ao fato deste antioxidante ter apresentado uma porcentagem de inibição da oxidação, significativamente ($p < 0,001$), superior aos outros sintéticos, como o BHA e o propil galato, resultado que pode ser visualisado no gráfico 2 e tabela 8. Como podemos observar, na tabela 8, o BHT apresentou resultados de inibição da oxidação superiores ao BHA e ao propil galato nas duas concentrações do estudo: 1 mM e 2 mM quando solubilizado em éter etílico e água. Contudo, quando solubilizado em álcool etílico apresentou porcentagem de inibição superior ao propil galato e equivalente ao BHA com média de 70% em relação a 100% de oxidação do controle sem antioxidante.

Tabela 8 - Porcentagem de inibição da oxidação dos antioxidantes sintéticos: BHT, BHA e propil galato

SOLVENTE	BHT 1mM	BHA 1mM	PG 1mM	BHT 2 mM	BHA 2 mM	PG 2 mM
ÉTER	83,6	65,5	61,6	85,2	68,8	63,1
ÁLCOOL	60,4	70,8	34,3	68,8	70,8	36,6
ÁGUA	85,2	77,0	55,5	87,5	80,3	55,7

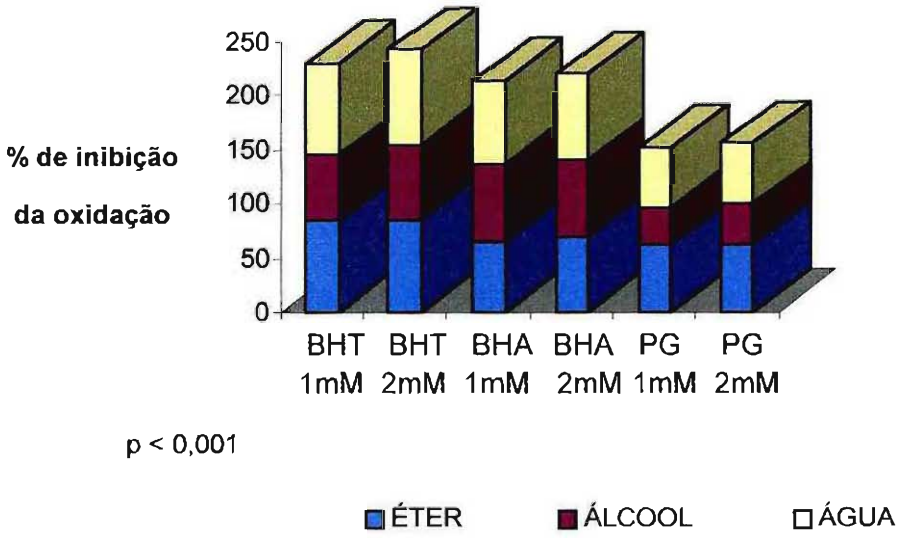


Gráfico 2 - Inibição da oxidação dos antioxidantes sintéticos: BHT, BHA e propil galato em diferentes meios de solubilização

A atividade antioxidante ou prooxidante de fenólicos é dependente dos seguintes fatores: potencial de redução de metais, poder de quelação, pH e características de solubilidade (MORGAN *et al.*, 1997).

Em uma série de trabalhos de laboratório (FRANKEL *et al.*, 1994; HOPIA *et al.*, 1996; HUANG *et al.*, 1997), as propriedades antioxidantes dos fenólicos têm também mostrado serem dependentes das suas características de solubilidade. PORTER *et al.* (1993) primeiro descreveu o "paradoxo antioxidante" como um fenômeno no qual, sequestradores de radicais livres (FRS) hidrofílicos, foram antioxidantes mais efetivos do que FRS hidrofóbicos em emulsões de óleo; onde os FRS hidrofóbicos foram mais efetivos em óleos emulsionados. Estes achados foram atribuídos para a capacidade de FRS hidrofílicos nos concentrados de interface óleo-água em sistemas lipídicos, serem mais efetivos e, por sua vez, a capacidade de FRS hidrofóbicos inibir a oxidação em concentrados na fase lipídica das emulsões. Os fenólicos hidrofílicos, como o *Trolox*® e ácido gálico, são melhores antioxidantes em sistemas de óleo do que seus homólogos hidrofóbicos, α-tocoferol e propil galato, por agirem melhor na interface óleo-água. Em óleo emulsionado, o oposto é verdadeiro, com α-tocoferol sendo mais efetivo do que *Trolox*, e metil carnosato e carnosol sendo mais efetivo do que seus homólogos hidrofílicos, ácido carnósico. Em sistemas de emulsões lipídicas, os FRS fenólicos equilibrados em água, emulsificidade (*Tween* 20®), micelas e fase lipídicas, a hidrofolicidade do fenólico aumenta, como conseqüência a inibição da oxidação lipídica. (SAIJA *et al*, 1995).

Estes resultados ajudaram a esclarecer os resultados dos extratos da mostarda, onde o extrato aquoso mostrou uma atividade significativamente maior em relação aos demais extratos ($p<0,001$). No processo de extração sequencial, o extrato aquoso apresenta, teoricamente, fenólicos de caráter hidrofílico, onde na prática confirmamos este resultado, em que o mesmo apresentou-se quase 30% mais efetivo na inibição da oxidação do que os extratos alcoólico e etéreo. Esses resultados apresentam-se na tabela 7 e gráfico 1.

Após a identificação do extrato com maior atividade antioxidante e visando a caracterização dos compostos fenólicos devido ao elevado potencial antioxidante apresentado, foi realizado um fracionamento da farinha de sementes de mostarda para obtenção das frações livre, ésteres solúveis e ligantes insolúveis de ácidos fenólicos, de acordo com o esquema proposto por KRYGIER e SOLSUSKI (1984) apresentado no item 4.2.8.2. As frações obtidas, além de utilizadas para purificação de bandas de compostos fenólicos por cromatografia em camada delgada e identificação destes compostos fenólicos por cromatografia à gás, foram submetidas ao sistema β-caroteno-ácido linóléico para verificação do potencial de inibição da oxidação destas frações.

Observamos que a fração livre apresentou 81,3% de inibição da oxidação, com uma diferença significativa, apresentando-se 15% de inibição da oxidação superior às outras frações solúvel e insolúvel, que apresentaram 67,9% e 65,7% de inbição da oxidação, em relação a 100% de oxidação do controle sem antioxidante, respectivamente. Tais resultados apresentam-se na tabela 9 e gráfico 3.

Tabela 9 - Porcentagem de inibição da oxidação das frações livre, ésteres solúveis e ligantes insolúveis de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda

PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DA OXIDAÇÃO DAS FRAÇÕES DE ÁCIDOS FENÓLICOS DA FARINHA DE SEMENTES DE MOSTARDA (*Brassica alba*)

FRAÇÕES	mostarda 50 ppm	BHT 50 ppm	mostarda 100 ppm	BHT 100 ppm
LIVRE	81,3 ± 1,18	66,2 ± 2,1	84,6 ± 1,55	72,4 ± 1,2
ÉSTERES SOLÚVEIS	67,9 ± 0,75	66,2 ± 2,1	75,5 ± 2,99	72,4 ± 1,2
LIGANTES INSOLÚVIES	65,7 ± 2,13	66,2 ± 2,1	77,0 ± 2,79	72,4 ± 1,2

NOTA: os valores estão expressos em médias ± desvio padrão

BHT - solubilizado no mesmo solvente das frações: THF (tetrahidrofurano).

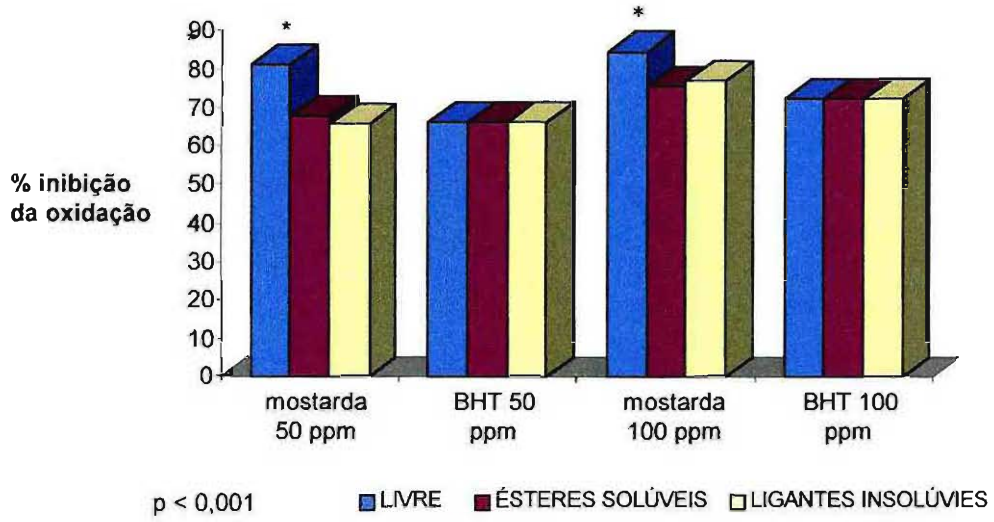


Gráfico 3 - Inibição da oxidação das frações livres, ésteres solúveis e ligantes insolúveis de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda.

Após realização dos ensaios de atividade antioxidante, foi verificado que a fração livre apresentou o maior pontencial antioxidante e por isso, resolveu-se realizar o mesmo ensaio (seguindo o protocolo do item 4.2.10.) com diferentes volumes de 0,002 mL até 0,1 mL para realização de uma curva de dispersão e cálculo da equação da reta, com o objetivo de encontrar a concentração responsável por 80% de proteção (porcentagem máxima de inibição da oxidação da fração livre de ácidos fenólicos da farinha de semente de mostarda).

Em uma quantidade de aproximadamente 0,05 mL, a fração livre apresentou uma concentração de 1,11 μg/ml, responsável por uma percentagem de proteção de 80%. Após esta concentração, como observado graficamente, a curva torna-se constante, ou seja, a curva é ascendente até uma quantidade de extrato em torno de 0,05 mL; acima desta quantidade a curva tende a ficar assintótica, sugerindo este volume de extrato, da fração livre de ácidos fenólicos da farinha de semente de mostarda, como tomada inicial, para realizações de futuros protocolos experimentais *ex vivo* e *in vivo* de aplicação dessas substâncias em estudo.

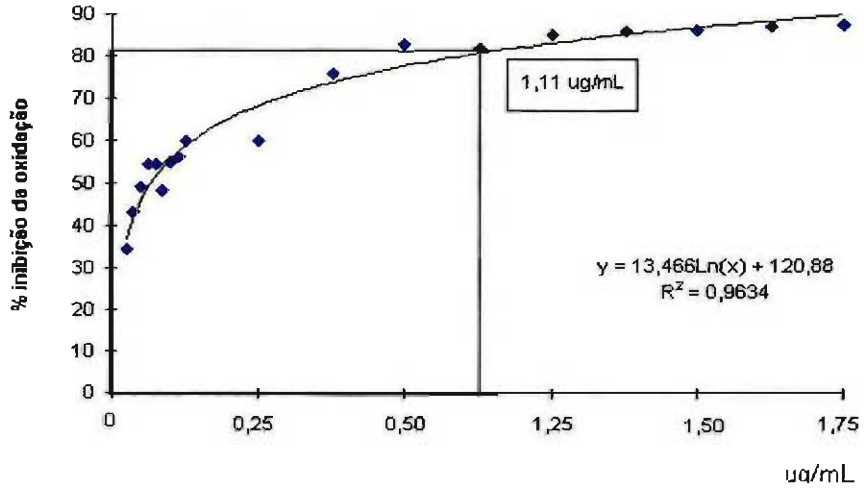


Gráfico 4 - Efeito da concentração dos ácidos fenólicos da fração livre no processo de inibição da oxidação

O experimento ilustrado no gráfico 2 permitiu apenas, identificar a atividade antioxidante no seu aspecto total e quantitativo, frente ao antioxidante sintético nas concentrações de 50 ppm e 100 ppm. Portanto, devido ao elevado potencial antioxidante destas frações (livre, solúvel e insolúvel), nos propusemos a verificar, qual a concentração mínima destas frações com elevado potencial antioxidante similar ao BHT, ao antioxidante natural α-tocoferol e a uma mistura de padrões de ácidos fenólicos.

