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

Avaliação da atividade antioxidante da romã (*Punica granatum*, L.) - Participação das frações de ácidos fenólicos no processo de inibição da oxidação

Fernanda Archilla Jardini

Dissertação apresentada para obtenção
do grau de MESTRE

Orientador: Prof. Tit. Jorge Mancini Filho

São Paulo
2005

Fernanda Archilla Jardim

Avaliação da atividade antioxidante da romã (*Punica granatum*, L.) –
I. Participação das frações de ácidos fenólicos no processo de
inibição da oxidação

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Tit. Jorge Mancini Filho
Orientador/ presidente

1º examinador
Prof. Assoc. Roseane Fett

2º examinador
Prof. Tit. Luis Antonio Gioielli

São Paulo, 19 de setembro de 2005.

A meus pais, Marcos e Iracema

DEDICO

*“Deus não impôs aos ignorantes
a obrigação de aprender,
sem antes ter tomado aos que sabem
o juramento de ensinar.”*

Provérbio árabe

AGRADECIMENTOS

A minha família: meus pais Marcos e Iracema e ao meu irmão, Marcos Fábio, pelo apoio material e emocional durante todo o percurso deste trabalho.

Ao meu orientador, professor Jorge Mancini Filho, pela oportunidade oferecida para alcançar mais um degrau na conquista profissional. Pelo espírito de confiança que motiva todos do laboratório de lípidos.

A todos os professores, funcionários e alunos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Em especial, a “família” do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, pela acolhida e oportunidade de aprender desde a iniciação científica.

Agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa e suporte financeiro ao projeto e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro ao projeto.

Obrigada aos companheiros e amigos do laboratório de lípidos: a técnica de nível superior Rosângela Pavan e aos pós-graduandos Alessandro, Elma, Fabiana e Lourdes, e a todos os que passaram para aprender e ensinar conosco.

Obrigada especial às amigas, ex- pós graduandas do laboratório de lípidos: Ana Vlória, Céphora e Maria Elena, não só pelo estímulo, mas também por serem um exemplo de dedicação a carreira científica.

À amiga Rose Dedovoti, e aos amigos do Departamento de Tecnologia Bioquímica- farmacêutica: Chiu, Denise e Juliana, pela amizade.

À empresa Cargill Agrícola S.A. pelo fornecimento do óleo sem antioxidante, para realização do experimento de atividade antioxidante pelo método Rancimat®.

À professora Julia M.P. Soler, à aluna Lourine Faria e à secretária Elaine F. Bosko, do Instituto de Matemática e Estatística (IME) da USP, pela atenção e cuidado na análise estatística dos dados experimentais.

Aos pesquisadores Ephraim Lanski e Michael Aviram, do Centro Tecnológico de Haifa (Israel), pelas informações sobre a romã.

Ao Dr. Antonio Marcos Levy, pela atenciosa correção e finalização deste trabalho.

Minha gratidão também aqui é expressa a todos aqueles a quem direta ou indiretamente, citados aqui ou não, colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS E QUADROS	v
LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS	viii
LISTA DE ABRVIAÇÕES	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Radicais livres e seus efeitos	3
2.2 Lípides	6
2.2.1 Ácidos graxos conjugados	8
2.2.2 Oxidação lipídica	11
2.3 Antioxidantes	13
2.3.1 Mecanismo de ação dos antioxidantes	14

2.3.2	Natureza dos antioxidantes	15
2.3.3	Classe de compostos antioxidantes	20
2.3.4	Compostos fenólicos e biodisponibilidade	22
2.4	A romã	24
3.	OBJETIVOS	29
4.	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	Material	30
4.1.1	Polpa	31
4.1.2	Sementes	31
4.1.3	Reagentes e solventes	31
4.2	Métodos	32
4.2.1	Composição centesimal	32
4.2.1.1	Conteúdo de umidade	32
4.2.1.2	Conteúdo de lípidos	33
4.2.1.3	Conteúdo de proteína total	34

4.2.1.4	Conteúdo de resíduo mineral	35
4.2.1.5	Conteúdo de carboidratos	35
4.2.2	Obtenção da fração lipídica da semente da romã	36
4.2.3	Preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos	36
4.2.4	Análise do perfil de ácidos graxos da semente da romã por cromatografia gasosa	37
4.2.5	Obtenção dos extratos e frações de ácidos fenólicos da polpa e semente da romã	38
4.2.5.1	Obtenção dos extratos da polpa e semente da romã	38
4.2.5.2	Obtenção das frações de ácidos fenólicos da polpa e semente da romã	39
4.2.6	Conteúdo de compostos fenólicos totais	43
4.2.7	Separação dos compostos fenólicos por cromatografia em camada delgada (CCD)	45
4.2.8	Avaliação da atividade antioxidante	47
4.2.8.1	Ensaio de cooxidação β - caroteno e ácido linoléico	47

4.2.8.2	Estudo cinético da atividade antioxidante do ensaio de cooxidação β - caroteno e ácido linoléico	49
4.2.8.3	Ensaio em meio lipídico (método Rancimat)	52
4.2.9	Avaliação estatística	53
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	Composição centesimal	55
5.2	Perfil lipídico	56
5.3	Conteúdo de compostos fenólicos totais	58
5.4	Separação dos compostos fenólicos por cromatografia em camada delgada (CCD)	61
5.5	Atividade antioxidante	64
5.5.1	Ensaio de cooxidação β - caroteno e ácido linoléico	64
5.5.2	Estudo cinético da atividade antioxidante do ensaio de cooxidação β - caroteno e ácido linoléico	77
5.5.3	Ensaio em meio lipídico (Rancimat)	93
6.	CONCLUSÕES	96
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

LISTA DE TABELA E QUADROS

	Página
TABELA 01: Concentrações empregadas ($\mu\text{g/mL}$) para extratos e frações de ácidos fenólicos no ensaio de conteúdo de fenólicos totais	44
TABELA 02: Composição centesimal da polpa e semente da romã	55
TABELA 03: Composição e porcentagem de ácidos graxos do óleo da semente da romã	56
TABELA 04: Conteúdo de fenólicos totais para os extratos da polpa e semente da romã	58
TABELA 05: Conteúdo de fenólicos totais para as frações de ácidos fenólicos da polpa e semente da romã	60
TABELA 06: Valores de R_f obtidos para os extratos e frações de ácidos fenólicos da polpa e semente da romã	63
TABELA 07: Concentrações de compostos fenólicos para os extratos nos volumes utilizados no teste de cooxidação β -caroteno e ácido linoléico	65

TABELA 08: Porcentagem de inibição da oxidação para os extratos da polpa e semente da romã no teste de cooxidação β - caroteno e ácido linoléico	66
TABELA 09: Porcentagem da inibição da oxidação para a associação entre os extratos da polpa e semente da romã e o BHT no teste de cooxidação β - caroteno e ácido linoléico	71
TABELA 10: Concentrações de compostos fenólicos para as frações fenólicas nos volumes utilizados no teste de cooxidação β - caroteno e ácido linoléico	72
TABELA 11: Porcentagem de inibição da oxidação para as frações de ácidos fenólicos da polpa e semente da romã no teste de cooxidação β - caroteno e ácido linoléico	73
TABELA 12: Porcentagem da inibição da oxidação para a associação entre as frações fenólicas da polpa e semente da romã e o BHT no teste de cooxidação β - caroteno e ácido linoléico	76
TABELA 13: Parâmetros cinéticos para os extratos da polpa e semente da romã	87
TABELA 14: Parâmetros cinéticos para a associação entre o BHT e os extratos da polpa e semente da romã	88
TABELA 15: Parâmetros cinéticos para as frações de ácidos fenólicos da polpa e semente da romã	90

TABELA 16: Parâmetros cinéticos para a associação entre o BHT e as frações de ácidos fenólicos da polpa e semente da romã	92
---	----

TABELA 17: Porcentagem da inibição da oxidação (método Rancimat) para os extratos da polpa e semente da romã	93
--	----

TABELA 18: Porcentagem de inibição da oxidação (método Rancimat) para as frações de ácidos fenólicos da polpa e semente da romã	18
---	----

QUADROS

QUADRO 01: Exemplos de radicais livres, estrutura e natureza radicalar	4
--	---

QUADRO 02: Exemplos de ácidos graxos conjugados do ácido graxo linolênico, diferenciados pela isomeria, pnto de fusão, fonte vegetal de origem e quantidades encontradas	9
--	---

QUADRO 03: Conseqüências <i>in vivo</i> da exposição aos antioxidantes sintéticos	17
---	----

QUADRO 04: Compostos identificados em trabalhos utilizando diferentes partes da romã	26
--	----

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

	Página
FIGURA 01: Processos patológicos possivelmente desencadeados pela ação das espécies reativas do oxigênio (ERO's) no organismo humano	6
FIGURA 02: Estrutura do ácido graxo punícico	10
FIGURA 03: Esquema demonstrativo das etapas ocorrentes no processo de oxidação lipídica	13
FIGURA 04: Estrutura dos principais antioxidantes sintéticos	16
FIGURA 05: Esquema do metabolismo dos compostos fenólicos	24
FIGURA 06: A romã	25
FIGURA 07: Amostras obtidas da romã (suco e sementes)	30
FIGURA 08: Esquema de extração seqüencial para obtenção dos extratos	39
FIGURA 09: Esquema para obtenção das frações de ácidos fenólicos	42
FIGURA 10: Reações decorrentes do processo oxidativo	51

FIGURA 11: Modelo para obtenção das tangentes para cálculo dos fatores cinéticos	52
--	----

GRÁFICOS

GRÁFICO 01: Curva cinética do potencial antioxidante do extrato alcoólico da polpa	77
GRÁFICO 02: Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso da polpa	78
GRÁFICO 03: Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etéreo da semente	79
GRÁFICO 04: Curva cinética do potencial antioxidante do extrato alcoólico da semente	80
GRÁFICO 05: Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso da semente	81
GRÁFICO 06: Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ácidos fenólicos livres da polpa	82
GRÁFICO 07: Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis da polpa	83

GRÁFICO 08: Curva cinética do potencial antioxidante da
fração de ácidos fenólicos livres da semente 84

GRÁFICO 09: Curva cinética do potencial antioxidante da
fração de ácidos fenólicos esterificados a compostos
solúveis da semente 85

GRÁFICO 10: Curva cinética do potencial antioxidante da
fração de ácidos fenólicos esterificados a compostos
insolúveis da semente 86

LISTA DE ABREVIATURAS

AA = ácido araquidônico
BHA = butil- hidróxi- anisol
BHT = butil- hidróxi- toluene
CAT = catalase
CLA's = do ingles, *conjugated linoleic acids*
CLNA's = do inglês, *conjugated linolenic acids*
COX = ciclooxigenase
EPA = ácido eicosapentaenóico
ERO's = espécies reativas do oxigênio
F1= fator cinético 1
F2 = fator cinético 2
FES = fração de ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis
FEI = fração de ácidos fenólicos esterificados a compostos insolúveis
FL = fração de ácidos fenólicos livres
GPx = glutathione peroxidase
LDL = do inglês, *low density lipoprotein*
LOX = lipooxygenase
PG = propil galato
PUFA's = do inglês, *polyunsaturated fatty acids*
Rf = fator de retenção
SOD = superóxido dismutase
TBHQ = terci- butil- hidroquinona

RESUMO

Os antioxidantes de origem natural têm importância na área de alimentos, pois podem representar uma alternativa de substituição aos antioxidantes sintéticos. Os compostos fenólicos, presentes nos vegetais, desempenham importância na inibição da oxidação. A romã (*Punica granatum*, L.) é rica em compostos fenólicos como as antocianinas, flavonóides e ácidos fenólicos. Avaliou-se a atividade antioxidante da polpa e semente de romãs plantadas no Brasil (Pernambuco), e foi feita a obtenção dos extratos e frações de ácidos fenólicos da fruta, que foram submetidos aos testes de cooxidação de substratos β - caroteno e ácido linoléico, em meio emulsionado, e ao método Rancimat, em meio lipídico. Também foi avaliado o comportamento cinético da atividade antioxidante para os extratos e frações de ácidos fenólicos. Verificou-se que os extratos aquosos da polpa e semente apresentaram significativa inibição da oxidação a concentrações baixas, em ambos os testes utilizados, fato atribuído à grande quantidade de compostos fenólicos presentes nestes extratos, em relação aos demais. A avaliação cinética dos extratos aquosos demonstrou que estes também foram mais eficientes ao longo do processo oxidativo, apresentando-se mais estáveis do que o antioxidante sintético BHT. As frações de ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis da polpa foi a fração que apresentou maior inibição da oxidação, e também maior quantidade de compostos fenólicos, apresentando uma atividade cinética bastante eficiente. Entretanto, as frações de ácidos fenólicos livres da polpa e semente apresentaram percentagens de inibição da oxidação bastante altas a uma concentração menor. A semente da romã apresenta em sua composição de ácidos graxos o ácido graxo punílico. Este ácido é um isômero conjugado do ácido linolênico, e que constitui 58% da composição total de ácidos graxos da semente da fruta, sendo seu principal ácido graxo.

ABSTRACT

The antioxidants of natural origin have an important role on food science, because they may substitute the synthetic antioxidants. The phenolic compounds of vegetables play an important role as oxidation inhibitors. The pomegranate (*Punica granatum*, L.) is rich in phenolic compounds as anthocyanins, flavonoids and phenolic acids. The antioxidant activity of extracts and acid phenolic fractions obtained from the pulp and seeds of Brazilian pomegranate (from Pernambuco) was evaluated, by the co-oxidation of β -carotene and linoleic acid assay and the Rancimat method. The kinetic behavior of the antioxidant activity of the extracts and acid phenolic fractions by the co-oxidation of β -carotene and linoleic acid test was evaluated, too. It was noted that the aqueous extracts from the pulp and seeds have significant antioxidant activity at low concentration. It was possible by the high content of phenolic compounds present on those extracts. The kinetic behavior showed that the aqueous extracts were the most efficient along the oxidative process, showing larger stability than the antioxidant BHT. The pulp's of bound acid phenolic fraction by soluble compounds was the most efficient among the acid phenolic fractions, and it has a major amount of phenolic compounds. The pomegranate seed has the punicic acid on its fatty acid composition. The punicic acid is a conjugated linolenic acid isomer. The punicic acid is present at 58% from the total fatty acids from the fruit, being its principal fatty acid.

1. INTRODUÇÃO

Os últimos 50 anos têm se caracterizado pelo estudo do impacto da nutrição e dos compostos presentes na dieta, sobre a saúde (BERGER, 2005).

Os antioxidantes são substâncias de grande importância nos alimentos. São empregados como aditivos alimentares, com o objetivo de impedir ou prolongar ao máximo o tempo de preservação do alimento contra reações químicas que podem ocorrer durante o processamento e estocagem, alterando de modo indesejável as características sensoriais e nutricionais do alimento (MELO e GUERRA, 2002).

Os antioxidantes sintéticos são os mais utilizados pela indústria, sendo exemplos o BHT (butil- hidróxi- tolueno), o BHA (butil- hidróxi- anisol), o TBHQ (terci- butil- hidroquinona) e o PG (propilgalato) (FKI, ALLOUCHE e SAYADI, 2004). Contudo, estudos indicam que os antioxidantes sintéticos podem oferecer danos à saúde, quando utilizados durante longo período ou ainda quando as quantidades superam àquelas consideradas seguras ao seu uso (ITO *et al*, 1983; HIROSE *et al*, 1986; WURTZEN e OLSEN, 1986). Frente a esta possibilidade, diversos vegetais têm sido estudados, como fontes de antioxidantes naturais em substituição aos antioxidantes artificiais (SHAHIDI, 1997; MOURE *et al*, 2001).

Devido à capacidade em reagirem com os radicais livres e assim prevenirem ou minimizarem os danos que a oxidação pode gerar no organismo, os compostos antioxidantes (como os compostos fenólicos, dentre outros) podem ser apontados como benéficos à saúde (SCALBERT e WILLIANSO, 2000; LEONG e SHUI, 2002; LO, CHEUNG e PETER, 2005).

A romã (*Punica granatum*, L.) é uma fruta originária do Oriente Médio, sendo nesta região de origem consumida tanto *in natura*, como aproveitada para

produção de bebidas (como sucos, vinhos e licores) e doces (SCHUBERT, LANSKI e NEEMAN, 1999). O fruto apresenta grande variedade de compostos fenólicos, como ácidos fenólicos, antocianinas, flavanóis e flavonóis (ARTIK, MURAKAMI E MORI, 1998; POYRAZOGLU, GÖKMEN e ARTIK, 2002). O óleo extraído das sementes possui, em sua composição de ácidos graxos, o ácido punícico, que é um ácido graxo poliinsaturado conjugado com configuração 9-*cis*, 11- *trans*, 13- *cis* (MELGAREJO e ARTÉS, 2000).

Assim, o presente trabalho teve por finalidade avaliar a atividade antioxidante da romã cultivada no Brasil, avaliando a participação dos extratos e frações de ácidos fenólicos presentes na polpa e sementes da fruta, na inibição da oxidação lipídica e analisar e quantificar os ácidos graxos da semente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Radicais livres e seus efeitos

Radicaís livres são definidos como moléculas ou átomos com um ou mais elétrons desemparelhados, que apresentam elevada instabilidade, e, por tal estrutura são altamente reativos (LO, CHEUNG e PETER, 2005).

As espécies reativas do oxigênio (ERO's) formam as espécies radicalares cujo elétron desemparelhado está localizado no átomo de oxigênio. São exemplos de ERO's o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) e o radical peroxila ($RO_2^{\bullet}$). As espécies reativas do nitrogênio (ERN's) incluem os radicaís peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$), óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) e dióxido de nitrogênio ($NO_2^{\bullet}$) (KARAKAYA, EL e TAS, 2001; BERGER, 2005).

Espécies como o ácido hipocloroso ($HOCl$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete (1O_2) e o ozônio (O_3), são espécies não radicalares, mas que podem levar a reações mediadas por radicaís livres (HALLIWELL *et al.*, 1995).

O quadro 1 mostra alguns exemplos de radicaís livres, sua estrutura e natureza radicalar.

QUADRO 1: EXEMPLOS DE RADICAIS LIVRES, ESTRUTURA E NATUREZA RADICALAR

Nome	Estrutura	Natureza
Átomo de hidrogênio	$H^{\bullet}$	radical livre de estrutura mais simples
Triclorometil	$CCl_3^{\bullet}$	radical carbônico, formado durante o metabolismo do CCl_4 no fígado
Superóxido	$O_2^{\bullet-}$	radical do oxigênio
Hidroxila	$OH^{\bullet}$	radical do oxigênio
Tióis	$RS^{\bullet}$	nome genérico do grupo de radicais sulfurônicos
Peroxila, alcóxila	$RO_2^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$	radicais oxigênicos formados da quebra dos peróxidos orgânicos
Óxidos de nitrogênio	$NO^{\bullet}$, $NO_2^{\bullet}$	radicais do nitrogênio

(adaptado de HALLIWELL *et al.*, 1995)

Nos alimentos, os radicais livres são responsáveis pela reação de autooxidação. Esta reação ocorre, por exemplo, nos lípides, degradando os ácidos graxos, causando a perda dos atributos sensoriais e nutricionais do alimento. Os compostos formados na reação de oxidação têm efeito tóxico ao organismo e podem reagir com aminoácidos, proteínas, bases fosfolipídicas e DNA, comprometendo células e sua estrutura (KUBOW, 1992).

A base do desenvolvimento de muitas doenças crônicas pode estar relacionada à quantidade de radicais livres presentes no organismo e os produtos subsequentes formados nas reações iniciadas por eles. Alterações nas membranas celulares podem levar a transtornos de permeabilidade, alterando o fluxo iônico e de substâncias, provocando a perda da seletividade para a entrada ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alteração do DNA, oxidação

da LDL e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina) (THOMAS, 2000; CURI *et al.*, 2002; TEPE *et al.*, 2005).

