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

**Efeito antioxidante dos compostos
fenólicos de especiarias sobre os
ácidos graxos das séries $\omega 3$ e $\omega 6$**

Ana Vlória Bandeira Moreira

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

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

SÃO PAULO
2003

Ficha Catalográfica

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

Moreira, Ana Vlândia Bandeira
M838e Efeito antioxidante dos compostos fenólicos de especiarias
sobre os ácidos graxos das séries w3 e w6 / Ana Vlândia
Bandeira Moreira. -- São Paulo, 2003.
153p.

Tese (doutorado) - 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. Composto
fenólico : Bioquímica 3. Metabolismo lipídico 4. Antioxidante :
Fisiologia humana I. T. II. Mancini Filho, Jorge, orientador.

641.19 CDD

ANA VLÁDIA BANDEIRA MOREIRA

Efeito antioxidante dos compostos fenólicos de especiarias sobre os ácidos graxos das séries $\omega 3$ e $\omega 6$

Comissão Julgadora:

Prof. Titular. Jorge Mancini Filho

1º Examinador - Presidente e Orientador

Prof. Alfredo Tenuta Filho

2º Examinador

Profa. Nonete Barbosa Almeida

3º Examinador

Prof. Fábio Bessa Lima

4º Examinador

Prof. Titular Rui Curi

5º Examinador

São Paulo, 19 de junho de 2003.

Se tivéssemos que escolher entre o conhecimento e a virtude, a última seria sem dúvida a melhor escolha, pois é mais valiosa. O bom coração que é fruto da virtude é por si só uma grande benefício para a humanidade. O mero conhecimento não.

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Titular e Orientador **Jorge Mancini Filho**, pela confiança e apoio "gratuitos" em minha vida acadêmica e de pesquisadora. Obrigada por tudo chefe!

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF/USP, pelas experiências adquiridas e amigos conquistados.

À Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pela liberação de 2 anos para realização deste trabalho. Agradeço, principalmente, ao Professor **Nilson Almeida** e à Professora **Carmen Calado** pelo apoio sempre presentes.

Ao serviço de moradia **COSEAS**, em nome da Assistente Social **Mariza**, pela oportunidade de um espaço com convivências interculturais, alegres e espontâneas, que me proporcionaram grande enriquecimento pessoal.

À **CAPES/PICDT/UFRN**, pelos meses de bolsa que auxiliaram em parte no meu programa de doutorado.

Aos Professores **Alfredo Tenuta Filho** e **Fábio Bessa**, pelas contribuições pertinentes e importantes a este trabalho.

Ao Professor **Luiz Guerra** e ao técnico **Cláudio Arraio**, do departamento de patologia da Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária - USP, pelas análises histopatológicas realizadas nos tecidos dos animais.

À Professora **Inar Alves de Castro**, pelo apoio na análise estatística e no desenvolvimento da análise sensorial desta tese.

À Sra. **Maria Cristina Siriani**, diretora de produção da Produtos Alimentícios Penina, pelo fornecimento das especiarias.

Ao Sr. **Elves Botta**, diretor da Nobel Alimentos Ltda (Vermate Verdinha Indústria do Mate Ltda), pela elaboração dos sachês dos chás.

Ao veterinário **Nelmon Oliveira da Costa**, funcionário do Ministério da Agricultura (S.I.F.), que forneceu as vesículas seminais de carneiro utilizadas neste trabalho.

Às Bibliotecárias **Adriana e Leila**, pela atenção e disponibilidade na revisão das referências bibliográficas.

Ao **Jorge** pela correção cuidadosa da redação da tese e pela amizade.

Aos funcionários: **Luiz, Auriluce, Renato, Ana Lúcia, Cláudia, Isabel, Sílvia, Iara, Roseli, Daniela, Cida e Vitor**, pelos auxílios prestados com dedicação e carinho.

Às Professoras: **Bernadette Franco, Beatriz Cordenunsi e Marilene Penteado**, pelo apoio nos momentos mais difíceis de minha permanência em São Paulo. Obrigada por me lembrarem que sou capaz!

Às funcionárias **Mônica, Tânia e Catarina**, pela atenção sempre eficiente espontânea, e alegre ao atendimento na secretaria, que continuam sendo o "cartão de entrada" do B14.

Aos funcionários **Benedita, Elaine e Jorge**, da secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia, pelas orientações e sempre

fornecidas com espontaneidade e alegria! Um cheirinho no coração de vocês! Obrigada por tudo!

A Sra. **Silvânia** responsável pelo biotério de criação e experimentação da FCF/IQ, pelo suporte durante o ensaio biológico.

À **Rose e Fátima**, pelos vários momentos de descontração e de apoio que tive! Obrigada!

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

Aos amigos do B14: **Malu (D+)**, **Vanuska**, **Luiz**, **Ivanir**, **Rogério**, **Érika**, **Jonas**, **Thomas** e **Rogério (James)**, **Elaine**, **Fabiana**, **Luciana**, **Helena**, **Márcia**, **Ana Cristina**, **Janaína**, **Maria Luiza**, **Jacqueline**, **Neuza**, **Alberto**, **Tânia**, **Eliana**, **Liliana**, **Eliane**, **Maria de Fátima**, **Patrícia**, **Márcio**, **Rosinha**, **Alexandre**, **Cláudia**, **Andréa Moura**, **Sandra**, **Álvaro**.
A todos vocês, obrigada pela amizade sincera e carinhosa.

À técnica de nível superior e amiga, **Rosângela**, pelo suporte técnico, pela amizade e pelos momentos de descontração e risos constantes. Obrigada Rô!

Às colegas do laboratório: **Dora**, **Nara**, **Elaine**, **Maria Elena** e **Denise D'Agostini**, pelo companheirismo diário.

Às amigas **Fernanda** e **Céphora**, pela amizade gratuita, cúmplice, sempre com tanto carinho, obrigada pelos risos e choros juntas!!! Digo estas palavras com saudades; mas, certa de que nossa amizade foi além do compromisso profissional e recíproco. Não digo adeus, digo até breve!

Aos amigos do CRUSP: Raquel, Tânia, Amaral, Jofre, Kátia, Élen Flávia, Robson e Nelson Burguer, pelos momentos de descontração e amizade. Obrigada!

Às amigas: Anna Karenina, Tarciana, Patrícia, Manuela e Luciana pelo nosso referencial de CEARÁ, sempre tão presentes, pelo amor, amizade eterna. Amo vocês!!!

À Sônia e Vanessa, pela convivência única e perfeita, onde fomos mais que amigas fomos companheira diárias de lágrimas, sorrisos e dúvidas... A cada uma de vocês o meu obrigada e o meu cheiro de amor no coração!

A vocês: Elma Regina e Renata Alexandra, pela conquista gradual de uma amizade eterna! Vocês sabem exatamente onde se fazem presentes e importantes... Amo vocês!!!!

À Denise Mafra e Andréa Lizbeth, pela amizade, cumplicidade, trocas culturais sempre tão alegres e autênticas! Obrigada por tudo.... Amo vocês! O meu cheirinho e o meu abraço bem carinhosos...

Aos meus amigos mais do que virtuais e, sim reais em meu coração: Luciano, Íris, Ademar, Ângela, Flávia, Indaia, Renato, Neide Farias e filhos, Gianisse, Cristine, Terezinha, Maria, Neide Sandrini e Luiz, pelas confidências e pelo amor sempre presentes! Não estão todos.... mas saibam que cada um citado ou não, tem um cantinho mais do que especial nesta minha caminhada que está apenas começando... Meus sinceros agradecimentos!

Às minhas amigas: **Karine, Severina Carla, Ana Verônica, Thaise e Nila**, o carinho de vocês sempre esteve presente! Obrigada!

Aos amigos **Josinete e Hermann** pelo amor, apoio, nobreza de espírito que me são espelhos de dignidade. Obrigada por tudo! Amo vocês!!!

Aos colegas do Departamento de Nutrição da UFRN pelos ensinamentos, por serem meu referencial no exercício da docência, motivo de eu estar aqui... Obrigada pela confiança!

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

Aos meus familiares de São Paulo, tios e primos, pelo carinho e acolhimento. Principalmente a **Jaíra**, pela amizade constante.

A família **Marsolla**, pelo carinho, atenção e acolhimento nas minhas idas e vindas à Campinas.

À minha "mainha" **Cleontina** e ao meu "painho" **Solon**, pelos pais guerreiros que tive, pelo amor sempre presente e a confiança ilimitada que sempre me fizeram acreditar que para conquistar algo era só dar o primeiro passo ... Obrigada por acreditar em mim! Amo-os com minha vida!

Ao meu irmão **Luiz Wladimir**, sem ele eu não seria a Aninha que todos conhecem. Obrigada pelo colo sempre presente e pelo **Lucas**, que já o amei pelo simples fato de ser seu filho!

Ao meu marido **Márcio**, grande amigo e companheiro, "co-autor" desta tese, que abriu mão de minha companhia, que apoiou e acreditou dizendo

sempre que eu chegaria. Obrigada por tudo! Amo a sua pessoa no que foi para mim... amo sua pessoa, no hoje que aprendi ao longo dos anos... e amo no amanhã, por saber que tem um papel importante na vida...vida esta que tanto amo!

A MEU QUERIDO E BOM DEUS em que tudo pode e me fortalece... poderia ter resumido estes agradecimentos em Tu, sabias? É.... Tu és o amor que acredito... és a vida que tanto amo.... és misericórdia e luz em meus momentos de escuridão... és tudo.... portanto: OBRIGADA DEUS, por tudo e por todos! Obrigada por confiar em mim!

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	xiv
Lista de Figura e tabelas	xvi
Resumo	xxiii
Abstract	xxv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Lípides em Alimentos e Nutrição	5
3.2. Ácidos Graxos ω 3 e ω 6	10
3.3. Eicosanóides	16
3.4. Lipoxigenase e Cicloxigenase	20
3.5. Antioxidantes	23
3.6. Especiarias	25
3.7. Compostos Fenólicos	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. Material	33
4.1.1. Amostras	33
4.2. Métodos	33
4.2.1. Preparação das farinhas	33
4.2.2. Preparação dos extratos	33
4.2.2.1. Obtenção do chá das especiarias	34
4.2.3. Preparação das frações de ácidos fenólicos das especiarias	34
4.2.3.1. Extrato de ácidos fenólicos livres	35
4.2.3.2. Extrato de ácidos fenólicos solúveis	36

4.2.3.3. Extrato de ácidos fenólicos insolúveis	37
4.2.4. Preparação da ração animal	37
4.2.4.1. Rações Experimentais	37
4.2.4.1.1. Poliinsaturada $\omega 3$	37
4.2.4.1.2. Poliinsaturada $\omega 6$	38
4.2.4.2. Composição centesimal das rações	38
4.2.4.2.1. Determinação de umidade	38
4.2.4.2.2. Determinação de cinzas	38
4.2.4.2.3. Determinação de lípidos	38
4.2.4.2.4. Determinação de proteína	38
4.2.4.2.5. Determinação da fração <i>Nifext</i>	39
4.2.5. Ensaio biológico	39
4.2.5.1. Animais	39
4.2.5.2. Procedimento experimental	40
4.2.6. Atividade antioxidante	41
4.2.6.1. Atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ácido linoléico (sistema aquoso)	41
4.2.6.2. Atividade antioxidante por condutimetria de compostos voláteis (sistema lipídico)	43
4.2.7. Análise cromatográfica	43
4.2.7.1. Análise do perfil lipídico da ração e tecidos	43
4.2.7.1.1. Obtenção da fração lipídica	44
4.2.7.1.2. Obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos	44
4.2.7.1.3. Cromatografia gasosa	45
4.2.7.2. Análise do perfil de compostos fenólicos	45
4.2.8. Determinação dos fenólicos totais	46

4.2.9. Atividade da lipoxigenase e da cicloxigenase	47
4.2.9.1. Atividade da lipoxigenase	47
4.2.9.2. Atividade da cicloxigenase	48
4.2.10. Análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nos tecidos dos animais experimentais	48
4.2.11. Análises estatísticas	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1. Atividade antioxidante	51
5.2. Identificação dos compostos fenólicos das especiarias mostarda, canela e erva doce	68
5.3. Resultados do ensaio biológico	80
5.4. Considerações finais	104
6. CONCLUSÕES	109
7. APÊNDICE – Análise sensorial de um chá de especiarias	110
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
ANEXOS	131

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Nome
µg	micrograma
µMol	micromol
AA	ácido araquidônico
AH	composto antioxidante
ALN	ácido linoléico
AOAC	<i>Association Official Analytical Chemists</i>
BHA	hidroxianisol butilado
BHT	hidroxitolueno butilado
BSA	N,O,bis(trimetilsilil)-acetamida
CCD	cromatografia em camada delgada
CEA	coeficiente de eficácia alimentar
CGMS	cromatografia a gás – espectrometria de massas
COX	cicloxigenase
DE	éter dietílico
DHA	ácido docosahexanóico
EA	acetato de etila
EPA	ácido eicosapentaenóico
Ext Al	extrato alcoólico
Ext Aq	extrato aquoso
Ext Et	extrato etéreo
F1	fator cinético 1
F2	fator cinético 2
FDA	<i>Food Drug Administration</i>
Fr I	fração insolúvel
Fr L	fração livre
Fr S	fração solúvel
GABA	ácido γ-butírico
HCl	ácido clorídrico
HDL	lipoproteína de alta densidade

HE	hematoxilina-eosina
HEPE	hidroxieicosapentaenóico
HETE	hidroxieicosatetraenóico
HETrE	hidroxieicosatrienóico
IDA	ingestão diária aceitável
KCl	cloreto de potássio
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LOX	lipoxigenase
LT	leucotrieno
MDA	malonaldeído
mg	miligrama
mM	milimolar
Mol	molar
Nifext	<i>nitrogen free extract</i>
PFGA	produtos finais de glicação avançada
Pg	prostaglandina
PG	galato de propila
ppm	partes por milhão
Prot	proteína
Rf	fator de resposta
RLH	radicais livres
RLHb	radicais livres hidrofóbicos
RLHf	radicais livres hidrofílicos
ROO [·]	radical peróxido
ROOH	hidroperóxido
rpm	rotação por minuto
TBHQ	terciobutil hidroquinona
tg	tangente
THF	tetrahidrofurano
TXA	tromboxano
und	unidade

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		Pag.
FIGURA 1	Esquema de um cenário especulativo da possibilidade dos efeitos atenuantes dos ácidos graxos polinsaturados e metabólitos dos óleos de vegetais e peixe pela geração dos leucotrienos pró-inflamatórios do ácido araquidônico.	9
FIGURA 2	Estrutura dos ácidos graxos polinsaturados das séries $\omega 3$, $\omega 6$ e $\omega 9$.	11
FIGURA 3	Esquema relativo dos diferentes percentuais de ácidos graxos e as possíveis trocas no processo da indústria alimentícia, envolvendo a engorda dos animais e a hidrogenação dos ácidos graxos.	14
FIGURA 4	Ácidos graxos dietéticos e seu metabolismo após a ingestão.	15
FIGURA 5	Síntese de monoeno, dieno e trieno prostaglandinas.	19
FIGURA 6	Etapas da oxidação lipídica	29
FIGURA 7	Modelo para cálculo de porcentagem de inibição da oxidação	42
FIGURA 8	Descrição esquemática do <i>Rancimat</i>	43
FIRURA 9	Atividade antioxidante dos extratos da mostarda a 100 e 200ppm.	55
FIGURA 10	Atividade antioxidante das frações de fenólicos da mostarda a 100 e 200ppm.	56
FIGURA 11	Atividade antioxidante dos extratos da canela a 100 e 200ppm	57
FIGURA 12	Atividade antioxidante das frações de fenólicos da canela a 100 e 200ppm.	58
FIGURA 13	Atividade antioxidante dos extratos da erva doce a 100 e 200ppm.	59

FIGURA 14	Atividade antioxidante das frações fenólicas da erva doce 100 e 200ppm.	60
FIGURA 15	Atividade antioxidante dos extratos da mistura teste das especiarias a 100 e 200ppm.	61
FIGURA 16	Atividade antioxidante das frações fenólicas da mistura das especiarias a 100 e 200ppm.	62
FIGURA 17	Atividade antioxidante por condutimetria (RANCIMAT) dos extratos da mostarda.	65
FIGURA 18	Atividade antioxidante por condutimetria (RANCIMAT) dos extratos da canela.	65
FIGURA 19	Atividade antioxidante por condutimetria (RANCIMAT) dos extratos das especiarias mostarda, canela e erva doce.	66
FIGURA 20	Atividade antioxidante do chá da mistura-teste das especiarias mostarda, canela e erva doce, de 25 a 200 ppm.	72
FIGURA 21	Cromatograma e espectros de massa dos principais componentes ativos com atividade antioxidante no chá administrado aos animais experimentais.	73
FIGURA 22	Box-plots para o ganho de peso dos animais experimentais	81
FIGURA 23	Coeficiente de Eficácia Alimentar dos animais que receberam tratamento experimental.	84
FIGURA 24	Absorção aparente (AbAp) de fenólicos nas fezes dos animais experimentais	85
FIGURA 25	Fotomicrografia de corte histológico de duodeno de animal	86
FIGURA 26	Detalhe, em maior aumento, das fotomicrografias anteriores	87
FIGURA 27	Detalhe, em maior aumento, das fotomicrografias anteriores (10 x maior)	88
FIGURA 28	Box-plots da lipoperoxidação do tecido plasmático dos animais experimentais	91

FIGURA 29	Box-plots da lipoperoxidação do tecido hepático dos animais experimentais.	91
FIGURA 30	Box-plots da lipoperoxidação do tecido cerebral dos animais experimentais.	91
FIGURA 31	Box-plots da lipoperoxidação do tecido cardíaco dos animais experimentais.	92
FIGURA 32	Box-plots da lipoperoxidação do tecido adiposo dos animais experimentais.	92
FIGURA 33	Box-plots da lipoperoxidação do tecido renal dos animais experimentais.	92
FIGURA 34	Box-plots para o percentual de incorporação lipídica no plasma dos animais	93
FIGURA 35	Box-plots para o percentual de incorporação lipídica no fígado dos animais	93
FIGURA 36	Box-plots para o percentual de incorporação lipídica no cérebro dos animais	93
FIGURA 37	Box-plots para o percentual de incorporação lipídica no coração dos animais	94
FIGURA 38	Box-plots para o percentual de incorporação lipídica nos adipócitos dos animais	94
FIGURA 39	Box-plots para o percentual de incorporação lipídica os rins dos animais	94
FIGURA 40	Espectros de massa do 18:2 (ácido linoléico) e 20:4 (ácido araquidônico) e comparação do % de incorporação dos ácidos graxos 18:2 e 20:4 dos tecidos dos animais experimentais que receberam a dieta rica em $\omega 6$.	97

FIGURA 41	Espectros de massa do EPA e DHA e comparação do % dos ácidos graxos EPA e DHA dos tecidos dos animais experimentais que receberam a dieta rica em $\omega 3$.	99
FIGURA 42	Atividade de inibição da lipoxigenase por compostos fenólicos da mistura teste das especiarias mostarda, canela e erva doce.	103
FIGURA 43	Atividade de inibição da cicloxigenase por compostos fenólicos da mistura teste das especiarias mostarda, canela e erva doce.	103
FIGURA 44	Esquema de ação de compostos fenólicos que podem bloquear ou inibir a formação de doenças.	107
FIGURA 45	Análise multivariada de correspondência múltipla – associação entre as características da população.	115
FIGURA 46	Análise multivariada de correspondência múltipla – associação da aceitabilidade e propriedades específicas	116
ESQUEMA 1	Extração seqüencial	34
ESQUEMA 2	Procedimento de extração de compostos fenólicos de frações livres, esterificadas e de resíduos de ácidos fenólicos para análises em coluna capilar de cromatografia gás-líquida.	35
ESQUEMA 3	Modelo para obtenção das tangentes para cálculo dos fatores cinéticos.	54
TABELA 1	Principais ácidos graxos em alimentos, sua nomenclatura, tamanho da cadeia e fontes.	7
TABELA 2	Percentual de atividade antioxidante dos extratos e frações de especiarias	53
TABELA 3	Parâmetros cinéticos caracterizando a inibição da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico pelos extratos e frações das especiarias mostarda, canela e erva doce, como de sua mistura teste nas concentrações de 100 e 200 ppm.	63

TABELA 4	Cromatografia em camada delgada dos extratos e frações das especiarias	70
TABELA 5	Identificação e quantificação dos compostos fenólicos das frações de fenólicas de especiarias	74
TABELA 6	Identificação e quantificação dos compostos fenólicos responsáveis pela atividade antioxidante, das frações fenólicas de especiarias após purificação por CCD	75
TABELA 7	Identificação e quantificação dos compostos fenólicos dos extratos das especiarias	78
TABELA 8	Identificação e quantificação dos compostos fenólicos responsáveis pela atividade antioxidante, das frações fenólicas de especiarias após purificação por CCD	78
TABELA 9	Composição centesimal das rações experimentais	81
TABELA 10	Concentração de ácidos graxos das rações fornecidas aos animais experimentais.	90
ANEXO 1	Cromatograma e espectros de massa da fração de ácidos fenólicos livres com atividade antioxidante da mostarda.	131
ANEXO 2	Cromatograma e espectros de massa da fração de ésteres solúveis de ácidos fenólicos com atividade antioxidante da mostarda.	132
ANEXO 3	Cromatograma e espectros de massa da fração livre de ácidos fenólicos com atividade antioxidante da canela	133
ANEXO 4	Cromatograma e espectros de massa da fração de ácidos fenólicos livres com atividade antioxidante da erva doce.	134
ANEXO 5	Cromatograma e espectros de massa da fração de ésteres solúveis de ácidos fenólicos com atividade antioxidante da erva doce.	135

ANEXO 6	Cromatograma e espectros de massa da fração livre de ácidos fenólicos com atividade antioxidante da mistura teste	136
ANEXO 7	Cromatograma e espectros de massa de ésteres solúveis com atividade antioxidante da mistura teste.	137
ANEXO 8	Cromatograma e espectros de massa dos compostos fenólicos presentes no extrato etéreo da mostarda	138
ANEXO 9	Cromatograma e espectros de massa dos compostos fenólicos com atividade antioxidante presentes no extrato alcoólico da mostarda	139
ANEXO 10	Cromatograma e espectros de massa dos compostos fenólicos com atividade antioxidante presente no extrato aquoso da mostarda.	140
ANEXO 11	Cromatograma e espectros de massa de compostos fenólicos com atividade antioxidante presentes no extrato etéreo da canela	141
ANEXO 12	Cromatograma e espectros de massa de compostos fenólicos com atividade antioxidante presentes no extrato alcoólico da canela.	142
ANEXO 13	Cromatograma e espectros de massa de compostos fenólicos com atividade antioxidante presentes no extrato aquoso da canela.	143
ANEXO 14	Cromatograma e espectros de massa de compostos fenólicos com atividade antioxidante presentes no extrato etéreo da erva doce.	144
ANEXO 15	Cromatograma e espectros de massa de compostos fenólicos com atividade antioxidante presentes no extrato alcoólico da erva doce.	145

ANEXO 16	Cromatograma e espectros de massa de compostos fenólicos com atividade antioxidante presentes no extrato etéreo da mistura teste.	146
ANEXO 17	Cromatograma e espectros de massa de compostos fenólicos com atividade antioxidante no extrato alcoólico da mistura teste.	147
ANEXO 18	Cromatograma e espectros de massa dos compostos fenólicos com atividade antioxidante presentes no extrato aquoso da mistura teste.	148
ANEXO 19	Perfil lipídico do tecidos dos animais (percentual de incorporação - %)	149

Resumo e Abstract

Dentro da perspectiva da utilização de compostos fenólicos como antioxidantes naturais para minimizar os efeitos *in vitro* e *in vivo* do processo oxidativo dos lípides insaturados, foi realizada a monitoração dietética de duas dietas ricas em lípides das séries $\omega 3$ e $\omega 6$ e a suplementação de um chá de uma mistura de especiarias, em ratos *Wistar*, com o objetivo de verificar a influência dos compostos fenólicos, presentes nas especiarias, sobre o metabolismo de ácidos graxos das séries $\omega 3$ e $\omega 6$. Extratos e frações das especiarias mostarda, canela e erva doce foram obtidos e tiveram suas atividades antioxidantes testadas em sistemas aquoso (co-oxidação de substratos com o uso de ácido linoléico/ β -caroteno) e lipídico (RANCIMAT) e o perfil de compostos fenólicos identificados e quantificados por CGMS. A partir de uma mistura de especiarias, foi elaborado um chá que foi fornecido aos animais de cada grupo dietético ($\omega 3$ e $\omega 6$). Após 45 dias de tratamento, os animais foram sacrificados e tiveram seus tecidos coletados para análise de TBARs e do perfil lipídico por CGMS. Todos os extratos das especiarias apresentaram atividade antioxidante equivalente ou superior ao BHT. Foram identificados por CGMS os ácidos fenólicos: catecol, salicílico e caféico. Foi obtido nos tecidos dos animais que o somatório do perfil de ácidos graxos saturados e dos insaturados apresentaram diferença entre os grupos testes e controles. Logo, no tecido cerebral, o EPA foi incorporado apenas no grupo $\omega 3$ que recebeu o extrato das especiarias. Já para o DHA, do mesmo grupo dietético, os tecidos hepático e renal também apresentaram incorporação aumentada em relação ao controle. No grupo dietético $\omega 6$, destaca-se um aumento no percentual de incorporação do ácido linoléico nos tecidos cardíaco e renal no grupo experimental. Enquanto, para o ácido araquidônico, houve diferença em todos os tecidos. Já, para os resultados da lipoperoxidação, observou-se que todos os tecidos dos animais que receberam o extrato das especiarias apresentaram baixos valores em comparação aos seus respectivos controles. Este estudo também avaliou a ação de compostos fenólicos do chá da mistura das especiarias mostarda, canela e erva doce sobre as enzimas lipoxigenase e cicloxigenase. O extrato da mistura das especiarias a 100 e 200 ppm foi

adicionado no meio de reação contendo o substrato e a enzima lipoxigenase 1B da Sigma com 112.000 und/mg. A cicloxigenase foi obtida de vesículas seminais de carneiro e seguiu-se o mesmo protocolo de atividade para a lipoxigenase. Indometacina foi o inibidor utilizado como controle positivo da reação. Observou-se que a 200 ppm, como na concentração do chá (0,02%), a lipoxigenase foi inibida em aproximadamente em 90%. Já para a cicloxigenase, o extrato a 200 ppm resultou numa média de 75% de inibição da atividade da enzima, enquanto que a indometacina apresentou uma média de 77% de inibição. A absorção aparente do chá das especiarias indicou que os fenólicos presentes na mistura foram absorvidos em média de 75%. O estudo histopatológico dos intestinos delgados dos animais não apresentou nenhuma diferença na área de absorção entre o grupo experimental e o controle. Estes dados sugerem, portanto, um efeito antioxidante das substâncias fenólicas identificadas nas especiarias sobre os ácidos graxos das séries $\omega 3$ e $\omega 6$, podendo agir diretamente: (1) no alimento (óleo), (2) com modificação do perfil lipídico, (3) proteção quanto à oxidação de tecidos e (4) inibição das enzimas da biossíntese dos eicosanóides.

Considering the perspective for the use of phenolic compounds as natural antioxidants to minimize *in vitro* and *in vivo* effects of oxidative processes on unsaturated lipids, this work monitored *Wistar* rats fed with two diets rich in ω 3 and ω 6 polyunsaturated lipids, supplemented with tea made from a blend of spices. The objective of the work was to study the influence of phenolic compounds present in spices on the metabolism of ω 3 and ω 6 fatty acids. Extracts and fractions of mustard, cinnamon and anise were obtained and had their antioxidant activity tested in aqueous (co-oxidation of substrates using linoleic acid/ β -carotene) and lipidic systems (RANCIMAT). Their phenolic compounds profile was determined and quantified using CGMS. The rats of each diet group (ω 3 and ω 6) were given tea made from a blend of spices and sacrificed after 45 days. Their tissues were then collected and analyses of TBARS and lipid profile were performed using CGMS. All the extracts of spices showed equal or higher antioxidant activity than BHT. The following phenolic acids were identified using CGMS: catechol, salicylic and caffeic. It was observed that the total amount of the profile of saturated and unsaturated fatty acids in the rat tissues were different in the test group and the control group. In brain tissue, EPA was found only in the ω 3 diet group which was given the tea. Concerning DHA, liver and kidney tissues of the same diet group showed higher concentrations than the control group. In the ω 6 diet group, an outstanding increase of linoleic acid in cardiac and kidney tissues was found. Concerning the arachidonic acid, a difference in concentration was observed in all tissues. All the tissues from rats given the tea presented a lower level of lipid peroxidation than their respective control groups. The present research also evaluated the action of phenolic compounds found in the tea made from the blend of mustard, cinnamon and anise on the enzymes lipoxygenase and cyclooxygenase. The extract of the blend of spices, in the concentrations of 100 and 200 ppm, was added to the substrate and Sigma lipoxygenase 112.000 units/mg. Cyclooxygenase was obtained from sheep seminal bladders and underwent the same protocol as lipoxygenase. Indomethacin was the inhibitor used as the positive control of the reaction. It was observed that in the concentration of 200 ppm (that is

0.02%, the same concentration as in the tea), lipoxygenase presented an average 90% inhibition. The extract of cyclooxygenase 200 ppm presented 75% inhibition of the enzyme activity, while indomethacin presented an average 77% inhibition. It was found that around 75% of the phenolic compounds present in the tea made from the blend of spices were absorbed, thus leading to the conclusion that apparent absorption of the tea took place. Histopathologic examinations on the small intestines of the rats did not reveal any difference in the absorption area between the experimental and the control groups. Such results suggest therefore an antioxidant effect of the phenolic substances identified in the spices on the ω 3 and ω 6 fatty acids, this effect being possible directly (1) on the food (oil), (2) modification of the profile fatty acids, (3) oxidation protection tissues and, (4) inhibition of enzymes of eicosanoids biosynthesis.

Introdução

1. Introdução

Dentre os produtos finais da digestão lipídica estão os ácidos graxos. Quando não oxidados, estes são incorporados nas células, podendo atuar direta ou indiretamente nas diversas funções celulares como: permeabilidade celular, atividade de enzimas teciduais, transporte e função de receptores associados à membrana que controlam o fluxo de nutrientes e metabólitos e, ainda, podendo agir sobre a interação célula-célula, responsividade celular, sobre os mediadores químicos e hormônios.