Tabela 10 - Atividade antioxidante das frações livre, solúvel e insolúvel da farinha de sementes de mostarda, em comparação ao antioxidante sintético BHT, α-tocoferol e a uma mistura de padrões de ácidos fenólicos em diferentes concentrações

	Concentração em ppm					
	5	10	25	50	100	200
α-tocoferol	50,3	58 ,0	70,0	79,6	67,3	30,6
BHT	40,6	45 ,0	60,2	68,4	60,4	40,0
Mistura de padrões de fenólicos*	42,9	43 ,0	44,0	45,0	41,0	35,0
AFL mostarda	55,0	60 ,0	73,1	81,3	84,6	50,2
AFES mostarda	43,7	48,6	52,65	67,9	75,4	35,5
AFEI mostarda	35,5	53,5	61,6	65,7	77,0	83,7

* ácidos: trans cinâmico, p-hidroxibenzóico, vanílico, gentíssico, protocatecuico, quínico, cumárico, gálico, sináptico, catquínico e clorogênico.

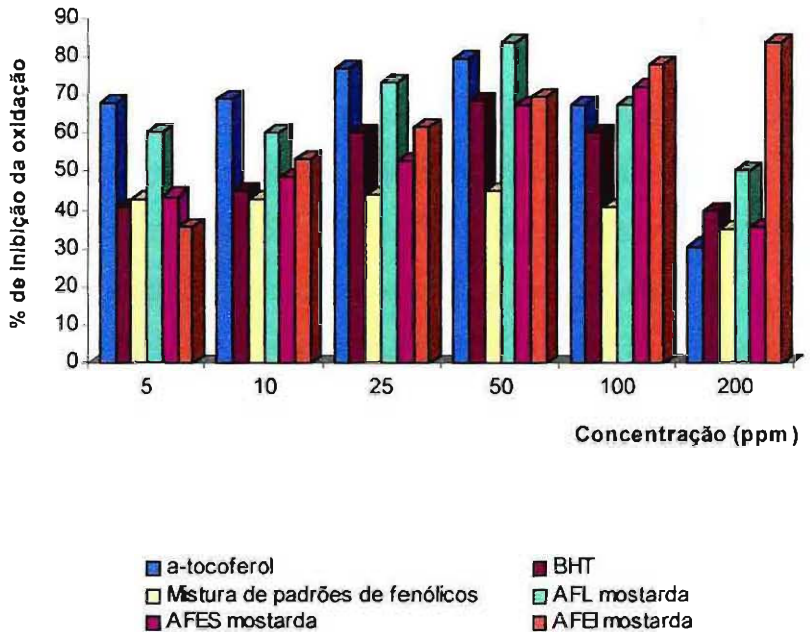


Gráfico 5 - Atividade antioxidante das frações livre, solúvel e insolúvel em comparação a mistura de padrões de ácidos fenólicos, BHT e α-tocoferol em diferentes concentrações.

O gráfico 5, obtido pelos dados da tabela 10, apresenta o comportamento das frações livre, ésteres solúveis e ligantes insolúveis de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda, frente a concentrações de 5 a 200 ppm. Os resultados do comportamento das frações foram comparados ao antioxidante sintético BHT, a uma mistura de ácidos fenólicos e a um outro antioxidante natural o α-tocoferol. Nesta figura pode-se verificar que, a partir da concentração de 5 ppm até 50 ppm, todas as frações, mistura de padrões, BHT e α-tocoferol aumentaram linearmente o seus percentuais de inibição da oxidação em relação a 100% de oxidação do controle sem antioxidantes. Acima da concentração de 50 ppm porém, todos os componentes do gráfico, tiveram comportamentos distintos: a mistura de padrões que mostrou-se estável, mantendo seu potencial de inibição da oxidação em torno de 40%. Por outro lado, o α-tocoferol, BHT e as frações livre e solúvel da mostarda apresentaram quedas significativas ($p < 0,05$) no seus potenciais de inibição da oxidação, em relação a 100% de oxidação do controle sem antioxidantes.

Entretanto, este efeito não foi observado pela fração insolúvel, que mesmo a uma concentração de 200 ppm não diminuiu seu potencial de inibição da oxidação.

Deve-se destacar que todos os ensaios cinéticos da determinação da inibição da oxidação foram acompanhados de uma mistura de padrões de ácidos fenólicos, já identificados e caracterizados (Sigma®), que apresentaram baixa atividade antioxidante, porém estável. Observou-se que neste sistema, o α-tocoferol apresentou uma atividade antioxidante superior ao BHT e quase equivalente a fração livre (maior percentagem de inibição da oxidação no sistema). Esperava-se que, sendo o α-tocoferol um antioxidante hidrofóbico, fossem obtidos valores inferiores a todos os demais, visto que, através de dados da literatura (SAIJA *et al.*, 1995), que o caráter de solubilidade de antioxidantes é um fator importante de sua atividade antioxidante em meios aquosos ou com emulsificantes.

Estes resultados sugerem uma concentração para os protocolos experimentais não superior a 50 ppm, confirmando o conceito de antioxidante como sendo "aquela substância, que, em concentrações mínimas são capazes de inibir ou retardar processos de oxidativos".

Frente aos ácidos fenólicos presentes na farinha de sementes de mostarda, como identificados nas figuras 6, 7, 8, 9, 10 e 11, como sendo responsáveis pela atividade antioxidante das frações livre, solúvel e insolúvel da farinha de sementes de mostarda, foi realizado, individualmente, a determinação da atividade antioxidante de alguns fenólicos identificados nas frações da mostarda (item 4.2.11). Estes resultados apresentam-se na tabela 11 e gráfico 6.

Tabela 11 - Inibição da oxidação de alguns ácidos fenólicos presentes na farinha de sementes de mostarda no sistema β-caroteno/ácido linoléico

	ÁCIDOS						
	quínico	caféico	ferúlico	p-hidroxibenzóico	sináptico	catequina	trans-cinâmico
Extrato etéreo 1mM	28,15	36,45	33,45	15,25	37,3	1,15	7,0
Extrato etéreo 2mM	40,2	54,3	68,8	45,05	39,15	7,65	13,15
Extrato alcoólico 1mM	33,55	32,35	21,05	8,45	24,7	6,3	12,95
Extrato alcoólico 2mM	37,85	33,15	33,25	10,05	28,5	8,2	12,85
Extrato aquoso 1mM	66,45	34,25	17,35	7,8	19,85	3,85	4,25
Extrato aquoso 2mM	69,15	53,15	17,95	13,55	21,3	22,1	9,95

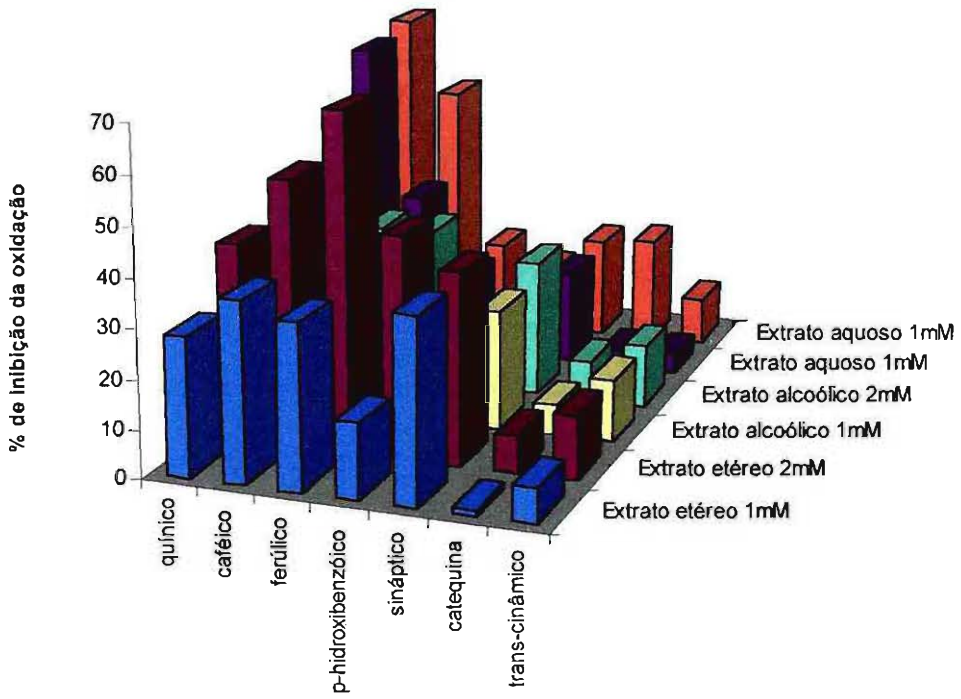


Gráfico 6 - Atividade antioxidante de alguns ácidos fenólicos presentes na farinha de sementes de mostarda

Como pode ser observado, todos os ácido fenólicos presentes (com exceção da catequina, do ácido quínico e caféico), apresentaram maior potencial de inibição da oxidação quando solubilizados em éter etílico a uma concentração de 2 mM. Por outro lado os ácidos quínico e caféico e a catequina apresentaram um percentual de inibição da oxidação quando solubilizados em água, que confirmam dados de literatura, em relação a solubilidade destes ácidos (SAIJA *et al*, 1995). A presença destes ácidos, principalmente do ácido ρ-hidroxibenzóico, confere à farinha de sementes de mostarda a sua estabilidade no processo de inibição da oxidação em diferentes meios de polaridade (gráfico 6).

Visando um melhor esclarecimento do mecanismo de ação antioxidante dos ácidos fenólicos presentes na farinha de sementes da mostarda, foram construídas as curvas cinéticas da inibição da oxidação no sistema β-caroteno/ácido linoléico

pelos extratos etéreo, alcoólico e aquoso da farinha de semente de mostarda, como também, das frações livre, solúvel e insolúvel de ácidos fenólicos em comparação ao antioxidante sintético BHT, ao antioxidante natural α-tocoferol e a mistura de padrões de ácidos fenólicos.

Foi avaliada a atividade antioxidante dos extratos etéreo, alcoólico e aquoso da mostarda (*Brassica alba*, L.) em 120 minutos no sistema β-caroteno/ácido linoléico, frente ao antioxidante sintético BHT, em concentrações de 50 ppm e 100 ppm, seguindo o procedimento descrito em 4.2.11. E os cálculos das tangentes obtidas dos gráficos, foram obtidos como descrito no item 4.2.11.

Nos gráficos 7, 8 e 9 estão representadas as curvas cinéticas da atividade antioxidante dos extratos etéreo, alcoólico e aquoso da farinha de sementes de mostarda; e, no gráfico 10 a curva cinética da atividade antioxidante de suas frações de ácidos fenólicos em comparação ao antioxidante sintético BHT, o antioxidante natural α-tocoferol e a mistura de padrões de ácidos fenólicos. Os resultados são expressos de acordo com a percentagem de inibição da oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoléico em relação a concentração dos mesmos em 100% de oxidação do controle sem antioxidante.