Os radicais livres são formados durante processos fisiológicos comuns, podendo as ERO's serem produzidas por leucócitos e também pelas mitocôndrias durante o processo respiratório, tendo papel de sinalizadores celulares. Os radicais livres produzidos são metabolizados no organismo pelo sistema enzimático endógeno (por ação das enzimas superóxido dismutase –SOD-, glutathione peroxidase –GPx- e catalase - CAT) ou, também, serem neutralizados através de substâncias antioxidantes que podem ser provenientes da dieta (por exemplo, vitaminas e compostos fenólicos). O desbalanceamento entre a produção de radicais livres e o sistema de defesa antioxidante pode conduzir a alguns estados patológicos (BERGER, 2005; MATHEW e ABRAHAM, 2005), que são esquematizados na figura 1.

FIGURA 1: Processos patológicos possivelmente desencadeados pela ação das espécies reativas do oxigênio (ERO's) no organismo humano (SHAHIDI, 1997).

2.2 Lípidos

Os lípidos constituem uma importante classe de nutrientes presentes na dieta. São responsáveis por características como gosto, aroma e textura, além da sensação de saciedade da fome. Nutricionalmente, são grandes fornecedores de

calorias (9 Kcal/g), fonte de ácidos graxos essenciais e veículo de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) (SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999; GRANZA e KORCZAK, 2005).

Os ácidos graxos são definidos quimicamente como ácidos carboxílicos (RCO_2H) onde, na maioria das vezes, o grupamento R é uma cadeia carbônica longa, não ramificada, com número par de átomos de carbono. O grupo carboxila constitui a região polar e a cadeia R, a região apolar da molécula. Nos alimentos, o número de átomos de carbono nos ácidos graxos varia, de forma geral, entre 12 a 22, mas podem ocorrer, também, ácidos graxos com menor ou maior número de átomos de carbono. A estrutura molecular dos ácidos graxos pode conter duplas-ligações ao longo da seqüência carbônica, de acordo com o número de insaturações a seqüência pode ser classificada como mono ou poliinsaturadas, ou ainda como saturada, em caso de ausência das duplas-ligações (SALEM JR., 1999).

Os ácidos graxos insaturados octadecenóicos (18 átomos de carbono na cadeia), também conhecidos como PUFA's (do inglês, *polyunsaturated fatty acids*) são importantes dentro do contexto de alimentos funcionais. Os ácidos graxos linoléico (18:2) e alfa-linolênico(18:3), conhecidos, respectivamente, como ácidos graxos Ω -6 e Ω -3 (a série ômega refere-se à uma ordem classificatória, baseada na posição da primeira insaturação contada à partir do último átomo do carbono metilênico), são ácidos graxos especiais e envolvidos no metabolismo de produção dos eicosanóides. O ácido linoléico, por ação das enzimas elongases e dessaturases, é metabolizado a ácido araquidônico (AA) e o ácido alfa-linolênico metabolizado a ácido eicosapentaenóico (EPA). Tanto o AA como o EPA fazem parte dos fosfolipídeos de membrana. A ativação, através de um estímulo como, por exemplo, inflamatório, leva à ativação da enzima fosfolipase A_2 , liberando os ácidos graxos que quando livres, podem sofrer uma adição à sua molécula de um átomo de oxigênio, por ação das enzimas ciclooxigenase (COX) ou lipooxigenase (LOX), dando origem a diferentes eicosanóides (ÁCIDOS..., 2001).

Os eicosanóides são sinalizadores químicos de importância para o sistema vascular, onde desempenham diferentes funções, dependendo do ácido graxo metabolizado e daqueles que lhes deram origem. Os eicosanóides produzidos a partir do AA apresentam efeitos vasoconstritores e proagregatórios. Já os eicosanóides formados a partir do EPA têm ações vasodilatadora e antiagregatórias, prevenindo a formação de trombos e estimulando a vasodilatação e respostas antiinflamatórias, levando a um menor risco de desenvolvimento de doenças isquêmicas e cardiovasculares. A proporção relativa de AA e EPA determina a origem dos efeitos trombóticos e vasoconstritores, ou efeitos antitrombóticos e vasodilatadores (ÁCIDOS..., 2001).

2.2.1 Ácidos graxos conjugados

Uma classe de lípides que podem apresentar características benéficas à saúde são os ácidos graxos conjugados. Os ácidos graxos conjugados do ácido linoléico (também chamados de CLA's, abreviação que vem do inglês, *conjugated linoleic acids*) são encontrados principalmente no leite e derivados, e são sintetizados a partir do ácido linoléico, por biohidrogenação no rúmen do animal. Há evidências de que estes ácidos graxos desempenham funções na inibição do crescimento de células epiteliais, por inibição da síntese de DNA, e possivelmente também colaboram na síntese dos eicosanóides (STUCHLIK e ZÁK, 2002).

Os ácidos graxos conjugados do ácido linolênico (ou abreviadamente chamados CLNA's, também do inglês *conjugated linolenic acids*) são encontrados exclusivamente no óleo de sementes de vegetais (demonstrados no quadro 2).

QUADRO 2: EXEMPLOS DE ÁCIDOS GRAXOS CONJUGADOS DO ÁCIDO GRAXO LINOLÊNICO, DIFERENCIADOS PELA SUA ISOMERIA, PONTO DE FUSÃO, FONTE VEGETAL E QUANTIDADE ENCONTRADOS

Ácido graxo	Conformação isomérica	Ponto de fusão (°C)	Fonte	% encontrada*
α- eleostárico	<i>cis</i> -9, <i>trans</i> - 11, <i>trans</i> - 13	48-49	<i>Momordica charandia</i> e no 'tung"	60 (<i>C. mommordica</i>) , 70 (tung)
calêndico	<i>trans</i> - 8, <i>trans</i> - 10, <i>cis</i> - 12	40-41	<i>Calendula officinalis</i> , L.	33
punícico	<i>cis</i> -9, <i>trans</i> - 11, <i>cis</i> - 13	44-45	<i>Punica granatum</i> , L. e <i>Trichosanthes kirilowii</i>	72 (<i>P. granatum</i>), 40 (<i>T. kirilowii</i>)
catálpico	<i>trans</i> - 9, <i>trans</i> - 11, <i>cis</i> - 13	31-32	semente de catálpia	31
jacárico	<i>cis</i> - 8, <i>trans</i> - 10, <i>cis</i> - 12	43-44	<i>Jacaranda mimosifolia</i>	-

* ARAO *et al.*, 2004

O trabalho realizado por NOGUCHI *et al.* (2001) demonstrou que ratos que foram submetidos a uma dieta contendo o ácido α- eleosteárico, nas concentrações de 0,5 e 2,0% do total lipídico da dieta, apresentaram aumento do teor lipídico no fígado. A análise dos ácidos graxos realizada no fígados dos animais não foi encontrado o ácido α- eleosteárico. Foi encontrado, porém, o ácido graxo conjugado do ácido linoléico, na conformação isomérica *cis*- 9, *trans*- 11, sendo este isômero apontado como biologicamente ativo dentro da classe dos CLA's.

Os possíveis efeitos citotóxicos dos conjugados dos ácidos linoléico e linolênico foram avaliados em cultura de células tumorais, demonstrando que o conjugado linoléico apresentou efeito citotóxico às células em concentrações de

25 a 50 μM , enquanto que o conjugado linolênico apresentou resultados equivalentes a concentrações acima de 100 μM (IGARASHI e MIYAZAWA, 2000).

FIGURA 2: estrutura do ácido graxo punílico, contendo três insaturações conjugadas (*cis*- 9, *trans*- 11, *cis*- C13).

O ácido punílico, apresentado na figura 2, apresenta uma conjugação 9- *cis*, 11- *trans*, 13- *cis* foi testado nos trabalhos de ARAO *et al.* (2004a) e RAO *et al.* (2004b). Estes trabalhos verificaram os efeitos biológicos sobre o metabolismo lipídico de ratos. No primeiro trabalho foram utilizados ratos OLEFT (portadores de uma síndrome que leva a distúrbios metabólicos e enzimáticos, causando obesidade). Os ratos que receberam a ração contendo óleo da semente da romã, rico em ácido punílico, apresentaram diminuição no acúmulo de triacilgliceróis no fígado e a redução dos ácidos graxos monoinsaturados no plasma, levando a um menor acúmulo lipídico no plasma. No segundo trabalho, o ácido punílico foi adicionado a cultura de células hepáticas, e os resultados comparados com o ácido α - linolênico, na concentração de 100 $\mu\text{M/L}$. Os autores observaram que as células apresentaram supressão na síntese da apolipoproteína B100 (componente

da VLDL) nas duas condições, mas o efeito foi maior nas células que receberam tratamento com o ácido puníco. Também foi verificada menor síntese de ácidos graxos pelas células.

2.2.2 Oxidação lipídica

A oxidação lipídica é responsável tanto por conseqüências positivas, quanto negativas. Dentre as características positivas, é responsável pelo aroma e sabor de alimentos fritos, alguns tipos de queijos e embutidos, como os salames e outros. Como características negativas, ocorre o desenvolvimento do ranço, que em alimentos como os óleos, diminui o tempo de prateleira do produto e seu valor nutritivo, causando rejeição do produto. Fatores como a composição química dos lípidos, a distribuição dos lípidos na matriz e sua exposição a agentes como oxigênio, luz, calor e agentes pró- oxidantes são fatores determinantes para a estabilidade oxidativa dos lipídeos. A degradação oxidativa dos ácidos graxos pode ocorrer por várias vias, em função do meio e dos agentes catalisadores (SILVA, 1999; MATHEW e ABRAHAM, 2005).

A rancidez hidrolítica ocorre devido à ação da enzima lipase sobre os óleos e gorduras, que liberam os ácidos graxos das moléculas de triacilgliceróis. Uma vez livres, os ácidos graxos estão muito mais propensos a sofrerem ação da enzima lipoxigenase, catalisando a adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada e assim produzindo o hidroperóxido, que pode ser convertido pela enzima hidroperóxidolase a estruturas como aldeídos, cetonas e epóxidos. O processo de catálise enzimática decorre com maior especificidade, em termos de substrato e de produtos finais, que o processo de autooxidação (HAMILTON *et al.*, 1997).

A reação de fotooxidação é promovida essencialmente pela radiação UV em presença de sensibilizadores, como a clorofila e a mioglobina, envolvendo a participação do oxigênio singlete como intermediário reativo (NAWAR, 1996).

A reação de autoxidação é medida através de radicais livres, ocorrendo principalmente nos ácidos graxos insaturados, devido à instabilidade eletrônica que as duplas ligações apresentam, tornando os hidrogênios ligados aos carbonos onde as insaturações estão localizadas mais fáceis de serem retirados da cadeia carbônica (NAWAR, 1996; SALEM JR., 1999).

A reação de autoxidação é dividida em três fases: iniciação, propagação e término. Na etapa de iniciação, ocorre o ataque do radical livre à molécula do ácido graxo, retirando o átomo de hidrogênio, gerando estruturas reativas, como o radical alquila ($R^{\bullet}$). Na etapa de propagação, uma reação em cadeia tem início com o radical alquila reagindo com o oxigênio, dando origem ao radical peroxila ($ROO^{\bullet}$); este radical ataca outras moléculas de ácido graxo, formando novamente radicais alquila e também o hidroperóxido ($ROOH$). O término da reação é caracterizado pelo rearranjo dos radicais formados entre si, formando produtos não reativos e polímeros (NAWAR, 1996; SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999; LO, CHEUNG E PETER, 2005). Estas etapas são representadas de forma esquemática na figura 3.

INICIAÇÃO

PROPAGAÇÃO

TÉRMINO (formação de produtos não reativos)

FIGURA 3: Esquema demonstrativo das etapas ocorrentes no processo de oxidação lipídica (NAWAR, 1996).

2.3 Antioxidantes

A oxidação lipídica provoca efeitos indesejáveis aos produtos lipídicos, como a deterioração e formação de compostos tóxicos. Estes inconvenientes podem ser minimizados nos alimentos, utilizando aditivos que inibam ou retardem a reação de oxidação dos lipídeos. Os antioxidantes são substâncias que, mesmo quando presentes em concentrações pequenas em relação ao substrato, previnem ou retardam a oxidação do mesmo (MELO e GUERRA, 2002; MARINOVA e YANISHILIEVA, 2003).

As condições desejadas em um composto antioxidante são a capacidade de doar átomos de hidrogênio ou elétron, apresentar estrutura estável após a reação com o radical livre e ter potencial quelante frente aos metais (RICE- EVANS, MILLER e PAGANGA, 1997).

2.3.1 Mecanismo de ação dos antioxidantes

Os antioxidantes podem exercer seu potencial inibitório da reação oxidativa mediante diferentes interações, sendo classificados de acordo com o mecanismo de ação em antioxidantes primários ou secundários.

2.3.1.1 Antioxidantes primários

Os antioxidantes primários agem interrompendo a cadeia da oxidação lipídica, doando elétrons ou átomos de hidrogênio ao radical lipídico. O radical adquire uma estrutura estável e de menor reatividade, quebrando a reação em cadeia. Como exemplos têm-se os compostos fenólicos (KAUR e KAPOOR, 2001).

2.3.1.2 Antioxidantes secundários

Os antioxidantes secundários agem protegendo os lípides da ação de compostos que podem levar à produção de radicais livres ou ainda atacar diretamente os ácidos graxos. Os antioxidantes secundários podem: agir sobre átomos de metais monovalentes (quelantes); criar barreiras entre o óleo e o oxigênio (fosfolípides); regenerar parcialmente os antioxidantes primários (como o ácido ascórbico, que pode regenerar a vitamina E); decompor peróxidos e produtos não radicalares; seqüestrar o oxigênio singlete ou absorver a radiação UV (THOMAS, 2000).

2.3.1.3 Sinergismo

O sinergismo pode ser definido como a ação combinatória entre dois compostos, que provoca um aumento do resultado observado pelos compostos quando testados isoladamente. Podem ser testados entre antioxidantes primários e secundários (por exemplo, compostos fenólicos e agentes quelantes) ou ainda entre antioxidantes sintéticos e naturais, sendo esta particularmente desejável pois este efeito apresenta a possibilidade de diminuir as concentrações dos antioxidantes sintéticos nos alimentos (MOURE *et al.* 2001).

2.3.2 Natureza dos antioxidantes

De acordo com sua origem, os antioxidantes podem ser classificados em antioxidantes sintéticos ou naturais.

2.3.2.1 Antioxidantes sintéticos

Os antioxidantes sintéticos (figura 4) são bastante utilizados industrialmente, sendo comum o emprego do tert- butil- tolueno (BHT), tert- butil- anisol (BHA), tert- butil- hidroquinona (TBHQ) e o propil- galato (PG). Estes antioxidantes sintéticos são os mais utilizados, sendo que a escolha e a concentração varia de acordo com o alimento empregado, em quantidades que variam entre 50 a 200 ppm do teor lipídico total do alimento (FKI, ALLOUCHE e SAYADI, 2004; HAN e RHEE, 2004).

FIGURA 4: Estrutura dos principais antioxidantes sintéticos A) butil- hidróxi-tolueno (BHT); B) butil- hidróxi – anisol (BHA); C) tert- butil-hidroquinona (TBHQ) e D) propil- galato (PG).

Como consequência do maior consumo de produtos industrializados, evidenciado principalmente a partir da década de 1980, a ingestão dos antioxidantes sintéticos também foi aumentada. Esta condição trouxe uma preocupação quanto à segurança destes compostos e motivou a partir desta data estudos com a finalidade de observar as consequências que uma exposição aguda e prolongada de antioxidantes sintéticos ao organismo (SHIBATA *et al.*, 1993). As consequências dos antioxidantes sintéticos nos estudos realizados *in vivo* são mostrados no quadro 3.

QUADRO 3: TRABALHOS QUE EVIDENCIAM AS CONSEQÜÊNCIAS *IN VIVO* DA EXPOSIÇÃO AOS ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS

ANTIOXIDANTE SINTÉTICO	CONSEQÜÊNCIA	TRABALHO
BHT	tumores de fígado, pâncreas e glândulas	HIROSE <i>et al.</i> 1981
BHA, BHT, PG	aumento da formação de H ₂ O ₂ nos microssomos, alterando funções hepáticas	ROSSING, KAHL e HILDEBRANDT, 1985
BHA	carcinogênese no forestômago de ratos	ITO <i>et al.</i> 1983
BHT	adenomas e carcinomas em células hepáticas	WURTZEN e OLSEN, 1986

Os trabalhos mostrados no quadro 3 realizados foram efetuados em animais, com doses acima das usualmente presentes nos alimentos e por um período de tempo prolongado. Esta metodologia foi empregada para simular os efeitos de uma exposição aguda e crônica sobre o organismo.

No trabalho de HIROSE *et al* (1981), as concentrações do antioxidante sintético BHT foram de 0,25 a 1% do total lipídico da ração. WURTZEN e OLSEN (1986) verificaram os efeitos citados na tabela 3 oferecendo aos ratos uma dieta contendo 500mg/ Kg de peso do animal/ dia, durante 2 anos.

ROSSING, KAHL e HILDEBRANDT (1985) ofereceram dieta com 2% de BHA, sendo sacrificados após 24 horas. Após perfusão do fígado e pulmões, foi verificado um aumento na concentração de H₂O₂, demonstrando que a dose aguda de BHA provocou aumento na concentração de peróxido de hidrogênio que, embora não tenha potencial de reação como radical livre, pode levar a reações mediadas por radicais.

O trabalho de HIROSE *et al.* (1986) verificou a diminuição do crescimento e queda de pêlos em ratas, hiperplasia das células epiteliais e do estômago. ITOA *et al.* (1983) verificou o efeito modulador do BHA sobre a resposta de compostos reconhecidamente carcinogênicos sobre o estômago de ratos.

Os antioxidantes sintéticos afetam o metabolismo enzimático, inclusive das enzimas envolvidas no metabolismo carcinogênico. Nota-se, porém, que o efeito inibitório ou promotor da carcinogênese depende da dose consumida diariamente. As informações sobre o consumo máximo de antioxidantes são incertas e, por vezes, contraditórias. GOWER (1988) descreveu que a dose de 10 mg/Kg diários não ofereceria risco à saúde, e a promoção carcinogênica foi observada em animais cujo consumo diário foi de 20 mg/Kg da dieta.

SHIBATA *et al.* (1993) observaram o efeito sinérgico entre os antioxidantes sintéticos e naturais, na indução da carcinogênese. Os autores submeteram ratos aos antioxidantes sintéticos BHA e aos ácidos ascórbico, benzóico e gálico, administrados sozinhos ou combinados entre si, na concentração de 2 mg/100g/dia, durante 52 semanas. Todos animais que receberam o BHA na dieta, sozinho ou combinado a outro ácido, apresentaram hiperplasia do estômago anterior, sendo que nos animais que receberam as dietas contendo somente os ácidos ascórbico, benzóico ou gálico foram notadas lesões leves. O efeito sinérgico foi observado em todos animais deste grupo, porém a hiperplasia do estômago foi mais pronunciada no grupo que recebeu o ácido ascórbico combinado ao BHA.

2.3.2.2 Antioxidantes naturais

Antioxidantes naturais são formados por compostos presentes principalmente nas plantas, incluindo-se aí os tocoferóis, a vitamina C, os carotenóides e os compostos fenólicos. Considerando-se o menor custo dos antioxidantes sintéticos e sua eficiente ação, estas substâncias têm sido preferencialmente usadas em relação aos antioxidantes naturais. Entretanto, frente aos efeitos que os antioxidantes sintéticos podem causar e, também, ao apelo de que os alimentos naturais são mais saudáveis, os antioxidantes extraídos de fontes naturais têm sido cada vez mais estudados quanto à sua eficácia e também seu emprego em alimentos (SHAHIDI, 1997).