Os mecanismos de resposta celular estão relacionados à fluidez da membrana, a qual é modulada pela quantidade e pelo conteúdo de ácidos graxos da dieta. Os ácidos graxos insaturados aumentam a fluidez e a permeabilidade das membranas celulares, estando o seu metabolismo associado à dessaturação, alongamento e oxigenação da sua estrutura.

Os processos enzimáticos de alongamento e dessaturação dos ácidos graxos ocorrem na fração microssomal do tecido hepático e envolvem quatro enzimas dessaturases: $\Delta 9$, $\Delta 6$, $\Delta 5$ e $\Delta 4$. Estas enzimas estão relacionadas com as três maiores famílias de ácidos graxos insaturados: $\omega 9$ (ácidos oléico), $\omega 6$ (linoléico) e $\omega 3$ (α -linolênico). Sendo que a enzima $\Delta 6$ dessaturase é a chave da reação de dessaturação destes ácidos graxos, a via metabólica que esta enzima atuará é modulada pelo tipo e quantidade de ácido graxo oferecido na dieta; visto que os ácidos graxos das séries $\omega 9$, $\omega 6$, e $\omega 3$ competem entre si pela mobilização da $\Delta 6$ dessaturase.

Como resultado dos processos de dessaturação e alongamento dos ácidos graxos oléico, linoléico e α -linolênico nas células, ocorre a formação de eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos) que são substâncias biologicamente ativas e que desempenham diversas funções biológicas no meio onde são produzidas mesmo quando presentes em pequenas concentrações.

Um dos intermediários da dessaturação e alongamento do ácido linoléico ($\omega 6$) é o ácido araquidônico. Por outro lado, o ácido α -linolênico ($\omega 3$) possui como intermediário o ácido eicosapentaenóico (EPA). As enzimas cicloxigenase e lipoxigenase participam do processo de conversão destes intermediários aos eicosanóides. Dependendo da via utilizada são produzidos os eicosanóides da série 2 ($\omega 6$) ou da série 3 ($\omega 3$). A quantidade dos eicosanóides produzida é influenciada pela disponibilidade dietética dos ácidos graxos linoléico e α -linolênico, bem como pela atividade das enzimas: $\Delta 6$ dessaturase, fosfolipase A_2 , cicloxigenase e lipoxigenase. Esta última, por sua vez, pode ser inibida por antioxidantes limitando, assim, a formação dos eicosanóides pró-inflamatórios.

Várias alternativas dietéticas vêm sendo estudadas com o objetivo de regular o metabolismo lipídico nas células. Antioxidantes naturais, como compostos fenólicos de especiarias, podem exercer funções fisiologicamente importantes, modulando a atividade da cicloxigenase e lipoxigenase. Desta forma, tanto o consumo dietético de ácidos graxos polinsaturados das séries $\omega 3$ e $\omega 6$, e o consumo de antioxidantes naturais, como especiarias ricas em compostos fenólicos, podem apresentar uma relação dose-dependente no metabolismo destes ácidos graxos polinsaturados.

O uso de antioxidantes é uma das maneiras mais eficientes utilizadas para minimizar os danos ocasionados pelas substâncias decorrentes da peroxidação lipídica. Estas substâncias, quando presentes em pequenas concentrações, devem ser capazes de inibir ou bloquear a cadeia oxidativa, minimizando os danos que os produtos da oxidação causam nos tecidos.

Certas especiarias e extratos de especiarias contêm componentes com atividade antioxidante; este fato é decorrente da aplicação destas em diferentes preparações culinárias para intensificar as características organolépticas, aumentar a aceitabilidade e, principalmente, melhorar a estabilidade oxidativa de produtos alimentícios. Os componentes responsáveis pela estabilidade oxidativa têm sido identificados em várias

especiarias, tais como: alecrim, sálvia, tomilho, cravo-da-índia, dentre outras. Esta propriedade antioxidante é devida principalmente à presença destes compostos fenólicos (MADSEN e col, 1996).

Com o aumento da restrição do uso em alimentos de antioxidantes sintéticos, tais como: o hidroxitolueno butilado, o hidroxianisol butilado, o terciobutil hidroquinona e o galato de propila, tem aumentado o interesse na pesquisa de substâncias naturais com atividade antioxidante, incluindo as especiarias. Nos últimos 10 anos, tais extratos têm sido utilizados, pela indústria, como antioxidantes. A restrição dos antioxidantes sintéticos está relacionada, principalmente, ao seu efeito tóxico (BARLOW, 1990).

A presente pesquisa foi configurada tendo, como hipótese de trabalho, que compostos fenólicos de especiarias atuam sobre os ácidos graxos polinsaturados das séries $\omega 3$ e $\omega 6$ por ação antioxidante e por efeito inibitório de enzimas da biossíntese dos eicosanóides. Dentro da perspectiva da utilização de compostos fenólicos como antioxidantes naturais para minimizar os efeitos *in vitro* e *in vivo* do processo oxidativo dos lípidos insaturados, foi realizada a monitoração dietética de duas dietas ricas em lípidos polinsaturados das séries $\omega 3$ e $\omega 6$ em ratos *Wistar*, recém desmamados, verificando a incorporação dos lípidos em diferentes tecidos, como também a influência da suplementação de um extrato rico em antioxidantes sobre o metabolismo lipídico.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antioxidante dos compostos fenólicos das especiarias mostarda, canela e erva doce no metabolismo de ácidos graxos polinsaturados das séries $\omega 3$ e $\omega 6$.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o potencial antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva doce, isolada e conjuntamente.
- Avaliar a influência dos compostos fenólicos presentes nas especiarias sobre o metabolismo lipídico e a regulação (enzimas) da biossíntese dos eicosanóides.
- Avaliar os efeitos antinutricionais da suplementação com o chá das especiarias sobre a morfologia intestinal dos animais.

Revisão Bibliográfica

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Lípidos em alimentos e nutrição

Os lípidos dietéticos são nutrientes essenciais à vida, assim como as proteínas, os carboidratos, as vitaminas, os minerais e a água.

Os lípidos podem ser de origem animal ou vegetal. Eles são constituídos principalmente de triglicerídeos, mas também contêm componentes como os esteróis, os fosfolípidos, os glicolípidos e outras substâncias. Além de atuar na determinação das características organolépticas do alimento, estes componentes também podem desempenhar importantes atividades biológicas (VIOLA, 1997).

Além de apresentarem elevado aporte energético, os lípidos têm outras funções importantes: estão presentes nos fosfolípidos dos tecidos das membranas celulares, das lipoproteínas, que são as responsáveis pelo transporte dos lípidos no sangue, e como precursores de hormônios. Os lípidos também são essenciais para o transporte das vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K) e, quando fazem parte do regime alimentar, contribuem para o sabor dos alimentos que, de outra forma, seriam impalatáveis (VIOLA, 1997).

A primeira indicação de lípidos dietéticos como constituinte essencial na alimentação para crescimento de animais foi apresentada em 1918 por ARON, o qual propôs a manteiga como um alimento que apresentava uma propriedade nutricional que não poderia ser fornecida por outros alimentos. Este trabalho sugeriu que o fator nutritivo inerente à gordura dietética foi devido a sua contribuição energética. Todavia, BURR e BURR (1929), publicaram uma série de trabalhos versando sobre a "nova doença carencial produzida pela exclusão rígida de gordura dietética". Eles estudaram a hipótese de que animais homeotérmicos, em geral, não sintetizam quantidades apreciáveis de certos ácidos graxos. Esta hipótese foi reforçada

com outros estudos, também de BURR e BURR (1930), onde estes pesquisadores adicionaram aos seus estudos anteriores a discussão de que o consumo de ácido linoléico, quando sozinho, poderia reverter todos os sintomas de deficiência de uma dieta livre de gordura; apresentando, assim, o conceito de essencialidade para o ácido linoléico (C18:2 ω 6). Este estudo pioneiro também indicou que, somando-se às escamações visíveis da pele, animais com deficiência de ácido linoléico também aumentaram a perda de água através da pele. Neste mesmo trabalho, os autores reconheceram os 2 maiores defeitos que têm sido associados com deficiência de ácido linoléico em biologia cutânea: hiperproliferação epidérmica e aumento da permeabilidade da água na pele (ZIBOH, 2000).

A maioria dos ácidos graxos em alimentos são de cadeia linear com número par regular de átomos de carbonos. Alguns ácidos graxos, tais como ácidos graxos de ramificações hidroxí, cíclicas e ímpares, também são encontrados, em menor quantidade, em alimentos de origem animal, podendo também ocorrer como uma consequência da ingestão, ação microbiana ou contaminação.

O comprimento da cadeia carbônica dos ácidos graxos em alimentos é altamente variável (C2-C26); contudo, na maioria das vezes, os ácidos graxos são C16, C18, C20 e C22.

Os ácidos graxos insaturados usualmente apresentam-se na posição *cis*, porém, podem existir na forma *trans*, especialmente em ocorrência natural de suprimentos microbianos e óleos comercialmente processados. Estes ácidos graxos isoméricos são formados durante o processo de hidrogenação (industrial ou no rúmen de animais). Bem mais comum, os ácidos graxos polinsaturados usualmente apresentam carbonos metilênicos, embora conjugados e outras formas existentes (PERKINS, 1991; KING, 1996; PADOVESE, MANCINI-FILHO, 2002).

Os ácidos graxos, unidade fundamental dos lípides, ocorrem em maior frequência com 16 e 18 átomos de carbonos. Na **tabela 1**, apresentam-se alguns destes lípides dietéticos.

TABELA 1- Principais ácidos graxos em alimentos, sua nomenclatura, tamanho da cadeia e fontes

Nomenclatura sistemática	Tamanho da cadeia	Nome comum	Fontes
Saturados			
Tetraenóico	C4:0	Butírico	Manteiga
Hexaenóico	C6:0	Capróico	Manteiga
Octaenóico	C8:0	Caprílico	Côco
Dodecaenóico	C12:0	Láurico	"miolo" de palma, côco
Tetradecaenóico	C14:0	Mirístico	"miolo" de palma, côco
Hexadecaenóico	C16:0	Palmítico	Palma
Octadecaenóico	C18:0	Esteárico	Muitas gorduras animais, cacau
Eicosaenóico	C20:0	Araquico	Amendoim
Docosaenóico	C22:0	Behênico	Sementes
Tetracosaeenóico	C24:0	Lignocérico	Amendoim
Monoinsaturados			
<i>Cis</i>			
9-tetradecaenóico	C14:1 η 5	Miristoléico	Manteiga
9-hexadecaenóico	C16:1 η 7	Palmitoléico	Alimentos marinhos, carne
9-ocatadecaenóico	C18:1 η 9	Oléico	Oliva, canola
11-octadecaenóico	C18:1 η 7	Vacênico	Alimentos marinhos
13-docosaenóico	C22:1 η 9	Erúcico	Colsa
<i>Trans</i>			
9-octadecaenóico	<i>t</i> 18:1 η 9	Elaídico	Gorduras hidrogenadas
11-octadecaenóico	<i>t</i> 18:1 η 7	<i>Trans</i> vacênico	Gorduras hidrogenadas, manteiga
Polinsaturados			
<i>Todo Cis</i>			
9,12-octadienóico	C18:2 η 6	Linoléico	Girassol Açafrão
6,9,12-octatrienóico	C18:3 η 6	γ -linolênico	Prímula
8,11,14-eicosatrienóico	C20:3 η 6	Dihomo- γ -linolênico	Fígado de tubarão
5,8,11,14-eicosatetraenóico	C20:4 η 6	Araquidônico	Ovos, muitas gorduras animais
9,12,15-octatrienóico	C18:3 η 3	α -Linolênico	Soja, canola
5,8,11,14,17-eicosapentaenóico	C20:5 η 3	Timnodônico	Alimentos marinhos
7,10,13,16,19-docosapentaenóico	C22:5 η 3	Clupadônico	Alimentos marinhos
4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico	C22:6 η 3	Cervônico	Alimentos marinhos

Fonte: PERKINS, 1991; KING, 1996.

Ácidos graxos polinsaturados de cadeias longas são de grande importância biológica porque são parte da composição dos fosfolípidos de membranas, onde são ácidos graxos verdadeiramente funcionais. Eles são também precursores de prostaglandinas, substâncias hormonais envolvidas em diversas atividades biológicas importantes, como a agregação plaquetária (VIOLA, 1997; ZIBOH, 2000).

Especificamente, os ácidos graxos polinsaturados de cadeias longas, pertencentes à série $\omega 3$, são fundamentais para o desenvolvimento do cérebro e da retina. Eles também são abundantes no esperma e testículos e definitivamente têm implicações funcionais. Ao regular a fluidez da membrana do neurônio, eles permitem a ocorrência dos processos bioquímicos envolvidos na iniciação e difusão dos impulsos elétricos e a sua transmissão sináptica (ZIBOH, 2000; VIOLA, 1997).

Os ácidos graxos polinsaturados de cadeias longas são formados pelo alongamento e dessaturação de seus homólogos C18 (ácido linoléico e α -linolênico). No entanto, eles também podem estar presentes, na alimentação, como exemplo, em produtos de origem marinha. Quando eles são insuficientes na dieta o organismo tem que sintetizá-los a partir de seus homólogos de maior número de carbonos, conquanto que não exista desequilíbrio nas proporções no regime alimentar entre as diferentes séries. Um excesso de ácido linoléico compete pelas dessaturases e as extrair do ácido α -linolênico, tendo como possível consequência uma baixa produção de ácido eicosapentaenóico (VIOLA, 1997; ZIBOH, 2000). Por esta razão recomenda-se manter uma proporção 6:1 – 10:1 entre a séries $\omega 6$ e $\omega 3$, sendo esta proporção usualmente encontrada no azeite de oliva (VIOLA, 1997). A **figura 1** apresenta efeitos dos constituintes dietéticos lipídicos polinsaturados originados de óleos vegetal (ácido linoléico) e de peixe (ácido α -linolênico) e, por consequência, a formação de eicosanóides de resposta inflamatória.

Além de aumentar a fluidez da membrana, os fosfolípidos polinsaturados também estão envolvidos na ativação das enzimas ligadas à

própria membrana. O transporte de elétrons na cadeia respiratória aparentemente também é influenciado pela sua presença na crista mitocondrial. Além disso, as lipoproteínas que transportam os lipídeos no sangue contêm uma quantidade predominante de ácido linoléico e de ácido araquidônico em sua estrutura fosfolipídica. Os ácidos graxos polinsaturados também exercem um efeito positivo sobre o metabolismo do colesterol, ao estimular a internalização do colesterol nas células, diminuindo seus níveis plasmáticos.

FIGURA 1 - Esquema de um cenário especulativo da possibilidade dos efeitos atenuantes dos ácidos graxos polinsaturados e metabólitos dos óleos de vegetais e peixe pela geração dos leucotrienos pro-inflamatórios do ácido araquidônico. A via A ilustra as transformações metabólicas da ingestão dietética do óleo de soja, o qual é rico em ácido linoléico. Isto mostra a *dessaturação* e *alongamento* *in vivo* do ácido linoléico ao ácido araquidônico, seguido da lipoxigenação (pela 5-lipoxigenase) para leucotrienos pro-inflamatórios, particularmente o LTB_4 pelas células polimorfonucleares. Ácido araquidônico é também metabolizado pela 15-lipoxigenase ao ácido hidroxieicosatetraenóico (15-HETE), o qual exerce atividade anti-inflamatória na pele (TERNOWITZ, 1988). A via B ilustra o *elargimento* do ácido α -linolênico dietético, um constituinte do óleo de primula, para o ácido dihomolinolênico, seguido da lipoxigenação (pela 15 lipoxigenase) para o ácido 15-hidroxieicosatrienóico (15-HETE) e a cicloxigenação para prostaglandina E_1 . A via C ilustra a lipoxigenação (pela 15 lipoxigenase) do ácido eicosapentaenóico dietético para 15-hidroxieicosapentaenóico (25-HEPE) e a lipoxigenação para o leucotrieno LTB_4 (pela 5 lipoxigenase).

FONTE: ZIBOH, 2000.

Em consequência da modulação da composição de membrana frente a presença de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (VITALE e BROITMAN, 1981; PRYOR, 1982; SALMOND e col, 1986), destacando-se as seguintes propriedades: 1) excesso de fluidez da membrana permitindo, assim, a maior facilidade de penetração dos agentes cancerígenos; 2) anomalia das enzimas da membrana; 3) redução da atividade do β -caroteno e da vitamina A; 4) aumento da liberação de colesterol e de sais de bÍlis no intestino; 5) aumento dos receptores hormonais na glândula mamária; 6) aumento de peroxidação lipídica.

3.2. Ácidos graxos ω 3 e ω 6

Ácidos graxos polinsaturados consistem de duas famílias de ácidos graxos: ω 6 e ω 3, distintos pela localização da primeira dupla ligação contida na molécula a partir do grupo metil terminal do ácido graxo (**figura 2**). O ácido linoléico pertence a família dos ácidos graxos ω 6 e o ácido α -linolênico pertence aos ácidos graxos ω 3. Estes ácidos graxos polinsaturados não podem ser sintetizados pelo organismo humano. Eles são ácidos graxos essenciais que devem ser obtidos na dieta. Ambas as famílias encontram-se amplamente distribuídas na natureza. Ácido linoléico é encontrado em sementes de muitas plantas, com a exceção do coco, cacau e palma. Já o ácido α -linolênico está largamente presente no cloroplasto de vegetais verdes frondosos, ao invés de sementes, com a exceção de semente de linhaça. Algumas amêndoas, como as nozes inglesas, são muito ricas em ácido α -linolênico (SIMOPOULOS, 1996), como também o óleo de peixe, fonte desse lípide (ZIBOH,2000).

No corpo humano, os ácidos graxos essenciais são metabolizados na forma de ácidos graxos de cadeia longa com 20 a 22 átomos de carbono, aumentando tanto o tamanho da cadeia, bem como a insaturação, por adição de duplas ligações extras na extremidade carboxil terminal da molécula do ácido graxo. Pelo uso de material marcado radiotivamente, tem

sido mostrado que o ácido linoléico é metabolizado para ácido araquidônico (AA), e ácido α -linolênico para ácido eicosapentaénoico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA).

FIGURA 2 - Estrutura dos ácidos graxos polinsaturados, das séries ω 3, ω 6 e ω 9.

O AA é encontrado predominantemente em fosfolípidos de animais alimentados com grãos e o EPA e o DHA, em óleo de peixe (particularmente ácidos graxos de peixes e algumas algas). Ácidos graxos ω 6 e ω 3 competem pela ação de enzimas, mas ambas, a Δ 5 e a Δ 6 dessaturases, preferem ácidos graxos ω 3 e ω 6. Contudo, concentrações aumentadas de ácidos graxos ω 6 na alimentação, como são observadas na dieta americana, interferem no metabolismo do ácido α -linolênico para a síntese de EPA e DHA. A atividade da enzima Δ 6 dessaturase pode diminuir com a idade. Crianças prematuras possuem limites na capacidade de síntese de EPA e DHA do ácido α -linolênico, como também alguns indivíduos hipertensos e alguns diabéticos (SIMOPOULOS, 1996).

Os ácidos graxos α -linolênico (ω 3) e linoléico (ω 6) e seus derivados de cadeia longa são componentes de plantas e membranas de células animais e estão seletivamente distribuídos ao longo das classes de lípidos de células de mamíferos e pássaros. O ácido linoléico é encontrado,

largamente, em triglicerídeos, ésteres de colesterol, e somente em pequenas quantidades nos fosfolípidos. O EPA está presente nos fosfolípidos e em ésteres de colesterol e em pequenas quantidades de triglicerídeos. O DHA também encontra-se em fosfolípidos. O córtex cerebral, a retina, os testículos e os espermatozoides de todos os mamíferos, incluindo seres humanos, são, em particular, ricos em DHA. Seres humanos podem obter EPA e DHA diretamente de dietas ricas em peixe e óleo de peixe, também, sintetizá-los a partir do ácido α -linolênico. No período Paleolítico uma parcela significativa da população pode ter buscado uma alimentação com quantidades iguais de $\omega 6$ e $\omega 3$ e poucas quantidades de ácidos graxos saturados, segundo estudos de estimativas de SIMOPOULOS (1996).

As dietas atuais são ricas em grandes quantidades de $\omega 6$, devido ao aumento da oferta na produção de óleos para cocção, os quais são obtidos de sementes, tais como: milho, girassol, algodão e entre outras. A produção em larga escala de óleos vegetais passou a ser mais eficiente e econômica devido ao uso mais intenso de solventes no processo de extração de óleos de sementes, que aumentou após a II Guerra Mundial. O processo de hidrogenação também contribuiu para o aumento na quantidade de ácidos graxos $\omega 6$ e para a diminuição de ácidos graxos $\omega 3$. Por exemplo, a hidrogenação seletiva parcial de óleo de soja reduziu o conteúdo de ácido α -linolênico, aumentando a concentração de ácido linoléico; a hidrogenação do óleo de soja visou à diminuição da concentração de ácido α -linolênico, pois este é muito susceptível ao processo de oxidação (SIMOPOULOS, 1996).

O processo de hidrogenação apresenta um outro problema: não somente diminui o ácido α -linolênico, como também apresenta um aumento de ácido graxos *trans*. Este fato tem demonstrado que os ácidos graxos *trans* levam ao acréscimo nas concentrações de colesterol sérico. Em outras palavras, ácidos graxos *trans* aumentam a LDL (lipoproteína de baixa densidade) e diminuem a HDL (lipoproteína de alta densidade). Segundo o autor, concentrações de AA em carcaças de animais que consumiram grãos

ricos em ácidos graxos $\omega 6$, apresentaram-se elevadas. Assim, estima-se que a ingestão dietética de ácido araquidônico seja em torno de 200 a 1000mg/d, para o EPA de 46 mg/d e para o DHA de 78 mg/d. Pássaros e animais do campo que se alimentam com plantas demonstraram apenas 3.9% de ácidos graxos polinsaturados em suas carcaças. Apesar desta pequena concentração, apresentam em torno de 5 vezes mais ácidos graxos polinsaturados por grama do que o encontrado em gado doméstico. A carne, proveniente de animais, obtida sob condições modernas de pecuária, possui pequena quantidade de ácido α -linolênico. Por outro lado, veados que vivem com uma dieta rica a base de musgos contêm mais ácidos graxos $\omega 3$ (ácido linolênico) em seus tecidos. Estes fatos refletem a importância da ingestão desses nutrientes essenciais como fator de expressão tecidual (VIOLA, 1997).

A razão de $\omega 6/\omega 3$ tem mudado em outros alimentos, devido à pecuária e piscicultura modernas e ao fato de que pessoas nos Estados Unidos e oeste Europeu, que refletem sua cultura no mundo, não ingerem plantas silvestres ou ervas frescas e se alimentam de um número limitado de vegetais cultivados. Peixes de aquacultura contêm menos $\omega 3$ e mais $\omega 6$ do que é encontrado nos rios de campos (SIMOPOULOS, 1996, SIMOPOULOS, 1992). Inclusive galinhas em condições livres produzem ovos ricos em ácidos graxos $\omega 3$, enquanto galinhas alimentadas com técnicas modernas apresentam uma produção de ovos com concentrações menores de ácidos $\omega 3$. Os ovos de galinhas criadas em condições livres têm uma razão de $\omega 6/\omega 3$ de 1:3, em contrapartida, aos ovos padrões da USDA, cuja mesma razão é de 19:4 (SIMOPOULOS, SALEM, 1986).

Um crescimento no consumo relativo do ácido linoléico e AA, devido ao aumento na produção de óleos vegetais, tem ocorrido desde o início do século XX e contribui com a diminuição dos ácidos α -linolênico, EPA e DHA. Antes de 1940, crianças eram alimentadas com óleo de fígado de bacalhau como fonte de vitamina A e D. O consumo de óleo de fígado de bacalhau foi drasticamente diminuído desde que estas vitaminas foram

sintetizadas. Hoje, a ingestão do ácido linoléico e do ácido araquidônico é muito maior do que a quantidade necessária para humanos. A razão de $\omega 6/\omega 3$ de suprimentos animais e vegetais foi aproximadamente 1, durante o período de evolução, quando o perfil genético foi programado em resposta a estas influências dietéticas (LEAF, WEBER, 1987). De fato, o *Homo sapiens* tem seu aparecimento por volta de 40.000 anos atrás e a constituição genética humana tem permanecido relativamente a mesma. Apesar de a agricultura produzir modificações na dieta aproximadamente 10.000 anos atrás, advenços recentes, a Revolução Industrial, por exemplo, contribuíram, particularmente nos últimos 150 anos, para a ocorrência de substituições da gordura total e de vários ácidos graxos (figura 3). Esta rápida troca é caracterizada pelo aumento no consumo da gordura saturada de suprimentos animais e ácidos graxos *trans* da hidrogenação de óleos vegetais, ocasionando um acréscimo de $\omega 6$ e uma diminuição de $\omega 3$, desbalanceando, à razão de aproximadamente 1 para 20-25/1. A ingestão ótima de 18:3 $\omega 3$ é estimada em 800 a 1100 mg/d e de EPA e de DHA, 300 a 400 mg/d (GALLI e SIMOPOULOS, 1989, SIMOPOULOS, 1996).

FIGURA 3 - Esquema relativo dos diferentes percentuais de ácidos graxos e as possíveis trocas no processo da indústria alimentícia, envolvendo a engorda dos animais e a hidrogenação dos ácidos graxos (LEAF e WEBER, 1987).

A discussão acerca da quantidade dietética dos ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa está presente em grandes centros de pesquisas sobre nutrição e alimentação. Há fatos que reforçam essa

discussão, ou seja, é sabido que na dieta do Ocidente, já citada anteriormente, consome-se 20 a 25 vezes mais lípidos da série $\omega 6$, do que $\omega 3$ (SIMOPOULOS, 1991). Esta abundância é justificada pela presença do ácido linoléico em grandes concentrações na soja, no milho, no açafrão e no girassol. Em contraste, há baixa ingestão do seu homólogo, o ácido α -linolênico (**figura 3**), presente em vegetais verdes, canola e linhaça como, também, em óleo de peixe. A concentração desta ingestão acarreta na formação de eicosanóides, principalmente prostaglandinas de séries distintas, decorrentes ora da conversão do ácido linoléico ao ácido araquidônico, ora do ácido α -linolênico ao ácido eicosapentaenóico. Por outro lado, existe o ácido oléico, ácido graxo não essencial, que também é consumido em quantidades substanciais na dieta ocidental. A partir deste ácido graxo forma-se o ácido eicosatrienóico, por meio de enzimas de dessaturação e alongamento (**figura 4**), que podem competir com os ácidos graxos linoléico e α -linolênico.

Designação lipídica	n9	n6	n3
ácidos graxos 18 carbonos	ácido oléico	ácido linoléico	ácido linolênico
		Ácidos graxos essenciais	
Fonte dietética	azeite de oliva, carne	soja, milho, açafrão, girassol	canola, óleo de peixe
Absorção dietética	alta absorção (8-15% de energia dietética)	alta absorção (7-8% de energia dietética)	baixa absorção (0.3-0.4% de energia dietética)
	↓	↓	↓
ácidos graxos 20 carbonos	ácido eicosatrienóico	ácido araquidônico	ácido eicosapentaenóico
FONTES	sintetizado do ácido oléico	sintetizado do ácido linoléico, e em pequenas quantidades de carnes	sintetizado do ácido linolênico ou de óleo de peixe
conteúdo dos leucócitos (ácidos graxos totais)	0.1%	10-16%	0.1-0.3%

FIGURA 4 - Ácidos graxos dietéticos e seu destino metabólico após a ingestão (JAMES, 2000)

3.3. Eicosanóides

Os ácidos graxos $\omega 3$ e $\omega 6$ competem entre si pelas enzimas $\Delta 5$ e $\Delta 6$ dessaturases. Há inclusive um aumento na competição nos níveis de ácido araquidônico e metabólitos do EPA. Ambos os precursores destas substâncias consistem de 20 átomos de carbono e são conhecidos como eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos) (**figura 4**). O AA é o precursor das duas séries de prostanóides (prostaglandinas e tromboxanas) e de 4 séries de leucotrienos, onde o EPA e o DHA são precursores dos prostanóides da série 3 e leucotrienos da série 5. Há plena evidência indicando que o consumo de ácidos graxos essenciais tem um efeito significativo na produção e distribuição de prostanóides e leucotrienos (WILLIS, 1981; SIMOPOULOS, 1996; JAMES, 2000).

Em 1978, dois conceitos importantes na formação de eicosanóides foram apresentados: (1) MONCADA e VANE mostraram que a parede vascular poderia utilizar endoperóxidos relacionados com a aderência de plaquetas para a formação de prostaciclina; e, (2) DYERBERG e col propuseram que apenas o EPA de peixe ou óleo de peixe poderia, por meio da formação de análogos ativos de prostaciclina, PGI_3 , mais tromboxanos, TXA_3 , produzir um estado antitrombótico e agir como protetor contra as doenças cardiovasculares (SIMOPOULOS, 1996).

Prostaglandinas derivadas de EPA têm propriedades biológicas diferentes daquelas derivadas do ácido araquidônico. Quando humanos ingerem peixe ou óleo de peixe, particularmente ricos em EPA e DHA, podem substituir os ácidos graxos $\omega 6$ (especialmente AA) nas membranas de todas as células, modificando especialmente as membranas de eritrócitos, plaquetas, neutrófilos, monócitos e células do fígado. Além do mais, a ingestão de EPA e DHA de peixe e de óleo de peixe leva a estados fisiológicos caracterizados pela produção de prostanóides e leucotrienos que possuem propriedades antitrombóticas, antiagregantes, antivasoconstritoras e antiinflamatórias. Isto evidencia que ácidos graxos $\omega 3$ podem afetar um número

de doenças crônicas pela ação de seus eicosanóides (SIMOPOULOS, 1991).

Embora muitas das investigações do fornecimento de EPA envolvessem pesquisas sobre o metabolismo dos eicosanóides, outros aspectos relacionando sua participação em processos metabólicos têm sido evidenciados. Estudos indicam que a classe de fosfolípides e composição de ácidos graxos e conteúdo de colesterol de biomembranas são determinantes críticos que influenciam uma grande variedade de funções dependentes da membrana, tais como: atividade integral de enzimas, transporte de membranas e funções de receptores. Como o EPA tem a capacidade de alterar a composição lipídica e o metabolismo das membranas, inclusive quando ocorre a supressão do mesmo, sua importância na dieta está correlacionada diretamente com o crescimento e o metabolismo, ou seja, o ciclo de vida (SIMOPOULOS e SALEM, 1986).

