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

**Caracterização química, avaliação da atividade
antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos
compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar
brasiliense*, Camb.)**

Alessandro de Lima

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Tit. Jorge Mancini Filho

São Paulo
2008

Alessandro de Lima

**Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro*
e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no
Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.)**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Tit. Jorge Mancini Filho
Orientador/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, __ de _____ de 2008.

Ficha Catalográfica

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

L732c Lima, Alessandro de
Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante
in vitro e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes
no pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) / Alessandro de
Lima. -- São Paulo, 2008.
182p.

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

Orientador: Mancini Filho, Jorge

1. Alimento : Composto fenólico : Ciência dos alimentos
2. Alimentos : Valor nutritivo 3. Bioquímica dos alimentos
- I. T. II. Mancini Filho, Jorge, orientador.

641 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Alessandro de Lima no Programa: Ciência dos Alimentos, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 23 dias do mês de abril de 2008, no(a) FCF - USP - Bloco 13A realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Alessandro de Lima, apresentada para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos - Área: Bromatologia, intitulada:

"Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (Caryocar brasiliense, Camb.)"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Jorge Mancini Filho	Presidente	FCF - USP	Aprovado
Marisa Aparecida Bismara Regitano d'Arce	Titular	ESALQ - USP	Aprovado
Silvia Berlanga de Moraes Barros	Titular	FCF - USP	Aprovado
Roseane Fett	Titular	IAL - Externo	Aprovado
Anna Lucia Casañas Haasis Villavicencio	Suplente	IPEN - Externo	Aprovado
Resultado Final: Aprovado			
Parecer da Comissão Julgadora *			

Comentários da Defesa (opcional)

Eu, Edilson Feitosa dos Santos _____, Técnico Acadêmico, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 23 dias do mês de abril de 2008.

Marisa Aparecida Bismara Regitano d'Arce

Silvia Berlanga de Moraes Barros

Roseane Fett

Anna Lucia Casañas Haasis Villavicencio

Jorge Mancini Filho
Orientador(a)

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Nos termos do artigo 110, do RG-USP, encaminhe-se o presente relatório à CPG, para homologação.

Impresso em: 24/04/2008

A minha mãe (Claudemira) e ao meu pai (José Bento) que, apesar das muitas adversidades, doaram-se de corpo e alma aos filhos, buscando sempre o melhor para nós.

A meus irmãos Raimundo, Francisca e Lúcia, pelo amor que nos une.

Aos meus sobrinhos, que renovam a família e alegria que nos alimenta a vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por estar sempre presente em minha vida, guiando-me e olhando por mim e por toda a minha família.

Ao meu orientador, Prof. Jorge Mancini Filho, por me ter acolhido em seu grupo de pesquisa, pelos tantos ensinamentos técnico-científicos que a mim transmitiu, pelo apoio às novas idéias que surgiram ao longo desse período e pelos aconselhamentos sempre muito prudentes.

Ao Centro Federal de Educação Tecnológica do Piauí (CEFET-PI), por me ter liberado para realizar o programa de Doutorado, em especial aos professores Francisca Barros, Rita de Cássia e Francisco das Chagas Santana, atual Diretor Geral.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), por ter tornado possível a realização desse sonho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Departamento de Alimentos, Nutrição e Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Sevilha (Espanha), por me ter aceitado no estágio de Doutorado Sanduíche, em especial à Profa. Catedrática Ana Maria Troncoso González, pelo acolhimento, sempre de braços abertos, e pelos muitos ensinamentos.

À Doutora Eugênia Kuskoski, cuja ajuda tanto facilitou o período inicial, de acomodação, em Sevilha; e pelas valiosas dicas.

Ao Doutor Wendu Tesfai, pela preciosa colaboração nas análises realizadas no HPLC e pelas agradáveis conversas que, durante minha estada em Sevilha, ajudaram-me a suportar a ausência dos amigos e a distância do Brasil.

À Farmacêutica Bioquímica Rosângela Pavan, responsável pelo laboratório de lípidos, pela colaboração em várias técnicas analíticas e pela convivência, sempre harmoniosa, não obstante diária.

Aos colegas pós-graduandos com quem dividi muitos sonhos e angústias, mas principalmente bons momentos: Aline Cristina, Bárbara Bicalho, Cláudia Passos, Claudimar, Elma Regina, Eliane, Fabiana Araújo, Felipe, Fernanda Jardim, Gerby Giovanna, Liliane, Lurdes Giada e Rogério.

A Ana Mara, pela ajuda valiosa, sem a qual não teria sido possível a realização do experimento biológico.

Aos grandes amigos que conquistei ao longo desse período: Reginaldo Trindade, Acácio Pagan e Artemir Coelho, pela agradável convivência e pelas conversas intermináveis, ainda quando a noite findava. E a Douglas, cuja amizade muito me fez crescer como ser humano.

A Wylla Tatiana: a distância não arrefeceu nosso recíproco carinho.

A Raimundo Nonato Luz, pela amizade, apoio e pela criteriosa correção gramatical deste trabalho.

A Carla Oliveira, pelo valioso auxílio nas análises de carotenóides totais.

Aos Técnicos Rosinha, Alexandre, Lúcia e Ivanir, pela cooperação e por estarem sempre prontos a ajudar.

A Lurdinha e a Joana, pela agradável presença e pelo sempre providencial cafezinho.

A Edílson, Mônica, Tânia e Cleo, secretários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, pelas variadas colaborações.

Enfim, a todos os professores, alunos e funcionários da FCF-USP, que contribuíram para a minha formação e para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	I
LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	VII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	03
2.1 Radicais livres e sua relação com o dano oxidativo	03
2.2 Estresse oxidativo sobre as funções corporais e sua implicação nas doenças.....	05
2.2.1 Doenças cardiovasculares.....	06
2.2.2 Carcinogênese.....	08
2.2.3 Catarata e degeneração macular com a idade.....	09
2.2.4 Doenças neurodegenerativas.....	10
2.3 Antioxidantes alimentares e endógenos no combate aos radicais livres.....	11
2.3.1 Antioxidantes endógenos.....	13
2.3.2 Antioxidantes alimentares.....	20
2.4 Compostos fenólicos como antioxidantes naturais.....	24
2.4.1 Consumo de compostos fenólicos pela população mundial.....	33
2.4.2 Metabolismo dos compostos fenólicos.....	33
2.4.3 Biodisponibilidade dos compostos fenólicos.....	36
2.5 Métodos utilizados na avaliação da atividade antioxidante.....	38
2.5.1 Determinação da oxidação de moléculas.....	39
2.5.2 Determinação da captura de radicais livres.....	40
2.5.3 Método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico.....	40
2.5.4 Método do radical ABTS.....	42
2.5.5 Método do radical DPPH.....	43
2.5.6 Método ORAC.....	45

2.5.7 Método Rancimat.....	47
2.6 O Pequi.....	49
3. OBJETIVOS.....	56
3.1 Objetivo geral.....	56
3.2 Objetivos específicos.....	56
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	57
4.1 Material.....	57
4.1.1 Amostras.....	57
4.1.2 Reagentes empregados nas análises.....	57
4.2 Métodos.....	63
4.2.1 Análise da composição centesimal.....	63
4.2.2 Determinação da composição em ácidos graxos.....	63
4.2.3 Preparação dos extratos fenólicos etéreo, alcoólico e aquoso da polpa e da amêndoa do pequi.....	65
4.2.4 Extração dos ácidos fenólicos	66
4.2.5 Identificação e quantificação dos ácidos fenólicos.....	68
4.2.6 Quantificação dos carotenóides totais.....	70
4.2.7 Quantificação dos fenólicos totais.....	70
4.2.8 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	71
4.2.8.1 Ensaio em sistema β -caroteno ácido/linoléico.....	71
4.2.8.2 Método do radical DPPH.....	74
4.2.8.3 Método da radical ABTS.....	74
4.2.8.4 Ensaio ORAC.....	76
4.2.8.5 Método Rancimat.....	77
4.2.9 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vivo</i>	78
4.2.9.1 Coleta de sangue, fígado e cérebro.....	78
4.2.9.2 Obtenção do plasma.....	80
4.2.9.3 Preparo dos homogenatos dos tecidos cerebral e hepático...	80
4.2.9.4 Medida da lipoperoxidação (TBARS).....	81

4.2.9.5 Determinação das enzimas antioxidantes.....	83
4.2.9.6 Quantificação de proteínas nos tecidos.....	85
4.2.9.7 Determinação do perfil lipídico nos tecidos dos animais.....	86
4.3 Análise estatística.....	88
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
5.1 Composição química.....	89
5.1.1 Caracterização da fração lipídica.....	90
5.1.2 Determinação de fenólicos e carotenóides totais.....	92
5.2 Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	94
5.2.1 Sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	95
5.2.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo Rancimat.....	108
5.2.3 Atividade antioxidante utilizando o radical DPPH.....	113
5.2.4 Atividade antioxidante utilizando o radical ABTS.....	119
5.2.5 Atividade antioxidante pelo método ORAC.....	225
5.2.6 Comparação e correlação da atividade antioxidante entre métodos...	128
5.3 Identificação dos compostos polifenólicos.....	130
5.4 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vivo</i>	138
5.4.1 efeito do extrato aquoso e da fração AFL da polpa do pequi nos biomarcadores do estresse oxidativo nos tecidos dos ratos.....	141
5.4.1.1 Tecido cerebral.....	142
5.4.1.2 Tecido hepático.....	148
5.4.1.3 Plasma.....	154
6. CONCLUSÕES.....	158
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	160
8. ANEXOS.....	179

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		Pág
Figura 1	Estrutura fenólica dos principais antioxidantes sintéticos.....	13
Figura 2	Atividade das enzimas antioxidantes nas células de mamíferos (FANG et al.; 2002).....	18
Figura 3	Fitoquímicos presentes em alimentos vegetais, com a classificação dos compostos polifenólicos (KARAKAYA <i>et al.</i> , 2004).....	25
Figura 4	Estrutura química de alguns flavonóides.....	26
Figura 5	Estrutura química dos principais ácidos fenólicos.....	27
Figura 6	Rota metabólica proposta para os compostos polifenólicos da dieta no organismo humano, extraído de Manach e Donovan, 2004.....	35
Figura 7	Estrutura química do radical DPPH.....	45
Figura 8	Árvore adulta do pequi.....	51
Figura 9	Diversas partes que compõem a polpa e daamêndoa do pequi.....	53
Figura 10	Pequi com espinhos no caroço, extraído de Kerr <i>et al.</i> (2007).....	55
Figura 11	Pequi sem espinhos no caroço, extraído de Kerr <i>et al.</i> (2007).....	55
Esquema 1	Obtenção dos extratos etéreo, alcoólico e aquoso da polpa e amêndoa do pequi, por extração seqüencial, usando solventes de diferentes polaridades, segundo Jardini e Mancini-Filho, 2007.....	66
Figura 12	Curva de calibração de ácido gálico (mg/L).....	71
Figura 13	Curva de decaimento da densidade ótica em sistema de co-oxidação β -caroteno/ ácido linoléico. Adaptado de Jardini e Mancini-Filho 2007.....	73
Figura 14	Curva de calibração-resposta da porcentagem de inibição de trolox em etanol (20 a 50 μ M), frente ao radical ABTS ^{•+}	76
Figura 15	Curva de calibração de 1,1,3,3-tetrametoxipropano.....	82
Figura 16	Curva de calibração de albumina	86
Figura 17	Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso da polpa de pequi no sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	101
Figura 18	Curva cinética do potencial antioxidante do extrato alcoólico da polpa de pequi no sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	102
Figura 19	Curva cinética do potencial antioxidante dos ácidos fenólicos livres da polpa de pequi no sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	102
Figura 20	Curva cinética do potencial antioxidante dos ácidos fenólicos solúveis da polpa de pequi no sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	102

Figura 21	Curva cinética do potencial antioxidante dos ácidos fenólicos insolúveis da polpa de pequi no sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	103
Figura 22	Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso da amêndoa de pequi no sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	103
Figura 23	Curva cinética do potencial antioxidante do extrato alcoólico da amêndoa de pequi no sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	103
Figura 24	Curva cinética do potencial antioxidante dos ácidos fenólicos livres da amêndoa de pequi no sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	104
Figura 25	Curva cinética do potencial antioxidante dos ácidos fenólicos solúveis da amêndoa de pequi no sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	104
Figura 26	Curva cinética do potencial antioxidante dos ácidos fenólicos insolúveis da amêndoa de pequi pelo β -caroteno e ácido linoléico.....	104
Figura 27	Atividade antioxidante pelo método DPPH dos extratos aquoso e alcoólico da polpa de pequi e do padrão BHT.....	116
Figura 28	Atividade antioxidante pelo método DPPH dos extratos aquoso e alcoólico da amêndoa de pequi e do padrão BHT.....	117
Figura 29	Atividade antioxidante pelo método DPPH dos extratos etéreos da polpa e da amêndoa de pequi e do padrão BHT.....	117
Figura 30	Atividade antioxidante pelo método DPPH dos ácidos fenólicos da polpa de pequi e do padrão BHT.....	118
Figura 31	Atividade antioxidante pelo método DPPH dos ácidos fenólicos da amêndoa do pequi e do padrão BHT.....	118
Figura 32	Espectro de absorção UV-visível do radical ABTS ^{•+} gerado a partir de solução de ABTS incubada por 12 horas com persulfato de potássio.....	119
Figura 33	Estabilidade do radical ABTS ^{•+} com o tempo de reação (90 minutos).....	120
Figura 34	Curva cinética da atividade antioxidante de extratos e frações de ácidos fenólicos da polpa de pequi e do padrão trolox.....	123
Figura 35	Curva cinética da atividade antioxidante de extratos e frações de ácidos fenólicos da amêndoa de pequi e do padrão trolox.....	125
Figura 36	Correlação entre as metodologias de atividade antioxidante do β -caroteno ácido linoléico e do radical DPPH para o extrato aquoso da polpa de pequi.	131
Figura 37	Correlação entre as metodologias de atividade antioxidante do β -caroteno/ácido linoléico e do radical DPPH para a fração livre da polpa de pequi.....	131
Figura 38	Cromatograma a 280nm do extrato aquoso de polpa de pequi. 1 = ácido gálico, 2= ácido p-cumárico, 3= ácido elágico.....	132
Figura 39	Cromatograma a 280nm da fração de ácidos fenólicos livres da polpa de	

	pequi. 1 = ácido gálico, 2= ácido p-cumárico, 3= ácido elágico.....	133
Figura 40	Cromatograma a 280nm da fração de ácidos fenólicos insolúveis da polpa de pequi. 1 = ácido gálico, 2= ácido p-hidroxibenzóico, 3= ácido p-cumárico, 3= ácido elágico.....	133
Figura 41	Estrutura química dos ácidos fenólicos presentes na polpa do pequi.....	135
Figura 42	Cromatograma a 280 nm do extrato aquoso da amêndoa do pequi. 1 = ácido gálico, 2 = procianidina B2, 3= ácido p-cumárico, 4= ácido elágico...	137
Figura 43	Estrutura química da procianidina B2.....	138
Figura 44	Curva de crescimento dos animais controle e experimentais tratados com extrato aquoso e fração de ácidos fenólicos livres do pequi.....	140

LISTA DE TABELAS

		Pág
Tabela 1	Estimativa do consumo de compostos fenólicos em vários países.....	33
Tabela 2	Gradiente de eluição das fases móveis ao longo do tempo de análise dos compostos fenólicos do pequi.....	69
Tabela 3	Curva de calibração dos padrões polifenólicos usados na quantificação dos compostos polifenólicos presentes na polpa e da amêndoa do pequi....	69
Tabela 4	Composição centesimal da polpa e da amêndoa do pequi (<i>Cariocar brasiliense</i> , Camb.) em base integral em g/100g de amostra.....	89
Tabela 5	Composição de ácidos graxos da polpa e da amêndoa de pequi (<i>Cariocar brasiliense</i> , camb.).....	92
Tabela 6	Teores de fenólicos totais (expressos em equivalente de ácido gálico) e carotenóides totais na polpa e na amêndoa de pequi (<i>Cariocar brasiliense</i> Camb.) em mg/100g de amostra seca.....	93
Tabela 7	Atividade antioxidante de extratos e frações de ácidos fenólicos da polpa de pequi pelo método do β -caroteno/ácido linoléico.....	98
Tabela 8	Atividade antioxidante de extratos e frações de ácidos fenólicos da amêndoa de pequi pelo método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico.....	100
Tabela 9	Parâmetros cinéticos caracterizando a inibição da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico pelos extratos aquoso, alcoólico e frações de ácidos fenólicos da polpa e da amêndoa do pequi.....	106
Tabela 10	Atividade antioxidante dos extratos e ácidos fenólicos da polpa e amêndoa do pequi e o antioxidante sintético BHT, pelo método Rancimat.....	110
Tabela 11	Intervalos de concentrações utilizados e coeficientes de correlação linear (r^2) obtidos pelos extratos e/ou frações de ácidos fenólicos do pequi, na avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio do radical DPPH [•]	114
Tabela 12	Capacidade antioxidante (EC ₅₀ em μ g/mL) dos extratos e ácidos fenólicos presentes na polpa e na amêndoa do pequi, utilizando o radical livre DPPH [•]	115
Tabela 13	Valor TEAC (Capacidade Antioxidante Total Equivalente ao TROLOX) pelo método ABTS para os extratos e frações de ácidos fenólicos da polpa de pequi, expressos em mM de TROLOX/g de amostra fresca.....	122

Tabela 14	Valor TEAC (Capacidade Antioxidante Total Equivalente ao TROLOX) pelo método ABTS para os extratos e frações de ácidos fenólicos da amêndoa de pequi, expressos em mM de TROLOX/g de amostra fresca.....	124
Tabela 15	Capacidade antioxidante dos extratos aquoso, alcoólico, etéreo e das frações de ácidos fenólicos da polpa de pequi, expressos como valor ORAC em μ moles de equivalente de TROLOX/g de amostra fresca.....	127
Tabela 16	Capacidade antioxidante dos extratos aquoso, alcoólico, etéreo e das frações de ácidos fenólicos da amêndoa de pequi, expressos como Valor ORAC em μ moles de equivalente de TROLOX/g de amostra fresca.....	128
Tabela 17	Identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes no extrato aquoso e nas frações de ácidos fenólicos da polpa do pequi, resultados expressos microgramas por grama de amostra fresca.....	132
Tabela 18.	Identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes no extrato aquoso e nas frações de ácidos fenólicos da amêndoa do pequi, resultados expressos em microgramas por grama de amostra fresca.....	136
Tabela 19.	Ganho de peso, consumo de ração e coeficiente de eficácia alimentar (CEA) dos grupos controle e experimentais tratados com extrato aquoso e ácidos fenólicos livres da polpa de pequi	140
Tabela 20	Peso (g) dos órgãos dos animais dos grupos controle e experimentais G1, G2, G3, G4, tratados com extrato aquoso e ácidos fenólicos livres (AFL) da polpa de pequi.....	141
Tabela 21	Valores de peroxidação lipídica (MDA) no tecido cerebral dos grupos controle e experimentais tratados com extrato aquoso e ácidos fenólicos livres da polpa do pequi.....	144
Tabela 22	Atividade das enzimas antioxidantes Catalase, Glutathione Peroxidase, Glutathione Redutase e Superóxido Dismutase no cérebro dos animais controle e tratados com extrato aquoso e fração de ácidos fenólicos livres da polpa de pequi, expressos em U/min/mg proteína.....	146
Tabela 23	Perfil de ácidos graxos (%) do tecido cerebral de ratos tratados com extrato aquoso e fração de ácidos fenólicos livres da polpa de pequi durante 30 dias.....	147
Tabela 24	Valores de peroxidação lipídica (MDA) no tecido hepático dos grupos controle e experimentais tratados com extrato aquoso e ácidos fenólicos livres da polpa do pequi.....	149
Tabela 25	Atividade das enzimas antioxidantes Catalase, Glutathione Peroxidase, Glutathione Redutase e Superóxido Dismutase no fígado dos animais controle e tratados com extrato aquoso e fração de ácidos fenólicos livres	

	da polpa do pequi expressos em U/min/mg proteína.....	151
Tabela 26	Perfil de ácidos graxos (%) do fígado de ratos tratados com extrato aquoso e fração de ácidos fenólicos livres da polpa de pequi.....	153
Tabela 27	Valores de peroxidação lipídica (MDA) no tecido hepático dos grupos controle e experimentais tratados com extrato aquoso e ácidos fenólicos livres da polpa do pequi.....	155
Tabela 28.	Perfil de ácidos graxos (%) do plasma de ratos tratados com extrato aquoso e fração de ácidos fenólicos livres da polpa de pequi	156

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAPH	2,2-azobis(2-amidinopropano)diidrocloreto
Abs	Absorbância
ABTS^{•+}	Radical 2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
AFI	Ácidos fenólicos insolúveis
AFL	Ácidos fenólicos livres
AFS	Ácidos fenólicos solúveis
AOM	Método oxigênio ativo
AUC	Área sob a curva
BHT	Butil hidroxi tolueno
BHA	Butil hidroxi anisol
BSA	N, O-bis (Trimetilsilil) acetamida
CAT	Catalase
CEA	Coeficiente de eficácia alimentar
CG	Cromatografia a gás
DMAI	Degeneração macular associada à idade
DPPH	Radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazil
EC₅₀	Concentração que inibe 50% da oxidação
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
ESR	Espectrometria de ressonância de spin
F1 e F2	Fatores cinéticos
FL	Fluoresceína
FP	Fator de proteção
GSH	Glutathione reduzida
GSH-Px	Glutathione peroxidase
GSH-R	Glutathione redutase
GSSG	Glutathione oxidada
HDL	Lipoproteína de alta densidade

LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MDA	Malonaldeído
µL	Microlitros
nm	Nanômetros
ORAC	Capacidade de absorção de radicais de oxigênio
PG	Propilgalato
ppm	Parte por milhão
PUFA	Ácidos graxos poliinsaturados
PI	Período de indução
R ou β-PE	R ou β-ficoeritrina
SOD	Superóxido dismutase
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente ao trolox
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
tg	Tangentes
THF	Tetrahidrofurano
TMP	1,1,3,3 –Tetrametoxipropano
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetracromano-2-carboxílico
TBHQ	Tercibutihidroquinona
v.o.	Via oral

RESUMO

O estresse oxidativo produzido no organismo relaciona-se com o aparecimento e/ou desenvolvimento de uma série de doenças crônico-não transmissíveis. Os compostos fenólicos, presentes nos vegetais, são capazes de neutralizar as estruturas radicalares; diminuindo, portanto, o risco de surgimento de patologias a elas associadas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antioxidante do fruto e da amêndoa do pequi e a participação desta atividade na prevenção do processo oxidativo em ratos. Foram obtidos, de forma seqüencial, os extratos etéreo, alcoólico e aquoso, bem como as frações de ácidos fenólicos livres (AFL), esterificadas solúveis (AFS) e insolúveis (AFI) da polpa e da amêndoa do pequi. Todos os extratos e frações foram avaliados quanto à atividade antioxidante *in vitro* pelos ensaios de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico, DPPH (radical 1,1-diphenil-2-picrilhydrazil), ABTS (radical 2,2'azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais Oxigênio) e Rancimat; e apresentaram expressiva atividade antioxidante. Entre os extratos, o aquoso da polpa apresentou maior atividade; entre as frações, a AFL da polpa se destacou nos ensaios β -caroteno/ácido linoléico, DPPH e ABTS. Os extratos e frações foram também avaliados quanto à composição em ácidos fenólicos, por HPLC. Encontraram-se os ácidos elágico, gálico, 4-OH benzóico, p-cumárico e procianidina B₂. O ácido elágico esteve presente em todos os extratos e/ou frações, sempre em maior concentração; a procianidina B₂, apenas no extrato aquoso da amêndoa. Na avaliação da atividade antioxidante *in vivo*, em ratos normais, foi administrado, por gavagem, extrato aquoso (100 e 300 mg/kg v.o.) e AFL (40 e 100 mg/kg v.o.) obtidos da polpa do pequi. Evidenciaram-se redução da lipoperoxidação e elevação da atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR) no cérebro e no fígado dos animais que receberam o extrato aquoso a 300 mg/kg e a fração AFL a 100 mg/kg. Isso demonstra que o pequi possui propriedades antioxidantes tanto *in vitro* como *in vivo*.

Palavras-chave: pequi, compostos fenólicos, antioxidantes, proteção oxidativa, ratos Wistar.

ABSTRACT

The oxidative stress produced in live organisms is related to the appearance and/or development of a series of non-transmissible chronic diseases. Phenolic compounds present in vegetables are able to neutralize these substances, thus reducing the risk of development of free radicals associated to pathologies. The aim of this work was to evaluate the antioxidant activity in the pulp and almond of the pequi fruit and its effects in preventing the oxidative process in rats. Extracts were obtained by means of sequential extraction in which solvents with different polarities (ether, ethanol and water) were used, as well as free phenolic acid fraction (and) soluble esters and insoluble-bound compounds from the pulp and almond of the pequi. The total antioxidant capacity was estimated through the following methods: β -carotene bleaching, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical), ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), oxygen radical absorbance capacity (ORAC), and Rancimat assays. All extracts and fractions of phenolic acids showed a significant antioxidant activity. Among the extracts, the pulp aqueous extract showed higher activities than the others. Free phenolic acids fraction from the pulp of the pequi was better compared to other fractions in β -carotene bleaching, DPPH and ABTS assays. Phenolic acids composition was identified by HPLC. It was found ellagic, gallic, 4-Hydroxybenzoic, p-coumaric and procyanidin B₂ acid being ellagic acid presents at larger amounts in all extracts and fractions, whereas procyanidin B₂ was found only in the aqueous extract of the almond from pequi. For evaluating the antioxidant activity in vivo, aqueous extract (100 and 300 mg/kg b.w.) and free phenolic acids (40 and 100 mg/kg b.w.) obtained from pequi pulp were administered in rats by oral gavage. It was observed a decrease in the levels of lipid peroxidation and an increased activity of antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSHPx), and glutathione reductase (GSSGr) in the brain and liver of animals that received aqueous extract at 300 mg/kg b.w. and free phenolic acids fraction at 100 mg/kg, which demonstrate that pequi fruit has both *in vitro* and *in vivo* antioxidative properties.

Key-words: pequi, phenolic compounds, antioxidants, oxidative processes, Wistar rats.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente os pesquisadores, em todo o mundo, têm repensado a importância da alimentação na manutenção da saúde e na prevenção de doenças. Muitas pesquisas mostram que, além dos nutrientes, existem outros componentes nos alimentos que podem exercer efeitos benéficos ao organismo, como os compostos polifenólicos, que exercem múltiplos efeitos, destacando-se a atividade antioxidante.

Pesquisas epidemiológicas evidenciaram que, a despeito do consumo de alimentos ricos em gorduras e da falta de exercícios físicos regulares, a população francesa apresentava um índice bem menor de doenças cardiovasculares que a maioria da população mundial, fenômeno conhecido como “paradoxo francês” (RENALD *et al.*, 1992). A explicação para tal constatação advém do hábito alimentar dos franceses, mormente pelo consumo de vinho tinto, uma fonte potencial de compostos fenólicos, no qual são encontrados na faixa de 1,4 a 4,0 g/L, expressos como equivalente em ácido gálico (VILLANO *et al.*, 2006).

Os compostos fenólicos são formados no metabolismo secundário dos vegetais, nos quais estão envolvidos em várias funções: propriedades sensoriais (cor, aroma, sabor e adstringência), crescimento, processos germinativos da semente, defesa contra pragas, entre outras. Em animais e humanos, tem-se observado que são capazes de reagir com radicais livres, neutralizando-os. O poder de bloqueio das estruturas radicalares pelos compostos polifenólicos deve-se à estrutura química destes, formada por pelo menos um anel aromático com grupamentos hidroxila (BRAVO, 1998; LIU, 2007).

Além da atividade antioxidante direta, pesquisas recentes têm destacado múltiplas funções e mecanismos importantes relacionados à habilidade dos

compostos fenólicos de se ligarem a receptores celulares e a transportadores de membranas, de influenciarem a expressão gênica, a sinalização e a adesão celular (MANACH, MAZUR e SCALBERT, 2005).

O fruto pequi é um alimento rico em carotenóides (7,25 mg/100 g), principalmente β -caroteno; possui também uma quantidade significativa de vitamina C (78,3 mg/100 g), e cerca de 33% de lipídeos, majoritariamente ácido oléico, que é um ácido graxo insaturado essencial para o organismo animal (ALMEIDA e SILVA,1994; RODRIGUES-AMAYA, 1997). Essas características sugerem que o pequi possua compostos que protegem a fração lipídica da oxidação, além do fato de o pequi ser nativo de regiões de alta incidência de radiação solar, que também promove a formação de radicais livres.

Portanto, a perspectiva de se estudar a atividade antioxidante da polpa e da amêndoa do pequi visa à identificação da presença de compostos com atividade antioxidante, com a perspectiva de uma melhor utilização do pequi, do ponto de vista tecnológico e nutricional, agregando valor ao fruto e aos seus produtos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. RADICAIS LIVRES E SUA RELAÇÃO COM O DANO OXIDATIVO

A respiração é um fenômeno intimamente relacionado com a vida; produz, entretanto, colateralmente, espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres. O termo radical livre é freqüentemente usado para designar qualquer átomo ou molécula contendo um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos, transformando as estruturas em compostos altamente reativos, capazes de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 1999).

A geração de radicais livres constitui uma ação contínua e fisiológica, cumprindo funções biológicas essenciais. São formados em um cenário de reações de óxido-redução, provocando essas reações ou delas resultando. Podem ceder o elétron desemparelhado e serem oxidados ou podem receber outro elétron e serem reduzidos (OKEZIE, 1998). Essas reações ocorrem no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e moléculas de DNA) está relacionado com seu local de formação (MANACH *et al.*, 2004).

As mitocôndrias consomem mais de 90% do oxigênio disponível no organismo, sendo o principal local de formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres. Durante o processo de obtenção de energia, a enzima citocromo oxidase adiciona 4 elétrons à molécula de oxigênio e a reduz a água, seguindo quatro passos seqüenciais, nos quais libera sucessivas

espécies reativas, tais como: o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) (VALCO *et al.*, 2006).

Outra fonte endógena de radicais livres são os fagócitos, que destroem células infectadas por bactérias ou vírus, liberando oxidantes: óxido nítrico, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio etc. Desse modo, os radicais livres também possuem um papel de destaque no organismo, fazendo parte da defesa imune primária (VALCO *et al.*, 2006).

São variadas as causas exógenas que levam à formação de radicais livres: radiação gama, poluentes, praguicidas etc. Uma importante fonte exógena de radicais livres é o fumo. Os óxidos de nitrogênio produzidos durante a combustão do cigarro oxidam macromoléculas biológicas e diminuem o nível de antioxidantes no organismo, o que contribui para o desenvolvimento de doenças associadas ao fumo. Desse modo, o tabagismo é um fator de risco importante no desenvolvimento de enfermidades cardiovasculares e de vários tipos de câncer, destacando-se o câncer de pulmão (ELSAYED, 2001).

As espécies radicalares são altamente reativas e provocam reações em cadeia, como a oxidação lipídica. Quando a geração de radicais livres é maior que a sua degradação pelas defesas antioxidantes, produz-se um desequilíbrio no organismo, denominado estresse oxidativo, que pode levar a danos, dependendo da extensão, da duração e do tipo de oxidante implicado (SIES, STAHL e SELAVANIAN, 2005).

O estresse oxidativo pode ser devido à exposição ambiental aos oxidantes; à ingestão insuficiente de antioxidantes na dieta; à produção

excessiva de radicais livres durante o metabolismo de fármacos ou substâncias tóxicas; à ativação excessiva do sistema celular que produz radicais livres, como os fagócitos, durante o processo inflamatório; ou ainda devido a alterações enzimáticas, resultando em níveis patológicos de danos oxidativos. Há uma forte evidência de que o estresse oxidativo tem um papel importante na patogênese de muitas doenças (HALLIWEL, 1996^b). O dano oxidativo aos lipídeos dos vasos sanguíneos contribui significativamente para o desenvolvimento da aterosclerose; o dano ao DNA contribui para o desenvolvimento do câncer; e o dano a proteínas está associado a enfermidades como a artrite reumatóide, a catarata e o mal de Parkinson, entre outras (BAGGI e PURI, 1998; MANACH *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2008)

2.2. ESTRESSE OXIDATIVO SOBRE AS FUNÇÕES CORPORAIS E SUA IMPLICAÇÃO NAS DOENÇAS

Há comprovações científicas de que a lesão oxidativa a biomoléculas corporais pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) e demais radicais livres está relacionada com mecanismos patológicos e bioquímicos implicados na origem ou no desenvolvimento de certas enfermidades crônicas não transmissíveis. Dessa forma, aumenta o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (como arteriosclerose e infarto do miocárdio), de câncer, de envelhecimento precoce, de enfermidades oculares, dentre outras (DIPLOCK, 1994; HALLIWELL, 1996^b).

Estudos epidemiológicos, clínicos e de intervenção, demonstram, cada vez mais, evidências de que os antioxidantes podem prevenir ou diminuir o desenvolvimento de muitas doenças, como veremos a seguir.

2.2.1. Doenças cardiovasculares

Atualmente, acredita-se que a causa primária da maioria das doenças cardiovasculares é a arteriosclerose, uma afecção, de origem multifatorial, caracterizada pelo aumento da espessura das capas das camadas íntima e média das artérias, com conseqüente perda da elasticidade dos vasos acometidos. A aterosclerose é um tipo de arteriosclerose que se caracteriza pelo aparecimento da chamada placa de ateroma. O desenvolvimento dessa doença e o respectivo dano patológico podem ser encontrados praticamente em cada artéria. O dano clínico mais importante se produz nas artérias coronarianas, cuja oclusão leva ao infarto do miocárdio, que pode ocasionar a morte (HOLLMAN, 2001).

É Cada vez mais evidente que um dos mecanismos essenciais no desenvolvimento da aterosclerose é a oxidação das lipoproteínas do plasma, ricas em colesterol. A oxidação dos lipídios aumenta sua aterogenicidade, facilitando sua penetração na parede arterial. A oxidação das lipoproteínas se deve principalmente à reação de peroxidação lipídica iniciada pelos radicais livres (BERLINEY e HEINECKE, 1996).

Os principais fatores de risco para a aterosclerose são: elevados níveis de colesterol total e de colesterol de baixa densidade, de triglicerídeos e de apolipoproteínas B e C-III, além de reduzidos níveis de colesterol de alta densidade e de apolipoproteína A-I. Há muito se sabe que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) intervêm primordialmente nesse fenômeno. Recentemente, contudo, tem-se visto que também a oxidação das lipoproteínas de alta densidade (HDL), das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e

dos quilomicrons influencia no desenvolvimento da enfermidade (HERTOG *et al.*, 1995; TIWARI, 2004).

Nas fases iniciais da aterosclerose, os depósitos de gordura se formam no espaço subendotelial; posteriormente afetam também a camada íntima e, depois, a camada média. A forma e o conteúdo das lesões avançadas de aterosclerose (placa de ateroma) mostram o resultado de três processos fisiológicos fundamentais (HERTOG *et al.*, 1995):

- a) Acumulação de células musculares lisas na camada íntima das artérias, junto com um número variável de macrófagos e linfócitos T.
- b) Formação, por proliferação das células musculares lisas, de grande quantidade de matriz de tecido conjuntivo, que inclui colágeno, fibras elásticas e proteoglicanos.
- c) Acumulação de lipídeos, principalmente na forma de colesterol livre, dentro das células e ao redor do tecido conectivo.

O crescimento progressivo da placa de ateroma pode provocar obstrução da luz arterial, com conseqüente redução do fluxo sanguíneo; podendo, a níveis críticos, produzir isquemia. É um processo lento, em cujo desenvolvimento não se apresentam sintomas clínicos.

Alguns estudos mostram uma associação inversa entre o consumo de vinho e o desenvolvimento dessa patologia. Esse efeito cardioprotetor se deve principalmente aos compostos fenólicos presentes no vinho. Auger *et al.* (2002) constataram que os compostos fenólicos do vinho foram capazes de reduzir a concentração plasmática de colesterol, triglicérides e apolipoproteína B, com conseqüente redução da espessura lipídica da aorta de hamsters. Também

observaram que o etanol presente no vinho aumentou ligeiramente a atividade biológica dos compostos fenólicos em relação a quando estavam dissolvidos em água.

Céspedes *et al.* (2008) demonstraram um efeito cardioprotetor dos compostos fenólicos presentes na amora silvestre (*Aristotelia chilensis* L.). Administrando extrato metanólico (100 ppm/kg) a ratos que sofreram processo de isquemia-reperfusão, observaram uma diminuição na lipoperoxidação no coração dos animais tratados, pela redução significativa na produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

2.2.2. Carcinogênese

Acredita-se que as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio estão relacionadas à gênese de tumores em diferentes níveis, podendo promover o desenvolvimento do câncer por vários mecanismos: alteração na proliferação celular; diminuição da afinidade da enzima polimerase; inativação de enzimas responsáveis pela degradação de carcinógenos potentes; união de produtos finais da peroxidação lipídica à molécula de DNA, criando lesões mutagênicas; e ataque direto ao DNA (HALLIWEL, 1996^a; BAGHI *et al.*, 2000). Têm sido encontradas bases de DNA modificadas (por exemplo: hidroxitimidina e hidroxiguanina) depois da exposição de células a situações de estresse oxidativo. A modificação nas bases do DNA pode ter como resultado mutações, deleções ou amplificações do material genético como primeiros passos para a carcinogênese (DIPLOCK *et al.*, 1998; TIWARI, 2004; MIN e EBELER, 2008).

Os antioxidantes ingeridos na dieta (como as vitaminas C e E, os carotenóides e os compostos fenólicos) podem impedir a carcinogênese pela

sua atividade seqüestradora de radicais livres ou por sua interferência nos sítios de união dos carcinógenos ao DNA. Vários estudos epidemiológicos e clínicos descrevem o efeito benéfico do consumo de frutas e verduras ricas em compostos fenólicos na redução do risco de vários tipos de câncer (HERTOG *et al.*, 1995; PARK *et al.*, 2003; VALKO *et al.*, 2006).

Park *et al.* (2003) observaram que a suplementação com suco de uva reduziu a lesão oxidativa do DNA de linfócitos. Bacghi *et al.* (2000) descrevem os mecanismos de proteção contra o câncer das proantocianidinas da uva como: seqüestradoras de radicais livres, além das atividades antiendonucleolítica, antiinibidora do citocromo P450, antinecrótica e antiapoptótica.

Delmas *et al.* (2000) observaram *in vitro* um efeito antiproliferativo do resveratrol em várias linhagens celulares derivadas de tumores, ao que atribui seu papel de agente preventivo em vários tipos de câncer. O resveratrol interage com os mecanismos de sinalização que contribuem para a proliferação de células do adenocarcinoma gástrico, inibindo o desenvolvimento do câncer gástrico. Também induz o processo apoptótico em linhagens de células de câncer de cólon SW 480. E pode ser especialmente adequado na prevenção do câncer de próstata, devido a sua habilidade de inibir o processo carcinogênico (antiiniciação, antipromoção e antiprogessão) (STEWART *et al.*, 2003).

2.2.3. Catarata e degeneração macular associada à idade (DMAI)

A catarata senil se deve à opacidade do cristalino. As proteínas do cristalino são de vida extremamente longa e sofrem pequenos efeitos do

estresse oxidativo, já que estão sujeitas à exposição crônica à luz e ao O₂, os quais são responsáveis pela formação das EROs. Se as proteínas são lesadas, podem-se agregar e precipitar, de forma que perdem sua função normal (TAYLOR, 1993).

A degeneração macular associada à idade (DMAI), principal causa de enfermidade ocular nos países ocidentais, afeta a região anatômica de maior grau de atividade visual da retina. O pigmento macular representa um filtro de cor através do qual a luz deve passar. Os carotenóides luteína e zeaxantina são os pigmentos predominantes nessa região. A função do pigmento macular ainda não foi totalmente elucidada; talvez proteja contra a fotooxidação induzida pela luz, mediada por moléculas de oxigênio em estado singlete ou por superóxido (LANDRUM *et al.*, 1997).

Estudos de suplementação apóiam a hipótese de que uma alta ingestão de vitaminas C (500 mg) e E (400 UI) previne ou diminui o risco de desenvolvimento da catarata (JAMPOL e FERRIS, 2001).

Os carotenóides são os compostos naturais que mais eficientemente combatem o oxigênio singlete. Estudos mostram que o consumo de alimentos ricos em carotenóides (15 mg) está associado com a diminuição do risco de DMAI (JAMPOL e FERRIS, 2001).

2.2.4. Doenças neurodegenerativas

Alguns estudos mostram que o estresse oxidativo possui um papel importante no surgimento e no desenvolvimento da degeneração neurológica, processo relacionado com doenças como o mal de Parkinson, a esclerose amiotrófica lateral e o mal de Alzheimer (SIMONIAN e CYLE, 1996).

As EROs são capazes de induzir tanto a necrose como a apoptose celular, entretanto não parecem ser importantes intermediários da morte neuronal sob condições patológicas. A ruptura das membranas celulares na lipoperoxidação faz com que ocorra uma mudança no gradiente dos íons dos diferentes compartimentos celulares. Já foi demonstrado, em cultura de células, que os neurônios podem sofrer morte celular necrótica após se degradar toda a glutathione (GSH) intracelular, o principal antioxidante endógeno (LEWERENZ *et al.*, 2003).

2.3. ANTIOXIDANTES ALIMENTARES E ENDÓGENOS NO COMBATE AOS RADICAIS LIVRES

Um antioxidante pode ser definido como uma substância que, em baixas concentrações, retarda ou previne a oxidação do substrato (HALLIWEL, 1995). Quando o mecanismo de ação do antioxidante for através de sua reação com o radical livre, o novo radical formado deve ser estável e incapaz de propagar a reação (SHAHIDI *et al.*, 1992).

As características de um bom antioxidante são: presença de substituintes doadores de elétrons ou de hidrogênio ao radical, em função de seu potencial de redução; capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura; capacidade de quelar metais de transição implicados no processo oxidativo; e acesso ao local de ação, dependendo de sua hidrofília ou lipofília e de seu coeficiente de partição (MANACH *et al.*, 2004).

Quanto ao mecanismo de combate aos radicais livres, os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários.

Os antioxidantes primários atuam como doadores de prótons, impedindo o processo de iniciação desencadeado pelos radicais livres. Nesta classe de antioxidantes são encontrados os compostos fenólicos, tocoferol, aminoácidos, carotenóides e os antioxidantes sintéticos (BRAVO, 1998).

Os antioxidantes secundários atuam no bloqueio da decomposição dos peróxidos e hidroperóxidos, convertendo-os na forma inativa, por ação de agentes redutores, bloqueando a reação em cadeia através da captação de intermediários reativos, como os radicais peroxila e alcooxila. Nesta classe estão os antioxidantes sintéticos, os compostos fenólicos e as vitaminas A, C e E (DONNELLI e ROBINSON, 1995).

Outra classificação divide os antioxidantes em sintéticos e naturais.

Os sintéticos são comumente usados na indústria alimentícia, para aumentar a vida de prateleira de alimentos lipídicos ou que contenham lipídeos em sua composição. São exemplos de antioxidantes sintéticos: o butilhidroxitolueno (BHT), o butilhidroxianisol (BHA), o propilgalato (PG) e o terciobutilhidroxinona (TBHQ) (BARREIROS e DAVID, 2006). As estruturas químicas desses compostos estão apresentadas na figura 1.

Figura 1. Estrutura fenólica dos principais antioxidantes sintéticos

O consumo desses compostos tem sido associado ao desenvolvimento, em ratos, de alguns tipos de câncer, como os de próstata, mama e estômago (GUNDUC e EL, 2003; SVILAAS *et al.*, 2004) Isso tem levado a indústria de alimentos a reduzir seu uso, e a uma tendência de substituição, ainda que parcial, por antioxidantes naturais. Existem fórmulas, já comercializadas, para adição em alimentos, elaboradas a partir de substratos com alto potencial antioxidante, como os extratos de alecrim e orégano (TRINDADE, 2007).

2.3.1. Antioxidantes endógenos

As células possuem vários mecanismos de defesa contra os radicais livres; são os antioxidantes endógenos, que combatem as espécies radicalares. Podem ser classificados em primários (ou preventivos), secundários e terciários, conforme o modo de ação.

1. Antioxidantes primários ou preventivos:

Previnem a formação de radicais livres através da quelação dos íons metálicos implicados nos processos oxidativos. São as proteínas transportadoras de íons: ceruloplasmina, melationeína e albumina (Cu^+); transferrina (Fe^{2+}) e ferritina (Fe^{3+}) (FREI, 1999).

2. Antioxidantes secundários

Eliminam os radicais livres formados antes que participem de reações em cadeia, que aumentam o dano oxidativo e levam a nova formação de radicais livres (DIPLOCK *et al.*, 1998). São de dois tipos: enzimas antioxidantes e compostos de baixo peso molecular.

A) Enzimas antioxidantes: Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutational Peroxidase (Gpx) e Glutational Redutase (GR).

Superóxido Dismutase (SOD)

É também conhecida como eritrocupreína ou indofenoloxidase (GUTTERIDGE *et al.*, 2000). A concentração da SOD celular varia de 10^{-6} a 10^{-5} M. Nas mitocôndrias se encontra ligada, em seu sítio ativo, ao magnésio (MnSOD); no citosol celular, possui cobre e zinco em seu sítio ativo (CuZnSOD) (HALIWELL, 1996^b; QIN *et al.*, 2008). A função catalítica dessa enzima foi descoberta por McCord e Fridovitch, em 1969: transforma o radical superóxido em peróxido de hidrogênio, conforme a reação a seguir:

Wang *et al.* (2005) referem em seu trabalho que a SOD remove o oxigênio singlete, assim como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), prevenindo a formação de $OH^{\bullet}$ e constituindo-se numa barreira essencial contra a potencial toxicidade do oxigênio.

