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

**Avaliação dos compostos fenólicos e das propriedades
antioxidantes da polpa do pequi (*Caryocar* spp) processado e
*in natura***

Lucillia Rabelo de Oliveira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Jorge Mancini Filho

São Paulo
2010

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

**Avaliação dos compostos fenólicos e das propriedades
antioxidantes da polpa do pequi (*Caryocar* spp) processado e
*in natura***

Lucillia Rabelo de Oliveira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Jorge Mancini Filho

São Paulo
2010

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

Oliveira, Lucillia Rabelo de
O48av Avaliação dos compostos fenólicos e das propriedades
antioxidantes da polpa do pequi (*Caryocar* spp) processado e *in*
natura / Lucillia Rabelo de Oliveira. -- São Paulo, 2010.
100p.

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

Orientador: Mancini Filho, Jorge

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

641 CDD

Lucillia Rabelo de Oliveira

Avaliação dos compostos fenólicos e das propriedades antioxidantes da
polpa do pequi (*Caryocar* spp) processado e *in natura*

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Jorge Mancini Filho
Orientador/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

*À minha família,
especialmente aos meus amores
de país: José e Creusa,*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Experimentei, na vida, todos os tipos de sensações e provações. Trilhei caminhos que ora foram acolhedores, ora, profundamente dolorosos. Ritualizei momentos. No momento atual, celebro a conclusão da minha dissertação de mestrado, a qual me permite completar mais uma etapa de vida, um verdadeiro sonho realizado. E neste momento único e especial, necessito tecer agradecimentos aos que se fizeram presentes, aos que me ajudaram ou contribuíram de alguma forma para que hoje eu estivesse recebendo tamanha honra com este título.

Sou eternamente grata ao meu Deus que de maneira tão infinita me escolheu e me agraciou com as suas bênçãos. Por tudo o que não posso comprar, mas tenho de graça dado por Ele, mesmo que por vezes eu nem fosse merecedora de tamanho amor. Hoje digo que este amor do Pai foi essencial para que eu chegasse até aqui. “Sou mais forte e vou mais longe quando estás comigo”. Agradeço a Ele também pelos muitos fracassos, pois mostrar o sucesso apenas é desconsiderar os muitos fracassos que vivi. Persisti porque todos estes fracassos foram feitos para a luta e serviram para construir forças.

Sou grata ao Prof. Jorge Mancini Filho que me aceitou como sua orientada, pela oportunidade e voto de confiança, pelas orientações e ensinamentos repassados com tanta gentileza e dedicação.

Agradeço aos meus pais, José e Creusa, pelo exemplo divino de amor, doação e união, que sempre fizeram o melhor por mim. A eles que me ensinaram somente tudo o que sou, por serem os meus maiores tesouros, e também por me fazerem entender que a presença e o amor são maiores que a saudade, dedico este trabalho e oferto o meu mais lindo agradecimento.

Ao meu avô Matias Rabelo (*in memoriam*) pelo incentivo, pelas palavras humildes, encorajadoras e cheias de orgulho. De onde estiver, tenho certeza que sua alegria é imensa por esta vitória.

“Acima de tudo, na vida, temos necessidade de alguém que nos incentive a realizar aquilo de que somos capazes”. Por me fazer entender diariamente o significado desta frase, agradeço ao meu namorado Francisco Leonardo que, sem sombra de dúvidas, foi, e é o meu maior incentivador e o grande responsável pela minha vinda e escolha por São Paulo. Por toda paciência, companheirismo, capacidade de motivação e por me alegrar tanto com todo seu amor em momentos difíceis. Sem você, eu não seria metade do que sou hoje!

Aos meus avós Raimundo Alexandrino; Lucília e Raimunda Maria (*In memoriam*) por terem construído com sabedoria, dedicação e muito amor a base de tudo o que sou, a minha FAMÍLIA.

À família Rabelo e, em especial, à Oliveira, pelos exemplos de amor, humildade, generosidade, honestidade, equilíbrio, carinho. Amo a cada um destes que são parte da minha história: irmãos, primos, tios, sobrinhos e agregados. Em especial, dirijo o meu muito obrigada aos meus irmãos Douglas e Renato pelo aprendizado e convivência diária que me fizeram amadurecer e à minha prima-irmã Reijane por estar sempre comigo me fazendo crescer com sua sabedoria. Obrigada, meus irmãos!

À família EJC dos tios e primos, com os quais eu aprendi o que é amar ao próximo, aprendi a conjugar o verbo “doação” e aprendi a encontrar a verdadeira felicidade. Agradeço pelo amor, carinho, incansáveis orações, intercessões, abraços e beijos encorajadores, votos e desejos de sucesso. Especialmente à Atayta, Ataylson, Bia, Carlinhos, Carlos Santos, Conceição, Cristiane, Edvan, Eycon, Eyllon, Fabiana, Fátima, Fernanda, George, Jadna, Luciano Pooh, Nicole, Ray, Rodrigo, Regininha, Shirley, Silvana.

À família Torres Leal pela acolhida, incentivo, confiança, força e demonstrações de carinho repassados nos momentos mais importantes.

Às minhas irmãzinhas de coração: Vivianne, Liliane, Michelle e Ana Mara pela companhia diária, por me aturarem e me darem apoio em momentos difíceis, pelo carinho, atenção e pelos jantares, passeios e conversas mais agradáveis.

Ao pessoal do laboratório de Lípidos: Rosângela, Illana, Fernanda, Eliane, Milessa, Paula, Felipe, Claudimar, Alessandro e Mayahra pela companhia, ajuda e

respeito. Em especial à Gabriela Taciro pelo importantíssimo apoio inicial, à Illana pela ajuda sempre presente e à Ana Mara por ter sido um anjo em momentos decisivos. Agradeço ainda ao professor Alexis Vidal e à aluna Ana Elsa Batista (Universidade de Havana - Cuba) pelo simples e sincero companheirismo durante o pouco tempo de convivência.

Aos colegas que encontrei em São Paulo e que me conquistaram pela amizade: Ivanir, Lucas, Daiana, Gil, Tatiana, Michele, Alexandre Pimentel, Soraya, Cassiana, Ivana, Virgínia, Luz Mérida, Luciana Nishimura, Suzana, Graziela, Kaluce, Ariana, Renato, Cristina, Míriam, Maria Isabel, Elias, Sybille. Em especial agradeço à Alexandra Melo e Gabriela Teodoro pelo apoio, principalmente durante o PAE, ao Emídio pelo incentivo, às amigas Illana, Luciana Tedesco e Isabel Massaretto pelo carinho imenso, pelos cafés e momentos felizes.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, em especial à: Cida, Cléo, Edilson, Elaine, João, Joana, Jorge, Jozefa, Lurdinha, Mônica, Rôse, Rosinha, Suzy e ao pessoal do setor de compras pela competência e presteza.

Aos demais amigos piauienses em São Paulo que por muitas vezes me fizeram esquecer a saudade de minha terra e se mantiveram presentes: George, Antônio, Ruthelle, Artemir, além dos que já foram citados.

“A força da amizade é a vida que ilumina o meu coração”. Por isso meu especial agradecimento aos amigos que ficaram no Piauí e sempre me apoiaram e me deram força para continuar: Larice, Elliel, Aline, Rosângela, Fabrina, Karla, Yara, Ivone, Teresinha, Josyanne, Juliana, Artemízia, Patrícia, Auridênia, Talita, Simone, Nilmara e Aquino.

Ao Tio Alípio pelas visitas agradáveis e pelas palavras de força e coragem, muita coragem!

Aos colegas do Grupo de Oração Universitário (GOU) pelos minutos de paz e busca ao Senhor.

Aos meus vizinhos e amigos da família que desde cedo reconheceram em mim, de uma maneira muito especial, uma pessoa digna de respeito, confiança e merecedora de incentivo.

Ao Conselho de Aperfeiçoamento Profissional de Ensino Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro.

Meus agradecimentos também aos fornecedores que ajudaram com as amostras.

Aos professores, funcionários e alunos da Universidade Federal do Piauí (UFPI) e do Instituto Federal de Educação Tecnológica do Piauí (IFPI).

Palavras foram escritas, mas, por mais que eu tente, não conseguirei expressar o enorme sentimento de gratidão que trago no coração. Com tudo isso que vivi, aprendi que não importa O QUE eu fiz, mas sim COMO eu fiz! Por isso, de uma maneira bem feliz, hoje digo, muito obrigada a todos que contribuíram para a realização deste trabalho!

*“A maior recompensa do
nosso trabalho não é o que nos
pagam por ele, mas aquilo em
que ele nos transforma”.*

John Ruskin

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Radicais livres e seus efeitos.....	4
2.2 Antioxidantes.....	5
2.3 Compostos fenólicos.....	8
2.3.1 Compostos fenólicos em vegetais.....	11
2.3.2 Ingestão e efeitos biológicos de fenólicos.....	12
2.4 Pequi.....	14
2.4.1 Características do fruto de pequi e sua produção.....	17
2.4.2 Compostos fenólicos no pequi.....	20
2.5 Processamento do pequi.....	21
2.5.1 Influência do processamento sobre os compostos fenólicos do pequi	25
2.6 Extração de compostos antioxidantes empregando solventes.....	29
2.7 Determinação dos fenólicos totais (FT).....	29
2.8 Métodos para avaliação da atividade antioxidantes <i>in vitro</i>.....	30

2.8.1 Sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	32
2.8.2 Método do radical DPPH [•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazila).....	34
3. OBJETIVOS.....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 Material.....	38
4.2 Métodos.....	39
4.2.1 Preparação dos extratos de pequi.....	39
4.2.2 Preparação das frações de ácidos fenólicos do pequi.....	40
4.2.2.1 Frações de ácidos fenólicos livres (AFL).....	41
4.2.2.2 Ésteres solúveis de ácidos fenólicos (AFS).....	41
4.2.2.3 Ésteres insolúveis de ácidos fenólicos (AFI).....	42
4.2.3 Determinação dos fenólicos totais (FT).....	43
4.2.4 Determinação do extrato seco (ES) dos extratos e frações.....	44
4.2.5 Determinação da atividade antioxidantes <i>in vitro</i>	44
4.2.5.1 Ensaio em sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	45
4.2.5.2. Método do radical DPPH [•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazila).....	46
4.2.6 Análise estatística.....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1 Determinação de fenólicos totais (FT).....	48
5.2 Determinação do extrato seco (ES)	55
5.3 Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	56
5.3.1 Ensaio em sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	57

5.3.2 Método do radical DPPH'	69
5.4 Correlação entre variáveis do estudo	78
6. CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXOS	100

LISTA DE TABELAS E QUADROS

	Página
Tabela 1. Percentual de extrato seco obtido a partir dos extratos alcoólicos e aquosos da polpa do pequi <i>in natura</i> .	55
Tabela 2. Percentual de extrato seco obtido a partir dos extratos alcoólicos, aquosos e do líquido da conserva do pequi processado.	55
Tabela 3. Percentual de extrato seco obtido a partir das frações de ácidos fenólicos da polpa do pequi processado (CB1).	56
Tabela 4. Percentual de inibição da oxidação para a associação entre os extratos alcoólicos das polpas de pequi e o BHT pelo método β -caroteno/ácido linoléico.	67
Tabela 5. Percentual de inibição da oxidação para a associação entre os extratos aquosos das polpas de pequi e o BHT pelo método β -caroteno/ácido linoléico.	67
Tabela 6. Percentual de inibição da oxidação para a associação entre os líquidos das conservas do pequi e o BHT pelo método β -caroteno/ácido linoléico.	68
Tabela 7. Percentual de inibição da oxidação para a associação entre as frações da polpa de pequi (CB1) e o BHT pelo método β -caroteno/ácido linoléico.	69
Tabela 8. Correlações lineares de Pearson (r) entre os fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos DPPH [*] e sistema β -caroteno/ácido linoléico nos extratos da polpa do pequi <i>in natura</i> .	79

Tabela 9. Correlações lineares de Pearson (r) entre os fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos DPPH^{*} e sistema β -caroteno/ácido linoléico nos extratos e líquidos das conservas do pequi processado. 79

Tabela 10. Correlações lineares de Pearson (r) entre os fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos DPPH^{*} e sistema β -caroteno/ácido linoléico nas frações do pequi processado (CB1). 80

Quadros

Quadro 1. Apresentação das amostras estudadas. 38

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estrutura química dos flavonóides e suas principais sub-classes.	9
Figura 2. Estrutura química dos ácidos benzóicos e cinâmicos.	10
Figura 3. Árvore do pequi.	15
Figura 4. Partes que compõem o fruto do pequi.	16
Figura 5. Estrutura química dos ácidos fenólicos predominantes na polpa e na amêndoa do pequi (elágico e gálico).	21
Figura 6. Conserva de pequi.	22
Figura 7. Fluxograma do processo de fabricação de conservas de pequi.	23
Figura 8. Estrutura do radical DPPH [*] (2,2 difenil-1-picril-hidrazila).	34
Figura 9. Extração seqüencial com diferentes solventes.	40
Figura 10. Esquema para obtenção das frações de ácidos fenólicos.	43
Figura 11. Teores de fenólicos totais nos EALC e EAQ da polpa do pequi <i>in natura</i> .	48
Figura 12. Teores de fenólicos totais (mg de equivalente de ácido gálico/100g de amostra seca) nos EALC (A), EAQ (B) da polpa do pequi processado (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.) e LC (C).	51

- Figura 13.** Teores de fenólicos totais (mg de equivalente de ácido gálico/100g de amostra seca) nas frações (AFL, AFS e AFI) da polpa do pequi processado (CB1) (*Caryocar brasiliense* Camb.). 54
- Figura 14.** Atividade antioxidante dos extratos alcoólicos da polpa de pequi *in natura* em diferentes concentrações pelo método β -caroteno/ácido linoléico. 57
- Figura 15.** Atividade antioxidante dos extratos aquosos da polpa de pequi *in natura* em diferentes concentrações pelo método β -caroteno/ácido linoléico. 58
- Figura 16.** Atividade antioxidante dos extratos alcoólicos da polpa de pequi processado em diferentes concentrações pelo método β -caroteno/ácido linoléico. 61
- Figura 17.** Atividade antioxidante dos extratos aquosos da polpa de pequi processado em diferentes concentrações pelo método β -caroteno/ácido linoléico. 62
- Figura 18.** Atividade antioxidante dos líquidos das conservas das polpas de pequi processado em diferentes concentrações pelo método β -caroteno/ácido linoléico. 63
- Figura 19.** Atividade antioxidante das frações (AFL, AFS e AFI) da polpa de pequi processado (CB1) em diferentes concentrações pelo método β -caroteno/ácido linoléico. 65
- Figura 20.** % de redução do radical DPPH[•] pelos extratos alcoólicos da polpa do pequi *in natura*. 70
- Figura 21.** % de redução do radical DPPH[•] pelos extratos aquosos da polpa de pequi *in natura*. 71

- Figura 22.** % de redução do radical DPPH[•] pelos extratos alcoólicos da polpa do pequi processado. 73
- Figura 23.** % de redução do radical DPPH[•] pelos extratos aquosos da polpa do pequi processado. 74
- Figura 24.** % de redução do radical DPPH[•] pelos líquidos das conservas da polpa do pequi processado. 75
- Figura 25.** % de redução do radical DPPH[•] das frações (AFL e AFI) da polpa do pequi processado (CB1) (*Caryocar brasiliense* Camb.). 77

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABS** = Absorbância
- ABTS** = 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
- AFI** = Ácidos fenólicos insolúveis
- AFL** = Ácidos fenólicos livres
- AFS** = Ácidos fenólicos solúveis
- BHA** = Butilhidroxianisol
- BHT** = Butilhidroxitolueno
- CEASAS** = Centrais de abastecimento
- DCNT** = Doenças crônico não-transmissíveis
- DMPD** = N,N-dimethyl-p-phenylenediamine
- DNA** = Ácido desoxirribonucléico
- DP** = Desvio-padrão
- DPC** = Desvio padrão conjunto
- DPPH[•]** = 2,2 difenil-1-picril-hidrazila
- DPPHH** = 2,2-difenil picril-hidrazina
- EAG** = Equivalente de ácido gálico
- EBC** = Extrato bruto concentrado
- ECG** = Epicatequina galato
- EGC** = Epigallocatequina
- EGCG** = Epigallocatequina galato
- EMBRAPA** = Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- ERNs** = Espécies reativas de nitrogênio
- EROs** = Espécies reativas do oxigênio
- ES** = Extrato seco
- EAQ** = Extratos aquosos
- EALC** = Extratos alcoólicos
- FCF** = Faculdade de Ciências Farmacêuticas
- FT** = Fenólicos totais

HDL = Lipoproteína de alta densidade
HSD = do inglês “honest significant difference”
IC₅₀ = Concentração de inibição de 50% do radical
LC = Líquidos das conservas
LDL = Lipoproteína de alta densidade
MeOH = Metanol
mT = Megaton
NADPH = Nicotinamida adenina dinucleotídeo
nm = Nanômetros
OMS = Organização Mundial de Saúde
ORAC = Capacidade de absorção do radical oxigênio,
p/v = Proporção peso/ volume
PG = Galato de propila
ppm = Partes por milhão
RPM = Rotação por minuto
TBARS = Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBHQ = Terc- butilhidroquinona
TEAC = Capacidade antioxidante equivalente ao trolox
THF = Tetraidrofurano
TRAP = Capacidade de redução total do plasma
USP = Universidade de São Paulo
UV = Radiação ultra violeta
µg = Microgramas
µL = Microlitros
% IO = Percentual de inibição da oxidação

RESUMO

OLIVEIRA, L.R. **Avaliação dos compostos fenólicos e das propriedades antioxidantes da polpa do pequi (*Caryocar spp*) processado e *in natura***. 2010. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O pequi caracteriza-se por possuir expressiva quantidade de compostos fenólicos, que por apresentarem propriedades antioxidantes estão associados com a prevenção da formação de radicais livres. Além de ser consumido *in natura*, é também comumente consumido na forma processada. No entanto, sabe-se que os antioxidantes presentes nos vegetais podem ser afetados pela forma de processamento e provocam alterações dos teores de fenólicos totais (FT) bem como da sua atividade antioxidante. Este trabalho objetivou avaliar o teor de FT e as propriedades antioxidantes da polpa do pequi processado e *in natura*. Foram obtidos os extratos alcoólicos (EALC) e aquosos (EAQ), a partir de amostras liofilizadas de diversas polpas de pequi processado (em conserva) e também do *in natura*, bem como as frações de ácidos fenólicos livres (AFL), ésteres solúveis de ácidos fenólicos (AFS) e ésteres insolúveis de ácidos fenólicos (AFI) de pequi processado (CB1). Os EALC e EAQ, além dos líquidos provenientes das conservas (LC), foram avaliados quanto aos teores de FT, onde se verificou que os EAQ do pequi *in natura*, principalmente, e do processado tiveram um maior conteúdo de FT quando comparados aos EALC. Os LC, por sua vez, apresentaram valores médios ainda maiores que os EAQ. Com relação ao teor de FT das frações, a AFL se destacou diante da AFS e AFI. Os extratos, LC e frações foram avaliados quanto à atividade antioxidante *in vitro* pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico e também pelo ensaio do radical DPPH[•] (2,2 difenil-1-picril-hidrazila). No primeiro, verificou-se que os EAQ e LC do pequi apresentaram maior atividade que os EALC. Foi observada ainda atividade elevada em todas as frações analisadas. No segundo ensaio pelo método do radical DPPH[•], pode-se observar que os extratos aquosos do pequi *in natura* apresentaram maior atividade, enquanto que, no pequi processado, os extratos alcoólicos e os líquidos das conservas tiveram melhores resultados. Verificou-se também que a AFL possui atividade superior às outras frações. De uma maneira geral, os resultados do pequi processado foram inferiores aos do pequi *in natura* tanto em relação aos teores de FT como na atividade antioxidante. Verificando-se ainda, que isto se deve principalmente à perda dos FT da polpa, indicando que houve lixiviação destes compostos para os LC.

Palavras-chave: Pequi. Compostos fenólicos. Atividade antioxidante.

ABSTRACT

OLIVEIRA, L.R. **Evaluation of phenolic compounds and antioxidant properties of pulp pequi (*Caryocar spp*) processed and fresh.** 2010. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Pequi characterized by having a significant amount of phenolic compounds, that are related with its antioxidant properties that are associated with the prevention of free radicals. Besides being eaten fresh, it is also widely consumed in processed form. However, it is known that the antioxidants present in plants can be affected by processing form and cause changes in the levels of total phenolic content (FT) and the antioxidant activity. The objective of this study was to evaluate the content of phenolic compounds and the antioxidant properties of the pequi pulp processed and fresh. Were obtained the alcoholic (EALC) and aqueous (EAQ) extracts from lyophilized samples of various pulps pequi processed (canned) and also *in nature*, as well as the fractions of free phenolic acids (AFL), soluble esters of phenolic acids (AFS) and insoluble esters of phenolic acids (AFI) of processed pequi (CB1). The EALC and EAQ, besides the liquid from the canned (LC) were evaluated for the levels of FT, where it was found that the EAQ of the pequi *in nature*, mainly, and of the processed had, in general, a higher content of FT compared to EALC. The LC, in turn have showed that even greater EAQ. Regarding the content of FT of the fractions, the AFL stood in front of the AFS and AFI. The extracts, LC and fractions were also evaluated for their antioxidant activity *in vitro* by the system β -caroteno/ linoleic acid and by test DPPH^{*} (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl). At first, it was found that the LC and EAQ of the pequi showed greater activity than the EALC. Still high activity was observed in all fractions analyzed. In the second test, we can observe that the EAQ of the pequi *in nature* showed greater activity, whereas in pequi processed, the EALC and LC had better results. It was also noted that the AFL has superior activity to other fractions. In general, the results of pequi processed were lower than in fresh pequi both in relation to content of FT as antioxidant activity. Verifying also, that this is mainly due to the loss of FT of the pulp, indicating that there was leaching of these compounds to the LC.

Keywords: Pequi. Phenolic compounds. Antioxidant activity.

1. INTRODUÇÃO

A fonte de radicais livres altamente reativos, especialmente os derivados do oxigênio, pode ser endógena (produzidos pelo organismo, associados a reações metabólicas) ou exógena (radiação ultravioleta, fatores ambientais como os pesticidas, poluição, cigarro e estilos de vida não saudáveis). Esses radicais podem provocar alterações tanto no corpo humano como nos sistemas alimentícios, sendo capazes de oxidar biomoléculas (DNA - ácido desoxirribonucléico, vitaminas, proteínas, lipídios), resultando na morte de células e danos aos tecidos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2003; SARIKURKCU et al., 2007). Por outro lado, o organismo humano dispõe de um sistema de defesa próprio que incluem as enzimas antioxidantes. Quando a quantidade de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) excede o limite dos mecanismos de defesa antioxidante, ocorre um desequilíbrio levando à condição de estresse oxidativo, principal fator responsável pelas doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT) (MATSUURA et al., 2008). Estudos recentes demonstram que o caminho mais provável e prático para diminuir o risco de ocorrência de tais doenças, é aumentar o *status* antioxidante do corpo, o qual pode ser alcançado pelo maior consumo de frutas e vegetais (RUFINO et al., 2010).

De acordo com Beal (2006), a preocupação com os efeitos deletérios das EROs é naturalmente seguida pelo interesse em compostos com atividade antioxidante. Nesse sentido, o consumo inadequado de frutas e vegetais é uma preocupação mundial, embora a ingestão de nutrientes varie conforme a região. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que o consumo mundial de frutas e vegetais seja de apenas 20-50% do mínimo diário recomendado (400g por pessoa) para a redução do risco de desenvolvimento de DCNT como câncer, diabetes, obesidade e doenças cardiovasculares. De fato, o consumo insuficiente desses alimentos é o sexto na lista da OMS das 20 causas de risco para mortalidade no mundo, atrás apenas de fatores mais conhecidos, como por exemplo, o tabagismo e o colesterol elevado (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO, 2006). As razões para uma ingestão inadequada desses alimentos variam entre os diferentes climas, culturas e países. Acrescenta-se ainda o fato de que, nos países desenvolvidos, onde as diferentes formas de frutas e

Introdução

verduras são abundantes, o baixo consumo é muitas vezes atribuído ao desejo dos consumidores por alimentos mais convenientes (RICKMAN; BARRETT; BRUHN, 2007). A OMS estima ainda que o consumo suficiente de alimentos de origem vegetal pode salvar até 2,7 milhões de vidas por ano (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO, 2006).