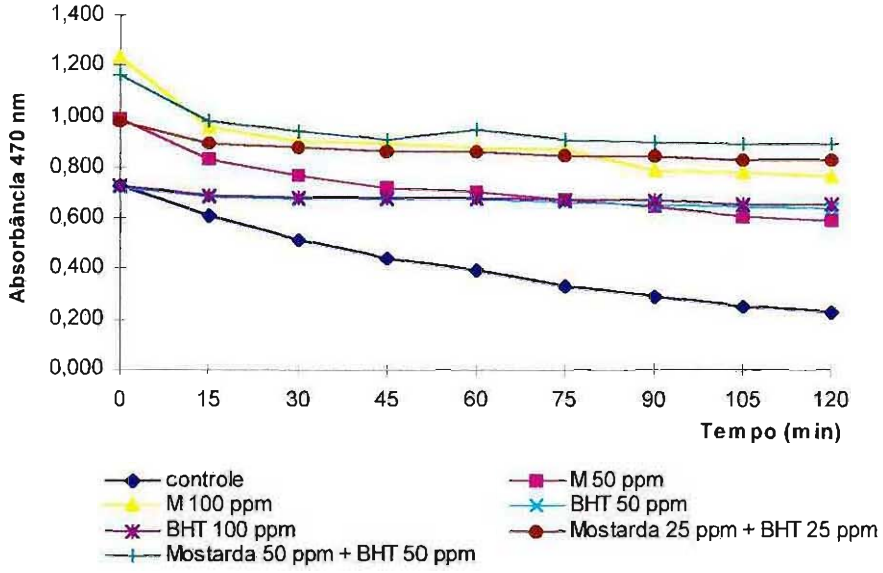


Gráfico 7 - Atividade antioxidante do extrato etéreo da farinha de sementes de mostarda

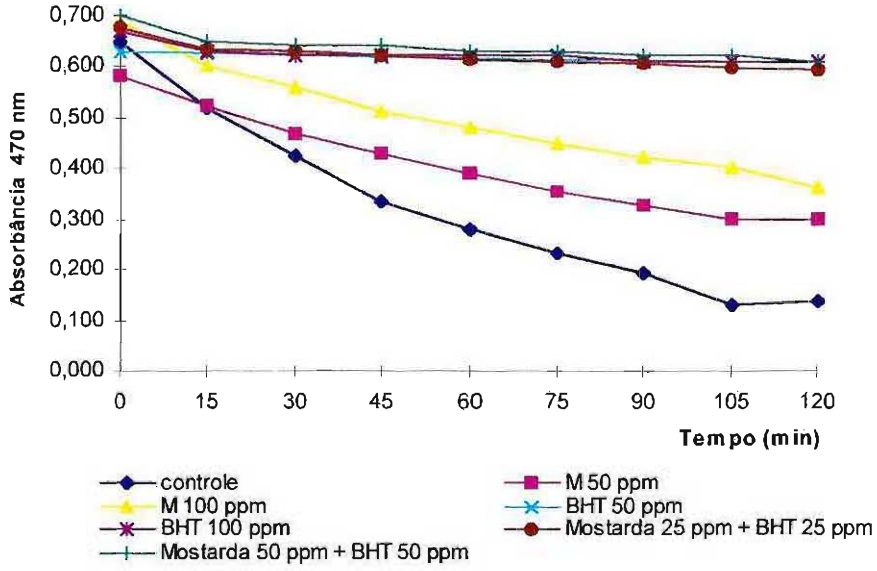


Gráfico 8 - Atividade antioxidante do extrato alcoólico da farinha de sementes de mostarda

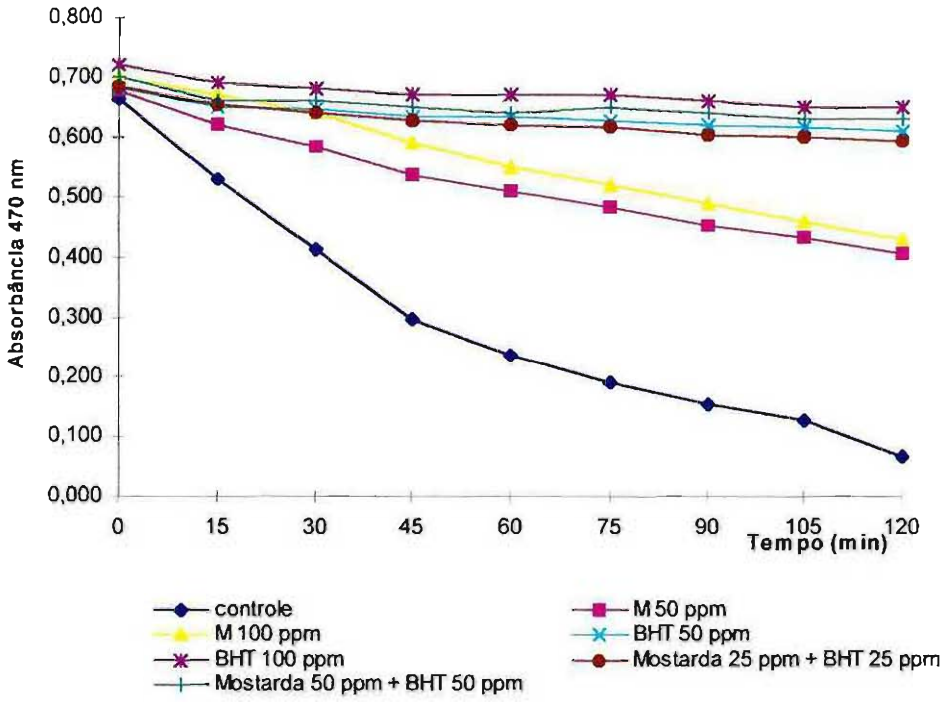
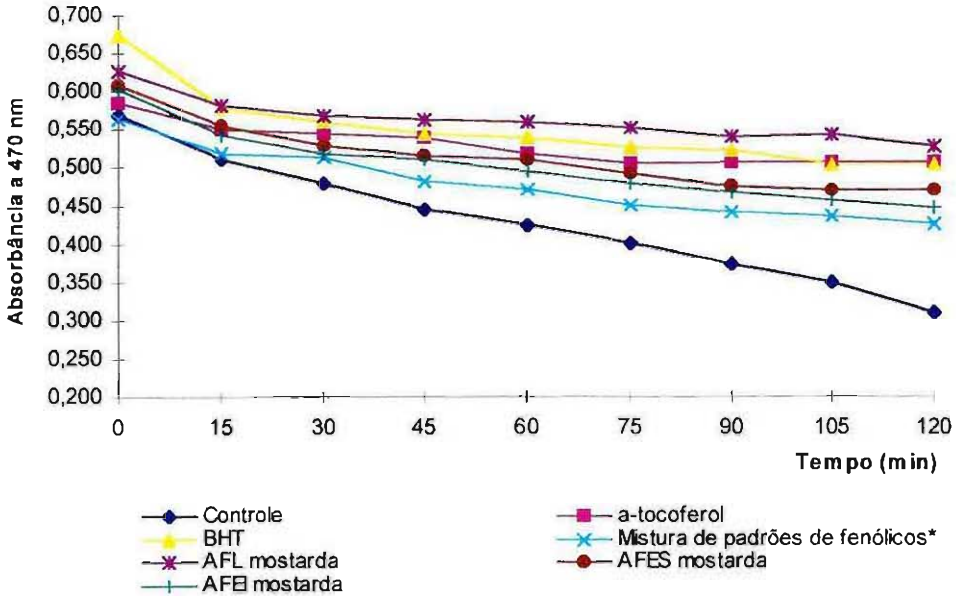


Gráfico 9 - Atividade antioxidante do extrato aquoso da farinha de sementes de mostarda

Observamos que o extrato etéreo, em uma concentração de 50 ppm, apresentou leituras ópticas proporcionais ao antioxidante sintético BHT, as concentrações de 50 ppm e 100 ppm. Por outro lado, o extrato etéreo em concentração de 100 ppm apresentou leituras semelhantes, mesmo associado com o antioxidante sintético BHT nas mesmas concentrações, não confirmando um efeito sinergista deste extrato (etéreo) a 100 ppm com o antioxidante sintético BHT (50 ppm do extrato + 50 ppm do BHT). Resultado oposto desse extrato, foi observado em uma concentração de 50 ppm, onde ocorreu um aumento da proteção em relação ao tempo quando associado com o BHT (25 ppm do extrato + 25 ppm do BHT) (Gráfico 7).

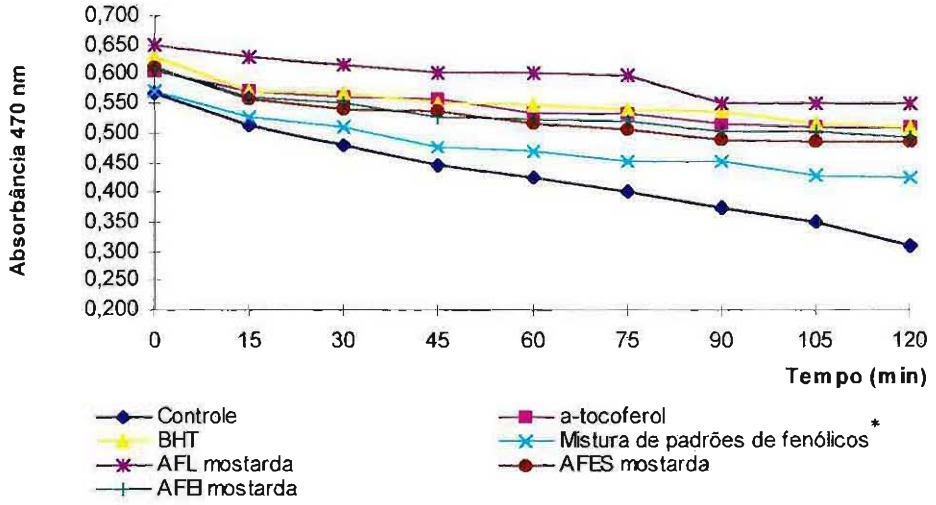
Já no extrato alcoólico da mostarda observamos uma atividade antioxidante em relação ao tempo, proporcional ao BHT quando associados ao mesmo antioxidante sintético, nas mesmas concentrações dos extratos de 50 ppm e 100 ppm, sem esta associação, a proteção, observada pelo gráfico da absorbância, diminui proporcionalmente ao tempo (Gráfico 8).

No extrato aquoso, as concentrações de 50 ppm e 100 ppm não apresentaram muita diferença nas leituras na absorbância a 470 ηm. Quando associados com o BHT nas mesmas concentrações, observou-se uma estabilidade na proteção a partir dos 30 minutos de análises, indicando um bom efeito sinergista desse extrato quando associado ao antioxidante sintético BHT. É importante salientar, a característica de solubilidade dos fenólicos presentes neste extrato, onde já vimos que o caráter hidrofílico de tais substâncias melhora significativamente a resposta à oxidação (Gráfico 9).



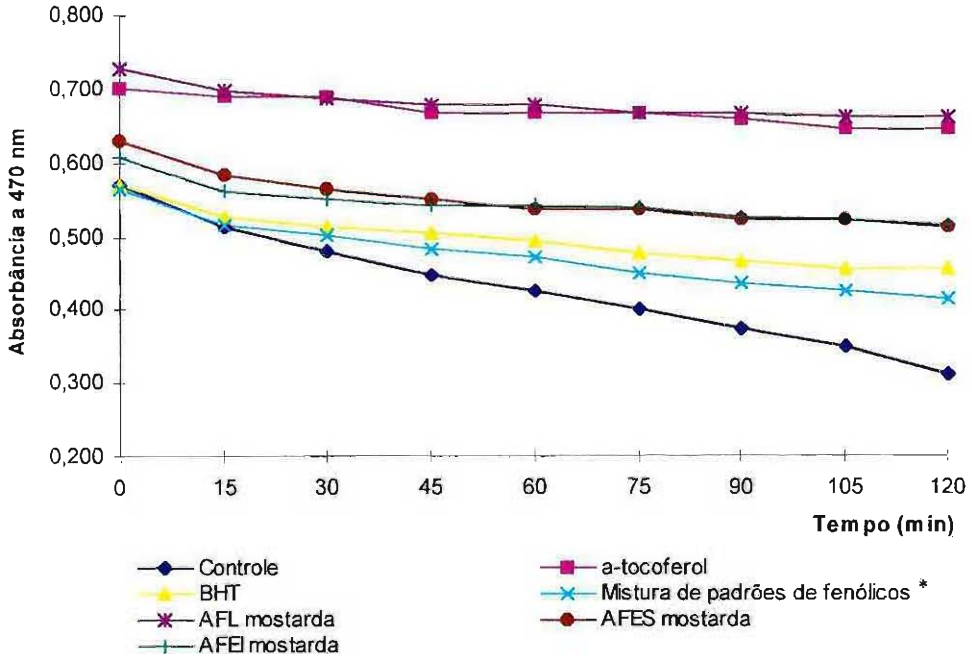
* ácidos: trans cinâmico, p-hidroxibenzóico, vanílico, gentíssico, protocatecuico, quínico, cumárico, gálico, sináptico, catquínico e clorogênico.