A degradação do superóxido é assegurada pela enzima superóxido dismutase, enquanto que os hidroperóxidos são destruídos pela catalase, pela glutathione peroxidase ou pela ascorbato peroxidase (KIN *et al.*, 2008).

Catalase (CAT)

A Catalase é uma das enzimas mais abundantes na natureza, encontrando-se amplamente distribuída no organismo humano, nas mitocôndrias e nos peroxissomos; salvo nos eritrócitos, onde é encontrada no citoplasma. Sua atividade varia de acordo com o órgão ou tecido em que se localize, sendo mais elevada no fígado e nos rins; mais baixa, nos tecidos conjuntivo e epitelial. Possui alta capacidade de reação e apresenta duas funções: catalítica e peroxidativa.

Contém um grupo porfirina de alto peso molecular e degrada o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em alta concentração, catalisando a dismutação de dois elétrons em oxigênio e água. Desempenha um papel importante na eliminação do H_2O_2 gerado pelas oxidases na β -oxidação dos ácidos graxos. Apresenta baixa afinidade pelo substrato, portanto resulta crucial quando o H_2O_2 se encontra em altas concentrações. (CHAUDIÈRE e FERRARI-ILIOU, 1999):

Como via alternativa, a CAT pode agir como peroxidase, numa concentração baixa de peróxido de hidrogênio, usando co-substratos redutores, tais como ácido ascórbico e fenóis:

A catalase, a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase são consideradas as defesas antioxidantes endógenas mais importantes do organismo no combate à produção dos radicais livres e na degradação destas. A forma de atuação dessas enzimas pode ser vista na figura 2.

Glutathione Peroxidase (Gpx)

A Gpx é uma selenoenzima localizada primariamente no citosol e na matriz mitocondrial. É reconhecida como o principal sistema protetor contra a peroxidação lipídica induzida endógena e exogenamente. Catalisa a redução de hidroperóxido e de peróxido de hidrogênio à custa de glutathione (GSH), ou seja, pode ser responsável pela captação de água, catalisando a peroxidação da GSH, resultando como produto a glutathione na forma dissulfeto oxidada (GSSG) (WANG *et al.*, 2005; CHAUDIÈRE e FERRARI-ILIOU, 1999).

Ou

Glutathione Redutase (GR)

A GR catalisa a redução da GSSG para a forma tiol da glutathione (GSH). E as células utilizam a GSH na redução do H_2O_2 e de outros substratos oxidantes num ciclo catalítico acoplado a NADPH, como se vê a seguir:

A atividade das enzimas antioxidantes depende do equilíbrio entre fatores que levam a sua ativação ou inativação, de forma que a indução das enzimas antioxidantes representaria um fator protetor contra a geração de radicais livres. Assim sendo, o aumento da expressão de algumas dessas enzimas, que atuam de forma coordenada entre si, estaria relacionado com o mecanismo benéfico de proteção antioxidante (ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001).

Alguns trabalhos relatam baixa atividade dessas enzimas em doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como aterosclerose, diabetes, neoplasias e doenças neurológicas associadas ao envelhecimento (KESAVULU *et al.*, 2001).

Estudos recentes correlacionam positivamente a elevação da atividade dessas enzimas ao consumo de especiarias, frutas e outros vegetais com potencial antioxidante (WANG *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2008; CÉSPEDES *et al.*, 2008).

Figura 2. Atividade das enzimas antioxidantes nas células de mamíferos (Fang *et al.*, 2002)

B) Compostos de baixo peso molecular: glutathione, ácido úrico, bilirrubina, ubiquinona, albumina.

A glutathione (δ -glutamil-cisteinil-glicina, GSH) é um tripeptídeo, o tiol não protéico mais abundante nas células dos mamíferos. Pode ser encontrada em muitos tecidos, compartimentos celulares e subcelulares. Protege contra o dano oxidativo por meio de distintos mecanismos: reagindo com os radicais livres; restaurando moléculas lesadas, cedendo-lhes hidrogênio; estabilizando a estrutura das membranas, pela eliminação dos peróxidos formados; mantendo os grupos tiois das proteínas em sua forma reduzida. O envelhecimento está associado à diminuição de glutathione intracelular, o que

permite que os neurônios sofram ataque dos radicais livres (CHADIÉRE e FERRARI-LLIOU, 1999).

Também atua como substrato ou cofator de diversas enzimas protetoras, como a GPx e a glutathione transferase. Além disso, a GSH atua como agente redutor, reciclando o ácido ascórbico de sua forma oxidada a sua forma reduzida, reação essa mediada pela enzima desidroascorbato redutase (ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001).

A glutathione da dieta é parcialmente absorvida pelo intestino delgado, mas também pode ser sintetizada internamente, de modo que pode ser considerada tanto um antioxidante endógeno quanto exógeno.

O ácido úrico, produto final do metabolismo das purinas, atua como antioxidante hidrossolúvel. Pode unir-se a íons metálicos, como cobre e ferro, e capturar espécies como o oxigênio singlete, HOCl e radicais peroxila (MURAOKA e MIURA, 2003).

A bilirrubina é um pigmento biliar produzido pelo catabolismo do grupo heme. É transportada ligada à albumina. Atua protegendo a peroxidação dos ácidos graxos ligados à albumina.

A ubiquinona (coenzima Q), encontrada nas membranas mitocondriais, transporta elétrons ao interior da mitocôndria. Sua forma reduzida, o ubiquinol, é um antioxidante efetivo em membranas extramitocondriais (CADENAS *et al.*, 1999).

A albumina une-se a íons metálicos, prevenindo o dano oxidativo em estruturas plasmáticas, como as membranas dos eritrócitos, e na fração LDL colesterol. Além disso, é um potente captador de hipoclorito (HOCl) plasmático (HALLIWEL e GUTERIDGE, 1990).

Como uma resposta fisiológica a situações de estresse oxidativo, observa-se que o organismo animal aumenta o nível dos antioxidantes endógenos: ácido úrico, glutatona e enzimas antioxidantes (BENZIE *et al.*, 2003).

3. Antioxidantes terciários

Reparam ou eliminam as estruturas celulares lesadas. Como exemplo, citam-se as enzimas de reparação do DNA, já que muitas das modificações nas bases do DNA têm sua origem no estresse oxidativo. São enzimas de reparo por excisão de bases e de nucleotídeos: DNA glicosilases, endonuclease, ligases (TUDEK, 2003).

2.3.2. Antioxidantes Alimentares

A hipótese de a dieta afetar o dano oxidativo *in vivo* se fundamenta em que os alimentos proporcionam tanto substâncias antioxidantes, nutrientes ou não nutrientes, com capacidade para combater os radicais livres, como substratos oxidáveis (ácidos graxos poliinsaturados - PUFA) e traços de metais com ação catalítica (Fe^{2+} , Cu^{+}). Dessa forma, os alimentos podem exercer tanto efeitos positivos quanto negativos no equilíbrio entre o dano oxidativo e as defesas frente ao dano (MANACH *et al.*, 2004; GIADA e MANCINI-FILHO, 2006).

O balanço antioxidante do organismo pode, portanto, ser alterado pelos componentes da dieta, aumentando o consumo de alimentos ricos em substâncias antioxidantes ou diminuindo o consumo de alguns constituintes suscetíveis de serem oxidados. Essa hipótese mostra-se muito simples diante da complexidade de funcionamento do organismo humano. Além do mais, existem algumas lacunas com relação aos antioxidantes, tais como: a inexistência de uma recomendação para cada antioxidante; a falta de padronização quanto ao real valor antioxidante dos alimentos; e os possíveis efeitos tóxicos da administração de elevadas doses de antioxidantes.

Os diferentes compostos antioxidantes da dieta podem produzir efeitos sinérgicos difíceis de serem avaliados. A dieta deve ser considerada de forma complexa, onde as interações entre os constituintes podem produzir efeitos que não representam necessariamente as propriedades dos constituintes individuais. A atividade antioxidante de qualquer alimento nos dará uma idéia da contribuição relativa da soma dos seus constituintes antioxidantes, proporcionando uma informação valiosa, que vai além de sua composição química (RICE-EVANS, 1999).

Os carotenóides e as vitaminas E e C estão entre os nutrientes da dieta com reconhecida propriedade antioxidante; entre os não nutrientes, citam-se os compostos polifenólicos.

2.3.2.1. Vitamina C (ácido ascórbico)

O ácido ascórbico é considerado um dos mais potentes e o menos tóxicos dos antioxidantes naturais. É solúvel em água, sendo encontrado em elevadas concentrações em muitos tecidos. Cada litro de plasma contém, em

média, 60 μmol de ácido ascórbico. Reage com as EROs, oxidando-se a desidroascórbico, e volta a se converter em ácido ascórbico pela ação da enzima dehidroascorbato redutase. É um seqüestrador muito eficaz de radicais, tais como: o ânion superóxido, o radical hidroxila, o peróxido de hidrogênio e o oxigênio singlete. Em soluções aquosas, também combate eficientemente espécies reativas de nitrogênio, impedindo a nitrosação de moléculas (WEBER *et al.*, 1996).

O ácido ascórbico também pode atuar *in vivo* como pró-oxidante. Na presença de metais com mais de um estado de valência, como o Fe^{2+} e o Cu^+ , os radicais ascorbato e hidroxila podem ser gerados, iniciando o processo de peroxidação lipídica. A quantidade de metais de transição livre *in vivo* é, entretanto, muito baixa, pois normalmente se encontram eficazmente ligados a proteínas de transporte (PODSEDEK, 2007).

Entre as principais fontes de vitamina C, citam-se: frutos cítricos, acerola, goiaba, kiwi. É encontrada também em algumas hortaliças: brócolis, couve de bruxelas, tomate, pimentão etc. (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos / NEPA-UNICAMP, 2006).

2.3.2.2. Vitamina E

Encontrada no fígado, nos rins e no tecido adiposo, seu nível plasmático é de 22 $\mu\text{mol/L}$, em média. Compreende todos os derivados tocoferóis e tocotrienóis que exibem propriedades biológicas de α -tocoferol. São compostos altamente lipofílicos e atuam nas LDLs. Sua função antioxidante consiste em inibir a peroxidação lipídica, combatendo os radicais peroxila e convertendo-se em um radical tocoferol, que regenera α -tocoferol ao reagir com a vitamina C. É

o antioxidante mais efetivo na fase lipídica, além de atuar sobre o oxigênio singlete e o peroxinitrito (SERRACARBASSA, 2006).

Na dieta, as principais fontes de vitamina E são os azeites vegetais, o leite e seus derivados. Também pode ser encontrada no gérmen de trigo, nas nozes e nas folhas de vegetais verdes (SIES e STAHL, 1995).

2.3.2.3. Carotenóides

São pigmentos naturais que possuem um papel muito importante na fisiologia dos vegetais; conferindo-lhes cor e participando da fotossíntese, conjuntamente com a clorofila. Muitos dos carotenóides presentes nos vegetais apresentam atividade de pró-vitamina A e atividade antioxidante (RODRIGUES-AMAYA e KIMURA, 2004).

Podem capturar eficientemente radicais de oxigênio singlete e radicais peroxila. São os mais eficientes inativadores naturais do oxigênio singlete, atuando de duas formas diferentes: uma via física, que ocorre pela transferência de energia das moléculas de oxigênio singlete aos carotenóides; e uma via química, que constitui não mais que 0,5% do total da inativação do oxigênio singlete. Seqüestram radicais peroxila por interação química. Semelhante à vitamina E, os carotenóides possuem caráter lipofílico, atuando como antioxidante sobre as lipoproteínas LDL e HDL. São consumidos quando as LDLs se expõem a processos de oxidação lipídica (PODSEDEK, 2007).

Já foram identificados mais de 600 carotenóides estruturalmente diferentes, 50 dos quais são encontrados na dieta humana. Os carotenóides estão presentes em frutas e verduras. Algumas das principais fontes são: cenoura, tomate, frutos cítricos, espinafre e milho (SIES e STAHL, 1995).

Abundantes fontes de β -caroteno são as frutas amarelas (laranja, manga, mamão) e verduras (cenoura, batata doce e folhas de espinafre).

Vários fatores influem na biodisponibilidade dos carotenóides dos alimentos, como, por exemplo, a sua ingestão associada a gordura e fibra alimentar. Além disso, a cocção e o processamento dos alimentos afetam a estabilidade dos carotenóides (RODRIGUES-AMAYA, 1997).

2.4. COMPOSTOS FENÓLICOS COMO ANTIOXIDANTES NATURAIS

Os compostos fenólicos compõem a grande classe dos fitoquímicos alimentares. Sua fórmula química contém pelo menos um anel aromático, ao qual está unida uma (ou mais) hidroxila(s). Existe uma grande variedade de compostos fenólicos, classificados em dois grandes grupos, flavonóides e não flavonóides (figura 3). Os flavonóides são formados por dois anéis aromáticos unidos por um heterociclo oxigenado. Dependendo do grau de hidrogenação e da substituição do heterociclo, diferenciam-se em flavanóis, flavonas, flavonóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavonóides. Encontram-se geralmente ligados a açúcares, formando glicosídeos. Na figura 4, pode-se observar a estrutura química de alguns flavonóides comumente encontrados em alimentos de origem vegetal (KARAKAYA, 2004).

Figura 3. Exemplo de compostos fitoquímicos presentes em alimentos vegetais, com a classificação dos compostos polifenólicos, (Karakaya, 2004)

Flavanóis:

- (+)-Catequina: $R=H$
- (+)-Galocatequina: $R=OH$

- (-)-Epicatequina: $R=H$
- (-)-Epigallocatequina: $R=OH$

- (-)-Epicatequina-3-galato: $R_1=H$
- (-)-Galato de epigallocatequina: $R_1=OH$

Antocianidinas:

- Cianidina: $R_1=OH, R_2=H$
- Delphinidina: $R_1=OH, R_2=OH$
- Peonidina: $R_1=OCH_3, R_2=H$
- Malvidina: $R_1=OCH_3, R_2=OCH_3$

Flavonóis:

- Kampferol: $R_1=H, R_2=H, R_3=H$
- Quercetina: $R_1=H, R_2=OH, R_3=H$
- Miricetina: $R_1=H, R_2=OH, R_3=OH$

Figura 4. Estrutura química de alguns flavonóides

Os não flavonóides são compostos benzóicos e cinâmicos, chamados comumente de ácidos fenólicos, que contêm um anel aromático com pelo menos um grupo hidroxila e com diferentes grupos funcionais: aldeídos, álcoois ou ácidos; que podem formar ésteres com os ácidos orgânicos ou unir-se a açúcares. Outros compostos de natureza fenólica são os estilbenos, lignanos e, de forma polimerizada, os taninos e ligninas. Algumas das propriedades dos vegetais (como a cor, a adstringência e o aroma) são devidas aos compostos fenólicos (MANACH *et al.*, 2004). Na figura 5, consta a estrutura química dos principais ácidos fenólicos.

Ácidos hidroxibenzóicos C₆-C₁:

- Ácido *p*-hidroxibenzóico: R₁=R₂=H
- Ácido protocatéquico: R₁=OH, R₂=H
- Ácido vanílico: R₁=OCH₃, R₂=H
- Ácido gálico: R₁=R₂=OH
- Ácido siríngico: R₁=R₂=OCH₃

- Ácido gentísico

Ácidos cinâmicos C₆-C₃:

- Ácido *p*-cumárico: R₁=R₂=H
- Ácido caféico: R₁=OH, R₂=H
- Ácido ferúlico: R₁=OCH₃, R₂=H
- Ácido sinápico: R₁=R₂=OCH₃

Figura 5. Estrutura química dos principais ácidos fenólicos

Em geral os compostos fenólicos são multifuncionais como antioxidantes, pois atuam de várias formas: combatendo os radicais livres, pela doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH) da sua estrutura aromática, que possui a capacidade de suportar um elétron desemparelhado através do deslocamento deste ao redor de todo o sistema de elétrons da molécula; quelando metais de transição, como o Fe^{2+} e o Cu^{+} ; interrompendo a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica; modificando o potencial redox do meio; reparando a lesão a moléculas atacadas por radicais livres (PODSEDEK, 2007; KYUNGMI e EBELER, 2008). Também bloqueiam a ação de enzimas específicas que causam inflamação; modificam as rotas metabólicas das prostaglandinas (VALCO *et al.*, 2006); protegem a aglomeração plaquetária; e inibem a ativação de carcinógenos (LIU, 2005).

Em outros estudos, tem-se visto que atuam contra alergias, inflamações, hepatotoxinas, alguns vírus, úlceras e tumores; aumentam a resistência dos vasos sanguíneos; e bloqueiam as enzimas que produzem estrógeno (MILES *et al.*, 2005; PUKASKAS *et al.*, 2005).

Em estudos com animais de laboratório, notou-se que os derivados da epicatequina (epigallocatequina-3-galato e epicatequina-3-galato) atuam como captadores de radicais livres, como quelantes de metais de transição, como anti-hipertensivos e antidiabéticos, como inibidores da expressão de enzimas cruciais no desenvolvimento do câncer (a exemplo das metaloproteinases), e aumentando a expressão da enzima catalase na aorta (BEUTLER *et al.*, 2002; BELLOSTA *et al.*, 2003; NEGISHI *et al.*, 2004; KOTA, KRISHNA e POLASA, 2008).

Os compostos polifenólicos atuam por mecanismos variados, dependendo da sua concentração e do tipo de composto presente no alimento, podendo existir sinergismo ou antagonismo entre os diferentes compostos (PEDRIELLI e SKIBSTED, 2002; HASSIMOTTO *et al.*, 2005).

O grau de hidroxilação e a posição dos grupos hidroxila na molécula dos compostos fenólicos estão entre os mais importantes fatores que determinam sua atividade antioxidante. A solubilidade e os efeitos estéricos de cada molécula podem ser afetados pelo tipo de estrutura, como no caso dos derivados glicosilados, que podem aumentar ou diminuir a atividade antioxidante (RICE-EVANS *et al.*, 1996).

Os compostos fenólicos se apresentam amplamente distribuídos entre as distintas partes das plantas, porém sua maior concentração está nas frutas, nas hortaliças e em seus derivados, tais como: azeite virgem de oliva, vinho tinto, chás, cerveja etc. Também em cereais e leguminosas são encontrados em concentrações consideráveis. Os distintos alimentos de origem vegetal contêm diferentes tipos de compostos fenólicos, em concentrações muito variáveis (SOARES, 2002; LIU, 2005).

Nos vegetais, os compostos fenólicos estão presentes na forma de glicosídeos. A ação de enzimas ou de alguns processos pode, no entanto, liberar as correspondentes agliconas, às quais se atribui maior capacidade antioxidante que aos glicosídeos correspondentes (RICE-EVANS *et al.*, 1996).

Em face das várias funções biológicas atribuídas aos compostos fenólicos no organismo animal, inúmeros trabalhos têm sido realizados com o objetivo de identificar e purificar tais compostos a partir de fontes naturais, visando à prevenção da deterioração oxidativa de alimentos, restringindo o uso

de antioxidantes sintéticos, em cuja utilização têm sido verificados prejuízos à saúde humana; e objetivando ainda a prevenção de uma série de doenças associadas ao estresse oxidativo (MELO e GUERRA, 2002; GUNDUC e EL, 2003; SVILAAS *et al.*, 2004).

Os estudos da capacidade antioxidante em alimentos de origem vegetal tiveram início com o trabalho de Chipault (1952), que apresentou uma avaliação sistemática da atividade antioxidante em especiarias. Em 1964, Pratt e Watts identificaram a quercetina como principal flavonóide no extrato aquoso de especiarias e de outros vegetais.

Nas décadas de 70 e 80, constatou-se que as especiarias são boas fontes de antioxidantes naturais. O coentro e a salsa, por exemplo, possuem compostos polares e apolares com ação antioxidante; os últimos apresentam maior eficiência em baixa atividade de água (GUERRA, 1976). No alecrim, o carnosol (um triterpeno) e a rosmariquinona são os componentes antioxidantes mais ativos (HOULIHAN e CHANG, 1985). No orégano e no tomilho, observou-se atividade antioxidante superior ao padrão comercial BHT (KIKUZAKI e NAKATANI, 1989).

Melo e Mancini-Filho (1991) isolaram duas frações com atividade antioxidante no extrato metanólico da castanha do Brasil que apresentaram reação positiva para compostos fenólicos. Tais frações demonstraram atividade sinérgica com os antioxidantes sintéticos BHA e BHT, potencializando a ação antioxidante a valores equivalentes a 100 ppm dos antioxidantes sintéticos. Na avaliação de nove diferentes cultivares de soja, todos apresentaram atividade antioxidante. Identificaram-se os ácidos clorogênico, em maior concentração, e

caféico, que apresentou melhor ação antioxidante (NAGEM, ALBUQUERQUE e MIRANDA, 1992).

O extrato etéreo do orégano mostrou-se efetivo na oxidação lipídica da banha de porco e de óleos vegetais (de milho, de soja e de oliva); nele foram identificados flavona (apigenin), flavonona (eriodictol) e dihidroflavonol (dihidrocampferol e dihidroquercetina) (VEKIARI *et al.*, 1993). Nos frutos cítricos, já se conheciam constituintes com atividade antioxidante na casca, na polpa e no óleo; Pereira e Mancini-Filho (1994) observaram que também suas sementes possuem tal propriedade.

Os ácidos fenólicos presentes no caroço do abacate apresentaram, na inibição da oxidação lipídica, níveis de eficácia semelhantes ao BHT em sistema modelo contendo β caroteno/ácido linoléico (SOARES e MANCINI FILHO, 1996).

No extrato etanólico de mostarda foram isoladas 04 frações com ação antioxidante, identificadas como compostos fenólicos (AMAROWICZ e WANASUNDARA, 1996). Nos extratos alcoólico e aquoso obtido da erva-doce, da mostarda e da canela, em um sistema modelo constituído por β caroteno/ácido linoléico, verificaram-se níveis de inibição do processo oxidativo na ordem de 76,7%, 59,0%, 73,9%, 95,5%, 66,5% e 81,4%, respectivamente (NASCIMENTO *et al.*, 1996).

Em um estudo que constatou que o mirtilo possui capacidade antioxidante superior à da framboesa e à do morango, observou-se ainda que o armazenamento dessas frutas em temperatura ambiente afeta de forma positiva o metabolismo dos compostos fenólicos presentes, aumentando sua capacidade antioxidante (KALT *et al.*, 1999).

No macambo ou cacau do Peru (*Theobroma bicolor*, L), foram obtidas frações de ácidos fenólicos que evidenciaram elevada atividade antioxidante, nas quais foram identificados vários ácidos fenólicos, destacando-se o ácido salicílico, presente em maior concentração (TORRES *et al.*, 2002).

Em frutos de diversas espécies de cactus, os flavonóides e carotenóides foram os principais compostos identificados, predominando a quercetina (KUTI, 2004). Já no espinafre, destacam-se o kampferol e a quercetina como compostos fenólicos de maior atividade antioxidante (KUTI e KONURU, 2004).

As especiarias têm demonstrado não só atividade antioxidante *in vitro* mas também proteção contra a oxidação de tecidos em animais de laboratório. Melo *et al.* (2005) avaliaram, em ratos, o efeito antioxidante dos extratos aquoso e etéreo do coentro, constatando que ambos apresentaram elevada atividade no plasma e no fígado desses animais, tendo o extrato etéreo mostrado maior atividade antioxidante.

As especiarias, hortaliças, leguminosas e frutas são conhecidas como fontes de compostos antioxidantes. Destacam-se o orégano, a mostarda, a canela, o coentro, as hortaliças da família das couves (*Brassica*) e brócolis e as leguminosas verdes, como vagem. Constituem uma boa fonte de flavonóides (CHUN *et al.*, 2005). Nas frutas normalmente estão presentes os flavonóides (quercetina, campferol, hesperidina) e os ácidos benzóicos e cinâmicos, que têm demonstrado efeito, *in vitro*, na proteção do DNA (WILLIAMSON *et al.*, 2005; APARÍCIO-FERNADEZ *et al.*, 2005).

Na soja estão presentes as isoflavonas (genisteína e daidzeína), que possuem propriedades antitumoríficas na glândula mamária de animais de experimentação, atuando como fitoestrógenos fracos e funcionando de forma

bastante similar aos flavonóides, bloqueando as enzimas que promovem o crescimento de tumores (NAKAMURA *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2008).

2.4.1. Consumo de compostos fenólicos pela população mundial

Ainda não existe uma recomendação para o consumo de compostos fenólicos pela população. É muito difícil estimar o consumo, haja vista a ausência de tabelas em que constem dados da composição fenólica dos alimentos. Além disso, inexistência de uniformidade de metodologia para identificação e quantificação da atividade antioxidante desses compostos. Estima-se, entretanto, que o consumo mundial varie de 150 a 1000 mg/dia. Na tabela abaixo, constam alguns estudos que quantificaram o consumo de compostos fenólicos em diferentes populações.

Tabela 1. Estimativa do consumo de compostos fenólicos em vários países

País	Consumo mg/dia	Referência
Dinamarca	23-46	Dragsted <i>et al.</i> (1997)
Finlândia	24	Knekt <i>et al.</i> (2002)
Holanda	73	Boker <i>et al.</i> (2002)
Japão	63	Arai <i>et al.</i> (2000)
Estados Unidos	20-34	Sampson <i>et al.</i> (2002) Wu <i>et al.</i> (2002)

2.4.2. Metabolismo de compostos fenólicos

Como todos os componentes celulares dos vegetais, os compostos polifenólicos necessitam ser mecanicamente liberados antes de serem absorvidos. Os eventos pré-absorção são importantes, pois determinam a forma como os compostos fenólicos vão encontrar-se no lúmen intestinal. A

saliva não é capaz de realizar nenhum tipo de digestão prévia dos compostos fenólicos. Parece que alguns compostos fenólicos sofrem ação do suco gástrico, como os oligômeros de proantocianidinas (desde trímeros até decâmeros), que são quebrados em moléculas menores, liberando monômeros e dímeros de epicatequina (MANACH e DONOVAN, 2004).

Na figura 6, estão representadas esquematicamente as distintas vias metabólicas que os compostos fenólicos podem seguir através do sistema digestivo. Nos alimentos, a maioria dos flavonóides encontra-se na forma de glicosídeos. Ao chegar ao intestino delgado, podem sofrer distintas transformações, determinadas por sua estrutura química. A glicosilação de um composto influi em seu coeficiente de partição, que mede a afinidade relativa de um composto pela fase aquosa ou orgânica e sua capacidade de difusão através das membranas biológicas (MANACH e DONOVAN, 2004).

A deglicosilação dos flavonóides glicosídicos é realizada pelas glicosidases que se encontram na mucosa intestinal, permitindo a difusão passiva destes flavonóides através da membrana intestinal. A enzima LPH (lactase/florizinhidrolase), encontrada somente no intestino delgado, catalisa a hidrólise de uma ampla variedade de polifenóis glicosídicos, incluindo a quercetina-3-o-glicosídeo, que não é substrato das β -glicosidades citosólicas. As agliconas livres resultantes, assim como os compostos fenólicos simples da dieta, podem ser conjugados mediante metilação, sulfatação ou glicuronização pelas enzimas UDP-glicuroniltransferase ou catecol-o-metiltransferases (SCALBERT *et al.*, 2002).

Em continuação, os metabólitos tissulares originados são absorvidos através da barreira intestinal. Depois chegam ao fígado, onde sucede uma

série de reações enzimáticas (YOUNG *et al.*, 1999). As β -glicosidases eliminam resíduos de glicose dos compostos. Sobretudo, ocorrem reações de conjugação, mediadas pelas enzimas catecol-o-metiltransferase, sulfotransferases, enzimas de fase I e II ou UDP-glicuroniltransferase; esta ocorre preferencialmente no fígado. Do fígado, os metabólitos são distribuídos aos tecidos ou vão diretamente aos rins, sendo excretados pela urina (GERMANO *et al.*, 2006).

Figura 6. Rota metabólica proposta para os compostos polifenólicos da dieta no organismo humano (MANACH e DONOVAN, 2004)

Os compostos fenólicos de elevado peso molecular e alto grau de polimerização (como algumas proantocianidinas e alguns flavonóides glicosilados) não sofrem ação das enzimas do trato gastro intestinal; não são, portanto, absorvidos no intestino delgado, alcançando o cólon, onde são hidrolisados ou degradados a ácidos fenólicos mais simples pelas enzimas da microflora colônica (MANACH e DONOVAN, 2004; RODRIGUEZ *et al.*, 2008).

Outros compostos fenólicos, absorvidos no intestino delgado e metabolizados no fígado, são re-excretados na bile e podem assim alcançar o cólon, onde são hidrolisados. O cólon possui aproximadamente 10^{12} microorganismos/cm³ e um elevado potencial catalítico e hidrolítico (AURA *et al.*, 2002).

A estrutura química do composto fenólico determina a natureza e a quantidade de metabólitos formados pela microflora e absorvidos no cólon. Os metabólitos são principalmente derivados dos ácidos fenilacéticos, fenilpropionícos e benzoícos, com diferentes perfis de hidroxilação. Tais metabólitos são facilmente absorvidos pela barreira do cólon e chegam ao fígado, onde alguns se conjugam com a glicina, formando ácido hipúrico, ou vão diretamente aos rins e são excretados pela urina (WALLE, 2004).

No cólon, as glicosidases (como as α -ramnosidases, que são exclusivas desse órgão) liberam quercetina a partir de quercetin-3-o-ramnoglicosídeo ou quercetin-3-o-ramnosídeo. Também no cólon, as estearases liberam as formas livres dos ésteres dos ácidos cinâmicos (PLUMB *et al.*, 1999; MANACH e DONOVAN, 2004).

Os compostos fenólicos resistentes à degradação pela microflora colônica (como os taninos condensados insolúveis e de elevado grau de polimerização) são excretados nas fezes (BRAVO, 1998).

2.4.3. Biodisponibilidade de compostos fenólicos

A biodisponibilidade dos compostos fenólicos possui papel determinante nos possíveis efeitos biológicos que se lhe atribuem. Características como peso molecular e solubilidade são fatores que influenciam o metabolismo dos compostos fenólicos, assim como o trânsito gastrointestinal, a permeabilidade

da membrana e o pH do lúmen. Outros fatores que influenciam a atividade fisiológica de tais compostos no organismo são: a estrutura do composto e a forma em que se apresenta, livre (chamada aglicona) ou ligada a outros compostos (denominada glicosilada) (NACZK e SHAHIDI, 2004).

A absorção dos ácidos fenólicos tem sido medida de forma direta e indireta. Evidências indiretas da absorção desses compostos são observadas pelo aumento da capacidade antioxidante no plasma após o consumo de alimentos ricos em polifenóis. A biodisponibilidade é obtida pela mensuração das concentrações, no plasma e na urina, de compostos fenólicos puros ou provenientes de alimentos com composição fenólica conhecida. A estrutura química determinará a proporção e a extensão da absorção, e a natureza dos metabólitos circulantes no plasma (GERMANO *et al.*, 2006).

NARDINI *et al.* (2006) verificaram que os ácidos fenólicos, após a absorção, são amplamente conjugados a sulfatos, e glicuronados. O grau de conjugação varia de acordo com as características químicas de cada ácido fenólico. Com alguns ácidos fenólicos ocorre *o*-metilação e glicuronização, no fígado. O ácido gálico não esterificado, por exemplo, é absorvido no intestino delgado e, no fígado, é *o*-metilado ou glicuronado ou excretado (KONISHI *et al.*, 2004).

Ainda não se conhecem com precisão as vias bioquímicas de metabolização dos compostos fenólicos ingeridos. Em muitos casos não se sabe especificamente o composto de origem de um determinado metabólico. Após a ingestão e o tempo de digestão de uma dose relativamente alta de um dado composto fenólico, a quantidade desse composto na circulação sanguínea é muito baixa ou quase nula. Os testes de determinação dos

compostos antioxidantes no sangue ainda não são capazes de detectar com precisão todos os metabólitos formados a partir dos fenólicos ingeridos. Isso pode subestimar o potencial antioxidante do composto pesquisado (MANACH e DONOVAN, 2004).

2.5. Métodos utilizados na avaliação da atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante dos alimentos, além de prever o potencial antioxidante do alimento antes de ser ingerido, é importante para avaliar a proteção contra a oxidação e a deterioração do alimento, reações que podem levar à diminuição da sua qualidade e do seu valor nutricional.

Esses métodos mostram-se necessários devido à dificuldade de medir cada composto separadamente, e às interações potenciais entre os diferentes antioxidantes no sistema. Foram descritos numerosos métodos de mensuração da atividade antioxidante de substâncias e alimentos, mas todos eles têm em comum a presença de um agente oxidante, um substrato adequado e uma estratégia de medida do ponto final.

Os métodos que determinam a atividade antioxidante de alimentos são classificados em dois grandes grupos: o primeiro se baseia na captura de radicais livres; o segundo, na determinação da oxidação de uma molécula alvo.

2.5.1. Determinação da oxidação de moléculas

Desenvolveram-se diversos métodos para medir a atividade dos radicais livres sobre moléculas do organismo, como as proteínas, os ácidos nucleicos e os lipídeos. Os biomarcadores do dano oxidativo encontram-se aumentados em pessoas com certas enfermidades ou risco associado (FREI, 2004).

A oxidação das proteínas pelos radicais livres leva à formação de grupos carbonila, que podem ser detectados pela reação com o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DPPH) ou por técnicas de ELISA.

O ataque dos radicais livres sobre o DNA produz várias espécies, entre elas a base oxidada 8-hidroxi-desidrogenase (8-OHdG), cuja concentração se pode determinar na urina (HALLIWEL, 2002).

As técnicas de determinação *in vitro* da oxidação lipídica têm sido muito desenvolvidas. Os substratos lipídicos são diversos: o ácido linoléico, os ésteres metílicos dos ácidos graxos e a LDL. Outro substrato muito empregado são os lipossomos. A oxidação pode ser iniciada pela adição de íons metálicos (Cu^+ , Fe^{2+}), de AAPH [2,2-azobis(aminopropano)diidroclorido], de peróxido de hidrogênio, ou ainda pela aplicação de calor (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

A oxidação dos ácidos graxos insaturados leva à sua quebra, com conseqüente formação, dentre outros compostos, do malonaldeído (MDA), que pode ser determinado pelo método TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico); no qual se faz reagir o MDA com o ácido tiobarbitúrico para formar um pigmento rosado, que apresenta um máximo de absorção a 532-535 nm (SANCHES-MORENO *et al.*, 1998).

2.5.2. Determinação da captura de radicais livres

Nos últimos anos, desenvolveu-se a técnica analítica de espectrometria de ressonância de spin de elétrons (ESR). Como a vida média dessas espécies é muita baixa (entre 10^{-9} e alguns segundos), não se consegue realizar a medida de forma direta, mas acoplando o radical livre a um composto nitroso capaz de com ele formar um aduto; esse complexo é estável e pode ser detectado por ESR (ANTOLOVICH *et al.*, 2002). Esse método ainda é pouco utilizado, em face do alto custo de instrumentação.

2.5.3. Método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico

Esse tipo de avaliação da atividade antioxidante é realizada em meio emulsionado, pela técnica de co-oxidação de substratos. Foi descrito inicialmente por MARCO (1968) e modificada por MILLER (1971). É um método colorimétrico, realizado em comprimento de onda de 470 nm, baseado na leitura referente à descoloração da solução preparada com β - caroteno e ácido linoléico, em meio aquoso. A descoloração ocorre em função das estruturas radiculares formadas pela oxidação do ácido linoléico, que atacam as duplas ligações do β - caroteno, perdendo seu cromóforo, resultando na descoloração do pigmento alaranjado, característico da solução. A presença de antioxidantes no sistema protege o ácido linoléico, prolongando o período de formação dos radicais (HUANG e WANG, 2004).

Normalmente se utiliza o antioxidante sintético butilhidroxidotolueno (BHT) como padrão positivo para comparação dos resultados. Esse método tem sido utilizado para analisar várias matrizes alimentares, principalmente frutos e sementes ricas em lipídeos. Melo e Mancini-Filho (1989) empregaram o

sistema β -caroteno/ácido linoléico na avaliação da atividade antioxidante do extrato metanólico do fruto do dendezeiro. Amarowicz *et al.* (1996) utilizaram-no na quantificação da capacidade antioxidante do extrato metanólico da semente de mostarda. Wettasinghe e Shahidi (1999) empregaram-no na avaliação das propriedades antioxidantes e de captura de radicais livres dos extratos etanólicos da semente de borage (*Borago officinalis* L.). Matthaus (2002) usou esse modelo na avaliação da capacidade antioxidante de extratos de canola, girassol e mostarda. Giada (2006) o empregou na avaliação da capacidade antioxidante dos extratos aquoso e etéreo do cotilédone da semente rajada de girassol, encontrando uma correlação positiva da atividade antioxidante com os métodos ORAC, DPPH e FRAP.

Nessa metodologia, acompanha-se o decaimento da absorbância das amostras, do controle e do BHT, por 120 minutos. A partir dessas curvas, Yanishlieva e Marinova (1995) desenvolveram um cálculo matemático em que, na parte inicial da curva (período entre 15 e 45 min.), é mensurada a eficiência do antioxidante em bloquear a reação em cadeia (F1 – fator de estabilização) por meio de interação com os radicais peróxidos. Seriam os chamados antioxidantes primários. No intervalo final da curva (período entre 75 e 105 min.), infere-se a possibilidade de o antioxidante participar de outras reações durante o processo oxidativo, como a decomposição dos hidroperóxidos com oxigênio, produzindo espécies radicalares que aceleram a oxidação no sistema. Esse recurso tem sido bastante utilizado na avaliação da atividade antioxidante (NASCIMENTO *et al.*, 2005; JARDINI e MANCINI-FILHO, 2007).

Outros métodos utilizam espécies radicalares estáveis, como os radicais livres DPPH e ABTS. A detecção do ponto final se realiza geralmente por

absorbância. São muito empregados na determinação *in vitro* da atividade antioxidante de alimentos e bebidas, e do plasma.

2.5.4. Método do radical ABTS

Consiste na produção do radical ABTS a partir de seu precursor, o ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico. O radical ABTS é um composto cromóforo quimicamente muito estável, com alta solubilidade em água e um máximo de absorbância a 414 nm, e também de medidas secundárias de absorbância a 645, 734 e 815 nm (MILLER *et al.*, 1993).

Pode ser utilizado tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis, o que lhe confere vantagem em relação a outros métodos. Tem sido utilizado em alimentos (como tomate e molho de soja), vinhos e cervejas, além de amostras biológicas (SCALFI *et al.*, 2000; MAZZA *et al.*, 2002).

O radical ABTS pode ser gerado enzimaticamente, utilizando mioglobina e peroxidase de couve; quimicamente, usando dióxido de magnésio ou persulfato de potássio; ou ainda eletroquimicamente (MILLER *et al.*, 1993).

O sistema ABTS/mioglobina/H₂O₂, também conhecido como método TAA (*Total Activity Method*) ou método de Rice-Evans, é o método de medida da atividade antioxidante mais conhecido. Foi o primeiro a utilizar o radical ABTS como substrato de oxidação. Serviu de base para o surgimento de outros métodos que usam o mesmo radical. Esse autor testou primeiramente tal método na avaliação da atividade antioxidante total do plasma e de fluidos biológicos em geral, em crianças nascidas prematuramente, que possuíam um déficit do antioxidante α -tocoferol, comprovando que a atividade antioxidante

do plasma dessas crianças era menor do que a do plasma de nascidos a termo (MILLER *et al.*, 1993).

O método original apresenta, entretanto, inconvenientes: a necessidade de purificação da enzima metamioglobina e de controle da temperatura (37°C) da reação, e a interferência de alimentos que contenham atividade de peroxidase (HENRIQUES *et al.*, 2002).

Sendo assim, foram desenvolvidos novos métodos de geração do radical ABTS, como a partir da oxidação do sal por persulfato de potássio, cuja reação ocorre na ausência de luz, durante 12 a 16 horas. A energia de ativação requerida é muito baixa e a reação começa imediatamente, mas não alcança um máximo de absorbância até o transcurso de 6 horas. O ABTS reage estequiometricamente a uma relação 1:0,5 com o persulfato de potássio (HENRIQUES *et al.*, 2002).

Uma vez gerado, o radical deve ser diluído em etanol até atingir uma absorbância de $0,7 \pm 0,02$ (RE *et al.*, 1999). A amostra a ser analisada é adicionada ao radical e mede-se a absorbância a 734 nm, a 30° C, durante 6 minutos. Este método tem sido muito aplicado a amostras biológicas (plasma), carotenóides e compostos fenólicos (ARTS *et al.*, 2001; PANNALA *et al.*, 2001).

2.5.5. Método do radical DPPH

Consiste em determinar a capacidade de captura do radical livre DPPH (figura 07) pelos compostos antioxidantes. O radical livre de 2,2-difenil-1-picrilhidrazina apresenta um máximo de absorbância a 515 nm. Após a adição do antioxidante, produz-se uma diminuição da absorbância, proporcional à

concentração e à atividade antioxidante da amostra (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

Uma vantagem deste método é que o radical livre é estável e está disponível comercialmente, o que evita sua geração por distintas formas (como ocorre com o método ABTS), além de facilitar seu uso.

As concentrações iniciais de DPPH utilizadas têm sido muito variáveis: 0,025 g/L a 0,415 g/L. Também tem variado o tempo de reação: tempo fixo de 30 minutos ou o tempo que leva para alcançar o estado de equilíbrio. Na literatura consultada, observam-se, entretanto, características comuns: o emprego de solventes (metanol, etanol) e o monitoramento da cinética da reação. A maior homogeneidade no emprego do método facilita a comparação dos resultados obtidos em distintas classes de alimentos. Não pode, contudo, ser usado para amostras biológicas, pois as proteínas precipitam-se em meio alcoólico (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). Por outro lado, o método DPPH tem sido muito empregado na análise de mecanismos de reação dos compostos polifenólicos com radicais livres (SAWAI *et al.*, 2005). Alguns compostos reagem rapidamente com o DPPH, reduzindo um número de moléculas igual ao número de grupos OH disponíveis, formando as correspondentes o-quinonas (BONDET *et al.*, 1997).

Figura 7. Estrutura química do radical DPPH

2.5.6. Método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio)

Foi desenvolvido por Cao e Prior (1999), que se basearam no trabalho de Glazer (1990). Utiliza como molécula alvo dos radicais livres de oxigênio as ficobiliproteínas β -ficoeritrinas ou R- ficoeritrina (PE), altamente fluorescentes, que contêm um pigmento vermelho fotorreceptor (34 grupos prostéticos tetrapirrólicos unidos covalentemente). Essas proteínas derivam de espécies de algas roxas e cianobactérias e possuem um peso molecular de 250.000 daltons. O fundamento do método consiste na medida do decréscimo da fluorescência das proteínas, como consequência da perda de sua conformidade ao sofrer dano oxidativo (PRIOR *et al.*, 1999).

Tem sido empregado para medir a capacidade antioxidante de compostos puros, como a melatonina e os flavonóides; em fluidos biológicos, como o plasma, o soro e a urina (CAO e PRIOR, 1999); em produtos naturais, como frutas e demais vegetais; e em produtos industrializados, como vinhos e chás (PRIOR *et al.*, 1999; WU *et al.*, 2004).

Como radical livre, usa-se a peroxila, espécie reativa de oxigênio biologicamente mais importante, por sua abundância e por ser responsável

pelo dano oxidativo (ANTOLOVICH *et al.*, 2002). Como fonte desses radicais, utiliza-se o AAPH, que os gera depois de sofrer decomposição térmica.

Os radicais peroxila diminuem a fluorescência da ficoeritrina e da fluoresceína. O antioxidante adicionado reage rapidamente com os radicais, doando átomos de hidrogênio e inibindo a perda da intensidade da fluorescência. Essa inibição é proporcional à atividade antioxidante (WU *et al.*, 2004).

A perda da fluorescência da ficoeritrina e/ou da fluoresceína na presença dos radicais peroxila não segue uma cinética de ordem zero (linear com o tempo), mas sim exponencial com o tempo; para a quantificação se usa, portanto, a técnica da área sob a curva de decréscimo (AUC) (CAO e PRIOR, 1999).

O antioxidante padrão utilizado é o trolox. Os resultados se expressam em equivalente de trolox (número de μ moles de trolox que produz a mesma atividade de 1 mg de amostra).

Ou *et al.* (2001) aprimoraram a metodologia ORAC original, utilizando a fluoresceína (3,6-dihidroxi-8-spiro (isobenzofuran-1 (3H)-9(9H)-xanten-3-ona) como marcador fluorescente estável, substituindo a ficoeritrina.

O fundamento do método é idêntico ao tradicional, que usa ficoeritrina. Seu mecanismo é a clássica transferência de átomos de hidrogênio. Introduz, porém, sensíveis melhoras. A fluoresceína é um composto fotoestável e termoestável; que apresenta homogeneidade entre seus distintos lotes após a exposição à luz de excitação; que não interage com os compostos antioxidantes da amostra; e que reduz os custos dos experimentos (OU *et al.*, 2001).

O ensaio ORAC usando fluoresceína pode medir a atividade antioxidante dos componentes hidrofílicos e lipofílicos de uma dada amostra, usando β -ciclodextrina metilada, que aumenta a solubilidade em água dos compostos lipossolúveis, pois que é uma molécula anfipática (WU *et al.*, 2004).