Trabalhos realizados empregando antioxidantes extraídos de fontes naturais e aplicados a alimentos processados apresentaram resultados satisfatórios. Os extratos de alecrim, chá verde, café e casca de uva, e também os antioxidantes sintéticos BHA e octil- galato, foram testados em carne de frango desidratada, sendo a atividade antioxidante do alecrim superior aos demais (NISSEN *et al.*, 2001). SALLAM, ISHIOROSHI e SAMEJIMA (2004) compararam o antioxidante sintético BHT com diferentes formas de alho (fresca, óleo e desidratada), em carne de frango. As formas fresca e desidratada do alho apresentaram atividades antioxidantes superiores ao BHT.

REDDY, UROOJ e KUMAR (2005) analisaram biscoitos foram formulados com extratos hidroalcoólicos obtidos de plantas (*Moringa oleifera*, *Emblica officinalis* e *Vitis vinifera*, na forma de passa), nas concentrações de 1% (para os dois primeiros extratos) e 2% (para o último), com a formulação padrão contendo 200 ppm de BHA. Os biscoitos foram armazenados durante 6 semanas e submetidos às análises de porcentagem de inibição da oxidação, conteúdo de ácidos graxos livres e índice de peróxido ao longo do período. Em todos os testes realizados, os biscoitos contendo em sua formulação o extrato de *Moringa oleifera* apresentaram inibição da oxidação superior a do BHA.

A incorporação de ácidos graxos poliinsaturados em gemas de ovos de galinhas, e a proteção dos antioxidantes sintéticos e naturais sobre os ácidos graxos foi o objetivo do trabalho de BERNAL GÓMEZ, MENDONÇA JÚNIOR e MANCINI FILHO (2003). A análise foi realizada em gemas de ovos de galinhas que receberam dietas enriquecidas com ácido α -linolênico e diferentes antioxidantes (combinação dos antioxidantes sintéticos BHA + BHT, e naturais, provenientes das especiarias orégano e alecrim, todos a concentração de 200 ppm). O perfil de ácidos graxos das gemas demonstrou a incorporação do ácido α -linolênico, e os antioxidantes naturais foram capazes de oferecer proteção contra a peroxidação lipídica, embora os antioxidantes sintéticos demonstraram ser mais eficientes.

2.3.3 Classes de compostos antioxidantes

Os compostos fenólicos são uma classe extensa de antioxidantes, sendo caracterizada pela presença de pelo menos um anel aromático, e de grupos substituintes (como hidroxilas e carboxilas) presos à estrutura do anel (SROKA e CISOWKI, 2003). São produtos do metabolismo secundário de vegetais, e sabe-se que além de desempenharem funções de proteção, contribuem para qualidades sensoriais dos vegetais como cor e adstringência (MACHEIX, FLEURIET e BILLOT, 1990).

2.3.3.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são compostos simples, formados por uma anel aromático e os substituintes presos à sua estrutura, conferindo capacidade de seqüestrar espécies reativas como o radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$) e o oxigênio singlete. Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos: os ácidos fenólicos cinâmicos (derivados do ácido cinâmico), e os ácidos fenólicos benzóicos (derivados do ácido benzóico). Os derivados benzóicos apresentam o grupo substituinte –

COOH enquanto que os derivados cinâmicos apresentam o grupo substituinte – $\text{CH} = \text{CH} - \text{COOH}$, o qual lhes confere maior estabilidade na estabilização dos fenóxi radicais. A posição dos grupos substituintes também é importante na atividade antioxidante, sendo maior quando há hidroxilas nas posições *orto* e *para*, e quando há presença de um ou mais substituintes do grupo metóxi ($-\text{CH}_3$) (MARINOVA e YANISHILIEVA, 2003).

2.3.3.2 Flavonóides

Flavonóides são um grupo de compostos químicos encontrados naturalmente em vegetais. Apresentam uma estrutura polifenólica do tipo C6- C3- C6, denominada difenilpropânica, constituída por dois anéis aromáticos ligados a três carbonos que em geral formam um heterociclo oxigenado. Diferenças entre os grupos correspondem à variação entre estruturas e arranjo dos grupos substituintes presos aos anéis, e também à forma à qual a estrutura apresenta-se (livre ou glicosilada) (SHAHIDI e NACZK, 2004).

Os flavonóides podem agir, devido à sua estrutura, como doadores de hidrogênio ou como quelantes de metais (RICE- EVANS ,MILLER e PAGANGA, 1997).

2.3.3.3 Taninos

Taninos são compostos polifenólicos que ocorrem naturalmente nos vegetais. Os taninos incluem grupos oligoméricos e poliméricos que, dependendo de sua estrutura, são definidos como hidrolisáveis ou condensáveis (ou proantocianidinas). Os taninos hidrolisáveis são formados por ácidos gálicos glicosilados. Os taninos hidrolisáveis são divididos em galotaninos e elágotaninos que produzem, após a hidrólise, os ácidos gálico e elágico. Os taninos condensados são estruturas oligoméricas e polímeros de flavonóides, especificamente, de flavan- 3- ol (COOK e SAMMAN, 1996).

2.3.4 Compostos fenólicos e biodisponibilidade

Como já citado no item 2.1., concentrações excessivas de radicais livres no organismo e os processos oxidativos por eles iniciados podem estar envolvidos no mecanismo de iniciação de algumas doenças (exemplificadas na figura 1). Compostos fenólicos têm sido encontrados em vários produtos presentes na dieta normal, como em bebidas (chá verde e vinho tinto, sucos de frutas, café), vegetais (frutas, hortaliças, especiarias) e grãos (SHAHIDI, 1997).

Por tal razão, muitos estudos são realizados, para verificar a associação entre o consumo de alimentos e bebidas ricas em compostos fenólicos à prevenção de doenças. Benefícios como a diminuição do risco aterogênico foram observados em estudos *in vitro*, através da redução na oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) mostrados em trabalhos utilizando polpa de uva (MEYER, JEPSEN e SORENSEN, 1998), ácidos caféico e dihidrocaféico (MOON e TERAQ, 1998) e catequinas obtidas do chá verde (NAKAGAWA *et al.*, 1999). Ainda como atuação benéfica do sistema cárdio- circulatório, os compostos antioxidantes também foram apontados como capazes de inibição da agregação plaquetária (AVIRAN *et al.*, 2000). DE GAULEJAC, PROVOST e VIVAS (1999), constataram que os compostos antioxidantes são capazes de proteger as células dos danos que podem ser iniciados pelos radicais livres.

A biodisponibilidade dos compostos fenólicos tem papel determinante nos possíveis efeitos biológicos atribuídos a estes compostos. Características como peso molecular, solubilidade e pKa são fatores que influenciam o metabolismo dos compostos fenólicos, assim como o trânsito gastrointestinal, a permeabilidade da membrana e o pH do lúmen. A estrutura do composto e a forma em que o composto está presente, se livre (aglicona) ou ligada a outros compostos (glicosilada) também são fatores influenciadores da atividade fisiológica dos compostos no organismo (SHAHIDI e NACZK, 2004).

Os compostos ingeridos na forma de aglicona são normalmente absorvidos e metabolizados pelo fígado. Já os fenólicos na forma glicosilada sofrem hidrólise enzimática no lúmen intestinal, sendo absorvidos a partir do intestino delgado. Quando os fenólicos estão ligados a compostos insolúveis, como as fibras, a hidrólise ocorre por ação das enzimas bacterianas, através da fermentação no cólon. Estes compostos são, portanto, absorvidos mais lentamente, sendo sujeito às condições da microflora colônica (BRAVO, 1998; SCALBERT e WILLIANSOM, 2000; WALLE, 2004).

Após a absorção, os compostos na forma de agliconas são metabolizados no fígado, sendo conjugadas a metilas, ácido glicurônico ou sulfatos. Os derivados conjugados e 3'-O - metilados foram detectados no plasma de animais que receberam administração de flavonóides, flavanóis e isoflavonas. A excreção das agliconas e dos compostos metabolizados pelo fígado é feita por excreção renal ou pela bile, podendo a partir daí ainda voltarem ao intestino e retornarem ao ciclo, através de um processo de re- absorção. Os fenólicos ligados a compostos insolúveis são encontrados em maior quantidade nas fezes, demonstrando sua resistência à digestão e absorção intestinal (SCALBERT e WILLIANSOM, 2000)

A absorção dos compostos fenólicos e sua excreção está esquematizado na figura 5.

FIGURA 5: Esquema do metabolismo dos compostos fenólicos (SCALBERT e WILLIANSOM, 2000)

2.4. A Romã

A romã (figura 6) é uma fruta conhecida desde os tempos mais remotos. O nome em latim, *Punica granatum*, L., provém de *malus punica* (maçã de Cartago), e *granatum*, que significa “com muitos grãos”. É originária da região da Ásia Ocidental, de onde se espalhou para a região do Mediterrâneo, África e, mais tarde, para a América.

É uma árvore de pequeno porte, chamada de romanzeira, pertencente à família Punicaceae. A romanzeira cresce em regiões áridas, e a produção do fruto é realizada entre os meses de setembro a fevereiro. É consumida tanto nas formas *in natura* quanto de produtos processados da fruta como bebidas, doces e

outras. Na medicina popular, as sementes e a mucilagem que as envolvem, são utilizadas principalmente no tratamento de infecções da garganta, podendo também ser empregada como vermífugo (em casos de teníase) (MARTINS, 1995; MACHADO *et al.*, 2002; SCHUBERT, LANSKI e NEEMAN, 1999).

FIGURA 6: A romã, o fruto fechado (A) e aberto (B), com as sementes à mostra.

Os dados da produção mundial da romã são escassos. O Irã, país situado na região de origem da fruta, contabilizou uma produção em 2004 de 570 toneladas da fruta, segundo o ILNA e o Fars Agriculture Jihad Dept. (<http://www.iran-daily.com/1383/2131/html/economy.htm>). O estado da Califórnia, nos Estados Unidos, produziu 17 mil toneladas em 2004 (<http://www.uga.edu/fruit/pomegran.htm#production>). No Brasil, segundo dados do CEAGESP da cidade de São Paulo, foram comercializadas 165 toneladas da fruta em 2001, 232 toneladas (2002), 219 toneladas (2003) e 187 toneladas (2004).

A romã é rica em compostos fenólicos, como pode ser visto em trabalhos mostrados no quadro 4.

QUADRO 4: COMPOSTOS IDENTIFICADOS EM TRABALHOS DIFERENTES PARTES DA ROMÃ

Parte da fruta	Compostos	Trabalho
Suco obtido por prensagem somente da parte interna da fruta	ácidos fenólicos (quínico, gálico e clorogênico), antocianinas (delfinidina, cianidina e pelargonidina) e quercetina	ARTIK, MURAKAMI e MORI, 1998
Mucilagem	antocianinas (delfinidina, cianidina e pelargonidina)	NODA <i>et al.</i> , 2002
Suco (obtido por prensagem da fruta toda)	antocianinas (delfinidina, cianidina e pelargonidina), ácidos orgânicos (cítrico, L-málico, tartárico, oxálico e succínico) e ácidos fenólicos (gálico, quínico, catequínico, clorogênico, caféico e orto e para-cumárico)	POYRAZOGLU, GÖKMEN e ARTIK, 2002

Na romã, as antocianinas estão presentes em grande quantidade, conferindo à fruta sua coloração rosa característica. Das antocianinas encontradas, os glicosídeos da cianidina e delfinidina estão presentes na mucilagem, e a pelargonidina encontrada somente na casca da fruta. Também são encontrados no suco da fruta grande quantidade dos ácidos galáico e eláico (MACHEIX, FLEURIET e BILLOT, 1990).

Há uma consideração a ser feita quanto aos compostos encontrados nos diferentes trabalhos mostrados no quadro 4. ARTIK, MURAKAMI e MORI (1998) e POYRAZOGLU, GÖKMEN e ARTIK (2002) fizeram a identificação dos compostos fenólicos e ácidos orgânicos, presentes no suco da fruta. Deve-se observar que o trabalho de ARTIK, MURAKAMI e MORI (1998) utilizou o suco da fruta obtido por prensagem da fruta integral, incluindo-se a casca e a parte branca interna

(olbedo). Este processo pode provocar a migração dos compostos como os ácidos fenólicos e taninos para o suco, e que estão presentes em maior quantidade em partes da fruta como na casca, nas sementes e no olbedo. Já POYRAZOGLU, GÖKMEN e ARTIK (2002) realizaram a identificação no suco obtido somente da parte interna da fruta (sementes e mucilagem). Assim, alguns dos compostos encontrados nestes dois trabalhos não foram identificados em NODA *et al* (2002), no qual identificaram os compostos fenólicos do suco feito somente da mucilagem da romã.

A composição de compostos fenólicos na romã é bastante variada. O estudo de PEREZ- VICENTE, GIL- IZQUIERDO e GARCÍA- VIGUERA (2002) analisou a o conteúdo de antocianinas, vitamina C e outros compostos fenólicos presentes no suco da romã, antes e após tratamento com pepsina, simulando a digestão gástrica. Ao final do experimento, os compostos polifenólicos foram encontrados em maior quantidade em relação aos demais compostos, evidenciando que sofreram uma menor perda durante a simulação do processo digestório. A perda de compostos fenólicos foi de 71%, seguida pelas perdas de vitamina C (95%) e antocianinas (97%).

Em trabalho realizado por SCHUBERT , LANSKI e NEEMAN (1999), foram extraídos os flavonóides do suco fermentado da romã e do óleo extraído das sementes. Os flavonóides foram submetidos aos testes de determinação da atividade antioxidante (teste de co-oxidação de substratos, utilizando β - caroteno e ácido linoléico) e inibição enzimática, utilizando as enzimas COX e LOX. O resultado apresentado mostrou que os flavonóides extraídos do óleo e do suco fermentado da romã apresentaram boa atividade antioxidante. Já nos testes de inibição enzimática, os resultados mais altos foram obtidos pelos flavonóides do óleo, sendo a inibição enzimática mais acentuada para a enzima LOX em relação à enzima COX.

O suco da romã foi avaliado quanto ao potencial de proteção aterogênica que os compostos presentes na fruta podem oferecer. Em trabalho de AVIRAN *et al*

(2000) demonstrou-se que o extrato aquoso feito com a parte interna da romã apresentou efeito inibitório da peroxidação lipídica no plasma, lipoproteínas e nos macrófagos. Os autores também observaram que a progressão das lesões ateroscleróticas foi significativamente inibida, assim como as modificações aterogênicas da LDL, incluindo sua retenção, oxidação e agregação. Ainda neste trabalho, evidenciou-se que o extrato atenuou a ativação das plaquetas. O mesmo pesquisador demonstrou em outro trabalho que a ingestão de 50 mL do suco da fruta, durante duas semanas, inibiu a atividade sérica da enzima conversora da angiotensina (ECA), e, conseqüentemente, diminuindo a pressão sistólica (AVIRAN e DORNFELD, 2001).

Coelhos que ingeriram sucos preparados com uma suspensão aquosa da fruta em pó tiveram suas respostas humorais e seus mediadores celulares aumentados (ROSS *et al.*, 2001). Os animais que receberam uma dose de 100 mg/Kg apresentaram um aumento no nível de anticorpos e também da inibição na migração leucocitária.

Os níveis das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e glutathiona (GSH) de ratos que receberam extrato metanólico de romã a 70% (a doses de 250 mg/Kg e 500 mg/Kg) encontraram-se maiores que os níveis pré- tratamento. Verificou-se também uma diminuição da lipoperoxidação dos tecidos, mostrando a grande ação do extrato da romã na varredura das espécies reativas do oxigênio (ERO's), formadas após a indução de injúria na mucosa gástrica dos animais (AJAIKUMAR *et al.* 2005).

Considerando que o Brasil possui boa produção e consumo da romã e o uso da fruta na medicina popular é avalizado pelos trabalhos científicos, nos dispusemos a estudar alguns aspectos da romã, com enfoque para a atividade antioxidante e a participação das frações de ácidos fenólicos sobre o processo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Avaliar o potencial antioxidante da romã (*Punica granatum*, L.).

3.2 Objetivos específicos:

Determinação da composição centesimal da romã (conteúdo de lípidos, proteína, umidade, resíduo mineral e carboidrato);

Avaliar e quantificar os ácidos graxos das sementes, através de cromatografia gasosa;

Avaliar o conteúdo de fenólicos totais nos extratos e frações de ácidos fenólicos da polpa e semente da romã;

Avaliar a atividade antioxidante em extratos e frações de ácidos fenólicos presentes na polpa e sementes da romã, utilizando ensaios em meio emulsionado e em meio lipídico e avaliar a cinética da atividade antioxidante para os extratos e frações de ácidos fenólicos da romã.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material:

As romãs foram adquiridas no CEAGESP (Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo), na cidade de São Paulo, no mês de janeiro, sendo as frutas provenientes da cidade de Petrolina (PE).

As romãs foram lavadas e abertas à temperatura ambiente. A parte interna foi retirada e colocada sobre uma peneira plástica de uso comum, posicionada acima de um becker de 500 mL, envolto em papel alumínio evitar danos causados pela luz. A seguir, com auxílio de um pistilo, este material foi friccionado contra a peneira, para separar a mucilagem das sementes. O suco, proveniente da mucilagem, foi coletado no becker e as sementes que ficaram na peneira, coletadas em um Graal. O material obtido está apresentado na figura 7.

FIGURA 7: amostras obtidas da romã: (A) sementes, separadas da mucilagem que as recobrem e (B) suco obtido da mucilagem.

4.1.1 Polpa

A polpa, coletada na forma de suco, foi imediatamente acondicionada em pequenos frascos de vidro, seguidamente cobertos com plástico tipo Parafilm "M"[®] (American company – E.U.A.), onde foram abertos pequenos furos, como procedimento de preparo da amostra para liofilização (liofilizador Edwards[®], modelo EC- Super Modulyo (Crawley- UK)). Depois de liofilizado, o material foi mantido em frascos protegidos da luz, estocados em freezer à temperatura de -18 °C.

4.1.2 Sementes:

As sementes, após a separação, foram trituradas com auxílio de um moinho analítico e padronizadas, em tamis de malha *mesh* 32. O material foi, então, acondicionado em pequenas bandejas de alumínio, cobertas com filme plástico onde foram abertos pequenos furos, como procedimento de preparo da amostra para liofilização (liofilizador Edwards[®], modelo EC- Super Modulyo (Crawley- UK)). Depois de liofilizado, o material foi coletado em frascos protegidos da luz e mantidos em freezer à temperatura de – 18 °C.

4.1.3 Reagentes e solventes

Os solventes de grau analítico utilizados foram: acetato de etila, acetona, ácido bórico, ácido sulfúrico, ácido clorídrico, álcool etílico, álcool metílico, clorofórmio, éter etílico, éter de petróleo, hexano e tetrahidrofurano da Synth[®]. O hexano utilizado para a cromatografia gasosa (grau ultrapuro) foi da Merck[®].

Os reagentes utilizados, da marca Sigma® foram: ácido linoléico (99% de pureza), β- caroteno (95% de pureza), os antioxidantes sintéticos butil- hidróxi- anisol (BHA) e butil- hidróxi- tolueno (BHT), o padrão interno para cromatografia gasosa metil éster de ácido heptadecanoato (C 17:0), a mistura de padrões de metil- ésteres (C 4 :0 a C 24:0) para cromatografia gasosa, o padrão catequina (98% de pureza) e a sílica gel 60G e o Tween 40. O reagente de Folin- Ciocalteau foi da marca Merck®.

O óleo de soja puro sem adição de antioxidantes foi doado pela empresa Cargil Agrícola S/A (unidade Mairinque – SP).

4.2 Métodos:

4.2.1 Composição centesimal:

4.2.1.1 Conteúdo de umidade:

O conteúdo de umidade foi realizado de acordo com o método descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

Polpa: foi tomada uma alíquota de 100 mL do suco obtido da polpa (medida em proveta), e pesada, antes da etapa de liofilização. A amostra foi novamente pesada, já liofilizada, e a porcentagem de umidade obtida através da fórmula:

$$\% \text{ umidade} = \frac{(P_i - P_f) \times 100}{P_i}$$

onde: P_i = peso inicial (em gramas) da amostra;

P_f = peso final (g) da amostra.