Gráfico 10 - Atividade antioxidante das frações livre, solúvel e insolúvel da farinha de sementes de mostarda em comparação com a mistura de padrões de ácidos fenólicos, BHT e o antioxidante natural α-tocoferol, em uma concentração de 5 ppm.



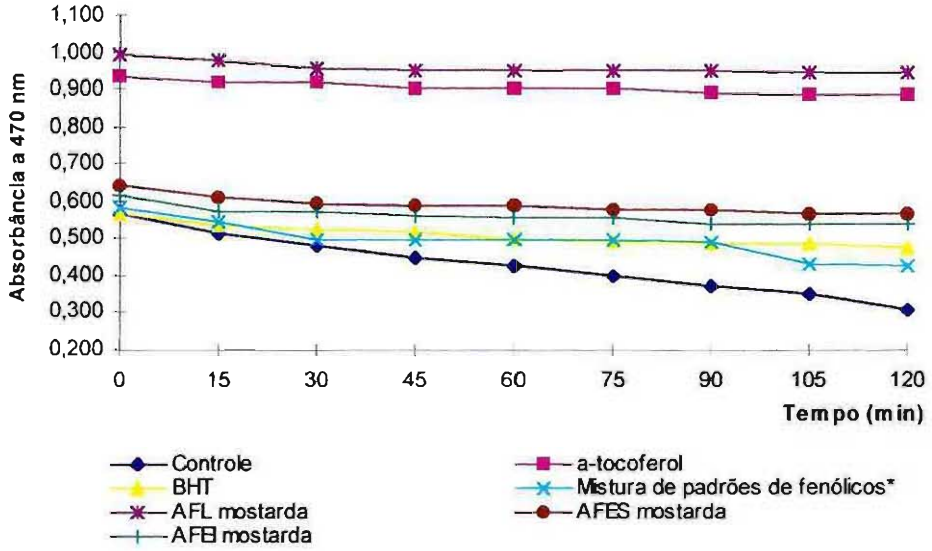
* ácidos: trans cinâmico, p-hidroxibenzóico, vanílico, gentíssico, protocatecuico, quínico, cumárico, gálico, sináptico, catquínico e clorogênico.

Gráfico 11 - Atividade antioxidante das frações livre, solúvel e insolúvel da farinha de sementes de mostarda em comparação com a mistura de padrões de ácidos fenólicos, BHT e o antioxidante natural α-tocoferol, em uma concentração de 10 ppm.



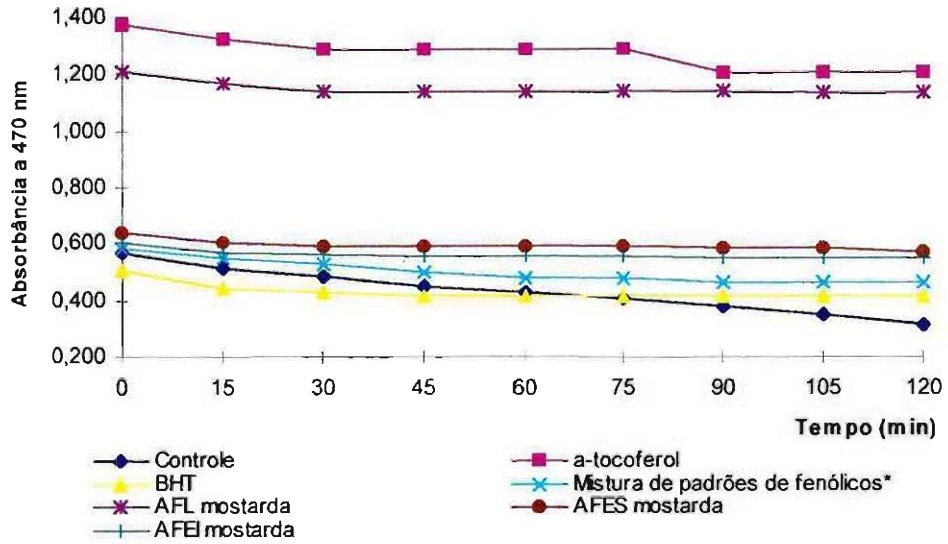
* ácidos: trans cinâmico, p-hidroxibenzóico, vanílico, gentíssico, protocatecuico, quínico, cumárico, gálico, sináptico, catquínico e clorogênico.

Gráfico 12 - Atividade antioxidante das frações livre, solúvel e insolúvel da farinha de sementes de mostarda em comparação com a mistura de padrões de ácidos fenólicos, BHT e o antioxidante natural α-tocoferol, em uma concentração de 25 ppm.



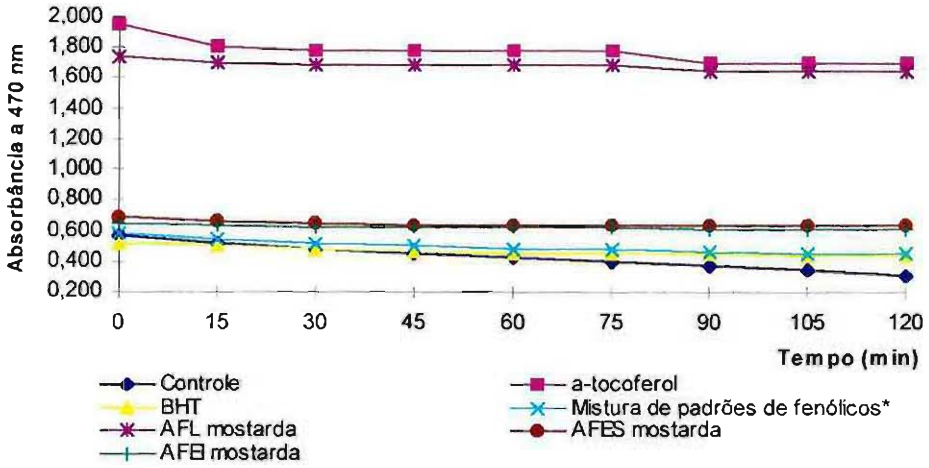
* ácidos: trans cinâmico, p-hidroxibenzóico, vanílico, gentíssico, protocatecuico, quínico, cumárico, gálico, sináptico, catquinico e clorogênico.

Gráfico 13 - Atividade antioxidante das frações livre, solúvel e insolúvel da farinha de sementes de mostarda em comparação com a mistura de padrões de ácidos fenólicos, BHT e o antioxidante natural α-tocoferol, em uma concentração de 50 ppm.



* ácidos: trans cinâmico, p-hidroxibenzóico, vanílico, gentíssico, protocatecuico, quínico, cumárico, gálico, sináptico, catquinico e clorogênico.

Gráfico 14 - Atividade antioxidante das frações livre, solúvel e insolúvel da farinha de sementes de mostarda em comparação com a mistura de padrões de ácidos fenólicos, BHT e o antioxidante natural α-tocoferol, em uma concentração de 100 ppm.



* ácidos: trans cinâmico, p-hidroxibenzóico, vanílico, gentíssico, protocatecuico, quínico, cumárico, gálico, sináptico, catquínico e clorogênico.

Gráfico 15 - Atividade antioxidante das frações livre, solúvel e insolúvel da farinha de semente de mostarda em comparação com a mistura de padrões de ácidos fenólicos, BHT e o antioxidante natural α-tocoferol, em uma concentração de 200 ppm.

Como já discutido anteriormente, pode-se observar que com o aumento da concentração das frações livre, solúvel e insolúvel, como também, a mistura de padrões de ácidos fenólicos, BHT e α-tocoferol, há um aumento da atividade antioxidante desses componentes até a concentração de 50 ppm. A partir desta concentração, observou-se comportamentos diferenciados para cada componente, em alguns, influenciado pela concentração, foi observado ação prooxidante, como já discutido no item 5.6. e visualizados nos gráficos de 10, 11, 12, 13, 14 e 15. Através desses resultados, quando correlacionados com a concentração, também foi possível elaborar as tabelas 12 e 13, onde encontram-se os fatores calculados a partir das tangentes das curvas cinéticas. De acordo com YANISHLIEVA & MARINOVA (1995), o fator F_1 representa a efetividade do antioxidante em bloquear as reações em cadeia ocasionadas pelos radicais peróxido, enquanto o F_2 representa a possibilidade do antioxidante participar de outras reações, tais como: decomposição dos hidroperóxidos com oxigênio formando espéceis radicalares, que aceleram o processo oxidativo do sistema. Nesse caso, se o valor da razão entre as tangentes das curvas do extrato e do controle forem maior que 1, então há uma atividade pró-oxidante, dada pela participação da substância antioxidante em reações como:

$ROO^{\cdot} + AH \quad ROOH + A^{\cdot}$ $\qquad$ $A^{\cdot} + ROOH \quad AH + ROO^{\cdot}$

$A^{\cdot} + O_2 \quad A^{\cdot} + HO_2^{\cdot}$ $\qquad$ $A^{\cdot} + RH \quad AH + R^{\cdot}$

$AH + O_2 \quad A^{\cdot} + HO_2^{\cdot}$

AH= Composto antioxidante

$ROO^{\cdot}$= Radical peróxido

ROOH = hidroperóxido

Tabela 12 - Parâmetros cinéticos caracterizando a inibição da oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoléico pelos extratos da farinha de semente de mostarda.

	Concentração			
	50 ppm		**100 ppm**	
Componentes	F_1	F_2	F_1	F_2
Extrato etéreo	0,8	0,3	1,0	1,0
Extrato alcoólico	0,3	0,3	0,3	0,3
Extrato aquoso	0,4	1,0	0,1	1,0
BHT (étéreo)	0,2	0,1	0,2	0,1
BHT (alcoólico)	0,16	0,03	0,16	0,03
BHT (aquoso)	0,3	0,1	0,1	0,1
Extrato etéreo + BHT(etéreo)	0,3	0,1	0,6	0,1
Extrato alcoólico + BHT(alcólico)	0,16	0,03	0,16	0,03
Extrato aquoso + BHT(aquoso)	0,1	0,1	0,1	0,1

Como foi possível verificar em todos os extratos da farinha de sementes de mostarda, as duas concentrações estudadas (50 e 100 ppm), apresentaram valores de F_1 próximos aos obtidos com o BHT, demostrando que esse extrato possui a efetividade de bloquear reações em cadeia, semelhante à apresentada pelo antioxidante sintético. Esta proximidade aumenta, quando os mesmos estão associados ao BHT, apontando, desse modo, relações sinergistas destes extratos com o BHT. O mesmo foi observado para os valores de F_2, confirmando a ação antioxidante desses extratos.

Tabela 13 - Parâmetros cinéticos caracterizando a inibição da oxidação do sistema β-caroteno/ácido

linoléico pelas frações de ácidos fenólicos da farinha de semente de mostarda.

COMPONENTES	Concentração											
	5 ppm		10 ppm		25 ppm		50 ppm		100 ppm		200 ppm	
	F_1	F_2	F_1	F_2	F_1	F_2	F_1	F_2	F_1	F_2	F_1	F_2
α-tocoferol	0,3	0,1	0,3	0,4	0,2	0,4	0,3	0,3	0,7	1,5	1,3	1,5
BHT	1,0	0,4	0,6	0,4	0,3	0,4	0,3	0,1	0,7	0,1	0,3	0,2
Mistura de padrões de fenólicos	0,7	0,3	0,6	0,4	0,3	0,4	0,7	1,0	0,7	0,3	0,6	0,5
Fração livre de ácidos fenólicos	0,3	0,2	0,3	1,0	0,3	0,1	0,3	0,1	0,7	0,2	0,3	0,5
Fração de ésteres solúveis de ácidos fenólicos	0,7	0,4	0,6	0,4	0,7	0,3	0,3	0,2	0,3	0,1	0,3	0,1
Fração de ligantes insolúveis de ácidos fenólicos	0,7	0,4	0,6	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1	0,2	0,2

Já com relação às frações de ácidos fenólicos, os valores de F_1 e F_2 encontrados, demonstraram elevada capacidade de inibir a oxidação no sistema utilizado até a concentração de 50 ppm sendo estes valores equivalentes ao antioxidante sintético BHT. No entanto a partir dessa concentração, observou-se ação pró-oxidante de alguns componentes, como o antioxidante natural α-tocoferol. Todas as frações apresentaram valores de F_1 e F_2 inferiores a 1 (hum) e a estabilidade da oxidação na concentração de 50 ppm.