Tanto nos lípides celulares como nos plasmáticos, a manipulação dietética de EPA fornece interações complexas e as manifestações no perfil dos ácidos graxos $\omega 3$ e $\omega 6$. Ácidos graxos dietéticos induzem a ativação celular, a geração de fosfato de inositol, regulando processos-chaves nas funções celulares. Nutrientes, como hormônios, influenciam e controlam a expressão gênica. O consumo de ácidos graxos $\omega 3$ de óleo do peixe *menhaden* têm sido apontado para reduzir a atividade da enzima sintetase no fígado por diminuição da síntese do RNAm de ácidos graxos (CLARKE e AMSTRONG, 1986; SIMOPOULOS, 1996). Embora, os mecanismos pelos quais ácidos graxos $\omega 3$ produzem efeitos que levam à hipolipidemia, assim como efeitos antiateromatoso, antitrombótico, antiinflamatório e antitumoral, não são claramente conhecidos.

Ao longo dos últimos 10 anos, grandes progressos têm ocorrido devido aos avanços metodológicos no interesse e, na elaboração, de dietas preventivas e/ou profiláticas para doenças crônicas. Estudos revelam que

ácidos graxos $\omega 3$ são essenciais para o desenvolvimento normal de crianças prematuras e possivelmente para crianças a termo (JAMES e col, 2000).

O processo inflamatório é caracterizado, sintomatologicamente, por dor, rubor, calor e inchaço; desordens ou inflamação excessiva também acarretam perda da função (ROBBINS, 1986). Esta patologia clínica resulta da liberação de mediadores, predominantemente dos leucócitos ativados, que migram para a área afetada. Dentre os mediadores-chaves estão os eicosanóides, prostaglandinas E_2 (PGE_2) e leucotrienos B_4 , os quais são derivados de ácidos graxos polinsaturados $\omega 6$ e AA ($C_{20:4} \omega 6$) (HENDERSON e col, 1987). Também importantes são as citocinas, as interleucinas 1β ($1L-1\beta$) e o fator de necrose tumoral na etiopatologia da artrite reumatóide (ARENDE e DAYER, 1995; ELLIOT e col, 1994; JAMES e col, 2000).

Prostaglandinas são substâncias que desempenham atividade hormonal e estão envolvidas em várias áreas da fisiologia e da patologia, tais como: reprodução, inflamação, equilíbrio da pressão arterial e agregação plaquetária. Este último aspecto é de maior interesse à bioquímica clínica devido à sua ligação com a aterogênese (VIOLA, 1997).

As prostaglandinas são derivadas de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia de comprimento C_{20} , pertencendo às séries $\omega 3$ e $\omega 6$, mas não à série $\omega 9$. Podem ter uma, duas ou três duplas ligações (monoenólica, dienólica, trienólica). Sua estrutura pode variar, e como resultado desta variação, possuem atividades biológicas diferentes, por vezes em oposição (**figura 5**).

As dieno prostaglandinas, derivadas do AA ($20:4 \omega 6$), são raras na natureza, enquanto que as trieno prostaglandinas, sintetizadas a partir do ácido eicosapentaenólico ($20:5 \omega 3$), são proporcionais à quantidade de ácido graxos $\omega 3$ na alimentação.

FIGURA 5 - Síntese de monoeno e dieno (A) e trieno prostaglandinas (B) (VIOLA, 1997).

Um aumento na formação de trieno prostaglandina pode ser considerado favorável, já que levaria a um melhor perfil de lípides (menos triglicérides plasmáticos e mais HDL) e, acima de tudo, a uma redução da agregação das plaquetas. Isto pode ser obtido pelo consumo de alimentos como o peixe, que contém $\omega 3$ ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, além da ingestão de ácido α -linolênico. Pesquisas experimentais (GIRON e col, 1989), por sua vez, demonstraram uma melhor formação de trieno prostaglandina com a administração de azeite de oliva do que com o óleo de girassol.

Muitos anti-inflamatórios farmacocinéticos são diretos na inibição da produção dos mediadores inflamatórios e, assim, possibilitam a existência de terapias que incorporem $\omega 3$ e $\omega 9$. Contudo, há interação competitiva entre os ácidos graxos das séries $\omega 3$, $\omega 6$ e $\omega 9$ (figura 4). Assim, em qualquer análise dos efeitos dietéticos dos ácidos graxos $\omega 3$ e $\omega 9$, é importante considerar também a presença na dieta dos ácidos graxos $\omega 6$ (JAMES e col, 2000).

3.4. Lipoxigenase e cicloxigenase

Lipoxigenases (LOX) e cicloxigenases (COX) são enzimas envolvidas na síntese de eicosanóides do AA. A oxigenação enzimática do ácido araquidônico ocorre preferencialmente nos carbonos 5, 12 ou 15, sendo catalizados pelas enzimas 5, 12 ou 15 lipoxidases formando seus respectivos hidroperóxidos. Estes hidroperóxidos podem ser metabolizados a leucotrienos, lipoxinas e hepoxilinas. Um outro caminho metabólico é a transformação do AA em prostaglandinas catalizadas, desta vez, pelo endoperóxido sintase. Esta enzima é biofuncional e geralmente, na reação da COX, insere-se duas moléculas de oxigênio dentro da molécula do AA para formar a PGG₂. Assim, oxigênio molecular é requisitado como um outro substrato em ambas as enzimas da oxigenação do AA, a LOX e a COX.

Espécies ativas de oxigênio são comumente geradas como mecanismos de defesa da planta, dentre os quais está a geração de condições enzimáticas e não enzimáticas, e estão presentes para minimizar os efeitos deletérios causados pelas espécies reativas do oxigênio. A superfície de células de plantas (parede celular/interfaceplasmalena) é um sítio importante de reações redox e alguns destes sítios são catalizados pela NADH oxidase e NADH peroxidase, que podem fornecer a geração do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio. Peróxido de hidrogênio pode também agir como um sinal molecular em mecanismos ativados de defesa pela célula da planta contra patógenos (MACRI e col, 1994).

Cerca de 4,4% do peso seco de sementes de cevada consistem de lípidos, os quais são armazenados, principalmente, em corpos lipídicos do embrião e na camada de aleuroma. No embrião, os ácidos graxos liberados por hidrólise podem ser metabolizados via LOX. A primeira enzima deste caminho, a LOX, catalisa a peroxidação de ácidos graxos polinsaturados para hidroperóxidos correspondentes. Esta reação pode ser convertida dentro de uma variedade de metabólitos secundários, incluindo alguns

compostos que participam no processo de envelhecimento e no sabor; como também, na fabricação de cervejas (DODERER e col, 1992).

Lipoxigenases são um grupo de enzimas, largamente distribuídas em plantas, que catalizam a reação estereoespecífica de oxigenação do dióxido de oxigênio em ácidos graxos polinsaturados, contendo sistemas pentadienos (*cis*) para formar hidroxiperoxídios conjugados (FORNAROLI e col, 1999). O conhecimento fisiológico de LOX de plantas é ainda escasso, embora estas enzimas pareçam estar envolvidas na biossíntese de moléculas reguladoras, como o ácido jasmônico e o ácido traumático (HAMBERG e GARDNER, 1992; SEMBUDNER e PARTIER, 1993, FORNAROLI e col, 1999). As enzimas animais utilizam o AA como substrato preferencial, enquanto que as enzimas das plantas utilizam, preferencialmente, os ácidos linoléico e α -linolênico, no entanto o caminho metabólico da LOX é semelhante tanto para os animais como para as plantas (MACRI e col, 1994).

As LOX catalizam a incorporação do oxigênio em ácidos graxos polinsaturados para produzir hidroperóxidos e possuem uma forma não usual do átomo de ferro não heme em suas estruturas. A forma ativa da LOX contém o íon ferro no seu estado férrico (FUNK e col, 1990; HSU e PAN, 1996). Em animais aquáticos, a atividade da LOX foi identificada em corais (BUNDY e col, 1986, HSU e PAN, 1996), na pele e guelras de trutas (HISEH e col, 1988; GERMAN e CREVERLING, 1990; HSU e PAN, 1996), na sardinha (HSU e PAN, 1996), em mexilhão, em ovos de estrela-do-mar e em hemolinfa de camarão (KUO e PAN, 1992; KUO e col, 1994, HSU e PAN, 1996).

A reação primária dos produtos, tendo o ácido linoléico como substrato, é algumas vezes dependente das condições de reação e da fonte das enzimas que resulta nos produtos: ácido 13- hidroperóxido-(9Z,11E)-octadeca-9-11-dienóico (13ZE-HPODE), ácido 13-hidroperóxido-(9E,11E)-octadeca-9,11-dienóico (13EE-HPODE), ácido 9-hidroperóxido-(10E,12E)-

octadeca-10-12-dienóico (9EE-HPODE) (WHITAKER, 1991; GARDNER, 1991; WU e ROBINSON, 1995). Estes HPODEs (fonte das enzimas) podem ser prontamente reduzidos, também, por LOX ou por proteínas associadas ou contendo-as, para seus correspondente de ácidos graxos hidroxí (WU e ROBINSON, 1995). Neste caso, os 13ZE, 13EE, 9EZ e 9EE, ácidos hidroxi-octadecadienóicos (HODEs) podem ser formados. Além do mais, compostos carbonil têm sido detectados em várias condições de reações com LOX de soja e ervilha (WU e ROBINSON, 1995).

Ácidos graxos ceto e hidroxí são produtos secundários, e podem ser sintetizados simultaneamente no curso da oxidação primária do substrato e, suas separações de hidroperóxidos são especialmente importantes para ensaios de produtos de reações primárias e secundárias (WU e ROBINSON, 1995).

A importância dessas LOXs de membrana pode estar relacionada com sua capacidade de atuar mais intensamente nas membranas lipídicas do que as outras LOXs solúveis. FORNAROLI e col (1999) isolaram a LOX alcalina do cotilédone de membranas plasmáticas de soja e determinaram suas características bioquímicas, servindo como parâmetro metodológico para isolamento de outras LOXs.

A COX é uma enzima limitante, envolvida na síntese de prostanóides do ácido araquidônico. Prostanóides têm sido demonstrados como importantes mediadores lipídicos, não somente em níveis periféricos, mas também no cérebro, onde parecem modular a transmissão sináptica (WILLIAMS, 1997; FATTORE, 2000).

O caminho metabólico da COX pode modular a neurotransmissão do ácido γ -butírico (GABA) e da dopamina em nível de sistema nervoso central (ONO e col, 1992; VAUGHAN, 1997 e col; ROSS, 1999 e col; MELIS, 2000; FATTORE e col, 2000). Em particular, o bloqueio de COX tem sido evidenciado como um potente inibidor opióide da transmissão sináptica do GABA (VAUGHAN, 1997), onde inibidores de COX, tais como o ácido acetil

salicílico, indometacina e piroxicam, inibiram catalepsia induzida por inibidores de receptores de dopamina.

Dentro desta perspectiva de utilização de inibidores naturais de enzimas da biossíntese dos eicosanóides, como LOX e COX, pesquisas na área de respostas inflamatórias, principalmente, têm se direcionado para a identificação de substâncias com capacidade inibitória semelhante aos inibidores convencionalmente utilizados, como indometacina, buscando assim, minimizar seus efeitos colaterais na prática clínica.

3.5. Antioxidantes

Antioxidantes são compostos naturais ou sintéticos que apresentam a propriedade de inibir a oxidação de qualquer substância oxidável (ABDALLA, 1993).

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: os com atividade enzimática e os sem atividade. Na primeira, estão os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio. Na segunda classe, estão moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação. Nesta classificação, incluem os antioxidantes naturais e os sintéticos, como os compostos fenólicos.

A adição de antioxidantes em gorduras, óleos e alimentos contendo gorduras é justificável por vários motivos. Primeiro, antioxidantes podem elevar a vida-de-prateleira dos alimentos de 15 a 200% (BRANEN, 1975; DUVE e WHITE, 1991), como conferir maior estabilidade no transporte e aumento no tempo de armazenamento. Segundo, a adição de antioxidantes pode “poupar” ácidos graxos essenciais, carotenóides, vitamina A e biotina, da degradação autoxidativa. Autoxidação de ácidos graxos polinsaturados não somente leva à perda do valor nutricional dos alimentos, como também está associada com danos de membrana, envelhecimento, doenças coronarianas e câncer em organismos vivos (DUVE e WHITE, 1991). E por

fim, na indústria alimentícia, antioxidantes sintéticos são freqüentemente usados por serem suficientes e menos caros do que os antioxidantes naturais. Contudo, consumidores concordam que aditivos químicos precisam ser diminuídos e pesquisadores têm investido em pesquisas de métodos eficientes para obtenção de extratos naturais com atividade antioxidante.

Muita atenção tem sido dada à pesquisa do envolvimento de espécies reativas do oxigênio e de radicais livres em doenças e no envelhecimento. Em particular, cada espécie reativa do oxigênio, tais como o peróxido de hidrogênio, o radical superóxido, oxigênio *singlet* e o radical hidroxil, tem sido proposta como agente de ataque aos ácidos graxos polinsaturados em membranas de células. Como resultado da peroxidação lipídica pode ocorrer dano oxidativo nas células vivas, possibilitando o envelhecimento precoce, o desenvolvimento de câncer e os processos ateroscleróticos. Sistemas *in vivo* são protegidos de espécies reativas ao oxigênio, por enzimas, tais como: a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase e a catalase, e eles também recebem proteção não enzimática, por antioxidantes, como o α -tocoferol, o ácido ascórbico, o β -caroteno, o ácido úrico e os compostos fenólicos de especiarias (OYA e col, 1997).

Pesquisas vêm sendo direcionadas para o efeito dos antioxidantes naturais na inibição da biossíntese de eicosanóides com a finalidade de uma resposta fisiológica. SCHUBERT e col (1999) verificaram que extratos do óleo de semente de romã, rica em flavonóides, foram capazes de inibir significativamente a atividade da COX e LOX. Guaiacol e eugenol, compostos fenólicos presentes em medicamentos dentários, apresentaram alta atividade inibitória da lipoxigenase, melhorando a resposta inflamatória em ratos experimentais (DOHI e col, 1991). Outros estudos com azeite de oliva virgem verificaram que compostos fenólicos presentes (oleuropeína, ácido caféico, tirosol e hidroxitirosol) foram capazes de inibir a 5-lipoxigenase de leucócitos de ratos. Este resultado é sustentado por trabalho anterior que verificou a inibição por flavonóides da lipoxigenase e a cicloxigenase (MORONEY, 1988).

Antioxidantes dietéticos podem ser efetivos na proteção ao dano oxidativo em sistemas *in vivo*, e muitos antioxidantes têm sido encontrados em ervas e especiarias. A atividade antioxidante de muitas especiarias, seqüestradoras de radicais livres, foi determinada pela formação de malonaldeído (MDA) da 2-deoxirribose e pela hidroxilação de benzoato com a reação de *Fenton* (OYA e col, 1997).

A glicação avançada em tecidos de pacientes diabéticos, geralmente, forma alguns produtos finais, por exemplo, PFGA – produtos finais de glicação avançada, através dos compostos de *Amadori*, de proteínas e da glicose. PFGA são postulados como sendo marcadores da reação de *Maillard* no sistema biológico. Algumas espécies radicalares, incluindo oxigênio, participam desses processos. Muitos trabalhos têm, recentemente, sugerido que a reação de *Maillard* desempenha um papel importante em doenças crônico-degenerativas, como o diabetes e envelhecimento. A formação de PFGA tem sido observada *in vivo* em várias proteínas ao longo da vida, como as do cristalino e do colágeno. Em particular, pentosidina tem sido encontrada em vários tecidos afetados por Diabetes Mellitus (OYA e col, 1997).

3.6. Especiarias

Ao longo de centenas de anos, ervas e especiarias têm participado significativamente na manutenção da saúde humana, melhorando a qualidade de vida e têm servido aos homens com suas diferentes propriedades, agindo como temperos, bebidas, cosméticos, tinturas e medicamentos. A Organização Mundial de Saúde estimou que aproximadamente 80% dos habitantes da Terra confiam na medicina tradicional para seus cuidados de saúde primários, ou seja, muitas das terapias utilizadas envolvem o uso de extratos de plantas ou seus componentes ativos (CRAIG, 1999).

Certas especiarias e extratos de especiarias contêm componentes com atividade antioxidante. Este fato é justificada da aplicação destas em

diferentes preparações culinárias para intensificar as características organolépticas, daí aumentando a aceitabilidade e, principalmente, melhorar a estabilidade oxidativa (MADSEN e col, 1996). Os componentes responsáveis pela estabilidade oxidativa têm sido identificados em várias especiarias, tais como: alecrim, sálvia, tomilho, cravo-da-índia, dentre outras. Estes compostos apresentam essa propriedade antioxidante devido, principalmente, à presença de compostos fenólicos (HERRMANN, 1973; MADSEN e col, 1996).

Com a restrição do uso dos antioxidantes sintéticos em alimentos, tais como: o hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA), terciobutil hidroquinona (TBHQ) e o galato de propila (PG), tem aumentado o interesse na descoberta de substâncias naturais com atividade antioxidante, incluindo as especiarias. E, durante os últimos anos, extratos naturais tem sido aplicados, como antioxidantes, na indústria. A restrição dos antioxidantes sintéticos está correlacionada, principalmente, à possibilidade de exercer efeitos tóxicos (BARLOW, 1990).

Vários estudos com alecrim e sálvia (CHIPAULT e col, 1952; HERRMANN, 1973, MADSEN e col, 1995, CINTRA e MANCINI-FILHO, 2001) têm demonstrado o efeito destas duas especiarias como potente antioxidantes naturais, promovendo grande aplicação de delineamentos experimentais que apontaram o isolamento e identificação de compostos responsáveis pela atividade antioxidante. *Carnosol* e *ácido carnósico* foram, ambos, encontrados no alecrim (WU e col, 1982; MADSEN e col, 1995). Estes compostos têm também sido isolados na sálvia, indicando, assim, uma certa relação botânica entre essas duas especiarias (BRIESKORN e FUNCHS, 1964; MADSEN e col, 1995).

Os efeitos de rosmarifenol e rosmariquinona, compostos fenólicos identificados no alecrim, foram amplamente estudados. A atividade antioxidante destes compostos foi superior ao antioxidante sintético BHA e semelhante ao BHT. A adição de antioxidantes naturais (carnosol, ácido carnósico, rosmanol, epirosmanol e isoromanol) a uma concentração de

0.01% em ambas, banha e emulsão de ácido linoléico, produziram efeitos semelhantes à atividade antioxidante dos sintéticos BHA e BHT, que foram adicionados ao sistema na mesma concentração ou a 0.02%. MOREIRA e MANCINI-FILHO (1999) também encontraram nesta concentração de 0.02%, efeito significativamente superior dos ácidos fenólicos da mostarda, no ensaio de atividade antioxidante em sistema lipídico. Carnosol e ácido carnósico, também, foram bons seqüestradores de radicais peroxil e mais efetivos do que o PG, inibindo a peroxidação de lípidos de membrana (ARUOMA, 1993). A metilação de grupos hidroxil, por sua vez, eliminou o efeito antioxidante, indicando que este mesmo efeito está correlacionado com grupos hidroxil (INATANI e col, 1983).

Cinco compostos fenólicos distintos têm sido isolados do extrato metanólico do orégano, sendo que todos apresentaram atividade antioxidante. Um dos compostos foi identificado como o ácido rosmarínico. Um outro componente, presente no orégano, provoca interesse especial na ciência devido a sua cadeia glicosídica, a qual age em meio aquoso (NAKATANI e KIKUZAKI, 1987). O extrato etanólico do orégano, que tem sido reextraído com éter etílico, apresentou alta atividade antioxidante e os componentes principais isolados da fração foram vários flavonóides (VEKIARI e col, 1993). Eugenol e ácido gálico foram indicados como os responsáveis da atividade antioxidante do cravo-da-índia (KRAMER, 1985). Contudo, o Eugenol possui fortes características organolépticas, como o *flavor* do cravo-da-índia, diminuindo assim, seu interesse como antioxidante. O gengibre também possui características antioxidativas, devido, principalmente, a compostos fenólicos com atividade antioxidante como a curcumina (KIKUZAKI e NAKATANI, 1993).

3.7. Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são antioxidantes primários que agem como seqüestradores de radicais livres e bloqueiam reações em cadeia. São largamente distribuídos na natureza e derivados dos ácidos benzóico e

cinâmico, bem como de flavonóides (PRATT e HUDSON, 1990, SHAHIDI e col, 1994).

Compostos fenólicos ocorrem amplamente como microconstituintes de plantas e há um crescente interesse de estudo dos seus efeitos na qualidade dos alimentos. Dentre outras formas de compostos fenólicos, os ácidos fenólicos livres, ésteres e glicosídeos que contêm um grupo ácido acrílico conjugado com anel aromático, são de característica particular. Estes fenólicos monocíclicos são largamente oxidados, conduzindo à formação de quinonas as quais, mais adiante, reagem para formar polímeros ou ligantes a proteínas e carboidratos. O *o*-dihidroxifenóis, tais como o ácido caféico, são caracteristicamente reativos e, assim, são encontrados, somente em baixas concentrações, em sementes. Contudo, ésteres destes ácidos fenólicos, assim como o ácido clorogênico, ocorrem vastamente em tecidos de plantas e representam de 3 a 4% da farinha desengordurada do girassol (DABROWSKI e SOSULSKI, 1984).

Glicosídeos de ácido sináptico (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico) encontram-se também presentes em alimentos tipo *Brassica*. Estes ésteres do ácido sináptico são responsáveis pela forte adstringência e amargor de farinhas desengorduradas e de concentrados protéicos (DABROWSKI e SOSULSKI, 1984).

Compostos fenólicos simples, usualmente, não se ligam extensivamente com proteínas, como com taninos poliméricos, e há poucos trabalhos que relatem com segurança os efeitos antinutricionais dos ácidos fenólicos na utilização de proteínas. Muitos destes trabalhos citam que a redução do aminoácido lisina durante a extração foi devida à presença de açúcares redutores ou quinonas (DABROWSKI e SOSULSKI, 1984).

A baixa estabilidade oxidativa dos lípides, que pode ser medida pela adição de antioxidantes, é importante para manutenção da saúde, como também, por fatores econômicos. A susceptibilidade de sistemas lipídicos a processos oxidativos depende, sobretudo, da força da ligação C-H contra o

ataque do oxigênio e/ou radicais peroxi (MARINOVA e YANISLIEVA, 1994). A capacidade dos antioxidantes inibirem a oxidação lipídica pode também ser afetada pela ligação com ácidos graxos em triglicerídeos (MARINOVA e YANISHLIEVA, 1994). A introdução de um inibidor dentro de um sistema oxidativo leva a uma troca no mecanismo do processo e, como resultado, o processo cinético. O efeito do antioxidante depende da sua participação e dos radicais formados no final de um série de reações (MARINOVA e YANISHLIEVA, 1994):

FIGURA 6 – Etapas da oxidação lipídica

O efeito estabilizante dos antioxidantes tem sido investigado freqüentemente em gorduras e óleos essenciais. O término da oxidação contém uma série de microcomponentes, tais como antioxidantes, ácidos graxos livres, acilgliceróis parciais, esteróis, álcoois, pigmentos, metais e produtos de autooxidação primária e secundária. O resultado de numerosos estudos tem demonstrado que estes componentes podem participar e contribuir para processos de autooxidação e afetam a ação inibitória do antioxidante adicionado. Por este motivo, os dados avaliados na literatura referente ao efeito estabilizante de um antioxidante específico nas mesmas

gorduras e óleos são freqüentemente diferentes (MARINOVA e YANISHLIEVA, 1994).

Derivados hidroxí dos ácidos benzóico e cinâmico, os quais são difundidos no reino vegetal, possuem propriedades inibitórias através da autoxidação lipídica. Derivados dihidroxí são mais eficientes do que derivados monohidroxí. Os derivados do ácido cinâmico são mais eficientes do que os do ácido benzóico. E, a presença de um ou dois grupos hidroxí, na posição *orto* e/ou *para*, aumenta o efeito antioxidante (MARINOVA e YANISHLIEVA, 1994).

Muitos óleos de sementes contêm fenólicos que retardam a oxidação de sementes nativas bem como no óleo extraído e podem agir como antioxidantes primários, sinergistas e quelantes de metais (PRATT e HUDSON, 1990). Extratos metanólicos de mostarda branca foram capazes de retardar o processo oxidativo de carnes (SHAHIDI e col, 1992). MOREIRA e MANCINI-FILHO (1998) verificaram que tanto o extrato aquoso, como as frações purificadas, ricas em ácidos fenólicos na farinha de sementes de mostarda, foram capazes de retardar, significativamente, o processo oxidativo do óleo de soja, através de testes de MDA, peróxidos e formação de dienos conjugados. Dos ácidos fenólicos presentes na mostarda, estes autores observaram que um dos ácidos presentes em maior concentração foi o ácido *p*-hidroxibenzóico, seguido do ácido sináptico e seus derivados. Muitos dos ácidos fenólicos presentes na farinha desengordurada de mostarda apresentam-se nas frações livre e esterificadas (SHAHIDI e col, 1994, MOREIRA e MANCINI-FILHO, 1998).

Outro aspecto relacionado com a utilização de compostos fenólicos é sua aplicação na clínica médica, devido à característica inibitória sobre enzimas da biossíntese dos eicosanóides, que podem influenciar na resposta anti-inflamatória. Os flavonóides representam uma importante classe de compostos fenólicos, juntamente com os ácidos fenólicos, presentes em plantas e comumente em diversos tipos de alimentos. Estes

compostos também exercem um efeito potencializador em níveis bioquímicos no organismo, principalmente na resposta inflamatória. Esta resposta está relacionada, primordialmente, à provável ação inibitória das substâncias fenólicas sobre a enzima COX em sistemas microssomais. Estes compostos, principalmente glicosídeos de fenólicos, podem inibir não somente a COX, bem como a LOX. Resultados deste tipo é que incentivam pesquisas sobre a investigação do efeito inibitório de substâncias fenólicas sobre enzimas da biossíntese dos eicosanóides.

A resposta antiinflamatória da mostarda foi verificada e comparada com a resposta da capsaicina, em ouvido de ratos, aos quais foram administrados, topicamente, óleo de mostarda (0.5-20.0%/20 μ L por ouvido). A dose-dependente da mostarda aumentou o extravasamento plasmático e a sensibilidade do ouvido estendeu-se por 30 minutos, pela aplicação do óleo da mostarda. Este estudo verificou, também, que o óleo de mostarda induz uma resposta anti-inflamatória diferente do controle capsaicina (INOUE e col, 1997). Estudos mais recentes, de resposta inflamatória, com óleo de mostarda, corroboram esses resultados (HAAS e col, 1992; YU e col, 1995, 1996; FIORENTINO e col, 1999; ZLOTOGORSKI e col, 1997; CHILCOTT e col, 2000).

Drogas antiinflamatórias não-esteroidiais, como aspirina, são utilizadas na prática farmacoterápica mundialmente. Esta droga inibe prontamente a COX e suas isoformas (COX 1 e COX 2). Estudos evidenciaram que manipulações químicas e mecânicas em tecido aórtico de coelhos resultaram na formação de prostaglandinas. Este processo foi prevenido pela aspirina. Utilizando homogenato de células, eles demonstraram que a aspirina, o ácido salicílico e a indometacina bloquearam a formação de prostaglandinas. Tais achados contribuíram para o efeito antiinflamatório e antitrombótico destas substâncias, embasando novas pesquisas para tais achados (PIPER e VANE, 1969; BJORKMAN, 1998; DECKER, 1997, DECKER, 1998).

Além destas substâncias farmacologicamente pesquisadas, têm-se estudado a eficácia de compostos fenólicos na inibição das enzimas COX e LOX como efeito antiinflamatório. Especiarias são ricas em compostos fenólicos potencialmente ativos e com comprovada atividade antioxidante. Foi demonstrado que Resveratrol, uma lignina, (JOHNSON e MADDIPATI, 1998) pode ser um anticarcinógeno que inibe seletivamente a PGHS1, como também um potente ativador da PGHS2. Além destas características, este composto também é um sensível facilitador da oxidação de outras substâncias fenólicas que podem contribuir para o efeito antiinflamatório.

Dentre a importância antioxidante dos compostos fenólicos para estudos *in vitro* e *in vivo* e mediante a implicação destas substâncias como inibidores de enzimas de substâncias de resposta inflamatória (eicosanóides), questiona-se como estas substâncias fenólicas, presentes em alimentos normalmente consumidos (especiarias), atuam no metabolismo de ácidos graxos das séries $\omega 3$ e $\omega 6$, que são substratos ativos na formação de eicosanóides, como as prostaglandinas e os leucotrienos. Diante disso, infere-se a hipótese que compostos fenólicos presentes em especiarias podem agir no metabolismo de ácidos graxos polinsaturados, inibindo as enzimas da biossíntese dos eicosanóides (LOX e COX).

Material e Métodos

4. Material e Métodos

4.1. Material

4.1.1. Amostras

As amostras de mostarda, canela e erva doce foram adquiridas no comércio local da cidade de São Paulo. As amostras foram trituradas e armazenadas em fracos âmbar para futuras análises.

4.2. Métodos

4.2.1. Preparação das farinhas

Sementes de mostarda e soja foram trituradas em *mixer* à temperatura ambiente e tamisadas (*Tamis 32 Mesh*). As farinhas das especiarias foram acondicionadas em fracos âmbar e mantidas à temperatura ambiente (20-25°C).

4.2.2. Preparação dos extratos

Extratos etéreo, alcoólico e aquoso das especiarias mostarda, canela e erva doce foram obtidos através do processo de extração sequencial (**esquema 1**).

Para obtenção dos extratos foram adicionados 100 mL de éter etílico a 20 gramas da farinha de cada amostra. As soluções foram agitadas em um homogeneizador por 1 hora à temperatura ambiente. Após este período, as suspensões foram filtradas em funil de *Büchner*, e o volume foi completado para 100mL com éter etílico. Os resíduos foram recuperados, secando-se em estufa a 60°C, e as perdas foram pesadas e calculadas para a obtenção dos demais extratos com álcool etílico e água destilada. O mesmo procedimento foi seguido para a obtenção dos demais extratos.

ESQUEMA 1 - Extração sequencial

4.2.2.1. Obtenção do chá das especiarias

Misturas de antioxidantes são realizadas para se obter o efeito sinérgico entre os componentes, aumentando a estabilidade das substâncias antioxidantes frente a processos oxidativos.

Depois de obtida a farinha de cada especiaria, foi elaborada uma mistura teste das 3 especiarias (na proporção de 1:1:1), para ser trabalhada, na obtenção de extratos e frações fenólicas.

4.2.3. Preparação das frações de ácidos fenólicos das especiarias

Para a identificação dos ácidos fenólicos livres, ésteres solúveis e ligantes insolúveis de ácidos fenólicos por cromatografia a gás, seguiu-se a

técnica de KRYGIER e SOSULSKI (1982), com algumas modificações (MOREIRA, 1998, 2003) (**esquema 2**).