Os efeitos benéficos atribuídos às frutas e vegetais devem-se à variedade de constituintes presentes nos mesmos, tais como vitaminas, minerais, fibras e numerosos metabólitos secundários, incluindo flavonóides e outros compostos fenólicos (MARTINELLO, 2006). A ingestão dietética desses componentes alimentares fornece suporte eficaz para os sistemas de defesa do organismo. As vitaminas E, C e o β -caroteno, encontrados principalmente em alimentos de origem vegetal, são compostos já bem estabelecidos e conhecidos como antioxidantes (SIKORA et al., 2008). Atualmente, pesquisadores têm concentrado os estudos na importância dos compostos fenólicos presentes nas plantas, que há não muito tempo atrás eram considerados desnecessários para a dieta humana. Existem muitas evidências destacando seu superior potencial antioxidante quando comparados com os das vitaminas acima mencionadas (CIÉSLIK; GRĘDA; ADAMUS, 2006). Pesquisas recentes indicam claramente a importância das frutas e vegetais como a mais rica fonte potencial dessas substâncias e enfatiza a necessidade de aumentar a proporção desses produtos na dieta (SIKORA et al., 2008; OLIVEIRA, 2009).

Diante do crescente reconhecimento do valor nutricional e terapêutico das frutas tropicais, seu consumo vem aumentando nos mercados interno e internacional. As perspectivas são promissoras para a exploração de espécies não-tradicionais de frutas tropicais com consideráveis níveis de nutrientes e capacidade antioxidante. O Brasil possui um grande número de espécies frutíferas nativas e exóticas subexploradas de potencial interesse para a agroindústria. Esses frutos representam uma oportunidade para produtores locais de ganhar acesso a mercados especiais, onde os consumidores colocam a ênfase sobre o caráter exótico e presença de nutrientes capazes de prevenir DCNT (RUFINO et al., 2010). Nesse contexto, torna-se relevante conhecer mais a respeito do teor de compostos bioativos e da capacidade antioxidante de frutas e vegetais cultivadas nos trópicos. Diferentes estudos têm demonstrado que a contribuição individual dos compostos bioativos para atividade antioxidante varia com o tipo e concentração presente no tecido vegetal e vários métodos têm sido desenvolvidos para avaliar esta atividade

Introdução

em produtos vegetais. Porém, os resultados geralmente variam dependendo do tipo de produto e do método utilizado (CORRAL-AGUAYO et al., 2008).

Dentre as frutas que apresentam relevantes quantidades de nutrientes, podemos destacar o pequi. Este, na sua forma *in natura*, possui concentrações expressivas de compostos fenólicos e carotenóides totais, principalmente na polpa, conforme estudo realizado por Lima et al. (2007a). Este autor observou ainda, a presença de atividade antioxidante *in vitro*, demonstrada através de diferentes métodos. Entretanto, o pequi processado (em conserva) é a forma da fruta mais disponibilizada e usualmente consumida na entressafra e em diferentes regiões do Brasil e do exterior, onde a cozinha típica regional é apreciada (BEAL, 2006). Sabendo-se que alguns compostos bioativos são afetados durante o processamento de alimentos e tendo em vista que, os vegetais em geral são frequentemente consumidos sob a forma processada, o efeito do processamento sobre esses parâmetros merece ser investigado (SIKORA et al., 2008). Além disso, pouco se conhece sobre as concentrações de componentes bioativos em alimentos processados.

Diante de novas formas de expansão desses produtos no mercado e considerando as poucas informações e trabalhos relacionados aos efeitos do processamento do pequi sobre o teor de compostos fenólicos e sua capacidade antioxidante, este trabalho objetivou avaliar os teores de compostos fenólicos e a atividade antioxidante do pequi disponível no mercado tanto na forma *in natura* quanto processada (em conserva), visando um melhor aproveitamento de seu potencial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Radicais livres e seus efeitos

Processos metabólicos químicos exógenos e endógenos no corpo humano ou nos sistemas alimentícios podem produzir radicais livres altamente reativos, que são capazes de oxidar biomoléculas, resultando na morte de células e danos aos tecidos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2003; SARIKURKCU et al., 2007). Os radicais livres são espécies altamente instáveis porque têm um ou mais elétrons não pareados (OBOH, 2006). Eles podem apresentar o elétron não-pareado centrado no átomo de oxigênio ou no átomo de nitrogênio, sendo denominados respectivamente de "espécies reativas de oxigênio" (EROs) e de "espécies reativas de nitrogênio" (ERNs). EROs e ERNs podem também estar presentes na forma não-radicalar (não apresentam número ímpar de elétrons); mas, ainda assim, serem capazes de gerar espécies prejudiciais ao sistema biológico e altamente reativas (MIRANDA-VILELA, 2009).

EROs são biologicamente as espécies reativas mais importantes (OBOH, 2006). Essas espécies são produzidas durante o metabolismo aeróbico normal em sistemas biológicos. Devido a isso, recentemente, essas espécies têm atraído uma atenção especial. O oxigênio molecular recebe elétrons gerando EROs. Estas desempenham papéis importantes em benefício das espécies vivas, como o extermínio de bactérias e a apoptose de células defeituosas. Por outro lado, em cada organismo, existe um equilíbrio das necessidades a serem mantidas entre a geração e a eliminação de EROs pelos sistemas de defesa antioxidante. No entanto, quando a quantidade de geração de EROs excede o limite dos mecanismos de defesa, o desequilíbrio leva a DCNT (MATSUURA et al., 2008).

O termo EROs descreve coletivamente radicais livres como, por exemplo, superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila ($OH^{\cdot}$) e outros derivados não-radicais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2) e o ácido hipocloroso (HOCl) (CHOE; MIN, 2006). Exemplos de ERNs importantes fisiologicamente são o óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$). Deve-se notar que nem todas as EROs e ERNs são igualmente reativas. Alguns compostos, tais como H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ e $NO^{\cdot}$ reagem *in vivo* seletivamente com apenas algumas moléculas biológicas, enquanto

Revisão Bibliográfica

que, por exemplo, o radical $\text{OH}^\bullet$ é uma das EROs mais reativas que irão reagir instantaneamente com praticamente qualquer molécula que encontrar. Outras diferenças entre as várias EROs incluem o local de sua reatividade, pois os radicais livres reagem quase instantaneamente no local da sua formação, enquanto os não-radicais como o H_2O_2 podem também passar membranas biológicas e, dessa forma, se propagar, espalhando sua reatividade e possível toxicidade (BOOTS; GUIDO; HAENEN, 2008).

Muitos processos indesejáveis de oxidação, incluindo a deterioração de alimentos, envolvem a presença destes radicais livres. A peroxidação lipídica é um tipo de dano oxidativo que ocorre nas membranas celulares quando ácidos graxos insaturados reagem com EROs em níveis excessivos para formar radicais de ácidos graxos e hidroperóxidos lipídicos (LOOH). Esse processo desencadeia a autooxidação de ácidos graxos poliinsaturados, o que não somente diminui o valor nutricional dos alimentos, mas está também associado no organismo a danos na membrana celular, envelhecimento, doenças cardíacas, neurodegenerativas e câncer (SPITELLER, 2001). Além disso, a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) é um fator importante no desenvolvimento de doenças coronarianas e aterosclerose (BEAL, 2006). Os peróxidos gerados na autooxidação também exercem ação oxidativa sobre vitaminas, proteínas, carotenóides, DNA e outros compostos (SOARES, 2002).

De posse desses dados, busca-se compreender os mecanismos moleculares que sublinham o estresse redox e propor medicamentos ou alternativas nutricionais (alimentos ou nutrientes específicos) que possam diminuir a ação deletéria dessas espécies reativas sobre os alimentos e sobre o organismo humano (OLIVEIRA; VALENTIM; GOULART, 2009).

2.2 Antioxidantes

Os processos oxidativos nos organismos aeróbios induzidos por EROs podem ser evitados através de uma variedade de mecanismos de defesa, como atividades enzimáticas, presença de antioxidantes, seqüestradores de metais e diversos mecanismos de reparação (LIMA; VIEIRA; COSTA JUNIOR, 2007). Recentemente, alguns estudos epidemiológicos têm demonstrado que uma alta ingestão de

Revisão Bibliográfica

antioxidantes presentes em alimentos pode diminuir o risco de ocorrência de algumas doenças, além de atuarem na prevenção do desencadeamento de reações oxidativas, tanto nos alimentos como nos organismos humano ou animal (MATSUURA et al., 2008). Os antioxidantes são uma família heterogênea de moléculas naturais que, quando presentes em baixas concentrações, comparadas à do substrato oxidável, podem retardar ou inibir significativamente a oxidação de lipídios ou de outras moléculas (BEAL, 2006; BOOTS; GUIDO; HAENEN, 2008; OLIVEIRA; VALENTIM; GOULART, 2009). Estes compostos têm sido adicionados há anos nos alimentos para prevenir este processo e ainda hoje são amplamente usados para melhorar sua conservação (TORRES DE PINEDO; PEÑALVER; MORALES, 2007).

Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, por meio de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; o segundo abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxila ($RO^{\bullet}$) e peroxila ($ROO^{\bullet}$), através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (SOARES, 2002).

Os componentes que agem no sistema antioxidante podem ser endógenos, como, o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo), o ubiquinol-10 e as enzimas catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase; ou exógenos, isto é, presentes na dieta, como o ácido ascórbico, α -tocoferol, vitamina A, carotenóides, licopeno e compostos fenólicos (OLIVEIRA, 2003; PRIOR; CAO, 2000), além dos antioxidantes sintéticos.

Na indústria de alimentos, a oxidação lipídica é inibida pelo uso de antioxidantes sintéticos (SOARES, 2002) e, para estes serem utilizados em alimentos, devem ser seguros à saúde (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Há uma grande variedade de antioxidantes sintéticos utilizados, como o butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxi tolueno (BHT), galato de propila (PG) e o terc-butilhidroquinona (TBHQ), os quais atuam de forma a aumentar a vida de prateleira e reduzir perdas nutricionais pela inibição da oxidação do substrato (SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2003). Estes antioxidantes possuem atividade expressiva, mas a sua utilização está restrita a um máximo de 200ppm (TORRES DE PINEDO;

Revisão Bibliográfica

PEÑALVER; MORALES, 2007). No entanto, apesar do seu largo uso, o consumo de antioxidantes sintéticos em alimentos tem sido associado em ratos ao desenvolvimento de câncer, principalmente em doses mais elevadas. Isso tem levado à indústria de alimentos a reduzir o seu uso e, além disso, há uma tendência de substituição, ainda que parcial, por antioxidantes oriundos de fontes naturais (LIMA, 2008).

As pesquisas têm se dirigido no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles, com o intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos (SOARES, 2002). Além disso, muitos alimentos contêm substâncias que fazem parte dos mecanismos de defesa antioxidante necessários para limitar os níveis intracelulares de EROs e impedir a indução de danos. Por isso a importância de se conhecer a capacidade antioxidante dos alimentos, justificando um aumentado interesse em métodos de extração, caracterização e utilização de antioxidantes naturais a fim de auxiliar nessa proteção contra os radicais livres (BEAL, 2006; VEDANA et al., 2008).

A vitamina C e os compostos fenólicos, principalmente os flavonóides, atuam como antioxidantes hidrofílicos, já a vitamina E e os carotenóides atuam como antioxidantes lipofílicos (RUFINO et al., 2007). Esses compostos antioxidantes podem agir em conjunto, reduzindo o nível das EROs de maneira mais eficaz do que os antioxidantes simples isolados da dieta, funcionando como agentes sinérgicos. Além disso, uma mistura contendo antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos é capaz de eliminar os radicais livres nas fases aquosa e lipídica (PODSEDEK, 2007).

Em muitos estudos *in vitro*, os compostos fenólicos demonstraram maior atividade antioxidante do que as vitaminas e os carotenóides. A eficácia de um antioxidante depende da sua configuração, estabilidade em sistemas diferentes, bem como o número e a localização dos grupamentos hidroxila (PODSEDEK, 2007). Estes grupamentos são capazes de doar elétron ou cátion hidrogênio para estabilizar os radicais livres (TORRES DE PINEDO; PEÑALVER; MORALES, 2007). A vitamina E e os carotenóides contribuem para a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo, pois sequestram o oxigênio singlete. Flavonóides, bem como a vitamina C, apresentam uma atividade protetora para α -tocoferol nas LDL humanas, e eles também podem regenerar a vitamina E (PODSEDEK, 2007).

2.3 Compostos fenólicos

O consumo de vegetais tem sido associado a uma dieta saudável, mas além do seu potencial nutritivo, estes alimentos contêm diferentes compostos fitoquímicos, muitos dos quais desempenham funções biológicas, com destaque para aqueles com ação antioxidante (LIMA et al., 2004). Dentre estes compostos com esta ação, os fenólicos constituem um dos grupos de metabólitos secundários de plantas mais numerosos e onipresentes, com mais de 8000 estruturas atualmente conhecidas. Polifenóis naturais apresentam uma grande diversidade de estruturas que podem variar de simples moléculas (ácidos fenólicos, flavonóides) a compostos altamente polimerizados (ligninas, melaninas e taninos), com os flavonóides representando o subgrupo mais comum e amplamente distribuído (SOOBRAATTEÉ et al., 2005).

Em virtude de sua natureza química, atuam como agentes redutores, interrompendo a cadeia da reação de oxidação através da doação de elétrons ou de $H^{\bullet}$ aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis, ou complexando com metais, componentes iniciadores da oxidação lipídica, agindo, portanto, tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (MELO et al., 2008). Os compostos fenólicos podem possuir, pelo menos, um anel aromático, onde um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (GEOCZE, 2007), o qual é o principal fator estrutural responsável pela atividade antioxidante e seqüestradora de radicais livres dos derivados fenólicos (TORRES DE PINEDO; PEÑALVER; MORALES, 2007).

Existe uma grande variedade de compostos fenólicos, que podem ser classificados em dois grandes grupos: flavonóides e não flavonóides (LIMA et al., 2007a). Os primeiros são formados por dois anéis aromáticos unidos por um heterociclo oxigenado (C6-C3-C6) e se diferenciam em: flavonóis (2), flavonas (3), flavan-3-ols (4), antocianidinas (5), flavanonas (6) e isoflavonas (7), enquanto que aqueles componentes da dieta que são comparativamente menores são dihidroflavonóis (8), flavan-3,4-dióis (9), cumarinas (10), chalconas (11), dihidrochalcones (12) e auronas (13) (Figura 1). O esqueleto básico dos flavonóides pode ter vários substituintes. Grupamentos hidroxila estão normalmente presentes nas posições 4'-, 5- e 7-. Os açúcares são muito comuns, com a maioria dos flavonóides existindo naturalmente como glicosídeos. Considerando que ambos os

Revisão Bibliográfica

açúcares e grupamentos hidroxila aumentam a solubilidade em água de flavonóides, outros substituintes, tais como grupos metílicos e unidades isopentil, aumentam a solubilidade em sistemas lipídicos fazendo flavonóides lipofílicos (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

Figura 1. Estrutura química dos flavonóides e suas principais subclasses. Adaptado de Crozier, Jaganath e Clifford (2009).

Flavonóides são uma vasta classe de compostos de baixo peso molecular, amplamente distribuídos nas folhas, sementes, cascas e flores das plantas (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). Mais de 5000 flavonóides diferentes de ocorrência natural já foram identificados e esta lista ainda continua crescendo (BOOTS; GUIDO; HAENEN, 2008). Nas plantas, estes compostos oferecem proteção contra a radiação ultravioleta, patógenos e herbívoros. Em sistemas

Revisão Bibliográfica

biológicos, os efeitos protetores dos flavonóides são atribuídos a sua capacidade de seqüestrar radicais livres, catalisar complexantes de metais, ativar enzimas antioxidantes, reduzir radicais α -tocoferol, e inibir oxidases (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

Já os denominados de não flavonóides são divididos em três grupos. O primeiro é composto pelos ácidos benzóicos (salicílico, gentísico, *p*-hidroxibenzóico, protocatequínico, vanílico, gálico, elágico e siríngico), que possuem sete átomos de carbono (C6-C1), são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza e os mais importantes da dieta. O segundo é formado pelos ácidos cinâmicos (cinâmico, *o*-cumárico, *m*-cumárico, *p*-cumárico, caféico, ferúlico, sinápico), que possuem nove átomos de carbono (C6-C3) (SOARES, 2002) e são os ácidos fenólicos mais amplamente distribuídos em tecidos de plantas (KIM; LEE, 2004). E o terceiro grupo é formado pelos estilbenos derivados das estruturas químicas do hidroxifenilacético (C6-C2-C6) e são as fitoalexinas produzidas em resposta a doenças, injúrias e stress, como por exemplo, o trans-resveratrol, cis-resveratrol e trans-resveratrol-glucosídeo (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). A estrutura química dos ácidos benzóico e cinâmico encontram-se na figura 2.

Figura 2. Estrutura química dos ácidos benzóicos (A) e cinâmicos (B). Fonte: SOARES, 2002.

Revisão Bibliográfica

O ácido gálico é ácido fenólico mais comum, e ocorre largamente como complexo na forma esterificada a açúcar (galotaninos). Os hidroxicinamatos mais comuns são o ácido caféico, *p*-cumárico, ferúlico e sinápico (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

2.3.1. Compostos fenólicos em vegetais

Fenólicos em vegetais existem nas formas livres e conjugadas. A maioria deles encontra-se ligados a açúcares (glicosilados) (HACKMAN et al., 2008). Os açúcares mais comuns são D-glicose e L-ramnose, porém, pelo menos oito monossacarídeos diferentes ou combinações destes podem ligar-se aos diferentes grupos hidroxilas do flavonóide, resultando em um grande número de glicosídeos conhecidos (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008). Os flavonóis estão geralmente presentes na forma de monômeros aglicona (desprovidas de açúcares), oligômeros ou esterificados com ácido gálico para formar epigallocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG) e epigallocatequina galato (EGCG).

A epicatequina e a catequina são unidades monoméricas dos flavonóis e as proantocianidinas ou taninos condensados são polímeros desses monômeros (HACKMAN et al., 2008). Quando as moléculas que se condensam são catequinas ou epicatequinas, as proantocianidinas são denominadas procianidinas (EFRAIM et al., 2006). Estruturas fenólicas também são encontradas como parte da estrutura de proteínas, alcalóides e terpenóides (GEOCZE, 2007). Os ácidos fenólicos, além de se apresentarem sob sua forma natural, podem também se ligar entre si ou com outros compostos. A combinação mais importante destes ácidos ocorre com o ácido caféico, que, associado a um álcool-ácido cíclico (ácido quínico), origina o ácido clorogênico (SOARES, 2002). Estes compostos e os seus derivados são amplamente distribuídos em plantas e a eles têm sido atribuídos vários efeitos biológicos, incluindo atividade antioxidante (HARISH NAYAKA et al., 2008).

Geralmente nos produtos vegetais frescos apenas os flavonóides conjugados estão presentes, mas podem ser encontradas agliconas como resultado do processamento de alimentos. A maioria dos estudos sobre níveis de flavonóides vegetais determinaram agliconas após a hidrólise de extratos de alimentos pelo calor

Revisão Bibliográfica

e ácido, porque a determinação dos flavonóides glicosilados individualmente é difícil, devido à falta de compostos de referência (PODSEDEK, 2007).

A relação entre as estruturas de ácidos fenólicos e suas respectivas atividades antioxidantes tem sido estabelecida. Encontrou-se que os derivados do ácido cinâmico são antioxidantes mais ativos que os derivados do ácido benzóico. A presença do grupamento $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ nos derivados do ácido cinâmico assegura uma maior eficiência que o grupo COOH dos ácidos benzóicos. Cuvelier, Richard e Berset (1992) sugeriram que a ligação dupla participaria na estabilização dos radicais fenoxil por ressonância. A introdução de um segundo grupo hidroxil na posição *orto* ou *para* também aumentaria a atividade antioxidante. Por outro lado, a eficiência de unidades monoméricas foi também substancialmente aumentada por um ou dois substituintes metoxil (MARINOVA; YANISHLIEVA, 2003).

2.3.2. Ingestão e efeitos biológicos de compostos fenólicos

Dados sobre a ingestão total de compostos fenólicos são difíceis de serem obtidos, no entanto, estima-se que a ingestão dietética diária de flavonóis (fenólicos mais extensivamente estudados) seja cerca de 60mg/dia, embora ela possa variar muito, dependendo da ingestão de frutas, vegetais, chocolate, chás e de vinho tinto (HACKMAN et al., 2008). Na Polônia, considera-se que o consumo médio de flavonóis na dieta é estimado em 32mg/dia. Em comparação, na Finlândia são 55mg/dia; no Japão, 68mg/dia e, nos Estados Unidos 190mg/dia (CIÉSLIK; GREDA; ADAMUS, 2006). Existem bases de dados atuais sobre o conteúdo de flavonóides, além de dados sobre os flavonóis em alimentos e bebidas, mas o valor real pode variar bastante. O amadurecimento e outros fatores ambientais antes da colheita, assim como o processamento de alimentos podem influenciar no teor de flavonóides e também no perfil de monômeros e oligômeros, tanto positivamente quanto negativamente (HACKMAN et al., 2008).

Os compostos fenólicos, especialmente os flavonóides, possuem diferentes atividades biológicas, mas as mais importantes são: atividade antioxidante, efeito protetor vascular e efeitos inibitórios do desenvolvimento tumoral (PODSEDEK, 2007). Estudos epidemiológicos sugerem uma associação entre o consumo de alimentos e bebidas ricos em ácidos fenólicos e a prevenção de muitas doenças

Revisão Bibliográfica

(MORTON et al., 2000; YEH; YEN, 2006), como a redução na incidência de doenças do coração (BEAL, 2006). Fenólicos são especialmente atraentes como agentes profiláticos devido à sua elevada prevalência na dieta e também devido aos seus efeitos plurifarmacológicos (SOOBRAITÉ et al., 2005). Knekt et al. (1997) encontraram uma relação inversa entre o consumo de flavonóides na dieta e o desenvolvimento de tumores em indivíduos na faixa etária de 50 anos e não-fumantes. Os autores observaram que entre as muitas fontes de flavonóides da dieta, o consumo de maçãs apresentou os melhores resultados na redução do risco do desenvolvimento de tumores no pulmão. Já o consumo de vinho tinto provoca uma diminuição na agregação plaquetária, bem como um aumento na lipoproteína de alta densidade (HDL) independente do colesterol e do conteúdo de álcool do vinho. Segundo Frankel et al. (1993), compostos fenólicos encontrados no vinho tinto atuaram como inibidores da oxidação do colesterol e da LDL. Algumas evidências mostram ainda que os flavonóides podem proteger a membrana lipídica da oxidação (OBOH, 2005). Miranda-Vilela et al. (2009) estudando os efeitos do óleo de pequi em homens e mulheres corredores, sugeriram que o óleo da polpa da fruta *Caryocar brasiliense* apresenta efeitos anti-inflamatórios, além de reduzir significativamente os níveis de colesterol total e da LDL no grupo etário com mais de 45 anos, principalmente para os homens. Os dados sugerem também que o óleo de pequi pode ter um possível efeito hipotensor.

É interessante notar que o consumo de alimentos fontes desses compostos tem sido apontado como fator protetor para doenças, enquanto o consumo de suplementos isolados ainda enfrenta problemas quanto à dosagem e eficácia. A explicação para isso seria o efeito sinérgico dos compostos antioxidantes, a presença nos alimentos de outros compostos bioativos e de fibra alimentar e, possivelmente, a presença de outros fatores ainda não esclarecidos que potencializariam a ação antioxidante (CAMPOS et al., 2008).

Estudos epidemiológicos observacionais demonstram que um maior consumo de substâncias antioxidantes provenientes da dieta e, principalmente, dietas ricas em frutas e hortaliças diminuem o risco cardiometabólico. No entanto, quando se investe na suplementação de um micronutriente específico com propriedades antioxidantes para se reduzir a incidência de *diabetes mellitus* tipo 2 ou eventos cardiovasculares, o impacto é inexistente ou, por vezes, negativo. É possível que,

Revisão Bibliográfica

quando as dúvidas em relação à dose e à duração da suplementação de cada micronutriente forem esclarecidas, além da combinação ideal entre eles, já que eles podem atuar em sinergismo na proteção das células e tecidos para a prevenção das doenças crônicas, assim como quando o perfil do paciente que potencialmente se beneficiaria for estabelecido, o papel protetor desses compostos antioxidantes seja finalmente comprovado. Enquanto se aguardam essas respostas, é prudente e desejável o estímulo ao aumento do consumo de frutas e hortaliças, ricas em substâncias que combatem o estresse oxidativo, e não à ingestão de antioxidantes isolados ou associados na forma de suplementos (CATANIA; BARROS; FERREIRA, 2009).

2.4 Pequi

O pequizeiro é uma espécie típica da região do Cerrado, pertencente ao gênero *Caryocar* e à família Caryocaraceae (VERA et al., 2007) (Figura 3). O fruto é chamado de pequi que se origina do tupi “pyqui”, onde “py” significa casca e “qui”, espinhos referindo-se aos espinhos do endocarpo do fruto (RIBEIRO, 2000). É também conhecido popularmente por diversos outros nomes: piqui, pequiá, amêndoa de espinho, grão de cavalo, amêndoa do Brasil, piqui-do-cerrado, almendro, barbasco, jiquiá, pequizeiro, piquirana (MELO JÚNIOR et al., 2004; RIBEIRO, 2000). Todas estas são denominações comuns de plantas da espécie *Caryocar brasiliense* Camb e outras do mesmo gênero como *C. coriaceum* Witmm, *C. barbinerve* e *C. crenatum* (FERREIRA, 2007).