Os resultados foram expressos em g/100 g de amostra

Semente: foram pesados 100 g das sementes moídas, antes da etapa de liofilização. A amostra foi novamente pesada após a liofilização, e a porcentagem de umidade obtida através da fórmula:

$$\% \text{ umidade} = \frac{(P_i - P_f) \times 100}{P_i}$$

O resultado foi expresso em g/100 g de amostra.

4.2.1.2 Conteúdo de lípides:

O conteúdo de lípides totais, para a polpa e semente da romã foi determinado pelo método de Soxhlet, seguindo o procedimento descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

Foram pesados 5,0 g de ambas amostras liofilizadas, e colocadas em cartuchos de papel filtro, sendo estes acondicionados em tubos extratores, que foram cobertos até a altura dos cartuchos com o solvente éter de petróleo.

Os balões utilizados foram previamente limpos e tarados (105 °C/1 hora). A etapa de extração foi realizada durante 6 horas. Após a extração, os balões foram colocados em estufa a 105 °C, para completa secagem do solvente e após, mantidos em dissecador, até atingirem temperatura ambiente. Os balões foram pesados e o resultado obtida pela fórmula:

$$\frac{N \times 100}{P. \text{ am.}}$$

onde: N = diferença entre o peso da amostra e o conteúdo do resíduo presente no balão

(em g.);

P am. = peso da amostra (g.).

O resultado foi expresso em g/100 g de amostra (em base úmida).

4.2.1.3 Conteúdo de proteína total:

O conteúdo de proteínas foi determinado utilizando-se o método microkjeldahl, empregando-se o procedimento descrito pela AOAC (1995). Foram pesados 100 mg da polpa e 100 mg de sementes da romã, liofilizadas. Após serem submetidas à digestão com ácido sulfúrico, as amostras foram coletadas em erlenmeyers contendo ácido bórico e tituladas com ácido clorídrico 0,02 N, sendo determinada a quantidade de nitrogênio presente na amostra, através da fórmula:

$$\% \text{ N} = \frac{(\text{V. HCl am.} - \text{V. médio HCl branco}) \times \text{N HCl} \times 14,007 \times 100}{\text{mg de amostra}}$$

Onde: V. HCl am. = volume gasto, em mL, de HCl na titulação da amostra;

V. médio HCl branco = média dos volumes gastos, em mL, de HCl na titulação dos brancos;

N HCl = normalidade da solução de HCl;

O resultado obtido da porcentagem de nitrogênio foi multiplicado pelo fator de conversão 6,25, sendo determinada a quantidade de proteína bruta. O resultado foi expresso em mg/100 g de amostra (base úmida).

4.2.1.4 Conteúdo de resíduo mineral:

O resíduo mineral foi obtido pelo método de incineração, como descrito nas normas do Instituto Adolfo Lutz (Instituto Adolfo Lutz, 1985). As amostras liofilizadas (5,0 g de amostra) foram pesadas em cápsulas de porcelana previamente limpas e taradas (105 °C/ 1 hora) e colocadas em mufla (550 °C) até incineração total. As cápsulas foram colocadas em dessecador para atingirem temperatura ambiente e pesadas, sendo a porcentagem de cinzas calculada seguindo a fórmula:

$$\% \text{ cinzas} = \frac{N \times 100}{P}$$

O resultado foi expresso em mg/100 g de amostra (base úmida)

4.2.1.5 Conteúdo de carboidratos:

O conteúdo de carboidratos foi obtido por diferença, ou seja, efetuou-se a somatória dos resultados obtidos para umidade, lipídeos, proteínas e cinzas, e este valor foi subtraído do valor 100, que se refere ao conteúdo integral (100%) das amostras.

O resultado foi expresso em g/ 100 g de amostra.

4.2.2 Obtenção da fração lipídica das sementes da romã

A obtenção da fração lipídica das sementes da romã foi feita através do método descrito por FOLCH, LEES e STANLEY, 1957.

Foi pesado 1 g de sementes liofilizadas da romã, aos quais foram adicionados 10 mL de metanol, homogeneizando (homogenizador Marconi[®], modelo MA 102 (Piracicaba – BR)) por 10 minutos. Em seguida foram adicionados 20 mL de clorofórmio, sendo homogenizados durante 2 minutos, sendo a seguir o sobrenadante filtrado em funil de Büchner, e o resíduo novamente homogenizado com 30 mL de uma mistura de clorofórmio e metanol (2:1), sendo novamente filtrado. O filtrado foi coletado em uma proveta de 250 mL, com tampa, e em seguida foi adicionada solução de KCl 0,88 %, sendo o volume correspondente a $\frac{1}{4}$ do volume original do material filtrado. A mistura foi suavemente agitada e deixada em repouso, para separação das fases. A fase superior foi desprezada e a fase inferior foi filtrada em sulfato de sódio anidro, e coletada em um balão. O material foi submetido a evaporação total em rotaevaporador (Micronal[®], modelo B525) à temperatura de 40 °C. A fração lipídica foi ressuspensa em 5 mL de clorofórmio, sendo coletada em frasco âmbar e armazenada em freezer (-18 °C).

4.2.3 Preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos

A identificação do perfil de ácidos graxos presentes nas sementes da romã, utilizando-se a cromatografia gasosa, a fração lipídica (item 4.2.2.) foi submetida a esterificação dos ácidos graxos presentes na amostra, seguindo-se o método de HARTMAN e LAGO (1973).

Em tubo de esterificação, foi colocada uma alíquota de 1 mL da fração lipídica obtida (referente a 50 mg de conteúdo lipídico), e o solvente foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio. Em seguida, foram adicionados 4 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5N metanólico, e o tubo foi submetido a banho fervente (aprox.

97 °C) durante 5 minutos. Após atingir temperatura ambiente, foram adicionados 6 mL de mistura para esterificação e novamente o tubo foi colocado em banho fervente, durante 3 minutos. Os tubos foram retirados do banho e, em temperatura ambiente, foram adicionados 5 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl) saturado e o tubo foi agitado. Os metil ésteres formados, na parte superior das duas fases formadas, foram coletados e transferidos a outro tubo, sendo adicionados 2 mL de hexano material (3 extrações), onde as partes superiores de cada extração foram transferidas a outro tubo, sendo a seguir adicionados 5 mL de solução saturada de NaCl. As fases superiores foram transferidas para outro tubo, sendo após o material coletado em balão de fundo redondo e submetido à eliminação do solvente em rotaevaporador (Micronal®, modelo B525) a 40 °C, sendo o conteúdo ressuspensão em 1 mL de hexano.

4.2.4 Análise do perfil de ácidos graxos da semente de romã por cromatografia gasosa

A identificação dos ácidos graxos presentes na fração lipídica das sementes da romã foi realizada em cromatógrafo a gás (*Shimadzu*® GC, modelo 17A (Kyoto - Japan), com detector de ionização de chama, conectado a um integrador (*Shimadzu*®, modelo CBM 101). Os parâmetros foram controlados através do software *Workstation Class GC 10*. A identificação dos ácidos graxos foi realizada com base na área cromatográfica do padrão interno metil éster de ácido heptadecanoato (C17:0), e comparados aos tempos de retenção relativos à mistura de padrões de metil-ésteres C 4:0 a C 24:0.

As condições cromatográficas foram as seguintes:

Coluna cromatográfica de sílica fundida *Supelcowax 10*, de 30 metros de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno;

Programação da temperatura:

- Coluna: aquecimento a 1 °C/min. de 170 °C até 225 °C, permanecendo nesta temperatura por 10 minutos;

- Vaporizador: 250 °C;
 - Detector: 270 °C
- Gás de arraste: Hélio (1mL/min.);

Quantidade de amostra injetada: 1µL;

Razão de divisão: 1:50.

4.2.5 Obtenção dos extratos e frações de ácidos fenólicos

4.2.5.1 Extratos da polpa e sementes da romã

Os extratos da polpa e sementes da romã foram obtidos pelo método de extração seqüencial, onde os compostos das amostras foram extraídos através de solventes de diferentes polaridades, iniciando-se do solvente de menor, para o de maior polaridade.

Foram pesados, inicialmente, 5 gramas das amostras, às quais foram adicionadas 100 mL de solvente, seguindo-se uma proporção de 1:20 (amostra : solvente). Os solventes empregados seqüencialmente foram, em ordem crescente de polaridade: éter etílico, álcool etílico e água destilada. Para a polpa, a extração foi iniciada utilizando-se o álcool etílico e, para as sementes, o solvente inicialmente empregado foi o éter etílico. A polpa e as sementes pesadas foram colocadas em erlenmeyers de 250 mL, os quais foram mantidos sob agitação durante 1 hora. Após este tempo, os materiais obtidos foram filtrados em funis de Büchner, utilizando-se bomba a vácuo. Os sobrenadantes foram centrifugados (Sorval Instruments Du Pont®, modelo RC5C) a 10000 rpm/ 15 minutos, a temperatura máxima de 20 °C (exceto o extrato etéreo, filtrado em papel de filtro). Os resíduos foram coletados, pesados e submetidos a nova extração, com o solvente subsequente, respeitando-se sempre a proporção inicial. Esta seqüência foi seguida até a extração com o último solvente, água destilada.

FIGURA 8: Esquema da extração seqüencial, para obtenção de extratos etéreo, alcoólico e aquoso.

4.2.5.2 Obtenção de frações fenólicas da polpa e semente da romã

Devido a grande variedade de compostos fenólicos que podem ser encontrados nas frutas e à forma que o composto pode estar presente (livre ou esterificada), o isolamento dos compostos fenólicos compreendem procedimentos mais complexos, com solventes ou mistura de solventes, filtração, necessidade de hidrólise e concentração de fases (TURA e ROBARDS, 2002).

A obtenção de frações de compostos fenólicos presentes na polpa e nas sementes liofilizadas da romã foi realizada pelo método descrito originalmente em trabalho de KRYGIER, SOSULSKI e HOGGE (1982), com adaptações descritas em MOREIRA e MANCINI- FILHO (2003).

4.2.5.2.1 Fração de fenólicos livres (FL)

Foi pesado 1g.de cada amostra, seca e desengordurada, em tubos de vidro. As amostras foram extraídas por exaustão (homogenizador Marconi[®], modelo MA 102 (Piracicaba – BR)), sendo realizadas 6 extrações, sendo que para cada extração, foram empregados 20mL de tetrahidrofurano (THF) durante 1 minuto. A cada extração, o sobrenadante foi filtrado em sulfato de sódio anidro e coletado em balão (protegido da luz). Ao final da última extração, os filtrados foram concentrados totalmente em rotaevaporador (Micronal[®], modelo B525) a 40 °C e a seguir a fração obtida de cada amostra foi ressuspensa em 10mL de THF, sendo transferidas para 2 frascos de vidro âmbar e mantidas em freezer (-18 °C).

4.2.5.2.2 Fração de fenólicos esterificados a compostos solúveis (FES)

Os resíduos provenientes da última extração da fase de obtenção da fração fenólica livre foram submetidos a 6 extrações, utilizando 20 mL metanol/ acetona/ água (7:7:6) durante 5 minutos, em homogenizador. A cada extração, os sobrenadantes foram coletados em balões (protegido da luz). Ao final da última extração, os conteúdos foram concentrados a vácuo (40 °C) até a fase aquosa. Os volumes dos balões foram medidos e acrescentados iguais volumes de hidróxido de sódio (NaOH) 4N, sendo transferidos para dois erlenmeyers distintos e submetidos a hidrólise alcalina (4 horas, sob agitação e atmosfera de nitrogênio). Após transcorrido o tempo total, foram corrigidos os pHs para 2,0 (utilizando-se ácido clorídrico 6N) e a seguir os conteúdos foram transferidos para 2 balões de separação, onde foram realizadas, para cada amostra, 6 extrações com 30 mL de

solvente hexano, procedendo-se da seguinte forma: as partes inferiores da mistura foram coletadas em beckers (para nova extração) e as partes superiores foram desprezadas. Após a última extração, os volumes foram medidos e transferidos para outros dois balões de separação, sendo acrescentados éter etílico/ acetato de etila/ THF (1:1:1), em volumes iguais aos medidos, executando-se as extrações da seguinte forma: as partes inferiores foram coletadas em beckers (para serem novamente extraídas, perfazendo um total de seis extrações) e as partes superiores coletadas em 2 balões protegidos da luz. Os materiais foram concentrados totalmente em rotaevaporador (Micronal[®], modelo B525) 40 °C e a seguir foram ressuspensos em 10 mL de THF. As frações obtidas de cada amostra foram transferidas para 2 frascos de vidro âmbar e mantidas em freezer (-18 °C).

4.2.5.2.3 Fração de fenólicos esterificados a compostos insolúveis (FEI)

Ao resíduo obtido da extração de ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis das sementes, foram acrescentados 20mL de NaOH 4N. O material foi então transferido para um erlenmeyer e, a seguir, foi realizada hidrólise alcalina, sob as mesmas condições descritas para a extração da fase anterior. Desta fase em diante, o procedimento seguido foi igual ao realizado para a obtenção da fração de ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis.

A figura 9 mostra o esquema para extração das frações de ácidos fenólicos.

FIGURA 9: Esquema para obtenção de frações fenólicas.

4.2.6 Conteúdo de compostos fenólicos totais

Para a quantificação estimada de compostos com capacidade redutora, dentre os quais, os compostos fenólicos, presentes em todos os extratos e frações da polpa e semente liofilizadas da romã, foi empregado o método espectrofotométrico, utilizando o reagente de Folin- Ciocalteu, descrito em SINGLETON, ORTHOFER e LAMUELA- RAVENTÓS (1999). Este método é baseado na capacidade redutora do reagente, que ao entrar em contato com compostos que contenham grupos capazes de serem oxidados (por exemplo, as hidroxilas), é realizada a reação, caracterizada por uma coloração azul (proveniente do complexo azul de molibdênio), que será mais intensa quanto maior o número de hidroxilas presentes.

Solução padrão de catequina:

Como padrão comparativo para as análises e construção da curva padrão para os cálculos, foi utilizada a catequina (grau de pureza = 98%, Sigma[®]), na concentração de 1mg/mL, em solução hidroalcoólica 80%.

Procedimento do ensaio:

Em tubos de ensaio, foram colocadas alíquotas das concentrações desejadas, das soluções padrão de catequina (de 10 a 50 µg/mL) e das amostras (descritas na tabela 1), completando-se o volume em cada tubo, para o volume total de 0,5 mL. Para o preparo do "branco" analítico, foi utilizado 0,5 mL do respectivo solvente de cada extrato e água, no caso das frações.

TABELA 1 : Concentrações empregadas, em $\mu\text{g/mL}$ para cada extrato ou fração, empregadas no ensaio de conteúdo de fenólicos totais

AMOSTRA	$\mu\text{g/ mL}$
Extrato alcoólico da polpa	1000 a 5000
Extrato aquoso da polpa	1000 a 5000
Extrato etéreo da semente	500 a 2500
Extrato alcoólico da semente	1000 a 5000
Extrato aquoso da semente	500 a 2500
Fração de ácidos fenólicos livres da polpa	100 a 300
Fração de ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis da polpa	100 a 300
Fração de ácidos fenólicos livres da semente	200 a 400
Fração de ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis da semente	350 a 550
Fração de ácidos fenólicos esterificados a compostos insolúveis da semente	300 a 500

A seguir, foram adicionados em todos os tubos, na sequência descrita, os seguintes reagentes:

0,5 mL de metanol;

7,0 mL de água;

0,5 mL de reagente Folin- Ciocalteau (esperar 3 minutos);

1,0 mL de solução saturada de carbonato de sódio.

Os tubos foram deixados em repouso durante 1 hora, apresentando ao final coloração azul. Após este período, foram realizadas as leituras, em espectrofotômetro, a 725 nm (Thermo Spectronic®, modelo Genesys 20 (Rochester- USA)).

As leituras da solução padrão de catequina foram empregadas na execução da curva- padrão. Os cálculos para obtenção do conteúdo de compostos redutores totais nas amostras foram realizados empregando- se as seguintes fórmulas:

$$K = A (\text{padrão}) / C (\text{padrão}) ,$$

Onde: K = constante da curva- padrão;

A = absorbância;

C = concentração.

$$C (\text{amostra}) = A (\text{amostra}) / K (\text{padrão}),$$

Onde: C= concentração da amostra;

A= absorbância

K= constante da curva- padrão.

Os resultados foram expressos em μg equivalente de catequina/mL.

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

A identificação primária de compostos fenólicos e, dentre estes, os possuidores de capacidade antioxidante presentes nos extratos e frações da polpa e semente liofilizadas da romã foi realizada através de cromatografia de camada delgada (CCD), baseada na técnica descrita por DUVE e WHITE (1991).

A separação dos compostos fenólicos por CCD é um método simples, que permite a separação dos compostos fenólicos onde, de acordo com a estrutura do composto e afinidade deste com as fases móvel e estacionária, são separadas em bandas (DUVE e WHITE, 1991).

Preparo das placas de sílica

As placas de sílica foram feitas sobre placas de vidro (20 x 20 cm), e foram recobertas com sílica gel 60G (Merck®), com 0,25 mm de espessura. As placas foram, no instante de uso, ativadas a 100 °C durante 15 minutos. Para a aplicação das amostras, a placa foi dividida em três partes, onde nas duas primeiras divisões, foram aplicados 200 µL de amostra, na forma de ponto e, na terceira divisão, foram aplicados 500 µL na forma de traço.

Separação e identificação

Para a separação, foi utilizada a fase móvel constituída pela mistura de solventes clorofórmio/ ácido acético/ água (98:2:2). A identificação foi realizada, utilizando-se dois agentes reveladores:

- Agente revelador 1: 9 mg de β- caroteno dissolvidos em 30 mL de clorofórmio + 40mg de ácido linoléico dissolvidos em 60 mL de etanol.
- Agente revelador 2: solução aquosa 1% de ferricianeto de potássio + solução aquosa 1% de cloreto férrico.

Após o tratamento, as bandas reveladas foram medidas, para o posterior cálculo do fator de retenção (Rf), segundo a fórmula:

$$R_f = \frac{\text{distância da banda revelada}}{\text{comprimento total da corrida}}$$

Onde: a distância da banda revelada é a distância (em centímetros) entre a banda e seu ponto de aplicação;

o comprimento total da corrida: é a distância (em centímetros) percorrida pela fase móvel até o final da placa.

Os resultados da leitura das bandas foram expressos em Rf.

4.2.8 Avaliação da Atividade Antioxidante

4.2.8.1 Ensaio cooxidação β - caroteno e ácido linoléico

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada em meio emulsionado, através da técnica de cooxidação de substratos, segundo MARCO (1968) e modificada por MILLER (1971). O método é colorimétrico, realizado em comprimento de onda de 470nm, e 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 radicalares formadas pela oxidação do ácido linoléico, e 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).

O antioxidante sintético utilizado, como padrão positivo para comparação, foi o butil- hidróxido tolueno (BHT).

Preparo da emulsão

Em um erlenmeyer de 250 mL, foram adicionados 20 μ L de uma solução de β - caroteno (20mg/mL em clorofórmio), 40 μ L de ácido linoléico e 20 mg de Tween® 40. A esta mistura foram adicionados 2 mL de clorofórmio, sendo o material homogenizado e o solvente evaporado com nitrogênio. Ao erlenmeyer foram adicionados 150 mL de água destilada (previamente submetida a tratamento com atmosfera de oxigênio, durante 30 minutos). A emulsão apresentou-se límpida e sua absorbância foi ajustada entre 0,7 a 0,6.

Procedimento do ensaio

Tubos de ensaio apropriados para leitura em espectrofotômetro foram separados e divididos nos seguintes grupos:

- branco;
- antioxidante sintético (BHT);
- amostra (extratos e frações);
- associados: BHT e amostra, em volumes iguais.

