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

Avaliação da capacidade antioxidante dos compostos
fenólicos do cotilédono da semente de girassol
(*Helianthus annuus* L.) rajada

Maria de Lourdes Reis Giada

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:

Prof. Titular JORGE MANCINI-FILHO

São Paulo

2006

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011631

Ficha Catalográfica

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

R375a Reis Giada, Maria de Lourdes
Avaliação da capacidade antioxidante dos compostos
fenólicos do cotilédono da semente de girassol *Helianthus
annuus* L.) rajada / Maria de Lourdes Reis Giada - - São
Paulo, 2005.
206p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciência Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos
e Nutrição Experimental
Orientador: Mancini-Filho, Jorge

1. Antioxidante : Nutrição 2. Alimento : Composto fenólico :
Ciência dos alimentos 3. Nutrição experimental : Ciência dos
alimentos I. T. II Mancini-Filho, Jorge, orientador

641.19 CDD

Maria de Lourdes Reis Giada

Avaliação da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos do
cotilédone da semente de girassol (*Helianthus annuus* L.) rajada

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Jorge Mancini Filho
orientador/presidente

1º. examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, 07 de março de 2006

*“Jamais se desespere em meio as mais
sombrias aflições da vida, pois das nuvens mais negras cai água límpida e fecunda”.*

(Provérbio chinês)

DEDICO

A Deus. É impossível não pensar Nele neste momento, pois se hoje percorro este caminho é porque o trilhaste. Obrigada, Pai, não só pela conquista do título, mas por tudo; aprendizado, força e até as decepções, pois tudo contribuiu para o meu crescimento, fazendo-me perceber a minha capacidade de vencer.

Ao meu pai Marino (*in memoriam*), minha mãe Zilá e meus irmãos Emma, Marino, Ângela e Ângelo que sempre estiveram ao meu lado, dando-me força e coragem, mesmo quando a trajetória parecia-me muito difícil.

E aos que, para nossa felicidade, em nossa vida depois chegaram: Martim, Mônica, Matheus, Margareth, Kátia e Bruninho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jorge Mancini Filho pela orientação em todas as etapas deste trabalho.

Aos colegas do IN/UFRJ pela liberação. Um agradecimento especial à chefe do Departamento de Nutrição Básica e Experimental Profa. Lucia Maria Jaeger de Carvalho.

Às Profas. Estela Bevilacqua (ICB/USP), Marisa Passarelli (FM/USP) e Célia Colli (FCF/USP) pela atenção e ensinamentos que muito enriqueceram o nosso conhecimento sobre experimentos com animais de laboratório.

À Dra. Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite (EMBRAPA) pelas informações sobre o girassol.

À eterna amiga, Profa. Magaly Silva Balata (IN/UFRJ), a quem somos imensamente grata.

Ao colega Thomas Wong por nos ter ensinado a técnica de gavagem.

À colega Fernanda Giardini pela colaboração no emprego do método Rancimat.

Aos colegas Ana Amélia e Ana Flávia (Instituto Butantã), Hilda (FMVZ/USP), Marcelo (ICB/USP), Vanessa (Microbiologia de Alimentos-FCF/USP), Lúcia Perret (UFMG) e Janaína Baggio (UFSC) pela bonita amizade que nasceu no decorrer deste trabalho. Foi muito bom conhecê-los.

À Silvania Neves, Renata, Flávia e demais funcionários do biotério da FCF-IQ/USP pelo apoio e informações fornecidas com muita seriedade, profissionalismo e cordialidade.

Às bibliotecárias do Conjunto das Químicas Adriana de Almeida Barreiros, pelos excelentes cursos de pesquisa em banco de dados, e Leila Bonadio, pela disponibilidade para revisão das referências bibliográficas.

Ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto “Avaliação da atividade antioxidante naturalmente presente nos alimentos”.