Uma vantagem do uso do método ORAC em relação aos demais métodos antioxidantes que usam a absorbância é o uso da fluorescência como medida do dano oxidativo, havendo menor interferência dos compostos coloridos presentes nas amostras. E isso é um fator importante a se considerar quando se analisam alimentos que possuem cor (especialmente frutos e hortaliças), suplementos de produtos naturais, e vinho tinto. Outra vantagem é o uso de radicais peroxila ou hidroxila como pró-oxidantes, conferindo um significado biológico maior em relação a métodos que usam oxidantes que não são necessariamente pró-oxidantes fisiológicos.

Além disso, é o único método que desenvolve a reação da espécie reativa com o substrato até o final e usa a técnica da área sobre a curva de decréscimo para a quantificação, que combina tanto a porcentagem de inibição como a longitude do tempo total de inibição do radical livre por um antioxidante. Os demais métodos usam uma porcentagem de inibição a um tempo fixo .

2.5.7. Avaliação da atividade antioxidante utilizando o teste Rancimat

Os testes existentes para avaliar a estabilidade oxidativa de óleos e gorduras comestíveis recorrem normalmente a condições padronizadas de oxidação acelerada (oxigenação intensa, tratamento térmico e/ou catálise metálica) e permitem quantificar, de forma rápida, a estabilidade oxidativa de

um óleo ou a eficácia teórica de um antioxidante isolado ou em associação. (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

Os testes clássicos para a avaliação da estabilidade oxidativa dos óleos e gorduras são o teste do forno Schaal e o método do oxigênio Ativo (AOM) ou teste de Swift (HASENNHUETTI e WAN, 1992). O último requer equipamento simples e pode ser usado como um método geral para a determinação da atividade antioxidante, utilizando substratos como banha e óleo comestível, ou um substrato modelo, como o metil linoleato. No teste AOM o óleo é exposto a uma temperatura de 100-140° C, e o progresso das curvas de oxidação decorrente pode ser seguido pela determinação periódica do índice de peróxido ou outro parâmetro, tal como condutividade ou conjugação de dienos. Essas curvas compreendem uma fase de indução, na qual praticamente nenhum dos produtos secundários é formado; e uma fase de oxidação, durante a qual é detectada uma grande elevação no índice de peróxido e produtos voláteis (LAUBLI e BRUTTEI, 1986). A adição de um antioxidante resulta na inibição da oxidação. Os resultados são quantificados pela medição do tempo de indução do controle e da amostra. A mais longa indução indica a melhor atividade antioxidante (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

O aparelho Rancimat (METROHM AG, CH-9100 Herisau, Switzerland) tem sido apresentado como um método para determinar a resistência de um óleo à oxidação. As condições de trabalho são semelhantes as do AOM, mas, em vez de peróxidos, avaliam-se os produtos secundários da oxidação. O método empregado neste aparelho baseia-se no registro das variações da condutividade da água destilada, na qual se faz a coleta dos ácidos de baixo peso molecular obtidos após a iniciação forçada da oxidação a elevada

temperatura. Grande parte dos produtos voláteis formados pela termodecomposição consiste em ácido fórmico, que é recolhido em água destilada e medido condutimetricamente. A condutividade é plotada automaticamente. O progresso das curvas de oxidação determinadas dessa maneira, virtualmente, assemelha-se ao índice de peróxido. A técnica do Rancimat apresenta duas vantagens: uma medida contínua, que não requer determinações analíticas periódicas; e o aparelho não requer supervisão durante o curso do experimento. O método condutimétrico apresenta, contudo, alguns inconvenientes: só se obtêm resultados mensuráveis para níveis de oxidação elevados, muito além do ponto correspondente ao aparecimento de *off flavors*; utiliza temperaturas acima de 100° C, formando produtos de decomposição distintos dos formados na decomposição normal de óleos e gorduras à temperatura ambiente ao longo do armazenamento; as condições térmicas usadas tornam impossível a avaliação da capacidade antioxidante de compostos termolábeis, que podem-se decompor ao longo do ensaio. Por outro lado, os testes acelerados são de grande utilidade quando se comparam óleos quanto a sua estabilidade frente à oxidação (HASENNHUETTI e WAN, 1992).

2.6. O PEQUI

Estima-se que dois terços da diversidade biológica mundial estejam nas zonas tropicais, distribuídas principalmente nos países em desenvolvimento. Cerca de 37% dessa diversidade encontra-se na América tropical, que contém cerca de 90 mil espécies de fanerógamas, representadas no Brasil por aproximadamente 60 mil espécies. O bioma cerrado possui uma flora estimada

em 7 mil espécies, sendo o segundo bioma brasileiro de maior diversidade vegetal com árvores frutíferas (RIBEIRO, 2000; PEREZ, 2004).

Poucos estudos têm sido realizados com o intuito de caracterizar o valor nutricional da infinidade de frutos do cerrado brasileiro. O estudo desses frutos certamente aumentaria a identificação de alimentos com considerável valor nutricional e econômico, propiciando alternativas alimentares para os povos da região.

Dentre as espécies típicas do cerrado, o pequi é uma das que tem ampla utilização pela população, sendo considerado por muitos como o "rei do cerrado". Isso se deve ao seu valor alimentício, medicinal, melífero, ornamental, oleaginoso e tanífero (KERR *et al.*, 2007).

O pequi é uma árvore pertencente à família *Caryocaraceae*, que possui dois gêneros: *Caryocar camb.* e *Anthodiscus g. mey.* O gênero *Caryocar* possui dezenove espécies, das quais oito são encontrados no Brasil, a saber: *C. nuciferum*, *C. glabrum Pers*, *C. glabrum var. edule*, *C. brasiliense Cambess*, *C. villosum var. planifolium*, *C. barbinerve*, *C. cuneatum* e *C. crenatum*. Além do Brasil, o pequi é encontrado no Peru, Guianas, Venezuela, Colômbia e Paraguai. Na figura 8, pode ser vista a árvore típica de um pequi adulto (SANO e ALMEIDA, 1998; MELO JÚNIOR *et al.*, 2004).

Figura 08. Árvore adulta do pequizeiro

O pequizeiro possui madeira bastante resistente e durável, utilizada na fabricação de barcos, estacas, mourões e pilões. A casca e as folhas contêm altos teores de taninos, constituindo matéria-prima para fabricação de tinturas. Também existem referências à utilização das folhas, flores e frutos do pequizeiro na farmacopéia popular, tais como: o uso do óleo da polpa, como expectorante, e do chá das folhas, como regulador menstrual (ALMEIDA e SILVA, 1994).

Estudos demonstraram que o extrato etanólico das folhas apresenta atividade contra o sarcoma 180, um tipo de câncer de pele. Por meio de análise cromatográfica, identificaram-se no extrato etanólico as seguintes substâncias: friedelina, friedelanol, ácido oleanóico, β -sitosterol, estigmasterol, β -amirilina e ácido elágico (OLIVEIRA *et al.*, 1968)

Os extratos etanólicos das folhas e das cascas do *Caryocar brasiliense*, na concentração de 100 ppm, provocaram a morte de 90% de uma população de *Biomphalaria glabata*, hospedeiro intermediário do *Eschistosoma mansoni*,

agente etiológico da esquistossomose. Em ambos os extratos foram detectados taninos condensados, taninos hidrolisáveis e flavonóides. No extrato das folhas encontraram-se também terpenos (BEZERRA *et al.*, 2002).

Passos *et al.* (2002), avaliando a atividade antifúngica do pequi sobre *Cryptococcus neoformans*, constatou que todas as partes do fruto possuem atividade antifúngica, sendo que a cera retirada da folha apresentou atividade mais elevada, inibindo o crescimento de 91,3% dos isolados desse microorganismo.

O fruto pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) é conhecido popularmente como piqui, pequiá, amêndoa de espinho, grão de cavalo, amêndoa do Brasil. Ocorre em todo o cerrado brasileiro (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, São Paulo, Minas Gerais) e adapta-se a condições ecológicas as mais diversas, sendo encontrado também em estados nordestinos (Piauí, Ceará e Maranhão). Sua frutificação ocorre de janeiro a março, porém podem ser encontrados frutos fora de época. A produção é maior em anos secos; nos chuvosos, há irregularidade de frutificação. Os pequizeiros podem produzir mais de 6.000 frutos por safra. A colheita é feita no chão (RIBEIRO, 2000; KERR *et al.*, 2007).

O pequi é um fruto que possui até 04 caroços reniformes em seu interior. Constitui-se pelo exocarpo ou pericarpo, de coloração esverdeada ou marrom-esverdeada; pelo mesocarpo externo, de coloração pardo-acinzentada; pelo mesocarpo interno; porção comestível do fruto, de coloração amarelada; e endocarpo, parte espinhosa que protege a semente ou amêndoa. A semente, parte também comestível, é revestida por tegumento fino de coloração marrom. Na figura 09, podem ser visualizadas as diversas partes que compõem o fruto (ARAÚJO, 1995; RIBEIRO, 2000).

Figura 09. Diversas partes que compõem a polpa e a amêndoa do pequi

O pequi é bastante consumido pelas populações que habitam as regiões onde são produzidos. Segundo dados da secretaria de agricultura do estado de Minas Gerais, principal produtor e consumidor do pequi, foram comercializados nesse estado cerca de 20.000 kg de pequi no ano de 2004. A polpa do pequi é utilizada na elaboração de diferentes pratos: arroz com pequi, feijão com pequi, frango com pequi, cuscuz com pequi e o tradicional baião de três (arroz, feijão e pequi). A amêndoa é utilizada como ingrediente de farofas, doces e paçocas, além de ser consumida salgada, como petisco. Isso não obstante, o pequi ainda é explorado de forma artesanal ou pouco industrializada. O que dificulta sua comercialização e seu consumo por populações urbanas e em períodos de entressafra. Por se tratar de um fruto de fácil produção e com características ímpares em relação ao sabor e ao valor nutritivo, o pequi representa uma fonte potencial na alimentação e para a sobrevivência de uma parcela significativa da

população brasileira (ARAÚJO, 1995; RIBEIRO, 2000; MELO JÚNIOR *et al.*, 2004).

A polpa do pequi possui alto valor energético, fornecendo 358 kcal/100g, em média. A maioria dessas calorias provém dos lipídeos, assim constituído: 45% de ácido oléico, 38% de ácido palmítico, 11% de ácido esteárico e 4% de ácido linoléico (SEGALL *et al.*, 2002).

Tanto a polpa quanto a amêndoa do pequi são fontes consideráveis de Mn, Zn, Cu, Mg e P (esse último apresenta uma concentração de 1,21% e atinge a ingestão diária de um adulto); contêm ainda Na, Fe e Ca. A polpa é também uma fonte potencial de vitamina C (78,3 mg/100g) (ALMEIDA e SILVA, 1994).

Ramos *et al.*(2001) identificaram na polpa, após seu cozimento convencional, a presença de diversos carotenóides: β -caroteno (12,17 $\mu\text{g/g}$), ζ -caroteno (8,17 $\mu\text{g/g}$), criptoflavina (12,65 $\mu\text{g/g}$), criptoxantina (7,99 $\mu\text{g/g}$), anteraxantina (31,28 $\mu\text{g/g}$), zeaxantina (79,73 $\mu\text{g/g}$) e mutaxantina (2,07 $\mu\text{g/g}$).

Os espinhos são considerados o maior entrave para a comercialização do pequi, pois dificultam a extração eficiente da polpa e implicam riscos de acidente para pessoas que não têm o hábito de consumir o fruto. Em 2004, descobriu-se uma mutação do pequizeiro que dá frutos sem espinhos, abrindo-se uma grande expectativa quanto à produção e à comercialização do pequi em larga escala. O pequi sem espinhos está sendo estudado pelo Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade de Uberlândia, que encontrou resultados promissores, como a facilidade de realizar enxertos e de germinação das sementes, além de apresentar um rendimento bem superior.

Nas figuras 10 e 11, podem ser vistos os pequis com e sem espinhos, respectivamente (KERR *et al.*, 2007).

Figura 10. Pequi com espinhos no caroço, extraído de KERR *et al.* (2007)

Figura 11. Pequi sem espinhos no caroço, extraído de KERR *et al.* (2007)

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antioxidante da polpa e da amêndoa do pequi e a proteção conferida por essa atividade no processo oxidativo em ratos.

3.2. Objetivos específicos

Caracterizar nutricionalmente a polpa e a amêndoa do pequi;

Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* da polpa e da amêndoa do pequi pelos métodos de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico, DPPH, ABTS, Rancimat e ORAC;

Avaliar o efeito da associação dos antioxidantes do pequi com o antioxidante sintético BHT;

Identificar e quantificar os principais compostos polifenólicos presentes no pequi;

Avaliar *in vivo*, em ratos, a participação da atividade antioxidante da polpa do pequi na proteção contra a lipoperoxidação, na modulação da peroxidação lipídica e na atividade das enzimas antioxidantes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Amostras

Os frutos de pequi foram coletados de árvores adultas, no solo, em dezembro de 2004, na zona rural do município Tanque do Piauí (06°45'57" de latitude sul e 42°17'17" de longitude oeste), pertencente à microrregião de Picos, estado do Piauí, Brasil.

Logo após a colheita, a casca e a polpa dos frutos foram retiradas, utilizando faca, à temperatura ambiente ($\pm 23^{\circ}\text{C}$). A polpa foi levada à estufa com ar forçado, a 60°C , por 24 horas. Após a secagem, as amostras foram trituradas em moinho analítico (modelo IKA A11 *basic*, Wilmington, USA), padronizadas em granulometria de 60 mesh (0,25 mm) e armazenadas a -20°C . Os caroços também foram levados a estufa com ar forçado, a 60°C , por 36 horas, para facilitar a retirada da amêndoa ou semente. Em seguida os caroços foram quebrados, com faca e martelo. As sementes foram então retiradas com uma pinça e trituradas em moinho analítico (modelo IKA A11 *basic*, Wilmington, USA), depois padronizadas em granulometria de 60 mesh (0,25 mm) e armazenadas a -20°C .

4.1.2. Reagentes empregados nas análises

Reagentes utilizados na determinação da composição centesimal

- Proteínas

Sulfato de potássio	Synth® 35490
Sulfato de cobre	Nuclear 1260
Ácido sulfúrico concentrado	Synth® A.1 063
Hidróxido de sódio	PA H 1017.01,AH

Ácido Bórico	Nuclear 0025
Ácido clorídrico 32%	Merck 100317.1000

- Lipídeos

Éter de petróleo	Synth® E 1015
------------------	---------------

- Fibra alimentar

α -amilase	Sigma A-3306
Protease	Sigma P-3910
Amiloglicosidase	Sigma A 9913
Etanol	Synth® E.1047.02
Acetona	Synth® A 1017.01.BL

- Perfil de ácidos graxos da polpa e da amêndoa de pequi

Metanol	Merck A 1085.01.BJ
Clorofórmio	Sinth C 1062.01.BJ

Mistura de ácidos graxos contendo os

ácidos mirístico, palmítico, Sigma 189.19
palmitoléico, margárico,
heptadecenóico, esteárico, oléico,
vacênico, α -linolênico, araquídico,
eicosanóico, beênico e lignocérico.

- Obtenção dos extratos etéreo, alcoólico e aquoso

Água destilada	
Etanol	Synth® E 1008.02
Éter etílico	Synth® E1012.04

- Obtenção das frações de ácidos fenólicos livres, solúveis, e de ligantes insolúveis

Tetrahidrofurano	Sinth® T100801.BJ
Acetato de etila	Sinth® A 1001.01.BJ
Éter etílico	Synth® E1012.04
Hidróxido de sódio	PA H 1017.01.AH
Ácido clorídrico	Merck 100317.1000
Hexano	Merck 1.04374.1000

- Quantificação dos fenólicos totais

Carbonato sódico	Merck 1.06392
Reagente Folin-Ciocalteu	Merck 1.09001
Ácido gálico	Fluka 48630

- Extração e determinação dos carotenóides totais

Acetona	Synth® A,1002.07
Éter de petróleo	Synth® E 1015
Sulfato de sódio	PA 36524

- Ensaio do β -caroteno/ácido linoléico

β -caroteno	Sigma C 4589
Ácido linoléico	Sigma L1268
Tween 40	Sigma P 1504
BHT	Sigma B 1253

- Ensaio DPPH

1,1-difenil-2picrilhidrazil (DPPH)	Sigma D-4139
Metanol	Merck 1.06009.25000
BHT	Sigma B 1253

- Ensaio ABTS

2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico) ABTS	Sigma A-1888
Persulfato de potássio	Sigma P 5487
Etanol	Synth [®] E 1008.02
Trolox	Sigma 23.881-3

- Ensaio Rancimat

Óleo de soja sem antioxidante	
BHT	Sigma B 1253

- Ensaio ORAC

Fluoresceína sódica	Fluka 46960
Trolox	Sigma 23,881-3
AAPH	Wako Chemicals 017-11062
NaH ₂ PO ₄	Sigma S-9638
K ₂ HPO ₄	Probus 145110
Etanol	Merck 1.11727.2500

- Padrões de fenólicos

Ácido gálico	Fluka 48630
Ácido elágico	Sigma E-2250
Ácido protocatéquico	Sigma P-5630
Ácido siríngico	Sigma S6881
Ácido gentísico	Sigma G-5254
Ácido vanílico	Sigma V-2250
Furfural	Sigma 4259
Tirosol	Fluka 56105
Ácido caféico	Fluka 60020
Ácido <i>p</i> -cumárico	Fluka 28200
Ácido ferúlico	Sigma F-3500
(+)-Catequina	Fluka 22130
(-)-Epicatequina	Fluka 45300
(-)-Epigallocatequina	Sigma E-3768
(-)-Galato de epicatequina	Sigma E-3893
(-)-Galato de epigallocatequina	Sigma E-4143
Procianidina B1	Extrasintese 0983
Procianidina B2	Extrasintese 0984
Siringaldeído	Sigma S-760-2
Rutina	Sigma R-5143
Miricetina	Sigma M-6760
Trans-Resveratrol	Sigma R-5010
Quercetina	Fluka 83370
Morina	Sigma M-4008
Kampferol	Sigma K-0133
Triptofol	Sigma T-90301
5-Hidroximetilfurfural	Merck 820678
<i>p</i> -Hidroxibenzaldeído	Merck 804536
5-Metilfurfural	Fluka 66911
Aldeído vanílico	Merck 818718
Ácido trans-cinâmico	Sigma C-6004

- Determinação de TBARS e de proteína dos tecidos animais

Ácido clorídrico 32%	Merck 100317.1000
BHT	B 1253
Etanol	Sinth E 1008.02
Ácido tiobarbitúrico	Sigma T 5500
Hidróxido de sódio	PA H 1017.01.AH
N-butanol	Merck 1.01990.1000
1,1,3,3,tetrametoxipropano	Merck 1.07850.1003
Soroalbumina bovina- BSA	Sigma A 4503

- Determinação das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase, glutational peroxidase e glutational redutase)

NaH_2PO_4	Sigma S-9638
K_2HPO_4	Probus 145110
Periodol 30%	Sigma Aldrich H 1009
Tampão tris	Sigma T 3253
Terc- butila	Sigma B 2633
EDTA	PA 13260
Xantina	Sigma 1458
Xantina oxidase	Sigma Aldrich 1875
Glutational reduzida	Sigma Aldrich G 4251
Glutational oxidada	Sigma 9027
Glutational redutase	Sigma G 3664
Citocromo C	Sigma C 7752
β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH)	Sigma N 1630

4.2. Métodos

4.2.1. Análise da composição centesimal

A determinação de umidade foi feita pela secagem em estufa (marca Universal FA BB-PRIMAR modelo 219) a 105° C até peso constante (AOAC, 1998; método 985.14). A determinação do resíduo mineral fixo (cinzas) foi realizada pela incineração em mulfla (marca Universal) a 550° C (AOAC, 1998; método 930.22). As proteínas foram determinadas pelo método de Kjeldahl, utilizando o fator de 6,25 (polpa) e 5,30 (amêndoa) para conversão do nitrogênio em proteína (AOAC, 1998; método 991.20). Os lipídeos totais foram obtidos com extração da fração etérea por fluxo intermitente, utilizando éter etílico como solvente sob refluxo, em aparelho de Soxhlet (AOAC, 1998; método 963.15). A fração fibra alimentar total, nas amostras previamente desengorduradas, foi determinada pelo método gravimétrico enzimático (AOAC, 1998; método 985.28). Os carboidratos foram obtidos por diferença. Calculou-se o valor energético total (VET), considerando-se os fatores de conversão de 4 kcal/g de proteína, 4 kcal/g de carboidrato e 9 kcal/g de lipídeo, conforme Ferreira (1983).

4.2.2. Determinação da composição em ácidos graxos da polpa e da amêndoa do pequi

Obtenção da fração lipídica

Realizou-se previamente a extração dos lipídeos: a 1 g de cada amostra (de polpa e de amêndoa) foram adicionados 10 mL de metanol e homogeneizados em turrax (marca yellow line DI 25 basic) por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 20 mL de clorofórmio às misturas, novamente homogeneizadas, por 2 minutos, e

então, filtradas a vácuo em funil de *Bücker* acoplado a um kitassato. O resíduo formado foi separado e ressuspenso com 30 mL de uma solução de clorofórmio/metanol (2:1 v/v), homogeneizado por 3 minutos e filtrado em funil de *Bücker*. Os dois filtrados foram combinados e transferidos para proveta de 100 mL, onde o volume foi aferido. Adicionou-se então $\frac{1}{4}$ deste volume de KCl (0,88%) e agitou-se manualmente. A fase superior foi aspirada a vácuo. Novamente, aferiu-se o volume e acrescentou-se $\frac{1}{4}$ de metanol/água (1:1), agitando-se manualmente. Mais uma vez, a camada superior foi aspirada a vácuo, e a solução restante foi filtrada e desidratada em sulfato de sódio anidro. Posteriormente, o solvente foi evaporado em rotoevaporador (Marca Marconi) sob vácuo a 38° C (FOLCH e STANLEY,1957).

Obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos

Em tubos de vidro com tampa rosqueada, foram colocados 300 μ L do extrato etéreo da polpa e da amêndoa, em triplicata, aos quais se adicionaram 2 mL de KOH metanólico (0,5 M). Em seguida, os tubos foram agitados vigorosamente e levados ao banho-maria fervente por cinco minutos. Após resfriamento, a uma temperatura de aproximadamente 40° C, foram adicionados 6 mL da mistura de esterificação. Os tubos foram novamente colocados em banho-maria fervente por três minutos. A seguir, 5 mL de solução saturada de NaCl foram misturados à solução, então agitada vigorosamente. Posteriormente, foram realizadas três extrações com 2 mL de hexano (para cada extração). Ao final, transferiu-se a fase orgânica (superior) para outro tubo, onde foi homogeneizada, e adicionaram-se 5 mL de solução saturada de NaCl. A camada superior (ésteres metílicos de ácidos

graxos) foi transferida para outro tubo, de onde foi evaporada com nitrogênio gasoso e ressuspensa em 1 mL de hexano (HARTMAN e LAGO, 1973).

Análise cromatográfica

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a gás GC 17A (SHIMADZU) com *software* Class GC. Utilizou-se uma coluna de sílica fundida SUPELCOWAX 10 (polietilenoglicol, 30 m de comprimento; 0,25 mm d.i. e 0,25 μ de fase estacionária) e detector de ionização de chama.

Condições cromatográficas

A programação usada seguiu os seguintes parâmetros:

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

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

4.2.3. Preparação dos extratos etéreo, alcoólico e aquoso da polpa e da amêndoa do pequi

Foram obtidos, de forma seqüencial, os extratos etéreo, alcoólico e aquoso a partir de 5 g de polpa, previamente seca em estufa, e 5 g de amêndoa triturada em

moinho analítico (conforme descrito no subitem 4.1.1.), seguindo o fluxograma apresentado a seguir:

Esquema 1. Obtenção dos extratos etéreo, alcoólico e aquoso da polpa e da amêndoa do pequi, por extração sequencial, usando solventes de diferentes polaridades (JARDINI e MANCINI-FILHO, 2007)

4.2.4. Extração e quantificação dos ácidos fenólicos da polpa e da amêndoa

Para a extração dos ácidos fenólicos das amostras, utilizou-se a metodologia descrita por Krygier, Sosulski e Hooger (1982), que obtém, de forma sequencial, os ácidos fenólicos livres (AFL), os ácidos fenólicos de ésteres solúveis (AFS) e os ácidos fenólicos de ligantes insolúveis (AFI), conforme descrito a seguir:

Ácidos fenólicos livres

Tomou-se 1 g de cada amostra desengordurada (polpa e amêndoa) e adicionou-se o solvente THF (6 volumes de 20 mL), homogeneizando por um minuto (homogeneizador turrax, marca Yellow Line DI 25 basic). Os sobrenadantes obtidos de

cada extração foram filtrados e desidratados em sulfato de sódio anidro, em balão protegido da luz. O solvente foi rotaevaporado, sob vácuo, a 38° C, restando os ácidos fenólicos livres que foram ressuspensos em 5 mL de metanol e armazenados, em vidros âmbar, a -20° C.

Ácidos fenólicos solúveis

O resíduo formado na primeira fase da etapa anterior foi submetido a seis novas extrações. Em cada extração adicionaram-se ao resíduo 20 mL da solução metanol/acetona/água (7:7:6). A mistura foi homogeneizada por cinco minutos e filtrada. O filtrado foi rotoevaporado sob vácuo, a 38° C, até a fase aquosa.

Com o objetivo de liberar ésteres solúveis esterificados com proteínas ou polipeptídios, à fase aquosa obtida adicionou-se o mesmo volume de NaOH (4 M). A hidrólise se deu por 4 horas, sob agitação, em temperatura ambiente e protegida da luz. Em seguida, o pH da solução foi corrigido para 2 ($\pm$ 0,1) com HCl (6 M). A solução resultante foi medida e transferida para um funil de separação, onde foi submetida a cinco lavagens com igual volume de hexano, agitando-se manualmente, para eliminação de ácidos graxos livres e outros contaminantes (glicosídeos) presentes na fase superior, desprezada a cada lavagem. Novamente, o volume foi aferido e realizadas cinco extrações com solução de éter etílico/acetato de etila/THF (1:1:1), também em funil de separação, agitando-se manualmente. A cada extração, o conteúdo da fase superior foi filtrado, desidratado em sulfato de sódio anidro e recolhido em balão protegido da luz; em seguida rotoevaporado a 38° C. Os ácidos fenólicos solúveis foram então ressuspensos em 5 mL de metanol e armazenados, em vidros âmbar, a -20° C.

Ácidos fenólicos insolúveis

O resíduo proveniente da extração dos ácidos fenólicos solúveis foi hidrolisado com 15 mL de NaOH (4 M) por 4 horas, à temperatura ambiente e protegido da luz. Em seguida, o pH da solução foi corrigido para 2 ($\pm 0,1$) com HCl 6 M. A partir dessa etapa, todo o procedimento de extração dos ésteres de ácidos fenólicos insolúveis seguiu o mesmo procedimento para a obtenção dos ácidos fenólicos solúveis, descrito anteriormente.

4.2.5. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos por HPLC

Utilizou-se um equipamento de HPLC Agilent série 1100, equipado com um detector com disposição de diodo (DAD), uma bomba quaternária e um injetor automático. A separação foi realizada utilizando uma coluna Zorbax StableBond C18 (30 mm x 4,6 mm) cujo tamanho das partículas eram de 3,5 μm , a 30° C. A detecção do DAD foi realizada entre 280 e 520 nm. Foram injetados 20 μL de cada amostra previamente filtrada (filtro Millex-LCR de 13 mm, PTFE 0,45 μm).

O método utilizado foi proposto por Ibern-Gomez *et al.* (2002). A fase móvel foi composta por dois eluentes: A (ácido tricloroacético a 0,2%, dissolvido em água) e B (acetonitrila - pH 1,5 - ajustado com ácido tricloroacético). Os eluentes foram injetados a um fluxo de 4 mL/min. Ao final da injeção de cada amostra, sempre se lavava o aparelho com água mili-Q. O gradiente de eluição dos solventes está descrito na tabela 2.

Tabela 2. Gradiente de eluição das fases móveis ao longo do tempo de análise dos compostos fenólicos do pequi

Tempo (min)	Solvente A*% (v/v)	Solvente B**% (v/v)
0	100	0
2	98	2
8	92	8
15	85	15
18	77	23

* Ácido tricloroacético a 0,2% dissolvido em água

**Acetonitrila a pH 1,5

A identificação dos compostos fenólicos presentes nas amostras foi realizada por superposição dos respectivos espectros com os dos padrões correspondentes. Para quantificação dos teores dos compostos fenólicos fracionados, utilizaram-se as áreas dos picos de cada um deles e estabeleceram-se as respectivas curvas de calibração dos padrões injetados (Sigma) vide tabela 3.

Tabela 3. Curva de calibração de padrões polifenólicos usados na quantificação dos compostos presentes na polpa e na amêndoa do pequi

Nome do composto	Concentração (mg/L)	Equação da reta	T _R (min)	Longitude de onda	R ²
Ácido gálico	10-100	Y = 12,8x - 9,1	0,5	280	0,999954
Ác. elágico	3,2 – 50	Y = 1,211117x + 3,42861	9,8	280	0,99240
Ác. p-cumámiro	25 -100	Y = 26,7983x – 4,76394	5,4	320	0,99959
Galato de etila	2,5-25	Y = 12,7x – 4,6e ⁻¹	5,6	280	0,99999
Ác. 4-OH benzóico	25/100	Y = 8,36x – 4,771	2,2	280	0,9998
Procianidina B2	10-100	Y = 2,46047X + 9,73302	6,168	280	0,99243

4.2.6. Quantificação dos carotenóides totais

A 2 e 5 gramas de polpa e de amêndoa de pequi, respectivamente, adicionaram-se 40 mL de acetona, homogeneizando-se por 2 minutos em agitador magnético; filtrando-se, em seguida, sob vácuo. Ao resíduo, adicionou-se 30 mL de acetona, homogeneizando-se por mais três vezes. Os pigmentos foram então transferidos da acetona para o éter de petróleo, realizando-se lavagem exaustiva com água destilada, em funil de separação (ALMEIDA e PENTEADO, 1998). A quantificação foi realizada em espectrofotômetro Hitachi (modelo U-3410) a 450 nm, usando éter de petróleo como branco, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{\mu\text{g de carotenóides/}}{\text{g de amostra}} = \frac{\text{absorbância} \times \text{volume da solução} \times 10^6}{100 \times E_{1\text{cm}}^{1\%} \times \text{peso da amostra}}$$

onde: $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2.592$ (coeficiente de absortividade)

4.2.7. Quantificação dos fenólicos totais

As amostras da polpa e da amêndoa do pequi foram previamente preparadas de acordo com o método de Fantozzi e Montedoro (1978). Cada amostra (2 g) foi homogeneizada com 100 mL da solução metanol/água (80/20), por 1 hora. O sobrenadante obtido foi filtrado; e o volume final, corrigido com metanol para 100 mL.

A determinação dos fenólicos totais seguiu a metodologia descrita por Swain e Hills (1959). Do filtrado final de cada amostra, tomou-se 0,5 mL e adicionaram-se 8 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente *Folin Ciocalteu*. A solução foi homogeneizada e, após 3 min, acrescentou-se 1 mL de solução saturada de NaCO_3 . Decorrida 1 hora de repouso, foram realizadas as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro SPECTRONIC® 20 GENESYS™ (Rochester, USA), a 720 nm.

Utilizou-se como padrão o ácido gálico, nas concentrações de 50, 100, 150, 250 e 500 mg/L para construir uma curva de calibração (figura 12). A partir da reta obtida, realizou-se o cálculo do teor de fenólicos totais, expresso em mg de ácido gálico/g de amostra.

Figura 12. Curva de calibração de ácido gálico (mg/L)

4.2.8. Avaliação da Atividade antioxidante *in vitro* da polpa e da amêndoa do pequi

4.2.8.1. Ensaio em sistema β -caroteno/ácido linoléico

Os procedimentos de análise foram realizados de acordo com o método descrito por MILLER (1971), que se baseia na oxidação (descoloração) do β -caroteno em uma determinada emulsão. A descoloração é observada diretamente em colorímetro.

Para formar a emulsão, adicionaram-se 20 μ L de solução de β -caroteno dissolvido em clorofórmio (20 mg/mL), 40 μ L de ácido linoléico, 530 mg de emulsificante *Tween* 40 e 1 mL de clorofórmio (para completar emulsificação). A

emulsão foi evaporada com nitrogênio gasoso. Acrescentaram-se, então, 100 mL de água destilada previamente oxigenada (por trinta minutos). A solução emulsionada foi diluída até atingir a faixa de densidade ótica, entre 0,6 – 0,7 nm.

Em tubos calibrados para leitura no espectrofotômetro, foram tomados 5 mL da solução emulsionada e adicionados a diferentes volumes de extratos ou frações, isolados ou associados ao BHT, além do BHT isolado, nas concentrações de 10, 20, 40, 50, 100 e 200 ppm. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e acompanhadas de um controle, sem antioxidante.

Imediatamente após a adição da solução emulsionada às substâncias antioxidantes naturais e ao BHT, ou seja, no tempo zero (A_0), foram realizadas as leituras de cada tubo em espectrofotômetro SPECTRONIC[®] 20 GENESYS[™] (ROCHESTER), a 470 nm. A seguir, os tubos foram colocados em banho-maria a 50° C e, a cada intervalo de quinze minutos, por um período de duas horas (A_t), foram realizadas as leituras das absorbâncias.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de oxidação, conforme o cálculo expresso na fórmula a seguir:

$$\% \text{ de Oxidação} = \frac{\bar{X} \text{ da Abs. amostra}^1 \times 100}{\bar{X} \text{ da Abs. controle}^2}$$

$$\% \text{ de Proteção} = 100 - \% \text{ de Oxidação}$$

¹ $\bar{X}$ da diferença das absorbâncias de cada amostra ($Abs. am_i - Abs. am_f$)

² $\bar{X}$ da diferença das absorbâncias de cada controle ($Abs. c_i - Abs. c_f$)

O decaimento da densidade ótica do controle ($Ac_0 - Ac_f$) foi considerado como 100% de oxidação. A partir dessa relação, o decréscimo na leitura da absorbância

das amostras foi correlacionado com o controle, desse modo estabelecendo o percentual de inibição da oxidação das amostras antioxidantes.

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

Para verificar a eficiência estimada da ação antioxidante dos extratos e frações, bem como do BHT, realizou-se uma avaliação a partir das tangentes (tg) de dois intervalos das curvas cinéticas, conforme descrito no subitem 2.5.3. Os valores de F1 e F2 foram calculados de acordo com a Figura 13:

FIGURA 13. Curva de decaimento da densidade ótica em sistema de co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico. A relação entre as tangentes representa os fatores cinéticos F1 e F2, nos quais, (a) e (A) são os catetos opostos, obtidos pela diferença das leituras das absorbâncias da amostra e do branco, respectivamente; (b) e (B) são os catetos adjacentes, obtidos pela diferença entre os tempos da amostra e do branco, respectivamente. Adaptado de JARDINI e MANCINI-FILHO (2007).

$$F1 = \frac{\text{tg extrato}_{(15\ 45)}}{\text{tg controle}_{(15\ 45)}}$$

$$F2 = \frac{\text{tg extrato}_{(75\ 105)}}{\text{tg controle}_{(75\ 105)}}$$

Quando a razão entre essas tangentes (F1 ou F2) apresentarem valores inferiores a 1, o composto testado atua eficientemente como antioxidante; quando o valor apresentado for acima de 1, indica uma ação pró-oxidante do composto.

4.2.8.2. Método do radical DPPH•

O ensaio de captura de radicais DPPH•, desenvolvido por Blois (1958) e adaptado por Brand-Willians (1995), tem por base a redução do radical [2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•)], que ao fixar um H• (removido do antioxidante em estudo), leva a uma diminuição da absorbância, permitindo calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50 % do radical DPPH•.

Para a avaliação da atividade antioxidante dos extratos e ácidos fenólicos presentes na polpa e na amêndoa do pequi, bem como do padrão BHT, adicionou-se a 1,5 mL de solução metanólica de DPPH• ($6 \times 10^{-5} \text{M}$) uma alíquota de 0,5 mL das soluções contendo diferentes concentrações de cada extrato e fração de ácidos fenólicos estudados, além do BHT. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro SPECTRONICS 20 GÊNESIS a 517 nm, após 20 minutos do início da reação. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e acompanhadas de um controle (sem antioxidante). A queda na leitura da densidade ótica das amostras e do BHT foi correlacionada com o controle, estabelecendo-se a porcentagem de descoloração do radical DPPH, conforme fórmula abaixo.

$$\% \text{ de proteção} = (\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}) / \text{Abs}_{\text{controle}}$$

Foi também calculado o valor EC₅₀ (concentração da amostra necessária para inibir 50% do radical).

4.2.8.3. Método do radical ABTS

Consiste em verificar como os antioxidantes são capazes de degradar os radicais livres presentes no meio. Inicialmente, gera-se o radical colorido; em

seguida, adiciona-se o antioxidante; posteriormente, mede-se o decréscimo de absorbância produzido. Quanto maior a atividade antioxidante do composto testado, maior será o decréscimo na absorbância.

Para a determinação da atividade antioxidante, usou-se a metodologia descrita por Re *et al.* (1999). Inicialmente, formou-se o radical ABTS^{•+}, a partir da reação de 7 mM de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio (concentração final), incubada à temperatura ambiente e na ausência de luz, por 12 horas. Transcorrido esse tempo, a solução foi diluída em etanol até obter-se uma solução com absorbância de 0,70 ($\pm$ 0,01), a 734 nm (longitude de onda de máxima absorção). As amostras foram diluídas em etanol até obter-se 20-80% de inibição do radical, e comparadas com a absorção do branco.

Para realizar as medidas, foram adicionados 40 μ L da amostra diluída a 1960 μ L da solução contendo o radical, determinando-se a absorbância em espectrofotômetro (Hitachi UV-2800[®]), a 734 nm, após 2, 4, 6, 10, 20, 30 e 60 minutos de reação. Como solução padrão, usou-se o antioxidante sintético trolox nas concentrações de 20 a 50 μ M em etanol (figura 14). Todas as leituras foram realizadas em triplicata, e os resultados foram expressos em mM de trolox por grama de amostra.

Figura 14. Curva de calibração-resposta da porcentagem de inibição de trolox em etanol (20 a 50 μ M) frente ao radical ABTS^{•+}

4.2.8.4. Capacidade de absorbância de radicais oxigênio usando fluoresceína como marcador fluorescente (ensaio ORAC-FL)

Baseia-se no ataque de radicais livres, gerados pelo AAPH, que vão degradar a estrutura química da fluoresceína (3',6'-dihidroxiestero (isobenzofuran-1[3H],9'[9H]-xanten]-3-ona), levando à perda de sua conformação inicial com o conseqüente decréscimo da emissão de fluorescência (OU *et al.*, 2001).

Para a realização do ensaio, foram adicionados 150 μ L de amostra + 150 μ L FL (2,934 mg/L) + 75 μ L AAPH (221,25 mM) em uma cubeta de quartzo. As leituras foram realizadas imediatamente, em fluorímetro Hitachi (modelo F-2500, termostatizado). Determinou-se a fluorescência das amostras ($\zeta_{\text{excitação}}$: 490 nm e $\zeta_{\text{emissão}}$: 515 nm) a cada 5 minutos, durante 1 hora, até que caísse aproximadamente a zero ou a um valor inferior a 5% do valor inicial. O ensaio transcorreu a uma temperatura de 37° C. Como padrão, utilizou-se o trolox a uma concentração de 20

μM; como branco, uma solução tampão (pH =7,0) nas mesmas condições descritas para as amostras.

Calculou-se o valor ORAC pela área sob a curva de emissão da fluorescência, recorrendo simultaneamente às informações de intensidade e de tempo.

$$\text{Valor ORAC } (\mu\text{M}) = 20K (S_{\text{amostra}} - S_{\text{branco}}) / (S_{\text{trolox}} - S_{\text{branco}})$$

20 = concentração de trolox

K = fator de diluição da amostra

S = área sob a curva de decréscimo da fluorescência da amostra, do trolox e do branco. Calcula-se com a seguinte fórmula:

$$S = (0,5 + f_5 / f_0 + f_{10} / f_0 + f_{15} / f_0 + \dots + f_{65} / f_0 + f_{70} / f_0) \times 5$$

f_0 : fluorescência inicial no tempo zero

f_i : fluorescência medida no tempo i (minutos)

Os resultados finais se expressam usando equivalentes de trolox (μmol/g): μmol de equivalentes de trolox por grama de amostra.

4.2.8.5. Método do RANCIMAT (sistema lipídico)

A capacidade antioxidante dos extratos e frações de ácidos fenólicos da polpa e da amêndoa, além do BHT, foram determinadas pela medição do tempo de indução para autooxidação de óleo de soja comercial sem antioxidante (fornecido pela Cargill Agrícola S.A.), usando um analisador Rancimat[®] (modelo 743, Metrohm Ltd., Herisau, Suíça), com o software PC 743 Rancimat 1.0.

Os extratos e/ou frações de ácidos fenólicos da polpa e da amêndoa do pequi e o antioxidante sintético BHT foram adicionados a tubos contendo 5 g de óleo de

soja sem antioxidante, de forma que a concentração final na solução correspondesse a 100 ou 200 ppm. Em seguida, a mistura foi homogeneizada por 15 minutos em aparelho de ultra-som e, logo após, os tubos foram acoplados ao aparelho Rancimat, previamente programado a uma temperatura de 110 ° C e fluxo de oxigênio de 20 L/h. O controle consistiu de óleo de soja, apenas. Os períodos de indução da oxidação do óleo (em horas) foram registrados automaticamente pelo software do aparelho. Os resultados foram expressos em porcentagem de aumento do período de indução em relação ao controle, conforme a fórmula a seguir:

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

Onde: % PI = % de aumento do período de indução

PI amostra = período de indução do óleo de soja mais amostra

PI controle = período de indução do óleo de soja sem antioxidante

4.2.9. Avaliação da atividade antioxidante *in vivo*

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, var. albinus) da linhagem “Wistar”, recém-desmamados, pesando 60 g (± 5), provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, a uma temperatura de 22° C (± 2), em ciclo claro/escuro de 12h, alimentados com ração comercial (Nuvilab CR-1, descontaminada e irradiada a 12 kgray, vide anexo 02) e água *ad libitum*, suplementados com extrato aquoso e fração de ácidos fenólicos livres da polpa de pequi. A fração AFL foi emulsificada em água, utilizado o solvente propilenoglicol a 0,5%.

O experimento teve uma duração total de 37 dias. Nos primeiros sete dias, os animais ficaram em adaptação; nos trinta dias restantes, foram administrados os extratos e frações de ácidos fenólicos livres, por gavagem, diariamente, em diferentes concentrações. Os animais receberam a última dose das substâncias testadas cerca de 16 horas antes do sacrifício.

Foram utilizados 40 animais, divididos em 05 grupos de oito, aos quais foram administradas as substâncias abaixo relacionadas, sempre no volume de 0,5mL/100g de peso:

- **Controle:** água autoclavada
- **Grupo G1:** extrato aquoso da polpa de pequi (100 mg/kg peso)
- **Grupo G2:** extrato aquoso da polpa de pequi (300 mg/kg peso)
- **Grupo G3:** fração de ácidos fenólicos livres, da polpa de pequi (40 mg/kg peso)
- **Grupo G4:** fração de ácidos fenólicos livres, da polpa de pequi (100 mg/kg peso)

A ingestão alimentar e o peso dos animais foram controlados durante todo o experimento, com a finalidade de verificar o ganho de peso e o coeficiente de eficácia alimentar (CEA), foi obtido de acordo com a seguinte fórmula:

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

Decorridos 37 dias de experimento, os animais foram sacrificados para a retirada do sangue e dos tecidos cerebral e hepático, que foram analisados quanto à atividade das enzimas antioxidantes, a presença de substâncias reativas ao ácido

tiobarbitúrico (TBARS) e quanto ao perfil de ácidos graxos. Os animais foram mantidos em jejum de oito horas antes de serem sacrificados, com acesso *ad libitum* à água.

4.2.9.1. Coleta do sangue, do fígado e do cérebro

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

O abdômen foi aberto por uma incisão na linha média. Coletaram-se cerca de 6 mL de sangue pela artéria aorta, com auxílio de uma seringa. O cérebro e o fígado foram retirados e lavados com solução de NaCl 0,9%, envolvidos em papel alumínio, e imediatamente colocados em nitrogênio líquido, armazenados a -80°C.

4.2.9.2. Obtenção do plasma

O sangue coletado foi adicionado a tubos de centrifuga que continham heparina (anticoagulante), que em seguida foram centrifugados a 4.000 RPM por 10 minutos, a 4° C. O sobrenadante (plasma) coletado foi imediatamente armazenado a -80° C.

4.2.9.3. Preparo dos homogeneizados dos tecidos cerebral e hepático

Homogeneizado de cérebro

O cérebro foi retirado, pesado e homogeneizado, em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem (Marconi), com um volume de tampão fosfato de potássio (0,1 M pH 7,0) igual a quatro vezes o valor absoluto da massa da amostra. O homogeneizado foi centrifugado a 1.010 x g, por 20 minutos, à 4° C. A maior parte do sobrenadante obtido foi empregado na avaliação da lipoperoxidação. Um volume de 1 mL desse

sobrenadante foi novamente centrifugado a 11.000 x g, por 15 minutos, a 4° C, originando um novo sobrenadante, empregado na determinação da atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase, glutathione redutase e glutathione peroxidase. Todas as amostras foram colocadas em ependorf e imediatamente armazenadas a -80° C.