5.7 - Atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos e seus ácidos isolados em sistemas lipídicos

Tendo em vista a efetividade das frações de ácidos fenólicos da mostarda na inibição da oxidação no sistema β-caroteno/ácido linoléico e buscando uma provável aplicação em alimentos, foi realizada atividade antioxidante das frações em sistemas lipídicos como descrito no item 4.2.13.

Para tanto, foi utilizado óleo de soja sem antioxidantes (Cargil Agricola S/A, que foi submetido a testes de estabilidade pelo teste de *Schaal* e pelo método do oxigênio ativo, empregando-se as seguintes análises: índice de peróxidos, presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e formação de dienos conjugados.

Os resultados obtidos estão representados nos gráficos 16 e 17 e tabelas 14

e 15, onde houve monitoramento da oxidação pelo índice de peróxidos, nos dois sistemas utilizados: teste de *Schall* e oxigênio ativo, respectivamente.

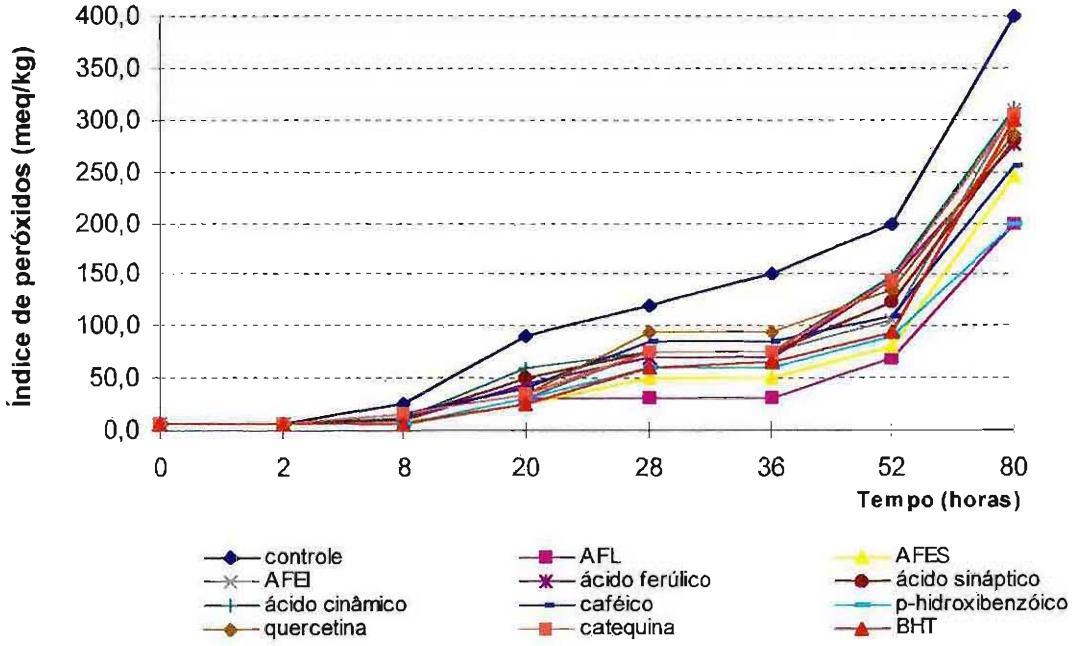


Gráfico 16 - Atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda e de seus ácidos identificados idividualmente, pela medida do índice de peróxidos nas amostras de óleo de soja submetidas a oxidação pelo teste de *Schaal*.

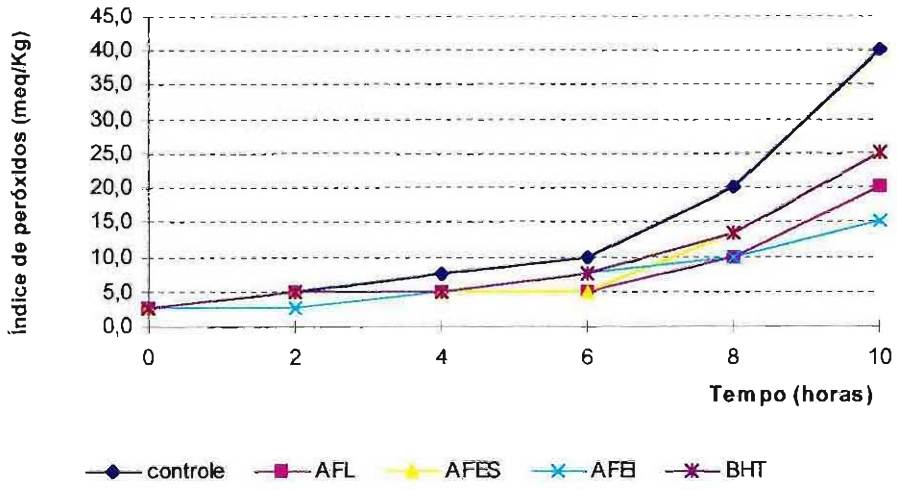


Gráfico 17 - Atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda pela medida do índice de peróxidos nas amostras de óleo de soja medido pelo método do oxigênio ativo.

Pode-se observar, no gráfico 16, que o óleo de soja sem a presença de

antioxidantes apresentou um rítmo de oxidação mais elevado, mostrando que todas as frações de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda, assim como os seus ácidos fenólicos identificados isoladamente, possuem atividade antioxidante. Contudo, a fração livre mostrou uma atividade maior que do que as outras, inclusive maior do que a dos ácidos fenólicos separadamente e do BHT. Dos ácidos fenólicos testados, o ácido ρ-hidroxibenzóico, foi o que se solubilizou melhor no sistema, com uma curva próxima da fração insolúvel e, portanto, apresentando uma melhor eficiência na inibição da oxidação. Apesar da maior efetividade da fração livre, no sistema testado, todos os componentes do gráfico apresentaram o mesmo comportamento na formação de peróxidos, que deu-se acima de oito horas. As diferenças nos valores podem ser observadas na tabela 14.

Tabela 14 - Valores dos índices de peróxidos, medidos pelo teste de *Schall*, da farinha de sementes de mostarda

	Índice de peróxidos (meq/kg)							
	0 h	2 h	8 h	20 h	28 h	36 h	52 h	80 h
Controle	5,0	6,0	25,0	90,0	120,0	150,0	200,0	400,0
AFL	5,0	5,0	5,0	30,1	30,1	30,1	70,3	200,0
AFES	5,0	5,0	7,5	25,1	50,2	50,2	80,8	245,7
AFEI	5,0	5,0	5,0	30,1	75,2	75,2	105,5	310,0
BHT	5,0	5,0	5,0	26,0	60,0	65,0	95,3	300,0
Ácido ferúlico	5,0	5,0	10,0	45,1	70,2	70,2	145,4	275,8
Ácido sináptico	5,0	5,0	12,5	50,2	75,2	75,5	122,9	280,8
Ácido cinâmico	5,0	5,0	12,5	60,2	75,2	75,2	147,9	310,9
Ácido caféico	5,0	5,0	15,0	40,1	85,3	85,3	110,3	255,8
Ácido ρ-hidroxibenzóico	5,0	5,0	5,0	30,1	60,2	60,2	90,0	200,0
Quercetina	5,0	5,0	15,0	35,1	95,3	95,3	135,4	285,9
Catequina	5,0	5,0	15,0	35,1	75,2	75,2	145,4	305,9

Já no método do oxigênio ativo, em condições oxidativas mais efetivas (temperatura maior) em menor tempo, observa-se um comportamento semelhante

na curva de peróxidos fomada pelo teste de *Shaal*, na qual as frações livre e insolúvel, mostraram-se as mais efetivas no sistema (gráfico 17 e tabela 15).

Tabela 15 - Valores dos índices de peróxidos, medidos pelo método do oxigênio ativo, da farinha de sementes de mostarda.

	Índice de peróxidos					
	0 h	**2 h**	**4 h**	**6 h**	**8 h**	**10 h**
Controle	2,5	5,0	7,5	10,0	20,1	40,1
AFL	2,5	5,0	5,0	5,0	10,0	20,1
AFES	2,5	5,0	5,0	5,0	13,4	25,1
AFEI	2,5	2,5	5,0	7,5	10,0	15,0
BHT	2,5	5,0	5,0	7,5	13,4	25,1

Estes dados estão de acordo com os da atividade antioxidante em sistema β-caroteno/ácido linoléico, onde as frações apresentaram-se mais efetivas, quando comparadas com outras substâncias antioxidantes (ver gráfico 5 e gráfico 10 - item 5.6).

Assim como observado para a curva de peróxidos, as curvas formadas pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico — ilustradas nos gráficos 18 e 19 e tabelas 16 e 17, nos dois sistemas testados — acompanharam a formação de peróxidos e confirmam os resultados destes componentes como antioxidantes estáveis e efetivos em alimentos.

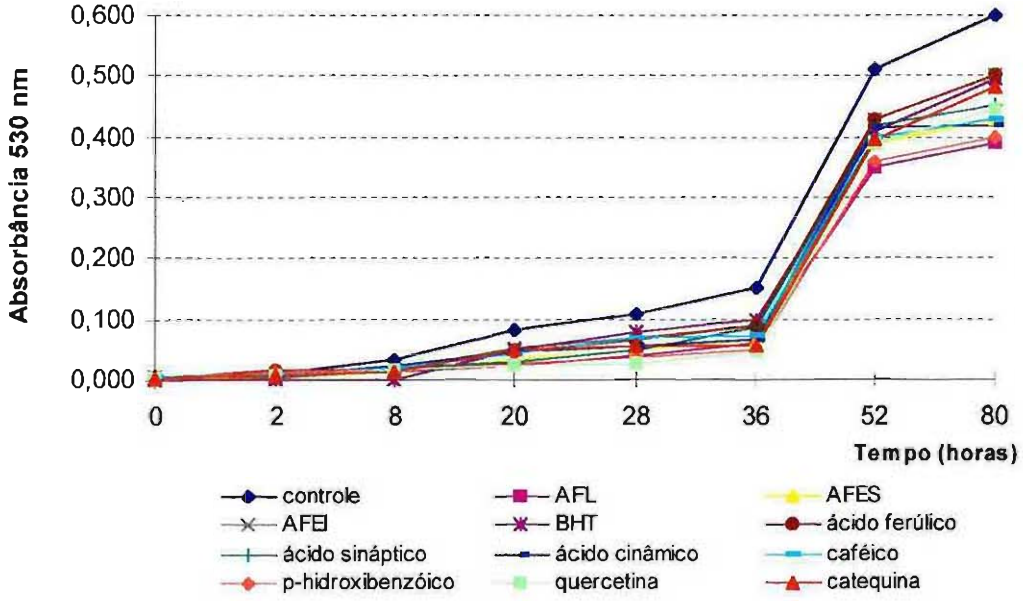


Gráfico 18 - Atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda e de seus ácidos identificados isolamente, pela presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nas amostras de óleo de soja submetidas a oxidação pelo teste de *Schaal*.

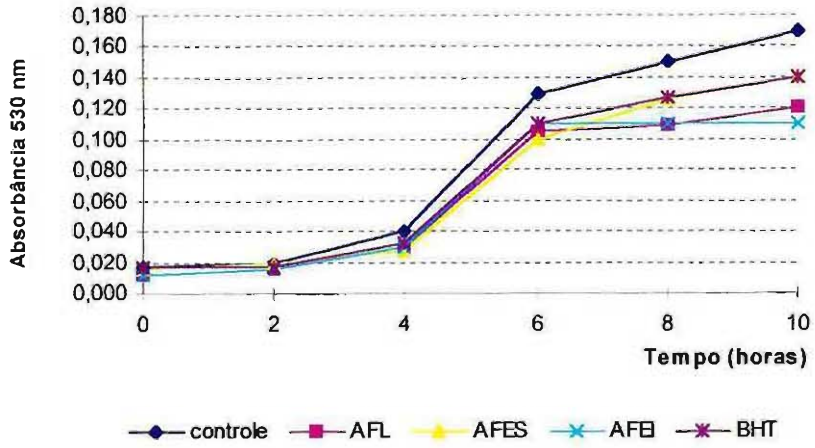


Gráfico 19 - Atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda, pela presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nas amostras de óleo de soja submetidas a oxidação pelo método do oxigênio ativo.