ESQUEMA 2 - 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 - tetrahydrofurano, 1:1:1).

4.2.3.1. Extrato de ácidos fenólicos livres

Um grama de amostra previamente desengordurada de cada especiaria (mostarda, canela e erva doce) foi extraído 6 vezes com porções de 20mL de tetrahydrofurano, homogeneização por 3 minutos em vortex e centrifugação por 10 minutos a 10.000rpm. Os sobrenadantes das 6 extrações foram filtrados e desidratados através de sulfato de sódio anidro.

As frações resultantes dos filtrados foram evaporadas em rotaevaporador, sob vácuo, à temperatura de 40°C e ressuspensas em 5mL de tetrahidrofurano. Os extratos contendo as frações de ácidos fenólicos livres foram, então, armazenados sob refrigeração em atmosfera de nitrogênio para posteriores análises cromatográfica e da atividade antioxidante.

4.2.3.2. Extrato de ácidos fenólicos solúveis

Os resíduos provenientes das extrações dos ácidos fenólicos livres foram submetidos a novos processos de extrações. Os fenólicos solúveis de cada especiaria foram extraídos 6 vezes com 20mL de solução metanol-acetona-água (7:7:6). As amostras foram homogeneizadas por 3 minutos e em seguida centrifugadas (como descrito para a fração livre dos ácidos fenólicos). No final da extração, os sobrenadantes foram evaporados, sob vácuo, à temperatura de 40°C, até a fase aquosa. Para liberação dos ésteres solúveis, que se encontram esterificados com proteínas ou polipeptídeos, foram adicionados iguais volumes de hidróxido de sódio 4N. Após 3 horas de hidrólise, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, os pHs foram corrigidos para 2, com HCl 6N, seguidos de centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para funis de separação e extraídos com igual volume de hexano (1:1), para eliminação dos ácidos graxos livres e outros contaminantes, e para extrações 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. As frações extraídas foram filtradas e desidratadas com sulfato de sódio anidro, evaporadas em rotaevaporador a 40°C e ressuspensas 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 para ácidos fenólicos livres.

4.2.3.3. Extrato de ácidos fenólicos insolúveis

Os resíduos das extrações dos fenólicos solúveis foram hidrolisados diretamente em 25mL de NaOH 4N, durante 3 horas, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os extratos contendo os ésteres insolúveis de ácidos fenólicos tiveram seus pHs corrigidos para 2, com HCl 6N, seguidos de centrifugação a 10.000rpm por 10 minutos. A partir dessa fase, seguiu-se o mesmo procedimento dos filtrados para os ésteres solúveis dos ácidos fenólicos da farinha de semente de mostarda (item 4.2.3.2).

4.2.4. Preparação da ração animal

Para o preparo das rações foram utilizados óleos comerciais, caseinato de cálcio (98% de proteína) e ração padrão para roedores.

As rações foram preparadas segundo GUIMARÃES e col (1990). Após o preparo da base da ração, esta foi colocada em uma laxadeira industrial, sendo acrescentado: ora óleo de soja sem antioxidante, ora óleo de peixe sem antioxidante, de acordo com os grupos experimentais. Foram adicionados, ainda, caseinato de cálcio e água. Depois, todos os ingredientes foram homogeneizados mecanicamente na laxadeira e colocados no granulador para formar os *peletes*, de modo que todas as rações tivessem a mesma forma e fossem adequadas ao consumo dos animais. A ração peletizada foi levada a uma estufa ventilada, à temperatura de 60°C.

4.2.4.1. Rações experimentais

4.2.4.1.1. Polinsaturada ω 3

Adicionou-se óleo de peixe e caseinato de cálcio à ração padrão comercial para roedores (NUVILAB CR-1). A composição química pode ser vista na **tabela 9**.

4.2.4.1.2. Polinsaturada $\omega 6$

Adicionou-se óleo de soja e caseinato de cálcio à ração padrão comercial para roedores (NUVILAB CR-1). A composição química pode ser vista na tabela 9.

4.2.4.2. Composição centesimal das rações

4.2.4.2.1. Determinação de umidade

Foi baseada na determinação da perda de peso da amostra submetida a aquecimento em estufa a 105°C (AOAC, 1980).

4.2.4.2.2. Determinação de cinzas

Fundamentou-se na determinação da perda de peso do material que resta na amostra dessecada, após destruição da matéria orgânica em altas temperaturas (550°C) (AOAC, 1980).

4.2.4.2.3. Determinação de lípidos

Foi baseada na determinação da perda de peso do material extraído, por meio da mistura éter de petróleo (1:1), a partir de uma amostra dessecada, seguida da remoção por evaporação do solvente empregado (AOAC, 1980).

4.2.4.2.4. Determinação de proteína

Para a determinação de proteína foi utilizado o método de *Micro-Kjeldahl*, que avalia a quantidade de nitrogênio total presente no alimento e, para a obtenção do valor protéico do produto em análise, multiplicou-se o valor do nitrogênio total pelo fator 6,25.

A base do processo de *Micro-Kjeldahl* consiste em deslocar-se o nitrogênio presente na amostra, transformando-o em sulfato de amônio por meio de H_2SO_4 e, desse sal obtido, deslocou-se o nitrogênio na forma de

amônia, recebendo-a em solução de ácido bórico. Por titulação com HCl 0,02N, determina-se a quantidade de nitrogênio presente na amostra, segundo AOAC (1980).

4.2.4.2.5. Determinação da fração *Nifext*

Corresponde ao extrato livre de nitrogênio (nitrogen free extract), estando também excluída a fração lipídica. Engloba compostos diversos tais como: fécula de amido, açúcares, resinas, ácidos orgânicos e fibras.

4.2.5. Ensaio biológico

4.2.5.1. Animais

Ratos *Wistar* machos, recém desmamados, pesando entre 50-60g, foram obtidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, São Paulo. Os animais foram mantidos em uma sala à temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em um ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais foram divididos em 4 grupos de 10 animais. Dois grupos receberam dieta cuja fonte lipídica foi $\omega 3$ e os outros dois grupos, dieta cuja fonte lipídica foi $\omega 6$. Um grupo $\omega 3$ e outro $\omega 6$ foram suplementados com os extratos das especiarias e os outros dois, com solução placebo.

Os grupos foram divididos de acordo com a dieta que receberam. Foi chamado de grupo $\omega 3\text{-C}$ o grupo que recebeu dieta rica em óleo de peixe ($\omega 3$), sem antioxidante, e uma quantidade de uma solução de glicose baseada na concentração de açúcares presentes na solução teste (extrato da mistura de especiarias). Foi denominado $\omega 3\text{-E}$ o grupo suplementado com a mesma ração do grupo $\omega 3\text{-C}$ mais o chá da mistura das especiarias (mostarda, canela e erva doce). Já o grupo $\omega 6\text{-C}$ teve o mesmo tratamento do grupo $\omega 3\text{-C}$, diferindo apenas no tipo de gordura oferecida, isto é, de óleo de soja ($\omega 6$). Houve a mesma modificação para o grupo $\omega 6\text{-E}$, em relação ao grupo $\omega 3\text{-E}$, apenas diferindo a fonte lipídica.

Durante um período de 45 dias os animais foram mantidos em gaiolas, com água e ração *ad libitum* e, em horários fixos, foram administrados os extratos e o placebo, por gavagem, aos respectivos grupos.

O extrato administrado aos animais foi obtido da mistura proporcional das especiarias: mostarda, canela e erva doce, na forma de um infuso (chá). A concentração de sólidos foi calculada para obter uma solução de 200ppm em um volume de 200 μ L iniciais, administrados aos ratos *Wistar* recém-desmamados com peso inicial 50g. O volume foi corrigido de acordo com o aumento de peso do animal. Já, a solução *placebo* foi obtida pelo cálculo baseado na concentração de açúcares solúveis presentes no chá, determinada pelo método de DUBOIS e col (1956).

4.2.5.2. Procedimento experimental

Os animais foram monitorados por 45 dias. No tempo zero, após 15, 30 e 45 dias, depois do início do experimento, foram obtidas alíquotas do sangue e fezes dos animais. Do sangue, foi separado o plasma para monitoração da peroxidação lipídica.

Afim de analisar-se, por microscopia eletrônica, a área de absorção, após o final do experimento (final do 45º dia), 24 horas antes do sacrifício, dois animais de cada grupo foram separados para retirada dos intestinos.

Os intestinos delgados dos animais foram coletados e, logo em seguida, retirados três segmentos de 1 cm das porções correspondentes ao duodeno, jejuno e íleo. Estes foram fixados em BOUIN por 24 horas, lavados em água corrente e, em seguida, mantidos em álcool a 70% até os processos de desidratação, diafanização e inclusão. Dos blocos de parafina com as porções dos intestinos foram obtidos cortes de 5 μ m de espessura e corados pela hematoxilina/eosina (HE).

Após o sacrifício, o sangue foi coletado em tubos contendo anticoagulante. O plasma foi obtido por centrifugação a 10.000rpm por 15

minutos a 5°C. Por diferença de densidade, o sobrenadante (plasma) foi recolhido em tubos de 1mL e armazenado em freezer a uma temperatura de -80°C, para prosseguir-se com as análises do perfil de ácidos graxos e atividade antioxidante, por avaliação da peroxidação.

Os tecidos hepático, cardíaco, renal, cerebral e adiposo foram coletados em nitrogênio líquido e as condições de armazenamento e posterior análise de ácidos graxos e atividade antioxidante foram semelhantes às realizadas com o plasma.

As fezes dos animais foram coletadas nos mesmos dias da coleta do sangue, com o objetivo de avaliar a absorção aparente de fenólicos que foi determinada segundo o método espectrofotométrico proposto por SWAIN e HILLIS (1959).

A ingestão da dieta e o peso dos animais foram monitorados durante todo o experimento, para a curva de ganho de peso e crescimento; mas, também, como parâmetro para o cálculo dos extratos das especiarias a serem administradas.

O coeficiente de eficácia alimentar (CEA) foi obtido através da fórmula:

$$CEA = \frac{\text{ganho de peso do animal (g)}}{\text{consumo da ração(g)}}$$

4.2.6. Atividade antioxidante

4.2.6.1. Atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ácido linoléico (sistema aquoso)

A atividade antioxidante foi determinada pelo método *in vitro*, desenvolvido por MARCO (1968) e modificado por MILLER (1971), empregando-se o ácido linoléico, Tween 40 e β -caroteno. Esse sistema foi mantido a 50°C, e medidas espectrofotométricas de absorbância foram

monitoradas em espectrofotômetro *Bausch & Lomb* (modelo Spectronic 20), a 470nm, a cada 15 minutos, durante 2 horas. Diferentes volumes de extratos para as concentrações de 100 e 200 ppm foram adicionados a 5mL de solução de β -caroteno com ácido linoléico: 20 μ L de solução de β -caroteno (20 mg/mL) + 1 mL de clorofórmio, 40 mg de ácido linoléico, 550mg de *Tween* 40, como emulsificante, e foram evaporados através da passagem de nitrogênio. A seguir foram adicionados entre 120 e 150mL de água destilada, tratada com borbulhamento de O_2 durante 30 minutos. A solução inicial foi diluída até apresentar densidade ótica entre 0.6 e 0.7 na absorvância de 470nm. Todas as determinações foram realizadas em repetições até obtenção de coeficiente de variância de 5% e acompanhadas por um controle sem antioxidante e um outro com antioxidante sintético (BHT), nas mesmas proporções das amostras. As porcentagens 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 (**figura 7**). A queda na leitura da densidade ótica das amostras foi correlacionada com o controle e estabeleceu-se a porcentagem de inibição da oxidação, subtraindo-se a porcentagem de oxidação de cada amostra de 100.

Primeiramente, foi verificada a ação antioxidante dos extratos e, depois, o efeito sinérgico da atividade dos extratos somados aos antioxidantes sintéticos.

FIGURA 7 - Modelo para cálculo de porcentagem de inibição da oxidação (PEREIRA, 1996).

4.2.6.2. Atividade antioxidante por condutimetria de compostos voláteis (sistema lipídico)

Para avaliação de ácidos voláteis por condutimetria foi utilizado o aparelho RANCIMAT®, a 110°C com um fluxo de ar de 10 h/L, no qual amostras de 5g de óleo sem antioxidante foram utilizadas como controle negativo. Logo, para o controle positivo foi usado o antioxidante BHT, a 100 e 200ppm, na mesma quantidade de óleo sem antioxidante. Todos os extratos das especiarias mostarda, canela e erva doce, nas mesmas concentrações do controle positivo, foram avaliados de acordo com o princípio da técnica que avalia o período de indução (PI). Este é um parâmetro importante relacionado com a estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. O PI determinado pelo RANCIMAT® avalia a produção de voláteis por meio da condutimetria (SILVA, 1999).

FIGURA 8 – Descrição esquemática do *Rancimat* (Silva, 1999)

4.2.7. Análise cromatográfica

4.2.7.1. Análise do perfil lipídico da ração e tecidos

Inicialmente foi obtida a fração lipídica pelo método de FOLCH e col (1957) e, em seguida, as amostras foram esterificadas pela técnica de HARTMAN e LAGO (1973). As condições cromatográficas seguiram os procedimentos descritos por MOREIRA e MANCINI-FILHO (1999, 2004).

4.2.7.1.1. Obtenção da fração lipídica

Foi utilizado o método de FOLCH e col (1957) para a extração dos lípidos totais. Utilizou-se 1 grama de ração triturada para homogeneização com metanol e clorofórmio (1:2 v/v) durante 7 minutos. Para tecidos e plasma também foram usados 1 grama. Após homogeneização, foi feita filtração sob vácuo em um funil de *Buchner* acoplado a um kitassato. O resíduo retido no filtro foi homogeneizado com metanol e clorofórmio (1:2 v/v) durante 1 minuto.

O filtrado foi recolhido em proveta com tampa esmerilhada, medido o volume e adicionado a este 1/4 do volume medido de KCl 0,88% em H₂O destilada. O material foi agitado manualmente e deixado em repouso por alguns minutos até formarem-se duas fases. Desprezou-se, por aspiração, a fase superior com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*. Adicionou-se à fase inferior uma mistura de metanol e H₂O destilada (1:1 v/v) e, novamente, foi feita a agitação manual. Formaram-se duas fases e a fase superior foi também desprezada por aspiração. Após rotaevaporação com auxílio de um banho-maria (MARCONI®), a uma temperatura de 40°C, a fração lipídica obtida foi ressuspensa em 5mL de clorofórmio, transferida para vidro âmbar sob atmosfera de nitrogênio e armazenada em freezer. A fração lipídica extraída foi utilizada para a preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos, para posterior análise cromatográfica.

4.2.7.1.2. Obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos

Foi usado o método de HARTMAN e LAGO (1973) para preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos. Para a extração dos ésteres de ácidos graxos foi transferido 1mL de fração lipídica, obtida, de acordo com a metodologia descrita anteriormente, para um tubo com tampa esmerilhada. Evaporou-se o solvente à vácuo e à temperatura ambiente. Adicionou-se 2mL de uma solução de NaOH 0,5 N metanólico e foi levado ao banho-maria fervente por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 6mL de mistura para

esterificação e aqueceu-se por mais 3 minutos em banho-maria fervente. Deixou-se esfriar e adicionou-se 5mL de água fria, agitando-se por 1 minuto. Os ésteres metílicos foram extraídos sucessivamente 3 vezes com 2mL de hexano, transferindo-se a fase orgânica (superior) para outro tubo, com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*. A esta fase foram adicionados 5mL de solução de NaHCO_3 saturada. Agitou-se por 1 minuto e transferiu-se a fase orgânica para outro tubo, para posterior evaporação do solvente no rotaevaporador com banho a uma temperatura de aproximadamente 40°C. Os ésteres metílicos obtidos foram ressuspensores em 1mL de hexano. Essa solução foi injetada no cromatógrafo.

4.2.7.1.3. Cromatografia gasosa

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo à gás HP (modelo 6890, com detector de ionização de chama), conectado a um espectro de massa modelo 5972 SP, com parâmetros controlados pelo *software windows NT workstation 4.0*, empregando-se a coluna capilar de sílica fundida, contendo polietileno glicol (Carbowax 30 m) de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. As condições cromatográficas se deram de acordo com a seguinte programação: temperatura da coluna isotérmica a 230°C, temperatura do vaporizador 240°C, gás de arraste, hidrogênio com fluxo de 1mL/min. A identificação dos ácidos graxos das amostras foi feita pela utilização da biblioteca *Niste* do programa *workstation 4.0* com o auxílio dos espectros obtidos por padrões Sigma®.

4.2.7.2. Análise do perfil de compostos fenólicos

As condições cromatográficas seguiram os procedimentos descritos por DABROWSKI e SOSULSKI (1984) com modificações feitas por MOREIRA e MANCINI-FILHO (1999, 2003).

As análises cromatográficas foram feitas em cromatógrafo à gás HP (modelo 6890, com detector de ionização de chama), conectado a um espectro de massa modelo 5972 SP, 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 empregado foi o hidrogênio.

A identificação dos ácidos fenólicos foi realizada com base nos tempos de retenção relativos das amostras baseando-se no padrão interno (heptametildecanoato) e na concentração dos compostos da solução padrão (Sigma) e, ainda, pela confirmação com os espectros de massa obtidos da biblioteca *Phenolic* adquirida no decorrer do procedimento com cadastramento dos padrões, sendo estes incluídos no programa *workstation 4.0*.

4.2.8. Determinação dos fenólicos totais

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

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

4.2.9. Atividade da lipoxigenase e cicloxigenase

4.2.9.1. Atividade da lipoxigenase

A enzima LOX 1B da soja com 112.000 unidades por mg foi adquirida comercialmente da Sigma® e sua atividade foi avaliada pelas condições descritas por SURREY (1964), fundamentadas no método original descrito por BERGSTROM (1946).

Para a realização do ensaio de inibição da enzima utilizou-se um substrato (ácido linoléico), um inibidor com atividade conhecida, descrita pelo autor (DOHI e col, 1991) e os extratos das especiarias como prováveis inibidores. Inicialmente, foi preparado o substrato utilizando-se 0,75mL de *Tween 20*, juntamente com tampão borato pH 9,0 e 0,5mL de ácido linoléico adicionado gota a gota. A mistura foi homogeneizada até obter uma fina emulsão. Em seguida, 1,3mL de NaOH 1N foram adicionados até conseguir uma solução transparente. A esta solução, foram adicionados 90mL de tampão borato, completados com água destilada para 200mL e pH ajustado para 7,0.

Depois do substrato pronto, a reação se deu em temperatura ambiente. Foi adicionado 1mL da enzima correspondente a 12.000 unidades específicas, 19mL de substrato sob fluxo contínuo de O₂ e, após 1 min, acrescentou-se o inibidor (Indometacina - controle positivo) e, em outros meios de reação, outros prováveis inibidores (o extrato administrado aos animais experimentais). Para controle da reação, um tubo contendo apenas o meio de reação (enzima e substrato) foi estabelecido. A cada 5 minutos, 1 mL da amostra foi transferido para tubos de centrifuga contendo 2mL de álcool absoluto e 7mL de etanol a 60% e, em seguida, realizadas leituras ópticas a 234nm, comparando-se com a solução controle. As variáveis do ensaio foram volume, pH, concentração de enzima, substrato e temperatura, otimizadas de acordo com SURREY (1964). Já a concentração de inibidor/enzima nas condições estabelecidas por SCHUBERT e col (1999).

4.2.9.2. Atividade da cicloxigenase

Para medir a atividade da enzima COX o procedimento se deu de acordo com o método descrito no item 4.2.9.1., utilizando-se, porém o ácido araquidônico como substrato.

Para tanto, a enzima foi obtida conforme o seguinte protocolo experimental: 10 vesículas seminais de carneiro foram acrescidas de tampão fosfato 50 mM, pH 7.0 cm EDTA 1 mM e centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi extraído por ultracentrifugação por 1 hora e o sobrenadante final foi coletado em pequenos recipientes e congelados a -80°C até a realização da atividade enzimática (SCHUBERT e col, 1999). O sobrenadante rico em COX teve o conteúdo protéico determinado pela metodologia de BRADFORD (1985), expresso em mg, pela qual alíquotas foram tomadas para a mesma concentração da enzima analisada no item 4.2.9.1.

4.2.10. Análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nos tecidos dos animais experimentais

Para determinação da medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi utilizado o método descrito por WINTERBOURN e col (1985). Foram preparados homogenatos dos diferentes tecidos com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4. Os tecidos foram homogeneizados na proporção de 1:10 (p/v). Após homogeneização, centrifugou-se os homogenatos a 10.000 rpm por 10 minutos em centrífuga *Sorvall Instruments*, modelo RC5C, com a separação em duas fases. Foi tomado 0,3mL do sobrenadante e completado o volume para 0,5 mL com tampão fosfato. Em seguida, adicionou-se HCl 25% (v/v), 45 μL de BHT etanólico 2% e 0,5mL de TBA (1% p/v em NaOH 0,05M) e a solução foi agitada e levada ao banho-maria fervente por 10 minutos, seguido de resfriamento em banho-de-gelo. 1,5 mL de η -butanol foi acrescentado e logo em seguida, agitou-se. Após centrifugação a 4000 rpm, foram coletadas alíquotas da fase superior

para serem analisadas espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 532nm, em comparação a um branco contendo apenas as soluções do ensaio.

Para obtenção dos cálculos foi realizada uma curva padrão com 1,1,3,3-tetramethoxipropano (6×10^{-6} mol/L) e uma curva padrão de proteína com solução padrão de albumina afim dos resultados serem expressos em $\mu\text{Mol MDA/mg Prot.}$

4.2.11. Análises estatísticas

Para as variáveis estudadas foram utilizados os seguintes procedimentos de análise inferencial: (1) análise unidimensional; (2) análise de variância com efeitos fixos; e (3) comparações múltiplas. Os programas computacionais utilizados foram o *Microsoft Excel for Windows*, versão 97 e *Minitab for Windows*, versão 13.1.

O modelo de análise de variância univariada foi utilizado quando requisitada a validade de suposições, como igualdade de variâncias (homocedasticidade). Esta técnica foi utilizada para avaliação estatística das variáveis da atividade antioxidante no sistema aquoso, no sistema lipídico e para o percentual de incorporação de ácidos graxos nos diferentes tecidos. Quando nestas análises a suposição de igualdade de variâncias não foi aceita, modelos estatísticos foram utilizados sem a necessidade da suposição de homocedasticidade. Neste caso, foi empregada a análise de variância com efeitos fixos. Já para a rejeição da igualdade de média foram realizadas comparações múltiplas e estabelecido o intervalo de confiança. Finalmente, para os resultados de lipoperoxidação e ganho de peso dos animais experimentais foram usadas comparações de médias por meio do teste *t* (BUSSAB e MORETTIN, 2002) e construídos intervalos de confiança.

Em todas as análises descritas anteriormente, considerou-se um nível de significância de 5%. Os intervalos foram de 95% de confiança no

modelo tipo *Box-Plot* que utiliza a mediana, intervalos de confiança e permite avaliar a variância dos grupos mediante à dimensão de suas caixas.

Resultados e Discussão

5. Resultados e Discussão

Com o aumento da restrição no uso de antioxidantes sintéticos na indústria alimentícia, pelo seu efeito controverso em organismo vivos, tem-se tornado crescente o interesse na pesquisa de antioxidantes naturais, e, dentre estes, pode-se destacar os extratos de especiarias.

Certos extratos de especiarias contêm componentes com efeitos antioxidantes que estão associados à aceitabilidade, estabilidade e qualidade sensorial dos alimentos aos quais são adicionados. (MADSEN e col, 1996).

Estando o processo oxidativo relacionado com os componentes lipídicos dos tecidos, os quais podem refletir na resposta fisiológica, o presente trabalho investigou a relação entre o efeito antioxidante de extratos de especiarias, ricos em compostos fenólicos, sobre o metabolismo de lípidos polinsaturados.

5.1. Atividade antioxidante

As propriedades antioxidantes de várias ervas e especiarias estão correlacionadas com a sua ação junto ao processo de peroxidação lipídica em alimentos (MILOS e JERKOVIC, 2000). Dentro desta abordagem, há estudos que relacionam a atividade antioxidante destes vegetais (BRACO e col, 1981; KRAMER, 1985) constituídos de compostos fenólicos que possuem grupos hidroxí (SHAHIDI e col, 1992).

Estudos prévios identificaram a presença de grupos hidroxí de compostos fenólicos em especiarias, principalmente na mostarda (MOREIRA e MANCINI FILHO, 1998; MOREIRA e MANCINI FILHO, 1999), associando estes grupos à estabilidade no processo oxidativo. Partindo do pressuposto quanto à atuação dos compostos fenólicos em especiarias, observados em outros estudos, foi feita a avaliação específica da estabilidade antioxidante

das substâncias fenólicas de três especiarias muito consumidas e utilizadas na culinária brasileira: mostarda, canela e erva doce.

Este trabalho apresenta, portanto, resultados da atividade antioxidante de extratos e de frações fenólicas das especiarias mostarda, canela e erva doce, como também uma mistura-teste das três.

A aquisição dos extratos foi por meio de extração seqüencial (descritos no item 4.2.2.), assim como, os chás obtidos pela mistura proporcional das três especiarias (mostarda:canela:erva doce). Tanto os extratos, quanto os chás foram avaliados segundo seu potencial antioxidante nos sistemas aquoso (co-oxidação de substratos, com o uso do ácido linoléico e β -caroteno) e lipídico (condutometria de compostos polares - RANCIMAT®).

Na **tabela 2**, que apresenta os resultados de inibição da oxidação no sistema aquoso, verifica-se que, dos extratos etéreos das especiarias, a canela foi a que apresentou melhor percentual de inibição da oxidação com 82,81% a 200ppm. A 100 ppm o mesmo extrato exibiu um percentual de 73,01% de inibição da oxidação, atividade esta sem diferença significativa ($p < 0,05$) do extrato etéreo da mostarda com 73,32% a 200ppm.

Os extratos alcoólicos de todas as especiarias não apresentaram um bom potencial antioxidante, porém os extratos aquosos da mostarda e da erva doce foram os que revelaram inibição significativa da oxidação, com 71,95% e 49,36% para mostarda e erva doce, respectivamente.

A mistura das três especiarias apresentou inibição significativa da oxidação nos três extratos, resultados estes mais evidentes nos chás da mistura-teste, os quais demonstraram melhor atividade antioxidante a 200ppm com 89,10% de inibição da oxidação, sem diferença significativa do mesmo extrato a 100ppm (87,13%), sendo superiores aos demais extratos. Em comparação ao antioxidante sintético BHT, nas duas concentrações de 100 e 200ppm, não houve diferença significativa por parte da mistura.

Tabela 2 – Percentual de atividade antioxidante dos extratos e frações de especiarias

AMOSTRAS	Mostarda	Canela	Erva Doce	Mistura Teste	Chá
BHT 100ppm	89,35	86,49	84,36	89,26	82,67
BHT 200ppm	90,19	88,17	85,83	90,93	84,91
Ext. Etéreo 100ppm	49,77	73,01	30,97	52,27	
Ext. Etéreo 200ppm	73,32	82,81	61,54	75,44	
Ext. Alcoólico 100ppm	29,29	25,62	4,68	36,13	
Ext. Alcoólico 200ppm	26,41	39,15	10,33	36,28	
Ext. Aquoso 100ppm	53,95	7,54	47,37	53,86	
Ext. Aquoso 200ppm	71,95	8,82	49,36	70,95	
Ext. Etéreo + BHT 100ppm	86,36	81,23	81,26	88,86	
Ext. Etéreo + BHT 200ppm	85,78	88,82	85,82	90,79	
Ext. Alcoólico + BHT 100ppm	85,95	71,37	79,15	80,56	
Ext. Alcoólico + BHT 200ppm	90,81	76,72	83,58	82,41	
Ext. Aquoso + BHT 100ppm	66,73	81,74	76,12	89,58	
Ext. Aquoso + BHT 200ppm	92,65	86,81	88,65	92,65	
Fr. Livre 100ppm	94,47	88,67	92,80	93,11	
Fr. Livre 200ppm	94,53	90,68	94,24	94,25	
Fr. Solúvel 100 ppm	95,12	91,25	93,18	93,15	
Fr. Solúvel 200ppm	95,57	92,44	94,13	94,98	
Fr. Insolúvel 100ppm	93,04	91,76	91,50	91,23	
Fr. Insolúvel 200 ppm	95,02	94,59	88,76	93,43	
Fr. Livre + BHT 100 ppm	92,42	89,12	91,57	91,38	
Fr. Livre + BHT 200 ppm	94,73	88,53	93,70	93,28	
Fr. Solúvel + BHT 100 ppm	94,52	90,29	92,53	90,55	
Fr. Solúvel + BHT 200 ppm	96,98	92,74	93,66	93,46	
Fr. Insolúvel + BHT 100ppm	90,74	90,18	90,28	88,69	
Fr. Insolúvel + BHT 200ppm	93,60	93,91	93,23	93,16	
Chá 100ppm					87,13
Chá 200ppm					89,10
Chá + BHT 100ppm					88,60
Chá + BHT 200ppm					90,25

Os dados apresentados são resultados de análises realizadas em duplicata de 4 experimentos. A capacidade antioxidante relativa dos extratos e frações fenólicas em 100 e 200 ppm na solução contendo β -caroteno/ácido linoléico, emulsificante e água, submetidos a condições oxidantes. Análises espectrofotométricas (470 nm) foram obtidas durante 120 minutos, a absorbância foi comparada ao controle, sem adição de extratos, como descrito no item 4.2.6.1.

No mesmo sistema (aquoso), as frações livres, ésteres solúveis e ligantes insolúveis de ácidos fenólicos, de todas as especiarias, obtidas segundo o item 4.2.3., apresentaram percentuais significativos de inibição da oxidação (acima de 90%) com valores superiores ao BHT e demais extratos avaliados (**tabela 2**).