As amostras foram testadas nos volumes de 50, 100 e 200 μL , para testes com o antioxidante sintético ou amostra isolados. Para a associação, os volumes de BHT e amostra utilizados foram: 25 + 25 μL , 50 + 50 μL e 100 + 100 μL . Para cada volume, de cada grupo testado (inclusive, o branco) foram utilizados três tubos. Após, foram adicionados a todos os tubos 5 mL da emulsão preparada. Em seguida, os tubos foram lacrados com filme plástico (Parafilm®) e agitados. A primeira leitura foi realizada, sendo os tubos em seguida colocados em banho de água a 50 °C e as leituras realizadas a cada 15 minutos (aparelho Thermo Spectronic®, modelo Genesys 20 (Rochester- USA)), perfazendo o tempo total de duas horas.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da oxidação, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição da oxidação} = 100 - \frac{(a - a') \times 100}{(b - b')}$$

Onde: a= resultado da leitura no tempo zero, da amostra a ser calculada;

a' = resultado da leitura no tempo de 120 minutos, da respectiva amostra;

b = resultado da leitura no tempo zero, do respectivo "branco";

b' = resultado da leitura no tempo de 120 minutos, do respectivo "branco".

% de inibição da oxidação = 100 – resultado da % de oxidação

4.2.8.2. Estudo cinético da atividade antioxidante do ensaio de cooxidação β - caroteno e ácido linoléico

Para a estimativa da eficiência da atividade antioxidante dos extratos e das frações fenólicas da polpa e semente da romã, empregou-se o método baseado no cálculo das tangentes, em dois momentos das curvas cinéticas de decaimento, obtidas da leitura espectrofotométrica no ensaio de cooxidação de substratos (β -caroteno e ácido linoléico). O método original foi descrito por YANISHILIEVA e MARINOVA (1995), com algumas adaptações descritas em MOREIRA (1999).

A análise da cinética da curva de um composto pode revelar duas características da amostra analisada: a efetividade, que representa a possibilidade da amostra em bloquear o processo da cadeia radicalar, tendo maior ação através de mecanismos de antioxidação primários (reação 1 da figura 7). O cálculo foi realizado pela divisão das tangentes das curvas cinéticas, nos tempos de 15 a 45 minutos, através da fórmula:

$$F1 = \frac{\text{tg amostra}}{\text{tg branco}}$$

Onde o cálculo da tangente é realizado da seguinte forma:

$$\frac{(\text{absorbância no tempo 45} - \text{absorbância no tempo 15})}{(45-15)}$$

Já o fator calculado F2 expressa a possibilidade da amostra em participar reações em uma etapa mais adiantada do processo da reação de oxidação, como a decomposição de peróxidos e estabilização de compostos formados (reações 2 a 6, na figura 10). O cálculo foi realizado pela divisão das tangentes das curvas cinéticas, nos tempos de 75 a 105 minutos, através da fórmula:

$$F2 = \frac{\text{tg amostra}}{\text{tg branco}}$$

Onde o cálculo da tangente é realizado da seguinte forma:

$$\frac{(\text{absorbância no tempo 105} - \text{absorbância no tempo 75})}{(105 - 75)}$$

A determinação de F1 e F2 é realizada em dois momentos distintos da curva cinética da atividade antioxidante, permitindo avaliar a interação do antioxidante no processo de inibição da oxidação. Assim, os valores de F1, medidos no intervalo de tempo compreendido entre 15 a 45 minutos, permitem uma avaliação da amostra quanto a capacidade em doar átomos de hidrogênio, estabilizando os radicais livres e prolongando assim o período de indução da oxidação. Quanto menores os valores de F1, mais eficientes são os compostos presentes na amostra em retardar ou inibir o processo oxidativo. Os valores de F2 são medidos no intervalo de tempo compreendido entre 75 e 105 minutos e estão mais relacionados a mecanismos de ação secundários, como a capacidade dos compostos presentes na amostra reagirem com compostos formados no processo mais adiantado da oxidação, como os peróxidos, e também à estabilização dos

produtos formados ao longo do processo de oxidação. Os valores tendem a ser maiores que os exibidos em F1, porém para um desempenho ser considerado

satisfatório, os valores não devem ultrapassar o valor de 1,0. Valores maiores que 1,0 indicam que os compostos presentes na amostra não são eficientes ao longo do processo de oxidação (YANISHILIEVA e MARINOVA, 1995).

FIGURA 10: Reações decorrentes do processo oxidativo, onde L = lipídeo, A = antioxidante, O = oxigênio e H = hidrogênio (YANISHILIEVA e MARINOVA, 1995).

FIGURA 11: modelo para obtenção das tangentes para cálculo dos fatores cinéticos (MOREIRA, 2003).

4.2.8.3 Ensaio em meio lipídico (Rancimat[®])

A avaliação da capacidade de inibição da oxidação em meio lipídico, para os extratos e frações fenólicas da polpa e semente da romã, foi empregado o teste RANCIMAT, descrito em GARCÍA DE SOTERO e MANCINI- FILHO (2002). O método avalia o tempo que o óleo leva para oxidar-se, denominado período de indução. Para tanto, o óleo é submetido a condições oxidantes como injeção de oxigênio e alta temperatura, formando os compostos da reação de oxidação. Os compostos voláteis são coletados em água ultrapura, onde são mensurados através de um sensor, sendo então estabelecido o período de indução.

O aparelho utilizado foi o Rancimat[®] modelo 743 (marca Metrohm[®] - (Herisau - Suíça)), ligado ao programa PC: 743 Rancimat 1.0. Os parâmetros utilizados no teste foram:

- Fluxo de oxigênio: 20L/h;
- Temperatura: 110^o C.

Para as análises, foi utilizado como substrato oxidativo, óleo de soja sem adição de qualquer antioxidante (Cargill Agrícola S/A). Além dos extratos e frações fenólicas testadas, foi empregado como padrão positivo de comparação o antioxidante sintético butil- hidróxi- anisol (BHA) (Sigma®), e o óleo sem adição de antioxidante, como padrão negativo de comparação. Os antioxidantes foram empregados nas concentrações de 100 e 200 ppm, equivalentes ao peso de óleo empregados na análise (5,0g).

As amostras e o BHA foram colocadas nos tubos próprios do equipamento, sendo em seguida adicionados os 5,0g do óleo. Os tubos foram homogenizados, utilizando sonicador (USC®, modelo 750), durante 15 minutos. Os frascos coletores foram cheios com 60mL água ultrapura. Após o tempo de homogenização, os frascos contendo o óleo e amostras, e os frascos coletores foram levados ao aparelho, para realização da leitura.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da oxidação, através da fórmula:

$$\% \text{ I.O.} = 100 - \frac{(\text{P.I. amostra}) \times 100}{(\text{P.I. branco})}$$

Onde: P.I. amostra = período de indução (em horas) relativo à amostra;

P.I. branco = período de indução (em horas) relativo ao branco
(óleo sem adição de antioxidantes).

4.2.9. Avaliação estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata, sendo os resultados expressos em média e mais ou menos o desvio- padrão (média $\pm$ desvio padrão). O programa utilizado para a execução da análise estatística foi o software *SigmaStat*, versão 1.0. A análise de variância foi feita pelo teste ANOVA, e

comparação entre as médias dos resultados foi realizada pelo método Student-Newman-Keuls, onde foi fixado o nível de significância de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Composição centesimal

TABELA 2: Composição centesimal da polpa e sementes liofilizadas da romã

	POLPA (%)	SEMENTE (%)
Umidade	64,09 ± 1,16	38,30 ± 0,44
Lípides	0,24 ± 0,00	14,06 ± 0,16
Proteína	1,28 ± 0,02	2,81 ± 0,08
Cinza	2,09 ± 0,07	0,86 ± 0,01
NIFEXT	32,30	43,97

n= 3

média ± desvio padrão

p < 0,05

Resultados expressos em base úmida

Pode-se notar que a polpa apresentou alto teor de umidade (64,09%), seguida pelo valor de carboidratos (32,30%). Já as sementes apresentaram o teor de umidade menor (38,30%) e os valores de carboidrato (43,97%) e proteína (2,81%) maiores em relação a polpa. Enquanto a polpa apresentou valor desprezível de lípides, a semente apresentou 14,06% de conteúdo lipídico.

Não foram encontrados na literatura qualquer relatos científicos ou tabelas oficiais sobre a composição centesimal da polpa e semente da romã. Desta forma que não foi possível apresentar uma comparação com outros resultados.

5.2 Perfil lipídico

Como pode ser observado na tabela 2 do item 5.1., a semente da romã contém razoável quantidade de lípides. Este fato levou-nos a realizar a identificação do perfil de ácidos graxos presentes no óleo da semente, que são mostrados na tabela 3.

TABELA 3: Composição de ácidos graxos presentes no óleo da semente liofilizada da romã, expressos em porcentagem de ácido graxo

ácido graxo	%
ácido palmítico (16:0)	4,07 ± 0,34
ácido esteárico (18:0)	2,30 ± 0,21
ácido oléico (18:1)	5,29 ± 0,25
ácido linoléico (18:2)	6,05 ± 0,53
ácido púncico (18:3)	58,14 ± 2,10
ácido araquídico (20:0)	0,50 ± 0,04
ácido eicosaenóico (20:1)	0,61 ± 0,05
Σ ácidos graxos saturados	6,87
Σ ácidos graxos insaturados	70,09
ácidos graxos não identificados	23,05
total	100
n=3	
média ± desvio padrão	
p< 0,05	

O óleo da semente da romã apresenta grande quantidade de ácidos graxos insaturados, onde se pode notar que o ácido punicico está presente em maior quantidade, na composição total do óleo da semente (58,14%). Os ácidos linoléico e oléico são os ácidos graxos presentes em segunda e terceira maior quantidade, 6,05 e 5,29%, respectivamente.

O óleo da semente da romã apresentou grande quantidade de ácidos graxos insaturados, onde se pode notar que o ácido punicico esteve presente em maior quantidade na composição total do óleo da semente (58,14%). Os ácidos linoléico e oléico foram os ácidos graxos presentes em segunda e terceira maior quantidade – 6,05% e 5,29% - respectivamente.

A elevada concentração de ácidos graxos insaturados (70,09%) encontrada no óleo da semente liofilizada da romã foi condizente com trabalhos anteriores. Estudos realizados em diferentes países produtores da fruta mostraram o interesse em saber se havia diferença entre a composição dos ácidos graxos do óleo da romã devido a uma característica do solo ou clima da região. Um dos primeiros relatos da composição lipídica da semente da romã foi apresentado em 1983 por El- Shaarawy e Nahapetian, com romãs provenientes do Egito, como citado no trabalho de FADAVI, BARZEGAR e AZIZI (2004), onde também foi avaliada a composição lipídica do óleo da semente da romã utilizando frutas produzidas no Irã. A pesquisa realizada em nosso trabalho apresentou resultados bastante próximos com os dos autores citados, sendo que os ácidos graxos insaturados presentes em maior quantidade foram os ácidos punicico (70% contra 58,14% de nosso trabalho), linoléico (10% contra 6,05% de nosso trabalho) e cerca de 8% de ácidos graxos saturados (6,87% encontrados em nosso trabalho).

Os trabalhos de MELGAREJO *et al.* (1995) e MELGAREJO e ARTÉS (2000) foram realizados com sementes de romãs cultivadas na Espanha, sendo o segundo trabalho realizado com diferentes clones da fruta. Nos dois trabalhos, não foram notadas diferenças significativas na composição de ácidos graxos, apenas foi

verificada uma variação não significativa entre os clones na quantidade de ácidos graxos. O ácido graxo punícico foi encontrado em quantidades bastante elevadas (acima de 60%) em todas as amostras.

5.3 Conteúdo de compostos fenólicos totais

A análise dos compostos fenólicos dos extratos e frações obtidos da polpa e da semente liofilizadas da romã foi realizada através da avaliação dos fenólicos totais, como descrita no item 4.2.6, empregando-se o reagente Folin- Ciocalteau. Os resultados obtidos estão expressos na tabela 4.

TABELA 4: Conteúdo de fenólicos totais, obtidos para os extratos da polpa e semente da romã, expressos em μg equivalente de catequina/mL de extrato

Extrato	μg equivalente de catequina/mL de extrato
Alcoólico da polpa	$30,96 \pm 4,50$
Aquoso da polpa	$432,55 \pm 2,56$
Etéreo da semente	$10,19 \pm 0,43$
Alcoólico da semente	$72,36 \pm 6,97$
Aquoso da semente	$351,35 \pm 14,72$

n = 3
média $\pm$ desvio padrão
p < 0,05

Pela tabela 4 pode-se observar que houve uma diferença significativa nos valores encontrados na análise de compostos fenólicos comparando-se todos os extratos entre si. O extrato aquoso da polpa foi o que apresentou maior conteúdo de compostos fenólicos ($432,55 \mu\text{g}$ equivalente de catequina/mL de extrato).

Ainda observando a tabela 4, quando comparados os conteúdos de compostos fenólicos entre amostras de polpa e semente utilizando-se os mesmos solventes extratores, foi também encontrada diferença significativa, sendo maior entre os extratos alcoólicos (conteúdo de fenólicos maior para a semente – 72,36 µg eq. cat/mL- em relação a semente – 30,96 µg eq. cat./mL) e entre os extratos aquosos (conteúdo de fenólicos maior para a polpa – 432,55 µg eq. cat./mL- em relação a semente – 351,35 µg eq. cat. /mL).

GIL *et al.* (2000) avaliaram o conteúdo de fenólicos totais para os sucos obtidos por extração manual (polpa interna) e comercialmente (fruto completo prensado mecanicamente) da romã. Os resultados foram de 2117 mg de fenólicos/L de suco obtido manualmente e 2566mg de fenólicos/L de suco obtido comercialmente. A diferença foi atribuída ao maior conteúdo de taninos galágicos no suco comercial, sendo que este grupo de fenólicos apresenta 16 grupos hidroxilas presos às estruturas dos anéis, e este composto é proveniente do albedo e da casca, mostrando que o processo de extração tem influência sobre a composição do produto.

A avaliação dos compostos fenólicos (tabela 4) demonstrou índices inferiores aos apresentados por outros autores. No entanto existem variações, pois em amostras de compostos de origem vegetal, e em especial as frutas, estão presentes outros compostos que podem interferir no resultado final, como a vitamina C, açúcares redutores e outros. Fatores da fruta como grau de maturação, diferença de composição entre espécies podem afetar os resultados. Estes fatos levam à discordância quanto a relação direta de conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante (SINGLETON, ORTHOFER e LAMUELA-RAVENTÓS, 1999; MOURE *et al.*, 2001)

O conteúdo de compostos fenólicos nas frações de ácidos fenólicos da polpa e sementes da romã estão apresentados na tabela 5.

TABELA 5 : Conteúdo de fenólicos totais, obtidos para as frações fenólicas da polpa e semente da romã, expressos em μg equivalente de catequina/mL de fração de ácidos fenólicos

Fração de ácidos fenólicos	μg equivalente de catequina/mL
Livres da polpa	573,24 $\pm$ 34,82
Esterificados a compostos solúveis da polpa	499,43 $\pm$ 28,24
Livres da semente	510,06 $\pm$ 33,59
Esterificados a compostos solúveis da semente	1090,81 $\pm$ 141,08
Esterificados a compostos insolúveis da semente	218,28 $\pm$ 13,72

n = 3

média $\pm$ desvio padrão

p < 0,05

Pode-se verificar a expressiva quantidade de compostos fenólicos obtidos para todas as frações de ácidos fenólicos da polpa e semente da romã, expressos na tabela 5. A fração de ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis da semente apresentou conteúdo de compostos fenólicos significativamente maior em relação às demais frações (1090,81 μg eq. cat./mL). A polpa apresentou valores menores de conteúdo de fenólicos (499,43 μg eq. cat./mL) para a mesma fração de ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis.

Não foi notada diferença significativa entre as frações de ácidos fenólicos livres para a polpa (573,24 μg eq.cat./mL) e semente (510 μg eq.cat./mL).

No decorrer desta pesquisa não foi encontrado quaisquer trabalhos em que se tenha realizado o fracionamento dos compostos fenólicos da romã como o aqui realizado. Não foi possível, portanto, realizar uma avaliação comparativa.

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

A cromatografia em camada delgada foi realizada posteriormente à análise de fenólicos totais, com o objetivo de identificar a presença de compostos fenólicos com atividade antioxidante.

Os compostos foram retidos na placa de sílica de acordo com a interação do peso molecular e polaridade dos compostos (maior em compostos com mais grupos hidroxilas) e dos solventes constituintes da fase móvel. Em geral, compostos com pesos moleculares maiores e mais polares apresentam R_f 's menores, pois ficam retidos mais próximos do ponto de aplicação, ou seja, na base da placa (DUVE e WHITE, 1991).

Todos os extratos e frações apresentaram, pelo menos, uma banda retida na placa, como pode ser observado na tabela 6. Isto demonstra que todos os extratos e frações da polpa e semente da romã apresentam algum tipo de composto fenólico. As bandas de separação obtidas dos extratos variaram entre 0,21 a 0,83. Já as bandas obtidas pelas frações, apresentaram R_f 's variando entre 0,55 a 0,86. Todas as bandas reveladas pelo sistema 1 com ferricianeto de potássio e cloreto férrico foram igualmente reveladas pelo sistema 2 com β - caroteno e ácido linoléico, demonstrando que em todos os extratos e frações, há a presença de compostos fenólicos com atividade antioxidante.

DUVE e WHITE (1991) utilizaram a CCD para isolamento e identificação de compostos fenólicos em grãos de aveia, sendo identificadas bandas de compostos fenólicos com atividade antioxidante, com R_f 's entre 0,3 a 0,8 que, posteriormente foram encontradas em sua composição ácidos fenólicos. Em 1999, MOREIRA utilizou a técnica para identificar compostos com atividade antioxidante nos extratos e frações fenólicas da mostarda. Para o extrato aquoso, foi encontrada

uma banda com $R_f = 0,86$ e, para as frações, R_f 's distintos com valores variáveis entre 0,32 a 0,87 sendo também posteriormente identificados ácidos fenólicos em sua composição.

A tabela 6 traz os resultados de R_f para os sistemas reveladores 1 e 2, para os extratos e frações de ácidos fenólicos da polpa e semente da romã.

TABELA 6: Valores de Rf (fator de retenção) obtidos para os extratos e frações da polpa e sementes da romã

Extrato	Rf	
	SR 1	SR 2
alcolico da polpa	0,32	0,32
	0,21	0,21
Aquoso da polpa	0,44	0,44
	0,32	0,32
Etéreo da semente	0,82	0,82
Alcolico da polpa	0,39	0,39
	0,25	0,25
Aquoso da semente	0,83	0,83
	0,26	0,26
	0,22	0,22
Fração		
Fenólica livre da polpa	0,57	0,57
Fenólicos esterificados a compostos solúveis da polpa	0,82	0,82
	0,68	0,68
	0,53	0,53
Fenólicos livres da semente	0,86	0,86
Fenólicos esterificados a compostos solúveis da polpa	0,86	0,86
	0,74	0,74
	0,55	0,55
Fenólicos esterificados a compostos insolúveis da semente	0,79	0,79

SR 1 = sistema revelador 1 (solução aquosa de FeCl_3 1% e $\text{K}_3(\text{CN})_6$)SR2 = sistema revelador 2 (β - caroteno/ clorofórmio e ácido linoléico/ etanol)

5.5 Atividade Antioxidante

5.5.1 Ensaio cooxidação β - caroteno/ ácido linoléico

Extratos:

Na tabela 7 estão apresentados os valores de concentração (μg de compostos fenólicos) equivalentes aos volumes (em μL) utilizados no teste β -caroteno e ácido linoléico, para os extratos da polpa e semente liofilizados da romã e do antioxidante sintético BHT. A tabela mostra que as concentrações dos extratos obtidos da polpa e semente da romã apresentaram atividade muito elevada frente a uma pequena concentração, de tal forma que não foi possível, para comparação, manter a concentração dos extratos em valores semelhantes aos do BHT.