À CAPES/ PICDT pela concessão da bolsa de doutorado.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	I
LISTA DE QUADROS	IV
LISTA DE TABELAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VIII
LISTA DE SÍMBOLOS	XI
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1 As sementes e sua importância	03
2.2 A semente de girassol	04
2.2.1 Cultivo	06
2.2.2 Comercialização	07
2.2.3 Valor nutritivo	09
2.3 Os compostos fenólicos da dieta	10
2.3.1 Origem e funções na planta	11
2.3.2 Classificação	14
2.3.3 Atividade antioxidante	17
2.3.3.1 Flavonóides	18
2.3.3.2 Taninos	21
2.3.3.3 Calconas e cumarinas	24
2.3.3.4 Ácidos fenólicos	26
2.3.4 Benefícios à saúde	31
2.3.4.1 Antioxidantes e câncer	34
2.3.4.2 Antioxidantes e envelhecimento	38
2.3.4.3 Antioxidantes e malária	40
2.3.5 Biodisponibilidade	44
2.3.5.1 Absorção	45

	Pág.
2.3.5.2 Metabolismo	48
2.4 Métodos para avaliação da atividade antioxidante	54
2.4.1 Principais métodos <i>in vitro</i>	55
2.4.1.1 Métodos baseados no seqüestro de radicais livres	58
2.4.1.1.1 Ensaio do Poder Antioxidante pela Redução Férrica (FRAP)	60
2.4.1.1.2 Ensaio da Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC)	62
2.4.1.1.3 Ensaio do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	66
2.4.1.2 Métodos que empregam lipídeos como substrato	68
2.4.1.2.1 Sistema β -caroteno e ácido linoléico	70
2.4.1.2.2 Ensaio das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	71
2.4.1.2.3 Método Rancimat	74
2.4.2 Principais métodos <i>in vivo</i>	77
2.4.2.1 Avaliação da peroxidação lipídica	81
2.4.2.1.1 Medida da perda de substrato	81
2.4.2.1.2 Quantificação de produtos da peroxidação lipídica	82
3. OBJETIVOS	86
3.1 Objetivo geral	86
3.2 Objetivos específicos	86
4. MATERIAL E MÉTODOS	87
4.1 Material	87
4.1.1 Amostra	87

	Pág.
4.1.2 Reagentes	87
4.1.3 Animais	88
4.2 Métodos	88
4.2.1 Preparo da amostra	88
4.2.2 Determinação da composição centesimal	89
4.2.2.1 Determinação do teor de umidade e substâncias voláteis a 105° C	89
4.2.2.2 Determinação do teor de lipídeos totais	89
4.2.2.3 Determinação do teor de proteínas totais	90
4.2.2.4 Determinação do teor de Resíduo Mineral Fixo (RMF)..	90
4.2.2.5 Determinação do teor de glicídeos totais por diferença	90
4.2.3 Caracterização da fração lipídica	91
4.2.3.1 Obtenção da fração lipídica	91
4.2.3.2 Esterificação, identificação e quantificação dos ácidos graxos por cromatografia a gás	92
4.2.4 Determinação de fenólicos totais	93
4.2.4.1 Extração dos fenólicos totais	93
4.2.4.2 Dosagem dos fenólicos totais	94
4.2.5 Obtenção dos extratos	94
4.2.5.1 Extração seqüencial com solventes de diferentes polaridades	94
4.2.5.2 Determinação do teor de matéria seca dos extratos	96
4.2.6 Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	96
4.2.6.1 Sistema β -caroteno e ácido linoléico	97
4.2.6.1.1 Estudo cinético da atividade antioxidante no sistema β -caroteno e ácido linoléico	98
4.2.6.2 Ensaio do Poder Antioxidante pela Redução Férrica (FRAP)	101

	Pág.
4.2.6.3 Ensaio do radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).....	102
4.2.6.4 Ensaio da Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC)	102
4.2.6.5 Método Rancimat	104
4.2.7 Identificação de compostos fenólicos	105
4.2.7.1 Padrões empregados	105
4.2.7.2 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos por cromatografia à gás	105
4.2.8 Determinação da atividade antioxidante <i>in vivo</i>	106
4.2.8.1 Obtenção do extrato	106
4.2.8.2 Preparo da solução placebo	107
4.2.8.3 Procedimento experimental com animal de laboratório.	107
4.2.8.4 Caracterização da fração lipídica dos tecidos dos animais	109
4.2.8.4.1 Obtenção da fração lipídica	109
4.2.8.4.2 Esterificação, identificação e quantificação dos ácidos graxos por cromatografia a gás ..	110
4.2.8.5 Análise da peroxidação lipídica nos tecidos dos animais	110
4.2.8.5.1 Determinação das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	110
4.2.8.5.2 Quantificação do conteúdo de proteína	111
4.2.8.5.3 Cálculo da peroxidação lipídica	112
4.2.8.6 Análise estatística	113
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	114
5.1 Determinação da composição centesimal	114