Observando-se, todavia, as **figuras 9 a 16** que ilustram a atividade antioxidante dos extratos e frações das especiarias, medida durante 120 minutos em sistema de co-oxidação de substratos, pode-se verificar a estabilidade de todos os extratos no sistema. A partir de tais figuras, foi possível calcular os fatores cinéticos dos extratos e frações estudadas. A **tabela 3** representa os fatores cinéticos calculados a partir das tangentes das curvas cinéticas obtidas segundo o esquema 2 abaixo:

ESQUEMA 3 – Modelo para obtenção das tangentes para cálculo dos fatores cinéticos

FIGURA 9 – Atividade antioxidante dos extratos da mostarda a 100 e 200ppm

FIGURA 10 – Atividade antioxidante das frações fenólicas da mostarda a 100 e 200ppm

FIGURA 11 – Atividade antioxidante dos extratos da canela a 100 e 200ppm

FIGURA 12 – Atividade antioxidante das frações fenólicas da canela a 100 e 200ppm

FIGURA 13 - Atividade antioxidante dos extratos da erva doce a 100 e 200ppm

FIGURA 14 – Atividade antioxidante das frações fenólicas da erva doce a 100 e 200ppm

FIGURA 15 – Atividade antioxidante dos extratos da mistura teste das especiarias a 100 e 200ppm

FIGURA 16 – Atividade antioxidante das frações fenólicas da mistura das especiarias a 100 e 200ppm

De acordo com YANISHLIEVA e MARINOVA (1995), o fator F_1 representa a efetividade do antioxidante em bloquear as reações em cadeia, ocasionadas pelos radicais peróxidos, enquanto o F_2 infere a possibilidade do antioxidante participar de outras reações, como, por exemplo, a decomposição dos hidroperóxidos com oxigênio, formando espécies 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 em reações como:

AH= Composto antioxidante

ROO= Radical peróxido

ROOH = hidroperóxido

Tabela 3 – Parâmetros cinéticos caracterizando a inibição da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico pelos extratos e frações das especiarias mostarda, canela e erva doce, como de sua mistura-teste nas concentrações de 100 e 200ppm.

	Concentração															
	Mostarda				Canela				Erva doce				Mistura teste			
	100 ppm		200 ppm		100 ppm		200 ppm		100 ppm		200 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	F_1	F_2	F_1	F_2
BHT	0,08	0,10	0,07	0,10	0,09	0,19	0,07	0,33	0,16	0,31	0,14	0,26	0,14	0,08	0,14	0,03
Ext. Etéreo	0,52	0,72	0,24	0,20	0,17	0,75	0,09	0,42	0,44	2,38	0,29	1,15	0,45	0,64	0,29	0,33
Ext. Alcolico	0,61	0,82	0,91	0,51	0,56	1,60	0,51	1,29	0,64	2,44	0,54	2,70	0,64	0,74	0,68	0,58
Ext. Aquoso	0,43	0,47	0,25	0,27	0,64	2,15	0,92	1,54	0,35	1,35	0,36	1,13	0,45	0,33	0,34	0,36
Et + BHT	0,06	0,12	0,14	0,08	0,10	0,40	0,06	0,23	0,18	0,37	0,15	0,19	0,18	0,12	0,15	0,09
Al + BHT	0,13	0,16	0,05	0,09	0,18	0,73	0,14	0,62	0,19	0,44	0,16	0,33	0,24	0,17	0,23	0,16
Aq + BHT	0,06	0,06	0,05	0,07	0,09	0,38	0,06	0,33	0,14	0,30	0,14	0,26	0,31	0,09	0,10	0,04
Fr. Livre	0,05	0,14	0,04	0,19	0,07	0,48	0,06	0,42	0,01	1,18	0,02	0,55	0,03	0,45	0,02	0,50
Fr. Solúvel	0,04	0,16	0,03	0,12	0,05	0,27	0,03	0,21	0,02	1,27	0,02	1,00	0,03	0,55	0,02	0,40
Fr. Insolúvel	0,05	0,28	0,04	0,19	0,04	0,33	0,04	0,30	0,03	1,27	0,02	1,18	0,04	0,55	0,03	0,40
L + BHT	0,06	0,19	0,04	0,24	0,06	0,42	0,06	0,46	0,02	1,27	0,00	0,91	0,03	0,45	0,03	0,50
S + BHT	0,05	0,07	0,02	0,05	0,05	0,36	0,04	0,22	0,02	1,27	0,02	1,27	0,04	0,60	0,02	0,60
I + BHT	0,07	0,24	0,06	0,15	0,04	0,30	0,03	0,18	0,03	1,63	0,02	1,18	0,05	0,80	0,03	0,55

Verifica-se em todos os extratos e frações fenólicas da mostarda e canela, nas duas concentrações estudadas (100 e 200ppm), que os valores de F_1 e F_2 foram inferiores a 1 e próximos aos fatores obtidos pelo antioxidante sintético BHT, apontando, desse modo, relações sinérgicas com o mesmo. Por outro lado, observa-se o efeito pró-oxidante nos extratos da canela e da erva doce e em todas as frações desta última especiaria, que apresentaram fatores F_1 e F_2 maiores que 1. Já a mistura das três especiarias demonstrou que em ambas os fatores cinéticos foram inferiores a 1, evidenciando, por conseguinte, estabilidade desses extratos e frações no meio avaliado e, deste modo, confirmando o efeito sinérgico que os compostos fenólicos exercem entre si, quando presentes em misturas.

As **figuras 17, 18 e 19** ilustram os resultados quanto à avaliação de ácidos voláteis por condutimetria. Os extratos alcoólico e aquoso da mostarda e da erva doce apresentaram maior aumento no período de indução neste sistema. Nas duas concentrações testadas (100 e 200ppm), verificou-se que dos extratos etéreos, destaca-se o da mostarda, na concentração de 100ppm, que retardou em 23,9% o período de indução do óleo de soja sem antioxidante, promovendo estabilidade oxidativa em proteção ao meio. Logo, para os extratos alcoólicos das três especiarias, evidencia-se o retardo no período de indução do extrato alcoólico a 200ppm da erva doce e, por fim, dos extratos aquosos. Também vale salientar a capacidade protetora dos extratos aquosos da mostarda a 100ppm e da erva doce a 200 ppm (ambos com média de 19% de retardo do período de indução), indicando que estas amostras estabilizam significativamente óleos comestíveis (como o óleo de soja utilizado no procedimento) em comparação ao controle positivo BHT (muito utilizado na indústria alimentícia).

FIGURA 17 – Atividade antioxidante por condutimetria (RANCIMAT) dos extratos da mostarda

FIGURA 18 – Atividade antioxidante por condutimetria (RANCIMAT) dos extratos da canela

FIGURA 19 – Atividade antioxidante por condutimetria (RANCIMAT) dos extratos das especiarias mostarda, canela e erva doce

Considerando a importância da determinação do PI para óleos e gorduras por meio do RANCIMAT®, objetivou-se também, com o presente trabalho, mostrar a viabilidade do uso deste equipamento para a avaliação da estabilidade oxidativa do óleo de soja refinado com antioxidantes naturais (fenólicos de especiarias) e sintéticos (BHT).

Foram avaliados diferentes meios de extração (utilizando vários solventes de diferentes polaridades) com a finalidade de testar a efetividade destes extratos nos meios lipídico e aquoso, quanto ao potencial antioxidante e provável aplicação industrial.

O estudo da estabilidade de substâncias fenólicas em meios distintos de solubilidade tem sido objetivo de muitos pesquisadores para viabilizar uma aplicação mais segura de seu potencial antioxidante (ARELLANO-BARRERA e ESTEVES, 1989; DECKER, 1997 e 1998; RECORD e LANE, 2001). Estes autores associam o tipo de antioxidante com a maior ou menor estabilidade em meios aquoso ou lipídico de oxidação. Logo, marcadores de oxidação em alimentos têm sido ferramentas importantes para a indústria de

alimentos. MILLER e col (1995) avaliaram a atividade antioxidante total de suco de frutas como um marcador de deterioração do suco durante o armazenamento. Portanto, a avaliação da atividade antioxidante deixou de ser apenas um parâmetro absoluto de determinação do potencial antioxidante de um determinado alimento, tornando-se uma ferramenta de controle de qualidade para a indústria alimentícia.

Os compostos fenólicos, sendo um dos maiores grupos de componentes dietéticos não essenciais, têm suas pesquisas justificadas por estarem associados à inibição de doenças crônico-degenerativas, como aterosclerose e câncer. A bioatividade dos fenólicos pode estar relacionada com potencial antioxidante destes compostos aos quais são atribuídos as seguintes características: quelar metais, inibir a LOX e seqüestrar radicais livres. Contudo, os compostos fenólicos podem também promover reação oxidativa *in vitro*, agindo como prooxidantes, por atuarem com metais (reduzindo-os), podendo aumentar a formação de radicais livres e peróxidos.

Parte deste diferencial antioxidante e pro-oxidante das substâncias fenólicas é devida, principalmente, as suas características de solubilidade e concentração no meio. DECKER (1997) revisou vários trabalhos citados na literatura que pudessem sustentar a hipótese de que as propriedades antioxidantes das substâncias fenólicas têm relação com suas características de solubilidade, reforçando o “paradoxo antioxidante” que o descreve como um fenômeno em que seqüestradores de radicais livres hidrofílicos (RLHf) seriam antioxidantes mais efetivos do que os radicais livres hidrofóbicos (RLHb) em emulsões de óleos e que RLH hidrofóbicos seriam mais efetivos em óleos emulsionados. Estes achados foram atribuídos à capacidade de RLH hidrofílicos serem mais efetivos nos concentrados de interface óleo-água de sistemas lipídicos, ou seja, a oxidação foi mais prevalente com separação da matéria oxidativa em ambas as fases: aquosa e lipídica (PORTER, 1993).

Associada à solubilidade dos compostos fenólicos, também encontra-se a concentração dos mesmos no meio a ser utilizado, dando indícios de

que os fenólicos são importantes para indústria alimentícia e benéficos à saúde. Todavia, a relação entre suas bioatividades e propriedades antioxidantes necessita de maiores estudos. O fato dos compostos fenólicos poderem ser tanto pró-oxidantes como antioxidantes indica que em determinadas condições, e em certos tecidos, estas substâncias podem trazer mais risco do que benefício. Além do mais, o consumo de elevadas concentrações de compostos fenólicos, oriundos do próprio alimento ou suplemento, pode não ser prudente até que a bioatividade destes compostos esteja melhor esclarecida.

Métodos que avaliem a atividade antioxidante em alimentos e sistemas biológicos têm sido desenvolvidos para disponibilizarem uma maior segurança à aplicabilidade das substâncias naturais com atividade antioxidante. SILVA e col (1999) estudaram várias metodologias de avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante em sistemas *in vitro*. PRIOR e CAO, no mesmo ano, avaliaram a capacidade antioxidante total *in vivo* comparando com diferentes métodos analíticos. Desta forma, estes trabalhos servem como parâmetros iniciais à seleção crítica da técnica a ser testada e/ou aplicada, principalmente esclarecendo as características da matéria-prima estudada, visto que a solubilidade e a concentração são os pontos limitantes de qualquer avaliação de estabilidade oxidativa.

5.2. Identificação dos compostos fenólicos das especiarias mostarda, canela e erva doce

Como um dos objetivos deste trabalho foi a identificação dos principais compostos responsáveis pela inibição da oxidação, presentes nas especiarias mostarda, canela e erva doce, utilizou-se como metodologias para a etapa de identificação dos compostos fenólicos: 1) a cromatografia em camada delgada 2) e a cromatografia à gás, descrita por MOREIRA e MANCINI FILHO, 2003.

A cromatografia em camada delgada é uma técnica simples de identificação de compostos fenólicos com ou sem atividade antioxidante e, também, pode ser utilizada como pré-tratamento (purificação) destes compostos para metodologias mais complexas e precisas, como a cromatografia gasosa.

Na cromatografia em camada delgada foi avaliada a presença de compostos fenólicos com ou sem atividade antioxidante. Para tal, foram seguidos os procedimentos citados por DUVE e WHITE (1991), utilizando-se como fase móvel η -butanol/ácido acético/água na proporção de 4:1:5, aplicando-se uma média de 10 μ L das amostras em placas de vidros com uma espessura de 0,25mm. Para a identificação dos compostos seguiu-se os seguintes sistemas de revelação: 1) na avaliação das bandas com atividade antioxidante utilizou-se a solução de 9mg de β -caroteno em 30mL de clorofórmio e 10 μ L de ácido linoléico em 60mL de etanol. As bandas com atividade antioxidante reveladas neste sistema apresentaram coloração variando do amarelo ao alaranjado e exibiram Rf com valores de 0,10 a 0,84; 2) na avaliação das bandas, que evidenciavam a presença de compostos fenólicos, foi utilizada uma solução de 1% de cloreto férrico e ferrocianeto de potássio em água destilada, bandas de coloração variaram do azul claro ao azul escuro e revelaram Rf de 0,10 a 0,83.

Os resultados obtidos indicaram que todas as especiarias utilizadas contêm fenólicos entre seus constituintes com presença de atividade antioxidante (**tabela 4**).

Tabela 4 - Cromatografia em camada delgada dos extratos e frações das especiarias

Amostras	β -caroteno/ác. Linoléico			Clor. Férrico/ferric. de pot.		
	altura de corrida	altura da banda	Rf	altura de corrida	altura da banda	Rf
CHÁ	13,5	4,5	0,33	14	4,8	0,34
	13,5	6,0	0,44	14	6,1	0,43
	13,5	8,0	0,59	14	8,7	0,62
	13,5	10,0	0,74	14	10,5	0,75
MOSTARDA						
E. Etéreo	12,0	4,0	0,33	12,7	4,7	0,37
	12,0	6,0	0,50	12,7	6,7	0,52
E. Alcóolico	12,5	3,0	0,24	15,0	4,5	0,30
	12,5	10,0	0,80	15,0	12,5	0,83
E. Aquoso	12,2	3,5	0,29	13,0	3,3	0,25
	12,2	8,5	0,70	13,0	9,0	0,69
F. Livre	15,0	11,5	0,77	15,0	10,5	0,70
Solúvel	15,0	9,5	0,63	15,0	10,5	0,70
Insolúvel	15,0	-	-	15,0	-	-
CANELA						
Etéreo	12,5	-	-	12,5	-	-
Alcóolico	12,5	8	0,64	12,5	7,5	0,60
Aquoso	12,5	3	0,24	12,5	2,5	0,20
Livre	15,0	1,5	0,10	15,0	1,5	0,10
	15,0	7,5	0,50	15,0	7,0	0,46
	15,0	10,5	0,70	15,0	10,5	0,70
Solúvel	15,0	-	-	15,0	-	-
Insolúvel	15,0	-	-	15,0	-	-
ERVA DOCE						
Etéreo	14,5	11,5	0,79	14,5	11,5	0,79
Alcóolico	14,5	11,5	0,79	14,5	11,3	0,77
	14,5	11,5	0,79	14,5	11,7	0,80
	14,5	2,5	0,17	14,5	2,4	0,16
Aquoso	14,5	4,0	0,28	14,5	4,0	0,28
	14,5	9,0	0,62	14,5	9,2	0,63
	14,5	10,5	0,72	14,5	10,3	0,71
	14,5	12,0	0,83	14,5	12,1	0,83
	15	3,5	0,23	15	3,0	0,20
Livre	15	8,0	0,53	15	8,5	0,57
	15	11,3	0,75	15	11,0	0,73
Solúvel	15	-	-	15	-	-
Insolúvel	15	-	-	15	-	-
MISTURA TESTE						
Etéreo	15,2	5,6	0,37	15,1	4,7	0,31
	15,2	10,8	0,71	15,1	11,5	0,76
Alcóolico	15,2	5,3	0,35	15,1	4,8	0,32
	15,2	10,0	0,66	15,1	10,5	0,70
	15,2	11,0	0,72	15,1	10,9	0,72
Aquoso	15,2	5,6	0,36	15,1	6,0	0,40
Livre	16	13,5	0,84	16,0	13,0	0,81
Solúvel	16	11,5	0,71	16,0	11,7	0,73
Insolúvel	16	-	-	16,0	-	-

Observa-se que todos os extratos e frações apresentaram bandas com Rf revelados tanto para existência de compostos fenólicos como para atividade antioxidante. Nos extratos e frações fenólicas das especiarias, isoladamente, foi verificado que todas as bandas, com presença de atividade antioxidante, possuem Rf correspondentes aos sistemas reveladores de substâncias fenólicas. Esta homogeneidade permanece na mistura (chá) administrada aos animais experimentais, com valores de Rf que variaram de 0,33 a 0,75.

Com a necessidade de se conhecer quais os compostos fenólicos presentes e o potencial inibidor da oxidação lipídica, realizou-se cromatografia gasosa seguindo o procedimento citado no item 4.2.7.2. e utilizou-se, como agente silinizante, o *N, O*, bis-trimetilsil acrilamida (B.S.A.), avaliando-se o perfil cromatográfico presente nas frações e extratos das especiarias mostarda, canela e erva doce, bem como, na mistura das mesmas.

Na **tabela 5** pode-se observar os valores quantificados com todas as substâncias identificadas e na **tabela 6**, pode-se verificar a atividade antioxidante após purificação e revelação nos sistema β -caroteno/ácido linoléico. O ácido salicílico (**tabela 5**) foi o composto fenólico presente em todas as especiarias e, com concentrações superiores aos demais compostos identificados e após purificação (**tabela 6**), o ácido caféico foi a substância identificada e quantificada em maior concentração na banda purificada, com atividade antioxidante em todas as frações das especiarias em questão. Os demais compostos fenólicos encontrados e quantificados (**tabela 5**) foram: catecol, hidroquinona, gliciteína, glicitina, trans-cinâmico, pirogalol, para-hidroxibenzóico, gentíssico, orto-cumárico, protocatequínico, para-cumárico, silibinina, gálico, ferúlico, caféico, sináptico, rutina, revesratrol, naringerina, epicatequina, catequina, hesperitina, epilocatequina e clorogênico. Destes compostos, 17 são ácidos fenólicos, 6 flavonóides e 2 isoflavonas. Por outro lado, quando se analisa o perfil de compostos fenólicos dos extratos das mesmas especiarias, não se verifica diferença significativa ($p < 0,05$) nas concentrações ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) dos mesmos. Todos os

cromatogramas e espectros de massa podem ser observados nos anexos (1 a 17).

Em relação ao perfil de substâncias fenólicas em especiarias, houve uma homogeneidade destes compostos identificados nas especiarias em questão; em concordância com resultados descritos nos poucos dados da literatura. Destacando-se: os ácidos salicílico, cafeico, catecol, como também derivados cinâmicos, benzóicos e alguns flavonóides complexos.

A partir do perfil das substâncias fenólicas identificadas e da sua estabilidade antioxidante nos meios avaliados (aquoso e lipídico), elaborou-se uma mistura das especiarias em proporções iguais, dieteticamente preparadas na forma de um infuso, para ser administrada aos animais no ensaio biológico.

Depois de avaliada a atividade antioxidante, realizou-se a identificação das substâncias responsáveis pela inibição da oxidação (os resultados apresentam-se nas **figuras 20 e 21**). Pode-se constatar que a partir de 25ppm, atingiu-se o máximo da atividade antioxidante do extrato da mistura-teste das especiarias, confirmando o efeito sinérgico que os compostos fenólicos contidos nestas especiarias possuem entre si (**figura 20**).

FIGURA 20- Atividade antioxidante do chá da mistura-teste das especiarias mostarda, canela e erva doce, de 25 a 200ppm.

Outro fator importante é observado na **figura 21**: apenas 10 μ L purificados em placa cromatográfica em camada delgada foram suficientes para se identificar os três principais componentes responsáveis pelo potencial antioxidante no chá, que foram os ácidos salicílico, caféico e o catecol.

Tabela 5 – Identificação e quantificação dos compostos fenólicos das frações fenólicas de especiarias

COMPOSTOS	T.R.	FRAÇÕES											
		LIVRE($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)				SOLÚVEL($\mu\text{g}/\text{L}$)				INSOLÚVEL($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)			
		M	C	ED	MT	M	C	ED	MT	M	C	ED	MT
Catecol	3,20	0,07	-	-	-	0,11	0,35	0,11	0,20	0,14	0,23	0,30	0,12
Hidroquinona	3,89	-	0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gliciteína	5,32	-	-	-	-	-	0,30	0,18	0,38	0,20	0,22	0,10	0,25
Salicílico	5,42	28,7	5,87	14,3	14,8	33,5	45,8	22,3	20,8	4,95	4,60	8,01	4,28
				9	4	1	8	3	8				
Glicina	5,60	-	-	-	-	-	0,07	0,08	-	-	-	-	0,05
Trans-cinâmico	5,89	0,18	0,04	0,09	0,09	0,17	0,24	0,12	-	-	-	-	-
Pirogalol	6,03	-	-	0,41	0,50	0,11	0,21	0,12	0,12	-	-	0,11	-
p-hidroxibenzóico	7,29	-	-	-	-	0,16	0,31	0,07	-	-	-	-	-
Gentíssico	10,21	-	-	-	-	-	-	0,04	-	-	-	-	-
o-cumárico	10,70	-	-	-	-	-	-	0,09	-	-	-	-	-
Protocatequínico	11,02	-	0,23	-	-	0,07	0,12	-	-	-	-	-	-
p-cumárico	12,20	-	-	0,94	1,10	-	-	-	-	-	-	-	-
Silibinina	13,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gálico	13,71	-	-	0,21	0,16	0,08	-	-	-	-	-	-	-
Ferúlico	15,97	0,12	-	0,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Caféico	16,88	0,12	0,04	0,15	0,15	0,35	0,96	0,51	1,11	0,52	0,64	0,99	0,69
Sinápico	18,65	0,42	-	1,76	0,96	0,08	-	0,06	0,02	-	-	-	-
Rutina	24,13	0,06	-	-	-	0,03	-	-	-	-	-	-	-
Reveratrol	26,12	-	-	-	-	-	0,02	-	-	-	-	-	-
Naringerina	28,17	-	0,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Epicatequina (-)	28,37	-	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catequina	28,71	-	0,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hesperitina	29,35	-	0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Epilocatequina	29,50	0,35	-	-	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-
Clorogênico	31,87	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

M-mostarda; C-canela; ED-erva doce; MT-mistura teste

Tabela 6 - Identificação e quantificação dos compostos fenólicos responsáveis pela atividade antioxidante, das frações fenólicas de especiarias após purificação por CCD

COMPOSTOS	T.R.	FRAÇÕES											
		LIVRE($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)				SOLÚVEL($\mu\text{g}/\text{L}$)				INSOLÚVEL($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)			
		M	C	ED	MT	M	C	ED	MT	M	C	ED	MT
Catecol	3,20	-	-	-	0,21	0,26	-	0,21	0,26	-	-	-	-
Salicílico	5,42	0,24	0,30	0,26	0,27	-	-	0,38	-	-	-	-	-
Pirogalol	6,03	0,26	0,21	0,21	0,25	-	-	0,25	-	-	-	-	-
Quínico	12,20	-	-	-	0,21	-	-	-	1,58	-	-	-	-
Ferúlico	15,97	-	-	-	0,58	-	-	-	2,33	-	-	-	-
Caféico	16,88	2,58	2,46	3,12	4,26	3,12	-	2,61	3,66	-	-	-	-
Luteolina	33,53	-	-	-	-	0,78	-	-	-	-	-	-	-

M-mostarda; C-canêla; ED-erva doce; MT-mistura teste

Há algumas metodologias descritas sobre a análise de compostos fenólicos por cromatografia à gás baseados nas suas características de polaridade. Os ácidos fenólicos, muito presentes em especiarias, são substâncias que possuem alta polaridade e baixa pressão de vapor. Tais características levaram alguns autores a descrever processos distintos para derivatização e condições de análises cromatográficas, objetivando uma melhor técnica de isolamento e caracterização destes compostos. Neste trabalho, foi seguida a metodologia descrita por DABROWSKI e SOSULSKI (1984) com modificações apresentadas por MOREIRA e MANCINI-FILHO (1999).

Para identificação dos compostos fenólicos das especiarias estudadas, utilizou-se métodos de purificação e identificação por CGMS, verificando-se que a maior classe de substâncias fenólicas presentes são ácidos fenólicos. Alguns autores corroboram estes resultados, observando-se que estes constituintes fazem parte da principal classe de compostos fenólicos dos vegetais, principalmente em especiarias (FENTON e col, 1980; DABROWSKI e SOSULSKI, 1984a, 1984b; MOREIRA e MANCINI-FILHO, 1998).

Fenólicos de pesos moleculares menores e maior volatilidade podem ser separados diretamente por CG, não sendo necessário um pré-tratamento

de derivatização da amostra. Contudo, compostos maiores, principalmente os polihídricos, precisam ser derivatizados devido à presença de grupamentos hidroxila que causam dificuldades na análise – como interações com a fase estacionária da coluna cromatográfica – não permitindo uma boa resolução. A derivatização dos compostos causa uma diminuição tanto da polaridade, quanto no ponto de ebulição, podendo ser reduzida, conseqüentemente, a temperatura de análise.

Como as especiarias estudadas apresentaram não somente substâncias fenólicas simples, mas também complexas, fez-se necessária a derivatização tanto dos extratos, como as frações com N,O, bis (trimetilsilil) - acetamida (BSA); permitindo, desse modo, uma melhor separação e identificação dos compostos fenólicos.

Nas fases estacionárias utilizadas na cromatografia gasosa, podem ser empregadas colunas empacotadas ou capilares, contendo desde substâncias apolares. Todavia, para as colunas polares e semipolares, o mais importante é a interação existente entre as hidroxilas dos ácidos fenólicos com os sítios eletronegativos da fase estacionária. Devido ao aumento da polaridade da fase estacionária ou dos grupamentos hidroxila das moléculas, tem-se um crescimento na seletividade, ou seja, uma melhor separação; há, com isso, uma maior preferência no uso de colunas polares ou semipolares para a separação de ácidos fenólicos, pois o uso de colunas apolares normalmente traz picos assimétricos ou com enorme quantidade de ruídos (TESAROVÁ e PACACOVÁ, 1983). A coluna DB 5, que foi utilizada no presente trabalho, é uma coluna semipolar, modificada do método original, o que permitiu uma melhor separação das substâncias fenólicas identificadas.

As análises de ácidos fenólicos por CG apresentam como principal problema a interferência de ácidos graxos de cadeia longa, remanescentes do desengorduramento das amostras, das quais se originam os extratos. Os ácidos graxos de 16 e 18 carbonos possuem um tempo de retenção muito próximo aos 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 e col, 1980). Diante do exposto, a cromatografia em camada delgada, além de confirmar a presença de substâncias fenólicas com atividade antioxidante presente nas especiarias, também foi utilizada como técnica de pré-tratamento dos extratos e frações fenólicas para serem identificados e quantificados por CGMS.

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

PRATT e 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, atuando também nos processos oxidativos catalisados por metais. Na tecnologia de óleos e gorduras, os compostos fenólicos naturais apresentam bom potencial antioxidante, podendo ser utilizados em associação a antioxidantes sintéticos ou, até, substituí-los. DÚRAN e PADILLA (1993) realizaram estudos para verificar o potencial antioxidante dos fenólicos, com a tentativa de substituir os antioxidantes sintéticos, como o BHA, BHT, TBHQ e o propil-galato. Diversas pesquisas tiveram por objetivo encontrar produtos naturais com atividade antioxidante que permitissem substituir antioxidantes sintéticos e/ou fazer associações entre eles, com o intuito de gradualmente diminuir a quantidade dos mesmos (BRANEN, 1975; HIROSE e col; OKUBO, 1997).

Tabela 7– Identificação e quantificação dos compostos fenólicos dos extratos de especiarias

COMPOSTOS	T.R.	EXTRATOS											
		Etéreo(µg/mL)				Alcoólico(µg/mL)				Aquoso(µg/mL)			
		M	C	ED	MT	M	C	ED	MT	M	C	ED	MT
Catecol	3,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	-
Gliciteína	5,32	-	-	-	-	-	-	-	-	0,02	-	-	0,01
Salicílico	5,42	-	-	-	-	-	-	0,04	-	-	-	0,01	-
Pirogalol	6,03	-	0,03	-	-	-	-	0,21	0,04	-	-	0,05	0,01
p-hidroxibenzóico	7,29	-	0,06	-	0,03	0,05	-	-	-	-	-	-	-
Vanílico	9,86	-	-	-	-	-	-	0,07	-	-	-	-	-
Protocatequínico	11,02	-	-	-	0,05	-	0,19	0,21	0,13	0,06	0,25	0,07	0,15
Quínico	12,20	-	-	-	0,04	-	0,07	0,08	0,06	0,01	0,02	0,03	0,01
p-cumárico	13,13	-	-	-	0,08	-	-	0,18	0,26	0,03	-	0,01	0,01
Silibinina	13,19	-	-	-	-	-	-	0,68	-	-	-	0,51	-
Gálico	13,71	-	0,22	-	-	-	0,04	0,13	0,06	-	-	0,04	0,02
Ferúlico	15,97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,07	0,13
Caféico	16,88	-	0,05	0,06	0,07	0,11	0,01	0,06	0,04	0,03	-	0,07	0,01
Sinápico	18,65	-	0,03	2,9	0,91	0,94	-	0,55	0,20	0,02	-	0,02	-
Rutina	24,13	-	-	-	1,44	0,44	-	0,03	0,13	-	-	-	-
Reveratrol	26,12	-	-	-	-	0,59	0,36	-	-	-	-	0,01	-
Naringerina	28,17	1,19	-	-	0,35	-	0,12	-	0,07	-	-	-	-
Epicatequina (-)	28,37	0,06	-	-	-	-	0,12	-	0,07	-	-	-	-
Daidzina	28,79	0,05	-	-	-	-	0,15	-	-	-	-	-	-
Catequina	28,71	-	-	-	-	-	-	-	0,10	-	-	-	-
Clorogênico	31,87	-	-	-	-	0,27	-	-	-	-	-	-	-

M-mostarda; C-canela; ED-erva doce; MT-mistura teste

Tabela 8 - Identificação e quantificação dos compostos fenólicos responsáveis pela atividade antioxidante, das frações fenólicas de especiarias após purificação por CCD

COMPOSTOS	T.R.	EXTRATOS											
		ETÉREO(µg/µL)				ALCOÓLICO(µg/L)				AQUOSO(µg/µL)			
		M	C	ED	MT	M	C	ED	MT	M	C	ED	MT
Catecol	3,20	0,023	0,033	0,058	-	0,085	0,098	0,140	0,128	0,309	0,305	0,111	0,654
Salicílico	5,42	0,053	0,035	0,038	0,074	0,111	0,143	0,119	-	0,238	0,302	0,175	0,510
Pirogalol	6,03	-	-	-	-	0,073	0,082	0,162	-	-	-	0,100	0,927
Protocatequínico	11,02	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quínico	12,20	-	-	-	-	-	0,069	-	-	-	-	0,430	4,899
Ferúlico	15,97	-	-	-	-	-	0,044	-	-	-	-	0,710	-
Caféico	16,88	0,283	0,378	0,500	0,833	1,092	0,482	1,528	0,615	1,545	2,462	1,772	11,1
Sinápico	18,65	0,155	0,153	0,162	0,189	0,184	0,180	0,251	0,114	-	0,233	0,202	-
Quercetina	32,55	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mirecetina	32,25	-	-	-	-	0,022	-	-	-	-	-	-	-
Luteolína	33,53	0,024	-	-	-	0,022	-	0,144	-	-	-	0,093	-

M-mostarda; C-canela; ED-erva doce; MT-mistura teste

A literatura discute a toxicidade aguda do BHT. Estes efeitos tóxicos provavelmente se manifestam em doses muito superiores às aquelas consumidas normalmente pelo ser humano. Entretanto, pequenas doses consumidas sistematicamente podem apresentar efeito cumulativo, induzindo a uma toxicidade crônica em vários órgãos e sistemas, e em particular, no fígado, provocando hipertrofia e hiperplasia. Nos pulmões, além dos efeitos observados no fígado, pode provocar uma desorganização generalizada dos componentes celulares (JORI, 1983; KEHRER e DIGIOVANNI, 1990). Em contrapartida, agentes quimiopreventivos isolados de antioxidantes naturais atuam prevenindo lesões teciduais que poderiam acarretar à diferenciação celular (NAMIKI, 1990; 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 podem oferecer ao ser humano, além de uma rejeição generalizada dos aditivos alimentares sintéticos (por parte do consumidor), torna-se crescente 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 e WATTS, 1964; TIAN e WHITE, 1994; YEN e CHEN, 1995; MIRANDA, 1997).