Tabela 16 - Valores das absorbâncias das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, medidas pelo teste de *Schal*, da farinha de sementes de mostarda

	Absorbâncias 530 nm							
	0 h	2 h	8 h	20 h	28 h	36 h	52 h	80 h
Controle	0,008	0,010	0,034	0,081	0,110	0,150	0,510	0,600
AFL	0,000	0,002	0,014	0,024	0,040	0,060	0,350	0,390
AFES	0,000	0,002	0,014	0,034	0,051	0,065	0,390	0,430
AFEI	0,006	0,002	0,015	0,054	0,070	0,090	0,430	0,500
BHT	0,000	0,001	0,001	0,050	0,080	0,100	0,410	0,495
Ácido ferúlico	0,002	0,015	0,015	0,045	0,065	0,090	0,430	0,500
Ácido sináptico	0,003	0,008	0,020	0,030	0,050	0,085	0,420	0,450
Ácido cinâmico	0,004	0,008	0,022	0,045	0,057	0,065	0,415	0,420
Ácido caféico	0,005	0,10	0,021	0,042	0,070	0,074	0,400	0,430
Ácido ρ-hidroxibenzóico	0,000	0,012	0,015	0,025	0,035	0,050	0,360	0,400
Quercetina	0,002	0,005	0,017	0,022	0,027	0,045	0,390	0,444
Catequina	0,003	0,005	0,012	0,048	0,057	0,057	0,397	0,480

Tabela 17 - Valores das absorbâncias das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, medidas pelo método do oxigênio ativo, da farinha de sementes de mostarda

	Absorbâncias 530 nm					
	0 h	**2 h**	**4 h**	**6 h**	**8 h**	**10 h**
Controle	0,017	0,020	0,040	0,130	0,150	0,170
AFL	0,012	0,015	0,030	0,105	0,109	0,120
AFES	0,015	0,020	0,027	0,100	0,125	0,140
AFEI	0,012	0,016	0,030	0,110	0,110	0,110
BHT	0,017	0,017	0,033	0,110	0,127	0,140

Pela curva da formação de dienos conjugados (gráfico 20), não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras testadas e o controle, pois apresentaram resposta à formação de dienos conjugados de maneira semelhante, diferente na curva de peróxidos, onde as frações apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparadas ao controle (gráfico 17). Mesmo sem ter ocorrido a diferença esperada entre o controle e as frações,

observa-se uma leve proteção de todas as frações da farinha de sementes de mostarda na inibição da oxidação pela formação de dienos conjugados.

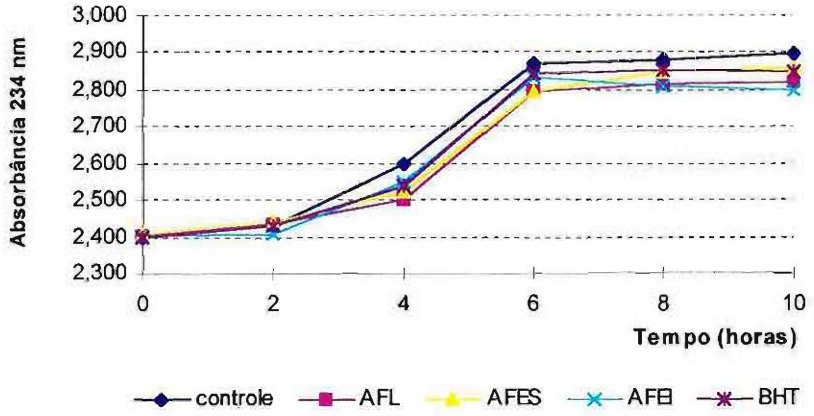


Gráfico 20 - Atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda, pela formação de dienos conjugados, nas amostras de óleo de soja submetidas a oxidação pelo método do oxigênio ativo.

No presente trabalho estão apresentados, através de tabelas, figuras e gráficos, os resultados da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos e frações de fenólicos das sementes de mostarda. A farinha das sementes de mostarda (*Brassica alba*, L.) apresentou bons resultados no que diz respeito a inibição da oxidação *in vitro*, sendo importante fonte de antioxidantes naturais que permitem sua utilização em alimentos, já que cumpre bem seu papel, apresentando bom desempenho na função antioxidante. Logicamente, estudos específicos são necessários, principalmente aqueles ligados a alguma toxicidade dos referidos compostos.

Com os resultados obtidos acreditamos que estes darão suporte para outros estudos com as sementes de mostarda, sobretudo estudos *in vivo* propondo equacionar a participação de tais compostos em processos fisiológicos.

Conclusões

6 - Conclusões

Os resultados das análises e sua discussão permitem apresentar as seguintes conclusões:

- Os extratos etéreo, alcoólico e aquoso da farinha de sementes de mostarda apresentaram atividade antioxidante.
- a farinha de sementes de mostarda possui elevado teor de fenólicos totais, com uma concentração de 70,07mg/g;
- os resultados demonstraram que o perfil de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda foi melhor identificado e quantificado quando purificado, previamente, por cromatografia em camada delgada;
- as frações livre, ésteres solúveis e ligantes insolúveis de ácidos fenólicos da farinha de sementes de mostarda, apresentaram homogeneidade nos ácidos fenólicos identificados, quando purificados por cromatografia em camada delgada. Foram identificados os ácidos salicílico, *trans* cinâmico, ρ-hidroxibanzóico, vanílico, gentíssico, quínico, ρ-cumárico, ferúlico, caféico, *cis* sináptico, *trans* sináptico e catequina;
- a inibição da oxidação da fração livre de ácidos fenólicos da farinha de mostarda, foi superior às demais frações solúvel e insolúvel, em comparação ao BHT e α-tocoferol, nos sistemas antioxidantes testados;
- dos ácidos fenólicos identificados, nas três frações, o ácido ρ-hidroxibenzóico foi o que apresentou-se em maior concentração e também, melhor atividade antioxidante frente aos outros ácidos fenólicos testados;

- os ácidos fenólicos presentes nas frações livre, solúvel e insolúvel da farinha de sementes de mostarda, possuem atividade antioxidante em meio lipídico. A fração livre, neste sistema, apresentou maior atividade antioxidante quando comparado com as outras duas;

- com base nos dados obtidos, a farinha de sementes de mostarda apresenta elevado potencial antioxidante para ser melhor aproveitada na indústria alimentícia, como um antioxidante individual ou como um coadjuvante a um antioxidante sintético como o BHT.

Referências Bibliográficas

7- Referências Bibliográficas

ABDALLA, D.S.P. Antioxidantes. 1- Conceitos básicos e perspectivas terapêuticas. **ARS CURANDI**, São Paulo, p.143-164 1993.

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

ADEGOKE, G.O., KRISHNA, A.G.G. Extraction and identification of antioxidants from the spice *Aframomum danielli*. **J. Am. Oil Chem. Soc.,** Champaign, v.75, n.8, p.1047-1051, 1998.

AMAROWICZ, R., WANASUNDARA, U.N., KARAMAC, M., SHAHIDI, F. Antioxidant activity of ethanolic extract of mustard seed. **Nahrung**, Berlim, v.40, n.5, p.261-263, 1996.

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

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC**. 13 ed. Washington, 1990, 937 p.

BABICH, H. Butylated hydroxytoluene (BHT): a review. **Environ. Res.,** New York, v.29, p.1-29, 1992.

BOBBIO, P.A., BOBBIO, F.O. **Química do processamento de alimentos**. 2.ed.,

De acordo com a NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997.

São Paulo: Varela, p. 39-50, 1992.

BOLTON, J.L., THOMPSON, J.A. ALLENTOFF, A.J., MILEY, F.B., MALKINSON, A.M. Metabolic activation of butilated hydroxytolune by mouse bronchiolar Cllara cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.,** New York, v.123, p.43-49, 1993.

BRANEN, A.L. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyananisole and butylated hidroxtoluene. **J. Am. Oil Chem. Soc.,** Champaign, v.52, p.59-63, 1975.

BRUNE, M. HALLBERG, L., SKANBERG, A. Determination of iron-binding phenolic groups in foods. **J. Food Sci.**, Chicago, v.96, n.1, p.128-131, 167, 1991.

CHIPAULT, J.R., MIZUNO, G.R., HAWKINS, J.M. The antioxidant properties of natural spices. **Food Res.,** Champaign, v.17, p.46, 1952.

CHIPAULT, J.R., MIZUNO, G.R., LUNDBERG, W.P. The antioxidant properties of spices in foods. **Food Technol.,** Chicago,v.10, p.209, 1956.

CHRISTIE, W.W. **Lipid analysis**. 2.ed. Oxford: Pergamon Press, 1982. p.22.

CINTRA, R.G. Atividade antioxidante em especiarias. São Paulo, 1999. 147p. (Tese de Dotourado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

COPIUS-PEEREBOOM, J.W., BEEKS, H.W. Thin-layer chromatoghaphy of preserving agents. **J. Chromatog.**, Amsterdam, v.14, p.417-423, 1964.

COULTER, R.B. Extending shelf-life by using traditional phenolic antioxidants. **Cereal Food World**, St. Paul, v.33, p.207-210, 1988.

DABROWSKI, K.J., SOSULSKI, F.W. Quantification of free and hydrolizable phenolic acids in seeds by capilary gas-liquid chromatography. **J. Agric. Food**

De acordo com a NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997.

Chem., Washington, v.32, p.123-127, 1984_a.

DABROWSKI, K.J., SOSULSKI, F.W. Composition of free and hydrolyzable phenolic acids in defatted flours of ten olseeds. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.32, p.128-130, 1984_b.

DECKER, E.A. Phenolics: Prooxidants or Antioxidants? **Nutr. Rev.,** New York, v. 55, n.11, p. 396-407, 1997.

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

ERENEL, G., ERBAS, D., ARICIOGLU, A. Free radicals and antioxidant systems. **Mater. Med. Polona**, Warszaw, v.1, n.85, p.37-43, 1993. Apud: SANT'ANA, L.S. Influência da fonte lipídica da dieta e da adição de antioxidantes *in vivo* na composição em ácidos graxos de filés de Pacu (*Piractus mesopotamicus*) cultivados. São Paulo, 1998. 157p. (Tese de Dotourado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

FANTOZZI, P., MONTEDORO, G. Dosage des composés phénoliques dans les drups dólives récoltés à différents stades de maturation. **Ind. Aliment. Agric.,** Paris, v.95, n.12, p.1335-1339, 1978.

FENNEMA, O.R. **Food chemistry**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p 225-319. (Food Science and Technology, v.76).

FENTON, T.W., LEUNG, J., CLANDININ, D.R. Phenolic components of rapeseed meal. **J. Food Sci.,** Chicago, v.45, p.1702-1705, 1980.

FENTON, T.W., MUELLER, M.M., CLANDININ, D.R. Isomerization of some cinnamic acid derivatives. **J. Chromatog.,** Amsterdam, v.152, p.517-522,1978.

De acordo com a NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997.

FERNÁNDEZ-BOLÕES, J., FELIZÓN, B., BRENES, M., GUILLÉN, R., HEREDIA, A. Hydroxytyrosol and tyrosol as the main compounds found in the phenolic fraction of steam-exploded olive stones. **J. Am. Oil Chem. Soc.,** Champaign, v.75, n.11, p.1643-1649, 1998.

FINLEY, J.W, GIVEN-JR, P. Technological necessity of antioxidants in the food industry. **Food Chemistry. Toxicol,** Oxford, v.24, n. 10/11, p. 999-1006, 1986.