Figura 3. Árvore do pequizeiro.

Atualmente há uma discussão no campo da História Ambiental apontando que a região norte mineira foi ocupada, no passado, por índios nômades, sendo que eles apreciavam muito o pequi. Os constantes deslocamentos desses índios favoreceram a migração de sementes por quase todo o Cerrado, chegando até a região da Amazônia. Por isso, ainda hoje é possível encontrar resquícios de pequizeiros por várias partes do Brasil (SILVA; JESUS, 2008). Hoje em dia, no Brasil, é grande a área de incidência do pequizeiro, estendendo-se desde os estados do Amazonas, Pará, Maranhão, Piauí, Goiás, Bahia, Ceará, até São Paulo e Minas Geras, porém ocorre em grande abundância na região norte de Minas Gerais, onde a espécie mais freqüente é a *Caryocar brasiliense* Camb (FERREIRA, 2007; SILVA et al., 2001). Por outro lado, na parte mais setentrional do Nordeste brasileiro, é encontrada a espécie *Caryocar coriaceum* Witmm, que exerce um importante papel sócio-econômico na Chapada do Araripe e circunvizinhanças, dos estados do Ceará, Pernambuco, Maranhão e Piauí (RAMOS; SOUZA; GOMES, 2008; LORENZI, 2000).

O pequizeiro floresce de novembro a dezembro e frutifica de janeiro a abril (RAMOS et al., 2001). Esse extenso período de oferta de frutos, aliado à diversidade de regiões produtoras, possivelmente propicia o desenvolvimento de frutos com

Revisão Bibliográfica

variadas características físicas e químicas, o que merece ser cientificamente investigado (VERA et al., 2007), pois em cada lugar o fruto pode apresentar, por exemplo, uma especificidade, como tamanho, variação de cor, sabor, maior ou menor quantidade de polpa, e outros (SILVA; JESUS, 2008).

O pequi é um fruto drupáceo, globoso, áspero, verde acinzentado, de aspecto lobulado em função da presença de até quatro sementes volumosas, protegidas por endocarpo lenhoso, erizado de espinhos delgados e agudos, com uma amêndoa grande e carnosa (LIMA et al., 2007b; RAMOS et al., 2001). A parte comestível do fruto é formada pela semente envolta por uma camada de polpa geralmente espessa, de coloração variando de alaranjada intensa, amarela e até branca, rica em óleo. Esta polpa é a preferida pelos consumidores. Na parte interna da camada de polpa localiza-se uma fina camada de espinhos, e mais internamente uma amêndoa de cor branca, bastante oleosa (SOUZA; SALVIANO, 2002), conforme mostra a figura 4.

Figura 4. Partes que compõem o fruto do pequi: frutos com casca (A); mesocarpo externo e mesocarpo interno ou polpa (B); endocarpo espinhoso e amêndoa (C).

O pequizeiro predomina sobre as outras espécies do cerrado, tanto em área de ocorrência como em frequência. Dessa forma, merece atenção especial por sua ocorrência, volume de frutos comercializados e pelas características organolépticas de seu fruto (NAVES, 1999), marcadas por suas peculiaridades de cor, aroma, sabor, textura e aparência, tão apreciadas pela população local (RODRIGUES et al., 2007; SOUZA, E. et al., 2007). Vale ressaltar que existe ausência de plantios comerciais, bem como de suficientes resultados de pesquisa

Revisão Bibliográfica

em melhoramento genético, silvicultura e demais aspectos direcionados à melhoria de sua produtividade (ANTUNES et al., 2006).

Embora o pequizeiro seja uma das árvores brasileiras com um alto grau de aproveitamento, não só pelos seus frutos, mas pela árvore como um todo (SILVA et al., 2001), o potencial econômico da espécie ainda é pouco conhecido (FERREIRA, 2007). Ainda assim, em diversas regiões de cerrado do país, o extrativismo dos frutos de pequizeiro constitui-se em uma importante atividade econômica, geradora de renda e emprego (CALDEIRA JÚNIOR et al., 2007). Em virtude de sua polpa (mesocarpo interno), possui grande aceitação na culinária regional, sendo consumido com arroz, frango, feijão, batida com leite e açúcar, sorvetes, picolés, além de serem encontrados nos comércios urbanos pequi em conserva, em pasta e na forma de licor (SOUZA, O. et al., 2007). Ao avaliarem a aceitação do arroz com pequi elaborado conforme sua forma usual de consumo, Lima et al. (2007b) encontraram, de uma maneira geral, uma boa aceitação, o que refletiu diretamente na intenção de compra do produto. O pequi possui também potencialidade como biodiesel, e a sua polpa pode ser adicionada à cachaça, o que torna a bebida com coloração amarelada e com um sabor peculiar (SOUZA, O. et al., 2007).

2.4.1. Características do fruto do pequizeiro e sua produção

O fruto do pequizeiro (*C. brasiliense*) constitui-se em fonte de energia, proteínas, fibras, vitaminas e sais minerais (RODRIGUES et al., 2007). Sua polpa é altamente calórica, fornecendo cerca de 358 Kcal/100g de material. Cada 100g de polpa de pequi contém de 41,50 a 59,10% de umidade; 0,40 a 0,72g de cinzas; 2,20 a 6,0g de proteína; 6,8 a 13,0g de fibras; 11,45 a 21,47g de carboidratos e de 20,0 a 33,40g de lipídeos, dos quais cerca de 61,35% de seus ácidos graxos constituintes são insaturados. Os ácidos graxos predominantes na polpa são o oléico (48,7 a 57,4%), seguido pelo palmítico (34,4 a 46,79%), além de outros componentes minoritários como o palmitoléico, linoléico, linolênico, esteárico e araquídico (AZEVEDO-MELEIRO; RODRIGUEZ-AMAYA, 2004; LIMA et al., 2007a).

Além disso, o pequi é um fruto encontrado em regiões que recebem alta exposição solar, o que favorece a geração de radicais livres, além do que, tanto a

Revisão Bibliográfica

polpa quanto a amêndoa do pequi são ricas em lipídeos, como visto anteriormente, predominando em ambas os ácidos graxos insaturados, que são susceptíveis à oxidação, portanto esse vegetal está exposto a condições adversas que podem levar à formação de EROs. Nestas condições, visando à proteção do vegetal, pode ocorrer à biossíntese de compostos secundários com propriedades antioxidantes, que se depositariam no fruto e na amêndoa. Foi observado que os teores de carotenóides totais variam entre 6,75 a 11,34mg/100g, em função do grau de maturação dos frutos (ALMEIDA, 1998; RAMOS et al., 2001; LIMA, 2008). Diferentemente da espécie *C. brasiliense*, o *C. coriaceum*, devido à coloração muito clara da sua polpa, quase branca, apresenta um baixo teor de carotenóides (8,62 µg em equivalente de β-caroteno/g de amostra fresca) (OLIVEIRA, 2009).

Ramos et al. (2001), trabalhando com pequis procedentes de Mato Grosso do Sul, encontraram valores médios de 23,11 e 15,41mg de carotenóides totais por 100g de polpa crua e cozida, respectivamente. O teor de vitamina C é alto e pode variar de 70,9 a 105mg/100g se destacando entre as espécies nativas do cerrado (ALMEIDA, 1998; DAMIANI, 2006; LIMA et al., 2007a). Tanto a polpa quanto a amêndoa do pequi são fontes consideráveis de Manganês, Zinco, Cobre, Magnésio e Fósforo; contém ainda Sódio, Ferro e Cálcio (ALMEIDA; SILVA, 1994).

As características físico-químicas de pequis de 35 plantas nativas (*Caryocar coriaceum*), objeto de estudo de Oliveira (2009), apresentaram uma considerável variabilidade, tendência comumente observada, segundo o autor, em frutos de plantas oriundos de propagação de sementes. Dos parâmetros avaliados, o maior coeficiente de variação foi exibido pelo teor de cobre da polpa, seguido pela relação sólidos solúveis/acidez, acidez e pelo teor de ferro na amêndoa.

Os frutos são colhidos quando caem, pois quando coletados na árvore têm menor qualidade nutricional, no entanto os extrativistas afirmam que os últimos frutos de uma árvore possam ser derrubados sem prejuízos à qualidade (CALDEIRA JÚNIOR et al., 2007). Além disso, embora o pequi seja considerado maduro logo que cai da árvore, o processo de maturação continua após a queda natural (GONÇALVES, 2007). No município de Montes Claros, os teores de lipídeos, proteínas e carotenóides do pequi aumentaram com o avanço do estágio de maturação dos frutos (FERREIRA, 2007).

Revisão Bibliográfica

A polpa e a amêndoa (semente) fornecem óleo rico em riboflavinas, tiamina e carotenóides provitamínicos "A", tendo mérito terapêutico, uma vez que é excelente na prevenção e combate à hipovitaminose A (ROESLER et al., 2007). Além do β -caroteno, a polpa de pequi contém outros carotenóides, tais como o licopeno, zeta-caroteno, criptoflavina, β -criptoxantina, anteraxantina, zeaxantina, mutatoxantina, violanxantina, luteína e neoxantina. É rica em vitamina C e foram também identificados compostos fenólicos, como flavonóides, saponinas e óleos essenciais em extratos hidroetanólicos do mesocarpo interno de pequi, além de um teor de taninos de 0,17mg/100g de polpa. Todos esses componentes da polpa de pequi têm propriedades antioxidantes (MIRANDA-VILELA; RESCK; GRISOLIA, 2008). Como uso medicinal, possui efeito tonificante, sendo usado contra bronquites, gripes e resfriados e no controle de tumores. O chá das folhas é tido como regulador do fluxo menstrual (ROESLER et al., 2007). Foi descrita também a atividade antifúngica das folhas, potencial antioxidante da casca, atividade tripanocida do extrato da casca e atividade antimutagênica e antioxidante do extrato da polpa (GONÇALVES, 2007).

A produção de pequi no Brasil atingiu 5.363 toneladas em 2007, gerando uma receita de R\$ 6.035.000,00. O crescimento de produção entre 2006 e 2007 foi de 0,2%. Das regiões brasileiras, o Nordeste apresentou a maior produção de pequi no ano de 2007 (2.978 toneladas), sendo que somente o estado do Ceará gerou 2.657t e a Bahia apenas 279t. O Sudeste vem logo em seguida com 1.563t produzidas, com o estado de Minas Gerais se destacando como o único produtor. A região Centro-Oeste produziu 444t e a região Norte 378t (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2007).

O fruto *in natura* e o óleo da polpa são vendidos à margem das rodovias e também para atravessadores que destinam os frutos e seus produtos para os centros de comercialização, centrais de abastecimento (CEASAS) e mercados municipais (GONÇALVES, 2007). A comercialização de pequi na CEASA-MG em 2005 alcançou 327.895kg (FERREIRA, 2007). Na CEASA-GO, o volume de comercialização dos frutos, no ano de 2008, foi de aproximadamente 3.570.240,00kg com um valor médio de venda de R\$ 468,75/tonelada (CENTRAIS DE ABASTECIMENTO DE GOIÁS, 2008). Estes números são

Revisão Bibliográfica

subestimados, uma vez que somente parte do que é comercializado utiliza este canal para escoar o produto (OLIVEIRA et al., 2008).

Em relação ao consumo e comercialização municipal do fruto do pequi, existem carências de estatísticas oficiais, apesar disso, observa-se que ele é bastante utilizado em pratos típicos regionais e no comércio em feiras, mercados e frutarias durante a safra e também na entressafra, onde o fruto processado é comercializado, principalmente sob a forma de conservas.

Há no Brasil uma Lei Federal de proteção dos pequizeiros, mas ela se restringe ao Parque Nacional dos Pequizeiros, Planaltina, no Distrito Federal. No entanto, alguns estados têm criado suas próprias leis (SILVA; JESUS, 2008). Em Minas Gerais observa-se um crescente aumento da produção, industrialização e comercialização do pequi e seus derivados, estimulados por iniciativas como a Lei do “Pró-pequi” que incentiva o cultivo, a extração, o consumo, a comercialização e a transformação do pequi e demais frutos e produtos nativos do cerrado, além da organização de cooperativas e associações, voltadas a preservação e o aproveitamento de frutos do cerrado. O uso diversificado e a qualidade nutricional do pequi têm elevado o interesse pelo produto atualmente, refletindo em aumento do volume do fruto comercializado nos últimos anos (FERREIRA, 2007).

2.4.2. Compostos fenólicos no pequi

Segundo Oliveira (2009), praticamente inexistem trabalhos sobre a quantificação de compostos fenólicos na porção comestível (polpa e amêndoa) do pequi. No Laboratório de Lípides da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São Paulo (USP), Lima et al. (2007a) demonstraram que a polpa do pequi possui 209mg/100g de fenólicos totais, valores superiores aos encontrados na maioria das polpas de frutas consumidas no Brasil, como açaí (136,8mg/100g), goiaba (83,1mg/100g), morango (132,1mg/100g), abacaxi (21,7mg/100g), graviola (84,3mg/100g) e maracujá (20,2mg/100g), sendo inferior apenas a acerola (580,1mg/100g) e a manga (544mg/100g).

Os mesmos autores avaliaram ainda, os compostos fenólicos presentes no extrato aquoso e nas frações ricas em ácidos fenólicos livres (AFL), ésteres solúveis (AFS) e frações de ésteres insolúveis (AFI) da polpa e da amêndoa de pequi

encontrando uma similaridade na composição em ácidos fenólicos, sendo identificados em ambos os ácidos elágico, gálico (Figura 5), 4-hidroxi benzóico e *p*-coumárico, além do flavonóide procianidina B2; este último somente presente na amêndoa. No extrato aquoso, o ácido elágico foi encontrado em maior concentração (32,2µg/g de amostra fresca), assim como em todos os extratos e frações analisadas, seguido pelo ácido *p*-cumárico (27,4µg/g de amostra fresca) e pelo ácido gálico (9,56µg/g de amostra fresca). Além disso, o extrato aquoso e a fração AFL do pequi administrados aos animais foram capazes de reduzir a lipoperoxidação nos tecidos cerebral, hepático e no plasma dos animais; observou-se um efeito dose-resposta inversamente proporcional entre a concentração do extrato e/ou fração de ácidos fenólicos e a lipoperoxidação no cérebro dos animais. Estes resultados apontam a polpa do pequi como um alimento com elevada capacidade antioxidante (LIMA, 2008).

Figura 5. Estrutura química dos ácidos fenólicos predominantes na polpa e na amêndoa do pequi (elágico e gálico).

A atividade antioxidante do extrato aquoso da polpa de pequi se mostrou superior ao BHT em concentrações equimoleculares, usando o método do β -caroteno/ácido linoléico (LIMA, 2008).

2.5 Processamento do pequi

Além do consumo *in natura*, o fruto do pequi e sua planta têm diversas outras utilidades (SIMÕES, 2007). Ele apresenta uma inconveniência que pode constituir-se em entrave ao seu consumo *in natura*: o mesocarpo interno, a porção comestível,

Revisão Bibliográfica

encontra-se aderido ao endocarpo espinhoso (RODRIGUES et al., 2007). Além de seguir para os centros de comercialização, o pequi tem servido de matéria-prima para pequenas agroindústrias que obtêm do fruto conservas, temperos, licor, congelados e outros (GONÇALVES, 2007).

A partir do conhecimento de novas técnicas de conservação, o processamento agroindustrial da polpa de pequi passou a garantir renda aos agricultores na entressafra. O consumo do pequi ao longo de todo o ano se faz por meio do uso de conservas (Figura 6) ou do armazenamento em freezer (congelamento). Estas são as técnicas mais utilizadas (SIMÕES, 2007).

Figura 6. Conserva de pequi.

No norte de Minas Gerais, as conservas de polpa de pequi são processadas de forma artesanal ou industrial. Nas indústrias desta região, o processo de fabricação das conservas envolve principalmente as seguintes etapas: limpeza dos frutos *in natura*, separação das sementes, seleção e classificação, lavagem, despulpamento, branqueamento, resfriamento, enchimentos das embalagens de vidro, adição de salmoura acidificada com ácido cítrico ou vinagre, adição do

conservante benzoato de sódio, deaeração, e selagem (FERREIRA, 2007), conforme se verifica na figura 7.

Figura 7. Fluxograma do processo de fabricação de conservas de pequi.

Revisão Bibliográfica

Todas esses pontos podem afetam as características físicas e biológicas do pequi em conserva, retardam a deterioração e melhoraram a segurança do produto. Visto que o pequi é um fruto de baixa acidez (pH: 5,5-6,5), as conservas devem ser suficientemente acidificadas para inibir o crescimento de microorganismos patogênicos, especialmente *Clostridium botulinum*, que cresce em valores de pH acima de 4,6 (FERREIRA; JUNQUEIRA, 2007).

Já o congelamento apresenta-se atualmente como alternativa viável à conservação do pequi, em condições adequadas, garante ao produto características nutricionais e de cor, sabor e aroma que mais se aproximam do produto fresco, quando comparado com o produto processado. Porém, como muitos alimentos são consumidos após algum tipo de processamento ou armazenamento eles podem ter seu valor nutritivo e características sensoriais alteradas (GONÇALVES, 2007). Pesquisadores do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes) desenvolveram um projeto voltado para o processamento agroindustrial da polpa de pequi e a fabricação de conservas. A análise surpreendeu ao revelar que o pequi em conserva e o pequi congelado não apresentaram diferenças sensoriais. Dessa forma, a conserva ganha espaço como um produto novo que vem servir como forma alternativa ao congelamento (SIMÕES, 2007).

Em função da presença do endocarpo espinhoso, da produção sazonal com curta duração, da grande produtividade, potencial nutritivo e econômico, da rápida deterioração e do alto custo de conservação por métodos convencionais, como o congelamento, reforça-se a importância do desenvolvimento e aplicação de técnicas adequadas à conservação do pequi, bem como a obtenção de informações sobre o efeito de tais técnicas na qualidade deste fruto que é consumido tradicionalmente cozido (FERREIRA, 2007; GONÇALVES, 2007). A conserva de pequi, devido ao menor custo de conservação em relação ao congelamento, tem sido usada tradicionalmente pela população e pelas indústrias como a principal forma de conservação do fruto (FERREIRA, 2007). Com isso, o pequi processado pode propiciar um aumento na conveniência do fruto, ser considerado uma alternativa na agregação de valor ao produto, contribuir para a expansão do fruto na culinária brasileira, além de ser atrativo para a sua comercialização e ainda tem a vantagem de preservar as suas características sensoriais (RODRIGUES et al., 2007).

Revisão Bibliográfica

O processamento ainda carece de melhor implementação tecnológica, e já representa uma perspectiva de melhoria da renda e geração de empregos em períodos de entressafra do pequi (GONÇALVES, 2007), sendo que esse processamento agroindustrial se caracteriza por não exigir muita sofisticação de equipamentos e instalações. Por intermédio de iniciativas individuais ou do cooperativismo, agroindústrias para o processamento do pequi podem ser instaladas (FERREIRA, 2007).

A utilização de conservas de pequi pode ser considerada uma boa alternativa para o consumo do fruto, porém, geralmente as concentrações de compostos bioativos e atividade antioxidante em vegetais processados são inferiores aos das amostras cruas correspondentes (PODSEDEK, 2007). Segundo Bunea et al. (2008), os compostos fenólicos podem ser afetados durante o processamento e a preparação, especialmente durante o tratamento térmico aplicado antes do consumo.

Embora o consumo de frutos frescos, transformados e produtos hortícolas seja amplamente defendido, isso pode nem sempre ser possível de se realizar devido a razões de custo, disponibilidade e sazonalidade. O processamento, portanto, torna-se necessário e, em muitos aspectos, desejável. O consumo de produtos frescos pode ser complementado por formas processadas, não só para aumentar o consumo global, mas também para permitir uma ingestão regular durante todo o ano (THANE; REDDY, 1997), pois apesar da possível degradação dos nutrientes durante o processamento, armazenamento e preparação na cozinha, frutas e legumes são fontes de muitas vitaminas e minerais, bem como de fibras (RICKMAN; BARRETT; BRUHN, 2007).

2.5.1. Influência do processamento sobre os compostos fenólicos do pequi

As perdas durante o processamento do pequi necessitam ser levadas em conta quando for realizado o cálculo da ingestão dietética de antioxidantes em alimentos processados. No caso de compostos fenólicos, que são espécies altamente reativas, o método de preparação da amostra também é muito importante. Fenólicos em vegetais existem nas formas livres e conjugadas. Geralmente, nos produtos vegetais frescos apenas flavonóides conjugados estão presentes, mas

agliconas podem ser encontradas como resultado do processamento de alimentos (PODSEDEK, 2007).

Os perfis de fenólicos em cada espécie vegetal são determinados por um sistema intrínseco de enzimas controladas geneticamente que regulam a síntese e distribuição nas plantas. Em adição aos fatores intrínsecos, o conteúdo de flavonóides e ácidos fenólicos, de uma maneira geral, é fortemente influenciado por fatores extrínsecos como cultivar, maturidade na época da colheita, estação do ano, incidência de radiação ultravioleta (UV), composição do solo, condições no período pré-colheita (clima) e condições de armazenamento e processamento no período pós-colheita (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008). Hoje em dia, as informações são limitadas no que diz respeito à influência dos processos de conservação em vegetais sobre o nível de compostos fenólicos e capacidade antioxidante (DÉCORDÉ et al., 2008).

Além disso, os compostos fenólicos não são uniformemente distribuídos dentro dos tecidos das frutas (ASAMI et al., 2003). Eles juntamente com outros compostos fitoquímicos são encontrados em quantidades significativas nas cascas de frutas, de modo que algum conteúdo é perdido durante a etapa de descascamento (RICKMAN; BARRETT; BRUHN, 2007). Os compostos fenólicos nas camadas mais externas das plantas, como na casca, estão presentes em altas concentrações para proteger os materiais interiores, como o cotilédone. Alguns ácidos fenólicos, no entanto, estão covalentemente ligados a polímeros insolúveis e a outros componentes da parede celular, tais como arabinoxilanos. O tratamento térmico pode liberar os compostos antioxidantes de baixo peso molecular das subunidades repetidas em polímeros de alto peso molecular (FRANCISCO; RESURRECCION, 2009).

No caso de maçãs e uvas, o acúmulo de compostos fenólicos de baixo peso molecular é maior em tecidos externos do que nos tecidos internos (ASAMI et al., 2003). A remoção da casca de pêssago, por exemplo, resultou em perda de 13-48% de fenólicos totais, dependendo do estágio de maturidade do fruto. A separação de outros tecidos vegetais, como a remoção de caules de cogumelos, também pode influenciar a composição final de fenólicos em um alimento (RICKMAN; BARRETT; BRUHN, 2007).

Revisão Bibliográfica

Essa distribuição dos fenólicos é importante no que diz respeito à sua composição global e a capacidade antioxidante dos alimentos processados industrialmente (ASAMI et al., 2003), e, por se tratarem de espécies altamente reativas, o método de preparação da amostra também é muito importante (PODSEDEK, 2007). As perdas durante o processamento podem ser mínimas ou mais extensas, envolvendo procedimentos tais como lavagem, descascamento, corte, branqueamento, enlatamento, esterilização, congelamento, cozimento, uso de produtos químicos de transformação, secagem (desidratação), congelamento, além do uso de conservas. Todos têm um impacto potencial sobre o rendimento, forma e biodisponibilidade dos compostos fitoquímicos (SULTANA; ANWAR; IQBAL, 2008; THANE; REDDY, 1997).

Durante o processamento de vegetais ocorrem mudanças qualitativas, desarranjo estrutural de antioxidantes e sua lixiviação para a água, principalmente de compostos fenólicos, já que eles são solúveis em água, o que pode influenciar na sua atividade antioxidante (PODSEDEK, 2007). Nicoli, Anese e Parpinel (1999) apontaram diferentes conseqüências de armazenamento e processamento sobre as propriedades antioxidantes de alimentos, como: perda de antioxidantes naturalmente presentes, melhora da capacidade antioxidante de compostos naturalmente presentes, formação de novos compostos com atividade antioxidante ou pró-oxidante ou, ainda, nenhuma mudança na concentração de antioxidantes naturalmente presentes. Efeitos positivos e negativos têm sido relatados, dependendo das diferenças nas condições de processamento e características morfológicas e nutricionais das espécies vegetais (MIGLIO et al., 2008).

A vitamina C, as vitaminas do complexo B e os compostos fenólicos são todos, em diferentes graus, solúveis em água, termicamente lábeis e sensíveis à oxidação. Todas estas propriedades fazem com que esses nutrientes sejam mais suscetíveis à degradação durante o processamento, armazenamento e cozimento do que os nutrientes lipossolúveis (RICKMAN; BARRETT; BRUHN, 2007).