Além da concentração e da solubilidade, uma característica importante para o potencial protetor dos compostos fenólicos é atribuída a estrutura química. Um exemplo é a presença de grupos hidroxila e de anéis aromáticos que estabilizam estas substâncias no processo oxidativo. A catequina e a quercetina, como também os ácidos caféico, salicílico e *p*-hidroxibenzóico, são compostos fenólicos muito estudados pelo seu potencial antioxidante e por estarem presentes em fontes naturais como frutas cítricas (maçã), vegetais (cebola) e especiarias (mostarda), com uma IDA (ingestão diária aceitável) de 20 mg a 1g/dia. Estes fenólicos agem, primordialmente, na inativação de radicais peroxila, prevenindo as consequências deletérias de suas reações e inibindo os efeitos da

peroxidação lipídica e da oxidação da LDL *in vivo*, as quais são as principais causas de processos crônico-degenerativos como, por exemplo, a aterosclerose (RICE-EVANS, 1996).

Embora essas substâncias tenham seus efeitos comprovados na literatura, mais estudos sobre a sua biodisponibilidade necessitam ser averiguados, para que se tenham dados novos e concretos, visando uma maior segurança na utilização destes compostos. Neste sentido, estudo recente sobre biodisponibilidade foi realizado com extratos de alecrim e de orégano, no qual foram obtidos valores reais da atividade antioxidante *in vivo* (em ratos) destes componentes alimentares (CINTRA e MANCINI-FILHO, 2001).

Este trabalho verificou os compostos fenólicos presentes nas especiarias: mostarda, canela e erva doce como sendo os responsáveis pelo processo de inibição da oxidação nos sistemas testados. Estando presente ácidos fenólicos e outros compostos fenólicos com atividade antioxidante, evidencia-se o efeito sinérgico destas substâncias no meio, o que justifica a sua utilização; confirmando, portanto, dados da literatura reportados até o momento a respeito do potencial antioxidante de compostos fenólicos.

5.3 – Resultados do ensaio biológico

Sob o ponto de vista da importância dos componentes lipídicos na alimentação dos seres vivos, várias alternativas dietéticas vêm sendo pesquisadas com o objetivo de regular o seu metabolismo nas diferentes células. Antioxidantes naturais, como compostos fenólicos de especiarias, podem exercer funções fisiologicamente importantes, entre elas a modulação de atividade da COX e LOX. Desta forma, tanto o consumo dietético de ácidos graxos polinsaturados das séries $\omega 3$ e $\omega 6$, bem como a ingestão de antioxidantes fenólicos naturais (contidos nas especiarias), podem apresentar uma relação dependente, na regulação da biossíntese dos eicosanóides, pela ação destas substâncias sobre as enzimas do metabolismo lipídico.

Na perspectiva de se avaliar a influência dos compostos fenólicos sobre o metabolismo lipídico foi realizado o ensaio biológico para averiguar a modulação do perfil lipídico em tecidos de ratos, tratados com dietas experimentais ricas em ácidos graxos das séries $\omega 3$ e $\omega 6$ (tabela 10), sendo estes animais suplementados com especiarias mostarda, canela e erva doce, na forma de uma mistura de chá rica em antioxidantes naturais.

Tabela 9 – Composição centesimal das rações experimentais

CONSTITUINTES	DIETAS	
	Peixe ($\omega 3$)	Soja ($\omega 6$)
Umidade	04,21 $\pm$ 0,05	04,32 $\pm$ 0,03
Lípides	18,84 $\pm$ 1,21	16,82 $\pm$ 0,98
Proteína	26,20 $\pm$ 2,34	25,01 $\pm$ 1,89
Cinzas	05,30 $\pm$ 0,06	04,75 $\pm$ 0,52
Fração Nifext	45,45 $\pm$ 3,24	49,10 $\pm$ 4,01

n= 03; resultados expressos em MD $\pm$ DP.

Como resultados de controle do experimento, os pesos dos animais foram monitorados durante os 45 dias de experimento. As diferenças entre os grupos controle e experimental podem ser observadas na figura 22.

FIGURA 22 – Box-plots para o ganho de peso dos animais experimentais

A análise estatística da variável ganho de peso foi realizada por meio do teste *t* e intervalo de confiança para a diferença de médias entre grupo controle e experimental. Observou-se que, para os animais suplementados com dieta $\omega 3$ e o infuso contendo antioxidantes naturais (grupo experimental), o ganho médio de peso foi menor do que àquele dos animais que ingeriram somente a dieta $\omega 3$ e o placebo (grupo controle). Entre os animais que receberam dieta $\omega 6$, o teste não detectou diferença entre os ganhos médios de peso dos grupos controle e experimental (**figura 22**).

Fenólicos livres são conhecidos por reagirem 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 cadeias aromáticas de proteínas (SOSOULSKI, 1979).

Efeitos antinutricionais de polifenóis em animais monogástricos indicam a presença de taninos. Trabalhos realizados com essas substâncias demonstraram que a digestibilidade foi afetada tanto pelo ácido tânico, como pela catequina. Esta reduziu, significativamente, a digestibilidade. Além disso, a atividade *in vitro* da lipase foi reduzida pelo ácido tânico. Contudo, a atividade de enzimas proteolíticas foi reduzida tanto pelo ácido tânico quanto pela catequina. Como resultado, devido ao alto conteúdo de taninos, houve depleção do ganho de peso de ratos, como também, *in vitro*, demonstrou-se um decréscimo na digestibilidade da proteína (SHAHIDI e NACZK, 1989).

Algumas especiarias estão associadas com a permeabilidade intestinal e, com isso, limitam a absorção de muitos nutrientes, prejudicando a nutrição animal (JAROLIM- JENSEN e col, 1997).

A importância do conhecimento da biodisponibilidade de nutrientes começa pela abordagem de seu mecanismo de digestão e absorção (RECORD e LANE, 2001). YOSHINO e col (1999) simularam o processo de

digestão de chás ricos em substâncias fenólicas, visto que, epidemiologicamente, estas bebidas estão associadas ao benefício da saúde. RECORD e LANE (2001) modularam *in vitro* o processo de digestão da catequina, um dos componentes mais presentes nos chás. Estes autores relataram que o fator concentração e mudanças de pH podem influenciar diretamente no processo de absorção, principalmente na formação de substâncias com ação ainda não esclarecida para saúde humana. Eles observaram também, na alimentação, que as associações, como presença de leite e outros alimentos, não alteram muito a biodisponibilidade e a atividade antioxidante de substâncias fenólicas (SERAFINI e col, 1996; LEENEN e col, 2000).

Devido a este fato, ensaios histopatológicos dos intestinos delgados (porção proximal) dos animais foram realizados, por meio de técnicas histoquímicas, para verificar o porquê da depleção do peso dos animais dos grupos experimentais, principalmente do grupo ω3. Procurou-se avaliar se houve, ou não, alteração da área de absorção, o que levaria à hipótese dos infusos administrados serem fatores antinutricionais que, possivelmente, pudessem modificar a área de absorção, influenciando, assim, na incorporação dos nutrientes e com reflexos no peso dos animais.

Nas **figuras 25, 26 e 27** observa-se, em todos os tratamentos experimentais, que a presença de compostos fenólicos não alterou a morfologia intestinal dos animais, de maneira que pudesse refletir no crescimento dos mesmos.

Foi observado, porém que estes animais dos grupos do infuso experimental, tiveram um peso médio do tecido adiposo subcutâneo de 25% menor do que os pesos dos tecidos adiposos subcutâneos (visceral) comparando-se com os respectivos grupos controles, o que poderia também explicar a diminuição da curva de crescimento destes animais, visto que o consumo destes grupos não apresentou diferença significativa (**figura 23**).

FIGURA 23 – Coeficiente de Eficácia Alimentar (C.E.A.) dos animais que receberam tratamento experimental

Na **figura 24** encontram-se os dados da absorção aparente de fenólicos como resultado parcial de digestibilidade das substâncias fenólicas presentes nas especiarias avaliadas.

Dados da literatura indicam que substâncias fenólicas, como os ácidos fenólicos, são rapidamente absorvidos, contribuindo, assim, para sua maior atividade nos sistemas biológicos (OLTHOF e col, 2001).

Os valores absolutos de fenólicos que foram absorvidos e a proporção em relação ao total consumido, ou seja, a absorção aparente, foram obtidos a fim de se avaliar um possível fator interferente na capacidade antioxidante *in vivo* das especiarias.

FIGURA 24 – Absorção aparente (AbAp) de fenólicos nas fezes dos animais experimentais. AbAp foi obtida pela expressão: $[(\text{fenólicos consumidos} - \text{fenólicos fecais}) / \text{fenólicos ingeridos}] \times 100$. Dados adquiridos em triplicada da coleta realizada durante as 5 semanas de tratamento com o chá, em concentração de 200ppm, administrado a cada animal, por gavagem

FIGURA 25 – Fotomicrografia de corte histológico de duodeno de animal dos grupos: (A) controle, que recebeu solução placebo e uma dieta rica em ácidos graxos polinsaturados das série $\omega 3$; (B) experimental, que recebeu solução rica em compostos fenólicos de especiarias e uma dieta rica em ácidos graxos polinsaturados das série $\omega 3$; (C) controle, que recebeu solução placebo e uma dieta rica em ácidos graxos polinsaturados das série $\omega 6$; (D) experimental, que recebeu solução rica em compostos fenólicos de especiarias e uma dieta rica em ácidos graxos polinsaturados das série $\omega 6$. A fotomicrografia demonstra a arquiteturas das mucosas bem preservadas, sem diferenças entre os grupos controle e experimental. Coloração HE. Aumento 40x.

FIGURA 26 – Detalhe, em maior aumento, das fotomicrografias anteriores, evidenciando vilosidades e criptas dentro dos padrões de normalidade, não apresentando diferenças entre os grupos controle e experimental. Coloração HE. Aumento 100x.

FIGURA 27 – Detalhe, em maior aumento, das fotomicrografias anteriores (10 x maior), **figura 25**, apresentando vilosidades que exibem epitélio colunar com células caliciformes e estroma de tecido conjuntivo vascularizado bem preservados, sem diferenças entre os grupos controle e experimental. Coloração HE. Aumento 400x.

O balanço de fenólicos mostrou que em torno de 73% destes compostos foram absorvidos para os grupos experimentais $\omega 3$ e $\omega 6$, avaliados durante as semanas de tratamento com o infuso administrado por gavagem aos animais.

A absorção de fenólicos parece ocorrer via metabolização na microflora intestinal (BRIVIDA e SIES, 1994), e metabólitos podem ser identificados no plasma dos animais recebendo dieta adicionada desses compostos (MANACH e col, 1995). Uma conjugação com glicídios ou com minerais pode ocorrer no fígado e a secreção biliar e a eliminação urinária são as vias de excreção dos flavonóides, segundo BRIVIDA e SIES (1994).

O mecanismo de defesa antioxidante, proveniente da dieta e dos antioxidantes naturais ingeridos, foi verificado nos tecidos plasmáticos, hepáticos, cerebrais, renais e adiposos para os grupos dietéticos soja e peixe quando comparados com seus controles. Estes resultados podem ser visualizados nos gráficos tipo *Box plot* presentes nas **figuras 28 a 33**, os quais evidenciaram possuir fator protetor detectado nos animais pelo o uso do extrato das especiarias. A base dietética era a mesma e o único diferencial era o extrato de antioxidantes.

O estresse oxidativo resulta em danos de muitos componentes celulares. A decomposição peroxidativa dos tecidos e as mudanças associadas às propriedades da membrana têm sido freqüentemente consideradas as bases da injúria celular. Este processo se identifica em diferentes situações metabólicas, incluindo o envelhecimento, as doenças cardiovasculares e o processo mutagênico (DE BONO, 1994).

A peroxidação lipídica é uma deterioração dos ácidos graxos insaturados, que leva a um aumento na concentração orgânica de uma variedade de produtos de oxidação, com a capacidade de interferir na replicação celular e/ou sobrevivência da célula. A presença de grandes concentrações de ácidos graxos altamente insaturados em certas gorduras da dieta, e os produtos de oxidação desses ácidos graxos, desempenham

um importante papel na taxa inibitória ou de crescimento celular (GONZALES e col, 1991).

Nos gráficos que se seguem (**figuras 28 a 33**), pelo tamanho das caixas (*box-plot*) é possível verificar a variância entre os animais, isto é, quanto menor a dimensão da caixa, pressupõe-se que uma menor variação ocorreu entre os animais. O tamanho expressa, também, os intervalos de variância e medianas que são apresentados e permitem uma visualização geral e completa do experimento.

Todos os tecidos estudados demonstraram baixos índices de peroxidação dos grupos experimentais em relação aos seus respectivos grupos controles. Estes resultados são corroborados por outros de autores que encontraram efeito na baixa peroxidação lipídica de tecidos na presença de extratos ricos em substâncias fenólicas (DOGRU-ABBASOGLU e col, 1997; FRÉMONT e col, 1998).

Tabela 10 – Concentração de ácidos graxos das rações fornecidas aos animais experimentais

ÁCIDO GRAXO	CONCENTRAÇÃO (%)	
	Ração peixe	Ração soja
10:0	0,45 ± 0,05	0,14 ± 0,04
12:0	0,45 ± 0,05	0,30 ± 0,21
15:0	0,67 ± 0,02	nd
16:0	19,47 ± 0,37	12,25 ± 0,08
17:0	0,79 ± 0,10	nd
18:0	3,02 ± 0,06	3,22 ± 0,04
20:0	4,58 ± 0,10	nd
Σ Saturado	29,43 ± 0,7	15,91 ± 0,4
16:1	7,70 ± 0,21	0,34 ± 0,01
17:1	0,89 ± 0,10	nd
18:1 c6	14,27 ± 0,16	21,79 ± 0,16
18:1 c9	2,47 ± 0,02	1,40 ± 0,01
20:1	2,70 ± 0,10	nd
Σ Monoinsaturado	28,03 ± 0,60	23,53 ± 0,20
18:2	10,75 ± 0,29	52,58 ± 0,30
18:3	2,70 ± 0,30	4,72 ± 0,12
20:5	11,05 ± 0,26	0,20 ± 0,01
22:6	12,19 ± 0,32	0,13 ± 0,03
Σ Poliinsaturado	36,69 ± 1,20	57,63 ± 0,60

Dados obtidos em triplicata de 2 experimentos. Resultados expressos em média e desvio padrão

Intervalo de confiança para a diferença dos índices médios de lipoperoxidação no tecido PLASMÁTICO

w3

Grupo	Média	Desvio padrão
w3c	0,396	0,062
w3e	0,309	0,058

$$IC (\mu_{w3c} - \mu_{w3e}; 95\%) = [0,031; 0,143]$$

w6

$$IC (\mu_{w6c} - \mu_{w6e}; 95\%) = [0,538; 0,648]$$

Grupo	Média	Desvio padrão
w6c	0,850	0,077
w6e	0,257	0,030

FIGURA 28 – Box-plots da lipoperoxidação do tecido plasmático dos animais experimentais

Intervalo de confiança para a diferença dos índices médios de lipoperoxidação no tecido HEPÁTICO

w3

Grupo	Média	Desvio padrão
w3c	0,870	0,062
w3e	0,621	0,109

$$IC (\mu_{w3c} - \mu_{w3e}; 95\%) = [0,164; 0,333]$$

w6

$$IC (\mu_{w6c} - \mu_{w6e}; 95\%) = [0,206; 0,347]$$

Grupo	Média	Desvio padrão
w6c	0,761	0,092
w6e	0,485	0,053

FIGURA 29 – Box-plots da lipoperoxidação do tecido hepático dos animais experimentais

Intervalo de confiança para a diferença dos índices médios de lipoperoxidação no tecido CEREBRAL

w3

Grupo	Média	Desvio padrão
w3c	1,767	0,161
w3e	1,080	0,103

$$IC (\mu_{w3c} - \mu_{w3e}; 95\%) = [0,560; 0,814]$$

w6

$$IC (\mu_{w6c} - \mu_{w6e}; 95\%) = [0,075; 0,273]$$

Grupo	Média	Desvio padrão
w6c	1,127	0,089
w6e	0,953	0,120

FIGURA 30 – Box-plots da lipoperoxidação do tecido cerebral dos animais experimentais

FIGURA 31 – Box-plots da lipoperoxidação do tecido cardíaco dos animais experimentais

FIGURA 32 – Box-plots da lipoperoxidação do tecido adiposo dos animais experimentais

FIGURA 33 – Box-plots da lipoperoxidação do tecido renal dos animais experimentais

FIGURA 34 – Box-plots para o percentual de incorporação lipídica no plasma dos animais

FIGURA 35 - Box-plots para o percentual de incorporação lipídica no fígado dos animais

FIGURA 36 – Box-plots para o percentual de incorporação lipídica no cérebro dos animais

FIGURA 37 – Box-plots para o percentual de incorporação lipídica no coração dos animais

FIGURA 38 – Box-plots para o % de incorporação lipídica nos adipócitos dos animais

FIGURA 39 – Box-plots para o percentual de incorporação lipídica nos rins dos animais

Na **tabela 10**, observa-se o perfil de ácidos graxos das rações experimentais (peixe e soja) oferecidas aos ratos, sugerindo que o perfil de ácidos graxos das rações experimentais reflete o tipo de óleo que foi adicionado nas rações.

As rações continham principalmente os ácidos palmítico (C 16:0), esteárico (C 18:0), oléico (C 18:1 ω 9) e linoléico (C18:2 ω 6). A ração óleo de soja, fornecida aos animais dos grupos experimental e controle ω 6, na sua composição, apresentou 52,58% de ácido linoléico (C18:2 ω 6). Estes dados estão em consonância com os da literatura, pressupondo-se que dietas ricas em óleo de soja contêm em torno de 54% de ácido linoléico (THAIN e col, 1981). Já a ração óleo de peixe foi a única que conteve os ácidos gordoico (C 20:1 n 9) 2,70%, eicosapentaenoico (EPA – C 20:5 n 3) 11,05% e o docosahexaenoico (DHA – C 22:6 n 3) 22,19%. Estes resultados encontram-se de acordo com os descritos por MOREIRA e MANCINI-FILHO (1997) (2001).

Mediante a composição das rações administradas aos animais, foi possível obter, após 45 dias de tratamento, os perfis lipídicos das composições teciduais plasmáticas, hepáticas, cardíacas, cerebrais, adiposas e renais dos animais experimentais (**anexo 19 e figuras 34 a 39**).

Tem-se o conhecimento de que diferentes tecidos metabolizam preferencialmente certos ácidos graxos e, com isso, pode-se ter uma maior ou menor mobilização de um determinado ácido graxo dentro dos seguintes parâmetros: 1) com seu fornecimento na dieta, 2) outros componentes oferecidos que podem influenciar no seu percentual de incorporação, como antioxidantes dietéticos, e 3) fatores externos como situações de estresse e doenças (THAIN e col, 1981). Por exemplo, o AA é, particularmente, abundante nas organelas hepáticas e relativamente baixo no cérebro. No presente estudo, observa-se o maior percentual de incorporação tanto no tecido hepático, bem como no plasmático, dos animais que receberam a ração à base de óleo de soja, ou seja, 21,20% e 17,05% para os grupos

controle e 26,56% e 21,08%, para os grupos experimentais, respectivamente. Verifica-se, por conseguinte, uma modificação no perfil de incorporação do AA nestes tecidos, quando o chá foi introduzido, havendo a diferença significativa entre os grupos.

Já para o ácido linoléico (C18:2 ω 6), o maior percentual de incorporação é no tecido cardíaco e o menor, no tecido cerebral (THAIN e col, 1981). No presente estudo, pode-se observar que nos tecidos cardíaco e cerebral, dos animais que receberam tanto a ração à base de óleo de peixe, bem como à base de soja, apresentaram diferentes percentuais de incorporação quando comparados aos grupos controles dos experimentais.

Para os animais que receberam dieta à base de óleo de peixe, a incorporação do ácido linoléico no tecido cardíaco se deu por um percentual de 13,60% e 24,50%, para os grupos controle e experimental, respectivamente. Já, para os animais que receberam a ração à base de óleo de soja, a diferença entre o grupo experimental e controle, quanto à incorporação do ácido linoléico, foi mais evidente, apresentando valores correspondentes a 45,7% e 15%, respectivamente (**figura 40**).

No tecido cerebral, apesar do percentual de incorporação de ácido linoléico ser menor do que no tecido cardíaco, esta diferença entre os grupos controle e experimental para ambas as rações, também foi detectada. Para os animais que receberam a ração à base óleo de peixe, apresentaram os seguintes percentuais de incorporação: 2,40% para o grupo controle e 13,70% para o grupo experimental. Entretanto, no grupo à base de óleo de soja, a diferença não foi tão pronunciada, com valores de 10,90% para o grupo controle e 11,80% para o grupo experimental. Nos tecidos plasmáticos e hepáticos não houve diferença significativa entre os grupos (para P valores < 0,05).

O tecido renal (com a ração peixe) foi o único o qual o grupo controle exibiu maior percentual de incorporação de ácido linoléico, isto é, 11,70% para o grupo controle e 1,20% para o grupo experimental. Já, para a ração

soja, pode-se verificar o mesmo comportamento dos demais tecidos. O grupo controle teve 39,30% de incorporação de ácido linoléico e o experimental, 42,70% (figura 40).

FIGURA 40 - Espectros de massa do 18:2 (ácido linoléico) (A) e 20:4 (ácido araquidônico) (B) e comparação do % de incorporação dos ácidos graxos 18:2 e 20:4 dos tecidos dos animais experimentais que receberam a dieta rica em $\omega 6$

O perfil de incorporação do ácido linoléico é refletido no percentual do AA, visto que este ácido graxo é elongado e dessaturado a partir da presença dietética do ácido linoléico. Verifica-se, portanto, o mesmo comportamento dos grupos controle e experimental quanto ao percentual de incorporação do ácido linoléico nos tecidos avaliados. Todavia, para o tecido renal, houve uma inversão de valores do AA em relação ao ácido linoléico quando comparados o grupo experimental com seu respectivo controle. Neste tecido, o grupo experimental apresentou um perfil de incorporação de 8,8% em comparação ao controle, de 5,60% (**figura 40**).

No EPA presente, principalmente, na ração rica em óleo de peixe, observou-se um percentual de incorporação, sem diferença significativa entre os grupos controle e experimental, para os tecidos plasmático, hepático, cardíaco e adiposo. Porém, para o tecido cerebral que utiliza preferencialmente este ácido graxo, houve diferença significativa nos percentuais de incorporação entre os grupos experimental e controle, com uma média de 9,10% e 0%, respectivamente. Estes dados dão indícios de haver um fator protetor no grupo experimental, que pode ter sido fornecido pelo chá rico em substâncias fenólicas. O chá foi a única variável diferencial dos grupos controle e experimental (**figura 41**).

Entretanto, para o DHA, presente na ração à base de óleo de peixe, foi verificado um percentual de incorporação diferenciado para os tecidos dos animais dos grupos controle e experimental (**figura 41**).

Nos tecidos plasmático, cardíaco e cerebral ocorreu uma maior incorporação de DHA no grupo controle, com os seguintes valores: 9,1%, 13,3% e 13,6% e, para o experimental, com os valores: 6,7%, 8,1% e 5,3%, nos respectivos tecidos. Logo, para o tecido hepático e adiposo não houve distinção entre os percentuais. No entanto, somente o tecido renal mostrou diferença significativa entre o aumento do perfil de incorporação para o grupo experimental em relação ao seu controle com valores: 10,9% e 5,3%, respectivamente (**figura 41**).

FIGURA 41 – Espectros de massa do EPA (C) e DHA (D) e comparação do % de incorporação dos ácidos graxos EPA e DHA dos tecidos dos animais experimentais que receberam a dieta rica em $\omega 3$

Estes resultados demonstraram que os tecidos possuem comportamentos distintos quanto à incorporação dos diferentes ácidos graxos, assim como, quando estão associados à ingestão de antioxidantes,

levando-se a inferir, que há uma relação direta entre a presença de antioxidantes e a incorporação tecidual dos ácidos graxos.

As diferenças nos percentuais de incorporação dos diferentes ácidos graxos nos tecidos dos animais que receberam ora a ração à base de óleo de soja, ora à base de peixe, quando comparados entre os grupos experimentais (chá) e controles (placebo), refletiram no somatório global dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e polinsaturados.

Verificou-se que os percentuais médios de incorporação de ácidos graxos no tecido **cerebral** (**figura 36**), apresentaram diferenças na distribuição dos dados nos grupos ω 3C e ω 3E; os valores do percentual médio de incorporação de ácido graxo saturado e poliinsaturado são maiores no grupo experimental do que no grupo controle, enquanto que para a distribuição de ácido graxo monoinsaturado ocorre justamente o contrário. No entanto, entre os grupos ω 6C e ω 6E não existem diferenças.

Para o tecido **cardíaco** (**figura 37**), notam-se as mesmas tendências para as composições dos ácidos graxos entre os grupos ω 3C e ω 3E e entre os grupos ω 6C e ω 6E. Na **figura 35**, referente ao tecido **hepático**, não existiu diferença entre os grupos controle e experimental, ou seja, os ácidos graxos saturados, monoinsaturados e polinsaturados possuem as mesmas distribuições nos grupos experimentais em comparação aos seus controles.

O **plasma** (**figura 34**) apresentou os valores de percentual médio do ácido graxo saturado maior no grupo experimental do que no grupo controle, enquanto as distribuições de ácidos graxos monoinsaturados e polinsaturados não diferem entre os grupos. Neste caso, as respectivas medianas apresentam um leve decréscimo no grupo experimental ω 3 em relação ao seu controle. Para o grupo dietético ω 6 pode-se observar que as distribuições das composições de ácidos graxos saturados e monoinsaturados não são distintas entre os grupos controle e experimental, enquanto que para os ácidos graxos polinsaturados houve um aumento nos valores para o grupo experimental em relação ao controle.

A **figura 39** refere-se ao tecido **renal**. Entre os grupos controle e experimental não houve diferença nos valores sobre percentual médio de incorporação de ácidos graxos saturados, tanto para o grupo dietético $\omega 3$, quanto $\omega 6$. Entre os grupos controle e experimental $\omega 3$, observa-se que os valores de ácidos graxos monoinsaturados são maiores no experimental quando comparados ao controle. Para os ácidos graxos poliinsaturados ocorreu uma diminuição dos valores do grupo experimental em relação ao controle. Já, para o grupo $\omega 6$, aconteceu ao contrário: entre os ácidos graxos monoinsaturados existiu um pequeno decréscimo do grupo experimental, quando comparado ao controle. Entre os poliinsaturados houve um pequeno aumento nos valores encontrados no grupo experimental em relação ao controle, o que pode ser desprezível se for levado em conta a dispersão dos dados (análise inferencial).

Para o tecido **adiposo**, referente a **figura 38**, no grupo dietético $\omega 3$, houve indícios de que, em média, os percentuais de incorporação dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados não diferem entre os grupos controle e experimental. O mesmo ocorre com o grupo dietético $\omega 6$.

Diante do exposto, estes dados contribuem com as evidências de que as propriedades de membranas estejam diretamente influenciadas pela composição de ácidos graxos, principalmente pelo grau de insaturação (DE GER e col, 1968; CHEN e RICHARDSON, 1971; SCARPA e DE GIER, 1971; ROMAN e col, 1979; TAHIN e col, 1981; MOREIRA e col, 2001).

Outro fator muito discutido na literatura é a susceptibilidade que lípidos insaturados têm frente ao processo oxidativo. A fim de remediar este fator é feito o uso de antioxidantes (SANT'ANA e MANCINI FILHO, 1995).

Compostos fenólicos com atividade antioxidante são utilizados como substâncias capazes de inibir o processo oxidativo, tanto *in vitro* (MIRANDA e col, 1998) quanto *in vivo* (SANT'ANA e MANCINI FILHO, 2002). Somando-se a isto, reações oxidativas onde atuam as enzimas LOX e COX, participantes do processo de alongação e dessaturação de ácidos graxos

polinsaturados, podem ser inibidas por substância fenólicas com atividade antioxidante (SCHUBERT e col, 1999).

No presente trabalho foi avaliado o efeito antioxidante de substâncias fenólicas de especiarias sobre os ácidos graxos polinsaturados das séries $\omega 3$ e $\omega 6$. Verificou-se a capacidade protetora do extrato da mistura das especiarias sobre o sistema oxidativo, como também sobre a peroxidação lipídica de tecidos de ratos experimentais. Esta proteção à oxidação tecidual foi refletida nos perfis lipídicos dos tecidos analisados quando comparados aos seus controles.

Portanto, diante dos resultados de lipoperoxidação e perfil lipídico dos tecidos dos animais experimentais, justificou-se uma investigação sobre a provável ação dos compostos fenólicos das especiarias mostarda, canela e erva doce sobre as enzimas que atuam no metabolismo de ácidos graxos polinsaturados das séries $\omega 3$ e $\omega 6$: LOX e COX. Para tal, ensaios de inibição enzimática foram conduzidos (**figuras 42 e 43**).

A COX e LOX foram inibidas pelo extrato rico em compostos fenólicos (catecol, ácido salicílico e caféico), levando-se a concluir que estas substâncias atuam diretamente no metabolismo de lipídeos polinsaturados, visto que o substrato utilizado no meio foi o ácido linoléico ($\omega 6$).