TABELA 7 : Concentrações (μg) de compostos fenólicos relativas aos volumes (μL) utilizados no teste de atividade antioxidante em meio emulsionado (β - caroteno e ácido linoléico), para o antioxidante sintético BHT e os extratos da polpa e semente liofilizadas da romã

Extrato	fenólicos	$\mu\text{g/ mL}$ de compostos			
		25 μL	50 μL	100 μL	200 μL
Alcoólico da polpa	0,77	1,5	3,09	6,18	
Aquoso da polpa	10,8	21,61	43,22	86,44	
Etéreo da semente	0,25	0,51	1,02	2,04	
Alcoólico da semente	1,81	3,61	7,23	14,46	
Aquoso da semente	8,79	17,57	35,15	70,30	
BHT	25	50	100	200	

A tabela 8 mostra as porcentagens de inibição da oxidação obtidas para os extratos da polpa e semente da romã, nos volumes de 50, 100 e 200 μL , e do antioxidante sintético BHT.

TABELA 8: Porcentagem da inibição da oxidação para o padrão positivo BHT e para os extratos da polpa e semente da romã, no teste de co-oxidação de substratos β - caroteno e ácido linoléico.

EXTRATOS	AMOSTRA			BHT		
	50 μ L	100 μ L	200 μ L	50 μ L	100 μ L	200 μ L
Alc. polpa	47,09 $\pm$ 1,25	65,59 $\pm$ 4,11	76,39 $\pm$ 1,25	76,52 $\pm$ 0,82	84,02 $\pm$ 0,47	88,42 $\pm$ 1,7
Aq. polpa	74,61 $\pm$ 0,94	81,98 $\pm$ 1,41	87,31 $\pm$ 0,47	71,08 $\pm$ 0,47	81,11 $\pm$ 0,47	86,87 $\pm$ 0,47
Et. semente	66,79 $\pm$ 1,89	77,80 $\pm$ 2,49	83,67 $\pm$ 0,47	77,71 $\pm$ 1,41	82,48 $\pm$ 0,47	85,96 $\pm$ 2,94
Alc. semente	34,19 $\pm$ 5,72	61,40 $\pm$ 1,25	71,35 $\pm$ 0,94	70,23 $\pm$ 4,19	78,97 $\pm$ 4,5	85,52 $\pm$ 3,4
Aq. semente	75,89 $\pm$ 1,25	89,12 $\pm$ 1,70	93,08 $\pm$ 1,25	70,41 $\pm$ 4,32	80,58 $\pm$ 1,70	88,09 $\pm$ 0,00

n= 3

Média $\pm$ desvio- padrão

Houve uma influência positiva, mas não proporcional, no aumento da concentração tanto dos extratos utilizados quanto do BHT no aumento da atividade antioxidante, como pode ser visto na tabela 8. Também foi notado que todos os extratos da polpa e semente da romã apresentaram expressiva atividade antioxidante, pois a concentração dos mesmos, relativa aos diferentes volumes testados, foi sempre menor que a concentração do BHT.

Conforme ZHOU e YU (2004) o solvente influenciou na extração dos compostos fenólicos e na atividade antioxidante de duas espécies de grãos de aveia, em meio aquoso.

O extrato aquoso da polpa apresentou conteúdo de compostos fenólicos de 432,55 µg eq. cat./mL e atividade antioxidante de 86,44% (no volume máximo testado, 200µL). O extrato aquoso da semente apresentou conteúdo de compostos fenólicos menor (351,35 eq. cat./mL), porém sua atividade antioxidante foi maior (93,08% em 200µL). Os valores de porcentagem de inibição da oxidação obtida pelos extratos aquoso foram as mais altas em relação aos demais extratos, porém, sua quantidade de compostos fenólicos também foi significativamente maior em relação aos demais extratos (como descritos na tabela 4).

A água, devido à sua alta polaridade, tem grande afinidade com os compostos fenólicos, formando ligações do tipo ponte de hidrogênio com as hidroxilas dos compostos, removendo-os de forma mais eficientemente que os demais solvente aqui testados. Por tal razão, o conteúdo de fenólicos nos extratos aquosos foi maior do que os demais extratos.

A importância do extrato aquoso na atividade antioxidante, inclusive de outras fontes de antioxidantes naturais já estudadas, pôde ser verificada em trabalhos recentes. Os extratos aquosos da semente de linhaça e das especiarias orégano e alecrim foram os responsáveis pelos maiores índices de inibição da oxidação, em

teste de atividade antioxidante no sistema de co-oxidação β - caroteno e ácido linoléico. Foram obtidos valores de 84,81% para a linhaça; 73,78% para o orégano e 82,22% para o alecrim (BERNAL GÓMEZ, 2003). Neste trabalho também foi evidenciado que os extratos aquosos não só apresentaram atividade antioxidante maior em relação aos demais extratos, como também um elevado conteúdo de compostos fenólicos em relação ao extrato alcoólico.

Os extratos etéreo, alcoólico e aquoso das frutas da floresta amazônica peruana chopé, sacha mangua e macambo, foram avaliados pelo método de co-oxidação, em trabalho de GARCIA DE SOTERO (2002). As porcentagens da atividade antioxidantes mais altas, à concentração de 100 ppm, referentes aos extratos aquoso do chope (79, 22%) e sacha mangua (84,42%). A maior atividade antioxidante para o fruto macambo foi obtida com o extrato alcoólico (76,74%) também a 100 ppm.

Os compostos fenólicos presentes em grande quantidade nos extratos aquosos também foram apontados como os responsáveis pela expressiva atividade antioxidante em dois trabalhos realizados com algas. Os extratos aquosos das algas *B. triquetrum* , estudada em trabalho de VIDAL *et al.* (2001) e *H. incrassata* (LINARES *et al.*, 2004), apresentaram valores altos de atividade antioxidante, atribuídos a alta concentração de compostos fenólicos.

Ainda de acordo com a tabela 8, nota-se que houve diferença significativa no aumento da atividade antioxidante proporcionalmente aos volumes utilizados, tanto para o antioxidante sintético BHT quanto para os extratos, mostrando que houve influência positiva no aumento da concentração.

A correlação entre atividade antioxidante e conteúdo de compostos fenólicos totais é observada em frutas, principalmente, de coloração rósea a púrpura, devido à presença das antocianinas (KAUR e KAPOOR, 2001). Como são compostos solúveis em água e altamente hidroxilados, podem apresentar grande influência

tanto sobre os altos valores de conteúdo de fenólicos totais, quanto na alta atividade antioxidante que o extrato aquoso da polpa da romã apresentou.

A atividade antioxidante do extrato etéreo da semente (mostrada na tabela 8) foi muito boa comparada com a de outros extratos, evidenciada pelo fato de que este extrato apresentou o menor conteúdo de compostos fenólicos (mostrados na tabela 4) em relação aos demais extratos. Este fato pode ter relação com o paradoxo polar, um fenômeno que parte do pressuposto que antioxidantes lipofílicos (menor polaridade) são mais efetivos em sistemas emulsionados que em sistemas oleosos (GRAMZA e KORCZAC, 2005; MOURE *et al.*, 2001). Além desta explicação, os constituintes presentes nos extratos etéreos podem ter grande atividade antioxidante. O conteúdo e, principalmente, composição dos ácidos graxos têm influência sobre a atividade antioxidante. Ácidos graxos insaturados ou poliinsaturados, dependendo da conformação de sua estrutura química, podem apresentar menor propensão à oxidação, conforme demonstrado em trabalho de HENRY *et al.* (2002). No caso da romã, a grande quantidade de ácidos graxos insaturados e sobretudo a presença do ácido puníco possivelmente têm grande influência no bom desempenho do extrato etéreo da semente da romã.

Em trabalho de SCHUBERT, LANSKI e NEEMAN (1999), os flavonóides extraídos do óleo da semente da romã apresentaram índices altos de inibição da oxidação, avaliados pelo sistema de cooxidação β - caroteno e ácido linoléico, sendo sua atividade antioxidante superior ao vinho tinto, também testado. No mesmo trabalho também foi demonstrado que os flavonóides extraídos do óleo inibiram em 37% a atividade da enzima COX, e em 75% a atividade da enzima LOX.

O trabalho de HUANG e WANG (2004), demonstrou que entre os extratos etéreos de 16 algas marinhas que foram extraídos, a atividade antioxidante (avaliada segundo o método de cooxidação de β - caroteno e ácido linoléico) revelou-se maior naqueles cujas algas continham maior quantidade de ácidos graxos insaturados (principalmente o ácido eicosapentaenóico C20:5).

O extrato etéreo foi aquele que apresentou maior atividade antioxidante em amostra das especiarias canela (KITAZURU *et al.*, 2004) e coentro (GUERRA, MELO e MANCINI-FILHO, 2005). Em ambos os trabalhos, o sistema para avaliação da atividade antioxidante foi o de co-oxidação de β -caroteno e ácido linoléico. A canela, irradiada a 0, 5, 10, 15, 20 e 25 kGy, foi submetida a extração etérea, alcoólica e aquosa e, realizada a atividade antioxidante de todos extratos. O extrato etéreo da canela a 400 ppm foi o melhor na inibição da oxidação. O coentro foi submetido a extração etérea, e do extrato foram obtidas cinco diferentes frações de compostos carotenóides, e tanto o extrato quanto as frações foram submetidos ao teste de co-oxidação. A atividade antioxidante das frações demonstraram resultados inferiores ao do BHT e do extrato etéreo integral. Este trabalho ainda mostrou que a interação de todos os compostos foi mais eficiente na inibição da oxidação do que cada fração, mostrando um efeito sinergista entre os compostos presentes no extrato.

Na tabela 9 estão apresentados os resultados das análises realizadas quando da associação dos extratos da polpa e semente da romã com o antioxidante sintético BHT.

TABELA 9 : Porcentagem da inibição da oxidação para a associação entre o BHT e os extratos da polpa e semente da romã, no teste de co-oxidação de substratos β -caroteno e ácido linoléico

BHT + EXTRATO:	Volume (μL)		
	25 + 25	50 + 50	100 + 100
Alcoólico da polpa	71,73 $\pm$ 1,25	83,51 $\pm$ 2,94	87,97 $\pm$ 0,82
Aquoso da polpa	82,35 $\pm$ 1,41	86,93 $\pm$ 1,25	91,39 $\pm$ 2,62
Etéreo da semente	74,13 $\pm$ 7,12	77,80 $\pm$ 2,49	79,17 $\pm$ 2,36
Alcoólico da semente	64,91 $\pm$ 2,87	73,27 $\pm$ 0,94	82,00 $\pm$ 5,73
Aquoso da semente	85,15 $\pm$ 0,47	90,32 $\pm$ 3,40	93,87 $\pm$ 2,16

n= 3

média $\pm$ desvio padrão

p < 0,05

Os dados da tabela 9 permitem observar que houve sinergismo acentuado na associação dos extratos da romã com o BHT. O efeito sinérgico fica evidenciado sobretudo nos extratos aquosos da polpa e semente, onde a associação de 100 μL dos extratos e 100 μL do BHT mostraram valores de inibição da oxidação acima de 90%, contra o valor médio de inibição da oxidação do antioxidante sinéptico BHT de 87,5%, quando testado sozinho, no volume de 200 ppm.

Frações fenólicas

Na tabela 10 estão apresentados os valores de concentração (μg de compostos fenólicos) equivalentes aos volumes (em μL) utilizados no teste β -caroteno e ácido linoléico, para os extratos da polpa e semente liofilizados da romã e do antioxidante sintético BHT.

TABELA 10 : Concentrações (μg) relativas aos volumes (μL) utilizados no teste de atividade antioxidante em meio emulsionado (β - caroteno e ácido linoléico), para as frações fenólicas da polpa e semente liofilizadas da romã

Fração de ácidos fenólicos:	ug / mL de compostos fenólicos			
	25uL	50uL	100uL	200uL
Livres - polpa	14,50	29,00	58,00	116,00
Esterificados a compostos solúveis - polpa	12,50	25,00	50,00	100,00
Livres - semente	12,75	25,50	51,00	102,00
Esterificados a compostos solúveis - semente	27,25	54,50	109,00	218,00
Esterificados a compostos insolúveis - semente	5,50	11,00	22,00	44,00

A concentração de compostos fenólicos encontrada em cada fração obtida da polpa e semente (tabela 10) demonstra que o processo de purificação de ácidos fenólicos extraiu grande quantidade desses compostos.

As considerações apresentadas na apreciação da tabela 7 também são adequadas para a tabela 10, que apresenta as concentrações dos compostos fenólicos nos diferentes volumes das frações obtidas da polpa e semente da romã.

A tabela 11 traz os resultados de porcentagem de inibição da oxidação para as frações de ácidos fenólicos obtidos da polpa e semente da romã, no teste de cooxidação de substratos (β - caroteno e ácido linoléico), nos volumes de 50, 100 e 200 μL .

TABELA 11 Porcentagem de inibição da oxidação para o BHT e as frações fenólicas da polpa e semente da romã, no teste de co-oxidação de substratos β - caroteno e ácido linoléico

FRAÇÕES DE ÁCIDOS FENÓLICOS	AMOSTRA			BHT		
	50 μ L	100 μ L	200 μ L	50 μ L	100 μ L	200 μ L
Livre- polpa	45,13 $\pm$ 4,24	68,18 $\pm$ 0,47	78,54 $\pm$ 0,47	60,99 $\pm$ 1,25	81,94 $\pm$ 1,70	87,33 $\pm$ 1,25
Est. comp. sol - polpa	62,80 $\pm$ 1,25	73,64 $\pm$ 0,94	82,74 $\pm$ 3,74	81,32 $\pm$ 0,94	84,99 $\pm$ 0,82	90,83 $\pm$ 1,89
Livre - semente	62,30 $\pm$ 1,25	75,21 $\pm$ 2,45	85,09 $\pm$ 5,56	78,92 $\pm$ 0,82	82,72 $\pm$ 0,94	84,90 $\pm$ 1,41
Est. comp. sol - semente	68,27 $\pm$ 0,47	81,77 $\pm$ 0,47	86,45 $\pm$ 0,47	81,85 $\pm$ 0,82	85,12 $\pm$ 0,94	87 $\pm$ 1,41
Est. comp. Insol- semente	18,04 $\pm$ 0,94	36,56 $\pm$ 1,25	53,84 $\pm$ 1,25	77,26 $\pm$ 0,82	80,90 $\pm$ 3,09	85,89 $\pm$ 0,82

n = 3

Média $\pm$ desvio- padrão

Todas frações apresentaram atividade antioxidante acentuadas, indicando que o processo de fracionamento dos fenólicos da romã levou à obtenção de compostos com expressiva atividade antioxidante. Na tabela 11 pode-se visualizar que as frações livre e esterificada da semente apresentaram os maiores níveis de inibição da oxidação e que os valores de inibição da oxidação, no volume máximo de 200 μ L testados, não apresentaram diferença significativa entre si.

Podemos observar que a fração de ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis da semente apresentou a mais alta atividade antioxidante (86,45%) como observado na tabela 11. Porém foi a fração de ácidos fenólicos com mais alta concentração de compostos fenólicos (1090,81 μ g eq. cat./mL, de acordo com a tabela 5). A mesma fração de ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis, mas da polpa, apresentou uma porcentagem pouco menor para o mesmo volume (82,74%) porém, seu conteúdo de compostos fenólicos é significativamente menor (499,43 μ g eq. cat./mL). O mesmo ocorre com as frações livres, às quais foram notados porcentagens de inibição de 78,54% (polpa) e 85,09% (semente), para concentrações de compostos fenólicos de 573,24 μ g eq. cat./mL e 510,06 μ g eq. cat./mL, respectivamente para polpa e semente. Aqui ficou evidenciado que a quantidade de compostos fenólicos não foi o fator determinante da atividade antioxidante, e que as frações de ácidos fenólicos livres mostraram melhor desempenho na relação quantidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

As porcentagens relativas à atividade antioxidante da fração de fenólicos esterificados a compostos insolúveis da semente foram as mais baixas apresentadas, sendo também sua concentração menor, frente às demais frações.

Em trabalho de MOREIRA (2003), foi realizado o fracionamento de fenólicos de três especiarias: mostarda, canela e erva doce, às quais foram obtidas as frações de fenólicos livres, esterificados a compostos solúveis e a compostos insolúveis. Demonstrou-se que nas amostras de mostarda e erva doce, as frações

de fenólicos esterificados a compostos solúveis foram melhores na inibição da oxidação (95% e 94%, respectivamente para mostarda e erva doce, em concentração de 200 ppm) no teste de co-oxidação com β -

caroteno e ácido linoléico. A fração de fenólicos esterificados a compostos insolúveis foi a que apresentou melhor porcentagem de inibição da oxidação no caso da canela (94% a 200 ppm). Este fato foi explicado pela natureza fibrosa da canela, e portanto, os fenólicos na fração de ácidos fenólicos esterificados a compostos insolúveis estaria presente em maior quantidade.

A purificação da fração de flavonóides do suco fermentado da romã foi obtida por extração com acetato de etila, e a atividade antioxidante avaliada pelo sistema de co-oxidação de β - caroteno e ácido linoléico (SCHUBERT, LANSKI E NEEMAN, 1999). A inibição foi de 80% , utilizando-se concentração de 10 ppm. Embora o autor tenha denominado sua extração como uma extração específica para compostos fenólicos, não houve um fracionamento destes compostos fenólicos de forma mais específica, como o realizado em nosso trabalho.

Na tabela 12 estão apresentados os resultados da inibição da oxidação entre as associações do antioxidante sintético BHT com as frações de ácidos fenólicos da polpa e semente da romã.

TABELA 12 : Porcentagem da inibição da oxidação para a associação entre o BHT e os extratos da polpa e semente da romã, no teste de co-oxidação de substratos β - caroteno e ácido linoléico

BHT + Fração de ácidos fenólicos:	Volume (μ L)		
	25 + 25	50 + 50	100 + 100
Livre - polpa	59,85 $\pm$ 1,70	79,28 $\pm$ 2,83	90,32 $\pm$ 2,16
Est. comp. solúveis - polpa	70,98 $\pm$ 0,82	80,82 $\pm$ 1,25	85,57 $\pm$ 0,47
Livre - Semente	70,28 $\pm$ 1,25	79,20 $\pm$ 1,63	80,72 $\pm$ 1,70
Est. comp. solúveis - semente	74,16 $\pm$ 2,05	82,50 $\pm$ 1,25	87,82 $\pm$ 0,47
Est. comp. Insolúveis- semente	67,37 $\pm$ 1,25	76,56 $\pm$ 1,25	83,84 $\pm$ 1,25

n= 3

média $\pm$ desvio padrão

p< 0,05

Na tabela 12 estão apresentados os resultados da inibição da oxidação das associações entre o antioxidante sintético BHT e das diferentes frações fenólicas. Pode-se notar que o efeito sinérgico foi mais pronunciado para a fração de ácidos fenólicos livres da polpa, para todos os volumes destacando-se a porcentagem de inibição obtida (90,32%), relativa à associação entre 100 μ L da fração e 100 μ L do BHT, contra 87,33% da inibição obtida pelo BHT, no volume de 200 μ L.

Para as demais frações foi notado um efeito sinérgico no volume de 200 μ L, ou seja, da associação entre 100 μ L das frações e 100 μ L do BHT.

5.5.2 Estudo cinético da atividade antioxidante do ensaio de co-oxidação do β -caroteno e ácido linoléico

A cinética das atividades antioxidantes dos extratos e frações de ácidos fenólicos foi realizado como descrito no item 4.2.8.2, à partir das curvas cinéticas obtidas no experimento de co-oxidação do β -caroteno e ácido linoléico (item 4.2.8.1) e demonstradas nos gráficos 1 a 5, referentes aos extratos e de 6 a 10, referentes às frações fenólicas.

Os gráficos mostram as curvas relativas ao branco, o BHT, as amostras e as associações entre o BHT e amostras, nos volumes avaliados de 50, 100 e 200 μ L.

GRÁFICO 1: Curva cinética do potencial antioxidante do extrato alcoólico da polpa liofilizada da romã no teste de co-oxidação de substratos β -caroteno e ácido linoléico.