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

FRANKEL, E.N, HUANG, S-W, KANNER, J., GERMAN, J.B. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.42, p.1054-1059, 1994.

GAMACHE, P. RYAN, E., ACWORTH, I.N. Analysis of phenolic and flavonoid compounds in juice beverages using high-performace liquid chromatography with colometric array detection. **J. Chromatog.,** Amsterdam, v.635, p.143-150, 1993.

GRICE, H.C. Safety evaluation of butylated hydroxyanisole from the perspective of effects on forestomach and oesophageal squamous ephytelium. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.26, p.717-723, 1988.

HAGEMAN, G.J. VERHAGEN, H., KLEINJANS, J.C.S. Butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene and tert-butylhidroquinone are not mutagenic in the Salmonella/microssome assay using new test strains. **Mutat. Res.,** Amsterdam, v.208, p.207-211, 1988.

HAMILTON, R.J., KALU, C., McNEIL, G.P., PADLEY, F.B., PIERCE, J.H. Effects of tocopherols, ascorbyl palmitate, and lecithin on autoxidation of fish oil. **J. Am. Oil Chem. Soc.,** Champaign, v.75, n.7, p. 813-821, 1998.

De acordo com a NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997.

HARTMAN, L., LAGO, B.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab. Pract.**, London, v.22, p.475-477, 1973. Referência duplicada com a debaixo.

HAYS, F., KATO, H. Antioxidative compounds of sweet potatoes. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, Tokyo, v.30, p.37, 1984.

HENRY, L.K., CATIGNANI, G.L., SCHWARTZ, S.J. The influence of carotenoids and tocopherols on the stability if safflower seed oil durig heat-catalyzed oxidation. **J. Am. Oil Chem. Soc.,** Champaign, v.75, n.10, p.1399-1402, 1998.

HERRMANN, K. Flavonols and flavones in food plants. a review. **J. Food Technol.,** Oxford, v.11, p.433, 1976.

HIROSE, M., HAGIWARA, A., HASUI, T., INOUE, K., ITO, N. Combined effects of BHA and other antioxidants in induction of forestomach lesions in rats. **Cancer Lett.,** Shannon, v.30, p.169-174, 1986.

HO, C-T. Phenolic compounds in food: an overview. In: HO, C.T., LEE, C.Y., HUANG, M-T., eds. **Phenolic compounds in food and their effects on health**. Washington: American Chemical Society, 1992. p.130-142. (ACS Symposium Series, n.506).

HO, C-T. Phytochemicals in Teas and Rosemary and Their Cancer-Preventive Properties. In: HO, C-T., FERRARP, T., CHEN, Q., ROSEN, R.T., HUANG, M-T., eds. **Food Phytochemicals for Cancer Prevention II**. Washington: American Chemical Society, 1992. p.1-19. (ACS Symposium Series, n.547).

HOPIA, A.L., HUANG, S-W, SCHWARZ, K. Effect of diferent lipid systems on antioxidant activity of rosemary constituents carnosol and carnosic acid with and without α-tocoferol. **J. Agric. Food Chem.,** Washington, v.44, p.2030-2036,

De acordo com a NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997.

1996.

HUANG, M-T, FERRARO, T. Phenolic compounds in food and cancer prevention: an overview. In: HO, C.T., LEE, C.Y., HUANG, M-T., eds. **Phenolic compounds in food and their effects on health**. Washington: American Chemical Society, 1992. p.130-142. (ACS Symposium Series, n.506).

HUANG, S.W., FRANKEL, E.N., SCHARZ, K. Partition of selected antioxidants in corn oil-water model systems. **J. Agric. Food Chem**, Washington, v.45, p.1991-1994, 1997.

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

IZMAILOV, N.A., SHRAIBER, M.S. A drop-chromatographic method of analysis and its utilization in pharmacy. **Farmatsia,** Moscow, n.3, p.1-7, 1938.

JAYAPRAKASAM, R., SIVAKUMAR, R. Thin-layer chromatography on cellulose. **Curr. Sci.,** Bangalore, v.58, n.17, p.980-982,1989.

JORI. A toxico kinetic aspects of butilated hydroxytoluene (BHT): a review. **Ann. Ist. Super. Sanitá**, Roma, v.19, p.271-286, 1983.

KAHL, R., WEINKE, S., KAPPUS, H. Production of reactive oxygen species due to metabolic activation of butylated hydroxyanisole. **Toxicology**, Amsterdam, v.59, p. 179-194, 1989.

KALSEC. **Our quality comes naturally**. Kalamazzoo: Kalsec, 1993. 10p.

KANAZAWA, K., KANAZAWA, A.E., NATAKE, M. Uptake of secondary autoxidation products of linoleic and by the rat. **Lipids**, Champaign, v.20, n.7, p.412-419,

De acordo com a NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997.

1985.

KANNER, J. Oxidative processes in meat and meat products quality implication. **Meat Sci.**, Barking, v.36, p. 169-189, 1994.

KANNER, J., GERMAN, J.B., KINSELLA, J.E. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Cleveland, v.25, n.4, p.317-364, 1987.

KANNER, J., KINSELLA, J.E. Initiation of lipid peroxidation by a peroxidase/hydrogen peroxide / halide system. **Lipids,** Champaign, v.18, n.3, p.204-210, 1983.

KASSIE, F. Genotoxic effects of crude juices from Brassica vegetables and juices and extracts from phytophamarceutical preparations and spices of cruciferous plants origin in bacterial and mammalian cels. **Chem. Biol. Interact.** Shannon, v.102, n.1, p.1-16, 1996.

KATO, T., et al. Formation of the mutagenic/ carcinogenic imidazoquinoxaline - type heterocyclic amines through the instable free radical Maillard intermediates and its inhibition by phenolic antioxidant. **Carcinogenesis**, London, v.17, n.11, p.2469-2476, 1996.

KAZIMIERZ, J., DABROWSKI, SOSULSKI, F.W. Quantification of free hydrolyzable phenolic acids in seeds by capillary gas-liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, Whasington, v.32, p. 123-127, 1984.

KEHRER, J.P., DIGIOVANNI, J. Comparison of lung injury induced in 4 strains of mice by butylated hydroxytoluene. **Toxicol. Lett.,** Amsterdam, v.52, p.55-61, 1990.

De acordo com a NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997.

KINSELLA, J.E., BROUGHTON, K.S., WHELAN, J.E. Dietary unsaturated fatty acids: interactions and possible needs in relation to eicosanoid synthesis. **J. Nutr. Biochem.**, Stonehm, v.1, n.3, p.123-141, 1990.

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

LABUZA, T.P. Kinetics of lipid oxidation in foods. **CRC Crit. Rev. Food Technol.**, Cleveland, v.3, p.355, 1971.

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

LEE, S.H., MIN, D.B. Effects, quenching mechanisms, and kinetics of carotenoids in chlorophyll - sensitized photooxidation of soybean oil. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.38, n.8, p.1630-1634, 1990.

LOLIGER, J. The use of antioxidants in foods. In: ARUOMA, O.I., HALLIWELL, B., eds. **Free radicals and food additives**. London: Taylor & Francis, 1991. cap.6, p.121-150.

LÓPEZ-ARGÜELLO, E., PÉREZ-RODRIGUES, M.L., BOSCH-BOSCH, N., BARRERA-VÁSQUEZ, C. Analytical study of the mineral fraction of mustard seed and mustard sauces. **Food Chem.**, Barking, v.62, n.2, p.157-160, 1998.

LUGASI, A. Cardio-Protective effect of red wine as reflected in the literature. **Orv Hetil.** Budapest, v.138, n.11, p.673-678, 1997.

MADSEN, H.L., BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends Food Sci. Technol.**, Cambridge, v.6, n.8, p.271-277, 1995.

De acordo com a NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997.

MANCINI-FILHO, J., SILVA, S.C., NASCIMENTO, C.R., TORRES, R.P. Evaluation of antioxidant activity in some spices consumed in Brazil. In: IFT ANNUAL MEETING, New Orleans, 1996. **Book of Abstracts**. Chicago: Institute of Food Technologists, 1996. p.122.

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

MARQUEZ-RUIZ, G., PEREZ-CAMINO, M.C. GUTIERREZ-RUIZ, V., DOBARGNES, M.C. Absorcion de grasa termoxidadas. II Influencia del muel de alteracion y porcentage de grasas en la dieta. **Grasas Aceites,** Seville, v.43, n.4, p.198-203, 1992.

MARTIN-ARAGON, S., BENEDI, J.M., VILLAR, A.M. Modifications on antioxidant capacity and lipid peroxidation in mice under fraxitin treatment. **J. Pham. Pharmacol.**, London, v.49, n.1, p.49-52, 1997.

MAYES, P.A. Lipídeos de Importância Fisiológica. In: **Harper: Bioquímica,** 7.ed. São Paulo: Atheneu, 1994, p. 142-154.

MI-JIN-JANG, IL-YOUNG-CHO, HYUN-KYU-JOO. Oxidants and antioxidants associated with commercial pickle products and ingredients. **Agricultural-Chemistry-and- Biotechonology**, n.38, v.5, p.408-413, 1995.

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

MIRANDA, M.D.P.S. Antioxidantes naturais em microalgas cultivadas em condições especiais: avaliação química e biológica. São Paulo, 1997. 107p. (Tese de Dotourado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

De acordo com a NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997.

MIRANDA, M.S., CINTRA, R.G., BARROS, S.B.M., MANCINI-FILHO,J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.31, n.8, p.1075-1079, 1998.

MONAHAN, F.J. GRAY, J.J., ASCHAR, A., HAVA, A. STRASBURG, G.M., BUCKLEY, J.D. MASSEY, P.A. Influence of diet on lipid oxidation and membrane structure in porcine muscle microssomes. **J. Agric. Food Chem.** Whashington, v.42, p. 59-63, 1994.

MONTEDORO, G., SERVILLI, M. BALDIOLI, M., MINIATI, E. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. I. Their extration, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. **J. Agric. Food Chem.**, Whashington, v.40, p.1571-1576, 1992.

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

MORGAN, J.F., et al. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.22, n.5, p.861-870, 1997.

MURPHY, J.B., STUTTE, C.A. Analysis for substituted benzoic and cinnamic acids using using high-pressure liquid chromatography. **Anal. Biochem.**, Baltimore, v.86, p.220-228, 1978.

NACZK, M., WANASUNDARA, P.K.J.P.D., SHAHIDI, F. Facile spectrophotometric quantification method of sinaptic acid in hexane-extracted and methanol-ammonia-water-treated mustard and rapessed meals. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.40, p.444-448, 1992.

De acordo com a NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997.

NAGAI, F., USHIYAMA, K., KANO, I. DNA cleavage by metabolites of butilated hydroxitoluene. **Arch. Toxicol.**, Berlin, v.67, p.552-557, 1993.

NAGEN, T.J., ALBUQUERQUE, T.T.O, MIRANDA, L.C.G. Ácidos fenólicos em cultivares de soja: ação antioxidante. **Arq. Biol. Tecnol.,** Curitiba, v.35, n.1, p.129-138, 1992.

NAKATANI, N. Chemistry of antioxidants from Labiatae herbs. In: HO, C.-T., OSAWA, T., HUANG, M.-T., ROSEN, R.T., eds. **Food phytochemicals for cancer prevention. II. Teas, spices and herbs.** Washington: American Chemical Society, 1994. cap.16, p.144-153.

NAKATANI, N. Natural antioxidants from spices. In: HUANG, M-T., HO, C-T., LEE, C.Y., eds. **Phenolic compounds and their effects on health.** II. Antioxidants and cancer prevention. Washington: Americam Chemical Society, 1992. p.72-86. (ACS Symposium Series, n.507).

NAKATANI, N., KIKUZAKI, H. A new antioxidative glycoside isolated from oregano. **Agric. Bio. Chem.**, Tokyo, v.51, p.2727, 1987.

NAMIKI, M. Antioxidants / antimutagens in food.. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.,** Cleveland, v.29, n.4, p.273-300, 1990.

NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O.R. **Food chemistry,** 3.ed. New York: Marcel Dekker, v. 76, 1996, p.225-319.