O branqueamento, que se caracteriza como um processo térmico de curto tempo de aplicação, inativa as enzimas causadoras da oxidação dos fenólicos, porém operações como corte e fatiamento podem provocar uma rápida depleção enzimática de vários antioxidantes naturais como resultado do rompimento celular, permitindo o contato entre substratos e enzimas. A degradação química pode ainda

Revisão Bibliográfica

ocorrer durante o armazenamento, dependendo do calor, da disponibilidade de oxigênio e da exposição à luz. Estes processos trariam uma série de mudanças nas características físicas e na composição química de vegetais (RICKMAN; BARRETT; BRUHN, 2007; SULTANA; ANWAR; IQBAL, 2008).

Oliveira e Vilas Boas (2009) conduziram um estudo, onde foram feitas conservas com quatro diferentes tipos de tratamentos, as quais tinham proporções distintas dos conservantes (salmoura de cloreto de sódio, ácido cítrico, benzoato de sódio e vinagre de álcool). Verificaram que não foram detectadas atividades das enzimas polifenoloxidase, peroxidase, pectinametilesterase e poligalacturonase durante armazenamento. O branqueamento em água fervente durante 3 minutos foi eficiente para completa inativação das referidas enzimas. Os teores de carotenóides totais e vitamina C diminuíram com o armazenamento.

Uma vez que os compostos fenólicos possam sofrer oxidação durante o armazenamento e durante o transporte para o mercado varejista, torna-se importante medir a composição fenólica de produtos alimentares disponíveis no mercado. Vários autores têm simulado estas condições com cultivares frescos, congelados e/ou armazenados sob a forma de conservas a partir de cultivares únicos. Outros pesquisadores optaram pela compra de frutas e legumes processados disponíveis no mercado a fim de examinar as diferenças nos cultivares e quantificar o que está à disposição do consumidor. Embora os cultivares provavelmente não sejam consistentes e os produtos tenham sido submetidos a diferentes tipos de armazenamento e condições de processamento, esses estudos de mercado oferecem uma representação das diferenças nutricionais entre produtos submetidos a diversos tipos de processamentos que estão disponíveis para os consumidores naquele local (RICKMAN; BARRETT; BRUHN, 2007).

Considerando que o Brasil possui boa produção e consumo de pequi, alguns trabalhos científicos investigaram suas características e também a sua capacidade antioxidante no fruto não processado, porém uma parcela deste é consumida após sua exposição a diferentes métodos de processamento e armazenamento. Portanto, o impacto desses métodos na capacidade antioxidante do fruto merece ser investigado, de modo a fornecer informações adicionais sobre a importância da contribuição do pequi, para ingestão de antioxidantes na dieta.

2.6 Extração de compostos antioxidantes empregando solventes

A identificação de compostos antioxidantes de origem vegetal é normalmente realizada através de diferentes técnicas de extração, levando em conta a química e a distribuição desigual destes compostos na matriz vegetal. Por exemplo, compostos fenólicos solúveis estão presentes em concentrações mais elevadas nos tecidos externos (camadas epidérmica e subepidérmica) das frutas e grãos do que nos tecidos internos (mesocarpo e polpa) (SULTANA; ANWAR; ASHRAF, 2009).

A extração por solvente é a técnica mais frequentemente utilizada de isolamento de compostos antioxidantes, no entanto, os rendimentos dos extratos resultantes e as atividades antioxidantes dos materiais vegetais são fortemente dependentes da natureza desse solvente de extração, devido à presença de diferentes compostos, de suas características químicas variadas e polaridades que podem ou não ser solúveis num determinado solvente (SULTANA; ANWAR; ASHRAF, 2009).

Dessa forma, os compostos bioativos são extraídos de forma diferente quando se modifica o sistema de solventes. Com diferentes extratos, busca-se extrair o maior número possível de compostos (VEDANA, 2008). Assim, sugere-se que a extração dos polifenóis seja efetuada por solventes orgânico-aquosos de polaridades diversificadas, empregando pelo menos dois ciclos de extração (MELO et al., 2008). Os solventes geralmente utilizados são metanol, etanol, acetona, água e suas misturas (DAI et al., 2009).

2.7 Determinação dos fenólicos totais (FT)

Os métodos *Folin-Denis* e *Folin-Ciocalteu* são exemplos de métodos utilizados para a determinação de FT (VEDANA, 2008). O ensaio de Folin e Ciocalteu (1927) é um dos mais antigos e tem sido utilizado para mensurar os FT em produtos naturais, sendo o seu mecanismo básico, uma reação de oxi-redução. Embora não caracterize a atividade antioxidante, este método é um dos melhores para estimar esta atividade em amostras de alimentos (ROGINSK; LISSI, 2005).

Esse método espectroscópico é simples e um dos mais utilizados, baseando-se na redução do ácido fosfomolibdídico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas, originando óxidos azuis de tungstênio (W_8O_{23}) e de molibdênio (Mo_8O_{23}) (GEOCZE, 2007). Um complexo de coloração azul é então formado, permitindo a determinação da concentração das substâncias redutoras que, não necessariamente, precisam ter natureza fenólica (OLIVEIRA; VALENTIM; GOULART, 2009). O número de hidroxilas ou de grupos potencialmente oxidáveis controla a quantidade de cor formada. O comprimento de onda máximo é de 720 nanômetros (nm). A reação ocorre em meio alcalino e a solução de carbonato de sódio é a base mais indicada (GEOCZE, 2007).

Na realidade, o método, popularmente reconhecido como o teste para medir o conteúdo total de fenólicos, mede a capacidade redutora das amostras (OLIVEIRA; VALENTIM; GOULART, 2009), sofrendo a interferência de várias substâncias, particularmente açúcares redutores, aminoácidos (tirosina e triptofano), aminas aromáticas, enxofre, ácidos orgânicos e ácido ascórbico (AL-DUAIS et al., 2009; VEDANA, 2008). Tem-se argumentado que este reagente pode ser inadequado para extratos de plantas com altos níveis de outras substâncias facilmente oxidáveis tais como açúcares e ácido ascórbico (PADDA; PICHA, 2007). Apesar dessas limitações, este protocolo é fácil de executar e têm sido freqüentemente utilizado para estimar o teor de FT em frutas e legumes (PADDA; PICHA, 2007; TABART et al., 2009).

2.8 Métodos para avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

O grande interesse em avaliar a atividade antioxidante de alimentos no início da década de 90 foi acompanhado pelo desenvolvimento de métodos para a sua determinação (ROGINSKY; LISSI, 2005). Desde então, novos métodos têm sido desenvolvidos para avaliar a eficiência dos antioxidantes da dieta como compostos puros ou como extratos de alimentos, bem como para determinar a atividade antioxidante do plasma (índice *in vivo*) (PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000).

No caso dos alimentos, a atividade antioxidante é necessária para determinar a eficácia dos compostos naturais na proteção contra danos oxidativos, a fim de evitar alterações deletérias e perda de valor comercial e nutricional (SANCHEZ-

Revisão Bibliográfica

MORENO, 2002). Existe uma falta de informação a respeito do teor de compostos bioativos e atividade antioxidante de frutas cultivadas nos trópicos. Diferentes estudos têm demonstrado que a contribuição individual dos compostos bioativos para atividade antioxidante varia com o tipo e concentração presente no tecido (CORRAL-AGUAYO et al., 2008). Assim, a atividade antioxidante de cada produto vegetal pode ser um parâmetro para determinar a sua qualidade (SANCHEZ-MORENO, 2002).

Partindo desta necessidade, separar cada composto antioxidante de um alimento e estudá-lo individualmente é ineficiente e caro, devido à sua complexa composição. Além disso, os compostos podem interagir uns com os outros produzindo efeitos sinérgicos ou inibitórios. Portanto, é muito importante para os pesquisadores ter um método adequado para a quantificação rápida da eficácia antioxidante. No entanto, tais métodos estão ainda a serem desenvolvidos (HUANG; OU; PRIOR, 2005). Não existe um método universal simples pelo qual "a capacidade antioxidante total" possa ser medida precisamente e quantitativamente (FRANKEL; MEYER, 2000; SANCHEZ-MORENO, 2002; SUN; TANUMIHARDJO, 2007). Em decorrência da grande diversidade química existente, especialmente entre os compostos fenólicos (OLIVEIRA; VALENTIM; GOULART, 2009), vários são os métodos usados tanto para compostos isolados como para extratos (VEDANA et al., 2008). Torna-se, portanto, difícil definir qual o melhor método a ser empregado. E isso tem dificultado a comparação de resultados entre estudos (CAMPOS et al., 2008)

Os métodos utilizados, de uma maneira geral, focam em diferentes mecanismos do sistema de defesa antioxidante, assim, alguns métodos determinam a capacidade dos antioxidantes em sequestrar radicais livres gerados no meio reacional, como os ensaios: capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC), capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) e capacidade de redução total do plasma (TRAP). Outros métodos como o 2,2 difenil-1-picril-hidrazila (DPPH^{*}) e o N,N-dimethyl-p-phenylenediamine (DMPD) medem o seqüestro dos radicais estabilizados pelos antioxidantes. O ensaio xantina/xantina oxidase determina a eficiência dos antioxidantes em sequestrar oxigênio singlete gerado pelo sistema enzimático. Outros métodos avaliam a inibição da peroxidação lipídica por antioxidantes, como a quantificação de dienos, peróxidos, ou hidroperóxidos, bem

Revisão Bibliográfica

como produtos resultantes da decomposição dos peróxidos lipídicos, tais como malonaldeído determinado pelo método TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000). Estes ensaios diferem em relação ao mecanismo de reação, às espécies-alvo, às condições reacionais e na forma com os resultados são expressos (OLIVEIRA; VALENTIM; GOULART, 2009).

Os méritos e desvantagens desses métodos têm sido amplamente debatidos em várias revisões (FRANKEL; MEYER, 2000; HALLIWELL et al., 1995; ROGINSKY; LISSI, 2005; SINGH; SINGH, 2008). Recomenda-se utilizar pelo menos dois métodos (YU et al., 2007), pois cada um é baseado em mecanismo diferente (TABART et al., 2009). Os primeiros devem ser ensaios de inibição, onde o marcador de atividade antioxidante é a extensão do sequestro de um radical livre pelo átomo de hidrogênio, ou através da doação de elétrons. Trata-se de uma medida indireta do poder antioxidante total. A segunda abordagem deve incluir ensaios envolvendo a presença de sistemas antioxidantes durante a geração do radical, para que a atividade seja medida e comparada com a taxa de oxidação de uma molécula-alvo na presença e ausência de sistema antioxidante (SINGH; SINGH, 2008).

As determinações feitas na capacidade antioxidante *in vitro* da uma idéia aproximada do que acontece no complexo *in vivo* (KUSKOSKI et al., 2005).

2.8.1. Sistema β -caroteno/ácido linoléico

Quanto à medida da capacidade de inibir a oxidação lipídica, o método da oxidação acoplada do β -caroteno/ácido linoléico é bastante empregado. O ensaio baseia-se na descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico em emulsão aquosa. A perda da coloração alaranjada característica do sistema é monitorada espectrofotometricamente pelo decaimento da absorbância na região do visível de modo a quantificar o grau de inibição da oxidação pelo antioxidante (CAMPOS et al., 2008). A adição de uma amostra contendo antioxidante, antioxidantes individuais, ou extratos naturais resulta no retardo do decaimento do β -caroteno (ROGINSKY; LISSI, 2005), pois eles se

Revisão Bibliográfica

encarregam de proteger o ácido linoléico, prolongando o período de formação dos radicais (LIMA et al., 2004).

Segundo Carpes (2008), o método β -caroteno emprega um emulsificante lipídico, o qual introduz um grande número de variáveis que influenciam a oxidação em comparação aos lipídeos puros. Neste método o complexo fenômeno interfacial denominado *paradoxo polar* influencia o comportamento dos antioxidantes. Neste caso os antioxidantes apolares (lipossolúveis) exibem fortes propriedades antioxidativas em emulsões porque eles estão concentrados na superfície lipídeo/água e desta forma, asseguram maior proteção. Por outro lado, os antioxidantes polares (hidrossolúveis) restantes na fase aquosa estão mais diluídos e dessa forma, menos efetivos para proteger o lipídeo.

Esse conceito pode ser entendido melhor em sistemas multifases, como o empregado neste método, onde a eficiência do antioxidante é grandemente afetada pelas propriedades de solubilidade, que determinam a distribuição dos compostos nas diferentes fases, incluindo a localização e a orientação. É comum observar que antioxidantes apolares, como o α -tocoferol, são relativamente ineficientes em óleos, mas altamente eficazes em uma emulsão água-óleo. Em contraste, um antioxidante polar como o ácido ascórbico ou trolox (análogo sintético da vitamina E) pode ter maior eficiência em óleos do que em emulsões. Este fato tem sido descrito como *paradoxo polar*, ou seja, os antioxidantes polares são mais ativos em lipídeos puros enquanto os apolares são mais ativos em substratos polares (PORTER, 1993; FRANKEL et al., 1994). Ele é baseado na suposição de que o início da oxidação de lipídeos está localizado na interface do sistema. Dessa forma, a oxidação do óleo puro, ocorre na interface ar/óleo, onde os antioxidantes hidrofílicos estão concentrados, enquanto a oxidação de emulsões está localizada na interface óleo/água onde os antioxidantes lipofílicos estão localizados (FRANKEL; MEYER, 2000). Porém este comportamento nem sempre é aplicável em todas as situações (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BREST, 1995).

Pesquisadores têm reportado que alguns compostos não agem segundo o *paradoxo polar* e que a partição dos antioxidantes entre as fases de óleo e de água depende de diferentes fatores. Isto sugere que a atividade antioxidante é afetada por um fenômeno complexo e que a polaridade não consiste no único parâmetro que influencia a ação dos antioxidantes. As características estruturais dos antioxidantes

tais como a localização dos grupos hidroxila, parecem ser mais importantes que a polaridade dos extratos em si. Além disso, a composição complexa dos extratos pode levar a algumas interações entre seus componentes, desencadeando efeitos sinérgicos, aditivos ou antagônicos (CARPES, 2008; PRADO; ARAGÃO; FETT, 2009).

2.8.2. Método do radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

Em 1922, Goldschmidt e Renn descobriram um radical livre estável de cor violeta (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl), que hoje é usado como reagente colorimétrico para processos de oxi-redução (Figura 8) (IONITA, 2005). O DPPH[•] não ocorre naturalmente e é relativamente estável comparado com as espécies altamente reativas como os íons superóxido e hidroxila, primariamente responsáveis pelo dano oxidativo em sistemas biológicos (ROCHA-GUZMÁN et al., 2009).

Figura 8. Estrutura do radical DPPH[•] (2,2 difenil-1-picril-hidrazila).

O DPPH[•] pode ser mantido indefinidamente com pouca decomposição porque ele não reage com o oxigênio. O método provou ser bastante útil em uma série de investigações, tais como a determinação das propriedades antioxidantes de aminas, fenóis ou compostos naturais (vitaminas, extratos vegetais, medicamentos) e para inibir reações hemolíticas. O ensaio baseia-se na redução dos radicais (DPPH[•]) através da doação de um átomo de hidrogênio pelo polifenol à molécula do radical,

Revisão Bibliográfica

resultando em seu homólogo 2,2-difenil picril-hidrazina (DPPHH) de cor amarelo-alaranjada (DI MAMBRO; MARQUELE; FONSECA, 2005).

Como o DPPH[•] mostra uma absorção muito intensa na região do visível, ele pode ser facilmente determinado pela espectroscopia (ROGINSKY; LISSI, 2005). Para essa análise utiliza-se uma solução alcoólica de DPPH[•], que absorve no comprimento de onda próximo de 517nm, e à medida que seu elétron deixa de ser desemparelhado (DI MAMBRO; MARQUELE; FONSECA, 2005). Ou seja, quando o radical aceita um elétron de uma fonte de antioxidantes para se tornar uma molécula estável, a absorção decresce e ocorre a mudança de coloração frente às moléculas antioxidantes testadas (HARISH NAYAKA et al., 2008). A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante (quantidade de DPPH[•] consumida pelo antioxidante) ou sequestradora de radicais e/ou a porcentagem de DPPH[•] remanescente no meio reacional (OLIVEIRA; VALENTIM; GOULART, 2009).

Do ponto de vista metodológico, o método DPPH[•] é recomendado como rápido e preciso no que diz respeito à medição da atividade antioxidante de frutas e sucos ou extratos de vegetais. Os resultados são altamente reprodutíveis e comparáveis a outros métodos de seqüestro do radical livre, tais como o 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS[•]) (SANCHEZ-MORENO, 2002), além de ser considerado um método sensível que detecta pequenas concentrações do ativo testado (OLIVEIRA; VALENTIM; GOULART, 2009), ser fácil e útil para análise de substâncias puras e amostras complexas (DI MAMBRO; MARQUELE; FONSECA, 2005).

Conforme foi visto, a atividade antioxidante pelo método β -caroteno pode ser útil especialmente na investigação de antioxidantes lipofílicos. Por outro lado, se compostos polares forem testados apenas pelo método β -caroteno, pode-se correr o risco de subestimar a atividade antioxidante destes compostos. Dessa forma, é necessário o uso de outros métodos como o do radical DPPH[•] que independe da polaridade do substrato, ou seja, permite testar substâncias lipofílicas e hidrofílicas (CARPES, 2008).

O resultado da atividade antioxidante pelo método DPPH[•] pode ser expresso de várias formas. Por exemplo, pode-se expressar os resultados como a capacidade

Revisão Bibliográfica

de sequestrar/reduzir o radical DPPH[•] em porcentagem; pelo valor de EC₅₀, ou seja, a quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH[•] e ainda pelo poder antioxidante ou poder anti-radical, o qual expressa a relação inversa do EC₅₀ (CARPES, 2008).

Resultados usando o método DPPH[•] ainda mostram que a interação de um potencial antioxidante com o radical depende de sua conformação estrutural. Este ensaio foi aplicado para taninos hidrolisáveis, lignanas e compostos polifenólicos (SANCHEZ-MORENO, 2002).

3. OBJETIVOS

Geral:

- ✓ Avaliar os teores de compostos fenólicos e as propriedades antioxidantes da polpa do pequi processado e *in natura*.

Específicos:

- ✓ Quantificar os teores de compostos fenólicos totais presentes em extratos de diferentes marcas de pequi processado, bem como em diferentes variedades de pequi *in natura*;
- ✓ Conhecer os teores de compostos fenólicos totais presentes nas frações de ácidos fenólicos de uma amostra de pequi processado,
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos de pequi processado e *in natura* e das frações de ácidos fenólicos de uma amostra de pequi processado nos sistemas modelos: β -caroteno/ácido linoléico e varredura do radical DPPH $\cdot$;
- ✓ Avaliar o efeito do processamento nos teores de compostos fenólicos totais e na capacidade antioxidante da polpa do pequi processado quando comparadas ao pequi *in natura* ou entre as diferentes marcas e variedades de pequi.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Nove amostras de polpa de pequi fatiado em conserva de marcas comerciais diferentes, com embalagens pesando 280 a 585g (peso líquido), foram adquiridas no comércio da cidade de São Paulo, Brasil, nos meses de abril de 2008 a junho de 2009. Destas, duas marcas encontravam-se em conserva de água, sal e ácido cítrico (CB1, CB2), duas em conserva à base de vinagre e sal (CB3 e CB4), e as demais (CB5, CB6, CB7, CB8 e CB9), em conserva com água, sal, ácido cítrico e benzoato de sódio. Todas as amostras estavam dentro do prazo de validade conforme determinado pelos fabricantes (12, 24 ou 36 meses) e foram armazenadas em temperatura ambiente.

Das cinco amostras *in natura* do pequi, a CC1 foi adquirida no Mercado Municipal Paulistano proveniente do estado da Bahia e os demais frutos (CC2, CC3, CC4 e CC5), da espécie *Caryocar coriaceum*, foram cedidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) do estado do Ceará. A distribuição das amostras encontra-se no quadro abaixo:

PEQUI	AMOSTRAS	LÍQUIDOS DAS CONSERVAS
CONSERVAS	CB1	LC1
	CB2	LC2
	CB3	LC3
	CB4	LC4
	CB5	LC5
	CB6	LC6
	CB7	LC7
	CB8	LC8
	CB9	LC9
IN NATURA	CC1	-
	CC2	-
	CC3	-
	CC4	-
	CC5	-

Quadro 1. Apresentação das amostras estudadas.

Logo após a aquisição, as amostras de pequi em conserva tiveram as fatias de sua polpa separadas dos seus respectivos líquidos de conserva (LC), sendo estes últimos filtrados e armazenados em freezer a -22°C. Os pequis *in natura* foram limpos, tiveram a casca e a polpa (parte comestível) dos frutos retirados com faca à temperatura ambiente ($\pm 23^{\circ}\text{C}$). Em seguida, as polpas de todas as amostras (*in natura* e em conserva) foram liofilizadas (liofilizador: Dura-Top™ MP FTS system) sob as seguintes condições: temperatura -83°C e vácuo de 24mT. Em seguida, as amostras foram trituradas em moinho (modelo IKA A11 basic, Wilmington, USA), padronizadas em granulometria de 60 *mesch*, homogeneizadas e armazenadas a -22°C.

4.2 Métodos

4.2.1. Preparação dos extratos de pequi

Os extratos etéreo, alcoólico e aquoso da polpa dos frutos do pequi *in natura* e processado foram obtidos pelo método de extração seqüencial através de solventes de diferentes polaridades (Figura 9) segundo Jardini e Mancini-Filho (2003).

Pesou-se 10g das polpas secas e adicionou-se 100mL de solvente, seguindo uma proporção de 1:10 (amostra:solvente). Os solventes empregados respeitaram a seguinte ordem: éter etílico, álcool etílico e água destilada. As amostras pesadas foram colocadas em erlenmeyers tampados e protegidos da luz e foram mantidas em agitação durante 1 hora. Após este tempo, o extrato etéreo obtido foi filtrado em funil de Büchner com a utilização de bomba a vácuo. O rendimento do material filtrado (sobrenadante) foi medido e a ele foi adicionado solvente para completar o volume seguindo a proporção inicial (1:10). O extrato alcoólico foi obtido pelo mesmo procedimento e, em seguida, o resíduo da sua extração foi coletado, pesado e submetido à extração com o solvente subsequente (água destilada) na mesma proporção (1:10). O extrato aquoso necessitou de centrifugação (Sorvat Instruments Du Pont®, modelo RC5C) a 5000 RPM/20 minutos a temperatura ambiente. Os extratos foram armazenados em frasco âmbar a -22°C.

Figura 9. Extração sequencial com diferentes solventes, segundo Jardini e Mancini-Filho (2003).

4.2.2. Preparação das frações de ácidos fenólicos do pequi

Baseado em dados anteriores sobre as propriedades antioxidantes do pequi (LIMA, 2008; LIMA, 2007a), os quais constataram a presença expressiva de ácidos fenólicos nas frações da polpa desta fruta *in natura*, buscou-se conhecer melhor as características da fruta processada (teor de FT e sua atividade antioxidante) com o intuito de isolar as frações de ácido fenólicos de uma conserva (CB1).

Devido à grande variedade de compostos fenólicos que podem ser encontrados nas frutas e à forma em que o composto pode estar presente (livre ou conjugado), o isolamento dos compostos fenólicos compreendem procedimentos mais complexos, com solventes ou misturas de solventes, filtração, necessidade de hidrólise e concentração de fases (JARDINI, 2005). Os compostos fenólicos conjugados freqüentemente estão sob a forma de ésteres, amidas ou glicosídeos. Eles incluem compostos de baixo peso molecular, solúveis em água, presentes no

citosol, ou formas lipossolúveis, associadas às ceras da superfície da planta (MIRA et al., 2008).

Foi realizado então, o fracionamento dos compostos fenólicos da amostra de pequi, da qual foram obtidas as frações ricas em ácidos fenólicos livres (AFL), ésteres solúveis de ácidos fenólicos (AFS) e ésteres insolúveis de ácidos fenólicos (AFI), utilizando-se solventes de diferentes polaridades segundo o método descrito por Krygier, Sosulski e Hogge (1982), modificado por Moreira e Mancini-Filho (2003).

4.2.2.1. Frações de ácidos fenólicos livres (AFL):

Sabe-se que os ácidos fenólicos livres representam a menor parte dos compostos fenólicos e são solúveis em soluções aquosas-orgânicas, tais como metanol, etanol ou acetona (MIRA et al., 2008).

A partir desse conhecimento, tomou-se 1g de amostra seca e desengordurada, a partir da qual se realizaram seis extrações (20mL tetrahidrofurano (THF)/ 1 minuto cada) em aparelho turrax (IKA®, modelo DI 25 Basic, Staufen, Alemanha). Os sobrenadantes obtidos de cada extração foram filtrados, desidratados em sulfato de sódio anidro e coletado em balão protegido da luz. O solvente foi então retirado completamente com auxílio de rotaevaporador (B525, Micronal, São Paulo, Brasil) a 40°C. Após este procedimento, o material (AFL) foi ressuspenso em 5mL de metanol, acondicionado em frasco âmbar e mantido à -22°C.