No gráfico 1, referente à atividade antioxidante do extrato alcoólico da polpa, nota-se que a curva referente ao extrato, no volume de 50 μ L encontra-se bem abaixo das demais, indicando que neste volume, o extrato não apresentou atividade antioxidante alta como antioxidante sintético BHT. Mesmo em volumes maiores, as curvas relativas ao extrato encontram-se menores em relação ao antioxidante BHT.

GRÁFICO 2: Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso da polpa liofilizada da romã no teste de co-oxidação de substratos β -caroteno e ácido linoléico.

O gráfico 2 mostra as curvas cinéticas do extrato aquoso da polpa, que se encontram acima do antioxidante BHT, nos respectivos volumes, e o que comprova os valores de porcentagem de inibição, presentes na tabela 8.

GRÁFICO 3: Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etéreo da semente liofilizada da romã no teste de co-oxidação de substratos β -caroteno e ácido linoléico.

As curvas cinéticas da atividade antioxidante do extrato etéreo da semente encontram-se mais espalhadas ao longo do sistema, como pode ser visto no gráfico 3. As porcentagens foram baixas, como pode ser observado na tabela 8, porém há um aumento significativo nos valores, com o aumento do volume utilizado e conseqüentemente, da concentração.

GRÁFICO 4: Curva cinética do potencial antioxidante do extrato alcoólico da semente liofilizada da romã no teste de co-oxidação de substratos β -caroteno e ácido linolético.

O extrato alcoólico da semente, como pode ser visto no gráfico 4, mostra curvas cinéticas de comportamento semelhante ao gráfico 1, referente ao extrato alcoólico da polpa. Este dado sugere que o solvente apresentaria influência dentro do sistema estudado.

GRÁFICO 5: Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso da semente liofilizada da romã no teste de co-oxidação de substratos β -caroteno e ácido linoléico.

No gráfico 5, referente ao comportamento cinético das curvas do extrato aquoso da semente, nota-se que todas as curvas encontram-se bem acima do gráfico. Estes dados demonstram que o BHT, os extratos e as associações apresentaram bom desempenho ao longo do processo de oxidação, avaliados no sistema.

GRÁFICO 6: Curva cinética do potencial antioxidante fração fenólica livre da polpa liofilizada da romã no teste de co-oxidação de substratos β -caroteno e ácido linoléico.

As curvas cinéticas mostradas no gráfico 6, referente a fração de fenólicos livres da polpa encontram-se bastante próximas, não sendo notado um caimento grande. Assim, tanto a fração quanto o antioxidante sintético e as associações tiveram bom desempenho frente às condições de oxidação no sistema.

GRÁFICO 7: Curva cinética do potencial antioxidante fração de fenólicos esterificados a compostos solúveis da polpa liofilizada da romã no teste de co-oxidação de substratos β -caroteno e ácido linoléico.

O gráfico 7 refere-se ao comportamento das frações de fenólicos esterificados a compostos solúveis da polpa. Pode-se notar que as curvas referentes às frações apresentam-se abaixo das referentes ao antioxidante BHT e entre estas aparecem as curvas da associação.

GRÁFICO 8: Curva cinética do potencial antioxidante fração fenólica livre da semente liofilizada da romã no teste de co-oxidação de substratos β -caroteno e ácido linoléico.

O gráfico 8 traz as curvas cinéticas da fração de fenólicos livre da semente. Pode-se verificar que a curva referente à fração, no volume de 200 μ L, encontra-se acima das demais, demonstrando o bom desempenho desta fração. Este dado reitera alta porcentagem de inibição, na tabela 12.

GRÁFICO 9: Curva cinética do potencial antioxidante fração de fenólicos esterificados a compostos solúveis da semente liofilizada da romã no teste de co-oxidação de substratos β -caroteno e ácido linoléico.

A fração de fenólicos esterificados a compostos solúveis da semente foi a fração com maior porcentagem de atividade antioxidante. Seu bom desempenho pode ser apreciado no gráfico 9, notando que todas as curvas apresentam curvas com pouco caimento, encontrando-se bem acima da área total do gráfico do sistema.

GRÁFICO 10: Curva cinética do potencial antioxidante fração de fenólicos esterificados a compostos insolúveis da semente liofilizada da romã no teste de co-oxidação de substratos β -caroteno e ácido linoléico.

No gráfico 10, referente a fração de fenólicos esterificados a compostos insolúveis da semente, nota-se um comportamento até então não caracterizado nas demais frações analisadas, que foi o caimento das curvas referentes à fração fenólica. Todos os volumes testados encontram-se abaixo das curvas referentes às associações e estas abaixo das curvas do antioxidante BHT, demonstrando o baixo desempenho desta fração no sistema avaliado.

Extratos

O estudo cinético da atividade antioxidante dos extratos foi realizado através do cálculo das tangentes dos gráficos referentes à curva cinética da atividade antioxidante no sistema β -caroteno e ácido linoléico, demonstrados nos gráficos 1 a 5 (item 5.5.1).

A tabela 13 traz os valores dos fatores F1 e F2, da avaliação cinética para os extratos da polpa e semente da romã.

TABELA 13: Parâmetros cinéticos do potencial antioxidante no sistema β -caroteno e ácido linoléico, para o antioxidante sintético BHT e os extratos obtidos da polpa e semente liofilizadas da romã

EXTRATO	F1			F2		
	50 μ L	100 μ L	200 μ L	50 μ L	100 μ L	200 μ L
BHT	0,18	0,12	0,07	0,89	0,57	0,43
Alc. da polpa	0,4	0,23	0,18	2,15	1,21	0,8
Aq. da polpa	0,09	0,06	0,03	0,7	0,45	0,3
Et. da semente	0,41	0,16	0,12	1,26	0,78	0,57
Alc. da semente	0,38	0,26	0,17	1,83	1,16	0,67
Aq. da semente	0,16	0,11	0,07	0,66	0,39	1,37

F1 = fator cinético 1, que mede a cinética no tempo entre 15 a 45 minutos

F2 = fator cinético 2, que mede a cinética no tempo entre 75 a 105 minutos

Os resultados expressos na tabela 13, obtidos na avaliação dos parâmetros cinéticos do potencial antioxidante dos extratos da polpa e sementes liofilizados da romã, demonstram que o antioxidante sintético BHT apresenta valores muito baixos tanto em F1 como em F2. Isto se deve ao fato de que o BHT age como um antioxidante primário, ou seja, doa átomos de hidrogênio aos radicais livres

formados. Observando-se os gráficos da curva cinética da atividade antioxidante em sistema β - caroteno e ácido linoléico, nota-se que o caimento das curvas referentes ao BHT não são expressivos, apresentando-se menores em concentrações maiores. Os valores de F1 e F2 apresentaram diminuição dos valores com o aumento da concentração, sendo reflexo do efeito do caimento das curvas.

O extrato aquoso da polpa foi, dentre todos os extratos, o que apresentou resultados de F1 e F2 mais baixos, demonstrando ser eficiente tanto no início quanto no processo oxidativo (medido através de F1) quanto na fase mais adiantada do processo (F2). Os valores de F1 e F2 foram inclusive menores que o do antioxidante sintético BHT, estando condizentes com o resultado referente à porcentagem de inibição do extrato aquoso da polpa e o BHT, mostrados na tabela 8. A curva cinética da atividade antioxidante do extrato aquoso da polpa é mostrado no gráfico 2.

TABELA 14 : Parâmetros cinéticos do potencial antioxidante no sistema β -caroteno e ácido linoléico, para as associações feitas com o antioxidante sintético BHT e os extratos obtidos da polpa e semente liofilizadas da romã

BHT + EXTRATO	F1			F2		
	25 + 25 μ L	50 + 50 μ L	100 + 100 μ L	25 + 25 μ L	50 + 50 μ L	100 + 100 μ L
Alcoólico da polpa	0,2	0,14	0,09	1,22	0,85	0,53
Aquoso da polpa	0,09	0,06	0,02	0,59	0,45	0,25
Etéreo da semente	0,24	0,09	0,04	1,02	0,66	0,32
Alcoólico da semente	0,19	0,13	0,1	0,82	0,41	0,36
Aquoso da semente	0,11	0,06	0,05	0,45	0,31	0,19

A avaliação do parâmetro cinético da associação entre os extratos e o BHT mostrados na tabela 14 demonstra que houve o sinergismo para todos os extratos, nos valores de F2. Entretanto, para os valores de F1, não foi notado sinergismo no extrato etéreo da semente. Foi notado que o efeito sinérgico foi potencializado conforme o aumento do volume e, conseqüentemente, da concentração.

Frações fenólicas

O estudo cinético da atividade antioxidante das frações fenólicas foi realizado através do cálculo das tangentes dos gráficos referentes à curva cinética da atividade antioxidante no sistema β - caroteno e ácido linoléico, demonstrados nos gráficos 6 a 10 (item 5.5.1).

A tabela 15 traz os resultados dos fatores F1 e F2, da avaliação cinética, realizados para as frações de ácidos fenólicos da polpa e semente da romã.

TABELA 15 : Parâmetros cinéticos do potencial antioxidante no sistema β -caroteno e ácido linoléico para o antioxidante sintético BHT e as frações fenólicas obtidas da polpa e sementes liofilizadas da romã

FRAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS	F1			F2		
	50 μ L	100 μ L	200 μ L	50 μ L	100 μ L	200 μ L
BHT	0,11	0,16	0,09	0,75	0,56	0,55
Livre - polpa	0,22	0,14	0,1	0,46	0,24	0,15
Est. comp. sol. – polpa	0,27	0,15	0,07	1,75	1,48	0,92
Livre - semente	0,18	0,12	0,08	1,14	0,97	0,73
Est. comp. sol. – semente	0,21	0,11	0,09	0,54	0,29	0,3
Est. comp. insol. - semente	1,11	0,73	0,47	1,81	1,44	1,27

F1 = fator cinético 1, que mede a cinética no tempo entre 15 a 45 minutos

F2 = fator cinético 2, que mede a cinética no tempo entre 75 a 105 minutos

A tabela 15 traz os resultados obtidos no cálculo das tangentes, referentes às frações fenólicas da polpa e semente da romã. Nota-se que a fração de fenólicos esterificados a compostos insolúveis da semente apresentou resultados muito elevados de F1 e F2 em relação às demais frações. Os valores de F1 foram superiores aos observados para o antioxidante sintético BHT, no volume de 50 μ L. Já em todas as frações fenólicas para o volume de 100 e 200 μ L, os resultados foram menores do que os obtidos pelo BHT, mostrando que o aumento da concentração de compostos fenólicos representou uma melhora na eficiência da atividade antioxidante.

A fração de fenólicos esterificados a compostos solúveis da semente foi a mais eficiente durante as fases iniciais e adiantadas do processo oxidativo. Este

fato ficou demonstrado pelos valores baixos de F1 e principalmente de F2 (tabela 15), podendo, também, ser notado no gráfico 9, que se refere às curvas cinéticas da atividade antioxidante, onde nota-se que o caimento das curvas referentes às frações fenólicas não se encontra pronunciado. A fração de fenólicos esterificados a compostos da semente apresenta uma concentração de fenólicos superior às demais, demonstrando que o conteúdo de fenólicos tem papel importante na estabilidade no processo oxidativo e na atividade antioxidante observada nas frações fenólicas.

A avaliação dos parâmetros cinéticos dos extratos e frações fenólicas da mostarda, erva-doce e canela, descritas por MOREIRA (2003) demonstra que os extratos aquosos da mostarda, erva-doce apresentaram melhor atividade antioxidante. Entretanto, os valores de F1 (0,25 para a mostarda e 0,36 para a erva-doce) e F2 (0,27 para a mostarda e 1,13 para a erva-doce) não foram superiores ao do antioxidante sintético BHT (F1 = 0,08 e F2 = 0,10, para a mostarda e F1 = 0,14 e F2 = 0,26, para a erva-doce). Já as frações de fenólicos esterificados a compostos solúveis da mostarda e erva-doce apresentaram os seguintes valores: F1 = 0,03 e F2 = 0,12 para a mostarda, e F1 = 0,02 e F2 = 1,00 para a erva-doce. Nota-se que as frações purificadas apresentaram valores menores em relação aos respectivos extratos aquosos, e que os valores de F1 e F2 para os extratos e frações foram superiores ao antioxidante sintético BHT. Portanto, foi notada uma perda da eficiência da atividade antioxidante ao longo do processo de oxidação do sistema. Todos os resultados analisados são referentes a concentração de 200 ppm, referentes às maiores porcentagens de inibição da oxidação.

TABELA 16: Parâmetros cinéticos do potencial antioxidante no sistema β -caroteno e ácido linoléico, para as associações feitas com o antioxidante sintético BHT e os extratos obtidos da polpa e semente liofilizadas da romã

BHT + FRAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS	F1			F2		
	25 + 25 μ L	50 + 50 μ L	100 + 100 μ L	25 + 25 μ L	50 + 50 μ L	100 + 100 μ L
Livre - polpa	0,16	0,14	0,11	0,3	0,21	0,24
Est. sol. - polpa	0,19	0,1	0,08	1,19	0,98	1
Livre - semente	0,17	0,13	0,07	1,15	0,74	0,61
Est. sol. - semente	0,17	0,14	0,11	0,46	0,29	0,29
Est. Insol. - semente	0,25	0,14	0,12	1,5	1,27	0,98

A tabela 16 traz os resultados da avaliação cinética entre a associação do antioxidante sintético BHT com as frações fenólicas da polpa e semente da romã. O sinergismo foi mais evidenciado nos valores de F2, onde as frações livre da polpa e de fenólicos esterificados a compostos solúveis da semente apresentaram sinergismo em todos os volumes testados, sendo estas duas frações as que apresentam maior concentração de compostos fenólicos. Isto demonstra que, para o efeito sinérgico, a concentração de compostos fenólicos é importante para a estabilização do processo oxidativo.

5.5.3 Ensaio em meio lipídico (Rancimat[®])

O BHA é o antioxidante sintético que permite maior proteção em sistemas oleosos ou onde a presença da água é baixa, sendo o mais eficiente dos antioxidantes sintéticos estudados, como demonstrado em GUERRA e LAJOLO (2005).

Os resultados obtidos para os extratos (tabela 17), frações fenólicas (tabela 18) da polpa e semente liofilizadas da romã e do padrão positivo antioxidante sintético BHA são mostrados na forma de porcentagem de inibição da oxidação, calculados à partir do período de indução em horas. Foi notado que houve diferença significativa ($p < 0,05$) nas comparações entre as amostras e o padrão BHA, em cada concentração respectiva.

TABELA 17 : Porcentagem de inibição da oxidação referente ao período de indução (em horas), para o antioxidante sintético BHA e os extratos da polpa e sementes liofilizados da romã, pelo método Rancimat

EXTRATO	% de inibição da oxidação	
	100 ppm	200 ppm
Alcoólico da polpa	41,39 $\pm$ 12,10	45,82 $\pm$ 10,27
Aquoso da polpa	47,76 $\pm$ 10,83	53,45 $\pm$ 8,47
Etéreo da semente	9,62 $\pm$ 4,27	19,55 $\pm$ 14,10
Alcoólico da semente	30,47 $\pm$ 4,61	35,41 $\pm$ 6,53
Aquoso da semente	42,16 $\pm$ 2,29	44,31 $\pm$ 3,10
BHA	11,65 $\pm$ 4,06	14,47 $\pm$ 3,57

n = 3

média $\pm$ desvio padrão

$p < 0,05$

De acordo com os resultados da tabela 17, referente a análise dos extratos, apenas o extrato etéreo da semente não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos resultados do padrão BHA. Os demais extratos apresentaram resultados superiores ao BHA, sobressaindo-se o extrato aquoso da polpa, com valores de inibição da oxidação de 47,76% (100 ppm) e 53,45% (200 ppm).

A tabela 18 traz os resultados de porcentagem de inibição da oxidação obtidas pelas frações de ácidos fenólicos, realizadas pelo método Rancimat.

TABELA 18 : Porcentagem de inibição da oxidação referente ao período de indução (em horas), para o antioxidante sintético BHA e as frações fenólicas da polpa e sementes liofilizados da romã, pelo método Rancimat

FRAÇÃO FENÓLICA	% de inibição da oxidação	
	100 ppm	200 ppm
Livres da polpa	43,86 ± 6,43	39,30 ± 6,82
Est. comp. sol. da polpa	54,06 ± 6,27	58,19 ± 5,97
Livres da semente	24,92 ± 6,43	39,88 ± 5,63
Est. comp. sol. da semente	22,07 ± 5,59	38,82 ± 7,06
Est. comp. Insol. da semente	4,41 ± 2,84	22,52 ± 1,78
BHA	11,65 ± 4,06	14,47 ± 3,57

n = 3

média ± desvio padrão

$p < 0,05$

Os valores de inibição da oxidação para as frações fenólicas apresentaram-se bastante variados. Comparando-se as porcentagens de inibição entre frações de polpa e semente, a porcentagem de inibição da oxidação obtida com as frações da polpa foram maiores do que as frações obtidas da semente e muito superiores às porcentagens de inibição do BHA. Deve-se destacar a fração de fenólicos

esterificados a compostos solúveis da polpa, com inibição de 54,06% (100 ppm) e 58,19 % (200 ppm).

Não houve alteração significativa na porcentagem de inibição da oxidação, por ocasião do aumento da concentração (100 e 200 ppm). Uma exceção foi a fração de ácidos fenólicos esterificados a compostos insolúveis da semente, cujo aumento da concentração elevou em cinco vezes o valor da inibição da oxidação. Tal resultado se deve ao fato da semente ter menos compostos fenólicos (tabela 5). O aumento da concentração gerou aumento na porcentagem de inibição.

A atividade antioxidante dos extratos e frações, avaliada nos sistemas emulsionados (ensaio β - caroteno e ácido linoléico em água) e oleoso (método Rancimat[®]) mostra o fenômeno chamado “paradoxo polar”. Este fenômeno foi demonstrado por FRANKEL *et al.* (1994), que utilizaram antioxidantes ácido ascórbico e α - tocoferol, ambos nos sistemas oleoso e emulsionado, e observaram que o ácido ascórbico, de natureza polar, apresentou melhor desempenho na inibição da oxidação no teste em meio oleoso. No teste em meio emulsionado, o antioxidante de característica menos polar, o α - tocoferol, foi mais efetivo na inibição do processo oxidativo.

Os óleos apresentam baixa superfície de contato, e os antioxidantes que apresentam maior balanço hidro/ lipofílico agem na interface óleo/ ar, sendo mais eficientes possivelmente por formarem uma barreira entre óleo e o ar, impedindo o acesso do oxigênio ao substrato. No meio oleoso a atividade de água é muito baixa, favorecendo a reação de oxidação. Quando antioxidantes são diluídos em água, o potencial antioxidante é aumentado. Assim, tem-se uma potencialização da inibição da oxidação, gerando um maior efeito antioxidativo (FRANKEL *et al.*, 1994; GUERRA e LAJOLO, 2005).

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante dos extratos obtidos da romã e a participação das suas frações fenólicas demonstram que os compostos desta fruta possuem a propriedade de inibir o processo oxidativo de forma expressiva. Verificou-se que pequenas quantidades de seus extratos e frações apresentaram elevada atividade antioxidante, superiores às obtidas com os antioxidantes sintéticos que foram comparados, o butil- hidróxi- anisol (BHA) e o butil- hidróxi- tolueno (BHT).

A capacidade antioxidante foi observada tanto nos extratos quanto nas frações, nos sistemas emulsionado e lipídico.

No sistema emulsionado β - caroteno e ácido linoléico, a atividade antioxidante foi tanto maior quanto maior a polaridade do solvente. Assim, os extratos aquosos da polpa e semente apresentaram as maiores porcentagens de inibição da oxidação. A avaliação da cinética das curvas de caimento do processo de oxidação no sistema demonstra que o extrato aquoso foi o extrato mais eficiente na inibição da oxidação ao longo do processo oxidativo.

A fração de ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis da semente da romã foi a fração que alcançou a porcentagem de inibição da oxidação mais alta, sendo também a fração com maior conteúdo de compostos fenólicos. Já as frações de ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis e livre, ambos da polpa, foram as frações que apresentaram valores mais elevados de porcentagem de inibição da oxidação.