Na **figura 42**, pode-se observar os percentuais de inibição, conferidos pelos extratos oferecidos aos animais experimentais, sobre a LOX 1B da Sigma® que apresentou 112.000 unidades por mg. O chá das especiarias não diluído, assim como, em concentrações de 100 e 200 ppm, apresentou o máximo da atividade inibitória da LOX, ou seja, cerca de 90%. Esta atividade inibitória apresentou uma diferença significativa em relação ao controle positivo (um inibidor de LOX), para P valores < 0,05.

FIGURA 42 – Atividade de inibição da lipoxigenase por compostos fenólicos da mistura teste das especiarias mostarda, canela e erva doce

O mesmo verifica-se com o ensaio de inibição da COX, com atividade em torno de 26%, no meio analisado, em comparação ao controle positivo, (indometacina) de 22,5% (**figura 43**).

FIGURA 43 – Atividade de inibição da cicloxigenase por compostos fenólicos da mistura teste das especiarias mostarda, canela e erva doce

Considerando que substâncias fenólicas já possuem sua ação antiinflamatória averiguada em alguns trabalhos, como agentes que podem interferir na biossíntese dos eicosanóides (SCHUBERT e col, 1999), estes resultados contribuem com os dados da literatura. Reforçam, também a hipótese de que as substâncias fenólicas de especiarias podem agir no metabolismo de ácidos graxos polinsaturados das séries $\omega 3$ e $\omega 6$, por inibição da peroxidação lipídica, podendo levar a uma modificação do perfil de tecidos, principalmente sobre ácidos graxos polinsaturados, e por inibição de enzimas que participam da biossíntese dos eicosanóides: LOX e COX.

5.4. Considerações finais

A atividade antioxidante dos extratos e frações fenólicas das especiarias mostarda, canela e erva doce, como de sua mistura-teste foram comparadas ao antioxidante sintético BHT, o mesmo que é utilizado na indústria alimentícia e é apontado, pela literatura, como tendo alguns efeitos colaterais. A atividade antioxidante apresentou-se estável nos respectivos meios de reação avaliados sendo, na maioria das vezes, superiores ao BHT.

Este efeito inibitório permaneceu no ensaio biológico, quando foi verificado que ocorreu uma diminuição significativa da peroxidação lipídica em todos os tecidos avaliados dos animais que receberam o extrato (chá da mistura das especiarias), refletindo no perfil lipídico, principalmente, no percentual de incorporação dos ácidos graxos polinsaturados e na regulação da biossíntese dos eicosanóides por meio da inibição das enzimas COX e LOX.

A biossíntese dos eicosanóides pode ocorrer: a) via COX, responsável pela transformação cíclica do AA a prostaglandinas e tromboxanos das séries 2 ou b) via LOX, que cataliza de maneira linear as transformações dos substratos do AA para formação de leucotrienos.

A via COX pode ser inibida por indometacina e outros agentes anti-inflamatórios, como o ácido acetil salicílico. A mistura das especiarias

mostarda, canela e erva doce foi capaz de inibir em torno de 74% esta enzima, com efeitos equivalentes à indometacina, utilizada como inibidor conhecido de COX e controle positivo da reação.

O mesmo foi observado no ensaio de inibição via LOX, no qual o mesmo extrato foi capaz de inibir esta enzima, que permaneceu apenas com uma média de 10% de sua atividade.

Trazendo estes dados para o universo da Alimentação e da Nutrição, confirma-se a importância dos nutrientes, de sua regulação via mecanismos de digestão, absorção e metabolismo, como também, de harmonia e interação no corpo humano. Os lípides, na condição de nutriente estrutural, necessitam de antioxidantes em função da sua suscetibilidade à oxidação. Tais substâncias agem diretamente sobre os lípides protegendo-os da ação oxidante e/ou agindo diretamente na regulação do seu metabolismo.

Neste sentido pode-se defender a aplicabilidade de dietas com efeito terapêutico. A título de exemplo, tem-se a chamada Dieta do Mediterrâneo. Esta dieta é rica em frutas, vegetais, grãos e óleos derivados de plantas, especialmente o azeite de oliva. Embora o efeito protetor de tal dieta seja de caráter multifatorial como, por exemplo, o consumo proporcional de lípides saturados e polinsaturados, destaca-se a presença de vários vegetais, incluindo especiarias, vinho tinto e chás. Estes últimos, caracterizam-se pela presença de substâncias fenólicas, derivadas do ácido cinâmico, como o ácido caféico, que refletem na baixa oxidação de constituintes lipídicos, prevenindo o desenvolvimento de doenças degenerativas como a aterosclerose, por exemplo, este efeito é devido a ação sobre mediadores inflamatórios, ou seja, compostos fenólicos agem inibindo as enzimas que formam eicosanóides a partir do AA.

Ainda assim, várias pesquisas sobre substâncias fenólicas de plantas foram ignoradas até os estudos de HERTOGE e cols (1993). Estes autores contribuíram para o redirecionamento das pesquisas com substâncias fenólicas, principalmente sobre o processo oxidativo.

O processo oxidativo desencadeia uma série de alterações em alimentos e organismos vivos, exemplificando, a modificação do perfil de ácidos graxos de membranas decorrentes da oxidação, que por sua vez reflete na resposta fisiológica, podendo ser a causa de doenças crônico-degenerativas como aterosclerose e câncer. O uso de antioxidantes naturais, como compostos fenólicos de plantas, que por ação na inibição da oxidação, patogenicidade de doenças e produção de eicosanóides são os mecanismos que refletem as pesquisas em antioxidantes (SCHRAMM e GERMAN, 1998).

Conforme as observações sobre as possibilidades de atuação de compostos fenólicos de plantas, principalmente de especiarias, misturas destas têm sido elaboradas para encontrar um perfil sensorial e químico que permita sua efetividade nos alimentos ou em organismos vivos. GROHS e KUNZ (2000) pesquisaram a mistura de 5 especiarias com a finalidade de inibir o crescimento microbiano em alimentos, contribuindo para diminuir a deterioração de alimentos.

Assim com o processo de aplicação de misturas de especiarias, a forma de consumo destas também tem sido investigada, mediante o seu alto consumo mundial, o qual está relacionado com a baixa incidência de doenças crônico-degenerativas (VINSON e col, 1998).

Observou-se então, que o chá de especiarias inibiu tanto a COX como a LOX, catalizando a formação de eicosanóides. Esta atuação pode ter um efeito indireto na inibição do processo inflamatório, além de um efeito antioxidante generalizado e, ainda, uma inibição da patogênese de doenças ainda mais complexas, tais como AIDS, câncer, aterosclerose e diabetes. Estes dados são suportados por achados de autores que confirmam a atuação de substâncias fenólicas sobre doenças de grande resposta inflamatória (SCHUBERT e col, 1999).

FIGURA 44 - Esquema de ação de compostos fenólicos que podem bloquear ou inibir a formação de doenças. (1) oxidação de monossacarídeos, (2) glicação, (3) glicooxidação, (4) replicação bacteriana, (5) replicação de bactérias, (6) ativação de leucócitos e produção de mediadores inflamatórios, (7) adesão de leucócitos e diapedese, (8) formação da *foam cell* e proliferação celular, (9) ligação com receptores de estrogênio e (10) ativação de protease no sistema local (SCHRAMM e GERMAN, 1998)

Assim como os trabalhos de MCKAY e BLUMBERG (2002), que verificaram o efeito protetor de substâncias fenólicas de chás em doenças crônico-degenerativas, o presente trabalho também avaliou sensorialmente o chá das especiarias mostarda, canela e erva doce, dando certa continuidade ao assunto, avaliando sua aplicação efetiva em grupos específicos.

Desta forma, um chá foi elaborado, submetido a avaliação sensorial, com público delimitado e com as variáveis identificadas, visando caracterizar o produto, que a propósito, teve 90% de aceitação global, conforme pode ser observado no **Apêndice**.

Com os resultados do presente estudo é possível concluir que a mistura das especiarias mostarda, canela e erva doce tem um potencial antioxidante que, provavelmente, atua sobre o metabolismo lipídico. Estes mesmos resultados sugerem uma aplicação destas especiarias não só na indústria alimentícia, como também em alimentos funcionais que potencialmente podem proteger os seres humanos, atuando como agentes terapêuticos no tratamento de doenças que levam a grande resposta inflamatória.

Pesquisas recentes, levantadas por MCKAY e BLUMBERG (2002) apontaram para a ação direta de substâncias fenólicas presentes em chás de especiarias sobre a saúde humana, atuando sobre doenças crônico-degenerativas, sendo reforçado pelo potencial antioxidante destas substâncias naturais. Portanto, maiores investigações científicas e ensaios mais abrangentes são necessários para que outras conclusões possam ser obtidas a respeito da atuação dos compostos fenólicos de especiarias sobre o metabolismo lipídico.

Conclusões

6. Conclusões

Observou-se, no desenvolvimento experimental, que os compostos fenólicos das especiarias mostarda, canela e erva doce foram os responsáveis pela atividade antioxidante nos sistemas testados e atuaram no metabolismo dos ácidos graxos polinsaturados das séries $\omega 3$ e $\omega 6$ por inibição da peroxidação lipídica e por inibição das enzimas participantes da biossíntese dos eicosanóides: LOX e COX, possibilitando-se inferir as seguintes observações:

- A atividade antioxidante das especiarias foi equivalente e/ou superior ao antioxidante sintético BHT.
- Os fatores cinéticos obtidos da atividade antioxidante mostraram que os extratos e frações de fenólicos da mostarda contribuíram para a estabilidade da mistura obtida.
- Os ácidos catecol, salicílico e caféico, foram os principais compostos fenólicos presentes na especiarias estudadas.
- Houve diferença entre os grupos controle e experimental no perfil lipídico dos tecidos dos ratos.
- Não houve alteração na área de absorção nos duodenos dos animais experimentais.

Apêndice

Análise sensorial de um chá de especiarias

Introdução

Análise sensorial é uma técnica utilizada para **medir, analisar e interpretar** reações produzidas pelas características dos alimentos e materiais identificados pelos órgãos da **visão, odor, gosto, tato e audição**.

As características da qualidade de vários chás de especiarias é determinada pelo seus constituintes na composição do aroma (YAMANISGHI, 1972, 1973, 1974 E 1978).

A qualidade dos chás de especiarias é devida, portanto, às notas sensoriais e, conseqüentemente, a sua composição de compostos voláteis aromáticos. Parâmetros cromatográficos, por outro lado, são importantes coadjuvantes para a nota sensorial e para a determinação da qualidade de um bom chá (YAMANISHI, 1978).

Ervas utilizadas na culinária mundial, desde a antigüidade, têm seu uso no *flavor* dos alimentos. A FDA (*Food and Drug Administration*) tem classificado o uso e quantidades de várias especiarias em função das suas características tóxicas ou por seus efeitos benéficos (CRAIG, 1999). Por exemplo, o uso de alcaçuz, em pequenas concentrações, apresenta efeitos benéficos em úlceras gástricas e duodenais; contudo, quando presentes em altas quantidades, foram verificados casos letais, devido a seu efeito tóxico. CRAIG (1999) conclui em seu trabalho que é comprovado o efeito benéfico de várias ervas e especiarias, principalmente pela sua aplicação na culinária mundial; contrapondo-se a isto, é necessário que este uso seja feito de maneira ordenada, sem excessos para que não ocasionem efeitos deletérios.

Mostarda

A mostarda é utilizada como condimento de uso popular, utilizado principalmente em produtos cárneos e também, como complemento de outros condimentos em maioneses e molhos (BARBIERI e col, 1999).

A mostarda tem um sistema de liberação de sabor que é característica por ser encapsulado. A liberação desse sabor é possível pela conjugação de três fatores: a) glicosídeos – singirina na mostarda preta e a sinalbina na mostarda amarela; b) uma enzima natural presente na mostarda chamada de mirosinase; c) água que proporciona a mobilidade para a enzima e participa da reação de hidrólise na liberação do sabor. Os componentes do sabor são: isotiocianato de alila na mostarda preta e isotiocianato de p -hidroxibenzeno na mostarda amarela (BARBIERI e col, 1999).

A mostarda é uma árvore crucífera de zonas temperadas. A mostarda branca, tem em média 60 cm de altura e possui flores amarelas dispostas em ramos e sementes amarelo-claras de 3mm de diâmetro no máximo. A mostarda negra tem 1 metro de altura, sementes mais escuras e até 16mm de diâmetro. As sementes desta espécie se caracterizam por seu intenso sabor picante, podem ser utilizadas inteiras ou moídas depois de retirado o óleo. Diversos compostos participam da composição da mostarda e devem ser quantificados pois estão relacionados com a característica de qualidade (BARBIERI e col, 1999).

Canela

A canela pertence ao gênero *Cinamum* da família das *Laureáceas*. A planta lenhosa da canela permanece sempre verde e desenvolve um óleo essencial específico. Na qualidade da canela influi de maneira decisiva a idade da árvore, o clima, o ponto geográfico e a forma de preparação e conservação. A primeira colheita pode ser realizada dos 6 aos 10 anos, época em que se reúnem as condições necessárias para sua obtenção.

A árvore da canela é oriunda do Sul da Ásia e seu cultivo é extensivo a muitos países tropicais. A qualidade da canela pode depender da origem (China, Ceilão...) e está relacionada unicamente com o conteúdo do azeite que varia de uns tipos de canela a outros. Como regra geral, a canela deve conter mais de 1% de extrato etéreo e menos de 6% de cinzas (temperatura de incineração a 1000°C).

Erva doce

A erva doce é uma planta umbilífera, originária da costa mediterrânea, de 50cm de altura. Seus frutos maduros e descascados medem de 3 a 5 mm de largura e de 2 a 2,5mm de comprimento. Ambas as partes do pequeno fruto saem de uma fina película de 2 a 122mm de largura e mostram uma coloração de amarela a parda. Seu odor e sabor são muito aromáticos e contém em torno de 1 a 3% de óleo dos quais são 8 a 11% de extrato etéreo, de 11 a 13% de água e de 6 a 10,5% de cinzas.

Além das características sensoriais atribuídas às especiarias, os seus extratos também contêm componentes com atividade antioxidante. Deste fato é consequente a aplicação destas em diferentes preparações culinárias, para intensificar as características organolépticas, aumentar a aceitabilidade e, principalmente, melhorar a estabilidade oxidativa (MADSEN e col, 1996).

Os componentes responsáveis pela estabilidade oxidativa têm sido identificados em várias especiarias, tais como alecrim, sálvia, tomilho, cravo-da-índia, mostarda, canela e erva doce; estes compostos que possuem propriedade antioxidante apresentam compostos fenólicos (HERRMANN, 1973; MADSEN e col, 1996).

Diante disso, justifica-se, além de ensaios laboratoriais que avaliam a efetividade antioxidante destas substâncias em sistemas *in vitro* e *in vivo*, a análise sensorial de misturas que possibilitem uma provável aplicação destas substâncias fenólicas das especiarias.

Procedimento Experimental

Teste de aceitação

Foi utilizado um teste de escala hedônica estruturada com 9 pontos (**anexo 21**), com 190 provadores não treinados em uma única abordagem.

Foi feito um teste de recrutamento, para obter os dados importantes do painel com questionário (junto com a escala hedônica) entregue aos participantes juntamente com o sachê do chá. Para análise estatística dos dados foi utilizado o teste de análise em componentes principais (IFT, 1981).

Participantes da pesquisa

Seleção, Abordagem e critério de exclusão.

A seleção para a participação dos indivíduos na pesquisa foi realizada de maneira aleatória com adultos freqüentadores da USP em seu *campus* da Capital.

Os indivíduos foram informados, a respeito de sua participação voluntária por meio de um termo de consentimento fornecido (**anexo 20**), constando dados sobre a pesquisa, riscos e benefícios. A desistência em qualquer momento da pesquisa lhes foi permitida, assim como o acesso aos resultados da pesquisa a qual o participante colaborou.

Metodologia estatística

A freqüência de observações nas classes definidas para cada atributo foi analisada estatisticamente pelo teste não paramétrico qui-quadrado, adotando-se $\alpha = 0,05$ (BOWER, 1996).

Conforme observações adquiridas no questionário (vide anexo 2), os dados foram tratados estatisticamente; possibilitando, desse modo, uma análise multivariada de correspondência múltipla para identificar possíveis associações significativas (PIGGOTT, 1986).

Os procedimentos foram realizados através do *software Statistica v.6*, módulo *Multivariate Exploratory Techiques para Correspondence Analysis and Cluster* (STATSOFT, 2002).

Resultados e Discussão

Análise multivariada de correspondência múltiplas

Alguns tipos de chás são fontes de compostos fenólicos com significativa atividade antioxidante tanto *in vitro* e como *in vivo*. Muitos estudos associam o uso de chás à saúde, em particular na prevenção de doenças crônico-degenerativas (MCKAY e BLUMBERG, 2002).

Observados os resultados apresentados e com a perspectiva de utilização deste chá em protocolos experimentais, o presente trabalho também avaliou o perfil de aceitação e características sensoriais da mistura de especiarias (mostarda, canela e erva doce) rica em substâncias fenólicas (**tabelas 5, 6, e 8**) com atividade antioxidante (**tabela 3**).

Neste contexto, informações complementares obtidas dos provadores, pela aplicação de questionários (**anexo 21**), foram tratadas estatisticamente, possibilitando uma análise multivariada de correspondência múltipla, para identificar possíveis associações significativas (PIGGOTT, 1986). Os resultados apresentam-se nas **figuras 45 e 46**.

A mistura das especiarias foi fornecida em sachês de 1 grama cada a 190 provadores não treinados para o teste sensorial afetivo, utilizando uma escala hedônica de 8 cm com extremos de características de: “gostei muitíssimo” a “desgostei muitíssimo”. Foram Considerados as notas acima do indiferente (superior a 5) como percentual de aceitação global, obtendo-se uma média de 90% de aceitação frente aos provadores.

FIGURA 45 – Análise multivariada de correspondência múltipla – associação entre as características da população. Variáveis: (1) sexo: M- masculino; F- feminino; (2) frequência de consumo: OCA-ocasionalmente; DIA-diariamente; SEM-semanalmente; N- nunca tomaram chá antes; (3) associações ao consumo de chá: DOE-doença; S-sono; OUT-outras associações; PRE-prevenção; DIG-problemas digestivos;(4) faixa etária: 18-25; 26-33; 34-41; 42-49; >50.

Pela análise de *Cluster*, os provadores do sexo feminino associam o consumo de chá a problemas digestivos, patologias e até à prevenção de doenças, em oposição aos provadores do sexo masculino que não fazem associações específicas. Os indivíduos acima de 50 anos relacionam o consumo de chás diariamente a problemas referentes ao sono como, por exemplo, insônia. Outras associações estabelecidas em relação à faixa etária foram obtidas: (1) indivíduos na faixa etária entre 26 a 41 anos a não fazem associações entre o consumo de chá e doenças; (2) indivíduos na faixa etária entre 42 a 49 anos possuem o hábito ocasional de ingestão de chás e (3) o público Na faixa etária entre 18 a 25 anos consome chás semanalmente.

FIGURA 46 – Análise multivariada de correspondência múltipla – associação entre as características da aceitabilidade e propriedades específicas. Variáveis: cor (cor), sabor amargo (Am) e sensação de adstringência (Ad): extremos de fraco e forte com notas de 0 a 9. Já para a variável temperatura (T): extremos de baixa e alta com notas de 0 a 9.

A cor amarelo (nos extremos fraco e forte) e baixas temperaturas (frio a moderado) estiveram mais relacionadas às baixas notas de aceitação do chá, dentre as variáveis estabelecidas: cor, sabor, temperatura e odor. Quanto as demais variáveis, 90% dos provadores que aceitaram o chá caracterizaram-no pontualmente, considerando-o com odor suave, pouco amargo e baixa sensação de adstringência.

Assim como misturas de especiarias, a forma de consumo destas também tem sido investigada, mediante o seu alto consumo mundial, o qual está relacionado com a baixa incidência de doenças crônico-degenerativas. VISON e col (1998) que associam os fenólicos solúveis em chás com a ação protetora em lipoproteínas. MCKAY e BLUMBERG (2002) corroboram com

estudo sobre substâncias fenólicas presentes em chás de especiarias sobre a saúde humana, atuando sobre doenças crônico-degenerativas, sendo reforçado pelo potencial antioxidante destas substâncias naturais. Portanto, dos resultados encontrados, justifica-se a continuidade da pesquisa com o chá da mistura obtida, o qual apresentou um bom perfil sensorial, em diversas faixas etárias, para assegurar o efeito deste como um alimento funcional.

7. Referências bibliográficas

- ABDALLA, D.S.P. Antioxidantes. 1. Conceitos básicos e perspectivas terapêuticas. **ARS CURANDI**, São Paulo, p.143-164, 1993.
- ARELLANO-BARRERA, D., ESTEVES, W. Atividade antioxidante de substâncias fenólicas em sistemas aquoso e lipídico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Rio de Janeiro, v.9, n.2, p. 107-114, 1989.
- ARENDE, W.P., DAYER, J.M. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor α in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, New York, v.38, p.151-60, 1995.
- ARON, H. Über den nährwert (On the nutritional value). **Biochem. Z.**, Berlin, v.92, p.211-233, 1918.
- ARUROMA, O.I. Free radicals and food. **Chem. Ber.**, Berlin, v.29, n.3, p.210-214, 1993.
- ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC**. 13.ed. Washington, 1980. 858p.
- BARBIERI, T., HOUGH, G., IGLESIAS, H. Análisis sensorial de semillas de mostaza. In: ALMEIDA, T.C.A. **Avanços em Análise sensorial**. São Paulo, ed. Varela, 1999. 286p.
- BARLOW, S.W. Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. In: HUDSON, B.J.F., ed. **Food antioxidants**. Amsterdam: Elsevier, 1990. p.253-307.
- BERGSTROM, S. On the oxidation of linoleic acid with lipoxidase. **Ark. Kemi, Mineral. Geol.**, Stockholm, v.21A, n.15, 21 (5): 1-8 1946.
- BJORKMAN, D.J. The effect of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on prostaglandins. **Am. J. Med.**, Philadelphia, v.105, p.8S-12S, 1998.
- BOWER, J.A. Statistics for food science III: sensory evaluation data. Part B. Discrimination tests. **Nutr. Food Sci.**, Bradford, v.2, p.16-22, 1996.
- BRACO, U., LOLIGER, J., VIRET, J. Production and use of natural antioxidants. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.58, p.686-690, 1981.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.72, p.677-685, 1985.
- BRANEN, A.L. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.52, p.59-63, 1975.

- BRIESKORK, C.H., FUNCHS, A., BREDEBERG, J.B., MCCHESENEY, J.D., WENKERT, E. **J. Org. Chem.**, Columbus, v.29, p.2293-2298, 1964.
- BRIVIDA, K., SIES, A. Nonenzymatic antioxidant defense systems. In: FREI, B., ed. **Natural antioxidants in human health and disease**. San Diego: Academic Press, 1994. p.107-128.
- BUNDY, G.L., NIDY, E.G., EPPS, D.E., MIZSAK, S.A., WNUK, R.J. Discovery of an arachidonic acid C8 lipoxygenase in the grogonian coral *Pseudoplexaura porosa*. **J. Biol. Chem.**, Birmingham, v.261, p.747-751, 1986.
- BURR, G.O., BURR, M.M. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. **J. Biol. Chem.**, Birmingham, v.82, p.345-346, 1929.
- BURR, G.O., BURR, M.M. On the nature of the fatty acids essential in nutrition. **J. Biol. Chem.**, Birmingham, p.587-621, 1930.
- BUSSAB, W. O e MORETTIN, P. A. (2002). Estatística básica. 5ª ed. São Paulo: **Saraiva**. 526p.
- CHEN, L., LUND, D.B., RICHARDSON, T. . Essential fatty acids and glucose permeability of lecithin membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.225, p.89-95, 1971.
- CHILCOTT, R.P., BROWN, R.F.R., RICE, P. Non-invasive quantification of skin injury resulting from exposure to sulphur mustard an Lewisite vapours. **Burns**, Guildford, v.26, p.245-250, 2000.
- CHIPAULT, J.R., MIZUNO, G.R., HAWKINS, J.M. The antioxidant properties of natural spices. **Food Res.**, Birmingham, v.17, p.46, 1952.
- CINTRA, R.M.G.C. Efeito antioxidante de especiarias: avaliação da *salsa* (*Petroselinum sativum Hoffm*), cebolinha verde (*Allium shoenoprasum L.*), orégano (*Origanum vulgare L.*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*). São Paulo, 1999. 147p (Tese de Doutorado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- CINTRA, R.M.G.C., MANCINI-FILHO, J. Efeito antioxidante de especiarias: avaliação e comparação de métodos *in vitro* e *in vivo*. **Nutrire**, São Paulo, v.22, p.49-62, 2001.
- CLARKE, S.D., AMSTRONG, M.K. Suppression of rat liver fatty acid synthetase mRNA level by dietary fish oil. **FASEB J.**, Bethesda, v.2, p.A852, 1986.
- CRAIG, W.J. Health-promoting properties of common herbs. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.70, suppl., p.491S-499S, 1999.

Referências bibliográficas

- DABROWSKI, K.J., SOSULSKI, F.W. Quantification of free and hydrolyzable phenolic acids in seeds by capillary gas-liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.32, p.123-127, 1984.
- DE BONO, D.P. Free radicals and antioxidants in vascular biology: the roles of reaction kinetics, environment and substrate turnover. **Q. J. Med.**, Oxford, v.87, p.445-453, 1994.
- DE GIER, J., MANDERSLOOT, J.G., VAN DEENEN, L.L.M. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.150, p.666-675, 1968.
- DECKER, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutr. Rev.**, Secaucus, v.55, n.11, p.396-407, 1997.
- DECKER, E.A. Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of foods to maximize oxidative stability. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 9, p. 241-248, 1998.
- DODERER, A., KOKKELINK, I., VAN DER VEEN, S., VALK, B.E., SCHRAM, A.W., DOUMA, A.C. Purification and characterization of two lipoxygenase isoenzymes from germinating barley. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1120, p.97-104, 1992.
- DOHI, T., ANAMURA, S., SHIRAKAWA, M., OKAMOTO, H., TSUJIMOTO, A. Inhibition of lipoxygenase by phenolic compounds. **Jpn. J. Pharmacol.**, Kyoto, v.55, p.547-550, 1991.
- DUBOIS, M., GILEES, K.A., HAMILTON, J.K., RIBERS, P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, Columbus, v.28, p.350-356, 1956.
- DURAN, R.M., PADILLA, B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos, **Grassas Aceites**, Sevilla, v.44, n.2, p.101-106, 1993.
- DUVE, K.J., WHITE, P.J. Extraction and identification of antioxidants in oats. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.61, n.6, p.365-370, 1991.
- DYERBERG, J., BANG, H.O., STOFFERSEN, E., MONCADA, S., VANE, J.R. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis. **Lancet**, London, v.2, p.117, 1978.
- ELLIOT, M.J., MAINI, R.N., FELDMANN, M. *et al.* Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor α (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. **Lancet**, London, v.334, p.1105-1110, 1994.
- FANTOZZI, P., MONTEDORO, G. Dosage des composés phénoliques dans les drups d'olives à différents stades de maturation. **Ind. Aliment. Agric.**, Paris, v.95, n.12, p.1335-1339, 1978.

- FATTORE, L., MELIS, M., DIANA, M., FRATTA, W., GESSA, G. The cyclo-oxygenase inhibitor nimesulide induces conditioned place preference in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v.406, p.75-76, 2000.
- FENTON, T.W., LEUNG, J., CLANDININ, D.R. Phenolic components of rapeseed meal. **J. Food Sci.**, Chicago, v.45, p.1702-1705, 1980.
- FIORENTINO, P.M., CAIRNS, B.E., HU, J.W. Development of inflammation after application of mustard oil or glutamate to the rat temporomandibular joint. **Arch. Oral Biol.**, Amsterdam, v.44, p.27-32, 1999.
- FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids. **J. Biol. Chem.**, Birmingham, v.226, p.497, 1957.
- FORNAROLI, S., PETRUSSA, E., BRAIDOT, E., VIANELLO, A., MACRI, F. Purification of a plasma membrane-bound lipoxygenase from soybean cotyledons. **Plant Sci.**, Amsterdam, v.145, p.1-10, 1999.
- FUNK, M.O., CARROL, R.T., THOMPSON, J.F., SANDS, R.H., DUNHAM, W.R. Role of iron in lipoxygenase catalysis. **J. Am. Chem. Soc.**, Columbus, v.112, p.5375-5376, 1990.
- GALLI, C., SIMOPOULOS, A.P., eds. **Dietary ω 3 and ω 6 fatty acids: biological effects and nutritional essentiality**. New York: Plenum Press, 1989. 452p. (NATO ASI Series. Series A, Life Sciences, v.171) (Proceedings of a NATO Advanced Research Workshop on Dietary [Omega] 3 and [Omega] 6 Fatty Acids: Biological Effects and Nutritional Essentiality, held in Belgrade, Italy).
- GERMAN, J.B., CREVERLING, R.K. Identification and characterization of a 15-lipoxygenase from fish gills. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.38, p.2144-2147, 1990.
- GIRON, M.D., MATAIX, F.J., FAUS, M.J., SUÁREZ, M.D. Effect of long term feeding of oil and sunflower oil on fatty acid composition and desaturation of liver microsomes. **Biochem. Int.**, New York, v.19, p.645, 1989.
- GONZALES, M.J., SCHEMMEL, R.A., GRAY, J.I., DUGAN, L., SHEFFIELD, L.G., WELSH, C.W. Effect of dietary fat on growth of MCF-7 and MDA-MB31 human breast carcinomas in athymic nude mice: relationship between carcinoma growth and lipid peroxidation product levels. **Carcinogenesis**, Oxford, v.12, n.7, p.1231-1235, 1991.
- GROHS, B.-M., KUNZ, B. Use of spice mixtures for the stabilisation of fresh portioned pork. **Food Control**, Amsterdam, v.11, p.433-436, 2000.
- GUIMARÃES, A.R.P., SITNIK, R.H., NASCIMENTO-CURI, C.M.P.O., CURI, R. Polyunsaturated and saturated fatty acids-rich diet and immune tissues. **Biochem. Int.**, New York, v.22, p.1005-1013, 1990.