4.2.2.2. Ésteres solúveis de ácidos fenólicos (AFS)

Os compostos fenólicos solúveis encontram-se compartimentalizados dentro dos vacúolos celulares, e estão na forma livre ou conjugada (MIRA et al., 2008). Para sua extração, o resíduo proveniente da extração da fração AFL, foi submetido a seis novas extrações (20mL/ 5 minutos cada) com uma solução de metanol/ acetona/ água (7:7:6) em aparelho turrax. O sobrenadante obtido de cada extração foi filtrado em sulfato de sódio anidro, coletado em balão e concentrado em rotaevaporador a 40°C até a fase aquosa. A seguir, foi realizada a hidrólise para liberar os ésteres solúveis que se encontram esterificados a proteínas e/ou polipeptídios, medindo-se o volume da amostra e adicionando igual quantidade de

NaOH 4N, permanecendo sob agitação, protegidos da luz e em atmosfera de nitrogênio durante 4 horas. Após esta etapa, ajustou-se o pH para 2,0 (HCl 6N). Em um funil de separação, sucederam-se cinco lavagens com volume igual de hexano para a remoção de ácidos graxos e outros componentes lipídicos, e sucessivamente coletou-se a fase inferior, desprezando-se a superior. O material proveniente foi transferido para outro funil de separação e adicionou-se igual volume da mistura dos solventes éter etílico/ acetato de etila/ THF (1:1:1) por cinco vezes consecutivas. Após a agitação manual, a fase superior foi coletada e filtrada em sulfato de sódio anidro. O material foi submetido à secagem em rotaevaporador (40°C) e ressuspenso em 5mL de metanol. A fração obtida (AFS) foi colocada em frasco âmbar e mantida à -22°C.

4.2.2.3. Ésteres insolúveis de ácidos fenólicos (AFI)

Os compostos fenólicos insolúveis encontram-se ligados a estruturas da parede celular, esterificados com arabinose ou resíduos de galactose dos componentes pécnicos ou hemicelulósicos (MIRA et al., 2008). O processo de extração da AFI iniciou-se a partir do resíduo proveniente da extração da fração AFS, foram adicionados 15mL NaOH 4N e realizou-se a hidrólise do material (4 horas, mantida sob agitação, ao abrigo de luz e com atmosfera de nitrogênio). Após esta etapa, o pH da solução foi ajustado para 2,0 (HCl 6N). A partir desta etapa, todo o procedimento de extração das frações esterificadas insolúveis seguiu o mesmo procedimento para a obtenção das frações solúveis, conforme foi anteriormente descrito. A figura 10 traz o esquema para a obtenção das frações de ácidos fenólicos.

Material e Métodos

Figura 10. Esquema para obtenção das frações de ácidos fenólicos: AFL = frações de ácidos fenólicos livres; AFS = ésteres solúveis de ácidos fenólicos e AFI = ésteres insolúveis de ácidos fenólicos. (Adaptado de Jardini, 2005).

4.2.3. Determinação dos fenólicos totais (FT)

A quantidade de FT foi determinada espectrofotometricamente, segundo o método descrito por Swain e Hills (1959), no qual a mistura dos ácidos fosfowolfrâmico e fosfomolibdico em meio básico se reduz ao oxidar os compostos fenólicos, originando óxidos azuis de wolframio (W_8O_{23}) e molibdeno (Mo_8O_{23}). A absorbância foi determinada a 720nm.

Foram colocadas alíquotas das concentrações desejadas das amostras, completando-se, em cada tubo, o volume total para 0,5mL. Tomou-se então 0,5mL destes extratos preparados (EALC, EAQ), LC ou das frações (AFL, AFS e AFI), adicionou-se 8mL de água destilada e 0,5mL do reagente *Folin-Ciocalteu*. A solução foi misturada em vortex (IKA® MS1 Minishaker) e após 3 minutos, acrescentou-se 1mL de solução saturada de carbonato de sódio. A mistura foi agitada e deixada em repouso por uma hora ao abrigo da luz, para posterior leitura a

Material e Métodos

720nm em espectrofotômetro (Espectronic® 20 Genesys™, Rochester, USA). Antes de realizar a leitura das amostras, foi utilizado um “branco” com água destilada para zerar o aparelho. Para a construção da curva padrão, foi utilizado o ácido gálico nas seguintes concentrações: 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 e 100µg. A partir da reta obtida, foi possível determinar a concentração de FT das amostras, expressos em mg equivalente de ácido gálico/100g de amostra seca.

4.2.4. Determinação do extrato seco (ES) dos extratos e frações

A determinação do extrato seco (ES) dos extratos e frações de ácidos fenólicos foi realizada por gravimetria dispondo uma alíquota de 500µL dos materiais em vidros de relógio previamente tarados, em triplicata e em estufa a 105°C por 2 horas a fim de determinar a quantidade de matéria seca presente nos materiais que além de demonstrarem o rendimento do processo de extração, foram utilizadas no cálculo da quantidade em partes por milhão (ppm) para a utilização em testes de atividade antioxidante. Após o tempo em estufa, os vidros de relógio foram pesados e então foi determinada a quantidade de matéria seca pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de extrato seco} = \frac{P_i - P_f \times 100}{0,5\text{mL}}$$

Onde: P_i = peso inicial;

P_f = peso final.

4.2.5. Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

A quantidade de extrato utilizado na determinação da atividade antioxidante de cada método foi calculada em ppm (partes por milhão) a partir dos dados gravimétricos (percentual de matéria seca).

4.2.5.1. Ensaio em sistema β -caroteno/ácido linoléico

A atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ácido linoléico foi determinada pelo método descrito por Miller (1971) e modificado por Moreira e Mancini-Filho (2003), que se baseia na oxidação (descoloração) do β -caroteno em uma determinada emulsão. A descoloração é observada diretamente em espectrofotômetro (Espectronic® 20 Genesys™, Rochester, USA) pela medida da absorbância.

Inicialmente foi preparada a emulsão, adicionando-se 120 μ L de uma solução de β -caroteno (20mg/mL de clorofórmio), 70 μ L de ácido linoléico, 22 gotas de emulsificante Tween 40 e 1mL de clorofórmio. Após a mistura destes reagentes, o clorofórmio foi evaporado com auxílio de nitrogênio gasoso. Acrescentou-se, então, cerca de 100mL de água destilada previamente oxigenada por trinta minutos homogeneizando vigorosamente. A emulsão apresentou-se límpida e sua absorbância foi ajustada na faixa de densidade ótica, entre 0,6-0,7nm, com a adição de água oxigenada.

Em tubos de ensaio apropriados para leitura em espectrofotômetro foram divididos os seguintes grupos em triplicata: “branco” (controle sem antioxidante), BHT (antioxidante sintético), amostra (extratos, LC e frações) e associação (BHT e amostra) a fim de avaliar, nesta última, o efeito sinergista na proporção de 1:1 (amostra:BHT).

Para a análise, foram tomados 5mL da solução emulsionada e adicionados a diferentes concentrações de extratos (50, 100 e 200ppm), LC (50, 100 e 200ppm) ou frações (10, 20, 40ppm), isolados ou associados ao BHT. Em seguida, logo após a adição da solução emulsionada às amostras e ao BHT, foram realizadas as leituras das absorbâncias de cada tubo em espectrofotômetro, a 470nm. Em seguida, os tubos foram colocados em banho-maria a 50°C e, as leituras realizadas a cada quinze minutos, por um período total de duas horas.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de oxidação (%IO) ou % de proteção sendo calculado em relação ao decaimento da absorbância do controle (considerado como 100% de oxidação). O decréscimo na leitura da absorbância das amostras foi correlacionado com o controle, estabelecendo o percentual de inibição da oxidação das amostras segundo a fórmula:

$$\% \text{ da oxidação} = \frac{\bar{X} \text{ abs. amostra} \times 100}{\bar{X}' \text{ abs. controle}}$$

$$\% \text{IO} = 100 - \% \text{ da oxidação}$$

Onde: $\bar{X}$ = diferença da absorbância da amostra no tempo zero e no tempo de 120 minutos;

$\bar{X}'$ = diferença da absorbância do “branco” no tempo zero e no tempo de 120 minutos.

4.2.5.2. Método do radical DPPH[•] (2,2 difenil-1-picril-hidrazila)

A atividade antioxidante dos extratos, LC e frações das amostras, bem como do padrão butilhidroxitolueno (BHT), foi avaliada pelo ensaio DPPH[•], seguindo o método proposto por Blois (1958) e adaptado por Brand-Willians, Cuvelier e Brest (1995), que tem por base a redução do radical DPPH[•], o qual ao fixar um H[•] (removido do antioxidante em estudo), leva a uma diminuição da absorbância.

Este ensaio foi realizado utilizando-se uma alíquota de 1,5mL de solução metanólica de DPPH[•] a 6x10⁻⁵M, e 500μL do material (extratos, LC ou frações), bem como do padrão BHT em diferentes concentrações. Foram realizadas leituras da absorbância após trinta minutos do início da reação em espectrofotômetro (Espectronic® 20 Genesys™, Rochester, USA) a 517nm. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e acompanhadas de um controle (sem adição de antioxidante ou amostra). A queda na leitura da densidade ótica das amostras e do BHT foi correlacionada com o controle, estabelecendo-se a porcentagem de descoloração (varredura) do radical DPPH[•], conforme a seguinte fórmula:

$$\% \text{ proteção} = \frac{\text{Abs. do controle} - \text{Abs. da amostra} \times 100}{\text{Abs. do controle}}$$

4.2.6. Análise estatística

Os resultados das análises foram inicialmente submetidos ao teste de Hartley para serem avaliados quanto à homogeneidade das variâncias. Num segundo passo, os resultados foram analisados pela ANOVA univariada, seguido do teste paramétrico de Tukey *Honest Significant Difference* (HSD) a 5% de significância para as amostras homogêneas, o qual foi aplicado para comparação das médias. Já as amostras não-homogêneas ($P_{\text{Hartley}} < 0,05$), seguiram para aplicação do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, aplicado para comparações entre as médias.

Correlações lineares de Pearson (r) entre os parâmetros foram efetuadas no intuito de analisar a força de interligação entre dois conjuntos de dados. O critério seguinte foi utilizado para analisar a força das correlações segundo Granato et al. (2010): perfeito ($r = \pm 1,00$), forte ($\pm 0,80 \leq r < \pm 1,00$), moderada ($0,50 \pm \leq r < \pm 0,80$), fraca ($\pm 0,10 \leq r < \pm 0,50$) e correlação muito fraca ($0,01 \leq r < \pm 0,10$).

Todas as análises foram realizadas em triplicata, sendo os resultados expressos pelo valor médio $\pm$ desvio-padrão (DP). Utilizou-se o programa Statistica 7.1 (Statsoft, Tulsa, Oklahoma, EUA) para todos os cálculos e análises estatísticas, enquanto os gráficos foram feitos usando o software *Prism* 5.0 (GraphPad).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação dos fenólicos totais (FT)

No presente estudo, a análise de compostos fenólicos dos extratos obtidos da polpa (EALC e EAQ), dos líquidos das conservas (LC) e das frações da conserva CB1 (AFL, AFS e AFI) foi realizada através da avaliação dos FT, como descrito anteriormente, empregando-se o reagente *Folin-Ciocalteu*. Os resultados obtidos estão expressos na figura 11 para os EALC e EAQ da polpa do pequi *in natura* e na figura 12 para os EALC e EAQ da polpa e LC das amostras processadas. O teor de FT das frações pode ser vista na figura 13.

A utilização de três solventes de diferentes polaridades, etanol (5,2), água (9) e éter etílico (2,9) possibilitou a solubilização de compostos de polaridade intermediária (EALC), mais polares (EAQ) e apolares (extrato etéreo) das diversas amostras em estudo (BORGUINI, 2006).

O teor de fenólicos totais no extrato etéreo, bem como sua capacidade antioxidante não foi possível de serem determinados pela imiscibilidade entre os solventes e reagentes, tornando a solução turva.

Figura 11. Teores de fenólicos totais (mg de equivalente de ácido gálico/100g de amostra seca) nos EALC (A) e EAQ (B) da polpa do pequi *in natura*. Resultados expressos em média e desvio padrão, n=3. Letras diferem entre si estatisticamente ao nível de significância de 5% (Tukey HSD, $p < 0,05$).

Resultados e Discussão

As amostras apresentaram homogeneidade de variâncias ($p > 0,05$) pelo teste de Hartley e também apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diversas amostras analisadas através do teste de Tukey.

O teor de FT variou de $23,04 \pm 0,27$ (CC1) a $45,66 \pm 1,59$ mg EAG/100g de amostra seca (CC2) nos EALC e de $38,02 \pm 2,04$ (CC4) a $76,23 \pm 0,96$ mg EAG/100g de amostra seca (CC1) nos EAQ, valores estes inferiores aos encontrados por Lima (2008) na polpa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) *in natura* (209mg EAG/100g em amostra seca), o que pode indicar uma possível influência de diferentes solventes utilizados, além da variação da espécie, do cultivar e outras causas como: maturidade na época da colheita, condições climáticas, dentre outros, conforme foi visto anteriormente (ASAMI et al., 2003).

Através de estudos com extratos metanol/água/acetona da espécie *Caryocar coriaceum* (*in natura*), Oliveira (2009), encontrou teor de FT para a polpa de pequi desta espécie de $104,12 \pm 36,21$ mg EAG/100g de amostra fresca, valor este inferior ao relatado acima em amostra seca. O extrato etanólico do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), em trabalho desenvolvido por Porto et al. (2009), apresentou níveis de compostos fenólicos de 255,24; 265,48 e 9,01mg/g, de flavonóides de 143,56; 164,23 e 2,23mg/g, de carotenóides de 421,65; 243,38 e 40,72µg/g para frações secas dos extratos de folha, mesocarpo e polpa, respectivamente. Os mesmos autores observaram ainda relação direta entre atividade antioxidante e níveis de flavonóides e carotenóides, sugerindo que provavelmente esses componentes representem os principais compostos antioxidantes do pequi.

Kuskoski et al. (2006), estudando extratos etanólicos de baguaçu (*Eugenia umbelliflora* Berg) encontraram conteúdos totais de compostos fenólicos maiores para estes (897,6mg EAG/100g) quando comparados aos demais extratos etanólicos de jambolão (229,6mg EAG/100g) e às polpas congeladas de acerola, açaí e de morango com valores de 580,1; 136,8 e 132,1mg EAG/100g, respectivamente. Roesler et al. (2007) encontrou valores de FT para os extratos etanólicos e aquosos da casca do pequi (*Caryocar brasiliense*) de 209,37 e 208,42g EAG/kg de matéria seca, respectivamente, enquanto que em extratos provenientes da polpa somada à semente, os valores encontrados para os extratos etanólicos e aquosos foram 27,19 e 20,88g EAG/kg, respectivamente. Os teores de FT do extrato aquoso do EBC (extrato bruto concentrado) do caju (*Anacardium occidentale* L.),

Resultados e Discussão

segundo Broinizi et al. (2007), foi de 10,4mg de EAG/g de EBC, enquanto que para o extrato alcoólico este conteúdo foi de 0,3mg EAG/g de EBC.

Verifica-se que os EAQ tiveram, de uma maneira geral, um maior conteúdo de FT quando comparados aos EALC. Pode-se observar a partir de dados encontrados na literatura, que geralmente o conteúdo de FT dos extratos e a atividade antioxidante diminui quando a polaridade do solvente diminui (água > metanol > etanol > acetona). Este resultado destaca a importância de solventes polares na extração de antioxidantes, bem como é um indicativo da natureza mais polar dos constituintes de extratos do pequi com esta ação. Na maioria dos casos, essa relação entre teor de FT e atividade antioxidante é bem acentuada, o que confirma o valor do teste *Folin-Ciocalteu* (ROGINSK; LISSI, 2005). Sabe-se que o extrato contendo a fração polar é constituído praticamente por compostos fenólicos, em particular por ácidos fenólicos (SOARES, 2002).

Pode-se ver também que dentre os EAQ das amostras de pequi *in natura*, a proveniente da Bahia (CC1) obteve um maior conteúdo de FT (76,23mg EAG/100g) em relação às amostras do estado do Ceará (CC2, CC3, CC4 e CC5), com valores médios de: 54,43; 51,88; 38,02 e 56,09mg EAG/100g, respectivamente (Figura 11B). No entanto, o EALC da amostra CC1 teve um conteúdo menor (23,04mg EAG/100g) de FT.

Além disso, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras submetidas ao mesmo tipo de extração, devendo essa ser decorrente, de acordo com Podsedek (2007), do conteúdo e da composição de FT que variam significativamente entre e dentro de subespécies.

Na figura 12 encontram-se os dados sobre FT das amostras de pequi processado.

Resultados e Discussão

Figura 12. Teores de fenólicos totais (mg de equivalente de ácido gálico/100g de amostra seca) nos EALC (A), EAQ (B) da polpa do pequi processado (*Caryocar brasiliense* Camb.) e LC (C). Resultados expressos em média e desvio padrão, $n = 3$. Letras diferem entre si estatisticamente ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$), quando utilizado o teste de Tukey (gráficos A e C) ou quando utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (gráfico B).

As respostas para o pequi processado apresentaram homogeneidade de variâncias ($p > 0,05$), exceto para o conteúdo de FT nos EAQ ($p < 0,001$), onde os dados não foram homogêneos e foi usado a análise não-paramétrica para a comparação das médias.

Observou-se que os EAQ tiveram valores maiores para FT quando comparados aos EALC apenas em algumas amostras (CB1, CB5, CB7, CB8 e CB9), enquanto que em outras (CB2, CB3, CB4 e CB6), os EALC tiveram um maior conteúdo de FT. Isto poderia ser atribuído aos efeitos do processamento sobre os compostos fenólicos, com consequentes mudanças nos critérios de solubilidade destas classes de compostos.

Resultados e Discussão

As diferentes amostras submetidas ao mesmo tipo de extração tenderam a diferir com relação à quantidade de FT. Estas discrepâncias podem ser decorrentes das características ambientais do cultivo, variedade da cultivar bem como da maturidade dos frutos (MELO et al., 2008).

Dentre as amostras, os EALC da CB2 e CB6 merecem destaque com maiores teores de FT (25,88 e 15,11mg EAG/100g de amostra seca, respectivamente); nos EAQ, os maiores teores foram encontrados nas amostras CB5 (15,74mg EAG/100g) e CB9 (13,25mg EAG/100g); já nos LC, os destaques foram as amostras LC3, LC4 e LC5 com valores de 154,02; 213,64 e 182,38mg EAG/100g, respectivamente. Destas últimas, vale ressaltar que as duas primeiras correspondiam à conserva em vinagre. Sabe-se que além de conservante e condimento, o vinagre, mais recentemente, também tem sido considerado como um ingrediente funcional devido à presença de compostos fitoquímicos. Como vinagres geralmente são produzidos a partir de vários tipos de matérias-primas agrícolas que contenham açúcar ou amido, como malte, cidra, frutas, e em alguns países do Mediterrâneo o vinho é usado como matéria-prima, os compostos fitoquímicos presentes nos produtos finais dependem do material de origem, que dita o seu tipo, quantidade e qualidade. Além do ácido acético e outros ácidos orgânicos, vinagres são ricos em polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos (SHAHIDI, 2009).

Observa-se que os LC apresentaram em todas as amostras de pequi processado analisadas teores de FT bastante superiores aos encontrados nos EALC e EAQ, indicando que houve migração destes compostos do fruto para os LC. Apesar dos parâmetros de processamento pelos quais as conservas de pequi foram submetidas não terem sido avaliados, pode-se inferir também que este material tenha sido submetido a algum tipo de tratamento térmico, pois sabe-se que processamento e preparação, especialmente tratamento térmico, os quais são aplicados antes ao consumo, podem afetar estes compostos fitoquímicos e em muitos casos têm sido observadas menores capacidades antioxidantes em amostras processadas diante dos vegetais crus (PODSEDEK, 2007).

Vários pesquisadores relataram perdas significativas no conteúdo de FT devido ao processamento térmico. Esta evidência sugere, no entanto, que o declínio do teor de FT é, em grande parte, devido à migração destes compostos para a salmoura ou líquido da conserva e não devido à oxidação. Verificou-se que em

Resultados e Discussão

legumes embalados a vácuo e/ou enlatados sem líquido adicionado (beterraba, tomate e milho) foram encontradas ligeiras alterações no conteúdo de FT. De fato, beterraba experimentou um aumento dos FT após aquecimento adicional por um total de 45 minutos. Curiosamente, cerejas também tiveram um aumento nos FT devido ao processamento térmico quando o líquido das conservas foi incluído na análise. No entanto, 50% (base úmida) de FT foram transferidos a partir do fruto para o líquido (RICKMAN; BARRETT; BRUHN, 2007). Essa dissolução dos polifenóis na água depende tanto do tipo do processamento quanto do tamanho dos vegetais (fracionamento) (SIKORA et al., 2008).

Outros estudos indicam que o processo de cozimento causa a perda de FT em vegetais. Isto pode ser devido à repartição de compostos fenólicos durante seu processamento (CROZIER et al., 1997). Por outro lado, foi encontrado que o cozimento pode dar origem a um aumento de FT em feijão verde, pimentão e brócolis. Outra pesquisa indicou que o processamento não causou mudança no potencial antioxidante de frutas e vegetais ou reforçou ser devido à melhoria das propriedades antioxidantes de compostos naturais ou devido à formação de novos compostos, como os produtos da reação de *Maillard* com atividade antioxidante (MANZOCCO et al., 2001; NICOLI; ANESE; PARPINEL, 1999). Sugere-se que o efeito do branqueamento sobre FT pode depender da amostra, temperatura e espécie.

Há necessidade, portanto, de mais estudos sobre os fatores que podem alterar os teores de fenólicos, no intuito de incrementar suas concentrações em alimentos frescos, bem como para que os processos de produção e estocagem sejam otimizados, evitando perdas desses compostos importantes na promoção da saúde.

Os valores médios dos FT das frações de ácidos fenólicos do pequi da CB1 estão apresentados na figura 13.

Figura 13. Teores de fenólicos totais (mg de equivalente de ácido gálico/100g de amostra seca) nas frações (AFL, AFS e AFI) da polpa do pequi processado (CB1) (*Caryocar brasiliense* Camb.). Resultados expressos em média e desvio padrão, $n = 3$. Letras diferem entre si estatisticamente ao nível de significância de 5% (Tukey HSD, $p < 0,05$). AFL: ácidos fenólicos livres; AFS: ésteres solúveis de ácidos fenólicos; AFI: ésteres insolúveis de ácidos fenólicos.

Estas respostas apresentaram homogeneidade das variâncias ($p > 0,05$) e os valores de FT das frações diferiram estatisticamente ($p < 0,001$) entre si segundo o teste de Tukey. Pode-se verificar que a quantidade de FT obtidas em todas as frações de ácidos fenólicos da CB1 foi expressiva, merecendo destaque a fração AFL que apresentou o maior conteúdo de FT: 465,15mg EAG/100g de amostra seca.

Pode-se observar que a alta concentração de compostos fenólicos encontrada em cada fração obtida da polpa da CB1, ao contrário dos menores teores encontrados nos extratos, demonstra que o processo de purificação de ácidos fenólicos extraiu grande quantidade desses compostos e que esse teor não sofreu influência com o processamento. Esses dados reforçam o que foi descrito em trabalho anterior, onde Lima (2008) detectou a presença expressiva de ácidos fenólicos com atividade antioxidante nas frações da polpa de pequi, dentre eles, os ácidos gálico, elágico, 4-hidroxi benzóico e *p*-coumárico.

Silva (2008) encontrou nas frações do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) valores médios de compostos fenólicos totais de 19,15; 23,90 e 10,14mg/g de amostra para a AFL, AFS e AFI, respectivamente.

5.2 Determinação do extrato seco (ES)

Nas tabelas a seguir podem ser observados os teores de extrato seco (ES) dos EAQ, EALC e LC obtidos das polpas do pequi *in natura* (Tabela 1) e processado (Tabela 2), além dos %ES das frações da CB1 (Tabela 3).

Tabela 1. Percentual de extrato seco (%ES) obtido a partir dos extratos alcoólicos (EALC) e aquosos (EAQ) da polpa do pequi *in natura*.

AMOSTRAS	%ES (EALC)	%ES (EAQ)
CC1	0,83±0,00 ^a	1,46±0,03 ^d
CC2	1,04±0,02 ^c	0,74±0,02 ^a
CC3	0,93±0,03 ^b	1,05±0,03 ^c
CC4	0,93±0,02 ^b	0,86±0,04 ^b
CC5	0,84±0,02 ^a	1,55±0,02 ^e

Valores expressos em média e $\pm$ desvio padrão, n = 3. Letras diferentes na mesma coluna representam resultados diferentes estatisticamente de acordo com o teste de Tukey HSD ($p < 0,05$).

Tabela 2. Percentual de extrato seco (%ES) obtido a partir dos extratos alcoólicos (EALC), aquosos (EAQ) e do líquido da conserva (LC) da polpa do pequi processado.