Homogeneizado de fígado

O fígado foi retirado, pesado e reduzido a pequenos fragmentos, com auxílio de tesoura, em solução salina 0,9%. Os fragmentos foram então homogeneizados (homogeneizador igual ao citado anteriormente), com um volume de tampão fosfato de potássio (0,1 M pH 7,0) igual a três vezes o valor absoluto da massa da amostra. O homogeneizado foi centrifugado a 1.010 x g, por 20 minutos, à 4° C. A maior parte do sobrenadante obtido foi empregado na avaliação da lipoperoxidação. Um volume de 1 mL desse sobrenadante foi novamente centrifugado a 11.200 x g, por 20 minutos, a 4° C. O novo sobrenadante obtido foi então centrifugado em ultracentrífuga a 105.000 x g, por 60 minutos, a 4° C, obtendo-se a fração citosólica para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes: catalase, superóxido dismutase, glutathione redutase e glutathione peroxidase.

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

Para a determinação da medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, usou-se o método descrito por Winterbourn, Gutteridge e Halliwell (1985). Os homogeneizados utilizados foram os descritos nos subitens **4.2.9.2. e 4.2.9.3.**

Tomou-se 0,5 mL do homogeneizado (sem diluição) do plasma, do cérebro ou do fígado, aos quais se adicionaram 0,5 mL de HCl (25%), 45 μ L de BHT etanólico (2%) e 0,5 mL de TBA (1% p/v em NaOH 0,05 M). A solução foi agitada em *vortex* e colocada em banho fervente por 10 minutos, seguindo-se o resfriamento em banho de gelo. Adicionou-se 1,5 mL de n-butanol, agitou-se e centrifugou-se a 1500 x g. Após a centrifugação, coletou-se a fase superior, que foi analisada espectrofotometricamente (espectrofotômetro HITACHI, modelo U-3410), a 532 nm. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. O branco conteve apenas n-butanol. Para realização dos cálculos, foi feita uma curva padrão com 1,1,3,3-tetrametoxipropano (6×10^{-6} mol/L) (figura 15). Os resultados foram expressos em μ Mol de equivalentes de MDA/mg de proteína.

Figura 15. Curva de calibração de 1,1,3,3-tetrametoxipropano

4.2.9.5. Determinação das enzimas antioxidantes na fração citosólica dos tecidos cerebral e hepático

A avaliação das enzimas antioxidantes presentes nos tecidos cerebral e hepático foi realizada até 15 dias após o sacrifício dos animais. O preparo dos homogeneizados foi feito conforme descrito no subitem **4.2.9.3**. Verificou-se atividade enzimática na fração citosólica do fígado e no homogeneizado do cérebro.

Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD citoplasmática foi avaliada de acordo com a metodologia de McCord e Fridovich (1969), que verifica a produção dos ânions peróxidos produzidos pela xantina oxidase na presença da xantina. O ânion superóxido produzido oxida o citocromo C; essa oxidação é medida pelo aumento da densidade ótica, a 550 nm, a 25° C.

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

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

Os resultados foram expressos em U/min/mg de proteína.

Uma unidade (U) corresponde à atividade da enzima que promove 50% de inibição da reação da xantina, a 25° C, em pH 7,8.

Determinação da atividade da catalase

A catalase propicia a oxidação do H_2O_2 a H_2O e O_2 . A metodologia empregada foi descrita por Beutler (1975), quantificando a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima, mediante a observação do decréscimo da densidade ótica a 230 nm (coeficiente de extinção molar $0,0071 \dots \text{nM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), a 37°C .

O meio de reação é composto por H_2O_2 10 mM (10 μL de peridrol 30% em 10 mL de H_2O mili-Q) e tampão Tris HCl 1M EDTA 5 mM em pH 8,0. Para a reação, foram utilizadas duas diluições: 15 μL do homogeneizado mais 985 μL do meio; e 20 μL do homogeneizado mais 980 μL do meio. As amostras (frações citosólicas) foram incubadas a 37°C . As leituras das absorbâncias foram realizadas a cada minuto, durante seis minutos. Os resultados foram expressos em U/min/mg de proteína.

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

Determinação da glutathione peroxidase (GPx)

A atividade da GPx na fração citosólica foi determinada pela metodologia padronizada por Sies *et al.* (1979), cujo método fundamenta-se na medição do decaimento da densidade ótica, promovido pela oxidação do NADPH (coeficiente de extinção molar igual a $6,22 \text{ nM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), durante a redução da glutathione oxidada (GSSG), catalisada pela glutathione redutase, a 30°C , 340 nm.

O meio de reação contém glutathione reduzida (GSH) 1 mM, glutathione redutase 0,1 U/mL, NADPH 20 mM, EDTA 5 mM (pH 7,0) e tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0). A 1 mL desse meio, acrescentaram-se 10 μL de cada amostra (fração citosólica), em triplicata, incubando-se esta solução, a 30°C , durante um minuto. Após esse tempo, adicionaram-se 10 μL de peróxido de terc-butila 0,5 mM e a solução foi novamente incubada. As leituras foram realizadas a

cada minuto, durante seis minutos. Os resultados foram expressos em U/min/mg de proteína.

Uma unidade (U) da enzima corresponde à atividade enzimática que oxida 1 μmol de NADPH por minuto, a 30° C, em pH 7,0.

Determinação da glutathione redutase (GR)

A GR catalisa a redução da GSSG através da oxidação do NADPH (coeficiente de extinção molar 6,22 $\text{nM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). A medição é feita em espectrofotômetro, a 37° C, 340 nm (SIES *et al.*, 1979).

O meio de reação é composto de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), EDTA 5 mM, GSSG 0,1 M e NADPH 20 mM. O ensaio foi realizado em duplicata. Foram tomados 50 μL da amostra e adicionados a 970 μL do meio, a solução foi incubada a 30° C. As leituras foram realizadas a cada minuto, durante seis minutos. Os resultados foram expressos em U/min/mg de proteína.

Uma unidade (U) de enzima corresponde à atividade enzimática que oxida 1 μmol de NADPH por minuto, em pH 7,0.

4.2.9.6. Quantificação de proteínas nos tecidos

A determinação do conteúdo de proteínas presentes no plasma e nos tecidos cerebral e hepático foi realizada conforme o método de Bradford (1985). Foi feita uma curva padrão de proteína com solução padrão de albumina (figura 16).

Figura 16. Curva de calibração de albumina

4.2.9.7. Determinação do perfil lipídico no plasma e nos tecidos hepático e cerebral dos animais

A extração dos ácidos graxos foi realizada segundo o método da AOAC 996.06 (1998), por hidrólise alcalina seguida de esterificação. Para a extração da gordura, foram colocados, em triplicata, em tubos de ensaio com boca rosqueada, 65 mg de cérebro, 500 mg de fígado e 250 µL de plasma, aos quais se adicionaram 12,5 mg de ácido pirogálico, 250 µL de etanol 95%, 1,25 mL de HCl 8,3 M e pérolas de vidro (para facilitar a extração). As amostras foram levadas a um banho termostatizado, com agitação moderada, a 75° C, por 40 minutos; a cada 10 minutos, foram agitadas vigorosamente em vortex. Em seguida foram deixadas à temperatura ambiente (25° C) até esfriar. Adicionaram-se 3 mL de éter etílico, agitando-se por 3 minutos. Adicionaram-se mais 3 mL de éter de petróleo, agitando-se por mais 3 minutos. Centrifugou-se o material a 6.000 RPM, por 10 minutos, a 4° C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio, imerso em banho

termostatizado, a 37° C, usando fluxo de nitrogênio gasoso, de forma a evaporar os solventes.

Para a esterificação, foram adicionados 2 mL de NaOH 0,5 N metanólico e levaram-se os tubos ao banho fervente por 05 minutos. Depois de esfriar, adicionaram-se 6 mL da mistura de esterificação, levando-se ao banho fervente por mais 3 minutos. Depois de esfriar à temperatura ambiente, adicionaram-se 5 mL de solução saturada de NaCl e 2 mL de hexano, agitando-se. A fase superior foi então transferida para outro tubo, ao qual se adicionou 1 mL de solução saturada de NaCl, agitando-se levemente. Transferiu-se a nova fase superior para outro tubo e evaporou-se em nitrogênio gasoso. Ressuspenderam-se as amostras em 1 mL de hexano, injetando-se, em seguida, no cromatógrafo.

Condições cromatográficas:

Utilizou-se um Cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama, equipado com coluna cromatográfica de sílica fundida SP-2560 (bisscyanopropil polysiloxane) com 100 metros de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. Os parâmetros foram controlados pelo software Class GC 10.

A Programação de temperatura da coluna foi a seguinte: isotérmica a 140° C, por 5 minutos; aquecimento de 4° C por minuto até 340° C, permanecendo nessa temperatura por 30 minutos. As temperaturas do vaporizador e do detector foram, respectivamente, 250° C e 260° C. Utilizou-se o hélio como gás de arraste a 1 mL/min. A alíquota injetada foi de 1 µL e a razão de divisão da amostra no injetor foi de 1/50.

A Identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizada comparando os tempos de retenção dos ésteres das amostras com os dos ácidos graxos padrões (mistura de padrões SIGMA 189.19). A quantificação foi realizada

com base na porcentagem de área dos picos. Os valores foram expressos em percentual.

4.3. Análise estatística

Neste estudo os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão. Para comparação das médias aritméticas, empregaram-se a análise de variância (ANOVA) e o teste Tukey, usando o software Prisma 4,0 (GraphPad). Adotou-se o nível de significância de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Composição química

Com vistas à consecução dos objetivos propostos, esta pesquisa se voltou, em sua primeira etapa, para a determinação da composição química das amostras selecionadas, por ensaios analíticos, utilizando métodos oficiais.

Os resultados da composição centesimal e os valores nutricionais da polpa e da amêndoa do pequi encontram-se dispostos na tabela 4, na qual se pode observar que a polpa é rica em lipídeos (33,4%) e também constitui uma fonte importante de fibra alimentar (10,02%) e de proteínas (3%). Cada 100 g de material fornece cerca de 358 kcal.

Tabela 4. Composição centesimal da polpa e da amêndoa do pequi (*Cariocar brasiliense* Camb.) em base integral em g/100g de amostra

Constituintes	Polpa (%)	Amêndoa (%)
Umidade	41,50 ± 1,04	8,68 ± 0,08
Cinzas	0,63 ± 0,01	4,01 ± 0,51
Proteína	3,00 ± 0,13	25,27 ± 0,74
Lipídeos	33,40 ± 3,76	51,51 ± 0,35
Carboidratos	11,45	8,33
Fibra alimentar total	10,02 ± 0,20	2,20 ± 0,10
VET	358,4	598,3

Valores expressos em média ± desvio padrão, n=3

Os resultados demonstram que o consumo de 100 g da polpa do pequi fornece 18% das necessidades calóricas de um adulto, com base em uma dieta de 2.000 kcal, e 40% das necessidades de fibra alimentar, com base em uma recomendação de 25 g diários (BRASIL, 2003). Isso demonstra que o consumo da polpa de pequi poderá trazer benefícios à saúde da população, tendo em vista o conhecimento de que o consumo regular de fibra alimentar na dieta está relacionado com a redução da fração LDL-colesterol no plasma, com a redução da resposta glicêmica e insulinêmica pós-prandiais, com a melhoria da função do intestino grosso e com a prevenção de alguns tipos de câncer (MICHELS, 2005). Os resultados encontrados neste trabalho para fibra alimentar (10,02g/100g) estão próximos ao detectado por Almeida (1994), que quantificou 13% nesse mesmo alimento.

Com relação à amêndoa do pequi, observa-se, na da tabela 4, que os componente majoritários são formados pelos lipídeos (51,51%), proteínas (25,27%); carboidratos (8,33%) e fibra alimentar (2,2%).

Ainda na tabela 4, observa-se que a amêndoa possui um teor de umidade extremamente baixo (8,68%) e um elevado teor de minerais, representado pelas cinzas (4,01%). É um alimento altamente energético (598 kcal/100g).

5.1.1. Caracterização da fração lipídica

O teor de cada diferente ácido graxo que compõem a fração lipídica da polpa e da amêndoa do pequi se encontra na tabela 5. Como se observa nessa tabela, na polpa e na amêndoa predominam os ácidos graxos insaturados, com 61,35% e 52,17%, respectivamente. Na polpa, o ácido oléico está presente em maior

concentração (55,87%), seguindo-se do ácido palmítico (35,17%); os ácidos palmitoléico, cis-vacênico e linoléico estão presentes em quantidades inferiores; os ácidos láurico, mirístico, margárico, α -linolênico, araquídico e gadoléico identificaram-se apenas como traços.

Na amêndoa do pequi predominam os ácidos palmítico e oléico em quantidades praticamente iguais, 43,76% e 43,59%, respectivamente; também estão presentes os ácidos linoléico (5,51%), esteárico (2,04%), palmitoléico (1,23%); detectando-se ainda traços dos ácidos láurico, mirístico, palmitoléico, α -linolênico, gadoléico, lignocérico e docosahexaenóico.

Como se pode inferir a partir dos resultados supramencionados, tanto a polpa como a amêndoa do pequi possuem ácidos graxos importantes para compor uma dieta saudável, pois em ambas predominam o ácido oléico, que é um ácido graxo monoinsaturado muito importante no fornecimento de calorias.

Tabela 5. Composição de ácidos graxos da polpa e da amêndoa de pequi (*Cariocar brasiliense* Camb.)

Ácidos Graxos	Nº carbonos	Polpa (%)	Amêndoa (%)
Láurico	C12:0	0,04 ± 0,00	nd
Mirístico	C14:0	0,13 ± 0,01	0,46 ± 0,01
Pentadecanóico	C15:0	nd	0,04 ± 0,00
Palmítico	C16:0	35,17 ± 0,27	43,76 ± 0,04
Palmitoléico	C16:1	1,03 ± 0,00	1,23 ± 0,03
Margárico	C17:0	0,06 ± 0,00	0,09 ± 0,00
Esteárico	C18:0	2,25 ± 0,04	2,54 ± 0,06
Oléico	C18:1 n-9	55,87 ± 0,30	43,59 ± 0,16
Cis-vacênico	C18:1 n-7	1,90 ± 0,08	1,38 ± 0,01
Linoléico	C18:2	1,53 ± 0,02	5,51 ± 0,08
α-linolênico	C18:3	0,45 ± 0,00	0,09 ± 0,00
Araquídico	C20:0	0,23 ± 0,00	0,20 ± 0,00
Gadoléico	C:20:1	0,27 ± 0,01	0,04 ± 0,00
Lignocérico	C24:0	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,01
Docosahexaenóico	C22:6	nd	0,19 ± 0,02
Total de saturados		37,97	47,17
Total de insaturados		61,35	52,48
Não identificados		0,68	0,35

nd = não detectado

Valores expressos em média ± desvio padrão, amostras analisadas em triplicata

5.1.2. Determinação quantitativa de compostos fenólicos totais e de carotenóides totais

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 polpa quanto a amêndoa do pequi são ricas em lipídeos (tabelas 4 e 5), 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 radicais livres. Nestas condições, visando à proteção do vegetal, pode ocorrer a biossíntese de compostos secundários com propriedades antioxidantes, que se depositariam no fruto e na amêndoa. Na tabela 6, pode-se constatar que tanto a polpa quanto a amêndoa do pequi são fontes de compostos antioxidantes, representados pelos compostos fenólicos e carotenóides totais.

Tabela 6. Teores de fenólicos totais (expressos em equivalente de ácido gálico) e de carotenóides totais na polpa e na amêndoa de pequi (*Cariocar brasiliense* Camb.), em mg/100g de amostra seca

Constituintes	Polpa ^a	Amêndoa ^a
Fenólicos totais	209,0 ± 0,05	122,0 ± 0,05
Carotenóides totais	7,25 ± 0,6	0,295 ± 0,5

^a valores correspondem à média ± desvio padrão, n = 3

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 (*Euterpe oleracea*), com 136,8mg/100g; goiaba (*Psidium guayava*) com 83,1 mg/100g; morango (*Fragaria vesca*), com 132,1mg/100g; abacaxi (*Ananos sativa*), com 21,7mg/100g; graviola (*Anona muricata*), com 84,3mg/100g e maracujá (*Passiflora indica*), com 20,2mg/100g; sendo inferior apenas à acerola (*Malphigia glabra*), com 580,1mg/100g; e à manga (*Mangifera indica*), com 544mg/100g (KUSKOSKI *et al.*, 2005). Esses resultados apontam a polpa do pequi como um

alimento com elevada capacidade antioxidante, pois inúmeros autores têm encontrado correlação positiva entre a quantidade de fenólicos totais e a capacidade antioxidante de alimentos (FALLARERO *et al.*, 2003; KUSKOSKI *et al.*, 2005).

Na tabela 6, pode-se constatar que a polpa do pequi possui 7,25mg/100g de carotenóides totais. Godoy e Rodrigues-Amaya (1994) determinaram que os α e β carotenos juntos representam 10% dos pigmentos carotenóides totais na polpa do pequi, valores muito próximo aos detectados neste trabalho para os carotenóides totais (7,46mg/100g). Dentre os frutos do cerrado, o teor de carotenóides do pequi é superado apenas pela polpa de buriti (*Mauritia vinifera* L) que possui 16,7mg/100g (ALMEIDA e SILVA, 1994).

A amêndoa do pequi possui um teor de fenólicos de 122mg/100g e de carotenóides de 0,295mg/100g. Esses valores estão próximos aos de outras amêndoas típicas do cerrado brasileiro (CREPALDI *et al.*, 2001). As amêndoas, de uma forma geral, são fontes de lipídeos, e por isso utilizadas para extração de óleos.

5.2. Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

Como segunda etapa, esta pesquisa foi voltada para a determinação da atividade antioxidante *in vitro*, utilizando distintas metodologias descritas na literatura. Foram utilizados os extratos aquosos, alcoólicos e etéreos, além das frações de ácidos fenólicos livres, solúveis e de ligantes insolúveis da polpa e da amêndoa do pequi.

5.2.1. Sistema β -caroteno/ácido linoléico

Para avaliar a atividade antioxidante dos diferentes extratos e frações da polpa e da amêndoa do pequi, usando o ensaio do β -caroteno/ácido linoléico, foram utilizadas distintas concentrações, de forma que os antioxidantes das amostras e do padrão BHT reagissem com o sistema emulsionado, produzindo quedas da densidade óptica em intervalos passíveis de serem quantificados. Nesta metodologia a descoloração da solução de β - caroteno/ácido linoléico, em meio aquoso emulsionado, ocorre em função das estruturas radicalares formadas pela oxidação do ácido linoléico, que atacam as duplas ligações do β -caroteno, perdendo seu cromóforo, resultando na descoloração do complexo alaranjado característico da solução. A presença de antioxidantes no sistema protege o ácido linoléico, prolongando o período de formação dos radicais (HUANG e WANG, 2004). Quanto menor a queda na densidade óptica da amostra, mais potente é o antioxidante em impedir a degradação do β -caroteno.

Dos extratos obtidos, somente o extrato etéreo não pôde ser utilizado na quantificação da atividade antioxidante por este método, tendo em vista que ocorria o turvamento da solução e não havia homogeneidade ao adicionar-se o extrato, provavelmente pelo alto teor lipídico, que leva à quebra da emulsão.

A capacidade antioxidante dos extratos aquoso, alcoólico, das frações AFL, AFS e AFI da polpa do pequi podem ser vistas na tabela 7. Nessa tabela pode-se observar que o extrato aquoso e o extrato alcoólico apresentaram atividade em combater os peróxidos formados, sendo que o extrato aquoso apresentou uma atividade superior ($p < 0,05$) em relação ao extrato alcoólico. O extrato alcoólico puro apresentou uma baixa atividade antioxidante (50 ppm = 0,75%, 100 ppm = 5,7% e 200 ppm = 18,3%); já quando se misturou ao BHT, observou-se um sinergismo e a

atividade antioxidante aumentou significativamente (50 ppm = 67,5%, 100 ppm = 73,1% e 200 ppm = 77,6%). O extrato aquoso apresentou uma elevada capacidade antioxidante (50 ppm = 72,9%, 100 ppm = 84,9% e 200 ppm = 90,8%); quando associado ao BHT, os valores de atividade antioxidante praticamente não se alteraram, principalmente nas concentrações de 100 e 200 ppm. Esses dados são corroborados por vários autores que estudaram diferentes matrizes alimentares em que o extrato aquoso apresentou uma atividade antioxidante superior aos demais extratos (VIDAL *et al.*, 2006; JARDINI e MANCINI-FILHO, 2007; ROESLER *et al.*, 2007). Sabe-se que a maioria dos compostos fenólicos são polares, portanto solúveis na água.

Todas as frações de ácidos fenólicos apresentaram uma elevada atividade em proteger o sistema contra os radicais peróxido gerados, todas as frações foram superiores ($p < 0,05$) ao padrão comercial BHT. Conforme observado na tabela 7, a fração AFL apresentou uma proteção da oxidação de 85%, 90% e 93,5% nas concentrações de 10, 20 e 50 ppm respectivamente, valores superiores ($p < 0,05$) ao BHT, que apresentou uma proteção de 15, 30 e 65% nas concentrações de 0,2; 0,4 e 1 ppm respectivamente. Quando se associaram as frações de ácidos fenólicos ao BHT, não se observou sinergismo, pois os valores da proteção da oxidação do sistema, de uma forma geral, tenderam à diminuição, mas não significativamente; exceto para a fração AFI + BHT na concentração de 50 ppm.

A fração AFI apresentou os maiores valores de atividade antioxidante. Essa fração é mais rica em ácidos fenólicos (vide tabela 17, subitem 5.3).

De acordo com a tabela 7, pode-se observar ainda que a atividade antioxidante elevou-se com o aumento da concentração, tanto para os extratos como para as frações de ácidos fenólicos.

Diversos autores utilizaram o método do β -caroteno/ácido linoléico para avaliar a capacidade antioxidante de frutos, sementes oleaginosas e outros alimentos. Araújo (2007) avaliou diferentes extratos e frações de ácidos fenólicos de café *Arábica*; Shahidi *et al.* (2007) avaliaram o potencial antioxidante de extratos etanólicos de avelãs e seus subprodutos; Jardini e Mancini-Filho (2007) avaliaram os extratos aquosos e alcoólicos da polpa e da semente da romã; Hassimoto *et al.* (2005) avaliaram a atividade antioxidante de diferentes frutas; Suja *et al.* (2005) determinaram a atividade antioxidante do extrato metanólico da torta de gergelim; e Jayaprakassha *et al.* (2001) quantificaram a capacidade antioxidante de extratos de sementes de uva.

Tabela 7. Atividade antioxidante de extratos e frações de ácidos fenólicos da polpa de pequi pelo método do β -caroteno/ácido linoléico

Extratos e frações	% de inibição da oxidação				
	Concentração (ppm)				
	10	20	50	100	200
Extrato alcoólico	na	na	0,75 $\pm$ 0,02 ^a	5,7 $\pm$ 0,03 ^a	18,3 $\pm$ 0,10 ^a
Extrato alcoólico +BHT	na	na	67,5 $\pm$ 1,11 ^b	73,1 $\pm$ 1,20 ^b	77,6 $\pm$ 1,24 ^b
Extrato aquoso	na	na	72,9 $\pm$ 1,54 ^c	84,9 $\pm$ 1,32 ^{b,c}	90,8 $\pm$ 1,89 ^c
Extrato aquoso + BHT	na	na	81,5 $\pm$ 1,43 ^d	86,6 $\pm$ 1,32 ^c	89,2 $\pm$ 1,76 ^c
AFL	85,0 $\pm$ 1,87	90,0 $\pm$ 1,97 ^{c,d}	93,5 $\pm$ 2,01 ^{e,f}	na	na
AFL + BHT	80,7 $\pm$ 1,21 ^{b,c}	86,6 $\pm$ 1,32 ^{b,c}	91,8 $\pm$ 1,56 ^e	na	na
AFS	80,0 $\pm$ 1,45 ^c	83,0 $\pm$ 1,87 ^b	90,0 $\pm$ 1,48 ^e	na	na
AFS +BHT	75,8 $\pm$ 1,43 ^b	82,1 $\pm$ 1,32 ^b	84,0 $\pm$ 1,76 ^d	na	na
AFI	91,0 $\pm$ 1,86 ^d	94,0 $\pm$ 1,92 ^d	97,0 $\pm$ 1,94 ^f	na	na
AFI + BHT	75,7 $\pm$ 1,11 ^b	83,6 $\pm$ 1,26 ^b	90,7 $\pm$ 1,43 ^e	na	na
BHT*	15,0 $\pm$ 0,70 ^a	30,0 $\pm$ 0,87 ^a	65,0 $\pm$ 1,03 ^b	87,3 $\pm$ 1,23 ^c	91,8 $\pm$ 1,65 ^c

na = não avaliado

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão, n = 3

(AFL) Frações de ácidos fenólicos livres, (AFS) esterificadas solúveis, (AFI) insolúveis

* A concentração do BHT utilizada foi de 0,2; 0,4; 1; 2 e 4 ppm para efeito de comparação com os diferentes extratos da polpa e da amêndoa do pequi

^{a,b,c,d,e,f} Médias, na mesma coluna, seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si e com o padrão BHT em nível de 5% (p<0,05)

A atividade antioxidante dos extratos e frações de ácidos fenólicos da amêndoa do pequi, utilizando o método do β -caroteno/ácido linoléico, encontra-se disposta na tabela 8. Na qual se pode verificar que semelhante à polpa do pequi, na amêndoa o extrato aquoso apresentou uma atividade antioxidante muito elevada, superior ao extrato alcoólico. Entretanto o extrato alcoólico também apresentou uma capacidade considerável de combater os peróxidos (50 ppm = 24,2%, 100 ppm =

39,6% e 200 ppm = 47,9%) e quando associado ao BHT, verificou-se um sinergismo, pois a atividade antioxidante aumentou significativamente (50ppm = 55%, 100 ppm = 75% e 78,3 ppm = 90,8%). O extrato aquoso na concentração de 50 ppm apresentou uma atividade antioxidante de 86,1%, superior ao BHT($p<0,005$). Entretanto quando se aumentou a concentração do extrato, pôde-se verificar que não houve uma correspondente elevação na atividade antioxidante (100 ppm = 86,9% e 200 ppm = 85,4%); provavelmente ocorreu uma saturação do sistema.

Usando também o método do β -caroteno/ácido linoléico, Giada (2006) observou que os extratos aquoso e alcoólico da semente de girassol forneceram uma proteção da oxidação do β -caroteno de 35,1 e 4,2%, respectivamente, na concentração de 200 ppm, após duas horas de ensaio; Jayaprakasha et al. (2001) quantificaram a capacidade antioxidante de extratos de sementes de uva e observaram que o extrato hidroalcoólico a 100 ppm protegeu o sistema entre 65 e 90%, valores superiores ao padrão BHA utilizado; Wettasinghe e Shahidi (1999) observaram uma atividade antioxidante de 81% para o extrato etanólico da semente de borage (*Borago officinalis* L.) a 200 ppm .

Todas as frações de ácidos fenólicos da amêndoa do pequi apresentaram uma elevada capacidade antioxidant,e sempre superior ao BHT ($p<0,05$), nas concentrações estudadas. As frações de ácidos fenólicos são frações purificadas de compostos fenólicos, o que justifica uma atividade antioxidante tão elevada. Observa-se, a partir da tabela 8, que as frações isoladas apresentaram melhores valores de proteção à oxidação do que quando associados ao BHT, portanto não há sinergismo. Há de se destacar a fração de ácidos fenólicos insolúveis, que apresentou uma proteção de 92, 95, e 96% nas concentrações de 10, 20 e 50 ppm, respectivamente.

Shahidi *et al.* (2007), avaliando o potencial antioxidante de uma mistura das frações de ácidos fenólicos da avelã (*Corylus avellana* L), observaram uma proteção de 62,2 e 63,5% nas concentrações de 50 e 100 ppm, respectivamente, e uma correlação positiva entre a atividade antioxidante pelo método β -caroteno e o método DPPH.

Tabela 8. Atividade antioxidante de extratos e frações de ácidos fenólicos da amêndoa de pequi pelo método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico

Extratos e frações	% de inibição da oxidação				
	Concentração (ppm)				
	10	20	50	100	200
Extrato alcoólico	na	na	24,2 $\pm$ 0,42 ^a	39,6 $\pm$ 0,51 ^a	47,9 $\pm$ 0,76 ^a
Extrato alcoólico+BHT	na	na	55,0 $\pm$ 1,02 ^b	75,0 $\pm$ 1,24 ^b	78,3 $\pm$ 1,02 ^b
Extrato aquoso	na	na	86,1 $\pm$ 1,03 ^d	86,9 $\pm$ 1,92 ^c	85,4 $\pm$ 1,36 ^c
Extrato aquoso + BHT	na	na	89,3 $\pm$ 1,32 ^e	92,4 $\pm$ 0,99 ^d	94,4 $\pm$ 1,03 ^d
AFL	90,0 $\pm$ 1,04 ^{c,d}	94,0 $\pm$ 1,08 ^b	95,0 $\pm$ 1,82 ^f	na	na
AFL + BHT	86,7 $\pm$ 1,34 ^{b,c}	91,0 $\pm$ 1,65 ^b	94,0 $\pm$ 1,32 ^f	na	na
AFS	91,0 $\pm$ 1,87 ^{c,d}	95,0 $\pm$ 1,98 ^b	98,0 $\pm$ 1,78 ^f	na	na
AFS +BHT	84,5 $\pm$ 1,45 ^b	94,0 $\pm$ 1,78 ^b	96,0 $\pm$ 1,87 ^f	na	na
AFI	92,0 $\pm$ 1,45 ^d	95,0 $\pm$ 1,32 ^b	97,0 $\pm$ 1,32 ^f	na	na
AFI + BHT	87,9 $\pm$ 1,32 ^{b,c}	92,1 $\pm$ 1,09 ^b	96,0 $\pm$ 1,43 ^f	na	na
BHT*	15,0 $\pm$ 0,70 ^a	30,0 $\pm$ 0,87 ^a	65,0 $\pm$ 1,03 ^c	87,3 $\pm$ 1,23 ^c	91,8 $\pm$ 1,65 ^d

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão, n = 3

na = não avaliado

(AFL) Frações de ácidos fenólicos livres, (AFS) esterificadas solúveis, (AFI) insolúveis

* A concentração do BHT utilizada foi de 0,2; 0,4; 1; 2 e 4 ppm para efeito de comparação com os diferentes extratos da polpa e da amêndoa do pequi

^{a,b,c,d,e,f} Médias, na mesma coluna, seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si e com o padrão BHT em nível de 5% (p<0,05)

No ensaio do β -caroteno/ácido linoléico, as amostras são analisadas por duas horas, realizando-se leituras a cada 15 minutos, para avaliar não só a atividade antioxidante total ao término da reação como também seu comportamento ao longo do tempo de reação. A partir dos dados obtidos pode-se traçar a curva cinética de degradação do β -caroteno e assim avaliar a eficácia do antioxidante adicionado em vários intervalos de tempo. As curvas cinéticas dos extratos aquosos, alcoólicos e das frações de ácidos fenólicos livres, solúveis e de ligantes insolúveis da polpa e da amêndoa do pequi estão dispostas nas figuras 17 a 26.

A partir dessas figuras, pode-se observar que, de uma forma geral, a degradação do controle ocorre quase totalmente aos 60 minutos de reação, ou seja, nesse intervalo de tempo os radicais gerados degradam praticamente todo o β -caroteno existente no sistema; entretanto acompanha-se a reação por mais 60 minutos para avaliar o potencial dos antioxidantes em proteger o sistema por um período de tempo mais longo.

Figura 17. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso da polpa de pequi no sistema β -caroteno/ácido linoléico

Figura 18. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato alcoólico da polpa de pequi no sistema β -caroteno/ácido linolêico

Figura 19. Curva cinética do potencial antioxidante dos ácidos fenólicos livres da polpa de pequi no sistema β -caroteno/ácido linolêico

Figura 20. Curva cinética do potencial antioxidante dos ácidos fenólicos solúveis da polpa de pequi no sistema β -caroteno/ácido linolêico

Figura 21. Curva cinética do potencial antioxidante dos ácidos fenólicos insolúveis da polpa de pequi no sistema β -caroteno/ácido linolêico

Figura 22. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso da amêndoa de pequi no sistema β -caroteno/ácido linolêico

Figura 23. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato alcoólico da amêndoa de pequi no sistema β -caroteno/ácido linolêico

Figura 24. Curva cinética do potencial antioxidante dos ácidos fenólicos livres da amêndoa de pequi no sistema β -caroteno/ácido linoléico

Figura 25. Curva cinética do potencial antioxidante dos ácidos fenólicos solúveis da amêndoa de pequi no sistema β -caroteno/ácido linoléico

Figura 26. Curva cinética do potencial antioxidante dos ácidos fenólicos insolúveis da amêndoa de pequi no sistema β -caroteno/ácido linoléico

A partir das curvas cinéticas obtidas é possível calcular os fatores cinéticos dos extratos e frações de ácidos fenólicos da polpa e da amêndoa do pequi, conforme descrito nos subitem 4.2.8.1. Esses fatores cinéticos foram propostos por Yanishlieva e Marinova (1995), segundo os quais no fator F1 (calculado no período entre 15 e 45 minutos de reação) é mensurada a eficiência do antioxidante em bloquear a reação em cadeia, por meio da inativação dos radicais peróxidos. Seriam os chamados antioxidantes primários. Enquanto o fator F2 (calculado no período entre 75 e 105 min.) está associado à capacidade do antioxidante de participar de outras reações como, por exemplo, a decomposição dos produtos secundários da oxidação, como os radicais hidroperóxidos. Nos dois casos, se o valor da razão entre as tangentes das curvas do extrato e do controle forem menor que 1, atuam efetivamente como antioxidantes; se os valores forem maior que 1, então não há uma atividade antioxidante nesse intervalo e o extrato pode inclusive atuar como pró-oxidante. Vários autores têm utilizado esse recurso na avaliação da eficácia antioxidante de diferentes matrizes alimentares (NASCIMENTO *et al.*, 2005; JARDINI e MANCINI FILHO, 2007).

Tabela 9. Parâmetros cinéticos caracterizando a inibição da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico pelos extratos aquosos, alcoólicos e frações de ácidos fenólicos da polpa e da amêndoa do pequi

Amostras	Fatores cinéticos		Amostras	Fatores cinéticos	
Polpa de pequi	F1	F2	Amêndoa de pequi	F1	F2
<i>Extrato aquoso</i>			<i>Extrato aquoso</i>		
50 ppm	0,2	1,9	50 ppm	0,06	0,7
100 ppm	0,1	1,4	100 ppm	0,06	0,6
200 ppm	0,05	1,3	200 ppm	0,04	0,3
Extrato 25 ppm + BHT 0,5 ppm	0,1	1,4	Extrato 25 ppm + BHT 0,5 ppm	0,02	0,8
Extrato 50 ppm + BHT 1,0 ppm	0,1	1,5	Extrato 50 ppm + BHT 1,0 ppm	0,02	0,3
Extrato 100 ppm+ BHT 2,0 ppm	0,1	1,2	Extrato 100 ppm+ BHT 2,0 ppm	0,01	0,3
<i>Extrato alcoólico</i>			<i>Extrato alcoólico</i>		
50 ppm	0,9	0,7	50 ppm	0,56	2,8
100 ppm	0,9	1,8	100 ppm	0,42	2,6
200 ppm	0,87	1,7	200 ppm	0,34	1,3
Extrato 25 ppm + BHT 0,5 ppm	0,2	1,1	Extrato 25 ppm + BHT 0,5 ppm	0,29	3,2
Extrato 50 ppm + BHT 1,0 ppm	0,1	1,2	Extrato 50 ppm + BHT 1,0 ppm	0,14	0,8
Extrato 100 ppm+ BHT 2,0 ppm	0,1	1,1	Extrato 100 ppm+ BHT 2,0 ppm	0,10	0,5
<i>AFL</i>			<i>AFL</i>		
10 ppm	0,1	1,5	10 ppm	0,05	0,8
20 ppm	0,1	1,0	20 ppm	0,01	0,4
50 ppm	0,02	0,6	50 ppm	0,01	0,4
AFL 5 ppm+ BHT 0,1 ppm	0,1	1,0	AFL 5 ppm+ BHT 0,1 ppm	0,06	0,4
AFL 10 ppm + BHT 0,2 ppm	0,1	1,4	AFL 10 ppm + BHT 0,2 ppm	0,02	0,7
AFL 25 ppm + BHT 0,5 ppm	0,0	1,0	AFL 25 ppm + BHT 0,5 ppm	0,01	0,7
<i>AFS</i>			<i>AFS</i>		
10 ppm	0,1	1,4	10 ppm	0,03	0,6
20 ppm	0,1	1,0	20 ppm	0,05	0,2
50 ppm	0,09	0,9	50 ppm	0,02	0,3
AFL 5 ppm+ BHT 0,1 ppm	0,1	1,5	AFL 5 ppm+ BHT 0,1 ppm	0,11	0,8
AFL 10 ppm + BHT 0,2 ppm	0,1	1,2	AFL 10 ppm + BHT 0,2 ppm	0,06	0,7
AFL 25 ppm + BHT 0,5 ppm	0,1	1,2	AFL 25 ppm + BHT 0,5 ppm	0,04	0,1
<i>AFI</i>			<i>AFI</i>		
10 ppm	0,0	1,0	10 ppm	0,03	0,7
20 ppm	0,0	0,8	20 ppm	0,01	0,6
50 ppm	0,02	0,6	50 ppm	0,04	0,6
AFL 5 ppm+ BHT 0,1 ppm	0,1	1,6	AFL 5 ppm+ BHT 0,1 ppm	0,06	0,9
AFL 10 ppm + BHT 0,2 ppm	0,1	1,3	AFL 10 ppm + BHT 0,2 ppm	0,04	0,7
AFL 25 ppm + BHT 0,5 ppm	0,0	0,5	AFL 25 ppm + BHT 0,5 ppm	0,02	0,5
BHT	0,07	0,7	BHT	0,07	0,7

De acordo com a tabela 9, pode-se observar que tanto o extrato aquoso quanto o extrato alcoólico da polpa de pequi apresentaram todos os valores do fator F1 menores que 1, ou seja, a capacidade em degradar os radicais peróxido, entretanto apresentaram valores F2 maiores que 1, portanto não sendo efetivos na inativação de produtos secundários da reação, como hidroperóxidos. Quando se observam os fatores cinéticos para as frações de ácidos fenólicos da polpa, constata-se comportamento semelhante aos extratos aquoso e alcoólico. Exceção apenas para os fatores F2 das frações AFL e AFS a 50 ppm, que apresentaram fatores cinéticos igual a 0,6 e 0,9 (respectivamente); e a fração AFI a 20 ppm e associado ao BHT (25 + 0,5 ppm), que apresentaram fatores cinéticos de 0,8 e 0,7 (respectivamente). Quando se observam as curvas cinéticas dos extratos e frações de ácidos fenólicos da polpa, percebe-se que a 75 minutos de reação praticamente todo o β -caroteno já tinha sido degradado, enquanto nas soluções contendo extratos e frações ainda continuava a reação, isso possivelmente explica o fato de o fator F2 ter apresentado valores superiores a 1.

Com relação à amêndoa, observa-se na tabela 9, que o extrato aquoso se mostrou eficiente no combate aos produtos primários e secundários da reação de oxidação, pois seus fatores F1 e F2 foram todos menores que 1. Já o extrato alcoólico apresentou eficiência somente em combater os radicais peróxido, apresentando seus fatores F2 superiores a 1; exceção apenas a quando associado ao BHT nas concentrações de 50 + 1 ppm e 100 + 2 ppm, que apresentaram F2 de 0,8 e 0,5 (respectivamente). Todas as frações de ácidos fenólicos da amêndoa foram efetivas em combater os produtos primários e secundários da reação de oxidação, apresentando valores tanto de F1 quanto de F2 extremamente baixos; mostrando, dessa forma, potente capacidade de reagir com os radicais presentes no sistema.

Jardini e Mancini-Filho (2007), ao avaliarem a atividade antioxidante da polpa e da semente da romã (*Punica granatum*) pelo ensaio do β -caroteno/ácido linoléico, observaram comportamento semelhante ao deste trabalho para os fatores cinéticos dos extratos aquosos e alcoólicos tanto da polpa quanto das sementes. De uma forma geral, os extratos foram mais eficientes em combater os produtos primários da oxidação, mas não tão efetivos contra os produtos secundários.

5.2.2. Avaliação da atividade antioxidante pela condutividade em Rancimat

É prática usual da indústria alimentícia a adição de antioxidantes sintéticos, como o BHT, o BHA ou o TBHQ, em óleos vegetais comestíveis, com o intuito de aumentar a sua vida de prateleira. Esses antioxidantes protegem os óleos contra a oxidação. Na atualidade, muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de substituir parcialmente esses antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais, haja vista a associação dos antioxidantes sintéticos com processos carcinogênicos em animais experimentais (GUNDUC e EL, 2003; SVILAAS *et al.*, 2004).

Dentre as várias classes de alimentos com propriedades antioxidantes, as especiarias têm-se destacado como antioxidantes efetivos na proteção da oxidação de óleos, comparáveis aos antioxidantes sintéticos. Murcia, Jiménez e Martinez-Tomé (2001) observaram que os extratos das especiarias cominho, orégano, páprica, alecrim e açafrão, a uma concentração de 5%, apresentaram atividade de proteção contra a oxidação de óleos comestíveis semelhante aos antioxidantes sintéticos BHT, BHA e propilgalato a 100 $\mu\text{g/g}$.

Na tabela 10, consta o aumento do período de indução (%) da oxidação do óleo de soja sem antioxidante proporcionado pela adição dos extratos e frações de ácidos fenólicos presentes na polpa e na amêndoa do pequi, assim como sua associação com o antioxidante sintético BHT. De acordo com essa tabela, todos os extratos apresentaram uma proteção efetiva da oxidação do óleo de soja, sendo que o extrato aquoso, nas duas concentrações testadas (100 e 200 ppm), apresentou as maiores porcentagens de inibição da oxidação (21,1 e 41,5%) respectivamente, valores superiores ao antioxidante sintético BHT, que apresentou uma porcentagem de inibição da oxidação de 10,68 e 16,02% nas concentrações de 100 e 200 ppm, respectivamente. O extrato alcoólico também apresentou uma elevada proteção da oxidação do óleo (25,4 e 27,2%) nas concentrações de 100 e 200 ppm, respectivamente. Tanto o extrato aquoso quanto o extrato alcoólico da polpa apresentaram valores maiores e diferentes ($p < 0,01$) em relação ao BHT. Já o extrato etéreo apresentou uma porcentagem de inibição da oxidação semelhante à do BHT.

Com relação aos extratos da amêndoa, pôde-se observar um comportamento semelhante para os extratos aquoso e etéreo em relação aos extratos da polpa; entretanto, o extrato etéreo da amêndoa apresentou uma porcentagem de inibição da oxidação de 3,9 e 7,45% nas concentrações de 100 e 200 ppm, respectivamente, valores inferiores ao BHT ($p < 0,05$).

Tabela 10. Atividade antioxidante dos extratos e ácidos fenólicos da polpa e da amêndoa do pequi e do antioxidante sintético BHT, pelo método Rancimat

Extratos e Frações	100 ppm		200 ppm	
	% de IO	FT	% de IO	FT
Extrato aquoso de polpa	21,10 ± 0,5 ^e	1,21 ± 0,01	41,50 ± 0,6 ^h	1,41 ± 0,06
Extrato aquoso de amêndoa	26,52 ± 0,3 ^f	1,26 ± 0,02	36,50 ± 0,5 ^g	1,36 ± 0,03
Extrato etéreo de polpa	8,60 ± 0,2 ^b	1,03 ± 0,00	11,64 ± 0,2 ^b	1,06 ± 0,01
Extrato etéreo de amêndoa	3,90 ± 0,05 ^a	1,02 ± 0,01	7,45 ± 0,1 ^a	1,04 ± 0,02
Extrato alcoólico de polpa	25,4 ± 0,1 ^f	1,24 ± 0,02	27,2 ± 0,1 ^e	1,27 ± 0,02
Extrato alcoólico de amêndoa	26,50 ± 0,2 ^f	1,26 ± 0,03	37,52 ± 0,3 ^g	1,37 ± 0,02
AFL polpa de pequi	29,07 ± 0,08 ^g	1,29 ± 0,02	33,09 ± 0,06 ^f	1,33 ± 0,03
AFS polpa de pequi	30,99 ± 0,03 ^g	1,30 ± 0,03	31,69 ± 0,13 ^f	1,32 ± 0,03
AFI polpa de pequi	8,23 ± 0,27 ^b	1,06 ± 0,001	17,33 ± 0,67 ^c	1,12 ± 0,002
AFL amêndoa de pequi	14,53 ± 0,15 ^d	1,14 ± 0,02	22,41 ± 0,16 ^d	1,22 ± 0,02
AFS amêndoa de pequi	35,02 ± 0,01 ^h	1,35 ± 0,01	36,71 ± 0,09 ^g	1,37 ± 0,04
AFI amêndoa de pequi	7,35 ± 0,35 ^b	1,07 ± 0,01	13,20 ± 0,85 ^b	1,11 ± 0,01
BHT	10,68 ± 0,30 ^c	1,10 ± 0,002	16,02 ± 0,33 ^c	1,15 ± 0,01

Inibição da oxidação (% IO) e fator de proteção (FT) do óleo de soja (em horas)

Valores expressos em média ± desvio padrão, n = 3

(AFL) Frações de ácidos fenólicos livres, (AFS) esterificadas solúveis, (AFI) insolúveis

^{a,b,c,d,e,f,g,h} Médias, na mesma coluna, seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si e com o padrão BHT em nível de 5% (p<0,05)

O aumento do período de indução da oxidação do óleo de soja apresentado pelas frações de ácidos fenólicos livres, solúveis e de ligantes insolúveis da polpa e da amêndoa do pequi constam na tabela 10; na qual se pode observar que a fração AFL apresentou uma proteção de 29,07 e 33,09%; e a AFS, de 30,99 e 31,68%, nas concentrações de 100 e 200 ppm, respectivamente; valores elevados em relação ao

antioxidante sintético BHT. Já a fração AFI apresentou uma porcentagem de proteção de 8,23 e 17,33%, valores semelhantes ao do BHT, que apresentou valores de 10,68 e 16,02% nas concentrações de 100 e 200 ppm, respectivamente. As frações de ácidos fenólicos da amêndoa do pequi também apresentaram significativa proteção da oxidação do óleo de soja, destacando-se a fração AFS, que apresentou uma proteção de 35,02 e 36,71%, superior às demais frações e ao BHT($p<0,05$). A fração AFL também apresentou uma proteção maior que o BHT, com 14,53 e 22,41%. Já a fração AFI apresentou uma proteção de 7,35 e 13,2% nas concentrações de 100 e 200 ppm, respectivamente, inferiores ao BHT($p<0,05$).