OKUBO, T. Contribution of oxygen radicals to DNA cleavage by quinone compounds derived from phenolic antioxidants, tert-butylhydroquinone and 2, 5 - di - tert - butyhydroquinone. **Toxicol. Lett.**, Amsterdam, v.15, n.9, p.11-18, 1997.

ONG, B.Y., NAGEL, C.W. High-Pressure liquid chromatographic analysis of

De acordo com a NBR 6023/89 prèconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997.

hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters and their glucose esteres in *Vitis vinifera*. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.157, p.345-355, 1978.

ONYENEHO, S.N., HETTTIARACHCHY, N.S. Antioxidant activity, fatty acids and phenolic acids compositions of potato peels. **J. Sci. Food Agric.**, London, v.62, p.345-350, 1993.

OYA, T., OSAWA, T., KAWAKISHI, S. Spice constituints scabenging free radicals and inhibiting pentosidine formation in a model system. **Biosci. Biotech. Biochem.,** Tokyo, v.61, n.2, p. 263-266, 1997.

PALIC, A., DIKANOVIC-LUCAN, Z. Antioxidative effect of "Herbalox" on edible oils. **Fett Wiss. Technol.**, Leinfelden-Echterdingen, v.97, n.10, p.379-381, 1995.

PAPADOPOULOS, G., BOSKOU, D. Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. **J. Am. Oil. Chem. Soc.,** Champaign, v.68, n.9, p.669-671, 1991.

PEREIRA, R.G. Avaliação da atividade antioxidante em sementes de frutas cítricas. São Paulo, 1996. 90p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

PÉREZ-BUENO, M. La mostaza: cultivo, enfermedades, rendimento e industrialización. Madrid: Mundi-Prensa, 1994 (Agroguías Mundi-Prensa).

PLUMB, G.W., HEANEY, R.K. Are whole extracts and purified glucosinolates from cruciferous vegetables antioxidants? **Free Radical Res. Commun.**, London, v.25, n.1, p.75-86, 1996.

PORTER, W.L. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. In: William, G.M., ed. **Antioxidants:** chemical, physiological, nutritional, and toxicological aspects. Princeton: Princeton Scientific, 1993. p.93-122.

De acordo com a NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997.

PRATER, W.A., SIMMONS, M.S., MANCY, K.H. Microanalysis of aqueous samples for phenols and organic acids. **Anal. Lett.,** New York, v.13, p.213-217, 1980.

PRATT, D.E. Natural antioxidants from plant material. In: HO, C.I., LEE, C.Y. HUANG, M.I., eds. **Phenolic compounds in food and their effects on health**. Washington: American Chermical Society, 1992. p.54-71. (ACS Symposium Series, n.507).

PRATT, D.E., BIRAC, P.M. Source of antioxidant activity of soybean and soy products. **J. Food Sci.,** Chicago, v.44, p.1720-1722, 1979.

PRATT, D.E., HUDSON, B.J.F. Natural antioxidants not exploited commercially. In Hudson, B.J.F., ed. **Food Antioxidants**. Amsterdam: Elsevier, 1990. p.171-192.

PRATT, D.E., WATTS, B.M. The antioxidant activity of vegetable extracts. I. flavone aglycones. **J. Food, Sci.,** v.19, p.27-33, 1964.

PRYOR, W.A. The formation of free radicals and the consequences of their reaction *in vivo*. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v.28, n.15, p.787-801, 1978.

PRZYBYLSKI, R., LEE, Y.C., ESKIN, N.A.M. Antioxidant and radical-scavenging activities of buckwheat seed components. **J. Am. Oil Chem. Soc.,** Champaign, v.75, n.11, p.1595-1601, 1998.

RAHMANI, M., CASALLANY, A.S. Role of minor constituints in the photooxidation of virgin olive oil. **J. Am. Oil Chem. Soc.,** Champaign, v.75, n.7, p. 837-843, 1998.

RAMARATHNAM, N. OSAWA, T. OCHI, H., KAWAKISHI, S. The contribution of plant food antioxidants to human health. **Trends Food Sci. Technol.,** Cambridge, v.6, p. 75-82, 1995.

De acordo com a NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997.

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

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

SAIJA, A., et al. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Radical Biol Med**, New York, v.19, n.4, p.481-486, 1995.

SALLEMI, Z.O., JANITHA, P.K., WANASUNDARA, P.D., SHAHIDI, F. Effects of low-pungency ground mustard seed on oxidative stability, cooking yield, and color characteristics of comminuted pork. **J. Agric. Food Chem.**, Whashington, v.41, p. 641-643, 1993.

SANT'ANA, L.S. Influência da fonte lipídica da dieta e da adição de antioxidantes *in vivo* na composição em ácidos graxos de filés de Pacu (*Piractus mesopotamicus*) cultivados. São Paulo, 1998. 157p. (Tese de Dotourado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

SCHULER, P. Natural antioxidants exploited commercilly. In: HUDSON, B.J.F.,ed. **Food anitioxidants**. Amsterdam: Elsevier, 1990. p.99.

SCHWENKE, D.C. Antioxidants and atherogenesis. **J. Nutr. Biochem.,** v.9, p. 424-445, 1998.

SGARAGLI, G.P., VALOTI, M., FUSI, F., PALMI, M., MANTOVANI, P., DE SANTI, M.M., LORENZINI, L., TOSI, P. Toxic injury to rat gut musculature following intraperitonial administration of 2-t-butil-4-methoxyphenol. **Eur. J. Pharmacol., Environ. Toxicol. Pharmacol. Sect.**, Amsterdam, v.248, p.121-129, 1993.

De acordo com a NBR 6023/89-preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997.

SHAHIDI, F., NACZK, M. Effect of processing on the content of condensed tannins in rapeseed meals: a research note. **J. Food Sci**, Chicago, v.54, p.1082, 1989.

SHAHIDI, F., NACZK, M. Effect of processing on the phenolic constituents of canola. **Bull. Liaison – Groupe Polyphenols**, Narbonne, v.14, p.89, 1988. (International Conference of Group Polyphenols, 14).

SHAHIDI, F., WANASUNDARA, P.K.J.D. Phenolic antioxidants. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr**, Cleveland, v.32, p.67, 1992.

SHAHIDI, F., WANASUNDARA, P.K.J.P.D., HONG, C. Antioxidant activity of phenolic compounds in meat model systems. In: HO, C.T., LEE, C.Y., HUANG, M.T., eds. **Phenolic compouds in food and their effect on health.** Washington: American Chemical Society, 1992. p.214. (ACS Symposium Series, n.506).

SHAHIDI, F., WANASUNDARA, U.N., AMAROWICZ, R. Natural antioxidants from low-pungency mustard flour. **Food Res. Int.**, Barking, v.27, p.489-493, 1994.

SHELEF, L.A., CHIN, B. Effect of phenolic antioxidants on the mutagenicity of aflotoxin B1. **Appl. Environ. Microbiol.,** Washington, v.40, p.1039-1043, 1980.

SHIBATA, M.A., HIROSE, M., MASUDA, A., KATO, T., MUTAI, M., ITO, N. Modification of BHA forestomach carcinogenesis in rats: inhibition by diethylmaleate or indomethacin and enhamcement by a retinoid. **Carcinogenesis,** Oxford, v.14, p.1265-1269, 1993.

SIES, H. Antioxidants in disease mechanisms and therapy. In:Antioxidants and helth. **Pharmacology**. London: Academic Press, 1997. p.3-17.

SINNHUBER, R.O. YU, T.C., YU, TE CHANG. Characterization of the red pigment

De acordo com a NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997.

formed in the 2- thiobarbituric acid determination of the oxidative rancidity. **Food Res.**, Champaing, v.23, p.626-634, 1958.

SIX, P. Current research in natural food antioxidants. **Inform**, Champaing, v.5, n.6, p.679-688, 1994.

SOARES, S.E. Identificação e avaliação da atividade antioxidante dos ácidos fenólicos presentes na semente de abacate (*Persea americana*, Mill.) das variedades *Wagner* e *Prince*. São Paulo, 1998. 126p. (Tese de dotourado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP).

SOSOULSKI, F. W. Organoleptic and nutritional effects of phenolic compounds on oilseed protein products: a review. **J. Am. Oil. Chem. Soc.,** v.56, p.711, 1979.

SWAIN, T. & HILLS, W.E. The phenolic constituents of *Punnus domestica*. I - Quantitative analysis of phenolic constituents. **J. Sci. Food Agric.,** London, v. 19, p. 63-68, 1959.

TESAROVÁ, E., PACÁKOVÁ, V. Gas and high-performance liquid chromatography of phenols. **Chromatographia,** Braunshweig, v.17, n.5, p.269-284, 1983.

TIAN, L.L. WHITE, P.J. Aantioxidant activity of oat extrat in soybean and cottonseed oil. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, Champaing., v.71, p.1079-1086, 1994.

TORRES, A.M. MAU-LASTOVICKA, T., REZAAIYAN, R. Total phenolics and High-Performance Liquid Chromatography of phenolic acids of avocado. **J. Agric. Food Chem.,** Washington, v.35, p. 921-925, 1987.

TULLBERG, L. PEETRE, I.B., SMITH, B.E.F. Structural investigation of phenols and alcohols using silylation and gas chromatography. **J. Chromatog.,** Amesterdam, v.120, p.103-113, 1976.

De acordo com a NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Handbook of the nutritional contents of foods. New York , Dover Publications, 1975.

VAN DER HEIDJEN, C.A. Toxicology of tert-butylhidroquinone (TBHQ). **Food Chem. Toxicol.,** Oxford, v.24, p.1067-1070, 1986.

VELASCO, L., FERNANDEZ-MARTINEZ, J.M., DE HARO, A. Determination of the fatty acid composition of the oil in intact-seed mustard by near-infrared reflectance spectroscopy. **J. Am. Oil Chem. Soc.,** Champaign, v.74, n.12, p.1595-1602, 1997.

VELASCO, L., FERNANDEZ-MARTINEZ, J.M., DE HARO, A. Increasing erucic acid content in Ethiopian mustard through mutation breeding. **Plant Breed,** Berlim, v.117, n.1, p.85-87, 1998.

VERHAGEN, H. THIJSSEN, H.H.W., HOOR, F., KLEINJANS, J.C.S. Disposition of single oral doses of butylated hydroxyanisole in man and rat. **Food Chem. Toxicol.,** Oxford, v.27, p. 151-158, 1989.

WHITING, G.C., COGGINS, R.A. Estimation of the monomeric phenolics of ciders. **J. Sci. Food Agric.,** London, v.26, p.1833-1838, 1975.

WHYSNER, J. WANF, C.X., ZANG, E.E., IATROPOULOS, M.J., WILLIAMS, G.M. Dose response of promotion by butylated hydroxyanisole in chemically initiated tumours of the rat forestomach. **Food Chem. Toxicol.,** Oxford, v.32, n.32, p. 215-222, 1994.

WILLIAMS, M.T. Cytochrome P 450. Mechanisms fo action and clinical implications. **Fla. Med. Assoc.** v.79, n.6, p.405-408, 1992. Apud: COMPREENSIVE Medline: EBSCO, 1997. UI 9234058 [CDROM].

WONG, J.W., HASHIMOTO, K., SHIBAMOTO, T. Antioxidant activities of rosemary

De acordo com a NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997.

and sage extracts and vitamin E in a model meat system. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 43, n. 10, p. 2707-2712, 1995.

WULF, L. W., NAGEL, C.W. Analysis of phenolic acids and flavonoids by high-pressure liquid chomatography.**J. Chromatog.**, Amsterdam, v.116, p.271- 279, 1976.

WURTZEN, G. Shortconings of current strategy for toxicity testing testing of food chemicals antioxidants. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.28, p. 743-745, 1990.

YANISHLIEVA, N.V.I., MARINOVA, E.M. Effect of lipid unsaturation on the antioxidative activity of some phenolic acids. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, Champaign, v.71, n.4, p.427-434, 1994.

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

YEN, G. C., CHEN, H.-Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their mutagenicity. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.43, n.1, p.27-32, 1995.

De acordo com a NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997.