AMOSTRAS	%ES (EALC)	%ES (EAQ)	%ES (LC)
CB1	0,39±0,02 ^{bc}	0,59±0,02 ^a	2,95±0,10 ^{ab}
CB2	0,71±0,03 ^{ef}	0,85±0,04 ^c	3,33±0,03 ^{ab}
CB3	0,38±0,00 ^{bc}	0,52±0,02 ^a	3,14±0,05 ^{ab}
CB4	0,58±0,03 ^d	0,75±0,01 ^{bc}	2,28±0,07 ^a
CB5	0,29±0,02 ^a	1,10±0,09 ^d	3,93±0,22 ^{ab}
CB6	0,67±0,02 ^{de}	0,72±0,04 ^b	2,88±0,05 ^{ab}
CB7	0,33±0,01 ^{ab}	1,17±0,02 ^d	3,23±0,38 ^{ab}
CB8	0,43±0,02 ^c	0,57±0,01 ^a	4,05±0,67 ^{ab}
CB9	0,78±0,07 ^f	1,42±0,05 ^e	4,85±0,02 ^b

Valores expressos em média e $\pm$ desvio padrão, n = 3. Letras diferentes na mesma coluna representam resultados diferentes estatisticamente de acordo o teste de Tukey (EALC e EAQ) ($p < 0,05$) ou de acordo com o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (LC).

O %ES variou estatisticamente entre as amostras ($p < 0,05$). De acordo com estes resultados, observam-se maiores %ES para os EAQ quando comparados aos EALC na maioria das amostras de pequi *in natura* (Tabela 1) e em todas as amostras de pequi processado (Tabela 2). Como se pode observar na tabela 1, o rendimento foi maior para os EAQ das amostras CC1 (1,46%) e CC5 (1,55%), as quais apresentaram também os maiores valores médios de FT (Figura 11). De acordo também com os resultados encontrados para os teores de FT, estão os %ES

Resultados e Discussão

dos EALC das amostras CC2 (1,04%) e CC4 (0,93%), onde se observou a mesma tendência.

Nos EAQ do pequi processado (Tabela 2), as amostras CB5 (1,10%) e CB9 (1,42%) também se destacaram quanto ao rendimento e quanto ao teor de FT (Figura 12), enquanto que nos EALC apenas a amostra CB2 (0,71%) teve resultados elevados nos dois parâmetros. Para os LC não foi observada essa mesma tendência.

Segundo Porto et al. (2009), os maiores rendimentos de extratos foram obtidos com etanol e metanol para folha e mesocarpo, e com clorofórmio e acetato de etila para a polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.).

O %ES das frações de ácidos fenólicos da CB1 estão dispostos abaixo:

Tabela 3. Percentual de extrato seco (%ES) obtido a partir das frações de ácidos fenólicos (AFL, AFS e AFI) da polpa do pequi processado (CB1).

AMOSTRAS	AFL	AFS	AFI
%ES	0,48±0,02 ^b	0,13±0,04 ^a	0,11±0,08 ^a

Valores expressos em média e $\pm$ desvio padrão, n = 3. Letras diferentes na mesma linha representam resultados diferentes estatisticamente de acordo com o teste de Tukey HSD ($p < 0,05$). AFL: ácidos fenólicos livres; AFS: ésteres solúveis de ácidos fenólicos; AFI: ésteres insolúveis de ácidos fenólicos.

De acordo com os resultados obtidos, foi observado para a AFL maior rendimento (0,48%), seguido pela AFS (0,13%) e AFI (0,11%), cujos rendimentos mostraram-se muito inferiores e diferentes estatisticamente ($p < 0,05$) da primeira. Estes resultados também seguem de acordo com o teor de compostos fenólicos encontrados para estas frações (Figura 13).

5.3 Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

Utilizando metodologias descritas na literatura foi determinada a atividade antioxidante *in vitro*, dos EALC e EAQ da polpa do pequi *in natura* e processado, além dos LC da polpa do pequi processado e das frações da conserva CB1.

Resultados e Discussão

5.3.1. Ensaio em sistema β -caroteno/ácido linoléico

Para avaliar a atividade antioxidante dos extratos, LC e frações através deste ensaio, foram utilizadas distintas concentrações (50, 100 e 200ppm para extratos e LC e 10, 20 e 40ppm para as frações) calculadas a partir dos dados de percentual de extrato seco, de forma que os antioxidantes da amostra e do BHT (antioxidante sintético utilizado como padrão) reagissem com o sistema emulsionado produzindo quedas da densidade óptica em intervalos passíveis de serem quantificados.

Diversos autores utilizaram este método para avaliar a capacidade antioxidante de frutos. Segundo Hassimotto; Genovese e Lajolo (2005), a capacidade antioxidante avaliada pelo método β -caroteno/ ácido linoléico pode ser classificada em %IO: elevada (> 70%), intermediária (40-70%) ou baixa (<40%). Nesse estudo, as capacidades antioxidantes do pequi podem ser vistas nas figuras a seguir.

Figura 14. Atividade antioxidante dos extratos alcoólicos da polpa de pequi *in natura* em diferentes concentrações pelo método β -caroteno/ácido linoléico. Resultados expressos em média e desvio padrão, n = 3. Letras diferem entre si estatisticamente ao nível de significância de 5% (Tukey HSD, $p < 0,05$). ppm: partes por milhão.

Resultados e Discussão

Figura 15. Atividade antioxidante dos extratos aquosos da polpa de pequi *in natura* em diferentes concentrações pelo método β -caroteno/ácido linoléico. Resultados expressos em média e desvio padrão, $n = 3$. Letras diferem entre si estatisticamente ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$), quando utilizado o teste de Tukey (gráficos A e B) ou quando utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (gráfico C). ppm: partes por milhão.

Nas figuras acima se pode observar que os extratos, em geral, apresentaram baixa capacidade de inibição da oxidação ($< 40\%$), com exceção dos EAQ da CC2 e CC3 a 200ppm que tiveram atividade antioxidante intermediária (45,84 e 44,37%, respectivamente) por este método.

Os EAQ, quando comparados aos EALC, apresentaram porcentagens maiores de inibição da oxidação em todas as concentrações testadas. Estes dados são corroborados por vários autores estudando diferentes matrizes alimentares, onde se verifica que os EAQ possuem atividade antioxidante superior aos demais extratos (VIDAL et al., 2006; JARDINI; MANCINI-FILHO, 2007; ROESLER et al., 2007; LIMA, 2008). Observa-se também que os EAQ detinham a maior quantidade

Resultados e Discussão

de compostos fenólicos dentre os materiais analisados (Figura 11). Segundo Jardini (2005), a água devido a sua elevada polaridade tem grande afinidade pelos fenólicos, formando ligações do tipo pontes de hidrogênio com as hidroxilas dos compostos, removendo-os de forma mais eficiente que os demais solventes testados.

A maioria de constituintes polares presentes no pequi possibilitam afirmar que os mesmos contribuem mais para as propriedades antioxidantes observadas na polpa de pequi *in natura*. Entretanto a contribuição dos constituintes antioxidantes não-polares não pode ser negligenciada para esta amostra e nem para as demais, pois vários estudos têm conclusivamente mostrado que os antioxidantes observados e atividades biológicas de materiais pode ser devido ao efeito sinérgico dos fitoconstituintes.

Em estudos anteriores no Laboratório de Lípidos da FCF/USP, Lima (2008) verificou que os extratos etéreo, alcoólico e aquoso do pequi *in natura* apresentaram capacidade antioxidante não somente no sistema β -caroteno/ácido linoléico, mas em todos os outros testes empregados (DPPH[•], ABTS[•], ORAC e Rancimat). Além desses efeitos, este autor observou ainda que o EAQ da polpa de pequi na concentração de 300mg/kg e a fração AFL na concentração de 100mg/kg foram capazes de reduzir significativamente a lipoperoxidação nos tecidos cerebral e hepático e no plasma de ratos *Wistar*.

Os resultados encontrados por Oliveira (2009), a partir de extratos (metanol/água/acetona) obtidos a partir de plantas da espécie *Caryocar coriaceum* (*in natura*) demonstrou que a oxidação do β -caroteno foi inibida pelos extratos das polpas de pequi, em percentuais que variaram de 55 a 85%, 70 a 90% e 80 a 93%, em função da concentração do extrato (4, 8 e 16mg da polpa seca, respectivamente). Utilizando também este método, Giada (2006) observou que os EAQ e EALC da semente de girassol (*Helianthus annuus* L.) forneceram uma proteção da oxidação de 35,1 e 4,2%, respectivamente, na concentração de 200ppm, após duas horas de ensaio.

É importante ressaltar que, em relação ao padrão BHT, com %IO variando entre 60 a 84% nas três concentrações testadas (50, 100 e 200ppm), todos os EAQ e EALC mantiveram-se sempre com %IO inferior (dados não demonstrados). Somado a isso, os EALC apresentaram um possível efeito pró-oxidante, onde se

Resultados e Discussão

verificou que o percentual de proteção ao β -caroteno pelos extratos foi inferior à proteção do controle (sem antioxidante).

Em estudos utilizando o método de branqueamento do β -caroteno, Alves et al. (2008) e Rufino et al. (2010) não detectaram capacidade antioxidante na acerola possivelmente devido ao elevado teor de vitamina C nesse fruto que interferiram no sistema como um fator pró-oxidante. Hassimotto, Genovese e Lajolo (2009), confirmam que dependendo da avaliação da capacidade antioxidante utilizada, o ácido ascórbico pode agir como um potente antioxidante ou como um agente pró-oxidante. Utilizando os métodos DPPH[•] e ORAC, o ácido ascórbico age como um antioxidante, enquanto no sistema β -caroteno/ácido linoléico, ele age como um potente pró-oxidante. O ácido ascórbico, portanto, pode ter influenciado os valores de atividade antioxidante obtidos neste estudo usando o extrato etanólico.

O comportamento pró-oxidante de ácido ascórbico já tem sido descrito e parece ser devido à formação de radicais ascorbil durante oxidação (KALT et al., 1999).

O compartimento dos extratos da polpa do pequi processado neste método podem ser visualizados logo abaixo.

Resultados e Discussão

Figura 16. Atividade antioxidante dos extratos alcoólicos da polpa de pequi processado em diferentes concentrações pelo método β -caroteno/ácido linoléico. Resultados expressos em média e desvio padrão, $n = 3$. Letras diferem entre si estatisticamente ao nível de significância de 5% (Tukey HSD, $p < 0,05$). ppm: partes por milhão.

Resultados e Discussão

Figura 17. Atividade antioxidante dos extratos aquosos da polpa de pequi processado em diferentes concentrações pelo método β -caroteno/ácido linoléico. Resultados expressos em média e desvio padrão, $n = 3$. Letras diferem entre si estatisticamente ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$), quando utilizado o teste de Tukey (gráficos A e B) ou quando utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (gráfico C). ppm: partes por milhão.

Resultados e Discussão

Figura 18. Atividade antioxidante dos líquidos das conservas das polpas de pequi processado em diferentes concentrações pelo método β -caroteno/ácido linoléico. Resultados expressos em média e desvio padrão, $n = 3$. Letras diferem entre si estatisticamente ao nível de significância de 5% (Tukey HSD, $p < 0,05$). ppm: partes por milhão.

Os EALC, EAQ e os LC, em geral, apresentaram baixa capacidade de inibição da oxidação (<40%). Os EAQ da polpa do pequi processado, à semelhança do *in natura*, também se comportaram melhor do que os EALC, apresentando maiores %IO nas concentrações testadas. Sabe-se que a maioria dos compostos fenólicos são polares, sendo, portanto, solúveis em água.

O EAQ da conserva CB1 merece destaque dentre os demais, por apresentar percentual de proteção de 10,71; 18,13 e 26,16% a 50, 100 e 200ppm, respectivamente. Apesar desse melhor comportamento dos EAQ em comparação aos EALC, eles tenderam a ter menor atividade antioxidante quando relacionados aos LC de algumas marcas (LC2, LC4, LC5, LC6 e LC9), devido provavelmente aos seus compostos já terem sofrido o processo de dissolução neste último. Já em

Resultados e Discussão

comparação ao padrão BHT, cujos %IO variaram de 60 a 84%, todos os extratos e LC mantiveram-se sempre com percentual de inibição inferior.

Os dados demonstram que %IO é dose-dependente, ou seja, aumenta com a elevação da concentração de extrato aplicada, exceto para os EALC (CB2, CB3, CB4, CB6, CB7, CB8 e CB9) e alguns EAQ onde o percentual de proteção foi inferior à proteção do controle, o que se deve possivelmente a uma atividade pró-oxidante deste extrato. De acordo com Carpes (2008), a presença de certos sais metálicos pode resultar no comportamento pró-oxidante de flavonóides. E se estes sais metálicos estão presentes no vegetal, eles podem estar dissolvidos na fase aquosa e dessa forma, podem inibir a atividade dos antioxidantes ou serem convertidos à pró-oxidantes.

Nos EAQ, observou-se que as conservas CB5 e CB9, as quais não demonstraram proteção ao β -caroteno, tiveram um destacado teor de FT, não se encontrando, portanto, correlação positiva entre estes dois testes.

A relação entre o conteúdo de compostos fenólicos e a atividade antioxidante não ocorre de maneira proporcional e isto pôde ser constatado com a observação dos resultados dos EALC e LC. Apesar de possuir algum conteúdo de FT (Figura 12), os EALC foram aqueles que, quanto maior a concentração testada, mais apresentaram percentual de inibição negativa. Os LC apesar de possuírem quantidade superior de FT, não reproduziram esses resultados mais elevados quando avaliados pelas suas porcentagens de inibição da oxidação. Dentre os LC podemos destacar o LC1 e LC6 (5,86, 10,96 e 18,41% e 8,38; 10,36 e 13,21% a 50, 100 e 200ppm, respectivamente).

Nos extratos e LC a atividade antioxidante variou consideravelmente de acordo com a espécie e tipo de conserva. Estudos recentes demonstram que a capacidade antioxidante de maçãs também é dependente do cultivar e do genótipo (OU et al., 2002; KHANIZADEH et al., 2008).

Turkmen, Sari e Veliloglu (2005) relataram que a atividade antioxidante de vegetais aumentou ou permaneceu inalterada após tratamentos com tipos de cozimentos diferentes (ou seja, cozinhar, ferver e cozinhar em microondas). Hunter e Fletcher (2002) relataram que a atividade antioxidante de hortaliças foi afetada pelo armazenamento sob diferentes condições, como o congelamento, o uso de

Resultados e Discussão

conservas, dentre outras. Oboh (2005) constatou que o branqueamento de legumes resultou na diminuição da atividade antioxidante.

Muitos artigos referem-se à capacidade antioxidante como estando relacionada ao teor de fenólicos totais e de antocianinas, cada um destes componentes pode contribuir de forma e proporção diferente. No entanto, alguns estudos têm mostrado uma baixa correlação (KUSKOSKI et al., 2005). Hassimoto, Genovese e Lajolo (2005) verificaram a atividade antioxidante de polpas de frutas congeladas consumidas no Brasil, fazendo uso da inibição da peroxidação induzida e inibição do processo de co-oxidação do β -caroteno, e não encontraram nenhuma relação entre o teor total de fenóis e vitamina C, com a capacidade antioxidante. No entanto, os autores observaram que as amostras ricas em antocianinas, apresentaram maior capacidade antioxidante. É necessário considerar que tal correlação não só depende da concentração e qualidade do antioxidante, mas também sua interação com outros componentes e da metodologia aplicada (KUSKOSKI et al., 2005).

A figura 19 traz os resultados de porcentagem de inibição da oxidação para as frações de ácidos fenólicos obtidos da polpa do pequi nas concentrações 10, 20 e 40ppm.

Figura 19. Atividade antioxidante das frações (AFL, AFS e AFI) da polpa de pequi processado (CB1) em diferentes concentrações pelo método β -caroteno/ácido linoléico. Resultados expressos em média e desvio padrão, $n = 3$. Letras diferem entre si estatisticamente ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$), quando utilizado o teste de Tukey (40ppm) ou quando utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (10 e 20ppm). ppm: partes por milhão; AFL: ácidos fenólicos livres; AFS: ésteres solúveis de ácidos fenólicos; AFI: ésteres insolúveis de ácidos fenólicos.

Resultados e Discussão

Todas as frações destacaram-se, com elevada capacidade de inibirem a oxidação (>70%), a partir de quantidades bem menores quando comparadas aos extratos. Essa atividade antioxidante acentuada das frações indica que o processo de fracionamento dos ácidos fenólicos do pequi levou à obtenção de compostos purificados com expressiva atividade antioxidante. Dados de estudos anteriores mostram que esses mesmos resultados foram encontrados para as polpas de romã, cajú e pequi (BROINIZI et al., 2007; JARDINI, 2005; LIMA, 2008).

A AFL apresentou uma atividade antioxidante elevada, o que já era esperado, em vista do seu elevado conteúdo de FT (465,165mg EAG/100g de amostra) (Figura 13). Enquanto que a fração AFI surpreende, pois, apesar de seu conteúdo inferior de FT (268,762mg/100g de amostra), o seu desempenho na inibição da oxidação superou o da fração AFL em todas as concentrações testadas (10, 20 e 40ppm). Ficou evidenciado, portanto, que a quantidade de compostos fenólicos não foi o fator determinante da atividade antioxidante por este método.

Conforme já foi visto, as frações de ácidos fenólicos apresentaram elevada atividade antioxidante, e esses valores se mostraram ainda superiores ao do BHT, o qual apresentou uma proteção de aproximadamente 6, 18 e 36% nas concentrações de 10, 20 e 40ppm respectivamente. Este comportamento das frações de ácidos fenólicos isolados do pequi caracteriza-as como uma excelente fonte de antioxidantes.

Pode-se observar ainda que a atividade antioxidante elevou-se com o aumento da concentração das frações.

Lima (2008) estudando o pequi encontrou para a AFI maiores valores de atividade antioxidante por este método, devido a essa fração ser a mais rica em ácidos fenólicos. Silva (2008), em trabalho com o alecrim demonstrou que a fração AFI nas maiores concentrações, também apresentou os melhores resultados de proteção.

Nas tabelas 4, 5, 6 e 7 encontram-se os resultados das análises realizadas quando da associação dos EAQ, EALC, LC e frações da polpa do pequi com o antioxidante sintético BHT, na proporção de 1:1 (extrato, LC ou fração : BHT).

Resultados e Discussão

Tabela 4. Percentual de inibição da oxidação para a associação entre os extratos alcoólicos das polpas de pequi e o BHT pelo método β -caroteno/ácido linoléico.

Extratos alcoólicos + BHT	% de inibição da oxidação Concentração (ppm)		
	25 + 25ppm	50 + 50ppm	100 + 100ppm
CB1	56,26 $\pm$ 0,22	73,82 $\pm$ 0,87	83,32 $\pm$ 0,94
CB2	30,24 $\pm$ 1,48	47,56 $\pm$ 0,99	58,24 $\pm$ 0,12
CB3	43,18 $\pm$ 1,68	60,65 $\pm$ 0,73	66,16 $\pm$ 0,51
CB4	47,28 $\pm$ 0,42	65,70 $\pm$ 0,69	76,19 $\pm$ 0,42
CB5	43,95 $\pm$ 2,70	62,85 $\pm$ 0,60	72,19 $\pm$ 0,60
CB6	46,05 $\pm$ 1,00	64,04 $\pm$ 0,96	75,16 $\pm$ 1,00
CB7	42,25 $\pm$ 0,33	64,89 $\pm$ 0,24	74,54 $\pm$ 0,60
CB8	45,65 $\pm$ 0,56	64,52 $\pm$ 0,23	73,69 $\pm$ 1,06
CB9	42,86 $\pm$ 1,54	62,24 $\pm$ 0,10	70,68 $\pm$ 0,10
CC1	34,19 $\pm$ 0,52	49,26 $\pm$ 1,78	63,96 $\pm$ 1,04
CC2	41,12 $\pm$ 1,07	58,88 $\pm$ 0,36	71,78 $\pm$ 1,78
CC3	41,49 $\pm$ 0,39	59,07 $\pm$ 0,00	73,02 $\pm$ 0,26
CC4	35,11 $\pm$ 0,71	55,23 $\pm$ 1,28	65,69 $\pm$ 3,84
CC5	36,76 $\pm$ 0,19	56,72 $\pm$ 0,84	67,33 $\pm$ 0,37
BHT	64,03 $\pm$ 1,26*	72,86 $\pm$ 2,96**	82,59 $\pm$ 2,83***

Valores expressos em média e $\pm$ desvio padrão, n = 3. ppm: partes por milhão; BHT: butilhidroxi tolueno. % de inibição da oxidação do BHT 25ppm = 44,44 $\pm$ 2,05. * % de inibição da oxidação do BHT a 50ppm; ** % de inibição da oxidação do BHT a 100ppm; *** % de inibição da oxidação do BHT a 200ppm.

Tabela 5. Percentual de inibição da oxidação para a associação entre os extratos aquosos das polpas de pequi e o BHT pelo método β -caroteno/ácido linoléico.

Extratos Aquosos + BHT	% de inibição da oxidação Concentração (ppm)		
	25 + 25ppm	50 + 50ppm	100 + 100ppm
CB1	57,19 $\pm$ 1,30	71,48 $\pm$ 0,43	84,15 $\pm$ 0,26
CB2	53,85 $\pm$ 0,24	68,12 $\pm$ 0,12	78,36 $\pm$ 0,36
CB3	40,25 $\pm$ 1,60	57,70 $\pm$ 0,48	58,86 $\pm$ 11,92
CB4	36,52 $\pm$ 1,19	67,65 $\pm$ 0,89	79,99 $\pm$ 0,10
CB5	44,06 $\pm$ 1,95	60,51 $\pm$ 0,30	73,46 $\pm$ 0,00
CB6	47,05 $\pm$ 0,95	65,52 $\pm$ 0,24	77,87 $\pm$ 0,17
CB7	42,07 $\pm$ 0,68	63,47 $\pm$ 2,36	72,79 $\pm$ 0,23
CB8	47,10 $\pm$ 0,13	67,67 $\pm$ 0,60	78,53 $\pm$ 1,03
CB9	43,67 $\pm$ 0,19	59,52 $\pm$ 1,83	72,18 $\pm$ 0,48
CC1	47,34 $\pm$ 8,88	60,56 $\pm$ 10,03	75,48 $\pm$ 2,30
CC2	49,92 $\pm$ 5,69	71,78 $\pm$ 0,83	81,16 $\pm$ 0,59
CC3	49,95 $\pm$ 2,10	67,16 $\pm$ 0,13	80,74 $\pm$ 1,45
CC4	44,97 $\pm$ 1,85	65,39 $\pm$ 0,28	76,16 $\pm$ 0,43
CC5	42,36 $\pm$ 3,45	64,82 $\pm$ 0,56	76,48 $\pm$ 0,65
BHT	65,41 $\pm$ 2,34*	71,76 $\pm$ 2,72**	83,53 $\pm$ 2,27***

Valores expressos em média e $\pm$ desvio padrão, n = 3. ppm: partes por milhão; BHT: butilhidroxi tolueno. % de inibição da oxidação do BHT 25ppm = 44,44 $\pm$ 2,05. * % de inibição da oxidação do BHT a 50ppm; ** % de inibição da oxidação do BHT a 100ppm; *** % de inibição da oxidação do BHT a 200ppm.

Tabela 6. Percentual de inibição da oxidação para a associação entre os líquidos das conservas do pequi e o BHT pelo método β -caroteno/ácido linoléico.

Líquidos das conservas + BHT	% de inibição da oxidação Concentração (ppm)		
	25 + 25ppm	50 + 50ppm	100 + 100ppm
LC1	25,04 $\pm$ 1,00	42,03 $\pm$ 0,76	60,93 $\pm$ 1,68
LC2	46,78 $\pm$ 1,26	65,21 $\pm$ 0,15	77,95 $\pm$ 0,99
LC3	37,18 $\pm$ 1,12	58,84 $\pm$ 0,70	72,85 $\pm$ 1,02
LC4	38,66 $\pm$ 5,63	54,43 $\pm$ 1,38	68,17 $\pm$ 1,70
LC5	40,24 $\pm$ 0,34	57,98 $\pm$ 0,68	74,69 $\pm$ 0,68
LC6	51,75 $\pm$ 0,34	72,81 $\pm$ 0,47	83,77 $\pm$ 0,09
LC7	29,24 $\pm$ 0,80	51,77 $\pm$ 0,70	68,08 $\pm$ 0,20
LC8	49,97 $\pm$ 0,43	65,22 $\pm$ 0,64	77,72 $\pm$ 0,32
LC9	49,47 $\pm$ 2,87	65,24 $\pm$ 1,38	77,40 $\pm$ 0,53
BHT	69,33 $\pm$ 2,06*	70,18 $\pm$ 2,49**	84,72 $\pm$ 2,03***

Valores expressos em média e $\pm$ desvio padrão, n = 3. ppm: partes por milhão; BHT: butilhidroxi tolueno. % de inibição da oxidação do BHT 25ppm = 44,44 $\pm$ 2,05. * % de inibição da oxidação do BHT a 50ppm; ** % de inibição da oxidação do BHT a 100ppm; *** % de inibição da oxidação do BHT a 200ppm.