Analisando extratos e frações de ácidos fenólicos presentes na polpa e na semente da romã, Jardini e Mancini-Filho (2007) corroboraram os resultados deste estudo, quando detectaram uma proteção da oxidação do óleo de soja que variou de 9,63% (para o extrato etéreo da semente a 100 ppm), a 53,45% (para o extrato aquoso da polpa a 200 ppm) e de 4,41% (para a fração AFI da semente a 100 ppm) a 58,19% (para a fração AFS da polpa a 200 ppm). Esses autores utilizaram como antioxidante sintético o BHA e encontraram uma proteção de 11,65% e 14,47% nas concentrações de 100 e 200 ppm, respectivamente; valores também semelhantes aos encontrados neste trabalho para o BHT. Moreira e Mancini-Filho (2003), avaliando os extratos das especiarias mostarda, canela e erva-doce, quantificaram uma proteção de 19,63% para o extrato aquoso da semente de mostarda, que apresentou a maior proteção da oxidação do óleo de soja sem antioxidante entre as amostras testadas.

Na avaliação da proteção oxidativa do óleo de soja pelos extratos e frações de ácidos fenólicos do pequi, também foram obtidos os fatores de proteção a partir da divisão entre o tempo de indução da oxidação (em horas) pelo extrato e ou fração

e o controle (constituído pelo óleo de soja sem antioxidante). O fator de proteção do controle é sempre 1,0. Quanto maior que 1,0 for o fator de proteção obtido pelo extrato analisado, melhor sua capacidade de proteger o óleo contra a oxidação, portanto maior sua atividade antioxidante.

Ainda na tabela 10, pode-se observar que, entre os extratos da polpa de pequi, o maior fator de proteção obtido foi o do extrato aquoso da polpa a 200 ppm (FP = 1,41), seguido do extrato alcoólico a 200 ppm (FP = 1,37). Na amêndoa, o maior fator de proteção foi o do extrato alcoólico a 200 ppm (FP = 1,37). Todos esses fatores foram superiores ao do BHT ($p < 0,05$), que apresentou FP de 1,10 e 1,15 nas concentrações de 100 e 200 ppm, respectivamente. Corroboram os resultados deste estudo, os trabalhos de: Murcia, Jiménez e Martínez-Tomé (2001) que, avaliando extratos hidroalcoólicos de frutos como a manga, mamão, abacate, maracujá, abacaxi, carambola e banana, encontraram FP acima de 1,1 para todos os frutos; Parras *et al.* (2007) que, avaliando a atividade antioxidante de 14 tipos de cafés provenientes de vários países, encontraram valores de FP entre 1,48 e 3,33 para o café expresso, e entre 1,20 e 3,14 para o café italiano.

Todas as frações de ácidos fenólicos da polpa e da amêndoa do pequi apresentaram um FP maior que 1, destacando-se a fração AFS da amêndoa, com FP de 1,35 e 1,37 nas concentrações de 100 e 200 ppm (respectivamente); valores superiores ao padrão BHT ($p < 0,05$). As frações AFI tanto da polpa quanto da amêndoa apresentaram os menores valores de FP, semelhantes entre si e com o BHT.

Proestos *et al.* (2006), avaliando os valores de FP de padrões de ácidos fenólicos (gentísico, caféico, *p*-cumárico, vanílico, siríngico, ferúlico e *p*-hidrobenzóico), na concentração de 0,02%, dissolvidos em óleo de girassol,

obtiveram FPs que variaram de 1,2 a 1,5; valores próximos ao detectado neste estudo. Já Artajo *et al.* (2006), também avaliando o FP de padrões de ácidos fenólicos, nas concentrações de 40 a 320 mg/kg, dissolvidos em óleo de oliva, obtiveram FPs mais elevados (10,5 para o ácido gálico e 4,6 para o ácido caféico).

Todas as frações de ácidos fenólicos da polpa e da amêndoa do pequi apresentaram uma elevada capacidade de proteger o óleo de soja contra oxidação, podem ser usados, portanto, na substituição, ainda que parcial, dos antioxidantes sintéticos. A concentração de 100 ppm mostrou-se satisfatória, pois a duplicação da concentração dos antioxidantes testados não aumentou proporcionalmente a proteção da oxidação, salvo para os extratos aquosos da polpa e da amêndoa.

5.2.3. Atividade antioxidante utilizando o radical DPPH[•]

Na avaliação da atividade antioxidante por este método, o radical livre DPPH[•] reage com o antioxidante, convertendo-se à sua forma reduzida. Nessa reação, a solução metanólica de DPPH, inicialmente de coloração violeta, torna-se amarela; e o grau deste descoramento, monitorado através do espectrofotômetro, indica a habilidade do antioxidante em seqüestrar o radical livre. Uma forma usual de expressar os resultados nesse ensaio é calcular a quantidade do antioxidante capaz de seqüestrar metade dos radicais livres DPPH[•] presentes na solução. Esse índice denomina-se EC₅₀. Quanto menor o valor de EC₅₀ apresentado pelo extrato, menor quantidade do extrato será necessária para reduzir 50% do radical livre DPPH[•], e maior será sua atividade antioxidante.

No presente estudo, avaliou-se a capacidade dos extratos e frações de ácidos fenólicos da polpa e da amêndoa do pequi em seqüestrar os radicais DPPH[•] em distintas concentrações, variando essas concentrações de acordo com a capacidade antioxidante de cada extrato, de forma a obter uma curva linear entre a

concentração do antioxidante e o seqüestro do radical. A partir da curva obtida, calcula-se o EC₅₀.

O intervalo de concentração utilizado para cada extrato e/ou fração de ácidos fenólicos, assim como o coeficiente de correlação linear (r^2) obtido, encontram-se dispostos na tabela 11, na qual se pode observar que foram obtidos, para todos os extratos e frações de ácidos fenólicos da polpa e/ou da amêndoa do pequi, coeficientes de correlação acima de 0,90, demonstrando uma boa linearidade.

Tabela 11. Intervalos de concentração utilizados e coeficientes de correlação linear (r^2) obtidos pelos extratos e/ou frações de ácidos fenólicos do pequi na avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio do radical DPPH*

Extratos e/ou frações	Concentração (µg/mL)	r^2 obtido
Extr. aquoso de polpa	0,78 – 12,5	0,9994
Extr. aquoso de amêndoa	50-400	0,9905
Extr. etéreo de polpa	500 – 4000	0,9975
Extr. etéreo de amêndoa	250 -4000	0,9873
Extr. alcoólico de polpa	30 – 500	0,9922
Extr. alcoólico de amêndoa	30 -1000	0,9979
AFL polpa de pequi	0,78 – 12,5	0,9712
AFS polpa de pequi	0,78 – 50	0,9912
AFI polpa de pequi	0,78 – 50	0,9851
AFL amêndoa de pequi	3 – 25	0,9974
AFS amêndoa de pequi	0,78 – 25	0,9876
AFI amêndoa de pequi	0,78 – 6,25	0,9085
BHT	0,78 -100	0,9945

Conforme demonstra a tabela 12, todos os extratos e frações de ácidos fenólicos da polpa e da amêndoa do pequi apresentaram atividade em seqüestrar o radical livre DPPH[•], entretanto inferiores ao antioxidante sintético BHT ($p < 0,05$). O extrato aquoso da polpa foi o que apresentou maior atividade antioxidante ($EC_{50} = 260,3$). Os extratos etéreos, tanto da polpa quanto da amêndoa, somente apresentaram atividade antioxidante em elevadas concentrações (1 a 4 mg/mL), apresentando os maiores valores de EC_{50} (4.580 e 6.698) respectivamente.

Roesler *et al.* (2007), avaliando a atividade antioxidante dos extratos aquosos e etanólicos da casca, da polpa e da semente de frutas do cerrado brasileiro, pelo ensaio DPPH, encontraram os seguintes valores de EC_{50} : 387,4 para o extrato etanólico e 879,3 para o extrato aquoso da polpa da cagaita; 148,8 para o extrato etanólico e 1.321,9 para o extrato aquoso da polpa de araticum; 298,7 para o extrato etanólico e 534,4 para o extrato aquoso de polpa+semente de pequi.

Tabela 12. Capacidade antioxidante (EC_{50} em $\mu\text{g/mL}$) dos extratos e de ácidos fenólicos presentes na polpa e na amêndoa do pequi, utilizando o radical livre DPPH[•]

EXTRATOS	EC_{50} em $\mu\text{g/mL}$	
	Polpa	Amêndoa
Aquoso	$260,37 \pm 4,3^e$	$481,43 \pm 4,7^d$
Alcoólico	$820,7 \pm 8,7^f$	$998,1 \pm 6,4^e$
Etéreo	$4.580 \pm 37,8^g$	$6.698 \pm 23,1^f$
AFL	$14,30 \pm 0,6^b$	$21,16 \pm 0,5^b$
AFS	$101,2 \pm 2,1^d$	$23,6 \pm 0,9^b$
AFI	$35,75 \pm 1,02^c$	$44,15 \pm 2,0^c$
BHT	$7,50 \pm 0,1^a$	

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$

(AFL) Frações de ácidos fenólicos livres, (AFS) esterificadas solúveis, (AFI) insolúveis

^{a,b,c,d,e,f,g} Médias, na mesma coluna, seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si e com o padrão BHT em nível de 5% ($p < 0,05$)

As frações de ácidos fenólicos apresentaram expressiva atividade antioxidante, destacando-se as frações AFL da polpa e da semente, com EC_{50} de 14,3 e 21,1 (respectivamente). A fração AFS da amêndoa também apresentou uma boa atividade em combater os radicais livres DPPH $^{\bullet}$, com um EC_{50} de 23,6. Já a fração AFS da polpa apresentou a menor atividade antioxidante, com um EC_{50} de 102,2.

Nas figuras 27, 28, 29, 30 e 31 pode ser visualizada a atividade antioxidante dos diferentes extratos e/ou frações de ácidos fenólicos do pequi, avaliadas em distintas concentrações. Percebe-se, a partir dessas figuras, que cada extrato e/ou fração possui um comportamento distinto de acordo com a concentração testada. O antioxidante sintético BHT apresentou uma captura de radicais DPPH $^{\bullet}$ sempre superior ($p < 0,05$) a todos os extratos e/ou frações analisadas.

Figura 27. Atividade antioxidante, pelo método DPPH, dos extratos aquoso e alcoólico da polpa de pequi e do padrão BHT

Figura 28. Atividade antioxidante, pelo método DPPH, dos extratos aquoso e alcoólico da amêndoa de pequi e do padrão BHT

Figura 29. Atividade antioxidante, pelo método DPPH, dos extratos etéreos da polpa e da amêndoa de pequi e do padrão BHT

Figura 30. Atividade antioxidante, pelo método DPPH, dos ácidos fenólicos da polpa de pequi e do padrão BHT

Figura 31. Atividade antioxidante, pelo método DPPH, dos ácidos fenólicos da amêndoa do pequi e do padrão BHT

5.2.4. Atividade antioxidante avaliada pelo método de captura do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$

O radical catiônico $\text{ABTS}^{+\bullet}$ é gerado em solução aquosa ou em solução orgânica, utilizando-se enzimas; ou quimicamente, a partir do cromógeno ABTS ($\lambda_{\text{max}} = 342 \text{ nm}$), que é solúvel em água e quimicamente estável (ANTOLOVICH *et al.*, 2002); entretanto, o radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ gerado resulta menos estável, apresentando novas características espectrais, com máximos de absorção a 414, 645, 734 e 815 nm (PRIOR e CAO, 1999).

Segundo Re *et al.* (1999) o radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ gerado por ação de persulfato de potássio apresenta como máximos de comprimento de onda 645, 734 e 815 nm, e é comumente empregado na análise antioxidante a 734 nm. Neste estudo, o radical foi gerado com persulfato de potássio e o comprimento de onda utilizado para avaliar as amostras foi de 734 nm. O espectro da solução de $\text{ABTS}^{+\bullet}$, apresentou-se conforme a figura 32.

Figura 32. Espectro de absorção UV-visível do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ gerado a partir de solução de ABTS incubada por 12 horas com persulfato de potássio

Segundo Arnao *et al.* (1999), a estabilidade do radical ABTS^{•+} depende da reação através da qual é gerado e do solvente em que é dissolvido; por isso, realizou-se um controle do radical gerado (figura 33) e utilizado neste ensaio. Observou-se que durante o tempo em que estava sendo utilizado, o radical se manteve estável.

Figura 33. Estabilidade do radical ABTS^{•+} com o tempo de reação (90 minutos)

A avaliação da atividade antioxidante utilizando o radical ABTS^{•+} normalmente é expressa como valor TEAC (Atividade Antioxidante Total Equivalente ao Trolox), que se define como a concentração de trolox que apresenta o mesmo percentual de inibição que uma concentração de 1 mM do composto de referência. Essa medida pode ser feita em diferentes tempos de reação, obtendo-se valores distintos de acordo com o tempo.

Inúmeros trabalhos apresentam grande divergência quanto ao tempo de medida da reação. Alguns autores sugerem a medida aos 2 minutos, pois nesse tempo o trolox já reagiu completamente com o radical. Justificam eles que quanto mais rápido um antioxidante reagir com um radical, melhor será sua atividade

antioxidante em organismos animais, haja vista que os radicais livres, no organismo, possuem uma meia vida muito curta (10^{-6} segundos). Muitos trabalhos utilizam, entretanto, tempos mais longos de reação (4, 6, 10, 30 e 60 minutos), pois os antioxidantes alimentares normalmente não reagem tão prontamente com o radical; assim sua medida a um tempo muito curto subestimaria o seu Valor TEAC. Neste estudo, avaliaram-se as amostras em tempos distintos, calculando-se o valor TEAC aos 2, 4, 6, 10, 30 e 60 minutos (vide tabelas 13 e 14). Constatou-se que tanto os extratos como as frações de ácidos fenólicos da polpa e da amêndoa do pequi continuam reagindo com o radical $ABTS^{*+}$ ao longo do tempo de reação (vide figuras 34 e 35), apresentando valores absolutos de TEAC maiores com tempos mais longos. Observou-se que a reação, de uma forma geral, tende a estabilizar-se aos 30 minutos.

A explicação para o uso de tempos mais longos é que certos antioxidantes seguem uma reação bifásica frente ao radical ABTS, com uma fase inicial rápida e, posteriormente, uma fase lenta (VAN DEN BERG *et al.*, 1999). Existem duas possíveis explicações: a formação de produtos da reação em um primeiro momento, que depois reagem lentamente com o $ABTS^{*+}$; e a existência de um reordenamento molecular dos antioxidantes. A formação de produtos da reação foi demonstrada por Arts *et al.* (2003), ao examinar o espectro do $ABTS^{*+}$ durante sua reação com compostos polifenólicos, como o resorcinol.

Tabela 13. Valor TEAC (Capacidade Antioxidante Total Equivalente ao TROLOX) pelo método ABTS para os extratos e frações de ácidos fenólicos da polpa de pequi, valores expressos em mM de TROLOX/g de amostra fresca

Amostras	Valor TEAC (mM de trolox/g amostra)						
	2 min	4 min	6 min	10 min	20 min	30 min	60 min
Ext. aquoso	1,19±0,10 ^b	1,55±0,11 ^b	1,75±0,11 ^b	1,86±0,13 ^c	2,10±0,13 ^b	2,27±0,12 ^b	2,56±0,11 ^c
Ext. alcoólico	0,84±0,12 ^a	0,84±0,12 ^a	0,85±0,11 ^a	0,86±0,13 ^a	0,92±0,13 ^a	0,92±0,14 ^a	0,95±0,14
Ext. etéreo	0,88±0,13 ^a	0,90±0,12 ^a	0,92±0,12 ^a	0,96±0,13 ^a	0,96±0,14 ^a	0,97±0,13 ^a	0,97±0,13 ^a
AFL	0,79±0,11 ^a	0,99±0,12 ^a	1,15±0,13 ^a	1,40±0,15 ^b	1,76±0,20 ^b	1,91±0,20 ^b	2,04±0,20 ^b
AFS	0,73±0,10 ^a	0,82±0,12 ^a	0,88±0,12 ^a	0,88±0,12 ^a	1,18±0,13 ^a	1,28±0,14 ^a	1,37±0,14 ^a
AFI	0,73±0,11 ^a	0,82±0,11 ^a	0,88±0,12 ^a	1,01±0,13 ^a	1,18±0,13 ^a	1,26±0,13 ^a	1,37±0,14 ^a

Valores expressos em média ± desvio padrão, n = 3

(AFL) Frações de ácidos fenólicos livres, (AFS) esterificadas solúveis, (AFI) insolúveis

^{a,b,c} Médias, na mesma coluna, seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si e com o padrão BHT em nível de 5% (p<0,05)

Pelo ensaio ABTS^{•+}, o extrato aquoso apresentou melhor atividade antioxidante, com valores TEAC de 1,19; 1,75 e 2,56 aos 2, 6 e 60 minutos, respectivamente. Observou-se que os antioxidantes do extrato aquoso continuam reagindo de forma significativa (p<0,05) com o tempo, portanto possuem uma ação lenta no seqüestro dos radicais ABTS^{•+}. Os extratos alcoólico e etéreo apresentaram atividade antioxidante semelhante entre si e inferior (p<0,05) ao extrato aquoso.

Kuskoski *et al.* (2003), avaliando a atividade antioxidante do fruto baguaçu (*Eugenia umbelliflora* Berg), natural do estado de Santa Catarina, Brasil, encontraram um TEAC de 3,08 mM/g de fruto fresco. Sellappan *et al.* (2002) constataram que os valores TEAC do mirtilo e da zarzamora foram de 0,8 e 3,8 mM/g de frutos frescos, respectivamente. Re *et al.* (1999) encontraram valores TEAC de 1,77 e 2,31 mM/mL para o suco de laranja, medidos a 2 e 6 minutos de reação, respectivamente.

Entre as frações de ácidos fenólicos da polpa do pequi, todas apresentaram capacidade de reagir com o radical ABTS^{•+}. A fração AFL apresentou uma atividade superior ($p < 0,05$) às demais, com valores TEAC de 0,79; 1,15 e 2,04 mM/g aos 2, 6 e 60 minutos de reação. As frações AFS e AFI apresentaram valores TEAC similares em todos os tempos avaliados.

Villaño *et al.* (2006), avaliando a atividade antioxidante de vinhos, constataram um valor TEAC de 0,67 mM/mL para os vinhos brancos e de 6,93 mM/mL para os vinhos tintos, aos 6 minutos de reação. Também avaliaram o valor TEAC de vários padrões fenólicos puros, no mesmo tempo de reação, encontrando os seguintes valores: 1,98 mM/g para o ácido gálico; 1,01 mM/g para o ácido cafeico; 0,99 mM/g para a epicatequina; e 1,83 mM/g para a procianidina B₂. Constataram também que os ácidos sirínico, vanílico, p-cumárico e a procianidina B₃ não reagem com o radical ABTS^{•+}.

Figura 34. Curva cinética da atividade antioxidante de extratos e frações de ácidos fenólicos da polpa de pequi e do padrão trolox pelo método ABTS.

Os extratos e as frações de ácidos fenólicos da amêndoa do pequi apresentaram boa capacidade de seqüestrar os radicais ABTS^{•+}, principalmente os extratos, destacando-se o extrato alcoólico, que apresentou valores TEAC de 3,63; 4,04 e 4,77 mM/g aos 2, 6 e 60 minutos, respectivamente; enquanto que os extratos aquoso e etéreo apresentaram valores TEAC de 2,12 e 1,51 mM/g aos 60 minutos de reação, respectivamente. Quando confrontados com valores TEAC aos 6 minutos de reação, obtidos de outros alimentos, como tomate (1,65 mM/g), azeite virgem de oliva (1,79 mM/mL), cerveja (1,0 mM/mL) e chá preto (3,6 mM/mL) (DE BEER *et al.*, 2003), pode-se considerar a amêndoa do pequi como um alimento de elevada capacidade antioxidante.

Tabela 14. Valor TEAC (Capacidade Antioxidante Total Equivalente ao TROLOX), pelo método ABTS, para os extratos e frações de ácidos fenólicos da amêndoa de pequi, expressos em mM de TROLOX/g de amostra fresca

Amostras	Valor TEAC (mM Trolox/g amostra)						
	2 min	4 min	6 min	10 min	20 min	30 min	60 min
Ext. aquoso	1,73±0,11 ^c	1,80±0,12 ^c	1,84±0,13 ^{c,d}	1,88±0,13 ^{a,b}	1,99±0,13 ^b	2,03±0,14 ^b	2,12±0,14 ^b
Ext. etéreo	1,47±0,17 ^{b,c}	1,48±0,17 ^{b,c}	1,49±0,11 ^{b,c}	1,51±0,10 ^{a,b}	1,50±0,10 ^{a,b}	1,50±0,10 ^{a,b}	1,51±0,10 ^{a,b}
Ext. alcoólico	3,62±0,21 ^d	3,88±0,22 ^d	4,04±0,30 ^e	4,18±0,30 ^d	4,47±0,32 ^d	4,56±0,33 ^d	4,77±0,33 ^d
AFL	1,40±0,12 ^b	1,85±0,12 ^c	2,24±0,21 ^d	2,65±0,21 ^c	3,11±0,22 ^c	3,25±0,25 ^c	3,31±0,25 ^c
AFS	1,14±0,12 ^a	1,26±0,12 ^{a,b}	1,36±0,13 ^{a,b}	1,49±0,13 ^{a,b}	1,69±0,14 ^{a,b}	1,79±0,15 ^b	1,87±0,15 ^b
AFI	0,98±0,11 ^a	1,02±0,12 ^a	1,05±0,12 ^a	1,08±0,13 ^a	1,14±0,13 ^a	1,13±0,13 ^a	1,16±0,13 ^a

Valores expressos em média ± desvio padrão, n = 3

(AFL) Frações de ácidos fenólicos livres, (AFS) esterificadas solúveis, (AFI) insolúveis

^{a,b,c,d} Médias, na mesma coluna, seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si e com o padrão BHT em nível de 5% (p<0,05)

Com relação às frações de ácidos fenólicos da amêndoa do pequi, todas apresentaram capacidade de reagir com o radical ABTS. A fração AFL obteve um

valor TEAC superior às demais frações em todos os tempos testados ($p < 0,05$), com valores de 1,40; 2,24 e 3,31 mM/g nos tempos de 2, 4 e 60 minutos, respectivamente. Já as frações AFS e AFI apresentaram valores TEAC de 1,87 e 1,16 mM/g, respectivamente, aos 60 minutos de reação.

Figura 35. Curva cinética da atividade antioxidante de extratos e frações de ácidos fenólicos da amêndoa de pequi e do padrão trolox pelo método ABTS.

5.2.5. Atividade antioxidante avaliada pelo ensaio da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)

O ensaio da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) é um método antioxidante muito desenvolvido, haja vista que usa o radical peroxila, muito importante em nível biológico por sua abundância e por ser responsável, tanto em nível fisiológico como patológico, pelo dano oxidativo (ANTOLOVICH *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2004). Além disso, as medidas de fluorescência não sofrem interferência de amostras que possuem pigmentos coloridos, e quantifica os resultados usando a técnica da área sob a curva de decréscimo (AUC) (CAO e PRIOR, 1999). O

antioxidante padrão utilizado nesse ensaio é o trolox, e os resultados se expressam em equivalente de trolox (número de μmoles de trolox que produz a mesma atividade de 1 g da amostra).

Conforme observado na tabela 15, todos os extratos e frações de ácidos fenólicos da polpa do pequi apresentaram expressiva atividade antioxidante. O extrato aquoso apresentou maior atividade em relação ao extrato alcoólico ($p < 0,05$). Já entre as frações de ácidos fenólicos, a fração AFS apresentou um valor ORAC (2.282,3) superior ($p < 0,05$) às demais frações avaliadas.

Wu *et al.* (2004), com o intuito de criar uma base de dados com a atividade antioxidante de alimentos de origem vegetal, avaliaram 100 diferentes alimentos, utilizando o ensaio ORAC. Os alimentos foram divididos por grupos: frutas, vegetais, nozes, frutas secas, condimentos, cereais, entre outros. Os valores reportados de ORAC hidrofílico variaram de 0,87 a 2.641 μmol de Trolox/g de amostra fresca, destacando-se o grupo dos condimentos, que apresentaram os maiores valores ORAC, dos quais vale ressaltar: orégano (2.640 μmol de Trolox/g), cravo (1.533 μmol de Trolox/g) e salsa (740,8 μmol de Trolox/g).

Entre as frutas avaliadas por esses autores, destacam-se cereja (± 2.000 μmol de Trolox/g) e morango (445 μmol de Trolox/g). Todas as outras frutas avaliadas apresentaram valor ORAC abaixo de 100 μmol de Trolox/g: abacate (79 μmol de Trolox/g), maçã gala (27,9 μmol de Trolox/g), caju (35 μmol de Trolox/g) e tangerina (16 μmol de trolox/g). No presente trabalho, os valores ORAC encontrados para a polpa do pequi foram: 352,9 μmol de Trolox/g para o extrato aquoso, 245,3 μmol de Trolox/g para o extrato alcoólico, 2.058 μmol de trolox/g para a AFL, 2.282,3 μmol de trolox/g para a AFS e 1.711,6 μmol de trolox/g para a AFI. Comparando-se

os resultados deste trabalho com os que obtidos por Wu *et al.* (2004), pode-se considerar a polpa do pequi como um alimento de expressiva atividade antioxidante.

Tabela 15. Capacidade antioxidante dos extratos aquoso e alcoólico e das frações de ácidos fenólicos da polpa de pequi expressa como valor ORAC, em μ moles de equivalente de TROLOX/g de amostra fresca

Amostra	Valor ORAC (μ moles de equivalente de TROLOX/g)
Extrato aquoso	325,9 $\pm$ 6,7 ^a
Extrato alcoólico	245,3 $\pm$ 5,9 ^b
AFL	2.058,2 $\pm$ 45 ^d
AFS	2.282,3 $\pm$ 38 ^e
AFI	1.711,6 $\pm$ 40 ^c

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão, n = 3

(AFL) Frações de ácidos fenólicos livres, (AFS) esterificadas solúveis, (AFI) insolúveis

^{a,b,c,d} Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si em nível de 5% (p<0,05)

Para a amêndoa do pequi (vide tabela 16), ao contrário da polpa, o extrato alcoólico apresentou um valor ORAC de 673,4 μ mol de Trolox/g, superior (p<0,05) ao extrato aquoso, que apresentou valor ORAC de 470,3 μ mol de Trolox/g. Entre as frações de ácidos fenólicos, a fração AFL foi a que apresentou o maior valor ORAC (3.017 μ mol de Trolox/g) (p<0,05).

Wu *et al.* (2004) também avaliaram amêndoas, que apresentaram os seguintes valores ORAC: noz preta da Califórnia (130,5 μ mol de Trolox/g), avelã (92,7 μ mol de Trolox/g), pistache (75,6 μ mol de Trolox/g), castanha de caju (15,2 μ mol de Trolox/g) e castanha do Pará (8,6 μ mol de Trolox/g). Comparando esses dados com os obtidos para a amêndoa do pequi (vide tabela 16), constata-se que tanto seu extrato aquoso como seu extrato alcoólico apresentam valores ORAC muito superiores a todas as amêndoas avaliadas por esses autores, sugerindo a

amêndoa do pequi como um alimento de alto potencial antioxidante e como um provável alimento funcional.

Com relação às frações de ácidos fenólicos tanto da polpa como da amêndoa do pequi, quase todas apresentaram valores ORAC acima de 2.000 μmol de Trolox/g, exceto a fração AFI da amêndoa, que apresentou valor ORAC de 1.711,6 μmol de Trolox/g, valores próximos aos dos condimentos orégano e cravo, que apresentaram os maiores valores ORAC entre os 100 alimentos avaliados por Wu *et al.* (2004).

Tabela 16. Capacidade antioxidante dos extratos aquoso e alcoólico e das frações de ácidos fenólicos da amêndoa de pequi expressa como Valor ORAC, em μmoles de equivalente de TROLOX/g de amostra fresca

Amostra	Valor ORAC (μmoles de equivalente de TROLOX/g)
Extrato aquoso	470,3 $\pm$ 32 ^a
Extrato alcoólico	673,4 $\pm$ 29 ^b
AFL	3.017,6 $\pm$ 56 ^e
AFS	2.915,1 $\pm$ 75 ^d
AFI	2.512,1 $\pm$ 89 ^c

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão, n = 3

(AFL) Frações de ácidos fenólicos livres, (AFS) esterificadas solúveis, (AFI) insolúveis

^{a,b,c,d} Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si em nível de 5% (p<0,05)

5.2.6. Comparação e correlação da atividade antioxidante entre os métodos *in vitro*

Atualmente, existe uma grande dificuldade de comparação entre dados experimentais referentes à atividade antioxidante aferida por diferentes métodos, bem como de comparar dados da literatura. Essa dificuldade se deve à diversidade de compostos antioxidantes, que diferem quanto à classe química, quanto à polaridade, quanto à solubilidade, quanto à matriz alimentar e quanto às

especificidade da metodologia. Outros fatores que também contribuem são as diferentes condições de análise empregadas e a forma de expressão dos resultados, que muitas vezes não permitem uma comparação direta (GIADA e MANCINI-FILHO, 2006; VILLANO *et al.*, 2006).

De uma forma geral, na avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos da polpa do pequi, pelos cinco métodos empregados neste estudo, observou-se que o extrato aquoso apresentou elevada atividade antioxidante em todos os métodos empregados e sempre com valores superiores aos extratos alcoólico e etéreo estudados.

Na amêndoa do pequi, constatou-se uma tendência distinta à que se observou na polpa: o extrato aquoso foi mais efetivo como antioxidante pelos métodos do β -caroteno/ácido linoléico, Rancimat e DPPH; já nos métodos ABTS e ORAC, o extrato alcoólico apresentou atividade antioxidante superior ao extrato aquoso.

Os extratos alcoólicos tanto da polpa quanto das amêndoas do pequi apresentaram sinergismo quando associados ao BHT, independentemente da concentração utilizada.

As frações de ácidos fenólicos, tanto da polpa quanto da amêndoa do pequi, apresentaram elevada atividade antioxidante em todos os testes *in vitro* empregados, destacando-se a fração AFL da polpa, que apresentou uma atividade antioxidante superior às demais nos métodos do β -caroteno/ácido linoléico, DPPH, e ABTS. No ensaio Rancimat, as frações AFL e AFS apresentaram atividade antioxidante semelhante; no ensaio ORAC, a fração AFS apresentou a maior atividade antioxidante. Na amêndoa do pequi, a fração AFL foi mais efetiva como

antioxidante nos métodos do β -caroteno/ácido linoléico, DPPH, ABTS e ORAC; e a fração AFS apresentou maior atividade antioxidante no ensaio Rancimat.

No presente estudo, foi possível realizar uma correlação da atividade antioxidante do extrato aquoso e da fração de ácidos fenólicos livres (AFL) da polpa do pequi entre as metodologias do β -caroteno/ácido linoléico e do ensaio de captura dos radicais DPPH, obtendo-se uma correlação positiva com um R^2 de 0,8125 para o extrato aquoso e um R^2 de 0,9698 pra a fração AFL (vide figuras 36 e 37), demonstrando que, apesar das diferenças quanto ao mecanismo de ação dessas metodologias, as amostras foram eficientes em atuar tanto na captura de radicais isolados como na prevenção da oxidação do ácido linoléico.

Figura 36. Correlação entre as metodologias de atividade antioxidante do β -caroteno/ácido linoléico e do radical DPPH para o extrato aquoso da polpa de pequi

Figura 37. Correlação entre as metodologias de atividade antioxidante do β -caroteno/ácido linoléico e do radical DPPH para a fração de ácidos fenólicos livres da polpa de pequi

5.3. Identificação dos compostos polifenólicos

A terceira etapa desta pesquisa foi voltada para a identificação dos compostos polifenólicos presentes no extrato aquoso e nas frações de ácidos fenólicos livres (AFL), solúveis (AFS) e de ligantes insolúveis (AFI) da polpa e da

amêndoa do pequi; compostos esses responsáveis pela capacidade antioxidante, conforme demonstrado no item 5.2 e em seus subitens.

Os compostos polifenólicos presentes no extrato aquoso e nas frações AFL, AFS e AFI da polpa e da amêndoa do pequi foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de fotodiodo (DAD), utilizados 31 padrões de compostos fenólicos (subitem 4.1.2), entre 280 e 520 nm.

Na tabela 17, constam a identificação e a quantificação dos compostos fenólicos presentes no extrato aquoso e nas frações de ácidos fenólicos da polpa do pequi, nos quais foram detectados os seguintes ácidos fenólicos: gálico, elágico, 4 hidroxibenzóico e p-cumárico. No extrato aquoso, o ácido elágico foi encontrado em maior concentração (32,2 µg/g de amostra fresca), seguido pelo ácido p-cumárico (27,4 µg/g de amostra fresca) e pelo ácido gálico (9,56 µg/g de amostra fresca).

Conforme se pode observar na figura 38, no cromatograma do extrato aquoso da polpa do pequi apareceram muitos picos sem identificação, portanto a atividade antioxidante do extrato pode não estar relacionada exclusivamente aos ácidos fenólicos identificados. O aparecimento de muitos picos sem identificação pode ser explicado pela não purificação desse extrato. Manach e Donovan (2004) e Shahidi *et al.* (2007) referem que os compostos fenólicos presentes nos vegetais se encontram predominantemente na forma de glicosídeos, ou seja, ligados a açúcares, necessitando de tratamentos prévios que quebrem essas ligações para permitir uma melhor identificação dos compostos.

Tabela 17. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes no extrato aquoso e nas frações de ácidos fenólicos da polpa do pequi, resultados expressos em $\mu\text{g/g}$ de amostra fresca

Amostras	Compostos fenólicos ($\mu\text{g/g}$)			
	Ácido gálico	Ácido 4.OH hidroxibenzóico	Ácido p- cumárico	Ácido elágico
Ext. aquoso	$9,56 \pm 0,1$	nd	$27,43 \pm 0,87$	$32,2 \pm 0,91$
AFL	$1,17 \pm 0,01$	nd	$0,75 \pm 0,07$	$8,32 \pm 0,06$
AFS	$1,26 \pm 0,01$	nd	$1,52 \pm 0,01$	nd
AFI	$2,46 \pm 0,06$	$0,68 \pm 0,26$	$32,58 \pm 0,85$	$39,63 \pm 3,71$

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão, $n = 2$

(AFL) Frações de ácidos fenólicos livres, (AFS) esterificadas solúveis, (AFI) insolúveis

nd = não detectado

Nas figuras 39 e 40, podem ser observados os cromatogramas das frações AFL e AFI da polpa do pequi, respectivamente.

Figura 38. Cromatograma a 280 nm do extrato aquoso de polpa de pequi. 1 = ácido gálico, 2= ácido p-cumárico, 3= ácido elágico

Figura 39. Cromatograma a 280 nm da fração de ácidos fenólicos livres da polpa de pequi. 1 = ácido gálico, 2= ácido p-cumárico, 3= ácido elágico

Figura 40. Cromatograma a 280 nm da fração de ácidos fenólicos insolúveis da polpa de pequi. 1 = ácido gálico, 2= ácido p-hidroxibenzóico, 3= ácido p-cumárico, 4= ácido elágico

Entre as frações avaliadas, a fração AFI da polpa do pequi foi a que apresentou maior concentração de ácidos fenólicos. O ácido elágico esteve presente em maior concentração (39,63 µg/g de amostra fresca), seguido pelo ácido p-cumárico (32,58 µg/g de amostra fresca), apresentando ainda o ácido gálico (2,46 µg/g de amostra fresca) e, distintamente das demais frações, o ácido 4-OH benzóico (0,68 µg/g de amostra fresca). A maior concentração de ácidos fenólicos na fração AFI possivelmente decorre do fato de muitos ácidos fenólicos se encontrarem fortemente ligados a outras estruturas celulares dos vegetais, sendo necessárias hidrólise e acidificação para sua extração. Na fração AFL, o ácido elágico foi encontrado em maior concentração (8,32 µg/g de amostra fresca) que os demais ácidos fenólicos, enquanto na fração AFS encontraram-se os ácidos p-cumárico (1,52 µg/g de amostra fresca) e gálico (1,26 µg/g de amostra fresca).

Na literatura ainda não existe nenhum trabalho que relate a identificação dos ácidos fenólicos presentes na polpa e ou na amêndoa do pequi. Há apenas um trabalho realizado por Kawanishi e Raffauf (1986), que avaliaram os compostos fenólicos nas folhas do pequizeiro, detectando a presença de galitaninos, como os ácidos gálico e elágico e o galato de metila.

Os ácidos elágico, gálico e p-cumárico são encontrados em vários frutos (uva, romã, morango, goiaba, etc.) e em nozes, como avelã e castanha do Pará (DANIEL *et al.*, 1989; SHAHIDI *et al.*, 2007; PINTO, LAJOLO e GENOVESE, 2008) e já foram bastante estudados com relação a sua capacidade de degradar radicais livres. Na figura 41, podem ser visualizadas as estruturas dos ácidos fenólicos presentes na polpa do pequi.

Figura 41. Estrutura química dos ácidos fenólicos presentes na polpa do pequi

Fernández-Pachón *et al.* (2006), ao avaliar a capacidade antioxidante de vários padrões de compostos fenólicos, encontraram elevada atividade antioxidante para os ácidos gálico (valor ORAC de 6.970 μ moles de Trolox/g de composto) e p-cumárico (7.820 μ moles de Trolox/g de composto). Os referidos valores ORAC são superiores aos de vários outros padrões como epigallocatequina (2.450 μ moles de Trolox/g de composto) e kampferol (5.310 μ moles de Trolox/g de composto). Já o ácido 4-OH benzóico apresentou um valor intermediário (1.140 μ moles de Trolox/g de composto). O ácido elágico, formado por duas moléculas de ácido gálico, também apresenta alta capacidade antioxidante, pois possui quatro hidroxilas livres, que podem reagir com os radicais livres.

Muitos trabalhos foram desenvolvidos com o ácido elágico puro ou extraído de matrizes alimentares, nos quais se observaram potentes efeitos desse ácido fenólico na prevenção de uma série de doenças crônicas não transmissíveis e na manutenção da homeostase dos organismos estudados. Vatten e Shetty (2005), em uma extensa revisão sobre as funções biológicas do ácido elágico, relatam que o referido composto pode atuar: como antimutagênico, pela modulação do metabolismo de toxinas, levando à inibição das enzimas de fase I, que são responsáveis pela metabolização de xenobióticos; como anticarcinogênico, inibindo a ligação do carcinógeno ao DNA; como potente inibidor das enzimas DNA

topoisomerasas; como hepatoprotetor, em animais intoxicados por tetracloreto de carbono; na diminuição da peroxidação lipídica; e no aumento da expressão da enzima glutathione peroxidase.

Na polpa do pequi, o ácido elágico esteve presente em maior concentração em todos os extratos e/ou frações estudados, o que aponta o pequi como uma fonte potencial desse ácido fenólico, e justifica a elevada atividade antioxidante encontrada nos diversos métodos testados neste estudo,

Tabela 18. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes no extrato aquoso e nas frações de ácidos fenólicos da amêndoa do pequi, resultados expressos em µg/g de amostra fresca

Amostras	Compostos fenólicos (µg/g)				
	Ácido gálico	Ácido 4.OH hidroxibenzóico	Ácido p-cumárico	Ácido elágico	Procianidina B2
Ext. aquoso	13,81 ± 1,03	nd	34,71± 3,61	38,4± 1,42	1,51 ± 0,07
AFL	0,53±0,01	nd	nd	0,99 ±0,02	nd
AFS	4,20 ±0,03	0,56 ±0,00	0,91 ±0,15	136,7±10,10	nd

Valores expressos em média ± desvio padrão, n = 2

(AFL) Frações de ácidos fenólicos livres, (AFS) esterificadas solúveis, (AFI) insolúveis
nd = não detectado

Na tabela 18, constam a identificação e a quantificação dos compostos fenólicos presentes no extrato aquoso e nas frações de ácidos fenólicos da amêndoa do pequi. Como se pode observar, assim como na polpa, a amêndoa do pequi apresentou uma similaridade no perfil dos ácidos fenólicos nas diferentes frações estudadas, estando presente, além dos ácidos fenólicos anteriormente comentados, a procianidina B₂. O ácido elágico esteve em maior concentração em todas as frações estudadas, destacando-se a fração AFS (136,7 µg/g de amostra

fresca). Na fração AFS também foram detectados os ácidos gálico (4,20 µg/g de amostra), 4-OH hidroxibenzóico (0,56 µg/g de amostra) e p-cumárico (0,91 µg/g de amostra).

No extrato aquoso da amêndoa do pequi, além dos ácidos elágico, gálico e p-cumárico, verificou-se a presença do flavonóide procianidina B₂ (figura 43). Assim como no extrato aquoso da polpa, no extrato aquoso da amêndoa apareceram muitos picos sem identificação (figura 42), necessitando de outros estudos, que busquem purificar esses extratos para melhor identificar os compostos fenólicos que efetivamente contribuem para sua atividade antioxidante.

Figura 42. Cromatograma a 280 nm do extrato aquoso da amêndoa do pequi. 1 = ácido gálico, 2 = procianidina B₂, 3= ácido p-cumárico, 4= ácido elágico

A figura 43, apresenta a estrutura da procianidina B₂. Esse flavonóide possui uma estrutura dímera, formada por duas moléculas de epicatequina, com vários grupamentos OH livres, que podem interagir facilmente com radicais livres. Fernandez-Pachón *et al.* (2006) determinaram a atividade antioxidante desse padrão

fenólico puro e encontraram um valor ORAC de 7.820 μ moles de Trolox/g de composto.

Figura 43. Estrutura química da procianidina B₂

5.4. Avaliação da atividade antioxidante *in vivo*

A quarta etapa desta pesquisa avaliou a atividade antioxidante *in vivo*, por um período de 30 dias, utilizando ratos Wistar recém-desmamados, fundamentando-se nas etapas anteriores em que a polpa e a amêndoa do pequi demonstraram expressiva atividade antioxidante em todos os métodos utilizados.

Elegeram-se o extrato aquoso e a fração de ácidos fenólicos livres (AFL) da polpa do pequi para os testes com animais, haja vista terem demonstrado uma elevada capacidade antioxidante *in vitro* pelos métodos testados; além dos seguintes fatos: o estudo com o extrato aquoso reflete mais a forma de consumo do alimento, pois na extração desses compostos utiliza-se apenas a água; a fração AFL apresenta facilidade de extração dos compostos; e a polpa é a parte do fruto mais usualmente consumida pela população brasileira.

Os procedimentos com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP,

por estarem de acordo com os Princípios Éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimental Animal (COBEA) (vide Anexo I).

Os animais foram divididos em 5 grupos de 8. Ao grupo controle foi administrada água autoclavada (0,5mL/100g de peso do animal); ao grupo G1, extrato aquoso de pequi (100 mg/kg peso); ao grupo G2, extrato aquoso de pequi (300 mg/kg peso); ao grupo G3, ácidos fenólicos livres de pequi (40 mg/kg peso); e ao grupo G4, ácidos fenólicos livres (100 mg/kg peso).

Durante a realização do experimento, foram monitorados alguns parâmetros (peso inicial, peso final, consumo alimentar diário e total de ração) para se calcular o ganho de peso e o coeficiente de eficácia alimentar (CEA). Os resultados obtidos estão dispostos na tabela 19, na qual se observa que não houve diferença estatística em nenhum dos parâmetros avaliados entre os diferentes grupos. O CEA do grupo controle foi de 0,33 e o dos grupos tratados variou entre 0,32 (G1) e 0,34 (G2), demonstrando assim que o extrato aquoso e a fração AFL da polpa do pequi não exerceram nenhum efeito antinutricional que comprometesse o crescimento dos animais (vide figura 44). Corroborando esses achados, Giada (2006) não encontrou nenhuma diferença no crescimento dos animais, ao administrar extrato aquoso do cotilédone da semente rajada de girassol (*Heliantus annus*, L) na concentração de 0,7 e 2,1% de compostos fenólicos; e Gonthier *et al.* (2003) não detectaram diferença significativa na ingestão alimentar e no ganho de peso dos ratos ao suplementar a ração com vinho tinto, que contém pró-antocianidinas, ácidos fenólicos, flavanóis, antocianinas e flavonóis.