- HAAS, D.A., NAKANISHI, O., MACMILLAN, R.E., JORDAN, R.C., HU, J.W. Development of an orofacial model of acute inflammation. **Arch. Oral Biol.**, Amsterdam, v.37, p.417-422, 1992.
- HAMBERG, M., GARDNER, H.W. Oxylipin pathway to jasmonates: biochemistry and biological significance. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1165, p.1-18, 1999.
- HARTMAN, L., LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. **Lab. Pract.**, London, v.22, p.475-476, 1973.
- HENDERSON, B., PETTIPHER, E.R., HIGGS, G.S. Mediators of rheumatoid arthritis. **Br. Med. Bull.**, Oxford, v.43, p.415-28, 1987.
- HERTOG, M.G.L., FESKENS, E.M., HOLLMAN, P.C.H. KATEN, M.B., KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. **Lancet** 342, 1007-1011, 1993.
- 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.
- HISEH, R.J. GERMAN, J.B., KINSELLA, J.E. Lipoxygenase in fish tissue: some properties of the 12-lipoxygenase from trout gill. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.36, p.680-685, 1988.
- 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).
- HSU, H.H., PAN, B.S. Effects of protector and hydroxyapatite partial purification on satability of lipoxygenase from gray mullet gill. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.44, p.741-745, 1996.
- INATANI, R., NAKATANI, N., FUWA, H. Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.). **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.47, p.521-528, 1983.
- INOUE, H., ASAKA, T., NOBUYUKI, N., KOSHIHARA, Y. Mechanism of mustard oil-induced skin inflammation in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v.333, p.231-240, 1997.
- INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. Sensory evaluation guide for testing food and beverage products – by the sensory evaluation division of the Institute of Food Technologists. **Food Technology**, november, p. 50-59, 1981.

- JAMES, M.J., GIBSON, R.A., CLELAND, L.G. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. **Am J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.71, suppl., p.343S-348S, 2000.
- JAROLIM-JENSEN, E., GAJDZIK, L., HABERL, I., KRAFT, D., SCHEINER, O., GRAF, J. Hot spices influence permeability of human intestinal epithelial monolayers. **J Nutr.**, v. 128, p. 557-581, 1998.
- JOHNSON, J.L., MADDIPATI, K.R. Paradoxical effects of resveratrol on the two prostaglandin H synthases. **Prostaglandins Other Lipid Mediators**, New York, v.56, p.131-143, 1998.
- JORI. A toxicokinetic aspects of butylated hydroxytoluene (BHT): a review. **Ann. Ist. Super. Sanità**, Roma, v.19, p.271-286, 1983.
- KIKUZAK, H., NAKATANI, N. Antioxidant effects of some ginger constituents. **J. Food Sci.**, Chicago, v.58, p.1107-1110, 1993.
- KING, I.B. Lipids in food: chemistry and nomenclature. In: SPILLER, G.A., ed. **Handbook of lipids in human nutrition**. Boca Raton: CRC Press, 1996.
- KRAMER, R.E. Antioxidants in clove. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.62, p.111-113, 1985.
- 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.
- KRYGIER, K., SOSULSKI, F., HOGGE, L. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.30, p.330-334, 1982.
- KUO, J.M., PAN, B.S. Occurrence of properties of 12-lipoxygenase in the hemolymph of shrimp (*Penaeus japonicus*, Bate). **J. Cgin. Biol. Soc.**, v.21, p.9-16, 1994.
- KUO, J.M., PAN, B.S., ZHANG, H., GERMAN, J.B. Identification of 12-lipoxygenase in the hemolymph of tiger shrimp (*Penaeus japonicus*, B.). **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.42, p.1620-1623, 1992.
- LEAF, A., WEBER, P.C. A new era for science in nutrition. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.45, suppl., p.1048, 1987.
- LEENEN, R., ROODENGURG, A.J., TIJBURG, L.B., WISEMAN, S.A. A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans. **European Journal of Clinical Nutrition**, Basingstoke, v. 54, p. 87-92, 2000.

- MACRI, F., BRAIDOT, E., PETRUSSA, E. VIANELLO, A. Lipoxygenase activity associated to isolated soybean plasma membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, n.1215, p.109-114, 1994.
- MADSEN, H.L., BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends Food Sci Technol.**, Amesterdam, v.61, p.271-277, 1995.
- MADSEN, H.L., NIELSEN, B.R., BERTELSEN, G., SKIBSTED, L.H. Screening of antioxidative activity of spices. A comparison between assays based on ESR spin trapping and electrochemical measurement of oxygen consumption. **Food Chem.**, Amsterdam, v.57, n.2, p.331-337, 1996.
- MANACH, C., REGERAT, F., TEXIER, O, AGELO, G., DEMIGNE, C., REMESY, C. Bioavailability: metabolism and physiological impad of 4 oxo-flavonoids. **Nutr. Res.**, New York, v.16, n.3, p.517-544, 1995.
- MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.45, p.494-598, 1968.
- MARINOVA, E.M., YANISHILIEVA, N.V. 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.
- MCKAY, D.L., BLUMBERG, J.B. The role of tea in human health: na update. **J. Am. Coll. Nutr.**, Denville, v.21, n.1, p.1-13, 2002.
- MELIS, M., DIANA, M., GESSA, G.L. COX-inhibitions increase morphine effects on mesolimbic dopamine neurons. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v.387, p.R1-R3, 2000.
- MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.48, p.91, 1971.
- MILLER, N.J., DIPLOCK, A.T., RICE-EVANS, C.A. Evaluation of the total antioxidant activity as a marker of the deterioration of apple juice on storage. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p. 1794-1801, 1995.
- MILOS, M., MASTELIC, J., JERKOVIC, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare*, L. ssp. *hirtum*). **Food Chem.**, Amsterdam, v.71, p.79-83, 2000.
- 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.**, Ribeirão Preto, v.31, n.8, p.1075-1079, 1998.
- MONCADA, S., VANE, J.R. Unstable metabolites of arachidonic acid and their role in hamemostasis and thrombosis. **Br. Med. Bull.**, Oxford, v.34, p.129, 1978.

- MOREIRA, A.B.B., MANCINI FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, Campinas, 2004.
- MOREIRA, A.V.B. Avaliação da atividade antioxidante de sementes de mostarda (*Brassica alba*, L.). I. Identificação dos principais compostos responsáveis pela inibição da oxidação. São Paulo, 1999. 120p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- MOREIRA, A.V.B., MANCINI FILHO, J. Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva doce em sistemas aquoso e lipídico. **Nutrile**, São Paulo, v.24, 2003 (no prelo)
- MOREIRA, A.V.B., MANCINI FILHO, J. INFLUÊNCIA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DE ESPECIARIAS SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO E O PERFIL LIPÍDICO DE TECIDOS DE RATOS. **Revista de Nutrição**, Campinas, 2004 (no prelo)
- MOREIRA, A.V.B., MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante de sementes de mostarda (*Brassica alba*, L.). I. Identificação dos principais compostos responsáveis pela inibição da oxidação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS., 17, Rio de Janeiro, 1998. **Anais**. Rio de Janeiro: SBCTA, 1998. v.2, p.1077-1080.
- MOREIRA, N.X., MANCINI-FILHO, J. Incorporation of dietary *trans* mono-unsaturated fatty acids into tissues of Walker 256 tumor-bearing rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.34, n.4, p.501-508, 2001.
- MORONEY, M.A., ALCARAZ, M.J., FORDER, R.A., CAREY, F., HOULT, R.S. Selectivity of Neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavanoid glycoside and related aglycone flavonoids. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.40, p.787-792, 1988.
- NAKATANI, N, KIKUZAKI, H. A new antioxidative glucoside isolated from oregano (*Origanum vulgare* L.). **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.51, p.2727-2732, 1987.
- NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Lauderdale, v.29, n.4, p.273-300, 1990.
- NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O.R., ed. **Food chemistry**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1996, p.225-319. (Food Science and Technology, v.76).
- OKUBO, T. Contribution of oxygen radicals to DNA cleavage by quinone compounds derived from phenolic antioxidants, tert-butylhydroquinone and 2, 5 - di - tert - butylhydroquinone. **Toxicol. Lett.**, Amsterdam, v.15, n.9, p.11-18, 1997.

- OLTHOF, M.R., HOLLMAN, C.H., KATAN, M.B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 131, p. 66-71, 2001.
- ONO, N., ABIRU, T., SUGIYAMA, K., KAMIYA, H. Influences of cyclo-oxygenase inhibitors on the cataleptic behavior induced by haloperidol in mice. **Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids**, Sidcup, v.46, p.59-63, 1992.
- OYA, T., TOSHIHIKO, O., KAWAKISHI, S. Spice constituents scavenging free radicals and inhibiting pentosidine formation in a model system. **Biosci., Biotechnol., Biochem.**, Tokyo, v.61, n.2, p.263-266, 1997.
- PADOVESE, R, MANCINI-FILHO, J. Ácidos graxos *trans*. In: CURI, R., coord. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. Barueri: Manole, 2002. p.507-522.
- PERKINS, E.G. Nomenclature and classification of lipids. In: PERKINS, E.G., ed. **Analyses of fats, oils, and lipoproteins**. Champaign: American Oil Chemists' Society, 1991. cap.1.
- PIGGOTT, J.R. **Statistical procedures in food research**. London: Elsevier Applied Science, 1986. 415p.
- PIPER, J.P., VANE, J.R. Release of additional factors in anaphylaxis and its antagonism by anti-inflammatory drugs. **Nature**, London, v.223, p.29-35, 1969.
- PORTER, W.L. Paradoxal 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.
- 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**. London: Elsevier Applied Science, 1990. p.171-192.
- PRATT, D.E., WATTS, B.M. Natural antioxidant activity of vegetable extracts. I. Flavone aglycones. **J. Food Sci.**, Chicago, v.19, p.27-33, 1964.
- PRIOR, R.L., CAO, G. in vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 27, n. 11/12, p. 1173-1181, 1999.
- PRYOR, W.A. Free radical biology: xenobiotics, cancer and aging. In: LUBIN, B., MACHLIN, L.J., eds. **Vitamin E: biochemical, hematological and clinical**

- aspects. New York: New York Academy of Sciences, 1982. p.1,. (Annals of the New York Academy of Sciences, v.393).
- RECORD, I.R., LANE, J.M. Simulated intestinal digestion of green and black teas. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.73, p. 481-486, 2001.
- 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.
- ROBBINS, S.L., COTRAN, R.S., KUMAR, V. **Patologia estrutural e funcional**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986. 1404p.
- ROSS, B.M., BROOKS, R., LEE, M., FLETCHER, P.J., KISH, S.J., TURENNE, S. The effect of cyclo-oxygenase inhibition on indices of dopaminergic function. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, 29, Miame Beach, 1999. **Abstracts**. Miame Beach: Society for Neuroscience, 1999. Res.385.3.
- SALMOND, C.E., BEAGLEHOLE, R., PRYOR, J.A.M.: I basi livelli di colesterolo sono associati ad un eccesso di mortalità? **Br. Med. J., Ed. Ital.**, Milano, v.4, p.253, 1986.
- SANT'ANA, L.S., MANCINI-FILHO, J. Influence of the addition of antioxidants *in vivo* on the fatty acid composition of fish fillets. **Food Chem.**, Amsterdam, v.68, p.175-178, 2002.
- SANT'ANA, L.S., MANCINI-FILHO, J. Mecanismos d proteção oxidativa na utilização de antioxidantes *in vivo* em músculos animais. **Cad. Nutr.**, São Paulo, v.10, p.48-63, 1995.
- SCARPA, A., DE GIER J. Cation permeability of liposomes as a function of the chemical composition of the lipid bilayers. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.241, p.789-797, 1971.
- SCHRAMM, D.D., GERMAN, B. Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. **J. Nutr. Biochem.**, New York, v.9, p.560-566, 1998.
- SCHRAMM, D.D., GERMAN, B. Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. **J. Nutr. Biochem.**, New York, v.9, p.560-566, 1998.
- SCHUBERT, S.Y., LANSKY, E.P., NEEMAN, I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate oil and fermented juice flavonoids. **J. Ethnopharmacol.**, Shannon, v.66, p.11-17, 1999.
- SEMBDNER, G., PARTHIER, B. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, Palo Alto, v.44, p.569-589, 1993.

- SERAFINI, M., GHISELLI, A., FERRO-LUZZI, A. In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. **European Journal of Clinical Nutrition**, Basingstoke, v. 50, p. 28-32, 1996.
- 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 intraperitoneal administration of 2-t-butyl-4-methoxyphenol. **Eur. J. Pharmacol., Environ. Toxicol. Pharmacol. Sect.**, Amsterdam, v.248, p.121-129, 1993.
- 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., WANASUNDARA, P.K.J.P.D. Phenolic antioxidants. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Lauderdale, v.32, p.67-103, 1992.
- SHAHIDI, F., WANASUNDARA, P.K.J.P.D., HONG, C. Antioxidant activity of phenolic compounds in meat model systems. In: HUANG, M.-T., HO, C.-T., LEE, C.Y., eds. **Phenolic compounds in food and their effects on health**. Washington: American Chemical Society, 1992. p.214-222. (ACS Symposium Series, 506).
- SHAHIDI, F., WANASUNDARA, U.N., AMAROWICZ, R. Natural antioxidants from low-pugency mustard flour. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v.27, p.489-493, 1994.
- SILVA, F.A.M., BORGES, M.F.M., FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Quim. Nova**, São Paulo, v.22, n.1, p.94-103, 1999.
- SIMOPOULOS, A.P. ω -3 fatty acids in health na disease and in growth and development. **Am J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.54, p.438-63, 1991.
- SIMOPOULOS, A.P. Omega-3 fatty acids. Part 1. Metabolic effects on omega-3 fatty acids and essentiality. In: SPILLER, G.A., ed. **Lipids in human nutrition**. Boca Raton: CRC Press, 1996.
- SIMOPOULOS, A.P., NORMAN, H.A., GILLASPY, J.E., DUKE, J.A. Common purslane: a source of omega-3 acids and antioxidants. **J. Am. Coll. Nutr.**, Denville, v.11, p.374, 1992.
- SIMOPOULOS, A.P., SALEM, N.J. Purslane: a terrestrial source of omega-3 fatty acids. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v.315, p.833, 1986.
- SOSOULSKI, F.W. Organoleptic and nutritional effects of phenolic compounds on oilseed protein products: a review. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.56, p.711, 1979.
- STATISTICA for Windows: v.6. Statsoft, 2002. v.2, 1 CD-Rom.

- SURVEY, K. Spectrophotometric method for determination of lipoxygenase activity. **Plant Physiol.**, Rockville, v.39, p.65-70, 1964.
- SWAIN, T., HILLS, W.E. The phenolic constituents of *Punus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.19, p.63-68, 1959.
- TAHIN, Q.S., BLUM, M., CARAFOLI, E. The fatty-acid composition of sub-cellular membranes of rat-liver, heart, and brain: diet-induced modifications. **Eur. J. Biochem.**, Oxford, v.121, n.1, p.5-13, 1981.
- TESAROVÁ, E., PACÁKOVÁ, V. Gas and high-performance liquid chromatography of phenols. **Chromatographia**, Braunschweig, v.17, n.5, p.269-284, 1983.
- TIAN, L.L. WHITE, P.J. Antioxidant activity of oat extract in soybean and cottonseed oil. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.71, p.1079-1086, 1994.
- VAUGHAN, C.W., INGRAM, S.L., CONNOR, M.A., CHRISTIE, M.J. How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. **Nature**, London, v.390, p.611-614, 1997.
- VEKIARI, S.A., OREOPOULOU, V., TZIA, C., THOMOPOULOS, C.D. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.70, p.183-187, 1993.
- VINSON, J.A., DABBAGH, Y.A. Tea phenols: antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. **Nutr. Res.**, New York, v.18, n.6, p.1067-1075, 1998.
- VIOLA, P. **Azeite de oliva e a saúde**. Madrid: Consejo Oleícola Internacional, 1997. v1, p.7-11.
- VITALE, J.J., BROITMAN, S.A. Lipids and immune functions. **Cancer Res.**, Birmingham, v.41, p.3706, 1981.
- WILLIAMS, J.T. The painless synergism of aspirin and opium. **Nature**, London, v.390, p.557-559, 1997.
- WILLIS, A.L. Nutritional and pharmacologic factors on eicosanoid biology. **Nutr. Res.**, New York, v.39, p.289, 1981.
- WINTERBOURN, C.C., GUTTERIDGE, J.M., HALLIWEL, B. Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O₂. **J. Free Radical Biol. Med.**, New York, v.1, p.43-49, 1985.
- WU, J.W., LEE, M.H., HO, C.T., CHANG, S. Elucidation of the chemical structures of natural antioxidants isolated from Rosemary **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.59, p.339-345, 1982.

- WU, Z., ROBINSON, D.S. High-performance liquid chromatographic analysis of the products of linoleic acid oxidation catalyzed by pea (*Pisium sativum*) seed lipoxygenases. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.43, p.337-342, 1995.
- YAMANISHI, T. The aroma of various teas, p. 305-328. In: **Flavor of foods and beverages. Chemistry and technology**, edited by CHARALAMBOUS, G & INGEETT, G. E. **Academic Press**, New York, 1978.
- YANISHLIEVA, N.V.L., MARINOVA, E.M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food Chem.**, Amsterdam, v.54, n.4, p.337-382, 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.
- YOSHINO, K., SUZUKI, M., SASAKI, K., MIYASE, T., SANO, M. Formation of antioxidants from (-)-epigallocatechin gallate in mild alkaline fluids, such as authentic intestinal juice and mouse plasma. **J. Nutr. Biochem.**, New York, v. 10, p. 223-229, 1999.
- YU, X.M., HU, J.W., SESSLE, B.J. Effects of inflammatory irritant application to the rat temporomandibular joint on jaw and neck muscle activity. **Pain**, Amsterdam, v.60, p.143-149, 1995.
- ZIBOH, V.A., MILLER, C.C., CHO, Y. Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.7, suppl., p.361S-366S, 2000.
- ZLOTOGORSKI, A., GOLDENHERSH, M., SHAFRAN, A. A model for quantitative measurement of sulfur mustard skin lesions in the rabbit ear. **Toxicology**, Amsterdam, v.120, p.105-110, 1997.

Anexos

ANEXO 1 - Cromatograma e espectros de massa da fração de ácidos fenólicos livres com atividade antioxidante da mostarda.

ANEXO 2 - Cromatograma e espectros de massa da fração de ésteres solúveis de ácidos fenólicos com atividade antioxidante da mostarda. (3) e (4) fragmentos do composto fenólico quercetina.(5) não identificado.

ANEXO 3 - Cromatograma e espectros de massa da fração livre de ácidos fenólicos com atividade antioxidante da canela.

ANEXO 4 - Cromatograma e espectros de massa da fração de ácidos fenólicos livres com atividade antioxidante da erva doce.

ANEXO 5 - Cromatograma e espectros de massa da fração de ésteres solúveis de ácidos fenólicos com atividade antioxidante da erva doce.

ANEXO 6 - Cromatograma e espectros de massa da fração de ácidos fenólicos livres com atividade antioxidante da mistura teste.

ANEXO 7 - Cromatograma e espectros de massa da fração de ésteres solúveis com atividade antioxidante da mistura teste.

ANEXO 8 - Cromatograma e espectros de massa dos compostos fenólicos presentes no extrato etéreo da mostarda. (1) fragmento de hidroquinona. (2) fragmento do ácido salicílico (3) fragmento trans-cinâmico. (4, 5, 6 e 7) espectros não identificados. OBS: sem padrão para cadastro na biblioteca do CGMS.

ANEXO 9 - Cromatograma e espectros de massa dos compostos fenólicos com atividade antioxidante presentes no extrato alcoólico da mostarda. (1) fragmento do catecol. (2, 3, 4, 5 e 6) espectros não identificados. OBS: sem padrão para cadastro na biblioteca do CGMS.

ANEXO 10 - Cromatograma e espectros de massa dos compostos fenólicos com atividade antioxidante presentes no extrato aquoso da mostarda.

ANEXO 11 - Cromatograma e espectros de massa de compostos fenólicos com atividade antioxidante presentes no extrato etéreo da canela. (1) fragmento hidroquinona

ANEXO 12 - Cromatograma e espectros de massa de compostos fenólicos com atividade antioxidante presentes no extrato alcoólico da canela. (1) fragmento hidroquinona

ANEXO 13 - Cromatograma e espectros de massa de compostos fenólicos com atividade antioxidante presentes no extrato aquoso da canela. (1) espectro não identificado. OBS: sem padrão para cadastro na biblioteca do CGMS.

ANEXO 14 - Cromatograma e espectros de massa de compostos fenólicos com atividade antioxidante presentes no extrato etéreo da erva doce.

ANEXO 15 - Cromatograma e espectros de massa de compostos fenólicos com atividade antioxidante presentes no extrato alcoólico da erva doce. (1) fragmento catecol (2) fragmento hidroquinona (3,4) espectros não identificados. OBS: sem padrão para cadastro na biblioteca do CGMS.

ANEXO 17 - Cromatograma e espectros de massa de compostos fenólicos com atividade antioxidante presentes no extrato alcoólico da mistura teste. (1) espectro não identificado. OBS: sem padrão para cadastro na biblioteca do CGMS.

ANEXO 18 - Cromatograma e espectros de massa dos compostos fenólicos com atividade antioxidante presentes no extrato aquoso da mistura teste. Espectros não identificados (1) fragmento ferúlico (2,3,4,5 e 6) espectros não identificados. OBS: sem padrão para cadastro na biblioteca do CGMS.

Anexo 19 – Perfil lipídico dos tecidos

Anexo 19 – Perfil lipídico do tecidos dos animais (percentual de incorporação - %)

Plasma	10:0	12:0	14:0	14:1	15:0	15:1	16:0	16:1	17:0	17:1	18:0	18:1 c6	18:1 c9	18:2	18:3	18:4	20:0	20:1	20:4	20:5	22:5	22:6	24:1
w3-C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	16,00	1,00	0,00	0,00	8,60	21,10	1,00	16,20	0,00	0,00	1,50	0,60	3,30	4,00	4,80	9,10	5,60
w3-E	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	21,50	1,40	1,30	1,70	9,40	18,90	2,00	16,30	0,90	0,00	1,10	0,60	6,70	5,00	0,00	6,70	0,00
w6-C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	19,10	0,60	0,90	0,90	13,00	11,50	1,10	25,30	1,00	0,00	0,00	0,00	21,20	0,00	0,00	1,37	0,00
w6-E	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	17,50	0,90	0,90	1,20	11,20	9,20	1,10	25,00	1,00	0,00	0,00	0,00	26,56	0,00	0,00	2,10	0,00
Fígado	10:0	12:0	14:0	14:1	15:0	15:1	16:0	16:1	17:0	17:1	18:0	18:1 c6	18:1 c9	18:2	18:3	18:4	20:0	20:1	20:4	20:5	22:5	22:6	24:1
w3-C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00	22,40	1,00	0,60	0,00	21,40	8,00	2,10	15,20	0,40	0,00	0,20	0,70	8,90	6,30	0,80	8,80	0,00
w3-E	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17	0,00	23,80	0,70	0,60	0,00	23,20	6,80	2,00	15,20	0,20	0,00	0,00	0,80	9,20	5,00	0,99	9,50	0,00
w6-C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	15,30	0,20	0,30	0,00	14,90	8,20	1,10	34,50	0,60	0,00	0,00	0,58	17,05	0,27	0,42	2,51	0,00
w6-E	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	15,50	0,20	0,30	0,00	17,00	6,60	1,30	31,40	0,80	0,00	0,00	0,47	21,08	0,25	0,49	2,90	0,00
Coração	10:0	12:0	14:0	14:1	15:0	15:1	16:0	16:1	17:0	17:1	18:0	18:1 c6	18:1 c9	18:2	18:3	18:4	20:0	20:1	20:4	20:5	22:5	22:6	24:1
w3-C	0,00	0,00	1,48	0,00	0,19	0,34	23,80	1,20	0,20	0,00	13,30	17,20	3,10	13,60	0,50	0,00	0,00	0,00	6,20	2,50	0,00	13,30	0,00
w3-E	0,00	0,00	0,70	0,00	0,00	0,58	20,50	0,90	0,40	0,00	12,90	17,50	2,30	24,50	1,10	0,00	0,00	0,00	7,70	2,20	0,00	8,10	0,00
w6-C	0,00	0,00	2,42	0,00	0,50	0,00	22,60	3,50	0,40	0,00	9,10	18,10	2,30	15,00	1,40	0,00	1,12	0,00	5,92	3,15	0,95	11,25	0,00
w6-E	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	14,20	0,00	0,00	0,00	10,70	20,10	2,40	45,70	1,70	0,00	0,00	0,00	4,39	0,00	0,00	0,00	0,00
Cérebro	10:0	12:0	14:0	14:1	15:0	15:1	16:0	16:1	17:0	17:1	18:0	18:1 c6	18:1 c9	18:2	18:3	18:4	20:0	20:1	20:4	20:5	22:5	22:6	24:1
w3-C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	18,40	1,20	0,00	0,00	15,00	22,10	4,60	2,40	0,00	0,00	0,00	0,00	8,20	0,00	0,00	13,60	0,00
w3-E	0,00	0,00	0,69	0,00	0,00	0,00	24,30	1,30	0,00	0,00	13,30	15,60	2,70	13,70	0,00	0,00	0,00	0,00	12,80	9,10	0,00	5,30	0,00
w6-C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	20,80	3,70	0,00	0,00	14,90	20,70	1,70	10,90	0,00	0,00	0,00	0,00	13,01	0,00	0,00	10,79	0,00
w6-E	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	21,90	0,00	0,00	0,00	16,60	21,30	4,00	11,80	0,00	0,00	0,00	0,00	10,60	0,00	0,00	11,10	0,00
Tec. Adip.	10:0	12:0	14:0	14:1	15:0	15:1	16:0	16:1	17:0	17:1	18:0	18:1 c6	18:1 c9	18:2	18:3	18:4	20:0	20:1	20:4	20:5	22:5	22:6	24:1
w3-C	0,21	3,03	0,08	3,18	0,30	0,00	25,10	7,80	0,30	0,00	3,40	21,80	1,90	15,00	1,70	1,20	0,10	1,10	0,50	3,60	0,50	6,2	0,00
w3-E	0,18	3,37	0,18	1,96	0,33	0,00	26,70	7,90	0,30	0,20	3,00	23,20	2,20	13,10	1,30	1,20	0,40	0,30	1,00	3,90	0,56	6,50	0,00
w6-C	0,14	1,07	0,00	4,28	0,13	0,00	20,70	3,50	0,00	0,00	2,30	25,80	1,50	34,90	0,00	0,00	0,00	0,14	0,65	0,00	0,00	0,44	0,00
w6-E	0,12	1,13	0,00	2,17	0,13	0,00	20,10	5,00	0,00	0,00	6,80	18,10	6,60	32,50	3,70	0,00	0,07	0,15	0,93	0,13	0,15	0,30	0,00
Rins	10:0	12:0	14:0	14:1	15:0	15:1	16:0	16:1	17:0	17:1	18:0	18:1 c6	18:1 c9	18:2	18:3	18:4	20:0	20:1	20:4	20:5	22:5	22:6	24:1
w3-C	0,00	0,00	2,63	0,00	0,00	0,00	32,20	5,30	0,00	0,00	8,70	16,60	1,90	11,70	0,90	0,00	0,00	0,00	5,60	6,90	0,00	5,30	0,00
w3-E	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	26,00	3,10	0,00	0,00	16,20	26,30	3,40	1,20	0,00	0,00	0,00	0,00	8,80	1,20	0,00	10,90	0,00
w6-C	0,00	0,00	0,75	0,00	0,00	0,00	20,20	1,30	0,00	0,00	7,70	16,80	1,30	39,30	1,00	0,00	0,00	0,00	10,10	0,00	0,00	0,00	0,00
w6-E	0,00	0,00	0,72	0,00	0,00	0,00	19,00	0,90	0,00	0,00	7,70	14,00	1,50	42,70	1,20	0,00	0,00	0,00	11,09	0,00	0,00	0,00	0,00

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome:

Documento de Identidade Nº : Sexo: () M () F

Data de Nascimento:/...../.....

Endereço: Nº: Apto:

Bairro: Cidade:

CEP: Telefone:

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa:

ANÁLISE SENSORIAL DO CHÁ DA MISTURA DAS ESPECIARIAS: MOSTARDA, CANELA E ERVA DOCE

2. Pesquisador: **Ana Vlândia Bandeira Moreira**

Cargo/Função: **Pós-graduanda** Nº USP: **2174162**

Departamento da FCF/USP: **Ciência dos Alimentos e Nutrição Experimental**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Sem Risco (x)	Risco Mínimo ()	Risco Médio ()
Risco Baixo ()	Risco Maior ()	

Duração da Pesquisa: **4 meses**

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

Este projeto constará da análise de aceitação de um produto: chá, que não implicará em nenhum risco ao indivíduo que o consumirá. O produto consta da mistura de três especiarias (mostarda, canela e erva doce) que na tese de doutorado, onde este procedimento será incluído, apresenta efeitos antioxidantes importantes.

Para que o objetivo seja alcançado os indivíduos que participarão do teste, apenas terão de preencher um questionário e degustar (provar) a amostra que lhes serão fornecidas, mediante a aceitação dos mesmos em participar do referido estudo.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

V – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

Será fornecido telefone de contato do pesquisador para cada participante, quanto a provável dúvida na execução do teste.

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa

Assinatura do pesquisador

Ficha para análise sensorial do chá

DATA: ____/____/2002.

NOME: _____. Sexo: ☐ F ☐ M

Data de Nasc.: ____/____/____.

Produto: Chá

- 1) Você tem o hábito de consumir chá? ☐ sim ☐ não
 caso afirmativo, qual seu hábito de consumir este tipo de produto:
☐ diária ☐ semanal ☐ ocasionalmente

- 2) Você associa o uso de chá em alguma situação, como por exemplo, alguma doença? ☐ sim ☐ não
 caso afirmativo, que tipo de chá e em que situação você consome:
- _____

- 3) Por favor, prove a amostra e avalie quanto ao sabor global do produto, segundo a escala a baixo:

1	2	3	4	5	6	7	8	9
gostei muitíssimo	gostei muito	gostei moderadamente	gostei ligeiramente	indiferente	desgostei ligeiramente	desgostei moderadamente	desgostei muito	desgostei muitíssimo

obs: marque com um "X" a sua sensação quanto ao sabor.

- 4) Por favor, prove a amostra, mais uma vez (obedecendo o modo de preparo apresentado no final deste questionário) e avalie quanto a escala abaixo:

odor

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
nenhum		fraco		moderado			forte		muito forte

cor amarelo escuro

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
nenhum		fraco		moderado			forte		muito forte

sensação de adstringência
(amarração)

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
nenhum		fraco		moderado			forte		muito forte

sabor amargo

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
nenhum									

temperatura

comentários:

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
muito frio		frio		morno			quente		muito quente