Os dados das tabelas acima permitem observar que a atividade antioxidante na associação entre os extratos e LC com o BHT aumentou na maioria das amostras, as quais apresentaram atividade antioxidante superior do que quando puros, porém ainda assim, não maiores do que o BHT isolado. A melhor atividade antioxidante nestes casos deveu-se mais devido a presença do BHT do que devido às amostras em si. Isso aconteceu mesmo em alguns EALC, os quais, conforme já foi visto, apresentaram atividade pró-oxidante quando isolados, demonstrando que a associação atingiu valores semelhantes aos demais extratos.

Lima (2008) demonstrou que os EALC tanto na polpa quanto na amêndoa do pequi apresentaram sinergismo quando associados ao BHT, independentemente da concentração utilizada. Naquele trabalho, o EALC puro apresentou baixa atividade (50ppm = 0,75%, 100ppm = 5,7% e 200ppm = 18,3%); já quando se misturou ao BHT, observou-se um sinergismo e a atividade antioxidante aumentou significativamente (50ppm = 67,5%, 100ppm = 73,1% e 200ppm = 77,6%).

A intenção destas associações entre os extratos e o BHT é maximizar a ação antioxidante, minimizando a quantidade de antioxidante sintético a níveis inferiores aos recomendados pela legislação (SALINAS, 2002).

Tabela 7. Percentual de inibição da oxidação para a associação entre as frações da polpa de pequi (CB1) e o BHT pelo método β -caroteno/ácido linoléico.

Frações + BHT	% de inibição da oxidação Concentração (ppm)		
	5 + 5ppm	10 + 10ppm	20 + 20ppm
AFL	60,09 $\pm$ 3,11	77,67 $\pm$ 2,54	89,30 $\pm$ 1,86
AFS	79,37 $\pm$ 1,18	86,87 $\pm$ 0,39	92,96 $\pm$ 0,39
AFI	80,42 $\pm$ 0,86	87,41 $\pm$ 0,16	93,40 $\pm$ 0,09
BHT	5,94 $\pm$ 0,54*	17,85 $\pm$ 0,67**	36,56 $\pm$ 1,21***

Valores expressos em média e $\pm$ desvio padrão, n = 3. ppm: partes por milhão; BHT: butilhidroxi tolueno; AFL: ácidos fenólicos livres; AFS: ésteres solúveis de ácidos fenólicos; AFI: ésteres insolúveis de ácidos fenólicos. * % de inibição da oxidação do BHT a 10ppm; ** % de inibição da oxidação do BHT a 20ppm; *** % de inibição da oxidação do BHT a 40ppm.

As frações isoladas do pequi processado (CB1) apresentaram melhores valores de proteção à oxidação em todas as concentrações testadas, conforme se verifica na figura 19, do que quando associados ao BHT (p. ex. frações a 40ppm isoladas e associadas ao BHT, respectivamente: AFL = 97,12% e 89,30%; AFS = 96,64% e 92,96%; AFI = 97,48% e 93,40%) (Tabela 7). Observa-se, portanto, que os valores de proteção da oxidação do sistema, de uma forma geral, tenderam a diminuição, não havendo sinergismo. Esta mesma tendência foi também observada por Lima (2008) estudando as mesmas frações no pequi *in natura*.

Além disso, todas as frações associadas ao BHT tiveram resultados médios superiores aos do BHT isolado, conforme se verifica na tabela acima.

5.3.2. Método do radical DPPH[•]

No presente estudo foi avaliada a capacidade em sequestrar o radical DPPH[•] dos EALC e EAQ da polpa do pequi *in natura* e processado e dos respectivos líquidos da conserva deste último nas concentrações de 50, 100, 200 e 400ppm, além disso, as frações da polpa da conserva CB1 também foram avaliadas em sua capacidade de seqüestro utilizando as concentrações 10, 25, 50 e 100ppm. As concentrações foram determinadas após testes prévios com as amostras. Os resultados obtidos foram agrupados em pequi *in natura* (Figuras 20 e 21), pequi processado (Figuras 22, 23 e 24) e frações (Figura 25), conforme se verifica nas ilustrações abaixo, iniciando-se com o primeiro grupo.

Resultados e Discussão

Figura 20. % de redução do radical DPPH[•] pelos extratos alcoólicos da polpa do pequi *in natura*. Resultados expressos em média e desvio padrão, n = 3. Letras diferem entre si estatisticamente ao nível de significância de 5% (Tukey HSD, p<0,05). ppm: partes por milhão.

Resultados e Discussão

Figura 21. % de redução do radical DPPH[•] pelos extratos aquosos da polpa de pequi *in natura*. Resultados expressos em média e desvio padrão, n = 3. Letras diferem entre si estatisticamente ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$), quando utilizado o teste de Tukey (gráficos A, B e D) ou quando utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (gráfico C). ppm: partes por milhão.

Todos os extratos do pequi *in natura* apresentaram atividade em sequestrar o radical livre DPPH[•] e variaram estatisticamente entre si ($p < 0,05$). Dentre os extratos, os que obtiveram maior atividade antioxidante foram os EAQ, o que é consistente com os resultados de FT anteriormente descritos. Esse fato demonstra a relação da atividade antioxidante com a composição fenólica dos extratos, provavelmente determinada pelas características de afinidade polar entre solvente e compostos fenólicos (ROCKENBACH et al., 2007).

O poder de redução do radical cresceu conforme se aumentava a concentração dos extratos. Podemos destacar os EALC a 400ppm com valores percentuais de redução do radical variando de 16,72 (CC5) a 23,39% (CC4) e os EAQ a 400ppm variando de 30,28 (CC3) a 34,59% (CC4).

Resultados e Discussão

Conforme descrito por Porto et al. (2009), dos resultados da atividade antioxidante de extratos do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) feitas a partir de extrações em amostras secas de folhas, mesocarpo e polpa, utilizando os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol, metanol e água destilada, as melhores atividades antioxidantes avaliada pela capacidade de redução do radical DPPH[•] foram encontradas para os solventes: etanol, metanol e água destilada.

Recentemente, Lima (2008) demonstrou a atividade de sequestro do radical livre DPPH[•] pelos extratos e frações da polpa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) *in natura*, os quais foram expressos como valor de EC₅₀ (concentração da amostra necessária para inibir 50% do radical). Nele, todos os extratos apresentaram atividade em sequestrar o radical sintético. O extrato aquoso da polpa foi o que apresentou maior atividade antioxidante.

A seguir se encontram as figuras referentes ao pequi processado.

Resultados e Discussão

Figura 22. % de redução do radical DPPH[•] pelos extratos alcoólicos da polpa do pequi processado. Resultados expressos em média e desvio padrão, n = 3. Letras diferem entre si estatisticamente ao nível de significância de 5% (Tukey HSD, $p < 0,05$). ppm: partes por milhão.

Resultados e Discussão

Figura 23. % de redução do radical DPPH[•] pelos extratos aquosos da polpa do pequi processado. Resultados expressos em média e desvio padrão, n = 3. Letras diferem entre si estatisticamente ao nível de significância de 5% (Tukey HSD, p<0,05). ppm: partes por milhão

Resultados e Discussão

Figura 24. % de redução do radical DPPH[•] pelos líquidos das conservas da polpa do pequi processado. Resultados expressos em média e desvio padrão, n = 3. Letras diferem entre si estatisticamente ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$), quando utilizado o teste de Tukey (gráfico D) ou quando utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (gráficos A, B e C). ppm: partes por milhão.

A maioria dos extratos e dos LC apresentaram atividade em sequestrar o radical livre DPPH[•], devido principalmente aos compostos fenólicos presentes na polpa do pequi processado, porém nos EAQ o percentual de redução do radical foi baixo (exceto para a CB5), como se pode ver na figura 23. Este resultado difere dos melhores resultados encontrados nos EAQ do pequi *in natura*.

Essa baixa atividade antioxidante dos EAQ do pequi processado pode ter ocorrido devido à falta de atividade seqüestradora desse extrato em decorrência da migração significativa dos FT e outros constituintes com atividade antioxidante para os LC, os quais apresentaram uma boa atividade (Figura 24).

Resultados e Discussão

Outro fator relevante a ser observado é que, ao contrário dos resultados de atividade antioxidante encontrados pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico, os EAQ do pequi processado foram menos efetivos no ensaio do sistema DPPH^{*} em comparação aos EALC, indicando existência de diferenças nas metodologias de ação de cada método.

Nas amostras processadas o percentual de redução do radical foi superior nos extratos etanólicos, em comparação com os EAQ. Isso pode ser atribuído aos efeitos do processamento sobre os FT e sua solubilidade nestes solventes, ou ainda, sugere a possibilidade de haver outros importantes compostos fitoquímicos de elevada capacidade antioxidante geradas pelo processamento (AL-DUAIS et al., 2009). Esses resultados do pequi processado, no entanto, vão ao encontro com os obtidos por Roesler et al. (2007), que avaliaram a atividade antioxidante dos extratos aquosos e etanólicos da casca, polpa e semente de frutas do cerrado brasileiro pelo ensaio DPPH^{*}, encontrando melhores valores para os extratos etanólicos da polpa da cagaita, araticum e polpa e semente de pequi em relação aos seus respectivos extratos aquosos.

No presente estudo, embora havendo variabilidade entre as amostras analisadas ($p < 0,05$), o percentual de redução do DPPH^{*} tendeu a ser maior nos EALC e EAQ do pequi *in natura* do que nos mesmos extratos da amostra processada. Sabe-se que os tratamentos térmicos afetam a atividade antioxidante de vegetais e em muitos casos tem sido observada menor capacidade antioxidante em amostras processadas do que em vegetais crus. A atividade antioxidante e a estabilidade de compostos fitoquímicos individuais diferem significativamente, com o processamento de vegetais (branqueamento, enlatamento), bem como o cozimento doméstico influencia no conteúdo de antioxidantes e na sua atividade (PODSEDEK, 2007).

Conforme visto nos testes anteriores, existe variação entre as amostras. Os valores mais baixos podem ser também o resultado das variedades utilizadas ou das condições de cultivo. Atualmente, em estudos desenvolvidos por Ou et al. (2002) para caracterização dos principais antioxidantes presentes em vegetais, os resultados encontrados acabaram por revelar a correlação entre as condições de cultivo e a atividade antioxidante do ponto de vista químico. Também é possível que o conteúdo de compostos sensíveis, como os fenólicos por exemplo, seja diminuído

Resultados e Discussão

pelo armazenamento ou pelo processamento preliminar dos vegetais (SIKORA et al., 2008).

Processos tecnológicos a que estes vegetais são geralmente sujeitos dão origem a alterações na atividade antioxidante. No entanto, o processo de branqueamento, devido à sua curta duração, tem um efeito menor (SIKORA et al., 2008).

Dados confirmam que, as técnicas de preparação e armazenamento podem significativamente afetar o nível e a estabilidade dos compostos fenólicos em vegetais (BUNEA et al., 2008). Além disso, devido à sua composição química benéfica, os vegetais devem ser consumidos com o mínimo de processamento e o mais rápido possível (SIKORA et al., 2008).

De acordo com os resultados apresentados, viu-se que as propriedades antioxidantes das amostras de pequi em conserva investigadas foram afetadas significativamente com os métodos de processamento em função de testes antioxidantes empregados. No entanto, segundo Al-Duais et al. (2009), é difícil prever o “valor antioxidante total” das amostras baseado em um único ensaio *in vitro*. Estes resultados, portanto, merecem ser acrescidos de outros a fim de prever melhor a capacidade antioxidante do pequi.

Os resultados obtidos para as frações encontram-se na figura 25.

Figura 25. % de redução do radical DPPH[•] das frações (AFL e AFI) da polpa do pequi processado (CB1) (*Caryocar brasiliense* Camb.). Resultados expressos em média e desvio padrão, n = 3. Letras diferem entre si estatisticamente ao nível de significância de 5% (Tukey HSD, p<0,05). ppm: partes por milhão; AFL: ácidos fenólicos livres; AFI: ésteres insolúveis de ácidos fenólicos.

Resultados e Discussão

Podemos observar que as frações apresentaram uma expressiva atividade antioxidante, quando comparadas aos extratos e aos LC, no sequestro do radical DPPH[•] por atuarem eficazmente como doadores de átomos de hidrogênio para o radical. Esse resultado demonstra que no pequi processado ainda há uma preservação dos ácidos fenólicos e que esses mesmos constituintes ainda detêm propriedades antioxidantes, apesar de as amostras terem sido submetidos ao processamento.

A fração AFL se destacou com maiores percentuais de redução do radical nas concentrações 25, 50 e 100ppm (51,39, 68,33 e 73,88%, respectivamente), resultados estes que demonstraram dependência com a concentração. Já a AFI mostrou atividade, embora menos efetiva que a AFL. O percentual de redução do radical para a fração AFS não pôde ser determinado devido à interferência da absorbância dos compostos da amostra, o que se tornou um problema na avaliação dessa fração por esse método.

Shahidi et al. (2007), avaliando o potencial antioxidante de uma mistura de frações de ácidos fenólicos da avelã (*Corylus avellana* L.), observaram uma proteção de 62,2 e 63,5% nas concentrações de 50 e 100ppm, respectivamente, valores estes inferiores aos da fração AFL do pequi.

Lima (2008), estudando o pequi *in natura*, observou que todas as frações apresentaram expressiva atividade antioxidante e que a fração AFL da polpa e da semente continham as maiores capacidades antioxidantes através deste ensaio. Ele verificou ainda que a AFS da polpa apresentou a menor atividade.

Vidal et al. (2009), verificando as frações de ácidos fenólicos da alga *Halimeda opuntia* e da *Halimeda monile*, encontrou que a fração AFL da primeira espécie, e a AFI da segunda mostraram-se superiores, em relação às demais frações, na inibição da atividade do radical DPPH[•].

5.4 Correlação entre variáveis do estudo

Outro ponto a ser considerado é a correlação entre os métodos avaliados. A análise de correlação foi feita entre os parâmetros para as amostras *in natura* e processada do pequi. As correlações lineares de Pearson (r) para os fenólicos totais e atividade antioxidante medida pelos ensaios do sequestro do radical DPPH[•] e

Resultados e Discussão

método β -caroteno/ácido linoléico são apresentados nas tabelas 8, 9 e 10 (extratos do pequi *in natura*, extratos e líquidos da conserva do pequi processado e frações, respectivamente).

Em função das diferenças de especificidade e sensibilidade entre os métodos não foi possível usar quantidades iguais de antioxidantes em cada teste. Por outro lado, o uso de concentrações distintas nos dois métodos torna difícil a comparação dos resultados. Em vista disso, foram utilizadas para a análise de correlação, as concentrações que apresentaram os melhores resultados na avaliação da atividade antioxidante nos métodos (DPPH[•]: 400 e 100ppm e β -caroteno/ácido linoléico: 200 e 40ppm para os extratos e frações, nesta ordem).

Tabela 8. Correlações lineares de Pearson (r) entre os fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos DPPH[•] e sistema β -caroteno/ácido linoléico nos extratos da polpa do pequi *in natura*.

r	DPPH [•] (400ppm)		β -caroteno/ácido linoléico (200ppm)	
	EALC	EAQ	EALC	EAQ
Fenólicos Totais	0,5437 (p=0,344)	-0,0458 (p=0,942)	0,2413 (p=0,696)	-0,3053 (p=0,617)

DPPH[•]: 2,2 difenil-1-picril-hidrazila; ppm: partes por milhão; EAQ: extrato aquoso; EALC: extrato alcoólico.

Tabela 9. Correlações lineares de Pearson (r) entre os fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos DPPH[•] e sistema β -caroteno/ácido linoléico nos extratos e LC do pequi processado.

r	DPPH [•] (400ppm)			β -caroteno/ácido linoléico (200ppm)		
	EALC	EAQ	LC	EALC	EAQ	LC
Fenólicos Totais	-0,2904 (p=0,448)	0,684 (p=0,042)*	0,829 (p=0,006)**	0,0023 (p=0,995)	-0,2907 (p=0,448)	-0,3975 (p=0,289)

DPPH[•]: 2,2 difenil-1-picril-hidrazila; ppm: partes por milhão; EAQ: extrato aquoso; EALC: extrato alcoólico; LC: líquido da conserva.

*p<0,05; **p<0,01.

Correlações significativamente forte e moderada foram encontradas neste estudo, conforme se verifica na tabela 9, apenas entre os teores de fenólicos totais e DPPH[•] do pequi processado nos seus LC (r = 0,829) e nos EAQ (r = 0,684), respectivamente. Não foi observada nenhuma correlação entre as análises avaliadas

Resultados e Discussão

para o pequi *in natura* (Tabela 8). Não houve ainda correlação significativa entre o sistema β -caroteno/ácido linoléico e qualquer uma das variáveis do estudo.

Segundo Carpes (2008), existe uma similaridade entre as metodologias empregadas na atividade antioxidante pelo método do radical DPPH[•] e a determinação dos compostos fenólicos totais, pois em ambos os casos há transferências de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante, por meio da doação de um átomo de hidrogênio.

As correlações entre o teor de FT e a atividade antioxidante de frutos é bastante controversa na literatura, independentemente da matéria-prima: enquanto uns referem forte correlação, outros observam uma fraca correlação entre os métodos. Esta divergência pode ser atribuída à falta de seletividade do reagente de *Folin-Ciocalteu* na quantificação de compostos fenólicos, uma vez que ele reage com outros compostos redutores como aminoácidos, açúcares redutores e ácido ascórbico (OLIVEIRA, 2009).

Tabela 10. Correlações lineares de Pearson (r) entre os fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos DPPH[•] e sistema β -caroteno/ácido linoléico nas frações do pequi processado (CB1).

r	DPPH [•] (100ppm)			β -caroteno/ácido linoléico (40ppm)		
	AFL	AFS	AFI	AFL	AFS	AFI
Fenólicos Totais	-0,9083 (p=0,275)	-	-0,6917 (p=0,514)	0,6286 (p=0,567)	0,9499 (p=0,202)	0,4271 (p=0,719)

DPPH[•]: 2,2 difenil-1-picril-hidrazila; ppm: partes por milhão; AFL: ácidos fenólicos livres; AFS: ácidos fenólicos solúveis; AFI: ácidos fenólicos insolúveis.

Conforme se verifica na tabela 10, não houve correlação significativa entre as análises para as frações do pequi processado.

Correlações entre os dois métodos para determinação de atividade antioxidante (DPPH[•] e β -caroteno/ácido linoléico) também foram realizadas, mas não foram significativas (dados não apresentados). As discrepâncias entre os dois métodos podem ter sido devido aos diferentes tipos de mecanismos de ação que ocorrem em cada ensaio. O radical DPPH[•] reage diretamente com um composto antioxidante doando átomos de hidrogênio ou elétrons, enquanto que a reação do β -caroteno/ácido linoléico acontece a partir da oxidação primária do ácido linoléico.

Resultados e Discussão

Estas diferenças levam a variações na medida da atividade antioxidante (CARPES, 2008; FUKUMOTO; MAZZA, 2000).

Estes achados demonstram que nem sempre é uma tarefa simples escolher o método mais adequado para determinar a capacidade antioxidante de amostras. Rufino et al. (2010), explica que o método β -caroteno/ácido linoléico é adequado para compostos lipofílicos. O método DPPH[•] pode ser empregado rotineiramente com extratos orgânicos contendo compostos hidrofílicos e lipofílicos.

Resultados semelhantes aos desse estudo foram encontrados por Silva (2008), investigando a atividade antioxidante dos extratos e frações de alecrim por três métodos (β -caroteno/ácido linoléico, DPPH[•] e ORAC), onde foi verificado que as amostras apresentaram expressiva atividade antioxidante sem, no entanto, mostrarem correlação entre os métodos. Já Shahidi et al. (2007), avaliando o potencial antioxidante de uma mistura de frações de ácidos fenólicos da avelã (*Corylus avellana* L.), observaram uma correlação positiva entre a atividade antioxidante pelo método β -caroteno/ácido linoléico e o método DPPH[•].

Lima (2008) correlacionou positivamente somente os métodos β -caroteno/ácido linoléico e DPPH[•] nos EAQ e a AFL da polpa de pequi *in natura*, demonstrando que apesar das diferenças quanto ao mecanismo de ação dessas metodologias, as amostras foram eficientes em atuar tanto na captura de radicais isolados quanto na prevenção da oxidação do ácido linoléico.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, chegou-se às seguintes conclusões:

- Os extratos alcoólicos e aquosos do pequi em conserva e *in natura*, bem como os líquidos das conservas do pequi processado possuem compostos fenólicos, merecendo destaque os extratos aquosos e principalmente os líquidos das conservas, pelas quantidades expressivas destes componentes.
- Na avaliação da atividade antioxidante *in vitro* pelo método β -caroteno/ácido linoléico, observou-se que a maioria dos extratos estudados tanto do pequi processado quanto do *in natura* tiveram uma baixa atividade. Neste método os extratos aquosos se destacaram em termos de percentual de inibição da oxidação.
- Na avaliação da atividade antioxidante pelo método de seqüestro do radical DPPH $^{\bullet}$, observou-se que a maioria dos extratos e LC analisados apresentaram atividade, porém não expressiva, tanto no pequi *in natura* como no processado. Diferentemente do que aconteceu no método β -caroteno, os extratos aquosos do pequi processado apresentaram, em geral, uma menor atividade.
- A composição fenólica e as propriedades antioxidantes das polpas de pequi investigadas foram afetadas significativamente em função do processamento, ocorrendo uma perda de compostos fenólicos da polpa com a sua consequente migração para os respectivos líquidos das conservas.
- Verificou-se que com pequenas quantidades, todas as frações apresentaram elevada atividade no sistema β -caroteno, superiores às obtidas com os extratos e líquidos das conservas e ao antioxidante sintético BHT.
- A fração de ácidos fenólicos livres do pequi processado foi a que alcançou o maior percentual de redução do radical DPPH $^{\bullet}$, sendo também a fração com o maior conteúdo de fenólicos totais diante das frações solúvel e insolúvel.
- A participação das frações de ácidos fenólicos demonstram que estes compostos no pequi processado são preservados e ainda possuem a propriedade de atuar como antioxidantes mesmo após serem submetidos ao processamento.

- As marcas de pequi processado estudadas, bem como os cultivares de pequi *in natura* apresentaram variação tanto quanto à composição de fenólicos totais como na atividade antioxidante.
- Os resultados do pequi processado foram inferiores aos do pequi *in natura* tanto em relação aos teores de FT como na atividade antioxidante.
- Embora os métodos e resultados da avaliação não terem sido ainda suficientemente padronizados, tornando as comparações difíceis, os dados acrescentam informações importantes para os conhecimentos atuais sobre as propriedades nutricionais do pequi processado, tais como uma considerável perda da capacidade antioxidante encontrados para o pequi processado nos métodos β -caroteno/ácido linoléico e DPPH^{*} e de seus compostos fenólicos com a conseqüente migração para os LC, sugerindo-se o aproveitamento destes no consumo do pequi processado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-DUAIS, M.; MÜLLER, L.; BÖHM, V.; JETSCHKE, G. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **Eur. Food Res. Technol.**, v.228, p.813-821, 2009.

ALMEIDA, S.P. Frutas nativas do cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina, DF: EMBRAPA-CPAC, p.247-285, 1998.

ALMEIDA, S.P.; SILVA, J.A. **Piqui e buriti**: Importância alimentar para a população dos cerrados. Planaltina: EMBRAPA, CPAC, 1994.

ALVES, R.E.; BRITO, E.A.; RUFINO, M.S.M.; SAMPAIO, C.G. Antioxidant activity measurement in tropical fruits: a case study with acerola. **Acta Horticulturae**, n.773, p.299-305, 2008.

ANTUNES, E.C.; ZUPPA, T.O.; ANTONIOSI FILHO, N.R.; CASTRO, S.S. Utilização do pequi (*Caryocar brasiliense* camb) como espécie recuperadora de ambientes degradados no cerrado e fornecedora de matéria prima para a produção de biodiesel. In: I Congresso da rede brasileira de tecnologia do biodiesel, 2006, Brasília. Disponível em: www.biodiesel.gov.br/docs/congressso2006/agricultura/UtilizacaoPequi.pdf. Acesso em: 24 jan. 2008.

ASAMI, D.K.; HONG, Y.J.; BARRETT, D.M.; MITCHELL, A.E. Processing-induced changes in total phenolics and procyanidins in clingstone peaches. **J. Sci. Food. Agric.**, v.83, p.56-63, 2003.

AZEVEDO-MELEIRO, C.H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-MS. **J. food Compos. Anal.**, v.17, p.385-396, 2004.

BEAL, B.H. **Atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos do gengibre (*Zingiber officinale* ROSCOE)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, London, v.181, n.26, p.1199-1200, 1958.