Tabela 19. Ganho de peso, consumo de ração e coeficiente de eficácia alimentar (CEA) dos grupos controle e experimentais tratados com extrato aquoso e ácidos fenólicos livres (AFL) da polpa de pequi

Grupos/ Parâmetros	Controle*	EA100mg/kg G1*	EA 300mg/kg G2*	AFL 40mg/kg G3*	AFL100mg/kg G4*
Peso inicial (g)	80,2 ±6,5	79,8 ^{ns} ±3,5	76,9 ^{ns} ±8,8	72,1 ^{ns} ±14,5	75,5 ^{ns} ±9,7
Peso final (g)	249,5±21,6	239,9 ^{ns} ±14,8	235,4 ^{ns} ±18,3	229,7 ^{ns} ±32,2	236,8 ^{ns} ±14,7
Ganho de peso (g)	169,2±19,2	160,1 ^{ns} ±16,5	158,5 ^{ns} ±10,8	157,5 ^{ns} ±25,7	161,3 ^{ns} ±12,1
Consumo diário(g)	17,3 ±4,6	16,8 ^{ns} ±3,2	15,7 ^{ns} ±3,7	15,9 ^{ns} ±1,7	16,3 ^{ns} ±2,3
Consumo total (g)	519,9±90,6	503,9 ^{ns} ±88,3	469,8 ^{ns} ±83,8	478,2 ^{ns} ±86,2	490,2 ^{ns} ±86,9
CEA	0,33±0,03	0,32 ^{ns} ±0,03	0,34 ^{ns} ±0,03	0,33 ^{ns} ±0,02	0,33 ^{ns} ±0,03

* Valores expressos como média ± desvio padrão, n = 8
ns =Média não difere estatisticamente do controle (p>0,05)

Figura 44. Curva de crescimento dos animais controle e experimentais tratados com extrato aquoso e fração de ácidos fenólicos livres do pequi

Na tabela 20, constam os valores dos pesos do fígado e do cérebro dos animais utilizados no experimento. Pode-se observar que o peso médio do fígado dos animais, por grupo, variou entre 7,15 e 7,61 g; enquanto o peso médio do

cérebro ficou entre 1,71 e 1,84 g. Não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre os pesos dos dois órgãos estudados entre os diferentes grupos, sugerindo que a suplementação com o extrato aquoso e a fração AFL da polpa do pequi não interferiram no desenvolvimento desses órgãos.

Tabela 20. Peso (g) dos órgãos dos animais dos grupos controle e experimentais G1, G2, G3, G4, tratados com extrato aquoso e ácidos fenólicos livres (AFL) da polpa de pequi

Grupos/ tecidos	Controle*	EA100mg/kg	EA 300mg/kg	AFL 40mg/kg	AFL100mg/kg
	G1*	G2*	G3*	G4*	
Fígado	7,32 ±1,84	7,24 ^{ns} ±0,46	7,26 ^{ns} ± 0,76	7,15 ^{ns} ± 1,08	7,61 ^{ns} ±0,64
Cérebro	1,84 ±0,07	1,77 ^{ns} ±0,06	1,79 ^{ns} ±0,03	1,75 ^{ns} ±0,11	1,71 ^{ns} ± 0,07

* Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão, n = 8
ns = Média não difere estatisticamente do controle ($p>0,05$)

5.4.1. Efeito do extrato aquoso e da fração AFL da polpa do pequi na peroxidação lipídica (TBARS), na atividade das enzimas antioxidantes e no perfil lipídico, no plasma e nos tecidos cerebral e hepático de ratos

Os compostos fenólicos são os antioxidantes mais abundantes na dieta. Alguns autores estimam que a ingestão total pode chegar a 1g por dia, superando a ingestão de outras classes de fitoquímicos e antioxidantes dietéticos bem conhecidos. Por exemplo, é 10 vezes maior que a ingestão da vitamina C e 100 vezes mais alta que a ingestão de vitamina E e de carotenóides (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000; MANACH *et al.*, 2004). As principais fontes de compostos fenólicos da dieta são as bebidas derivadas das plantas, como chás, café, vinho tinto e os sucos de frutas. Existem suficientes evidências científicas que relacionam o

consumo de compostos fenólicos com a prevenção de doenças cardiovasculares, de câncer e da osteoporose, e que sugerem uma relação entre o consumo e a prevenção de doenças neurodegenerativas e diabetes melitos (SCALBERT *et al.*, 2005). Alguns trabalhos têm demonstrado claramente, pela indicação de diferentes biomarcadores do estresse oxidativo, que os compostos fenólicos administrados por meio da dieta melhoram o nível de saúde (SIES *et al.*, 1995; KRIS-ETHERTON e KEEN, 2002).

No presente estudo, avaliou-se o efeito do extrato aquoso e da fração de ácidos fenólicos livres do pequi na melhoria de alguns biomarcadores do estresse oxidativo, como a peroxidação lipídica, a atividade das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione redutase), além do perfil de ácidos graxos nos tecidos cerebral e hepático e no plasma.

5.4.1.1. Tecido cerebral

Dentre os tecidos do corpo humano, exceto o tecido adiposo, o sistema nervoso possui o maior conteúdo de lipídeos. O peso seco do cérebro de um adulto possui cerca de 50 a 60% de gordura, das quais 35% são ácidos graxos poliinsaturados (PUFAS). Por isso, o cérebro é muito susceptível à destruição pelos radicais livres (VASCONCELLOS *et al.*, 1999).

A tabela 21 apresenta os resultados da determinação do índice de peroxidação lipídica no tecido cerebral dos animais tratados com o extrato aquoso e a fração AFL da polpa do pequi nos diferentes grupos avaliados. Pode-se observar que houve uma diminuição significativa ($p < 0,01$) da lipoperoxidação de todos os grupos tratados com o extrato aquoso e a fração AFL em relação ao grupo controle. Observa-se também que os grupos que receberam as maiores doses do extrato

aquoso (grupo G2 = 300 mg/kg de peso) e da fração AFL (grupo G4 = 100 mg/kg de peso) apresentaram valores de peroxidação lipídica menores (0,156 μ moles MDA/mg de proteína, para os dois grupos), demonstrando que houve uma resposta dose-dependente inversamente proporcional entre a administração dos compostos fenólicos e a peroxidação lipídica. Sabe-se que o cérebro de animais possui uma capacidade antioxidante relativamente baixa e uma elevada utilização de oxigênio, sendo um órgão ideal para avaliar o efeito de compostos antioxidantes administrados pela dieta na degradação dos radicais livres gerados nesse órgão (VASCONCELLOS *et al.*, 1999).

Resultados semelhantes foram encontrados por Chowdhury e Solsby (2002), que demonstraram que a proteína de soja foi capaz de reduzir os níveis de peroxidação lipídica no cérebro de ratos adultos machos, quando comparados com ratos alimentados com dieta regular; e Giada (2006), que verificou uma redução na lipoperoxidação, ao administrar extrato aquoso da semente de girassol, na dose de 2,1% de fenólicos totais, a ratos machos recém-desmamados, por um período de 29 dias, comparando-os com ratos que receberam dieta padrão comercial.

Tabela 21. Valores de peroxidação lipídica (MDA) no tecido cerebral dos grupos controle e experimentais tratados com extrato aquoso e ácidos fenólicos livres (AFL) da polpa de pequi

Grupo	Peroxidação lipídica (μ moles MDA/mg de proteína)
Controle	0,303 $\pm$ 0,04
EA100mg/kg - G1	0,202** $\pm$ 0,07
EA 300mg/kg - G2	0,156*** $\pm$ 0,03
AFL 40mg/kg - G3	0,180*** $\pm$ 0,06
AFL 100mg/kg - G4	0,156*** $\pm$ 0,06

* Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão, n = 8

* Média difere estatisticamente do controle em nível de erro de 5% (p<0,05)

** Média difere estatisticamente do controle em nível de erro de 1% (p<0,01)

*** Média difere estatisticamente do controle em nível de erro de 0,1% (p<0,001)

É consenso entre os pesquisadores que o consumo regular de frutas e outros vegetais ricos em compostos fenólicos pode proteger contra várias enfermidades, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares; o que pode ser explicado pela capacidade dos compostos fenólicos em seqüestrar radicais livres. Mais recentemente tem-se visto que os compostos fenólicos também podem atuar na potencialização da atividade e/ou na indução da expressão gênica das enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GSH-Px e GSH-R), além de inibir a ação da xantina oxidase e da NADPH oxidase (enzimas geradoras de espécies reativas de oxigênio) (LI *et al.*, 2005; YEH e YEN, 2006; WANG *et al.*, 2008).

A tabela 22 mostra os valores de atividade das enzimas antioxidantes (catalase, glutathiona peroxidase, glutathiona redutase e superóxido dismutase) no cérebro dos animais controle e tratados com o extrato aquoso e com a fração de ácidos fenólicos livres, do pequi. De acordo com os resultados, observa-se que houve uma diferença significativa (p<0,05) na atividade da enzima catalase entre o

grupo controle (1,58 U/min/mg proteína) e o grupo G4 (2,06 U/min/mg proteína); não se observando diferença ($p > 0,05$) entre o grupo controle e os demais grupos, apesar de uma tendência, não estatisticamente significativa, no aumento da atividade enzimática (vide tabela 23). O grupo G4 foi o que recebeu a maior dose de AFL da polpa do pequi (100 mg/kg de peso).

A atividade da enzima glutathiona redutase no tecido cerebral do grupo controle (0,0262 U/min/mg proteína) diferiu ($p < 0,05$) com relação aos grupos G3 ($0,0318 \pm 0,007$ U/min/mg proteína) e G4 ($0,0349 \pm 0,003$ U/min/mg proteína), não apresentando diferença estatística com os grupos G1 e G2. Já na atividade das enzimas glutathiona peroxidase e superóxido dismutase, constatou-se diferença ($p < 0,05$) entre o grupo controle e os grupos G2, G3 e G4.

Verificou-se que a administração do extrato aquoso, na dose de 300 mg/kg (grupo G2), potencializou atividade das enzimas glutathiona peroxidase e superóxido dismutase. Nos animais que receberam a fração AFL da polpa, na dose de 100 mg/kg (grupo G4), observou-se aumento significativo na atividade de todas as enzimas antioxidantes avaliadas neste estudo. Achados semelhantes foram reportados por Li *et al.* (2005), ao administrar ácido gálico purificado de rosa rugosa (*Hamanasu rosaceae*) em ratos com senescência acelerada, a uma dose de 80 mg/kg de peso, constatando uma potencialização das enzimas CAT e GSH-Px, além de uma diminuição da lipoperoxidação, no cérebro dos animais.

Já Balu *et al.* (2005), ao suplementar a ração de ratos jovens e velhos com extrato de semente de uva, detectaram, apenas nos ratos em senescência, uma elevação na atividade das enzimas antioxidantes (catalase, glutathiona peroxidase, glutathiona redutase e superóxido dismutase), que nos ratos jovens permaneceu inalterada.

Tabela 22. Atividade das enzimas antioxidantes Catalase, Glutathione peroxidase, Glutathione redutase e Superóxido dismutase no cérebro dos animais controle e tratados com extrato aquoso e fração de ácidos fenólicos livres da polpa de pequi, valores expressos em U/min/mg proteína

Grupos/ Enzimas	Controle*	EA100mg/Kg G1*	EA 300mg/Kg G2*	AFL 40mg/kg G3*	AFL100mg/g G4*
Catalase	1,58±0,4	1,71 ^{ns} ±0,3	1,72 ^{ns} ±0,3	1,81 ^{ns} ±0,3	2,06 [*] ±0,3
Glutathione redutase	0,0262 ±0,004	0,0294 ^{ns} ±0,001	0,0291 ^{ns} ±0,002	0,0318 [*] ±0,007	0,0349 ^{***} ±0,003
Glutathione peroxidase	0,101±0,008	0,109 ^{ns} ±0,01	0,135 ^{**} ±0,01	0,123 ^{***} ±0,01	0,131 ^{***} ±0,015
Superóxido dismutase	6,48±0,6	7,25 ^{ns} ±0,8	7,56 [*] ±0,8	7,09 ^{ns} ±0,7	7,92 ^{**} ±0,6

* Valores expressos como média ± desvio padrão, n = 8

ns Média não difere estatisticamente do controle (p>0,05)

* Média difere estatisticamente do controle em nível de erro de 5% (p<0,05)

** Média difere estatisticamente do controle em nível de erro de 1% (p<0,01)

*** Média difere estatisticamente do controle em nível de erro de 0,1% (p<0,001)

A tabela 23 mostra o perfil de ácidos graxos do tecido cerebral dos animais tratados com extrato aquoso e com a fração AFL da polpa do pequi. Observa-se, no grupo controle, que os ácidos graxos saturados representaram 53,37%; os ácidos graxos monoinsaturados, 23,71%; e ácidos graxos poliinsaturados, 23,88%. Não se detectaram diferenças estatísticas, quando se compararam os percentuais de ácidos graxos totais, saturados, mono e poliinsaturados, entre o grupo controle e os grupos que receberam extrato aquoso e a fração AFL do pequi.

Nos resultados obtidos, pôde-se identificar um discreto aumento (estatisticamente não significativo) na concentração dos ácidos graxos insaturados C20:4 e C22:6. Giada (2006), ao avaliar o perfil de ácidos graxos do tecido cerebral de ratos tratados com extrato aquoso de semente de girassol, também não verificou

nenhuma diferença significativa entre os grupos. Essa autora sugere que a ação protetora dos antioxidantes, no tecido cerebral, poderia dar-se de forma mais tardia.

Tabela 23. Perfil de ácidos graxos (%) do tecido cerebral de ratos tratados com extrato aquoso e fração de ácidos fenólicos livres da polpa de pequi, durante 30 dias

Ácido graxo	Teor (%) [*]				
	Controle [*]	EA100mg/Kg	EA 300mg/Kg	AFL 40mg/kg	AFL100mg/g
	G1 [*]	G2 [*]	G3 [*]	G4 [*]	
C13:0	0,63 ±0,42 ^a	0,33 ±0,06 ^a	0,45 ±0,12 ^a	0,41 ±0,05 ^a	0,43 ±0,05 ^a
C14:0	0,54 ±0,59 ^a	0,20 ±0,03 ^a	0,29 ±0,07 ^a	0,21 ±0,06 ^a	0,20 ±0,04 ^a
C16:0	23,53 ±2,70 ^a	22,62 ±1,66 ^a	23,07 ±1,39 ^a	23,35 ±0,90 ^a	22,45 ±2,1 ^a 8
C16:1	0,59 ±0,15 ^a	0,41 ±0,04 ^a	0,43 ±0,07 ^a	0,41 ±0,06 ^a	0,33 ±0,30 ^a
C17:0	0,49 ±0,18 ^a	0,29 ±0,03 ^a	0,34 ±0,02 ^a	0,27 ±0,0 ^a 3	0,27 ±0,02 ^a
C18:0	25,21 ±2,97 ^a	27,26 ±3,3 ^a 9	27,32 ±2,22 ^a	26,93 ±2,7 ^a 2	25,60 ±1,26 ^a
C18:1	19,57 ±3,44 ^a	20,07 ±3,44 ^a	19,37 ±2,44 ^a	18,85 ±1,21 ^a	19,94 ±2,69 ^a
C18:2	3,04 ±0,89 ^a	1,14 ±0,38 ^a	1,63 ±1,23 ^a	0,79 ±0,11 ^a	0,93 ±0,10 ^a
C20	0,81 ±0,39 ^a	0,71 ±0,10 ^a	0,77 ±0,20 ^a	0,54 ±0,14 ^a	0,70 ±0,33 ^a
C20:1	1,13 ±0,60 ^a	1,06 ±0,35 ^a	1,30 ±0,54 ^a	0,97 ±0,23 ^a	1,26 ±0,81 ^a
C20:3n-6	0,38 ±0,19 ^a	0,32 ±0,06 ^a	0,36 ±0,08 ^a	0,34 ±0,03 ^a	0,37 ±0,08 ^a
C20:4	9,83 ±2,62 ^a	10,76 ±1,05 ^a	10,30 ±1,26 ^a	11,80 ±1,26 ^a	11,55 ±1,24 ^a
C22:0	0,74 ±0,48 ^a	0,68 ±0,14 ^a	0,65 ±0,21 ^a	0,51 ±0,19 ^a	0,60 ±0,38 ^a
C22:1	0,24 ±0,03 ^a	0,17 ±0,03 ^a	0,22 ±0,08 ^a	0,14 ±0,01 ^a	0,19 ±0,10 ^a
C24:0	1,44 ±0,91 ^a	1,40 ±0,28 ^a	1,45 ±0,38 ^a	1,04 ±0,44 ^a	1,15 0,61 ^a
C22:6	10,47 ±2,29 ^a	11,52 ±1,51 ^a	10,93 ±1,04 ^a	12,64 ±1,53 ^a	12,62 ±1,32 ^a
C24:1	1,17 ±0,55 ^a	1,18 ±0,39 ^a	1,21 ±0,43 ^a	0,83 ±0,25 ^a	1,05 ±0,60 ^a
Saturados	53,37 ±4,90^a	53,49 ±4,85^a	54,35 ±2,71^a	55,58 ±6,48^a	56,88 ±7,38^a
Poliinsatur.	23,71 ±4,44^a	23,74 ±2,36^a	23,22 ±2,49^a	23,13 ±6,73^a	20,82 ±6,37^a
Monoinsat.	23,88 ±6,99^a	22,89 ±3,7^a	22,53 ±3,30^a	21,19 ±1,52^a	22,91 ±4,49^a

^{*} Valores expressos como média ± desvio padrão, n = 8

^{a,b} Médias, na mesma linha, seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si em nível de 5% (p<0,05), comparando as amostras ao grupo controle

5.4.1.2. Tecido Hepático

A tabela 24 mostra os valores da peroxidação lipídica no tecido hepático dos animais controle e tratados com extrato aquoso e com a fração AFL da polpa do pequi. Observando-se os índices de lipoperoxidação (controle = 0,362 μ moles MDA/mg de proteína, G1 = 0,374 μ moles MDA/mg de proteína, G3 = 0,379 μ moles MDA/mg de proteína), verifica-se que não houve diferença significativa. Já os grupos G2 e G4 apresentaram um nível de peroxidação lipídica menor e estatisticamente diferente ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle. Os grupos G2 e G4 foram os que receberam as maiores doses do extrato aquoso (300 mg/kg de peso) e da fração AFL (100 mg/kg de peso), demonstrando que nessas doses os compostos fenólicos do pequi foram efetivos na redução da lipoperoxidação nesse tecido. Rodrigues *et al.* (2005), Lima *et al.* (2005) e Wang *et al.* (2008) também encontraram níveis de peroxidação lipídica reduzidos em tecidos hepáticos de ratos tratados com amostras de vinho tinto, infusão aquosa de sálvia (*Salvia officinalis*) e soja fermentada, respectivamente.

Tabela 24 Valores de peroxidação lipídica (MDA) no tecido hepático dos grupos controle e experimentais tratados com extrato aquoso e ácidos fenólicos livres da polpa do pequi

Grupo	Peroxidação lipídica* (μmoles MDA/mg de proteína)
Controle	0,362 $\pm$ 0,07
EA100 mg/kg - G1	0,374 ^{ns} $\pm$ 0,04
EA 300 mg/kg - G2	0,173 ^{***} $\pm$ 0,08
AFL 40 mg/kg - G3	0,379 ^{ns} $\pm$ 0,08
AFL 100 mg/kg - G4	0,243 [*] $\pm$ 0,07

* Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão, n = 8

ns Média não difere estatisticamente do controle (p>0,05)

* Média difere estatisticamente do controle em nível de erro de 5% (p<0,05)

** Média difere estatisticamente do controle em nível de erro de 1% (p<0,01)

***Média difere estatisticamente do controle em nível de erro de 0,1% (p<0,001)

A tabela 25 mostra os valores da atividade das enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e superóxido dismutase) no fígado dos animais controle e tratados com extrato aquoso e fração de ácidos fenólicos livres, do pequi. Observa-se que houve aumento (p<0,01) na atividade da enzima catalase nos grupos G2 (249,9 U/min/mg proteína) e G4 (243,9 U/min/mg) quando comparados ao controle (174,6 U/min/mg proteína). Comportamento semelhante ao da enzima catalase foi observado para a enzima glutathione reductase, cuja atividade aumentou significativamente (p<0,05) nos grupos G2 e G4.

A atividade da enzima glutathione peroxidase do fígado dos ratos aumentou nos grupos G2, G3 e G4; no grupo G1, não apresentou elevação significativa. Já a atividade da enzima superóxido dismutase só não apresentou elevação significativa no grupo G3. Esses resultados demonstram que o extrato aquoso e a fração AFL da

polpa do pequi apresentaram um efeito positivo na atividade das enzimas antioxidantes no fígado, principalmente nas maiores doses administradas. Resultados semelhantes foram observados por Wang *et al.* (2008), que constataram elevação na atividade enzimática da CAT, SOD e GSH-Px no fígado de ratos alimentados, por três semanas, com dieta rica em colesterol (0,5%) adicionada de 4% de fermentado de soja; e Kota, Krishna e Polasa (2008), que também constaram elevação das mesmas enzimas no tecido hepático de ratos normais alimentados por, um mês, com 1 e 5% de gengibre (*Zingiber officinalis*) na dieta, observando ainda uma redução na lipoperoxidação.

Yeh e Yen (2006), suplementando, por via oral, ratos normais com ácidos fenólicos sintéticos (gentísico, gálico, ferúlico e *p*-cumárico) na concentração de 100 mg/kg de peso do animal, também constataram um aumento da atividade das enzimas CAT, SOD e GPx, no tecido hepático.

Sanmugapriya e Venkataraman (2006), avaliando o efeito da suplementação com extrato aquoso das sementes de *Strychnos potatorum* Linn, em ratos com lesão hepática induzida por CCl₄, observaram uma potencialização de todas as enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx e GR) com o aumento de suas atividades e diminuição da lipoperoxidação, no tecido hepático.

Já Andrade-Wartha (2007), administrando extrato aquoso de caju (nas concentrações de 80 e 240 mg/kg de peso do animal) e fração AFL do caju (nas concentrações de 40 e 120 mg/Kg de peso do animal), a ratos machos recém-desmamados, normais, não observou elevação na atividade das enzimas antioxidantes no fígado. Em outro experimento, entretanto, a referida autora induziu o estresse oxidativo nos ratos com tetracloreto de carbono (CCl₄) e avaliou a influência do mesmo extrato aquoso, a uma concentração mais elevada (480 mg/kg

de peso do animal) e da mesma fração AFL (nas mesmas concentrações utilizada no primeiro ensaio), constatando que mesmo sob condições de estresse oxidativo, o extrato aquoso e a fração AFL na menor concentração não alteraram a atividade das enzimas antioxidantes; houve, entretanto, uma elevação da atividade das enzimas nos animais que receberam a fração AFL na maior concentração (120 mg/kg de peso).

Tabela 25. Atividade das enzimas antioxidantes Catalase, Glutathione peroxidase, Glutathione redutase e Superóxido dismutase no fígado dos animais controle e tratados com extrato aquoso e fração de ácidos fenólicos livres da polpa do pequi, valores expressos em U/min/mg proteína

Grupos/ Enzimas	Controle*	EA100mg/kg G1*	EA 300mg/kg G2*	AFL 40mg/kg G3*	AFL100mg/kg G4*
Catalase	174,6±50,5	231,3 ^{ns} ±49,3	249,9*±38,9	239,6 ^{ns} ±55,2	243,9*±40,0
Glutathione redutase	0,047±0,005	0,047 ^{ns} ±0,004	0,056**±0,004	0,049 ^{ns} ±0,005	0,066***±0,004
Glutathione peroxidase	1,33±0,15	1,35 ^{ns} ±0,09	2,05***±0,25	2,54***±0,36	2,96***±0,40
Superóxido dismutase	20,27±4,0	28,06**±5,3	29,41**±5,4	25,41 ^{ns} ±3,7	29,02**±2,3

* Valores expressos como média ± desvio padrão, n = 8

ns Média não difere estatisticamente do controle (p>0,05)

* Média difere estatisticamente do controle em nível de erro de 5% (p<0,05)

** Média difere estatisticamente do controle em nível de erro de 1% (p<0,01)

*** Média difere estatisticamente do controle em nível de erro de 0,1% (p<0,001)

A tabela 26 mostra o perfil de ácidos graxos do tecido hepático dos animais tratados com extrato aquoso e fração AFL da polpa do pequi. Observa-se que houve diferença (p<0,05) na concentração de ácidos graxos saturados e poliinsaturados

entre o grupo controle e o grupo G2; no grupo controle o teor de ácidos graxos saturados foi de 41,36% e no grupo G2, de 35,66%. A concentração de ácidos graxos poliinsaturados no grupo controle foi de 48,76% e no grupo G2, de 55,25%; demonstrando que o extrato aquoso de pequi protegeu os ácidos graxos insaturados do tecido hepático contra o ataque de radicais livres. Apesar de perceber uma tendência de aumento na concentração de ácidos graxos poliinsaturados nos grupos G1 (51,85%), G3 (51,46%) e G4 (52,02%) em relação ao grupo controle (48,76%) essas diferenças não foram significativas ($p>0,05$). Com relação à concentração de ácidos graxos monoinsaturados, não houve diferença entre os grupos.

Quando se avaliam isoladamente os ácidos graxos, em cada grupo, constata-se aumento na concentração do ácido linoléico (18:2): controle (17,26%), G1 (18,92%), G2 (20,59%), G3 (19,17%) e G4 (20,00%). O aumento foi significativo ($p<0,05$) apenas para o G2. O ácido araquidônico (C24:4) apresentou comportamento semelhante ao ácido linoléico. Esses resultados sugerem uma ação inibidora dos compostos fenólicos presentes no extrato aquoso de pequi na maior dose estudada (300 mg/kg de peso, grupo G2) sobre o processo oxidativo no tecido hepático dos animais. Resultados semelhantes foram verificados por Giada (2006), que observou uma elevação discreta, mas significativa, na concentração de ácidos graxos poliinsaturados (C20:3 n-6 e C24:4) em ratos tratados com extrato aquoso da semente rajada de girassol, na concentração de 2,1% de fenólicos totais no extrato.

Os compostos polifenólicos advindos da dieta, antes de serem secretados na circulação sangüínea, sofrem metabolização no fígado (MANACH e DONOVAN, 2004). Portanto esse órgão pode servir como um depósito de compostos polifenólicos, combatendo os radicais livres mais rapidamente que o cérebro e o plasma. Isso possivelmente explica o fato de apenas no tecido hepático o conteúdo

de ácidos graxos poliinsaturados ter apresentado valores mais elevados ($p < 0,05$) quando comparados o grupo controle e o grupo que recebeu o extrato aquoso na maior dose estudada (300 mg/kg).

Tabela 26. Perfil de ácidos graxos (%) do fígado de ratos tratados com extrato aquoso e fração de ácidos fenólicos livres, da polpa de pequi

Ácido graxo	Teor (%) [*]				
	Controle [*]	EA100mg/kg	EA 300mg/kg	AFL 40mg/kg	AFL100mg/kg
	G1 [*]	G2 [*]	G3 [*]	G4 [*]	
C14:0	0,25 ±0,07 ^a	0,28 ±0,05 ^a	0,28 ±0,05 ^a	0,29 ±0,14 ^a	0,32 ±0,13 ^a
C15:0	0,24 ±0,02 ^a	0,22 ±0,05 ^a	0,24 ±0,06 ^a	0,20 ±0,04 ^a	0,20 ±0,04 ^a
C16:0	18,81 ±2,52 ^a	17,77 ±1,57 ^a	17,04 ±0,53 ^a	18,33 ±1,01 ^a	18,21 ±1,67 ^a
C16:1	0,56 ±0,13 ^a	0,65 ±0,21 ^a	0,77 ±0,26 ^a	0,78 ±0,34 ^a	0,81 ±0,44 ^a
C17:0	0,78 ±0,08 ^a	0,69 ±0,10 ^a	0,73 ±0,25 ^a	0,63 ±0,09 ^a	0,58 ±0,09 ^a
C18:0	20,59 ±2,98 ^a	19,13 ±2,33 ^a	16,70 ±1,24 ^b	19,23 ±2,57 ^a	18,68 ±2,15 ^a
C18:1	7,34 ±0,80 ^a	7,43 ±0,84 ^a	8,39 ±0,88 ^a	8,39 ±1,61 ^a	8,64 ±1,76 ^a
C18:2	17,26 ±4,94 ^a	18,92 ±1,50 ^a	20,59 ±1,43 ^b	19,17 ±2,86 ^a	20,00 ±1,63 ^a
C18:3	0,43 ±0,11 ^a	0,47 ±0,12 ^a	0,55 ±0,12 ^a	0,46 ±0,19 ^a	0,46 ±0,24 ^a
C20:2	0,52 ±0,11 ^a	0,41 ±0,05 ^a	0,46 ±0,08 ^a	0,40 ±0,04 ^a	0,38 ±0,03 ^a
C20:3n-6	0,37 ±0,06 ^a	0,33 ±0,05 ^a	0,42 ±0,07 ^a	0,38 ±0,07 ^a	0,31 ±0,08 ^a
C24:4	25,86 ±1,09 ^a	27,24 ±1,97 ^a	28,34 ±1,59 ^b	26,15 ±2,49 ^a	26,29 ±2,79 ^a
C24:0	0,70 ±0,15 ^a	0,71 ±0,17 ^a	0,46 ±0,04 ^a	0,69 ±0,30 ^a	0,59 ±0,08 ^a
C22:5	0,60 ±0,12 ^a	0,43 ±0,07 ^a	0,61 ±0,12 ^a	0,56 ±0,14 ^a	0,47 ±0,05 ^a
C22:6	3,73 ±1,45 ^a	4,06 ±0,72 ^a	4,42 ±0,55	4,34 ±0,86 ^a	4,09 ±0,41 ^a
Saturados	41,36 ±5,53 ^a	38,81 ±3,77 ^a	35,66 ±0,89 ^b	39,36 ±3,28 ^a	38,57 ±2,35 ^a
Poliinsat.	48,76 ±7,51 ^a	51,85 ±2,26 ^a	55,25 ±1,13 ^b	51,46 ±2,80 ^a	52,02 ±2,83 ^a
Monoinsat.	7,90 ±0,82 ^a	8,08 ±1,00 ^a	9,06 ±1,13 ^a	9,18 ±1,89 ^a	9,45 ±2,16 ^a

^{*} Valores expressos como média ± desvio padrão, n = 8

^{a,b} Médias, na mesma linha, seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si em nível de 5% ($p < 0,05$), comparando as amostras ao grupo controle

5.4.1.3. Plasma

Cerca de 90% do plasma sanguíneo constitui-se de água, na qual estão dissolvidas as numerosas substâncias presentes no sangue. Alguns trabalhos têm demonstrado que (assim como as vitaminas C e E, reconhecidamente antioxidantes) os compostos fenólicos presentes nos alimentos, uma vez absorvidos, podem prevenir a oxidação da fração LDL colesterol plasmático (KRIS-ETHERTON e KEEN, 2002). No plasma dos animais em estudo, foram avaliadas a peroxidação lipídica e a composição em ácidos graxos.

A tabela 27 mostra os valores da peroxidação lipídica do plasma dos animais tratados com o extrato aquoso e a fração AFL da polpa do pequi. Nota-se que houve diferença ($p < 0,001$) entre o grupo controle e todos os grupos que receberam extrato e/ou fração AFL da polpa do pequi. Identifica-se também, na tabela 27, que os níveis da lipoperoxidação reduziram-se com a elevação da dose tanto do extrato, quanto da fração AFL, demonstrando um efeito dose-dependente.

Choi e Hwang (2005) observaram um decréscimo significativo na concentração de MDA no plasma dos ratos que receberam extratos de plantas medicinais (*Piper cubeba*, *Physalis angulata* e *Rosa hybrida*), na dose de 0,2 g/kg de peso corporal; e Silva *et al.* (2004) constataram uma maior resistência à oxidação do plasma dos ratos alimentados com ração suplementada com quercetina, quando comparados aos animais do grupo controle, cuja dieta não foi suplementada com antioxidante.

Tabela 27. Valores de peroxidação lipídica (MDA) no plasma dos grupos controle e experimentais tratados com extrato aquoso e ácidos fenólicos livres da polpa do pequi

Grupo	Peroxidação lipídica* (μmoles MDA/mg de proteína)
Controle	0,324 $\pm$ 0,06
EA100mg/kg - G1	0,210*** $\pm$ 0,02
EA 300mg/kg - G2	0,092*** $\pm$ 0,02
AFL 40mg/kg - G3	0,258** $\pm$ 0,02
AFL 100mg/kg - G4	0,071*** $\pm$ 0,140

* Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão, n = 8

ns Média não difere estatisticamente do controle (p>0,05)

* Média difere estatisticamente do controle em nível de erro de 5% (p<0,05)

** Média difere estatisticamente do controle em nível de erro de 1% (p<0,01)

***Média difere estatisticamente do controle em nível de erro de 0,1% (p<0,001)

A tabela 28 mostra o perfil de ácidos graxos do plasma dos animais tratados com extrato aquoso e fração AFL da polpa do pequi. No grupo controle, os ácidos graxos saturados representaram 50,21%; os ácidos graxos monoinsaturados, 14,76%; e os poliinsaturados, 35,05%. Quando se compararam os percentuais de ácidos graxos totais, saturados, mono e poliinsaturados, não se detectaram diferenças estatísticas.

Observa-se uma tendência de aumento, embora não estatisticamente significativo, nas concentrações dos ácidos graxos insaturados. Por exemplo, a concentração verificada do ácido oléico (18:1) foi: controle (11,73%), G1 (14,36%), G2 (13,21%), G3 (12,22) e G4 (11,70%). Já do ácido linoléico (18:2) apresentou: controle (13,57%), G1 (15,61%), G2 (14,15%), G3 (16,26%) e G4 (14,75%).

Tabela 28. Perfil de ácidos graxos (%) do plasma de ratos tratados com extrato aquoso e fração de ácidos fenólicos livres da polpa de pequi

Ácidos graxos	Teor (%)*				
	Controle*	EA100mg/kg	EA 300mg/kg	AFL 40mg/kg	AFL100mg/kg
	G1*	G2*	G3*	G4*	
C13:0	1,66 ±1,23 ^a	2,34 ±1,31 ^a	2,05 ±0,29 ^a	1,67 ±0,76 ^a	2,33 ±1,43 ^a
C14:0	0,65 ±0,21 ^a	1,16 ±0,78 ^a	0,87 ±0,37 ^a	0,75 ±0,22 ^a	0,87 ±0,33 ^a
C15:0	0,46 ±0,15 ^a	0,52 ±0,15 ^a	0,44 ±0,05 ^a	0,40 ±0,06 ^a	0,56 ±0,41 ^a
C16:0	25,01 ±4,42 ^a	21,09 ±1,74 ^a	21,60 ±1,50 ^a	23,66 ±1,73 ^a	22,98 ±0,88 ^a
C16:1	3,04 ±1,95 ^a	3,95 ±2,61 ^a	2,43 ±0,87 ^a	2,10 ±0,62 ^a	2,19 ±0,88 ^a
C17:0	0,72 ±0,16 ^a	0,69 ±0,09 ^a	0,69 ±0,12 ^a	0,64 ±0,10 ^a	0,70 ±0,13 ^a
C18:0	19,39 ±2,29 ^a	16,11 ±2,90 ^a	18,70 ±1,78 ^a	17,76 ±2,73 ^a	18,97 ±2,30 ^a
C18:1	11,73 ±1,86 ^a	14,36 ±3,44 ^a	13,21 ±1,18 ^a	12,22 ±1,29 ^a	11,70 ±1,55 ^a
C18:2	13,57 ±1,69 ^a	15,61 ±3,25 ^a	14,15 ±2,10 ^a	16,26 ±1,96 ^a	14,75 ±2,39 ^a
C18:3	0,54 ±0,04 ^a	1,04 ±0,86 ^a	0,48 ±0,16 ^a	0,60 ±0,08 ^a	0,66 ±0,52 ^a
C20:0	1,41 ±1,30 ^a	1,41 ±1,37 ^a	1,00 ±0,62 ^a	0,61 ±0,30 ^a	0,74 ±0,36 ^a
C20:4	18,46 ±2,15 ^a	18,05 ±5,74 ^a	20,31 ±3,14 ^a	20,20 ±2,85 ^a	20,54 ±2,92 ^a
C24:0	0,92 ±0,17 ^a	0,89 ±0,31 ^a	0,91 ±0,24 ^a	0,96 ±0,25 ^a	1,02 ±0,70 ^a
C22:6	2,49 ±0,72 ^a	2,79 ±1,27 ^a	3,16 ±0,30 ^a	2,11 ±0,53 ^a	1,91 ±0,50 ^a
Saturados	50,21 ±4,68^a	44,21 ±3,64^a	52,88 ±5,05^a	46,44 ±4,88^a	48,16 ±4,47^a
Poliinsat.	35,05 ±3,56^a	37,48 ±6,79^a	38,27 ±4,62^a	39,17 ±4,47^a	37,87 ±4,89^a
Monoinsat.	14,76 ±2,93^a	18,30 ±5,90^a	13,90 ±5,41^a	14,32 ±1,41^a	13,88 ±2,24^a

* Valores expressos como média ± desvio padrão, n = 8

^{a,b} Médias, na mesma linha, seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si em nível de 5% (p<0,05), comparando as amostras ao grupo controle

A partir dos resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso e da fração AFL do pequi, nas doses testadas nos ratos, pode-se constatar que tanto o extrato aquoso quanto a fração ALF da polpa apresentaram um efeito positivo nos biomarcadores do estresse oxidativo utilizados, em maior ou

menor grau, de acordo com o biomarcador, com a dose do extrato e com a fração utilizada.

Por outro lado, esses resultados positivos merecem estudos adicionais, que utilizem concentrações diversas dos extratos estudados, além de um tempo maior de tratamento, aliados a estudos que visem à avaliação dos efeitos toxicológicos da administração de antioxidantes a animais de laboratório.

O efeito dos antioxidantes naturais sobre as enzimas antioxidantes intrínsecas do organismo animal abre ainda a possibilidade de uma avaliação da influência daqueles sobre a expressão gênica destas.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, nas condições de realização desta pesquisa, permitem inferir:

- Tanto na polpa quanto na amêndoa do pequi, os lipídeos são os constituintes majoritários, predominando em ambas os ácidos graxos oléico e palmítico. A polpa é rica em fibra alimentar, e a semente possui uma quantidade considerável de proteínas.

- A polpa possui quantidades expressivas de compostos fenólicos e carotenóides totais. O teor de fenólicos totais é significativamente superior ao que se pode encontrar na maioria das polpas de frutas consumidas no Brasil.

- A polpa e a amêndoa do pequi apresentaram similaridade na composição em compostos fenólicos. Em ambas identificaram-se os ácidos elágico, gálico, 4-OH benzóico e p-cumárico. O flavonóide procianidina B₂ foi identificado somente na amêndoa. O ácido elágico esteve presente em maior concentração em todos os extratos e frações analisados.

- Na avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, observou-se que todos os extratos e frações de ácidos fenólicos estudados apresentaram expressiva atividade antioxidante, independentemente do teste empregado (β -caroteno/ácido linoléico, DPPH, ABTS, ORAC e Rancimat), demonstrando a capacidade dos compostos fenólicos da polpa e da amêndoa do pequi em combater os diversos radicais livres gerados nas distintas metodologias empregadas.

- O extrato aquoso da polpa do pequi na concentração de 300 mg/kg e a fração AFL na concentração de 100 mg/kg foram capazes de reduzir significativamente a lipoperoxidação nos tecidos cerebral e hepático, e no plasma.

- A atividade das enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase, glutathione redutase e superóxido dismutase) apresentou-se aumentada nos tecidos

hepático e cerebral dos animais que receberam a fração de ácidos fenólicos livres na maior dose (100 mg/kg). Já os animais que receberam extrato aquoso a 300 mg/kg apresentaram elevação da atividade das quatro enzimas antioxidantes avaliadas no fígado; no cérebro houve incremento da atividade da glutathione peroxidase e de superóxido dismutase.

- Observou-se uma maior concentração de ácidos graxos poliinsaturados no tecido hepático dos animais tratados com o extrato aquoso do pequi na dose de 300 mg/kg, sugerindo que houve uma proteção desses ácidos graxos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L.B.; PENTEADO, M.V.C. Carotenoids and pro-vitamin A value of white fleshed Brazilian sweet potatoes (*Ipomoea batatas* Lam.). **Journal of Composition and Analysis**, v.1, p.249-258, 1988.

ALMEIDA, S.P.; SILVA, J.A. **Piqui e buriti**: Importância alimentar para a população dos cerrados. Planaltina: EMBRAPA, CPAC, 1994. 38p.

AMAROWICZ, R.; WANASUNDARA, U.N. Antioxidant activity of ethanolic extract of mustard seed. **Nahrung**, n.5, p.261-268, 1996.

ANDRADE-WARTHA, E.R. **Propriedades antioxidantes de clones do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.)**: efeito sobre a lipoperoxidação e enzimas participantes do sistema antioxidante de defesa do organismo animal. São Paulo, 2007. 134p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v.127, p.183-198, 2002.

APARICIO-FERNANDEZ, X.; YOUSELF, G.G.; LILA, M.A. Characterization of polyphenolics in the seed coat of black jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.4615-4622, 2005.

ARAI, Y.; WATANABE, S.; KIMURA, M.; SHIMOI, K.; MOCHIZUKI, R.; KINAE, N. Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. **Journal of Nutrition**, v.130, n.9, p.2243-2250, 2000.

ARAÚJO, F.A. **Café (*coffea arábica*, L.) submetido a diferentes condições de torrefação**: caracterização química e avaliação da atividade antioxidante e sensorial. São Paulo, 2007. 130p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

ARAÚJO, D.F. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae): an economically valuable species of the Central Brazilian cerrados. **Economic Botany**, v.49, n.1, p.40-48, 1995.

ARNAO, M.B.O.; CANO, A.O.; ACOSTA, M. Methods to measure the antioxidant activity in plant material: a comparative discussion. **Free Radical Research**, v.31, p.89-96, 1999.

ARTAJO, L.S.; ROMERO, M.P.; MORELLÓ, J.R.; MOTILVA, M.J. Enrichment of refined olive oil with phenolic compounds: evaluation of their antioxidant activity and their effect on the bitter index. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.6079-6088, 2006.

ARTS, M.J.T.J.; HAENEM, G.R.M.M.; VOSS, H.P.; BAST, A. Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. **Food and Chemical Toxicology**, v.39, p.787-791, 2001.

ARTS, M.J.T.J.; DALLINGA, J.S.; VOSS, H.P.; HAENEM, G.R.M.M.; BAST, A. A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. **Food Chemistry**, v.80, p.409-414, 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16.ed. Arlington: AOAC, 1998. v.1.

AUGER, C.; CAPORICCIO, B.; LANDRAULT, N.; TEISSEDE, P.L.; LAURENT, C.; CROS, G.; BESANCON, P.; ROANET, J.M. Red wine phenolic compounds reduce plasma lipids and apolipoprotein B and prevent early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic golden Syrian Hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Journal of Nutrition**, v.132, p.1207-1213, 2002.

AURA, A.M.; OLEARY, K.A.; WILLIAMSON, G.; NUUTILA, A.M. Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora *in vitro*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.1725-1730, 2002.

BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; STOHS, S.J.; DAS, D.K.; RAY, S.D.; KUSZYNSKI, C.A.; JOSHI, S.S.; PRUESS, H.G. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. **Toxicology**, v.148, p.187-197, 2000.

BAGCHI, K.; PURI, S. Free radicals and antioxidants in health and disease. **Eastern Mediterranean Health Journal**, v.4, p.350-360, 1998.

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

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BELLOSTA, S.; DELL'AGLI, M.; CANAVESI, M.; MITRO, N.; MONETTI, M.; CRESTANI, M.; VEROTTA, L.; FUZZATI, N.; BERNINI, F.; BOSISIO, E. Inhibition of metalloproteinase-9 activity and gene expression by polyphenolic compounds

isolated from the bark of *tristanopsis calobuxus* (Myrtaceae). **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.60, n.7, p.1440-1448, 2003.

BEUTLER, T.M.; RENARD, M.; OFFORD, E.A.; SCHNEIDER H.; RUEGG, U.T. Green tea extract decreases muscle necrosis in mdx mice and protects against ROS. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.75, p.749-753, 2002.

BENZIE, I.F.F. Evolution of dietary antioxidants. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.136, p.113-116, 2003.

BERLINEY, J.A.; HEINECKE, J.W. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. **Free Radical Biology & Medicine**, v.20, n.5, p.707-727, 1996.

BEZERRA, J.C.B.; SILVA, I.A.; FERREIRA, H.D.; FERRI, P.H.; SANTOS, S.C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabata* of the Brazilian cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, v.73, n.5, p.428-430, 2002.

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

BOKER, L.; VAN DER SCHOUW, Y.; PEETERS, P. Intake of dietary phytoestrogens by dutch women. **Journal of Nutrition**, v.132, p.1319-1328, 2002.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.30, n.6, p.609-615, 1997.

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

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.28, n.1, p.25-30, 1995.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC n.360, de 23 de dezembro de 2003**. Aprova regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=9059&word=>. Acesso em: 14 mar. 2006.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v.56, n.11, p.317-333, 1998.

CADENAS, E.; PODEROSO, J.J.; ANTUNES, F.; BOVERIS, A. Reaction of ubiquinol with nitric oxide. In: PACKER, L.; HIRAMATSU, M.; YOSHIKAWA, T., eds.