No sistema lipídico, por avaliação pelo método Rancimat[®], o extrato aquoso da polpa apresentou os maiores valores de inibição da oxidação, devido ao

elevado teor de compostos fenólicos e também pela influência do solvente sobre o meio, no fenômeno conhecido como “paradoxo polar”.

A quantificação de ácidos graxos das sementes da romã cultivada no Brasil apontou a presença do ácido graxo puníco, sendo este o ácido graxo presente em maior quantidade na fração lipídica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIDOS graxos poliinsaturados de cadeia longa na nutrição e na prevenção de doenças. **PUFA Infocus**, São Paulo, p.1-13, 2001. (Publicação científica da Divisão de vitaminas da Roche na América Latina).

AJAIKUMAR, K.B.; ASHEEF, M.; BABU, B.H.; PADIKKALA, J.. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) methanolic extract. **J. Ethnopharmacol.**, Orlando, V. 96, p. 171- 176, 2005.

ARAO, K.; WANG, Y.M.; INOUE, N.; HIRATA, J.; CHA, J.Y.; NAGAO, K.; YAGITA, T..Dietary effect of pomegranate seed oil rich in 9-*cis*, 11- *trans*, 13- *cis* conjugated linolenic acid on lipid metabolism in obese, hyperlipidemic OLETF rats. **Lipids Health and Dis.**, Cleveland, V. 3, p. ,2004 (a).

ARAO, K.; YOTSUMOTO, H.; HAN, S.Y.; NAGAO, K.; YANAGITA, T.. The 9-*cis*, 11- *trans*, 13- *cis* isomer of conjugated linolenic acid reduces apolipoprotein B100 secretion and triacylglycerol síntesis in HEP G2 cells. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Tokyo V.68, p. 2643- 2645, 2004(b).

ARTIK, N.; MURAKAMI, H.; MORI, T.. Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by using HPLC. **Fruit Process.**, Oberhonnefeld-Gierend, V. 12, p. 492-499, 199

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16.ed. V.1, n. 960.52/12.1.07. Washington: AOAC, 1995. p.7.

De acordo com a NBR 6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas técnicas (ABNT). As abreviações dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Index (**CAS**) de 1997 (CDRom).

AVIRAN, M.; DORNFELD, L.; ROSENBLAT, M.; VOLKOVA, N.; KAPLAN, M.; COLEMAN, R.; HAYEK, T.; PRESSER, D.; FUHRMAN, B.. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E- deficient mice. **Am. J. Clin. Nutr.**, Rockville Pike, V. 71, p. 1062- 1076, 2000.

AVIRAN, M.; DORNFELD, L.. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. **Atherosclerosis**, Oxford, V. 158, p. 195- 198, 2001.

BERGER, M.M.. Can oxidative damage be treated nutritionally? **Clin. Nutr.**, Amsterdam, V. 24, p. 172- 183, 2005.

BERNAL GOMEZ, M.E.D.. Modulação da composição de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 de ovos e tecidos de galinhas poedeiras, através da dieta. I. Estabilidade oxidativa. São Paulo, 2003, 120p. (Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP).

BERNAL GÓMEZ, M.E.; MENDONÇA- JÚNIOR, C.X.; MANCINI- FILHO, J.. Estabilidad oxidativa de huevos enriquecidos com ácidos grasos poliinsaturados Omega 3, frente a antioxidantes naturales. **Rev. Brás. C. Farmac.**, São Paulo, V. 39, p. 426- 432, 2003.

BRAVO, L.. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutr. Rev.**, New York, V. 56, p. 317-328, 1998.

COOK, N.C.; SAMMAN, S.. Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. **J. Nutr. Biochem.**, New York, V.7, p.66-76, 1996

- CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKI, C.K.; PROCOPIO, J.. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, 2002. 580 p..
- DE GAULEJAC, N. S.C. ; PROVOST, C.; VIVAS, N.. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, V. 47, p. 425- 431, 1999.
- DUVE, K.J.; WHITE, P.J..Extraction and Identification of antioxidants in Oats. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, V. 68, p. 365-370, 1991.
- FADAVI, A.; BARZEGAR, M.; AZIZI, M.H.. Determination of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 pomegranates varieties grown in Iran. **J. Food Comp. Anal.** (disponível on line no site <http://www.sincdirect.com> desde 18 de maio de 2005).
- FKI, I.; ALLOUCHE, N.; SAYADI, S.. The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4- dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. **Food Chem.**, Amsterdam, V.93, p. 1-8, 2004.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S.. A simple method for the isolation and purification of total lipids. **J. Biol. Chem.**, Rockville Pike, V. 226, p. 497- 509, 1957.
- FRANKEL, E.N.; HUANG, S.W.; KANNER, J.; GERMAN, J.B.. interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs. emulsions. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, V. 42, p. 1054- 1059, 1994.
- GARCÍA DE SOTERO, D.E.. Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante de frutos da Amazônia: chopé (*Gustavia augusta*

- L.), sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) e macambo (*Theobroma bicolor*). São Paulo, 2002, 143 p.(Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP).
- GIL, M.I.; TOMÁS- BARBERÁN, F.A.; HESS- PIERCE, B.; HOLCROFT, D.M.; KADER, A.A.. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, V. 48, p. 4581- 4589, 2000.
- GOWER, J.D.. A role for dietary lipids and antioxidants in the activation of carcinogenesis. **Free Radic. Biol. Med.**, Oxford, V. 5, p. 95- 111, 1988.
- GRANZA, A.; KORCZAK, J.. Tea constituents (*Camellia sinensis*, L.) as antioxidants in lipid systems. **Trends Food Sci. & Technol.**, Kidlington, V. 16, p. 351- 358, 2005
- GUERRA, N.B.; LAJOLO, F.M.. Ação antioxidante de especiarias face diferentes atividades de água. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, V. 25, 45-50, jan.- mar.. p.45-50. 2005.
- GUERRA, N.B.; MELO, E.A.; MANCINI FILHO, J.. Antioxidant compounds from coriander (*Coriandrum sativum* L.) etheric extract. **J. Food Comp. Anal.**, Kidlington, V. 18, p. 193- 199, 2005.
- HALLIWELL, B.; MURCIA, M.A.; CHIRICO, S.; ARUOMA, O.I.. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. **Crit. Rev. Food Sci. and Nutr.**, Philadelphia, V. 35, p. 7- 20, 1995.
- HAMILTON, R.J.; KALU, C.; PRISK, E.; PADLEY, F.B.; PERCE, H.. Chemistry of free radicals in lipids. **Food Chem.**, Amsterdam, V. 60, p. 193- 199, 1997.

- HAN, J.; RHEE, K.S.. Antioxidant properties of selected Oriental non-culinary/ nutraceutical herb extracts as evaluated in raw and cook meat. **Meat Sci.**, Amsterdam, V.70, p.25- 33, 2004.
- HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A.. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab. Pract.**; V.22, p. 475- 477. 1973.
- HENRY, G.E.; MOMIN, R.A.; NAIR, M.G.; DEWITT, D.L.. Antioxidant and cyclooxygenase activities of fatty acids found in food. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, V. 50, p.2231- 2234, 2002.
- HIROSE, M.; HAGIWARA, A.; HASUI,; INOVE, K.; ITO, N.. Combined effects of BHA and other antioxidants in induction of forestomach lesions in rats. **Cancer Lett.**; Shannon, V. 30, p. 169- 174, 1986.
- HUANG, H-L; WANG B-G.. Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the Qingdao Coastline. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, V. 52, p. 4993- 4997, 2004.
- IGARASHI, M.; MIYAZAWA, T.. Newly recognized cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on cultured human tumor cells. **Cancer Lett.**, Shannon, V. 148, p. 173- 179, 2000.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz:** métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. São Paulo, 1985
- IRAN- DAILY. (disponível no site <http://www.iran-daily.com/1383/2131/thml/economy.htm>) (acessado em 26 de julho de 2005).

- ITO, N.; FUKUSHIMA, S.; HAGIWARA, A.; SHIBATA, M.; OGISO, T.. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, V. 70, p. 343- 352, 1983.
- ITO, A.; SHAMON, L.A.; YU, B.;, MATA- GREENWOOD, E.; LEE, S.K.; VAN BREEMEN, R.B.; MEHTA. R.G., FARNSWORTH, N.R.; FONG, H.H.S.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A. D.. Antimutagenic constituents of *Casimiroa edulis* with potential cancer chemopreventive activity. **J. Agric. and Food Chem.**, Washington, V. 46, p. 3509- 3516, 1998.
- KARAKAYA, S.; EL, S.N.; TAS, A.A.. Antioxidant Activity of some foods containing phenolic compounds. **Int. Food Sci. Nutr.**, London, V. 52, p. 501- 508, 2001.
- KAUR, C.; KAPOOR, H.C.. Antioxidants in fruits and vegetables. **Int. J. Food Sci. and Technol.**, Oxford, V. 36, p. 703- 725, 2001.
- KITAZURU, E.R.; MOREIRA, A.V.B.; MANCINI FILHO, J.; DELINCÉE, H.; VILLAVICENCIO, A.L.C.H.. Effects of irradiation on natural antioxidants of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* N.). **Radiat. Phys. and Chem.**, Amsterdam, V. 71, p.37- 39, 2004.
- KRYGIER, K.; SOSULSKI, F.; HOGGE, L..Free, Esterified and insoluble-bound phenolic acids. 1- extraction and purification procedure. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, V.30, p.330-334, 1982.
- KUBOW, S.. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. **Free Radic. Biol. Med.**, V. 12, p. 63- 81, 1992.

- LEONG, L.P.; SHUI, G.. Na investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. **Food Chem.**, Amsterdam, V. 76, p. 69- 75, 2002.
- LINARES, A.F.; LOIKKANEM, J.; MANCINI- FILHO, J.; SORIA, R.B.; NOVOA, A.V.. Antioxidant and neuroprotective activity of the extract from the seaweed *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux, against *in vitro* and *in vivo* toxicity induced by methyl- mercury. **Vet. Human Tox.**, Manhatten, v. 46, p. 1-5, 2004.
- LO, K.M.; CHEUNG, PETER C.K.. Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*. **Food Chem.**, Amsterdam, V. 89, p. 533- 539, 2005.
- MACHADO, T.B.; LEAL, I.C.R.; AMARAL, A.C.F.; SANTOS, K.R.N.; SILVA, M.G.; KUSTER, R.M.. Antimicrobial ellagiotannin of *Punica granatum* fruits. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, V.13, p. 606- 610, 2002.
- MACHEIX, J.-J., FLEURIET, A.; BILLOT, J.. Importance and roles of phenolic compounds in fruits. *In*: _ **Fruit Phenolics**. Boca Ratón: CRC Press, 1990. p. 98, 239.
- MARCO, G.J.. A rapid method for evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil Chem. Soc.**..Champaign, V. 45, p. 594- 598, 1968.
- MARTINS, E. **Plantas Medicinais**. Viçosa: UFV, 1995. p. 162- 163.
- MARINOVA, E.M.; YANISHLIEVA, N.V.. Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. **Food Chem.**, Amsterdam, V. 81, p.189- 197, 2003.

- MASUI, T.; HIROSE, M.; IMAIDA, K.; FUKUSHIMA, S.; TAMANO, S.; ITO, N.. Sequential changes of the forestomach of F344 rats, Syrian golden hamsters and B6C3F1 mice treated with butylated hydroxyanisole. **Jpn. J. Cancer Res.**, Kami- Ikeburo, V.77, p. 1083- 1090, 1986.
- MATHEW, S.; ABRAHAM, E.. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. **Food Chem.**, Amsterdam. (disponível on line no site [http:// www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com) a partir de 16 de fevereiro de 2005).
- MELGAREJO, P.; SALAZAR, D.M.; AMORÓS, A.; ARTÉS, F.. Total lipids content and fatty acid composition of seed oils from six pomegranate cultivars. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, V. 69, p. 253- 256, 1995.
- MELGAREJO, P.; ARTÉS, F..Total lipid content and fatty acid composition of oilseed from lesser known sweet pomegranate clones. **J. Sci. Food Agric.** Bognor Regis, V. 80, p.1452- 1454, 2000.
- MELO,E.A.; GUERRA, N.B..Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim SBCTA**, Campinas, V. 36, p. 1-11, 2002.
- MEYER, A. S.; JEPSEN, S.M.; SORENSEN, N.S.. Enzymatic release of antioxidants for human low- density lipoprotein from grape pomace. **J. Agric. Food Chem.** , Amsterdam, V. 46, p. 2439- 2446, 1998.
- MILLER, H.E.. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil Chem.. Soc.**, Champaign, V. 48, p. 91, 1971.

- MOON, J.H.; TERAOKA, J.. Antioxidant activity of caffeic acid and dihydrocaffeic acid in lard and human low-density lipoprotein. **J. Agric. and Food Chem.**, Washington, V. 46, p. 5062- 5065, 1998.
- MOREIRA, A. V.B.. Avaliação da atividade antioxidante de sementes de mostarda (*Brassica alba*, L.) I- identificação dos principais compostos responsáveis pela inibição da oxidação. São Paulo, 1999, 120p. (Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP).
- MOREIRA, A.V.B.. Efeito antioxidante dos compostos fenólicos de especiarias sobre os ácidos graxos das séries ω -3 e ω - 6. São Paulo, 2003, 153p. (Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP).
- MOREIRA, A.V.B.; MANCINI- FILHO, J.. Efeito dos compostos fenólicos de especiarias sobre lípidos poliinsaturados (TALN04). **Rev. Brás. C. Farmac.**, São Paulo, V.39. P. 130-133, 2003
- MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J.M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M.J.; PARAJO, J.C.. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chem.** , Amsterdam, V.72, p.145- 171, 2001
- NAKAGAWA, K.; NINOMIYA, M.; OKUBO, T.; AOI, N.; JUNEJA, L.R.; KIM, M.; YAMANAKA, K.; MIYAZAWA, T.. Tea catechin supplementation increases antioxidant capacity and prevents phospholipid hydroperoxidation in plasma of humans. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, V.47, p. 3967- 3973, 1999.
- NAWAR, W.W.. Lipids. In: FENNEMA, O. R.. **Food chemistry**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 225- 319.

- NETTLETON, J.A.. **Omega- 3 fatty acids and Health**. New York: Chapman & Hall, 1994. p. 1,4,6.
- NISSEN, L.R.; MANSSON, L.; BERTELSEN, G.; HUYH- BA, T.; SKIBSTED, L.H.. Protection of dehydrated chicken meat by natural antioxidants as evaluated by electron spin resonance spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, V.48, p. 5548- 5556, 2000.
- NODA, Y.; KANEYUKI, T.; MORI, A.; PACKER, L.. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin and pelargonidin. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, V. 50, p. 166- 171, 2002.
- NOGUCHI, R.; YASUI, Y.; SUZUKI, R.; HOSOKAWA, M.; FUKUNAGA, K.; MIYASHITA, K.. Dietary effects of bitter gourd oil on blood and liver lipids of rats. **Arch. Biochem. Biophys.**, San Diego, V. 396, p. 207- 212, 2001
- PEREZ- VICENTE, A.; GIL- IZQUIERDO, A.; GARCÍA- VIGUERA, C.. In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins and vitamin C. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, V. 50, p. 2308- 2312, 2002.
- POYRAZOGLU, E.; GÖKMEN, V.; ARTIK, N..Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum*, L.) grown in Turkey. **J. Food Comp. and Anal.**, Kidlington, V. 15, p. 567- 575, 2002.
- RAMARATHNAM, N.; OSAWA, T.; OCHI, H; KAWAKISHI, S.. The contribution of plant food antioxidants to human health. **Trends Food Sci. & Technol.**, V.6, p.75- 82, 1995

- REDDY, V.; UROOJ, A.; KUMAR..Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application in biscuits. **Food Chem.**,Amsterdam, V. 90, p.317- 321, 2005.
- RICE- EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G..Antioxidants properties of phenolic compounds. **Trends Plant Sci.**, Kidlington, V. 4, p.152- 159, 1997.
- ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W.. Phenolic compounds and their role in processes in fruits. **Food Chem.**, Amsterdam, V. 66, p.401- 436, 1999.
- ROSS, R. G.; SELVASUBRAMANIAN, S.; JAYASUNDAR, S.. Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits – a preliminary study. **J. ethnopharmacol.**, Orlando, V. 78, p. 85- 87, 2001.
- ROSSING, D.; KAHL, R.; HILDEBRANDT, A.G..Effect of synthetic antioxidants on hydrogen peroxide formation, oxyferro cytochrome P450 concentration and oxygen consumption in liver microsomes. **Toxicol.**, Amsterdam, V. 34, n.1, p. 67-77, 1985.
- SALEM JR., N.. Introduction to polyunsaturated fatty-acids. **Background**; V. 3, p. 1-8, 1999.
- SALLAM, Kh.; ISHIOBOROSHI, M.; SAMEJIMA, K.. Antioxidant and antimicrobial effects of garlic in chicken sausage. **Lebensm. – Wiss. U. – Technol.**; V. 37, p. 849- 855, 2004.
- SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G.. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J. Nutr.**, Rockville Pike, V.130, p. 2073S- 2085S, 2000.

- SCHUBERT, S.Y.; LANSKY, E.P.; NEEMAN, I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. **Journal of Ethnopharmacol.**, Orlando, V. 66, p.11-17, 1999.
- SHAHIDI, F.. **Natural Antioxidants: Chemistry, health effects and applications**. Champaign: AOCS Press, 1997. 414p..
- SHAHIDI, F., NACZK, M.. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Boca Ratón: CRC Press, 2004. 558 p..
- SHIBATA, M.A.; HIROSE, M.; NAGAWA, M.; BOONYAPHIPHAT, P.; ITO, N.. Enhancing effect of concomitant L- ascorbic acid administration on BHA-induced forestomach carcinogenesis in rats. **Carcinogenesis**, V. 14, p. 275- 280, 1993
- SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.; FERREIRA, M.A.. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, V. 22. p. 94- 103, 1999.
- SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R., LAMUELA- RAVENTÓS, R.M.. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocateau reagent. **Methods Enzymol.**, San Diego, V. 299, p. 152- 178, 1999.
- STUCHLIK, M.; ZÁK, S.. Vegetable lipids as components of functional foods. **Biomed. Pap.**, Olomouc, V. 146, p. 3- 10, 2002
- SROKA, Z.; CISOWSKI, W.. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti- radical activity of some phenolic acids. **Food Chem. Toxicol.**, Amsterdam, V.41, p. 753- 758, 2003.

- TEPE, B., SOKMEN, M., AKPULAT, A., SOKMEN, A.. *In vitro* antioxidant activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey. **Food Chem.**, Amsterdam, V. 90, p. 685- 689, 2005.
- THOMAS, M.J.. The role of free radicals and antioxidants. **Nutrition**, New York, V. 16, p. 716- 718, 2000.
- TURA, D.; ROBARDS, K.. Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. **Journal of Chromatogr. A**, Amsterdam, V. 975, p. 71- 93. 2002.
- YANISHILIEVA, N.V.; MARINOVA, E.M.. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food Chem.**, Washington ,V. 54, p.377-382, 1995.
- VIDAL, A.; MOTIDOME, M.; MANCINI-FILHO, J.; FALLARERO, A.; MIDORI, M.; BRANDÃO, L.M.; LAPA, A.J.. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G. Gmelin) Howe. **Rev. Bras. C. Farm.**, São Paulo, V. 37, p. 373- 382, 2001.
- WALLE, T.. Absortion and metabolism of flavonoids. **Free Radic. Biol. Medic.**, V. 36, p.829- 837. 2004.
- WÜRTZEN, G.; OLSEN, P.. Chronic study on BHT in rats. **Food Chem. Toxicol.**,Amsterdam, V. 24, p. 1121-1125, 1986.
- ZHOU, K.; YU, L.. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. **Lebensm- Wiss. U- Technol.**. V. 37, p. 717- 721, 2004.

<http://www.uga.edu/fruit/pomegran.htm#production> (acessado em 26 de julho de 2005)