Referências Bibliográficas

BOOTS, A.W.; GUIDO, R.M.M.; HAENEN, A.B. Review Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, v.585, p.325-337, mai., 2008.

BORGUINI, R.G. **Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional**. 2006. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BREST, C. Use of free radical method evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, London, v.28, p.25-30, 1995.

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

BUNEA, A.; ANDJELKOVIC, M.; SOCACIU, C.; BOBIS, O.; NEACSU, M.; VERHE, R.; CAMP, J.V. Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.). **Food Chemistry**, v.108, p.649-656, 2008.

CALDEIRA JÚNIOR, C.F.; ROCHA, S.L.; SANTOS, W.G.; PAULA, T.O.M.; SANTOS, A.M.; ARAÚJO, C.B.; MARTINS, E.R.; LOPES, P.S.N. Ecogeografia e etnobotânica do *Caryocar brasiliensis* no Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl.1, p.477-479, jul., 2007.

CAMPOS, F.M.; MARTINO, H.S.D.; SABARENSE, C.M.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M. Estabilidade de compostos antioxidantes em hortaliças processadas: uma revisão. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.19, n.4, p.481-490, out./dez., 2008.

CARPES, S.T. **Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região sul do Brasil**. 2008. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CATANIA, A.S.; BARROS, C.R.; FERREIRA, S.R.G. Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.53, n.5, p.550-559, 2009.

Referências Bibliográficas

- CENTRAIS DE ABASTECIMENTO DE GOIÁS S.A. **Análise Conjuntural 2008**, n.33. Disponível em: <http://www.ceasa.goias.gov.br/ArquivosSiteCeasa/Conjunturas/analise2008/analise2008.pdf>. Acesso em: 23 set. 2009.
- CHOE, E.; MIN, D.B. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. Critical Reviews in **Food Science and Nutrition**, v.46, p.1-22, 2006.
- CIEŚLIK, E.; GREDA, A.; ADAMUS, W. Contents of polyphenols in fruit and vegetables. **Food Chemistry**, v.94, p.135-142, 2006.
- CORRAL-AGUAYO, R.D.; YAHIA, E.M.; CARRILLO-LOPEZ, A.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity measured with six different assays in eight horticultural crops. **J. Agric. Food Chem.**, v.56, n.22, p.10498-10504, 2008.
- CROZIER, A.; JAGANATH, I.B.; CLIFFORD, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Nat. Prod. Rep.**, v.26, p.1001-1043, 2009.
- CROZIER, A.; LEAN, M.E.J.; MCDONALD, M.S.; BLACK, C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.590-595, 1997.
- CUVELIER, M.E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Comparison of the antioxidant activity of some acid phenols: structure-activity relationship. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Benkyoku, v.59, p.324-325, 1992.
- DAI, J.; GUPTA, A.; GATES, L.; MUMPER, R.J. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.837-847, 2009.
- DAMIANI, C. **Qualidade e perfil volátil de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) minimamente processado, armazenado sob diferentes temperaturas**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2006.
- DÉCORDÉ, K.; TEISSÈDRE, P.; AUGER, C.; CRISTOL, J.P.; ROUANET, J.M. Phenolics from purple grape, apple, purple grape juice and apple juice prevent early atherosclerosis induced by an atherogenic diet in hamsters. **Mol. Nutr. Food Res.**, v.52, p.400-407, 2008.

Referências Bibliográficas

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.5, n.1, p.33-40, jan./jun. 2004.

DI MAMBRO, V.M.; MARQUELE, F.D.; FONSECA, M.J.V. Avaliação *in vitro* da ação antioxidante em formulações antienvhecimento. **Cosmetics & Toiletries**, v.17, n.4, p.74-78, 2005.

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

EFRAIM, P.; TUCCI, M.L.; PEZOA-GARCÍA, N.H.; HADDAD, R.; EBERLIN, M.N. Phenolic compound content in cocoa seeds from different genotypes. **Braz. J. Food Technol.**, v.9, n.4, p.229-236, out./dez. 2006.

FERREIRA, L.C. **Aspectos microbiológicos da conservação de polpas de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.):** qualidade, higiene, adaptação de bactérias ao estresse ácido e isolamento de microorganismos com potencial para bioconservação. 2007. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

FERREIRA, L.C.; JUNQUEIRA, R.G. Microbiological evaluation of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) preserves made from a typical Brazilian fruit. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.23, p.1179-1181, 2007.

FOLIN, C.; CIOCALTEAU, V. Tyrosine and tryptophan determination in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.73, p.627-650, 1927.

FRANCISCO, M.L.L.D.; RESURRECCION, A.V.A. Total phenolics and antioxidant capacity of heat-treated peanut skins. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.22, p.16-24, 2009.

FRANKEL, E.N.; KANNER, J.; GERMAN, J. B.; PARKS, E.; KINSELLA, J. E. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. **Lancet**, v.341, p.454-457, 1993.

FRANKEL, E.N.; HUANG, S.W.; KANNER, J.; GERMAN, J.B. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: Bulk oils vs emulsions. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.42, n.5, p.1054-1059, 1994.

Referências Bibliográficas

FRANKEL, E.N; MEYER, A.S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants: review. **J. Sci. Food Agric.**, v.80, p.1925-1941, 2000.

FUKUMOTO, L.R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v.48, p.3597-3604, 2000.

GEOCZE, A.C. **Influência da preparação do licor de jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba Vell Berg*) no teor de compostos fenólicos**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

GIADA, M.L.R. **Avaliação da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos do cotilédono da semente de girassol (*Helianthus annuus* L.) rajada**. São Paulo, 2006. 206p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GOLDSCHMIDT, S.; RENN, K. **Chemische Berichte**, v.55, p.628-643, 1922.

GONÇALVES, G.A.S. **Qualidade dos frutos do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) submetidos aos processos de congelamento e cozimento**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

GRANATO, D.; CASTRO, I.A.; ELLENDERSEN, L.S.N.; LUCIAMASSON, M. Physical stability assessment and sensory optimization of a dairy-free emulsion using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v.75, n.3, 2010.

HACKMAN, R.M.; POLAGRUTO, J.A.; ZHU, Q.Y.; SUN, B.; FUJII, H.; KEEN, C.L. Flavanols: digestion, absorption and bioactivity. **Phytochem. Rev.**, v.7, p.195-208, 2008.

HALLIWELL, B.; AESCHBACHT, R.; LOLIGERT, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Fd. Chem. Toxk.**, v.33, n.7, p.601-617, 1995.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, Oxford, UK. 2003.

Referências Bibliográficas

HARISH NAYAKA, M.A.; SATHISHA, U.V.; CHANDRASHEKAR, K.B.; MANOHAR, M.P.; DHARMESH, S.M. Evaluation of antioxidant activity of bound phenolics of sugarcane under *in vitro* conditions. **Sugar Tech.**, v.10, n.4, p.302-307, 2008.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables and commercial frozen fruit pulps. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, p.2928-2935, 2005.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of Brazilian fruits, vegetables and commercially-frozen fruit pulps. **Journal of food composition and analysis**, v.22, p.394-396, 2009.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p.572-584, 2002.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, p.1841-1856, 2005.

HUBER, L.S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.19, n.1, p.97-108, jan./mar., 2008.

HUNTER, K.J.; FLETCHER, J.M. The antioxidant activity and composition of fresh, frozen, jarred and canned vegetables. **Innovative Food Science & Emerging Technology**, v.3, p.399-406, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Diretoria de pesquisas, coordenação de agropecuária, produção da extração vegetal e da Silvicultura**. Rio de Janeiro, v.22, p.1-47, 2007.

IONITA, P. Is DPPH[•] stable free radical a good scavenger for oxygen active species?. **Chemical Papers**, v.59, n.1, p.11-16, 2005.

JARDINI, F.A. **Avaliação da atividade antioxidante da romã (*Punica granatum* L.) - Participação das frações de ácidos fenólicos no processo de inibição da oxidação**. 2005. 129 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Referências Bibliográficas

JARDINI, F.A.; MANCINI-FILHO, J. Atividade antioxidante da polpa liofilizada da romã (*Punica granatum* L.). In: 7 Congresso da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN, 2003, Belo Horizonte. **Anais...** p.25, Belo Horizonte, 2003.

JARDINI, F.A.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Rev. Bras. Cienc. Farmac.**, São Paulo, v.43, n.1, p.137-147, 2007.

KHANIZADEH, S.; TSAO, R.; REKIKI, D.; YANG, R.; CHARLES, M.T.; RUPASINGHE, H.P.V. Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. **Journal of food composition and analysis**, v.21, p.396-401, 2008.

KALT, W.; FORNEY, C.F.; MARTIN, A.; PRIOR, R.L. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.47, n.11, p.4638-4644, 1999.

KIM, D.O.; LEE, C.Y. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship, Critical Reviews. **Food Science and Nutrition**, v.44, p.253-273, 2004.

KNEKT, P.; JÄRVINEN, R.; SEPPÄNEN, R.; HELLÖVAARA, M.; TEPPPO, L.; PUKKALA, E.; AROMAA, A. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. **American journal of epidemiology**, v.146, n.3, p.223-230, 1997.

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

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.25, n.4, p.726-732, out./dez., 2005.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; MORALES, M.T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v.36, n.4, jul-ago, 2006.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.).** 2008. 182 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) –

Referências Bibliográficas

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LIMA, A.; SANABRIA, G.G.R.; ANDRADE-WARTA, E.R.A.; BEHRENS, J.H.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da aceitação de arroz com pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Publ. UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng.** Ponta Grossa, v.13, n.3, p.45-51, dez., 2007b.

LIMA, A.; SILVA, A.M.O.; TRINDADE, R.A.; TORRES, R.P.; MANCINI-FILHO, J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v.29, n.3, p.665-668, dez., 2007a.

LIMA, M.M.O.; VIEIRA, L.F.; COSTA JUNIOR, J.S. **Avaliação da atividade antioxidante de *Platonia insignis* Mart. (clusiaceae)**. In: II CONNEPI-Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, João Pessoa, 2007.

LIMA, V.L.A.G.; MÉLO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; SILVA, G.S.B.; LIMA, D.E.S. Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato aquoso de broto de feijão-mungo (*Vigna radiata* L.). **Rev. Nutr.**, Campinas, v.17, n.1, p.53-57, jan./mar., 2004.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, v.1, 2000.

MANZOCCO, L.; CALLIGARIS, S.; MASRROCOLA, D.; NICOLI, M.C.; LERICI, C.R. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, p.340-346, 2001.

MARINOVA, E.M.; YANISHLIEVA, N.V. Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. **Food Chemistry**, v.81, p.189-197, 2003.

MARTINELLO, F. **Avaliação da atividade biológica do extrato hidroalcoólico de *Tamarindus indica* L. sobre o metabolismo lipídico e na carcinogênese coloretal em hamster**. 2006. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

MATSUURA, R.; MORIYAMA, H.; TAKEDA, N.; YAMAMOTO, K.; MORITA, Y.; SHIMAMURA, T.; UKEDA, H. Determination of antioxidant activity and

Referências Bibliográficas

characterization of antioxidant phenolics in the plum vinegar extract of cherry blossom (*Prunus lannesiana*). **J. Agric. Food Chem.**, v.56, n.2, p.544-549, 2008.

MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; ARAÚJO, C.R. Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de polpas congeladas de frutas. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.19, n.1, p.67-72, jan./mar. 2008.

MELO JÚNIOR, A.F.; CARVALHO, D.; PÓVOA, J.S.R.; BEARZOTI, E. Estrutura genética de populações naturais de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Scientia Florestalis**. n.66, p.56-65, dez., 2004.

MIGLIO, C.; CHIAVARO, E.; VISCONTI, A.; FOGLIANO, V.; PELLEGRINI, N. Effects of different cooking methods on nutritional and physicochemical characteristics of selected vegetables. **J. Agric. Food Chem**, v.56, p.139-147, 2008.

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

MIRA, N.V.M.; BARROS, R.M.C.; SCHIOCCHET, M.A.; NOLDIN, J.A.; LANFER-MARQUEZ, U.M. Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza sativa* L.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.28, n.4, out./dez., 2008.

MIRANDA-VILELA, A.L.; RESCK, I.S.; GRISOLIA, C.K. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.4, p.956-963, 2008.

MIRANDA-VILELA, A.L. **Avaliação dos efeitos antigenotóxicos, antioxidantes e farmacológicos de extratos da polpa do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* CAMB).** 2009. Tese (Doutorado em Biologia animal) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

MIRANDA-VILELA, A.L.; PEREIRA, L.C.S.; GONÇALVES, C.A.; GRISOLIA, C.K. Pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory markers and blood pressure of male and female runners. **Nutrition Research**, n.29, p.850-858, 2009.

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

Referências Bibliográficas

MORTON, L.W.; CACCETTA, R.A.; PUDDEY, I.B.; CROFT, K.B. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** v.27, p.152-159, 2000.

NAVES, R.V. **Espécies frutíferas nativas dos cerrados de Goiás: caracterização e influências do clima e dos solos.** 1999. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, p.206, 1999.

NICOLI, M.C.; ANESE, M.; PARPINEL, M. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. **Trends in Food Science & Technology**, v.10, p.94-100, 1999.

OBOH, G. Effect of blanching on the antioxidant properties of some tropical green leafy vegetables. **LWT**, v.38, p.513-517, 2005.

OBOH, G. Antioxidant properties of some commonly consumed and underutilized tropical legumes. **Eur. Food. Res. Technol.**, v.224, p.61-65, 2006.

OLIVEIRA, M.E.B. Características físicas, químicas e compostos bioativos em pequis (*Caryocar coriaceum* Wittm.) nativos da Chapada do Araripe - CE. 2009. Tese (Doutorado em Nutrição). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quim. Nova**, v.32, n.3, p.689-702, 2009.

OLIVEIRA, E.; LONGHI, E.H.; VANDERLEI, J.C.; MARTINS, T.K.; ROCHA, E.V. Caracterização do mercado consumidor do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) em Goiânia - GO. In: XLVI Congresso da sociedade brasileira de economia, administração e sociologia rural, 2008, Rio Branco. **Anais...** Rio Branco, 2008.

OLIVEIRA, J.T.G.S.B. **Melhor dose e dose econômica de TBHQ nos óleos de milho e canola.** 2003. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, junho, 2003.

OLIVEIRA, P.M.C; VILAS BOAS, E.V.B. Caracterização bioquímica da conserva de pequi durante armazenamento. **Revista Bionorte e Anais do Fórum Bionorte Montes Claros**, v.1, n.1, 2009. Montes Claros como palco da discussão científica nacional, 2009.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO (FAO). **More fruit and vegetables.** Disponível em:

Referências Bibliográficas

<http://www.fao.org/ag/magazine/0606sp2.htm>. Published: July 2006. Acesso em: 15 set. 2009.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC[®]) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p.3122-3128, 2002.

PADDA, M.S.; PICHA, D.H. Methodology optimization for quantification of total phenolics and individual phenolic acids in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) Roots. **Journal of Food Science**, v.72, n.7, 2007.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: a review. **LWT**, v.40, p.1-11, 2007.

PORTER, W. L. Paradoxical Behavior of antioxidants in food and biological systems. **Toxicology and Industrial Health**, Horsham, v.9, n.1-2, p.93-122, 1993.

PORTO, C.S.; MELO, G.A.; OLIVEIRA, D.A.; NOBRE, S.A.M.; PRATA, E.R.B.A. Potencial antioxidante de extratos de frutos e folhas do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). In: XII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal "Desafios para produção de alimentos e bioenergia", 2009, Fortaleza. Disponível em: <http://www.sbfv.org.br/congresso2009/trabalhos/autor/metabolismo/-1078.pdf>. Acesso em: 19 mai. 2010.

PRADO, A.C.P.; ARAGÃO, A.M.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]. **Braz. J. Food Technol.**, v.12, n.4, p.323-332, out./dez., 2009.

PRIOR, R.L.; CAO, G. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: a review. **Journal of AOAC International**, v.83, n.4, 2000.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **J. Agric. Food Chem.**, v.48, p.3396-3402, 2000.

RAMOS, K.M.C.; SOUZA, V.A.B.; GOMES, S.O. Características físicas de frutos de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) nos estados do Maranhão e Piauí. In: XX Congresso Brasileiro de fruticultura; 54th Annual meeting of the interamerican society for tropical horticulture, 2008, Vitória. **Anais...** Vitória: Centro de Convenções, 12 a 17 de Outubro, 2008.

Referências Bibliográficas

- RAMOS, M.I.L.; UMAKI, M.C.S.; HIANE, P.A.; RAMOS FILHO, M.M. Efeito do cozimento convencional sobre os carotenóides pró-vitamínicos "A" da polpa do piqui (*Caryocar brasiliense* Camb). **B.CEPPA**, Curitiba, v.19, n.1, jan./jun., 2001.
- RIBEIRO, R.F. **Pequi, o rei do cerrado**: roendo o fruto sertanejo por todos os lados. Belo Horizonte: Rede Cerrado/REDE/CAANM/Campo Vale, p.62, 2000.
- RICKMAN, J.C.; BARRETT, D.M.; BRUHN, C.M. Nutritional comparison of fresh, frozen and canned fruits and vegetables. Review: Part 1. Vitamins C and B and phenolic compounds. **J. Sci. Food Agric.**, v.87, p.930-944, 2007.
- ROCHA-GUZMÁN, N.E.; GALLEGOS-INFANTE, J.A.; GONZÁLEZ-LAREDO, R.F.; REYNOSO-CAMACHO, R.; RAMOS-GÓMEZ, M.; GARCIA-GASCA, T.; RODRÍGUEZ-MUÑOZ, M.E.; GUZMÁN-MALDONADO, S.H.; MEDINA-TORRES, L.; LUJAN-GARCÍA, B.A. Antioxidant activity and genotoxic effect on HeLa cells of phenolic compounds from infusions of *Quercus resinosa* leaves. **Food Chemistry**, v.115, p.1320-1325, 2009.
- ROCKENBACH, I.I.; SILVA, G.L.; RODRIGUES, E.; GONZAGA, L.V.; FETT, R. Atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva das variedades Regente e Pinot Noir (*Vitis vinifera*). **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.66, n.2, p.158-163, 2007.
- RODRIGUES, L.J.; VILAS BOAS, E.V.B.; PICCOLI, R.H.; PAULA, N.R.F.; PINTO, D.M.; VILAS BOAS, B.M. Efeito do tipo de corte e sanificantes no amaciamento de pequi (*Caryocar brasiliense* camb.) minimamente processado. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.31, n.6, p.1793-1799, nov./dez., 2007.
- ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; BARATA, R.H.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do Cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.53-60, 2007.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v.92, p.235-254, 2005.
- RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. Comunicado técnico 128. **Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS**. Embrapa, p.1679-6535, Fortaleza, Julho, 2007.

Referências Bibliográficas

- RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v.121, p.996-1002, 2010.
- SALINAS, R.D. **Alimentos e Nutrição**: Introdução à Bromatologia. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v.8, n.3, p.121-137, 2002.
- SARIKURKCU, C.; TEPE, B.; DAFERERA, D.; OLISSIOU, M.; HARMANDAR, M. Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum* subsp. *globosum* (lamiaceae) by three different chemical assays. **Bioresource Technology**. v.5, out., 2007.
- SHAHIDI, F. Nutraceuticals and functional foods: whole versus processed foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.20, p.376-387, 2009.
- SHAHIDI, F.; ALASALVAR, C.; LIYANA-PATHIRANA, C.M. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.4, p.1212-1220, 2007.
- SIKORA, E.; CIEŚLIK, E.; LESZCZYŃSKA, T.; FILIPIAK-FLORKIEWICZ, A.; PISULEWSKI, P.M. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. **Food Chemistry**, v.107, p.55-59, 2008.
- SILVA, D.B.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SILVA, J.A.; PEREIRA, A.V.; SALVIANO, A.; JUNQUEIRA, G.D. Avaliação do potencial de produção do "pequizeiro-anão" sob condições naturais na região sul do estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v.23, n.3, dez., 2001.
- SILVA, A.M.O. **Efeito dos compostos fenólicos presentes no alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre as enzimas antioxidantes e os parâmetros bioquímicos do sangue de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- SILVA, M.N.S.; JESUS, D.M. Territorialidades do pequi: Montes Claros e o norte de Minas Gerais em questão. In: COLÓQUIO INTERNACIONAL: (des)envolvimentos contra a pobreza: mediações teóricas, técnicas e políticas, 2008, Montes Claros. **Anais...** Montes Claros: 21 a 23 de agosto, 2008.

Referências Bibliográficas

SIMÕES, M.O.M. **Avaliação das características organolépticas e microbiológicas de diversos tipos de conserva da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) e diferentes formas de congelamento dos putâmens.** 2007. Projeto: Edital Universal. Disponível em: <http://revista.fapemig.br/materia.php?id=326>. Acesso em: 02 fev. 2008.

SINGH, S.; SINGH, R.P. *In vitro* methods of assay of antioxidants: An overview. **Food Reviews International**, v.24, p.392-415, 2008.

SOARES, D.G.; ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR, M. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol and vitamins C and E against ABTS[•], DPPH[•] and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.10, p.1077-1080, 2003.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.15, n.1, p.71-81, jan./abr., 2002.

SOBRATTEÉ, M.A.; NEERGHEEN, V.S.; LUXIMON-RAMMAA, A.; ARUOMAB, O.I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research**, v.579, p.200-213, 2005.

SOUZA, E.C.; VILAS BOAS, E.V.B.; VILAS BOAS, B.M.; RODRIGUES, L.J.; PAULA, N.R.F. Qualidade e vida útil de pequi minimamente processado armazenado sob atmosfera modificada. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.31, n.6, p.1811-1817, nov./dez., 2007.

SOUZA, I.; SALVIANO, A. **Fruticultura - A Cultura do Pequi (*Caryocar brasiliense*)**. EMATER-MG. Informação Tecnológica, Mai; 2002. Disponível em: http://www.emater.mg.gov.br/site_emater/Serv_Prod/Livraria/Fruticul. Acesso em: 25 jan. 2008.

SOUZA, O.A.; NASCIMENTO, J.L.; NAVES, R.V.; BORGES, J.D. Propagação sexuada de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.): efeito da procedência de frutos e do ácido giberélico na emergência de plântulas. **Pesq. Agropec. Trop.**, v.37, n.3, p.131-136, set., 2007.

SPITELLER, G. Peroxidation of linoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases. **Mechanisms of ageing and development**, v.122, p.617-657, 2001.

Referências Bibliográficas

SULTANA, B.; ANWAR, F.; IQBAL, S. Effect of different cooking methods on the antioxidant activity of some vegetables from Pakistan. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, p.560-567, 2008.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; ASHRAF, M. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. **Molecules**, v.14, p.2167-2180; 2009.

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

SUN, T.; TANUMIHARDJO, S.A. An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. **Journal of food science**, v.72, n.9, 2007.

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

THANE, C.; REDDY, S. Processing of fruit and vegetables: effect on carotenoids. **Nutrition & Food Science**, n.2, p.58-65, mar./apr., 1997.

TORRES DE PINEDO, A.; PEÑALVER, P.; MORALES, J.C. Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: Structure-activity relationship. **Food Chemistry**, v.103, n.1, p.55-61, 2007.

TURKMEN, N.; SARI, F.; VELIOGLU, Y.S. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. **Food Chemistry**, v.93, p.713-718, 2005.

VEDANA, M.I.S. **Efeito do processamento na atividade antioxidante da uva**. 2008. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

VEDANA, M.I.S.; ZIEMER, C.; MIGUEL, O.G.; PORTELLA, A.C.; CANDIDO, L.M.B. Efeito do processamento na atividade antioxidante de uva. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.19, n.2, p.159-165, abr./jun. 2008.

Referências Bibliográficas

VERA, R.; SOUZA, E.R.B.; FERNANDES, E.P.; NAVES, R.V.; SOARES JÚNIOR, M.; CALIARI, M.; XIMENES, P.A. Caracterização física e química de frutos do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) oriundos de duas regiões no estado de Goiás, Brasil. **Pesq. Agropec. Trop.**, v.37, n.2, p.93-99, jun., 2007.

VIDAL, A.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; PAVAN, R.; LIMA, A.; FALLARERO, A.; BATISTA, A.E.; MANCINI-FILHO, J. Actividad antioxidante y polifenoles de las algas marinas *Halimeda opuntia* y *Halimeda monile*. **Ars. Pharm.**, v.50, n.1, p.24-31, 2009.

VIDAL, A.; FALLARERO, A.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; LIMA, A.; TORRES, R.P.; VUORELA, P.; MANCINI-FILHO, J. Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmelin) howe. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v.42, n.4, p.589-600, out./dez., 2006.

YEH, C.; YEN, G. Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression. **J. Nutr.**, v.136, n.1, p.11-15, jan., 2006.

YU, J.O.; LIAO, Z.X.; LEI, J.C.; HU, X.M. Antioxidant and cytotoxic activities of various fractions of ethanol extract of *Dianthus superbus*. **Food Chemistry**, v.104, p.1215-1219, 2007.