Antioxidant food supplements in human health. San Diego: Academic Press, 1999. cap.11, p.59-77.

CAO, G.; PRIOR, R.L. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. **Methods in Enzymology**, v.299, cap.5, p.50-62, 1999.

CÉSPEDES, C.L.; MOHAMMED, E.-H.; PAVON, N.; ALARCON, J. Antioxidant and cardioprotective activities of phenolics extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), maqui. **Food Chemistry**, v.107, p.820-829, 2008.

CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v.37, p.946-962, 1999.

CHIPAUT, P. The antioxidant properties of natural spices. **Food Research**, v.17, p.46-55, 1952.

CHOWDHURY, P.; SOULSBY, M. Lipid peroxidation in rat brain is increased by simulated weightlessness and decreased by a soy-protein diet. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v.32, p.188-192, 2002.

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

CHUN, O.K.; KIM, D.O.; SMITH, N.; LEE, C.Y. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.85, p.1715-1724, 2005.

CREPALDI, I.C.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PENTEADO, M.D.C.; SALATINO, A. Composição nutricional do fruto de licuri (*Syagrus coronata* Martius Beccari). **Revista Brasileira de Botânica**, v.24, n.2, p.155-159, 2001.

DANIEL, E.M.; KRUPNICK, A.S.; HEUR, Y.H.; BLINZLER, J.A.; MIMS, R.W.; STONER, G.D. Extraction, stability and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.2, p.385-398, 1989.

DE BEER, D.; JOUBERT, E.; GELDERBLOM, W.C.A.; MANLEY, M. Antioxidant activity of south African red and white cultivar wines: free radical scavenger. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.90, p.569-577, 2003.

DELMAS, D.; JANNIN, B.; CHERKAOUI MALKI, M.; LATRUFFE, N. Inhibitory effect of resveratrol on the proliferation of human and rat hepatic derived cell lines. **Oncology Reports**, v.7, p.847-852, 2000.

DELMAS, D.; REBE, C.; LACOUR, S.; FILOMENKO, R.; ATHIAS, A.; GAMBERT, P.; CHERKAOUI-MALKI, M.; JANNIN, B.; DUBREZ-DALLOZ, L.; LATRUFFE, N.; SOLARY, E. Resveratrol-induced apoptosis is associated with fas redistribution in

the rafts and the formation of a death inducing signaling complex in colon cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.42, p.41482-41490, 2003.

DIPLOCK, A.T. Antioxidants and disease prevention. **Molecular Aspects of Medicine**, v.15, n.4, p.295-376, 1994.

DIPLOCK, A.T.; CHARLEUX, J.L.; CROZIER, G.; KOK, F.J.; RICE-EVANS, C.A.; ROBERFROID, M.; STAHL, W.; VINA-RIBES, J. Funcional food science and defence against reactive oxidative species. **British Journal of Nutrition**, v.80, suppl.1, p.77-112, 1998.

DONNELLI, J.K.; ROBINSON, D.S. Free radical in foods. **Free Radical Research**, v.22, n.2, p.147-176, 1995.

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

DRAGSTED, L.; STRUBE, M.; LETH, T. Dietary levels of plant phenols and other non-nutritive components: could they prevent cancer. **European Journal of Cancer Prevention**, v.6, p.522-528, 1997.

ELSAYED, N.M. Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental: nutritional interaction. **Nutrition**, v.17, p.828-834, 2001.

FALLARERO, A.; LOIKKANEN, J.J.; MANNISTO, P.T.; CASTAÑEDA, O.; VIDAL, A. Effects of aqueous extracts of *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux and *Bryothamnion trquetrum* (S.G. Gmelim) howe on hydrogen peroxide and methyl mercury-induced oxidative stress in GT1-7 mouse hypothalamic immortalized cells. **Phytomedicine**, v.10, n.1, p.39-47, 2003.

FANG, Y.Z.; YANG, S.W.; WU, G. Free radical antioxidants and nutrition. **Nutrition**, v.8, p.872-879, 2002.

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

FERNANDEZ-PACHÓN, M.S.; VILLANO, D.; TRONCOSO, A.M.; GRACÍA-PARRILLA, M.C. Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. **Analytica Chimica Acta**, v.563, p.101-108, 2006.

FERREIRA, F.A.G.; GRAÇA, M.E.S. **Tabela de composição de alimentos portugueses**. 2.ed. Lisboa, Instituto Superior de Higiene Dr. Ricardo Jorge, 1983. p.7.

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

FREI, B. on the role of vitamin C and other antioxidants in atherogenesis and vascular dysfunction. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.222, p.196-204, 1999.

FREI, B. Efficacy antioxidants to prevent oxidative damage and inhibit disease. **Journal of Nutrition**, v.134, p.3196-3198, 2004.

GERMANO, M.P.; D'ANGELO, V.D.; BIASINI, T.; SANOGO, R.; Evaluation of the antioxidant properties and bioavailability of free and bound phenolic acids from *Trichilia emetica* Vahl. **Journal of Ethnopharmacology**, v.23, p.121-127, 2006.

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 de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Universidade de São Paulo.

GIADA, M.L.R.; MANCINI FILHO, J. Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. **Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, v.12, n.4, p.7-15, 2006.

GODOY, H.T.; RODRIGUES-AMAYA, D.B. Occurrence of cis-isomers of provitamin A in Brazilian fruits. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 42, p. 1306-1313, 1994.

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

GUERRA, N.B. **Ação antioxidante de algumas especiarias em diferentes atividades de água**. São Paulo, 1976. 62p. Tese de Mestrado - Faculdade de Farmácia - Universidade de São Paulo.

GUNDUC, N.; EL, S.N. Assessing antioxidant activities of phenolic compounds of common Turkish food and drinks on *in vitro* low-density lipoprotein oxidation. **Journal of Food Science**, v.68, n.8, p.2591-2595, 2003.

GUTTERIDGE, J.M.; HALLIWEL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.899, p.136-147, 2000.

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

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v.49, p.1341-1348, 1995.

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

HALLIWELL, B. Oxidative stress, nutrition and health. **Free Radical Research**, v.25, p.57-74, 1996b.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M.V.; LONG, L.H. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Letters**, v.486, p.10-13, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. The antioxidants of human extracellular fluids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.280, p.1-8, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. New York: Clarendon Press; Oxford: Oxford University Press, 1999. p.285, 293, 625. (Oxford Science Publications).

HALLIWELL, B. Effect of diet on cancer development is oxidative DNA damage a biomarker. **Free Radical Biology & Medicine**, v.32, p.968-974, 2002.

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

HASENHUETTI, G.L.; WAN, P.J. Temperature effects on the determination of oxidative stability with the Metrohm Rancimat. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.69, n.6, p.525-527, 1992.

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

HENRIQUEZ, C.; ALIAGA, C.; LISI, E. Formation and decay of the ABTS derived radical cation: a comparison of different preparations procedures. **International Journal of Chemical Kinetics**, v.34, n.12, p.659-665, 2002.

HERTOG, M.G.; KROMHOUT, D.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; BUZINA, R.; FIDANZA, F.; GIAMPAOLI, S.; JANSEN, A.; MENOTTI, A.; NEDELJKOVIC, S.; PEKKARINEN, M.; SIMIC, B.S.; TOSHIMA, H.; FESKENS, E.J.; HOLLMAN, P.C.; KATAN, M.B. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. **Archives of Internal Medicine**, v.155, n.4, p.381-386, 1995.

HOULIHAN, C.M.; HO, C.; CHANG, S.S. The structure of rosmariquinone: a new antioxidant isolated from *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.62, n.1, p.96-98, 1985.

HOULLMAN, P.C. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.81, p.842-845, 2001.

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

IBERN-GÓMEZ, M.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.; WATERHOUSE, A.L. Rapid HPLC analysis of phenolic compounds in red wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.53, n.3, p.218-221, 2002.

JAMPOL, L.M.; FERRIS, F.L. Antioxidants and zinc to prevent progression of age-related macular degeneration. **Journal of the American Medical Association**, v.21, n.1, p.2466-2468, 2001.

JARDINI, F.A.; MANCINI FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**, v.43, n.1, p.137-147, 2007.

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

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

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

KAWANISHI, K.; RAFFAUF, R.F. Caryocat microcarpum: an ant repellent and fish poison of the northwes amazon. **Journal of Natural Products**, v.49, n.6, p.1167-1168, 1986.

KERR, W.E.; SILVA, F.R.; TCHCARRAMAE, B. Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) informações preliminares sobre um pequi sem espinhos no caroço. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.29, n.1, p.169-171, 2007.

KESAVULU, M.M.; RAO, B.K.; GIRI, R.; VIJAVA, J.; SUBRAMANYAM, G.; APPARAO, C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in Type 2 diabetics with coronary heart disease. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.53, n.1, p.33-39, 2001.

KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N. Strcture of a new antioxiative phenolic-acid from oregano (*Origanum vulgare* L.) **Agricultural and Biological Chemistry**, v.53, n.2, p.519-524, 1989.

KIM, K.-W.; KIM, K.-S.; PARK, S.-D.; KIM, J.-K.; CHUNG, K.-H.; KIM, D.-S.; LEE, Y.-C.; KIM, C.-H. Effect of *Cervus Korean TEMMINCK* var. *mantchuricus Swinoe* on protease activities, antioxidant and free radical damages in rheumatis arthritis rats. **Toxicology in vitro**, v.22, p.80-86, 2008.

KNEKT, P.; KUMPULAINEN, J.; REUNANEN, A.; HAKULINEN, T.; AROMA, A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.76, p.560-568, 2002.

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

KOTA, N.; KRISHNA, P.; POLASA, K. Alterations in antioxidant status of rats following intake of ginger through diet. **Food Chemistry**, v.106, p.991-996, 2008.

KRIS-ETHERTON, P.M.; KEEN, C.L. Evidence that the antioxidant flavonoids in the tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. **Current Opinion in Lipidology**, v.13, p.41-49, 2002.

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

KUSKOSKI, E.M. **caracterización de pigmentos em frutos de baguaçu (E. umbellifera Berg)**. Sevilla, 2003. 230p. Tesis de Doctorado – Departamento de Alimentos, Nutrición y Bromatología - Universidad de Sevilla.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, G.A.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.726-732, 2005.

KUTI, J.O. Antioxidants compounds from four opuntia cactus pear fruit varieties. **Food Chemistry**, v.85, n.4, p.527-533, 2004.

KUTI, J.O.; KONURU, H.B. Antioxidant capacity and phenolic content in leaf extracts of tree spinach (*Cnidoscolus spp.*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.1, p.117-121, 2004.

KYNGMI, M, S.; EBELER, E. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 96-104, 2008.

LANDRUM, J.T.; BONE, R.A.; KILBURN, M.D. The macular pigment: a possible role in protection from age-related macular degeneration. **Advances in Pharmacology**, v.38, p.537-556, 1997.

LAUBLI, M.W.; BRUTTEL, P.A. Determination of the oxidative stability of fats and oils: comparison between the active oxygen method (AOCS Cd 12-57) and the Rancimat Method. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.63, n.6, p.792-795, 1986.

LEWERENZ, J.; LETZ, J.; METHNER, A. Activation of stimulatory heterotrimeric G proteins increases glutathione and protects neuronal cells against oxidative stress. **Journal of Neurochemistry**, v.87, n.2, p.522-531, 2003.

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

LIMA, C.F.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M.; FERNANDES-FERREIRA, M.; PEREIRA-WYLLSON, C. The drinking o a salvia officinalis infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, n.2, p.383-389, 2005.

LIU, F. Antioxidant activity of garlic acid from rose flowers in senescence accelerated mice. **Life Sciences**, v.77, p.230-240, 2005.

LIU, R.H. Whole grain phytochemicals and health. **Journal of Cereal Science**, v.46, p.207-219, 2007.

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

MANACH, C.; DONOVAN, J. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. **Free Radical Research**, v.38, n.8, p.771-785, 2004.

MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Current Opinion in Lipidology**, v.16, p.77-84, 2005.

MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.45, p.594-598, 1968.

MATTHAUS, B. Antioxidant activity of extracts of isolated from residues of oilseeds, such as rapessed or sunflower. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v.13, n.4, p.22-25, 2002.

MAZZA, G.; KAY, C.D.; COTTRELL, T.; HOLUB, B.J. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidants status in human subjects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.7731-7737, 2002.

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

MELO, M.S.O.M.; MANCINI FILHO, J. Antioxidantes naturais do fruto do dendezeiro (*Elaeis guineensis*, Jacq). **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.25, n.2, p.147-157, 1989.

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

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.36, n.1, p.1-11, 2002.

MELO, E.A.; BION, F.M.; MANCINI FILHO, J.; GUERRA, N.B. *In vivo* antioxidant of aqueous and etheric coriander (*Coriander sativum*, L) extracts. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.105, p.483-487, 2005.

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

MICHELS, K.B. Fiber intake and incidence of colorectal cancer among 76,947 women and 47,279 men. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.14, p.842-849, 2005.

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

MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.A.; DAVIES, M.J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v.84, p.407-412, 1993.

MILES, E.A.; ZOUBOULI, P.; CALDER, P.C.; PHIL, D. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. **Nutrition**, v.21, p.389-394, 2005.

MIN, K.; ELEBER, S.E. Flavonoid affects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.96-104, 2008.

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

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

MURAOKA, S.; MIURA, T. inhibition by uric acid of free radicals that damage biological molecules. **Pharmacology & Toxicology**, v.93, p.284-289, 2003.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography, A**, v.1054, n.1/2, p.95-111, 2004.

NAGEM, T.J.; ALBUQUERQUE, T.T.D.; MIRANDA, L.C.G. Ácidos fenólicos em cultivares de soja: ação antioxidante. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.35, n.1, p.129-138, 1992.

NAKAMURA, Y.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Determination of the levels of isoflavonoids in soybeans and soy-derived foods and estimation of isoflavonoids in the Japanese daily intake. **Journal of AOAC International**, v.83, p.635-650, 2000.

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

NASCIMENTO, C.R.; TORRES, R.P.; VAN-KOIJ, A.; MANINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em extratos de canela, erva-doce e mostarda. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 1996, Poços de Caldas. **Resumos**: 1996, p.254

NASCIMENTO, M.A.; SILVA, A.K.; FRANÇA, L.C.B.; QUIGNARD, E.L.J.; LÓPEZ, J.A.; ALMEIDA, M.G. *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae): preliminary study of its antioxidant activity. **Bioresource Technology**, v.97, n.12, p.1387-1391, 2006.

NEGISHI, H.; XU, J.W.; NJELEKELA, M.; NARA, Y.; YAMAMORI, Y. Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Journal of Nutrition**, v.134, p.38-42, 2004.

OKEZIE, I.A. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.75, n.2, p.199-212, 1998.

OLIVEIRA, M.M.; GILBERT, B.; MORS, W.B. Triterpenes in *Caryocar brasiliense*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.40, p.51, 1968.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.4619-4626, 2001.

PANNALA, A.S.; CHAN, T.S.; O'BRIEN, P.; RICE-EVANS, C. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.282, p.1161-1168, 2001.

PARK, Y.K.; PARK, E.; KIM, J.S.; KANG, M.H. Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. **Mutation Research**, v.529, p.77-86, 2003.

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

PASSOS, X.S. atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.6, p.623-627, 2002.

PEDRIELLI, P.; SKIBSTED, L.H. Antioxidant synergy and regeneration affect of quercetin, (-) epicatechin of α -tocopherol in homogeneous solutions of peroxidizing methyl linoleate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.7138-7144, 2002.

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

PEREZ, E. **Diagnose fitoquímica dos frutos de Caryocar brasiliense Camb. Caryocaraceae**. Curitiba, 2004. 115p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Paraná.

PINTO, M.S.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Food Chemistry**, v.107, p.1629-1635, 2008.

PLUMB, G.W.; GARCIA-CONESA, M.T.; KROON, P.A.; RHODES, M.; RIDLEY, S.; WILLIAMSON, G. Metabolism of chlorogenic acid by human plasma, liver, intestine and gut microflora. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.79, p.390-392, 1999.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants capacity of brassica vegetables: a review. **LWT: Journal of Food Composition and Analysis**, v. 40, p.1-11, 2007

PRATT, D.E.; WATTS, B.M. the antioxidant activity of vegetable extracts I- flavones aglycones. **Journal of Food Science**, v.29, p.27-31, 1964.

PRIOR, R.L.; CAO, G. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology & Medicine**, v.27, n.11/12, p.1173-1181, 1999.

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

PUKASKAS, A.; VAN BEEK, T.A.; DE WAARD, P. Development of a triple hyphenated HPLC-radical scavenging detection-DAD-SPE_NMR system for the rapid identification of antioxidant in complex plant extracts. **Journal of Chromatography, A**, v.1074, p.81-88, 2005.

QIN, Z.; RESZKA, K.J.; FUKAI, T.; WEINTRAUB, N.L. Extracelular superoxido dismutase (ecSOD) in vascular biology: update on exogenous gene transfer and endogenous regulators of ecSOD. **Translational Research**, v.51, n.2, p.68-78, 2008.

RAMOS, M.I.L.; UMAKI, MC.S.; HIANE, P.A.; RAMOS FILHO, M.M. Efeito do cozimento convencional sobre os carotenóides pró-vitaminicos “A” da polpa do piqui (*Caryocar brasiliense Camb*). **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v.19, n.1, p.23-32, 2001.

RE, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, n.9/10, p.1231-1237, 1999.

RENAUL, S.; BESWICK, A.D.; FEHILY, A.M.; SHARP, D.S.; ELWOOD, P.E. Alcohol and platelet aggregation: the caerphilly prospective heart disease study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.55, p.1012-1017, 1992.

RIBEIRO, R.F. **Pequi**: o rei do cerrado. Belo Horizonte: Rede Cerrado, 2000. 62p.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAPANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolics acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v.20, p.933-956, 1996.

RICE-EVANS, C.A. Measurement of total antioxidant activity as a marker of antioxidant status *in vivo*: procedures and limitations. **Free Radical Research**, v.33, p.59-66, 1999.

RODRIGUEZ, H.; LANDETE, J.M.; RIVAS, B.; MUÑOZ, R. Metabolism of food phenolic acids by lactobacillus plantarum CECT 748. **Food Chemistry**, v.107, p.1393-1398, 2008.

RODRIGUES, R.; CASTILHO, R.; CARRASCO, R.; HUERTA, P.; MORENO, M. Diminution of tissue lipid peroxidation in rats is related to the *in vitro* antioxidant capacity of wine. **Life Sciences**, v.76, n.8, p.889-900, 2005.

RODRIGUES-AMAYA, D.B. **Carotenoids and food preparation**: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed, and stored foods. Arlington: OMNI Project, 1997. 88p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M. **HarvestPlus handbook for carotenoid analysis**. Washington: International Food Policy Research Institute, 2004. 58p.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p.53-60, 2007.

ROVER JUNIOR, L.; HOER, F.; VELASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v.24, n.1, p.112-119, 2001.

SAMPSON, L.; RIMM, E.; HOLLMAN, P.C.; KATAN, M.B. Flavonol and flavone intakes in US health professionals. **Journal of the American Dietetic Association**, v.102, p.1414-1420, 2002.

SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of poly phenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.76, p.270-276, 1998.

SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. **Cerrado**: ambiente e flora. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 556p.

SANMUGAPRIYA, E.; VENKATARAMAN, S. Studies on hepatoprotective and antioxidant actions of *Strychnos potatorum* Linn. seeds on CCL₄-induced acute hepatic injury in experimental rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, p.154-160, 2006.

SAWAY, Y.; MOON, J.-H.; SAKATA, K.; WATANABE, N. Effects of structure on radical-scavenging abilities and antioxidative activities of tea polyphenols: NMR analytical approach using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.9, p.3598-3604, 2005.

SCALBERT, A.; MORAND, C.; MANACH, C.; REMESY, C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut impact on health. **Bomedicine & Pharmacotherapy**, v.56, p.276-282, 2002.

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, n.4, p.287-306, 2005.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary Intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v.130, p.2073S-2085S, 2000.

SCLAFI, C.; FOGLIANO, V.; PENTAGELO, A.; GRAZIANI, C.; GIORDANO, I.; RITIENI, A. Antioxidant activity and general fruit characteristics in different ecotypes of corbarini small tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.1363-1366, 2000.

SEGALL, S.D.; ARTZ, W.E.; TAKAHASHI, J.A.; RASLAN, D.S.; FERRAZ, V. The fatty acid and triacylglycerol composition of pequi (*Caryocar brasiliensis*) oil. In: AOCs ANNUAL MEETING & EXPO, 93., Montreal, 2002. **Abstract**. Montreal, 2002. p.S18-S19. Disponível em: <http://www.aocs.org/archives/am02abstracts.pdf>. Acesso em: 22 de setembro de 2007.

SELLAPAN, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.2432-2438, 2002.

SERRACARBASSA, P.D. Vitaminas antioxidantes na degeneração macular relacionada à idade. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.69, n.2, p.443-445, 2006.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.36, p.67-103, 1992.

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.

SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **FEBS Letters**, v.103, p.287-290, 1979.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.62, p.1315-1321, 1995.

SIES, H.; STAHL, W.; SEVANIAN, A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. **Journal of Nutrition**, v.135, n.5, p.969-972, 2005.

SILVA, B.M.; ANDRADE, P.B.; VALENTAO, P.; FERRERES, F.; SEABRA, R.M.; FERREIRA, M.A. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.15, p.4705-4712, 2004.

SIMONIAN, N.A.; COYLE, J.T. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.36, p.83-106, 1996.

SOARES, S.E.; MANCINI FILHO, J. Avaliação antioxidante de ácidos fenólicos presentes no caroço de abacate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E

TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, Poços de Caldas, 1996. **Livro de resumos**. Poços de Caldas, 1996. p.272.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição da PUCCAMP**, v.15, n.1, p.71-81, 2002.

STEWART, J.R.; ARTIME, M.C.; OBRIAN, C.A. Resveratrol: a candidate nutritional for prostate cancer prevention. **Journal of Nutrition**, v.133, p.2440-2443, 2003.

SUJA, K.P.; JAYALEKSHMY, A.; ARUMUGHAN, C. Antioxidant activity of sesame cake extract. **Food Chemistry**, v.91, n.2, p.213-219, 2005.

SVILAAS, A.; SAKHI, A.K.; ANDERSEN, L.F.; SVILAAS, T.; STROM, E.C.; JACOBS Jr., D.R.; OSE, L.; BLOMHOFF, R. Intakes of antioxidants in coffee, and vegetables are correlated with plasma carotenoid in humans. **Journal of Nutrition**, v.3, n.134, p.562-567, 2004.

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. **Tabela brasileira de composição de alimentos**: TACO - Versão II. 2.ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2006. 113p. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/>. Acesso em: 16 nov. 2007.

TAYLOR, A. Cataract: relationship between nutritional and oxidation. **Journal of the American College of Nutrition**, v.12, p.138-146, 1993.

TIWARI, A.K. Antioxidants: new-generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders. **Current Science**, v.86, n.8, p.1092-1102, 2004.

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

TRINDADE, R.A. **Influência de antioxidantes naturais sobre o perfil lipídico de hambúrgueres bovinos submetidos à irradiação por CO⁶⁰ e aceleradores de elétrons**. São Paulo, 2007. 112p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Universidade de São Paulo.

TUDEK, B. Oxidative DNA damage and its repair: base excision repair. **Mutation Research**, v.531, p.1-3, 2003.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIC, M.T.D.; MILAN, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.32, n.3, p.3-41, 2006.

VAN DEN BERG, R.; HAENEN, G.R.M.M.; VAN DEN BERG, H.; BAST, A. Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chemistry**, v.66, p.511-517, 1999.

VASCONCELOS, A.P.; MANOLLI, L.P.; SILVEIRA, P.P.; GAMARO, G.D.; TORRES, I.L.S.; DALMAZ, C. Effect of two different models of chronic stress on oxidative stress in cerebral cortex and hippocampus of rats. In: MEETING OF SOUTH AMERICAN GROUP FOR FREE RADICAL RESEARCH, 1., Florianópolis, 1999. **Abstracts**. Florianópolis: CCB/UFSC, 1999. p.69.

VATTEN, D.A.; SHETTY, K. Biological functionality of ellagic acid: a review. **Journal of Food Biochemistry**, v.20, p.234-266, 2005.

VERIAKI, S.A.; OREOPOULOU, V.; TZIA, C.; THOMOPOULOS, C.D. orégano, flavonoids as lipid antioxidants. **Journal the American Oil Chemists Society**, v. 70, n. 5, p. 483-487, 1993.

VIDAL, A.; FALLARERO, A.; ANDRADE-WHARTHA, E.R.; SILVA, A.M.O.; LIMA, A.; TORRES, R.P.; VUORELA, P.; MANCINI FILHO, J. Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja *bryothamnion triquetum* (S.G.Gmelín) howe. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**, v.42, n.4, p.589-600, 2006.

VILLAÑO, D.; FERNANDEZ-PCHÓN, M.S.; TRONCOSO, A.M.; GARCIA-PARRILLA, M.C. Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines. **Food Chemistry**, v.95, p.394-404, 2006.

WALLE, T. Flavonoids and isoflavones (Phytoestrogens) absorption, metabolism and bioactivity. **Free Radical Biology & Medicine**, v.36, n.7, p.829-837, 2004.

WANG, D.; WANG, L.-J.; ZHU, F.-X.; ZHU, J.-Y.; CHEN, X.D.; ZOU, L.; SAITO, M.; LI, L.-T. *In vitro* and *in vivo* studies on the antioxidant activities of the aqueous extracts of Douchi (a traditional Chinese salt-fermented soybean food). **Food Chemistry**, v.107, p.1421-1428, 2008.

WANG, S.Y.; FENG, R.T.; LU, Y.J.; BOWMAN, L.; DING, M. Inhibitory effect on activator protein-1, nuclear factor-kappaB, and cell transformation by extracts of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.10, p.4187-4193, 2005.

WEBER, P.; BENDICH, A.; SCHALCH, W. Vitamin C and human health: a review of recent data relevant to human requirements. **Internationale Zeitschrift für Vitaminforschung**, v.66, p.19-30, 1996.

WETTASHINGHE, M.; SHAHIDI, F. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts o defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds. **Food Chemistry**, v.67, n.4, p.399-414, 1999.

WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.81, p.243-255, 2005.

WINTERBOURN, C.; GUTTERIDGE, J.M.; HALIWELL, B. Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O₂. **Journal of Free Radicals in Biology & Medicine**, v.1 n.1, p.43-49, 1985.

WU, A.; WAN, P.; TSENG, C.; PIKE, M.; Adolescents and adult soy intake and risk of breast cancer in Asian Americans. **Carcinogenesis**, v.23, p.1491-1496, 2002.

WU, X.; BEECHER, G.R.; HOLDEN, J.M.; HAYTOWITZ, D.B.; GEBHARDT, S.E.; PRIOR, R.L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.12, p.4026-4037, 2004.

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

YEH, C.T.; YEN, G.C. Effects of phenolic acids on human phenolsulfotransferases in relation to their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.1474-1479, 2006.

YOUNG, J.F.; NIELSEN, S.E.; HARALDSDOTTIR, J.; DRAGSTED, L.O. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, p.87-94, 1999.

Anexo 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

Comissão de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA nº 005/2006

São Paulo, 13 de fevereiro de 2006.

Ilmo(a) Sr(a).
Alessandro de Lima
Orientador: Prof. Jorge Mancini Filho
FBA

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP, em reunião realizada em 13 de fevereiro, **APROVOU** o projeto "Caracterização dos principais compostos antioxidantes presentes no Pequi (Caryocar brasiliense, L.)" (Protocolo CEEA nº 95), apresentado por Vossa Senhoria.

Obs.: Recomenda-se que seja feita a determinação da composição química das rações para a padronização das condições experimentais.

Sendo o que nos cumpre, reiteramos protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita de Ligia Ferreira Gomes.

Prof^ª. Dr^ª. Ligia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA

Anexo 2

vital Nutrientes S/A

Página 1 de 1

• MENU

EMPRESA

PRODUTOS

SUÍNOS

RUMINANTES

AVES

EQUÍNOS

ANIM. DE LABORATÓRIO

MAT. PRIMAS E ADITIV

RAÇÕES

NOTÍCIAS NUVITAL

SERVIÇOS

ARTIGOS TÉCNICOS

BOLETIM

DISTRIBUIDORES

PARCEIROS

ATENDIMENTO ON-LINE

TRABALHE CONOSCO

NEWSLETTER

FALE CONOSCO

INICIAL » SUÍNOS » NUVILAB CR1 IRRADIADA

Nuvilab CR-1 Irradiada

Composição básica do produto: Milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, gordura vegetal, premix vitamínico mineral e aminoácidos.

Níveis de garantia por quilograma do produto:

Umidade (máx)	12,50	%
Proteína Bruta (min)	22,00	%
Extrato Etéreo (min)	5,00	%
Matéria Mineral máx)	10,00	%
Matéria Fibrosa (máx)	8,00	%
Cálcio (máx)	1,40	%
Fósforo (min)	0,80	%

Enriquecimento por quilograma do produto:

Vitaminas: Vitamina A 13.000,00 UI; vitamina D3 2.000,00 UI; vitamina B1 5,00 mg; vitamina B12 22,00 mcg; vitamina B2 6,00 mg; vitamina B6 7,00 mg; vitamina E 34,00 mg; vitamina K3 3,00 mg; niacina 60,00 mg; biotina 0,05 mg; ácido fólico 1,00 mg; ácido pantotênico 21,00 mg; colina 650,00 mg.

Microelementos Minerais: Cobre 10,00 mg; cobalto 1,50 mg; ferro 50,00 mg; iodo 2,00 mg; manganês 60,00 mg; selênio 0,05 mg; zinco 60,00 mg.

Aminoácidos: Lisina 100,00 mg, metionina 300,00 mg.

Aditivos: Antioxidante 100,00 mg.

Indicação: Alimento irradiado para camundongos e ratos de laboratórios.

Uso: Administração à vontade através de comedouros suspensos.

Apresentação: Peletizada, (extrusada ou farelada sob consulta).

[← voltar](#)

• CALEND.DE EVENTOS

HOJE : 18/09/2007

Setembro

07

D

S

T

Q

Q

S

S

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

Telefone para contato: +55 (41) 2169 3100

Endereço: Estrada da Ribeira, 3001 KM3 - Alto Maracanã - Colombo PR - Brasil

Anexo 3

Artigos publicados

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NA POLPA E NA AMÊNDOA DO PEQUI (*Caryocar brasiliense*, Camb.)¹

ALESSANDRO DE LIMA², ANA MARA DE OLIVEIRA E SILVA³, REGINALDO ALMEIDA TRINDADE³,
ROSÂNGELA PAVAN TORRES³, JORGE MANCINI-FILHO⁴

RESUMO - O conhecimento da composição química dos alimentos é fundamental para se avaliarem a disponibilidade de nutrientes e o seu consumo por populações. Neste trabalho, o pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) foi caracterizado pela composição centesimal e pela presença de compostos bioativos na polpa e na amêndoa. Os dados do perfil lipídico mostram alto teor de lipídeos tanto na polpa quanto na amêndoa, destacando-se nos mesmos a presença dos ácidos graxos insaturados, predominando o ácido oléico como principal componente entre os ácidos graxos. Foi observada também a relação entre os elevados teores de ácidos graxos insaturados com os compostos fenólicos e carotenóides presentes, tendo a polpa quantidades mais expressivas dessas substâncias quando comparada à amêndoa, além de conter uma quantidade superior de fibra alimentar. Os resultados obtidos abrem a perspectiva de se utilizar o pequi como fruto que apresenta, na sua composição, compostos importantes para a formulação de uma dieta saudável.

Termos para indexação: pequi, perfil de ácidos graxos, fibras, compostos bioativos.

CHEMICAL COMPOSITION AND BIOACTIVE COMPOUNDS IN THE PULP AND ALMOND OF PEQUI FRUIT

ABSTRACT - The knowledge of the chemical composition of foods is basic for evaluate the nutrients availability and its consumption for the population. In this work, the pulp and the almond of pequi fruit (*Caryocar brasiliense*, Camb.) were characterized by the centesimal composition and the presence of nutrients. The results showed high amount of lipids and in the fatty acids profile, the oleic fatty acid was the main component. The presence between high unsaturated fatty acids and antioxidant compounds (phenolic acids and carotenoids) was correlated with the fruit protection. In the pulp was observed too high amount of alimentary fiber. These results are suggesting the pequi utilization in a healthful diet preparation.

Index Terms: pequi, fatty acid profile, fiber, bioactive compounds.

O conhecimento da composição nutricional dos alimentos consumidos no Brasil é fundamental para se avaliarem a disponibilidade de nutrientes e o seu consumo por populações, além de verificar a adequação nutricional da dieta, identificar o estado nutricional, desenvolver pesquisas sobre as relações entre dieta e doença, no planejamento agropecuário e na indústria de alimentos, entre outros. Entretanto, pelas suas dimensões continentais, nosso País possui ainda uma infinidade de alimentos, principalmente de origem vegetal, que devem ser melhor caracterizados (Núcleo de Estudos e Pesquisa em Alimentação, 2004).

O pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.), conhecido popularmente como piqui, pequiá, amêndoa de espinho, grão de cavalo ou amêndoa do Brasil, é cultivado em todo o cerrado brasileiro, que inclui os Estados do Pará, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, São Paulo, Minas Gerais e Paraná, como também nos Estados nordestinos, Piauí, Ceará e Maranhão. Sua

frutificação ocorre principalmente entre os meses de janeiro a março, podendo ser encontrados frutos fora dessas épocas (Ribeiro, 2000). Esses são constituídos pelo exocarpo ou pericarpo, de coloração esverdeada ou marrom-esverdeada, mesocarpo externo, polpa branca com coloração pardo-acinzentada e mesocarpo interno, que constitui a porção comestível do fruto, possuindo coloração amarelada, e separa-se facilmente do mesocarpo externo quando maduro. O endocarpo, que é espinhoso, protege a semente ou amêndoa, que é revestida por um tegumento fino e marrom, sendo também uma porção comestível (Melo Junior et al., 2004).

O fruto de pequi é consumido pelas populações que habitam as regiões onde são produzidos. O Estado de Minas Gerais (MG) é o principal produtor e consumidor do pequi, sendo que, no ano de 2003, foram comercializados aproximadamente 20.000kg de pequi. A polpa do pequi é utilizada na elaboração de diferentes pratos, como: arroz com pequi, feijão com pequi, frango

¹ (Trabalho 154-06). Recebido em : 04-10-2006. Aceito para publicação em: 19-07-2007.

² Professor do Curso de Tecnologia em Alimentos, CEFET-PI, Doutorando em Ciências de Alimentos FCF-USP. Fone (0XX 11 30913688). e-mail: alima@usp.br

³ Mestrando em Ciência dos Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP- São Paulo-SP. Fone (0XX 11 30913688). anamara@usp.br, realtrin@usp.br, rptorres@usp.br

⁴ Professor Titular Do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP- São Paulo-SP. Fone (0XX 11 30913688). jmancini@usp.br
Apoio Financeiro: CNPq

com pequi, cuscuz com pequi e o tradicional baião de três: arroz, feijão e pequi. Já a amêndoa é utilizada como ingrediente de farofas, doces e paçocas, além de ser consumida salgada como petisco. Por se tratar de um fruto de fácil produção e com características desejáveis em relação ao sabor e valor nutritivo, o pequi pode representar uma fonte potencial na alimentação e sobrevivência de uma parcela da população brasileira (Ribeiro, 2000).

Por outro lado, o consumo de frutas e vegetais tem sido associado a uma menor incidência e mortalidade por diversas doenças crônicas não-transmissíveis. A proteção que esses alimentos oferecem contra as enfermidades degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, está associada ao seu alto conteúdo de constituintes químicos com propriedades importantes, como as de antioxidantes (vitamina C, E, carotenóides e polifenóis) (Hinneburg et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar nutricionalmente o pequi, através da determinação da sua composição centesimal, do perfil de ácidos graxos e dos teores de compostos fenólicos e carotenóides totais na sua polpa e amêndoa.

Os frutos de pequi foram coletados em árvores adultas no solo (dezembro/2004), na zona rural do município de Santa Rosa, pertencente à microrregião de Picos, coordenadas geográficas de 06°45'57" de latitude sul e 42°17'17" de longitude oeste de Greenwich, Estado do Piauí – Brasil.

Logo após a colheita, a casca e a polpa dos frutos de pequi foram retiradas com faca, à temperatura ambiente ($\pm 23^{\circ}\text{C}$), e a polpa seca, em estufa com ar forçado a 60°C , por 24 horas. Após a secagem, as amostras foram trituradas em moinho analítico, passadas em peneira de 32 Mesh e armazenadas a -20°C .

Os caroços foram secos em estufa com ar forçado a 60°C , por 36 horas, para facilitar a retirada da amêndoa ou semente. Em seguida, as sementes foram retiradas com uma pinça e trituradas conforme procedimento anteriormente descrito.

Com relação à composição centesimal da polpa e da amêndoa, foram determinados: umidade, resíduo mineral fixo (cinzas), proteínas, lipídios totais e fração fibroalimentar total (AOAC, 1998); os carboidratos foram obtidos por diferença; o valor energético total (VET) foi estimado, considerando-se os fatores de conversão de Atwater de 4Kcal/g de proteína, 4Kcal/g de carboidrato e 9Kcal/g de lipídio.

Para a determinação da composição em ácidos graxos, foram realizadas extração e esterificação conforme descrito por Folch et al. (1957) e Hartman & Lago (1973), respectivamente. Os ácidos graxos foram separados, utilizando-se de um cromatógrafo a gás marca Shimadzu, modelo GC17A, com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida, Carbowax 20M (30 m x 0,25 mm diâmetro interno), utilizando como referência padrões de ácidos graxos da Sigma.

Os fenólicos totais foram determinados de acordo com Swain & Hills (1995), e os carotenóides totais foram extraídos e quantificados conforme Almeida & Penteado, (1988).

Todas as análises foram realizadas em triplicata, e os resultados obtidos foram expressos em média e desvio-padrão entre as amostras.

A polpa do fruto de pequi é rica em lipídios (33,4%). Também se constitui em uma fonte importante de fibra alimentar (10,02%) e um teor de 3% de proteínas, fornecendo cerca de 358Kcal/100g de material, as quais correspondem a 18% das necessidades calóricas de um adulto com uma dieta de 2.000Kcal e 40% das necessidades de fibra alimentar (Brasil, 2003). Isso mostra que o consumo da polpa de pequi poderá trazer benefícios à saúde da população, tendo em vista o conhecimento de que o consumo regular de fibra alimentar na dieta está relacionado com a redução do risco de diversos quadros patológicos (Michels et al., 2005).

Os quatro componentes majoritários da amêndoa de pequi foram os lipídios (51,51%), as proteínas (25,27%), os carboidratos (8,33%) e a fibra alimentar (2,2%), apresentando um baixo teor de umidade e um teor elevado de minerais representado pelas cinzas (Tabela 1).

Tanto na polpa como na amêndoa do pequi, pode ser observado o predomínio dos ácidos graxos insaturados com 61,35% e 52,17%, respectivamente. O ácido oléico está presente em maior concentração na polpa, com 55,87%, sendo seguido pelo ácido palmítico (35,17%). Na amêndoa do pequi, predominam os ácidos palmítico e oléico em quantidades praticamente iguais, 43,76% e 43,59%, respectivamente. Também estão presentes o ácido linoléico com 5,51%, esteárico com 2,04%, palmitoléico com 1,23%, sendo detectado em menores quantidades outros ácidos graxos (Tabela 2). Assim, tanto a polpa como a amêndoa do pequi possuem ácidos graxos importantes para compor uma dieta saudável.

O pequi é um fruto encontrado em regiões onde as árvores recebem alta incidência de raios solares, o que favorece a geração de radicais livres, além do que, tanto a polpa quanto a amêndoa do pequi são ricas em lipídios (Tabelas 1 e 2). Essas condições favorecem a biossíntese de compostos secundários com propriedades antioxidantes (compostos fenólicos e carotenóides totais), como é apresentado na Tabela 3.

Na avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso e das frações de ácidos fenólicos da polpa do pequi pelos métodos de co-oxidação do β -caroteno ácido linoléico e teste de Rancimat, Lima & Mancini-Filho (2005) evidenciaram proteção contra os danos oxidativos comparados ao padrão comercial butilidroxitolueno (BHT).

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 (*Euterpe oleracea*), com 136,8mg/100g; goiaba (*Psidium guayava*), com 83,1mg/100g; morango (*Gingko biloba*), com 132,1mg/100g; abacaxi (*Ananas sativa*), com 21,7mg/100g; graviola (*Anona muricato*), com 84,3mg/100g, e maracujá (*Passiflora edulis*), com 20,2mg/100g, sendo inferior apenas à acerola (*Malpighia glabra*), com 580,1mg/100g, e à manga (*Mangifera indica*), com 544mg/100g. Esses resultados indicam que a polpa do pequi é um alimento com elevada capacidade antioxidante, demonstrando a correlação existente entre a quantidade de fenólicos totais e a proteção antioxidante (Kuskoski et al., 2005).

A polpa do pequi possui 7,25mg/100g de carotenóides totais. De acordo com Godoy & Rodrigues-Amaya (1994), os α e

β carotenos juntos representam 10% dos pigmentos carotenóides totais na polpa do pequi. Esses mesmos autores encontraram valores muito próximos aos detectados neste trabalho para os carotenóides totais (7,46mg/100g). Dentre os frutos do cerrado, o teor de carotenóides do pequi é superado apenas pela polpa de buriti, com 16,7mg/100g.

A amêndoa do pequi possui um teor reduzido de fenólicos e de carotenóides, como mostra a Tabela 3. Esses valores estão próximos aos de outras amêndoas típicas do cerrado brasileiro, como o baru (*Dipteryx alata*), a bocaiúva (*Calophyllum*

brasiliense) e o caju (*Anarcadium occidentale*) (Crepaldi et al., 2001).

Dessa forma, pode-se observar que, na polpa e na amêndoa do pequi, os lipídios são os constituintes predominantes, prevalecendo nestes os ácidos graxos oléico e palmítico. Na polpa, também se detectam um teor elevado de fibra alimentar e a presença de compostos fenólicos e carotenóides totais, os quais estão associados à prevenção de processos oxidativos.

TABELA 1 - Composição centesimal da polpa e amêndoa do pequi em base úmida.*

Constituintes	Polpa	Amêndoa
Umidade (%)	41,50 ± 2,00	8,68 ± 0,08
Cinzas (g)	0,63 ± 0,01	4,01 ± 0,51
Proteína(g)	3,00 ± 0,13	25,27± 0,74
Lipídios(g)	33,40 ± 3,76	51,51 ± 0,35
Carboidratos(g)	11,45	8,33
Fibra alimentar total(g)	10,02 ± 0,2	2,20 ± 0,1
Valor Energético Total (Kcal)	358,4	598,3

* Valores expressos como média± desvio-padrão

TABELA 2 - Composição percentual de ácidos graxos da polpa e amêndoa de pequi.*

Ácidos graxos	Nº carbonos	Polpa	Amêndoa
Láurico	C12:0	0,04 ± 0,00	nd
Mirístico	C14:0	0,13 ± 0,01	0,46 ± 0,01
Palmítico	C16:0	35,17 ± 0,27	43,76 ± 0,04
Palmitoléico	C16:1	1,03± 0,00	1,23 ± 0,03
Esteárico	C18:0	2,25 ± 0,04	2,54 ± 0,06
Oléico	C18:1 n-9	55,87 ± 0,30	43,59 ± 0,16
Cis-vacênico	C18:1 n-7	1,90 ± 0,08	1,38 ± 0,01
Linoléico	C18:2	1,53 ± 0,02	5,51 ± 0,08
α -linolênico	C18:3	0,45 ± 0,00	0,09 ± 0,00
Araquídico	C20:0	0,23 ± 0,00	0,20 ± 0,00
Gadoléico	C:20:1	0,27 ± 0,01	0,04 ± 0,00
Docosaexaenóico	C22:6	nd	0,19 ± 0,02
Total de saturados		37,97	47,17
Total de insaturados		61,35	52,48
Não identificados		0,68	0,35

nd = não detectado

* Valores expressos como média± desvio-padrão

TABELA 3 - Teores de fenólicos totais e carotenóides totais em mg/100g, na polpa e amêndoa de pequi.*

Constituintes	Polpa	Amêndoa
Fenólicos totais	209,0 ± 0,05	122,0 ± 0,05
Carotenóides totais	7,25 ± 0,6	0,295 ± 0,5

* Valores expressos como média± desvio-padrão

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, pelo apoio financeiro no desenvolvimento do trabalho e pela bolsa de estudos de Doutorado concedida ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L.B.; PENTEADO, M.V.C. Carotenoids and provitamin A value of white fleshed Brazilian sweet potatoes (*Ipomoea batatas* Lam.) **Journal of Food Composition and Analysis**, Roma, v. 1, p.249-258, 1988.
- ALMEIDA, S.P.; SILVA, J.A. **Piqui e Buriti**: importância alimentar para a população dos cerrados. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1994. 38p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16th ed. Arlington: AOAC, 1998. v.1
- CREPALDI, I.C.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PENTEADO, M.D.C.; SALATINO, A. Composição nutricional do fruto de licuri (*Syagrus coronata* Martius Beccari). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 155-159, 2001.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.226, p.497, 1957.
- GODOY, H. T.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Occurrence of cis-Isomers of provitamin A in brazilian fruits. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 42, p. 1306-1313, 1994.
- HARTMAN, L., LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. **Laboratory Practice**, London, v.22, p.475-476, 1973.
- HINNEBURG, I.; DAMIEN, H.J.; RAIMO, H. **Antioxidant** activities of extracts from selected culinary herbs and spices. **Food Chemistry**, London, v. 97, n. 1, p. 122-129, 2006.
- KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, G.A.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.4, p.726-732, 2005.
- LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J. Compostos com atividade antioxidante no fruto Pequi (*Caryocar brasiliense*, L), **Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição (NUTRIRE)**, São Paulo, v. 30, p. 310, 2005.
- MICHELS, K.B.; FUCHS, C.S.; GIOVANNUCCI, E.; COLDIT, A.; HUNTER, D. J.; STAMPFER, M.J.; WILLETT, W.C.; Fiber intake and incidence of colorectal cancer among 76,947 women and 47,279 men. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v.14, p.842-849, 2005.
- MELO JUNIOR, A.F.; CARVALHO, D.; PÓVOA, J.S.R.; BEARZOTI, E. Estrutura genética de populações naturais de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 66, p.56-65, 2004.
- NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. Campinas: NEPA/ UNICAMP, 2004. 42p.
- RIBEIRO, R.F. **Pequi**: o rei do cerrado. Belo Horizonte: Rede Cerrado, 2000. 62p.
- RODRIGUES-AMAYA, D.B. **Carotenoids and food preparation**: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed, and stored foods. Arlington: OMNI project, 1997. 88p.
- WAIN, T.; HILLS, W.E. The phenolic constituents of *Punus domestica*. I-quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal Science of. Food Agricultural**, London, v.19, p.63-68, 1995.

AVALIAÇÃO DA ACEITAÇÃO DE ARROZ COM PEQUI (*Caryocar brasilienses*, Camb.)

EVALUATION OF THE ACCEPTANCE OF RICE WITH PEQUI (*Caryocar brasilienses*, Camb.)

Alessandro de Lima¹, Gerby Giovanna Rondán Sanabria, Elma Regina da Silva Andrade Wharta², Jorge Herman Behrens³, Jorge Mancini-Filho^{3*}

¹ Professor do Curso de Tecnologia em Alimentos do Centro Federal de Educação Tecnológica do Piauí; Doutorando em Ciência de Alimentos, FCF/USP.

² Doutorandas em Ciência de Alimentos, FCF/USP.

^{3*} Autor para contato: Professor do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - USP; e-mail: jmancini@usp.br

Recebido para publicação em 13/06/2007

Aceito para publicação em 08/10/2007

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a aceitação do arroz com pequi, elaborado conforme sua forma usual de consumo. Para a avaliação da aceitação e intenção de compras, foi utilizada como instrumento de medida, escala hedônica híbrida de 10 pontos, sendo aplicada a 63 provadores. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de clusters para segmentar os provadores segundo suas preferências e aplicado o teste de K-médias. De acordo com a tendência das notas atribuídas para os atributos de aparência, aroma, sabor e impressão geral, formaram-se quatro clusters. Os clusters 1 e 4 concentraram 17,4% dos provadores e não apresentaram boa aceitação geral e intenção de compras. Entretanto o cluster 3, com 74,3% dos provadores, apresentou boa aceitação para todos os atributos com média geral 8,31 e intenção de compras 9,3. De uma forma geral a aceitação do prato foi muito boa, com média 7,31, que refletiu diretamente na intenção de compra, 7,9.

Palavras-chave: arroz com pequi, análise sensorial, aceitação, clusters.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the acceptance of rice with pequi, prepared in accordance with its usual form of consumption. In order to evaluate the consumers' acceptance of the preparation and their intention of

purchasing it, the hybrid hedonic 10-point scale was used as a measuring instrument, and the preparation was offered to 63 tasters. The results were divided into clusters, according to the tasters' preferences, and the "K-médias" test was applied. In accordance with the trend of grades given for appearance, aroma, flavor and general impression, 4 clusters were formed. Clusters 1 and 4 concentrated 17,4% of the tasters, and did not present a good acceptance or intention of purchasing, whereas cluster 3, with 74,3% of the tasters, presented a good acceptance for all the attributes and an average of 8,31 and 9,3 intention of purchasing. In a general way, the acceptance of the preparation was very good, with an average grade of 7,31 that reflected directly on the intention of purchasing, which had the average grade of 7,9.

Key words: rice pequi, sensory evaluates, acceptance, clusters.

1 Introdução

A procura por novas fontes alimentares tem motivado várias pesquisas em todo o território brasileiro, destacando-se nesse contexto os frutos nativos do cerrado brasileiro. Dentre estes frutos, encontra-se o pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.), conhecido popularmente como piqui, pequiá, amêndoa de espinho, grão de cavalo, amêndoa do Brasil, ocorrendo em toda região dessa vegetação (Pará, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, São Paulo, Minas Gerais e Paraná). Adapta-se a condições ecológicas mais diversas, sendo encontrado também em alguns estados nordestinos (Piauí, Ceará e Maranhão). Sua frutificação ocorre de janeiro a março, porém podemos encontrar frutos fora de época. A produção é maior em períodos de seca e na presença de chuvas há irregularidade de frutificação. Os frutos são colhidos no solo, e certos pequizeiros produzem mais de 6.000 frutos (ARAÚJO, 1995; SANO & ALMEIDA, 1998).

O fruto do pequizeiro é do tipo drupa globular, grossa, áspera, verde acinzentada de aspecto lobulado em função da presença de até quatro caroços reniformes em seu interior. É constituído pelo exocarpo ou pericarpo, de coloração esverdeada ou marrom esverdeada, pelo mesocarpo externo, com polpa branca de coloração parda acinzentada e pelo mesocarpo interno, porção comestível do fruto, com coloração amarelada e separada facilmente do mesocarpo externo O endocarpo, espinhoso, protege a semente ou amêndoa, revestida por um tegumento fino e marrom, sen-

do também uma porção comestível (ARAÚJO, 1995; RIBEIRO, 2000).

A polpa amarela do fruto é utilizada na alimentação humana, na fabricação de licores, doces e extração de óleo, é considerada de alto valor energético, fornecendo em média 358 Kcal/100g, representada na sua maioria pelos lipídeos (25,6g/100g), principalmente os ácidos graxos palmítico (35%) e oléico (56%). Também apresenta 3% de proteína, 12% de carboidratos e 10% de fibra alimentar (ALMEIDA e SILVA, 1994; PASSOS, 2002; LIMA e MANCINI FILHO, 2004).

Esse fruto também se constitui em fonte potencial de compostos antioxidantes, possuindo 209mg/100g de compostos fenólicos totais e 7,25mg/100g de carotenóides totais. Desses carotenóides, predominam os α e β -carotenos, ambos apresentando atividade de provitamina A. A atividade antioxidante do extrato aquoso da polpa de pequi se mostrou superior ao BHT (butilhidroxitolueno) em concentrações equimoleculares, usando o método de co-oxidação do β -caroteno ácido linoléico. (LIMA e MANCINI-FILHO, 2005). Portanto, o consumo regular desse fruto pode contribuir para a prevenção de doenças crônicas não-transmissíveis, decorrentes do ataque dos radicais livres formados e não degradados pelo organismo humano, o que caracteriza o estresse oxidativo.

O pequi é muito consumido pelas populações das regiões onde são produzidos, utilizado na incorporação à diferentes pratos da culinária, como: arroz, feijão, frango, cuscuz e também no tradicional baião

de três; arroz, feijão e pequi. Entretanto, esse fruto é pouco industrializado, impossibilitando ser comercializado e consumido por populações urbanas e em períodos de entre safra. Atualmente, a única forma de industrialização constitui-se na extração do óleo realizada de forma artesanal por famílias que fazem do pequi um meio de sobrevivência. Por se tratar de um fruto de fácil produção, com características ímpares em relação ao sabor e valor nutritivo, o pequi representa fonte potencial na alimentação e sobrevivência de grande parte da população (RIBEIRO, 2000).

A análise sensorial constitui-se em um poderoso instrumento para mensurar e interpretar as reações produzidas pelas características dos alimentos e a forma como são percebidas pelos órgãos dos sentidos humanos. Ao longo dos anos foram desenvolvidos vários testes sensoriais, aplicados de acordo com os objetivos propostos pelo estudo (MEILGAARD, CIVILLE e CARR, 1999).

Os testes sensoriais podem ser divididos em métodos discriminativos ou de diferença, descritivos ou analíticos e afetivos. Os discriminativos são usados para estabelecer diferenças qualitativas e/ou quantitativas entre produtos; os descritivos descrevem todos os atributos sensoriais do produto avaliado, mensurando também a sua intensidade, e os afetivos medem o quanto uma população gostou de um produto, para avaliar preferência ou aceitabilidade (MEILGAARD, CIVILLE & CARR, 1999).

Por ser um produto pouco explorado e de processamento ainda artesanal, o pequi é desconhecido por grande parte da população brasileira. Portanto, é de grande contribuição trabalhos que visem à divulgação e a avaliação sensorial de formulações contendo o pequi. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar a aceitação de uma formulação de arroz com pequi.

2 Material e métodos

2.1 Material

Foram utilizadas nessa pesquisa, amostras de polpa de pequi, conservadas em solução salina, em embalagens de 770g, fornecidas pela empresa Cerrado Goiano, localizada no estado do Goiás. As amostras foram colhidas na safra de 2004.

Para o preparo da formulação (arroz com pequi) foram utilizados os seguintes ingredientes: 1 Kg de arroz parboilizado tipo 1, 500g de polpa de pequi, 10 g de alho, 15g de cebola, 1,5 g de açafrão, 15 g de sal de cozinha (NaCl) comercial, 1 g de pimenta do reino preta e 5mL de óleo de soja.

2.2 Métodos

Inicialmente, refogou-se o alho e a cebola picados, no óleo pré-aquecido. Em seguida, foram adicionados o arroz e água fervente (2,5 vezes a quantidade do arroz), deixando cozinhar em fogo brando por cerca de 25 minutos, conforme instruções do fabricante. Em outra panela, foi preparado o molho, com polpa de pequi, açafrão e pimenta do reino em 200mL de água filtrada, em ebulição por 5 minutos. Por último, adicionou-se o arroz cozido ao molho até obter mistura homogênea. Após o preparo, o prato foi mantido em banho de água termostatizado (banho-maria) a 55°C até o momento da degustação, por um período de no máximo 2,5 horas.

2.3 Avaliação sensorial de aceitação

Os provadores foram selecionados em função do interesse e disponibilidade para participar da análise sensorial. No total, participaram 63 indivíduos, 39 do sexo feminino e 24 do sexo masculino, com idade entre 20 e 55 anos, sendo constituídos por alunos, funcionários e docentes da Universidade de São Paulo.

O teste foi realizado no Laboratório de Análise Sensorial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP), em cabines individuais com luz branca apropriadas a avaliações sensoriais.

Para a avaliação dos atributos sensoriais foram servidos aproximadamente 30g da preparação em pratos descartáveis, sendo também oferecido garfo descartável e água mineral. Foram avaliados os seguintes atributos sensoriais: aparência, aroma, sabor e impressão geral da preparação. Foi ainda avaliada a intenção de compra do produto, caso esse fosse encontrado à venda.

A escala hedônica híbrida de 10 pontos (0 = desgostei muitíssimo, 5 = não gostei nem desgostei, 10 = gostei muitíssimo) proposta por Vilanueva (2003) foi utilizada como instrumento de medição da aceitação (vide figura 1).

Nome: _____ Data: ____/____/____.
 Sexo M () F () Idade: ____.

Você está recebendo uma amostra de arroz com pequi. Siga a sequência de atributos a serem avaliados e marque com um "X" na escala correspondente o lugar (inclusive entre os pontos) que melhor represente o quanto você gostou ou desgostou de cada atributo.

1. APARÊNCIA:

Desgostei MUITÍSSIMO 0-----5-----10 Gostei MUITÍSSIMO
 Nem gostei, Nem desgostei

2. AROMA :

Desgostei MUITÍSSIMO 0-----5-----10 Gostei MUITÍSSIMO
 Nem gostei, Nem desgostei

3. SABOR:

Desgostei MUITÍSSIMO 0-----5-----10 Gostei MUITÍSSIMO
 Nem gostei, Nem desgostei

4. DE UMA FORMA GERAL O QUANTO VOCÊ GOSTOU DESSA PREPARAÇÃO:

Desgostei MUITÍSSIMO 0-----5-----10 Gostei MUITÍSSIMO
 Nem gostei, Nem desgostei

5. DE 0 A 10 QUAL PROBABILIDADE DE VOCÊ COMPRAR ESSE PRODUTO, SE O ENCONTRASSE À VENDA:

0-----1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9-----10-----
 Certamente não Compraria Certamente Compraria

Figura 1 - Modelo de ficha utilizando a escala hedônica híbrida de 10 pontos.

2.4 Análise dos resultados

As notas dos 63 provadores para aparência, aroma, sabor e impressão global foram submetidos a uma análise de conglomerados, realizada em duas etapas. Primeiramente a matriz de dados foi utilizada em uma análise hierárquica através do método de Ward que, via de regra, usa a distância euclidiana quadrática no algoritmo de aglomeração (LAWLESS, HEYNEMAN, 1999; O'MAHONY, 1986).

Desta forma, foram identificados quatro segmentos de consumidores. A intenção de compras foi introduzida após a definição dos conglomerados. Como refino na formação dos segmentos finais de consumidores procedeu-se uma análise não hierárquica através do método de K-médias, para a formação de quatro conglomerados (HAIR *et al.*, 1998). As análises foram feitas usando o pacote estatístico SPSS (SPSS, 1997).

3 Resultados e discussão

Para estudar o comportamento do consumidor e avaliar a atitude, técnicas de pesquisas qualitativas e quantitativas têm sido utilizadas de forma a segmentar o mercado, identificando os consumidores potenciais do produto e caracterizando suas demandas e expectativas (COHEN, 1999; SABA *et al.*, 1998, TOMLINS *et al.*, 2005).

A geração dos clusters, isto é, dos segmentos de consumidores com similaridade de respostas, depende da seleção de variáveis que apresentam bom poder de segmentação dos indivíduos. Outros autores também têm utilizado procedimentos similares para caracterizar grupos de consumidores de acordo com sua atitude em relação a um conceito, produto ou preparação (QANNARA *et al.*, 1997; SABA e MESSINA, 2003; MARSHALL e BELL, 2003; TOMLINS *et al.*, 2005).

Além disso, a técnica de geração de clusters não exige os pressupostos de normalidade e homoscedasticidade, exigidos por outras técnicas multivariadas. O que realmente determina o poder de segmentação é a escala utilizada (BEHRENS, da SILVA e EMAKELING, 1999). No presente estudo a escala hedônica híbrida de 10 pontos mostrou ser um bom instrumento de medida.

Os dados obtidos com os 63 consumidores, a partir da avaliação da aceitação do arroz com pequi foram segmentados em quatro conglomerados ou clusters de acordo com a tendência das notas atribuídas pelos provadores, utilizando o método de Ward mostrados na tabela 1. A importância de segmentar os provadores em clusters se reflete em uma avaliação mais criteriosa da aceitação do produto em questão, pois a média global não reflete necessariamente, a aceitação de grupos.

Tabela 1 - Segmentação em clusters dos provadores de arroz com pequi.

Cluster	Número de consumidores
1	3
2	5
3	47
4	8
Total	63

Na tabela 2 consta a média atribuída por cada cluster para os atributos sensoriais avaliados e a intenção de compra do produto.

Tabela 2 - Valores Médios atribuídos pelos provadores para o arroz com pequi de acordo com os quatro clusters formados.

Cluster	Nº prov.	Aparência	Aroma	Sabor	Geral	Compra
1 (atitude negativa)	3	5	2,3	1,3	1,0	1,0
2 (atitude positiva)	5	9,2	3,9	6,6	7,9	7,4
3 (atitude muito positiva)	47	8,97	8,9	8,0	8,3	9,3
4 (atitude neutra a negativa)	8	8,5	7,3	2,8	3,8	2,1
média geral		8,7	8,0	6,9	7,4	7,9

A partir da tabela 2 e da figura 3, pode-se constatar que a aceitação dessa formulação de uma forma geral foi boa, obtendo-se uma média geral de 7,4, que equivale a gostei moderadamente na escala de Vilanueva (2003), o que refletiu diretamente na intenção de compra do produto (7,91). Schiffman e Kanuk (2000) referem que a atitude do consumidor em relação a uma preparação é formada a partir de suas experiências e informações em relação ao mesmo, que o influenciam a agir favorável ou desfavoravelmente em relação a este produto. Desta forma, pode-se interpretar esses resultados como muito positivos com relação à aceitação da associação do arroz com pequi.

Resultados semelhantes foram encontrados por Rocha (2003), ao avaliar iogurte adicionado de doce de pequi. Essa autora inicialmente avaliou a preferência entre três formulações de iogurte adicionado de 15, 20 e 25% de doce de pequi, observando preferência pela terceira formulação. Em seguida, ofereceu essa formulação a 100 provadores e constatou uma boa aceitação, obtendo-se média geral 6,3, correspondendo a “gosto disso e comeria de vez em quando” na escala utilizada.

Dos atributos sensoriais avaliados do arroz com pequi o que obteve a maior aceitação pela maioria dos provadores foi a aparência com uma média geral de 8,7. Isso pode ser observado mesmo entre os provadores que atribuíram notas baixas para os demais atributos. Esse fato decorreu provavelmente, pela cor amarela forte, devido à elevada concentração de carotenóides com pigmentação amarelada presentes na polpa de pequi (RODRIGUES-AMAYA, 1997).

O primeiro cluster ($n=3$), que representa 4,7% dos degustadores (figura 2), foi formado por provadores com atitude negativa em relação ao arroz com pequi. Esse grupo teve uma menor aceitação do produto para todos os atributos, obtendo uma média de 5,0 para aparência, 2,3 para aroma e 1,3 para o sabor. A impressão geral do produto obteve uma média equivalente a 1,0, que na escala corresponde a desgostei muito, refletindo diretamente na intenção de compra do produto que obteve uma média também de 1,0. O pequi possui um sabor muito forte e característico, causando muitas vezes uma forte rejeição a esse produto.

O segundo cluster ($n=5$), que representa 7,9% dos degustadores (tabela 2), foi formado por provadores com atitude positiva para todos os atributos, exceto para o aroma que obteve média 3,9. Isso provavelmente pode ser explicado pelo fato de ser um produto pouco conhecido e também pela rejeição quanto aos compostos voláteis liberados. No que se refere a degustação, houve uma melhor aceitação refletindo na impressão geral da preparação e intenção de compra que obtiveram médias de 7,9 e 7,4 respectivamente.

O terceiro cluster ($n=47$) concentrou a maior parte dos degustadores, sendo representado por 74,6% e mostrou que a grande maioria aceitou a preparação, atribuindo uma média geral de 8,36 para impressão geral e de 9,36 para intenção de compra. Esses resultados servem de suporte para o desenvolvimento de pesquisas voltadas para a industrialização e melhor aproveitamento do pequi, visto ser um alimento de grande valor nutritivo e de baixo custo de produção, além de ser possuidor de características ímpares em relação ao sabor e aroma, podendo ser utilizado para elaboração de inúmeras preparações culinárias.

O quarto e último cluster ($n=8$) que representa 12,7% dos degustadores, foi formado por provadores que apresentaram atitude neutra à negativa para a preparação. Foi observada uma aceitação inicial com relação aos atributos de aparência (média = 8,5) e aroma (média = 7,3), entretanto, quando degustaram o produto houve uma baixa aceitação geral (média = 3,8) e conseqüentemente, uma baixa intenção de compra (média = 2,1)

Figura 2 - Percentual de aceitação por clusters de arroz com pequi.

Figura 3 - Representação gráfica das médias atribuídas pelos provadores de arroz com pequi por clusters e geral.

Conclusões

A partir dos dados obtidos, nas condições em que foi realizada essa pesquisa, pode-se concluir que:

A apresentação da preparação do arroz com pequi obteve uma boa aceitação, entretanto, os resultados obtidos indicaram que os provadores do teste apresentaram segmentação em função das características químicas e sensoriais do produto.

O atributo sensorial com melhor aceitação foi a aparência, apresentando uma média de 8,74 seguido do aroma com 8,03.

O cluster 3, que representa 74,3% dos provadores teve uma maior aceitação para todos os atributos e intenção de compra do produto e diferenciando-se demais.

Apenas 17,4% dos provadores, representados pelos clusters 1 e 4, não apresentaram boa aceitação e intenção de compra pelo produto em estudo.

Esses dados contribuem para pesquisas voltadas para comercialização e expansão do consumo do pequi entre a população brasileira.

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, S.P.; SILVA, J.A. **Piqui e Buriti: Importância alimentar para a população dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1994. 38p.
2. ARAÚJO, D.F. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) – na economically valuable species of the central Brazilian cerrados. **Economic Botanic**, v. 49, n. 1, p. 40-48, 1995.
3. BEHRENS, J. H., da SILVA, M.A.P., WAKELING, I.N. Avaliação da aceitação de vinhos brancos varietais brasileiros através de testes sensoriais afetivos e técnica multivariada de mapa de preferência interno. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 2, maio/ago. 1999.
4. COHEN, J.C. Applications of qualitative research for sensory analysis and product development. **Food Technology**. Chicago, v.11, p.164-166, 1990.
5. HAIR Jr. J.F.; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R.L.; BLACK, W.C. Cluster analysis. In: **Multivariate data analysis**. 5.ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1998. cap. 9, p.469-518.
6. LAWLESS, H.; HEYMANN, H. **Sensory Evaluation of Food – Principles and Practices**. Aspen Publishers, Inc. 1999. 827 p.
7. LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J. Composição em ácidos graxos de óleo de pequi comercializados na cidade de São Paulo, **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**. v.40, p.58, 2004.
8. LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J. Compostos com atividade antioxidante no fruto Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.), **Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição (NUTRIRE)**, v. 30, p. 310, 2005.
9. MARSHALL, D.; BELL, R. Meal construction: exploring the relationship between eating occasion and location. **Food Quality and Preference**. Harlow, v.14, p.53-64, 2003.
10. MEILGAARD, M.; CIVILLE, V.; CARR, B.T. **Sensory Evaluation Techniques**. Boca Raton-FL: CRC Press, Inc. 1987. 281 p.
11. O'MAHONY, M. **Sensory Evaluation of Food – Statistical methods and Procedures**. Marcel Dekker, Inc. New York, 1986. 487 p.
12. PASSOS, X.S. *et al*, atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Soc. Brás. De Méd. Tropical**. v.35, n. 6, p.623-627, 2002.
13. QANNARA, E.M.; VIGNEAU, E.; LUSCAN, P.; LEFEBVRE, A.C.; VEY, F. Clustering of variables, application in consumer and sensory studies. **Food Quality and preference**. Harlow, v.8, p.423-428, 1997.
14. RIBEIRO, R.F. **Pequi: o rei do cerrado**. Rede Cerrado: Belo Horizonte, 2000. 62p.
15. ROCHA, C. Análise sensorial de iogurte batido sabor pequi (*Caryocar brasiliense* L), **Food Ingredients**, v.1, n. 23, 2003
16. RODRIGUES-AMAYA, D.B. **Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed, and stored foods**. Arlington: OMNI project, 1997. 88p.
17. SABA, A.; MESSINA, F. Attitudes towards organic foods and risk/benefit perception associated with pesticides. **Food Quality and Preference**. Harlow, v.14, p.637-645, 2003.
18. SABA, A.; MONETA, E.; NARDO, N.; SINESIO, F. Attitudes, habit, sensory and linking expectation as determinants of the consumption of milk. **Food Quality and Preference**. Harlow, v.9, n.1/2, p.31-41, 1998.
19. SANO, S.M; ALMEIDA, S.P. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 556p.
20. SCHIFFMAN, L.G.; KANUK, L.L. Consumer behavior. 7.ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2000. 469p.
21. SPSS for Windows. Release 8.0.0. Chicago: SPSS, 1997.
22. TOMLINS, K.I.; MANFUL, J.T.; LARWER, P.; HAMMOND, L. Urban preferences and sensory evaluation of locally produced and imported rice in West Africa. **Food Quality and Preference**. Harlow, v.16, p.79-89, 2005.
23. VILANUEVA, N.D.M. **Avaliação do desempenho de quatro métodos de escalonamento em testes sensoriais de aceitação utilizando modelos normais aditivos de análise de variância e mapas internos de preferência**. Campinas, SP, 2003. 140p. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas.

Efeito do extrato aquoso e ácidos fenólicos livres presentes naturalmente na polpa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) sobre biomarcadores do estresse oxidativo em fígado de ratos

Effects of aqueous extracts and free phenolic acids naturally present in the pulp of pequi fruit (*Caryocar brasiliense*, Camb.) on biomarkers of oxidative stress in liver of rats.

Alessandro de Lima*

Ana Mara de Oliveira e Silva**

Jorge Mancini Filho***

Lima A, Silva AMO, Filho JM. Efeito do extrato aquoso e ácidos fenólicos livres presentes naturalmente na polpa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) sobre biomarcadores do estresse oxidativo em fígado de ratos. BIOFARMA - Rev. Téc. Cient. Farm. Bioquím. Anál. Clín. Toxicol. 2007; 2 (5); 329-335.

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito do extrato aquoso (EA) e de ácidos fenólicos livres (AFL), presentes naturalmente na polpa do pequi, sobre biomarcadores do estresse oxidativo em fígado de ratos. Foram administrados: EA (100 e 300 mg/g) e AFL (40 e 100 mg/Kg), p.o., durante 30 dias, aos grupos G1, G2, G3, G4, respectivamente. Os animais controle (C) receberam água. No final do experimento foi coletado o tecido hepático para análise dos seguintes biomarcadores: atividade enzimática da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR), determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) e perfil de ácidos graxos. O tratamento com EA e AFL nas maiores concentrações (G2 e G4) aumentou significativamente ($p < 0,05$) a atividade das enzimas: CAT, SOD, GPx e GR quando comparadas aos animais controle. Essa proteção foi observada também pela redução nos níveis de TBARs. O perfil de ácidos graxos do grupo G2 apresentou uma elevação ($p < 0,05$) nos ácidos graxos poliinsaturados. Pode-se inferir que o EA e AFL nas maiores concentrações elevaram a atividade das enzimas antioxidantes e diminuíram a peroxidação lipídica, apresentando, portanto, um efeito positivo no combate ao estresse oxidativo em fígado de ratos.

Palavras-chave: pequi, biomarcadores antioxidantes, ratos

* Professor do Curso de Tecnologia em Alimentos do Centro Federal de Educação Tecnológica do Piauí, Doutorando em Ciência de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

** Mestranda em Ciência de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

*** Professor Titular do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

Introdução

O excesso de radicais livres produzidos no organismo animal pode atuar sobre várias moléculas, como proteínas, ácidos graxos insaturados dos fosfolípidos de membranas, carboidratos e DNA, estando relacionado com o surgimento e/ou desenvolvimento de uma série de doenças crônico-não transmissíveis, como aterosclerose, diabetes, catarata, câncer, mal de Alzheimer, entre outras. Os compostos fenólicos, presentes nos vegetais, são capazes de neutralizar as estruturas radicalares, portanto diminuindo o risco de surgimento dessas doenças (1).

Além da sua capacidade de neutralizar os radicais livres, os compostos fenólicos atuam quelando metais de transição, como o Fe^{2+} e o Cu^+ ; interrompem a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica; podem modificar o potencial redox do meio; reparam a lesão nas moléculas causadas pelos radicais livres; bloqueiam a ação de enzimas específicas que causam inflamação; modificam as rotas metabólicas dos eicosanóides; protegem a aglomeração plaquetária e inibem a ativação de carcinógenos (2,3).

Trabalhos recentes também relacionam o consumo de compostos fenólicos com a elevação da atividade das enzimas antioxidantes: catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione reductase em ratos (4,5). Essas enzimas são consideradas os principais agentes de defesa endógenos, no combate aos radicais livres, gerados no interior do organismo animal.

O pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.), conhecido popularmente como piqui, pequiá, amêndoa de espinho ou amêndoa do Brasil, é cultivado em todo o cerrado brasileiro, sendo bastante utilizado como fonte alimentar por essas populações. É considerado um alimento de alto valor nutricional, sendo rico em lipídeos, contendo principalmente o ácido oléico (55%) e fonte de fibra alimentar (10,2%) (6). Também se constitui em uma fonte potencial de compostos antioxidantes, possuindo 209 mg/100g de compostos fenólicos totais e 7,25 mg/100g de carotenóides totais. Na avaliação da atividade antioxidante *in vitro* pelo método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico, o extrato aquoso da polpa do pequi apresentou uma atividade antioxidante superior ao BHT (butilhidroxitolueno) em concentrações equimoleculares (7). Essas constatações sugerem que os extratos e frações de ácidos fenólicos da polpa do pequi possam atuar como antioxidantes *in vivo*. Nesse sentido o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do extrato aquoso e dos ácidos fenólicos livres (AFL) presentes naturalmente na polpa do pequi, sobre biomarcadores do estresse oxidativo em fígado de ratos *Wistar*.

Material e Métodos

Amostras

O extrato aquoso (EA) da polpa do pequi foi obtido por extração seqüencial, partindo-se de 5 g de amostra, a qual foi inicialmente extraída por 1 hora com éter etílico na proporção (1:20) amostra-solvente, o resíduo dessa extração foi novamente extraído com álcool etílico utilizando a mesma proporção amostra-solvente, o resíduo dessa segunda extração foi extraído com água destilada nas mesmas condições, obtendo-se o extrato aquoso.

Os ácidos fenólicos livres (AFL) da polpa do pequi foram obtidos a partir da amostra previamente desengordurada, sendo extraída com tetrahydrofurano em aparelho Turrax Yellow Line DI 25 basic, posteriormente o solvente foi rotavaporado e os AFL foram res-suspensos em solução aquosa contendo o emulsificante propilenoglicol a 0,5% (8).

Animais

Foram utilizados 40 ratos da linhagem Wistar, recém desmamados, pesando entre 50 e 60g, os quais foram divididos em cinco grupos contendo oito animais cada grupo.

Métodos

Foram administrados, por gavagem diária, extrato aquoso nas doses de 100 e 300 mg/kg (grupos G1 e G2, respectivamente) e AFL a 40 e 100mg/Kg (grupos G3 e G4, respectivamente), ao grupo controle (C) foi administrado água autoclavada, também foram monitorados o ganho de peso e o consumo de ração dos animais para avaliar o coeficiente de eficácia alimentar (CEA). O experimento teve uma duração total de trinta e sete dias, nos primeiros sete dias os animais permaneceram em adaptação e nos trinta dias restantes foram administrados os extratos e frações de ácidos fenólicos. Após esse período os animais foram sacrificados e coletados o fígado para dosagem dos biomarcadores que se constituíram nas enzimas antioxidantes: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR), substâncias reativas ao ácidos tiobarbitúrico (TBARs), e na composição em ácidos graxos.

Resultados e Discussão

O Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA) do grupo controle foi de 0,33 e dos grupos tratados variaram entre 0,32 (G1) e 0,34 (G2). Demonstrando que o extrato aquoso e a fração AFL da polpa do pequi não exerceram efeito antinutricional que comprometessem o crescimento normal dos animais.

Pode-se ver a partir da tabela 01, que o grupo controle apresentou um índice de lipoperoxidação de 0,362 μ moles MDA/mg de proteína, o grupo G1 = 0,374 μ moles MDA/mg de proteína e o grupo G3 = 0,379 μ moles MDA/mg de proteína, não havendo diferença entre esses grupos. Já os grupos G2, e G4 apresentaram um nível de peroxidação lipídica menor e estatisticamente diferente ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle. Os grupos G2 e G4 foram os que receberam as maiores doses de extrato aquoso da polpa do pequi (300 mg/Kg) e da fração AFL da polpa do pequi (100 mg/Kg) respectivamente, demonstrando que nessas doses os compostos fenólicos do pequi foram efetivos na redução da lipoperoxidação desse tecido. (9,10) também encontraram níveis de peroxidação lipídica reduzidos em fígados de ratos tratados com amostras de vinho tinto e infusão aquosa de sálvia (*Salvia Officinalis*, L) respectivamente.

Tabela 01. Valores de peroxidação lipídica (MDA) no tecido hepático dos grupos controle e experimentais tratados com extrato aquoso e ácidos fenólicos livres da polpa do pequi.

Grupo	Peroxidação lipídica*
(μ moles MDA/mg de proteína)	
Controle	0,362 $\pm$ 0,07
EA100mg/Kg - G1	0,374 ns $\pm$ 0,04
EA 300mg/Kg - G2	0,173*** $\pm$ 0,08
AFL 40mg/kg - G3	0,379 ns $\pm$ 0,08
AFL 100mg/kg - G4	0,243* $\pm$ 0,07

*Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão, n = 8

ns Média não difere estatisticamente do controle ($p > 0,05$)

* Média difere estatisticamente do controle ao nível de erro de 5% ($p < 0,05$)

** Média difere estatisticamente do controle ao nível de erro de 1% ($p < 0,01$)

*** Média difere estatisticamente do controle ao nível de erro de 0,1% ($p < 0,001$)

Na tabela 02, em que consta a atividade das enzimas antioxidantes, pode-se observar que houve um aumento ($p < 0,01$) na atividade da enzima catalase comparando-se o grupo controle (174,6 U/min/mg proteína) e o grupo G2 (249,9 U/min/mg proteína), que recebeu o extrato aquoso da polpa de pequi na dose de 300mg/Kg de peso e o grupo G4 (243,9 U/min/mg proteína) que recebeu a fração AFL na concentração de 100mg/Kg de peso. Comportamento semelhante ao da enzima catalase foi observado para a enzima glutathiona redutase, onde se verificou um aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade dessa enzima para os grupos G2 e G4.

A atividade da enzima glutathiona peroxidase aumentou nos grupos G2, G3 e G4, só não apresentando elevação significativa na sua atividade para o grupo G1. Já a enzima superóxido dismutase só não apresentou uma elevação significativa na sua atividade para o grupo G3. Demonstrando que o extrato aquoso e a fração AFL da polpa do pequi apresentaram um efeito positivo na atividade das enzimas antioxidantes no fígado, sendo evidenciado principalmente nas maiores doses administradas nesse estudo. Resultados semelhantes foram observados por (4) ao suplementar ratos normais, por via oral, com ácidos fenólicos sintéticos gentísico, gálico, ferúlico e p-cumárico na concentração de 100mg/Kg de peso do animal, onde também constataram um aumento da atividade das enzimáticas CAT, SOD e GPx no tecido hepático.

Tabela 02. Atividade das enzimas antioxidantes Catalase, Glutathiona peroxidase, Glutathiona redutase e Superóxido dismutase no fígado dos animais controle e tratados com extrato aquoso e fração de ácidos fenólicos livres da polpa do pequi expressos em U/min/mg proteína

Grupos/ Enzimas	Controle*	EA100mg/Kg G1*	EA 300mg/ Kg G2*	AFL 40mg/kg G3*	AFL100mg/g G4*
Catalase	174,6±50,5	231,3 ^{ns} ±49,3	249,9*±38,9	239,6 ^{ns} ±55,2	243,9*±40,0
Glutathiona redutase	0,047±0,005	0,047 ^{ns} ±0,004	0,056**±0,004	0,049 ^{ns} ±0,005	0,066***±0,004
Glutathiona peroxidase	1,33±0,15	1,35 ^{ns} ±0,09	2,05***±0,25	2,54***±0,36	2,96***±0,40
Superóxido dismutase	20,27±4,0	28,06**±5,3	29,41**±5,4	25,41 ns ±3,7	29,02**±2,3

*Valores expressos como média ± desvio padrão, n = 8

ns Média não difere estatisticamente do controle ($p > 0,05$)

* Média difere estatisticamente do controle ao nível de erro de 5% ($p < 0,05$)

** Média difere estatisticamente do controle ao nível de erro de 1% ($p < 0,01$)

*** Média difere estatisticamente do controle ao nível de erro de 0,1% ($p < 0,001$)

A tabela 03 mostra o perfil de ácidos graxos do tecido hepático dos animais. Observa-se que houve diferença ($p < 0,05$) na concentração de ácidos graxos saturados e poliinsaturados entre o grupo controle e o grupo G2. No grupo controle o teor de ácidos graxos saturados foi de 41,36% e do grupo G2 de 35,66%; já para os ácidos graxos poliinsaturados a concentração do grupo controle foi de 48,76% e do grupo G2 de 55,25%, demonstrando que o extrato aquoso de pequi protegeu os ácidos graxos insaturados do tecido hepático. Com relação à concentração de ácidos graxos monoinsaturados não houve diferença entre nenhum dos grupos.

Tabela 03. Perfil de ácidos graxos (%) do fígado de ratos tratados com extrato aquoso e fração de ácidos fenólicos livres da polpa de pequi

Ácido graxo	Teor (%)*					
	Controle*		EA100mg/Kg G1*	EA 300mg/Kg G2*	AFL 40mg/kg G3*	AFL100mg/g G4*
C14:0	0,25 ±0,07 ^a		0,28 ±0,05 ^a	0,28 ±0,05 ^a	0,29 ±0,14 ^a	0,32 ±0,13 ^a
C15:0	0,24 ±0,02 ^a		0,22 ±0,05 ^a	0,24 ±0,06 ^a	0,20 ±0,04 ^a	0,20 ±0,04 ^a
C16:0	18,81 ±2,52 ^a		17,77 ±1,57 ^a	17,04 ±0,53 ^a	18,33 ±1,01 ^a	18,21 ±1,67 ^a
C16:1	0,56 ±0,13 ^a		0,65 ±0,21 ^a	0,77 ±0,26 ^a	0,78 ±0,34 ^a	0,81 ±0,44 ^a
C17:0	0,78 ±0,08 ^a		0,69 ±0,10 ^a	0,73 ±0,25 ^a	0,63 ±0,09 ^a	0,58 ±0,09 ^a
C18:0	20,59 ±2,98 ^a		19,13 ±2,33 ^a	16,70 ±1,24 ^b	19,23 ±2,57 ^a	18,68 ±2,15 ^a
C18:1	7,34 ±0,80 ^a		7,43 ±0,84 ^a	8,39 ±0,88 ^a	8,39 ±1,61 ^a	8,64 ±1,76 ^a
C18:2	17,26 ±4,94 ^a		18,92 ±1,50 ^a	20,59 ±1,43 ^b	19,17 ±2,86 ^a	20,00 ±1,63 ^a
C18:3	0,43 ±0,11 ^a		0,47 ±0,12 ^a	0,55 ±0,12 ^a	0,46 ±0,19 ^a	0,46 ±0,24 ^a
C20:2	0,52 ±0,11 ^a		0,41 ±0,05 ^a	0,46 ±0,08 ^a	0,40 ±0,04 ^a	0,38 ±0,03 ^a
C20:3n-6	0,37 ±0,06 ^a		0,33 ±0,05 ^a	0,42 ±0,07 ^a	0,38 ±0,07 ^a	0,31 ±0,08 ^a
C24:4	25,86 ±1,09 ^a		27,24 ±1,97 ^a	28,34 ±1,59 ^b	26,15 ±2,49 ^a	26,29 ±2,79 ^a
C24:0	0,70 ±0,15 ^a		0,71 ±0,17 ^a	0,46 ±0,04 ^a	0,69 ±0,30 ^a	0,59 ±0,08 ^a
C22:5	0,60 ±0,12 ^a		0,43 ±0,07 ^a	0,61 ±0,12 ^a	0,56 ±0,14 ^a	0,47 ±0,05 ^a
C22:6	3,73 ±1,45 ^a		4,06 ±0,72 ^a	4,42 ±0,55	4,34 ±0,86 ^a	4,09 ±0,41 ^a
Saturados	41,36 ±5,53^a		38,81 ±3,77^a	35,66 ±0,89^b	39,36 ±3,28^a	38,57 ±2,35^a
Polinsaturados	48,76 ±7,51^a		51,85 ±2,26^a	55,25 ±1,13^b	51,46 ±2,80^a	52,02 ±2,83^a
Monoin-saturados	7,90 ±0,82^a		8,08 ±1,00^a	9,06 ±1,13^a	9,18 ±1,89^a	9,45 ±2,16^a

*Valores expressos como média ± desvio padrão, n = 8

a,b Médias na mesma linha seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% (p<0,05), comparando as amostras ao grupo controle

Efeito do extrato aquoso e ácidos fenólicos livres presentes naturalmente na polpa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) sobre biomarcadores do estresse oxidativo em fígado de ratos

Quando se avalia isoladamente os ácidos graxos, por grupo, percebe-se um aumento na concentração do ácido graxo monoinsaturado, oléico (18:1) apresentando diferença ($p < 0,05$) entre o grupo controle e G2. Já para os ácidos graxos poliinsaturados notou-se uma elevação no teor do ácido linoléico (18:2) havendo diferença ($p < 0,05$) entre o grupo controle e os grupos G2 e G4. O ácido araquidônico (C24:4) apresentou comportamento semelhante ao ácido oléico. Os demais ácidos graxos isoladamente não apresentaram diferenças entre os diferentes grupos. Esses resultados sugerem uma ação inibidora dos compostos fenólicos presentes no extrato aquoso de pequi na maior dose estudada (300mg/Kg de peso) sobre o processo oxidativo no tecido hepático dos animais que o receberam. Resultados semelhantes foram detectados por (11) que verificou uma elevação discreta, mas significativa na concentração de ácidos graxos poliinsaturados (C20:3 n-6 e C 24:4) em ratos tratados com extrato aquoso da semente de girassol rajada, na concentração de 2,1% de fenólicos totais.

O fígado é o órgão de metabolização dos compostos polifenólicos advindos da dieta, sendo responsável pela sua sulfatação e/ou glucuronização, para que esses possam cair na circulação sanguínea e atuar como antioxidantes nos diversos tecidos corporais. Portanto, o fígado pode servir como depósito dos compostos polifenólicos, dessa forma combatendo os radicais livres mais rapidamente.

Conclusões

Os resultados obtidos permitem inferir que 300 mg/Kg do extrato aquoso e 100 mg/Kg da fração AFL da polpa do pequi, reduziram a lipoperoxidação e elevaram a atividade das enzimas antioxidantes: catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione reductase no fígado dos animais. Também que a dose de 300 mg/Kg do extrato aquoso protegeu os ácidos graxos poliinsaturados do fígado contra a lipoperoxidação.

Abstract

The present work aimed to evaluate the effects of aqueous extract (AE) and free phenolic acid (FPA), naturally present in the pulp of pequi fruit (*Caryocar brasiliense*, Camb.), on biomarkers of oxidative stress in livers of rats. It was orally administered: AE (100 and 300 mg/kg-1), FPA (40 and 100 mg/kg-1) and water for 30 days to the groups G1, G2, G3, G4 and control animals (C), respectively. At the end of experiment, liver tissues were removed and analyzed for the following biomarkers: enzymatic activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR). Lipid oxidation was measured by 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and fatty acid profile was determinate by Gas Chromatography (GC). Significantly increase ($P < 0.05$) of enzymatic activity of CAT, SOD, GPx and GR were observed in rats treated with the high EA and FPA concentration (G2 and G4) compared to control animals. The protective effect was also confirmed by low TBARS values. Fatty acids profile of the group G2 showed a significantly increase ($P < 0.05$) of the polyunsaturated fatty acids. It can be concluded that the higher concentration of AE and FPA are able of raising the activity of antioxidant enzymes and diminishing the lipid peroxidation, hence indicating a positive effect in the fighting against the oxidative stress in liver of rats.

Referencias bibliográficas

1. VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIC, M.T.D.; MILAN, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease,. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 32, n. 3, p. 3-41, 2006.
2. MILES, E.A.; ZOUBOULI, P.; CALDER, P.C.; PHIL, D. Differential anti-inflammatory affects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. Nutrition, v. 21, p. 389-394, 2005
3. LIU, R.H.; Finley potential cell culture models for antioxidant research. Journal of Agric and F. Chem., v. 53, n. 10, p.4311-4314, 2005.
4. YEH, C. T.; YEN, G. C. Effects of phenolics acids on human phenolsulfotransferases in relation to their antioxidant activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v.51, p.1474-1479, 2006.
5. ANDRADE-WARTHA, E.R. Propriedades antioxidantes de clones do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e enzimas participantes do sistema antioxidante de defesa do organismo animal. São Paulo, 2007. 134p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas).
6. KERR, W. E.; SILVA, F.R.; TCHCARRAMAE, B. Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) informações preliminares sobre um pequi sem espinhos no caroço, Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal –SP, v. 29, n.1, p. 169-171, 2007.
7. LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J. Compostos com atividade antioxidante no fruto Pequi (*Caryocar brasiliense*, L), Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição (NUTRIRE), v. 30, p. 310, 2005.
8. KRYGIER, K., SOSULSKI, F., HOGGER, L. Free, sterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. J. Agric. Food Chem., v.30, n.2, p.330-334, 1982.
9. RODRIGUES, R.; CASTILHO, R.; CARRASCO, R.; HUERTA, P.; MORENO, M. Diminution of tissue lipid peroxidation in rats is related to the in vitro antioxidant capacity of wine. Life Sci., Amsterdam, v. 76, n.8, p. 889-900, 2005.
10. LIMA, C.F.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M.; FERNANDES-FERREIRA, M.; PEREIRA-WYLSON, C. The drinking o a salvia officinalis infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. J. Ethnopharmacol., Amsterdam, v.97, n. 2, p. 383-389, 2005.
11. GIADA, M.L.R. Avaliação da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos do cotilédone da semente de girassol (*Helianthus annuus* L) rajada. São Paulo, 2006. 206p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas).

Efeito do extrato aquoso e ácidos fenólicos livres presentes naturalmente na polpa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) sobre biomarcadores do estresse oxidativo em fígado de ratos