	Pág.
5.2 Caracterização da fração lipídica	115
5.3 Determinação dos fenólicos totais	117
5.4 Determinação do teor de matéria seca dos extratos	119
5.5 Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	121
5.5.1 Sistema β -caroteno e ácido linoléico	121
5.5.1.1 Estudo cinético da atividade antioxidante no sistema β -caroteno e ácido linoléico	127
5.5.2 Ensaio do Poder Antioxidante pela Redução Férrica (FRAP)	129
5.5.3 Ensaio do radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	133
5.5.4 Ensaio da Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC)	137
5.5.5 Método Rancimat	144
5.6 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos	147
5.7 Determinação da atividade antioxidante <i>in vivo</i>	149
5.7.1 Efeitos <i>in vivo</i> do extrato aquoso	149
5.7.1.1 Avaliação do perfil lipídico e de TBARS no tecido adiposo	150
5.7.1.2 Avaliação do perfil lipídico e de TBARS no tecido cerebral	154
5.7.1.3 Avaliação do perfil lipídico e de TBARS no tecido hepático	158
5.7.1.4 Avaliação do perfil lipídico e de TBARS no plasma	162
6. CONCLUSÕES	168
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	170
8. ANEXOS	192

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
Figura 1. Produção mundial de semente de girassol entre 2003 e 2004	06
Esquema 1. Inter-relações entre o metabolismo primário e secundário nas plantas	12
Figura 2. Estruturas químicas básicas das principais classes de compostos fenólicos	15
Figura 3. Estruturas químicas das principais classes de flavonóides	20
Figura 4. Estrutura básica e sistema de numeração dos flavonóides	21
Figura 5. Estruturas químicas dos taninos hidrolisáveis e condensados	23
Figura 6. Estrutura química das calconas	24
Figura 7. Estrutura química das cumarinas	25
Figura 8. Fórmula geral e denominações dos ácidos benzóicos	27
Figura 9. Fórmula geral e denominações dos ácidos cinâmicos	28
Figura 10. Estrutura química do ácido clorogênico	29
Figura 11. Estágios do desenvolvimento do câncer e interações potenciais dos compostos fenólicos de plantas	35
Figura 12. Fontes de ROS durante a vida intraeritrocítica do <i>P.</i> <i>Falciparum</i>	41
Figura 13. Rotas envolvidas no metabolismo dos compostos fenólicos de plantas	49

Esquema 2. Obtenção dos extratos da farinha do cotilédone da semente de girassol por extração seqüencial com solventes de diferentes polaridades, segundo MOREIRA	95
Figura 14. Tangentes das curvas cinéticas apresentadas pelo meio contendo o extrato e o controle sem antioxidante	99
Figura 15. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etanólico do cotilédone da semente de girassol (G) no sistema β -caroteno e ácido linoléico	125
Figura 16. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol (G) no sistema β -caroteno e ácido linoléico	125
Figura 17. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etanólico do cotilédone da semente de girassol (G) no ensaio FRAP	132
Figura 18. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol (G) no ensaio FRAP	132
Figura 19. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etanólico do cotilédone da semente de girassol (G) no ensaio DPPH	136
Figura 20. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol (G) no ensaio DPPH	136

Figura 21. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etanólico do cotilédone da semente de girassol (G) no ensaio ORAC	139
Figura 22. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol (G) no ensaio ORAC	139
Figura 23. Atividade antioxidante das frações etanólica e aquosa do cotilédone da semente de girassol, associadas com diferentes concentrações de BHT no sistema β -caroteno ácido linoléico	141
Figura 24. Atividade antioxidante das frações etanólica e aquosa do cotilédone da semente de girassol, associadas com diferentes concentrações de BHT no ensaio FRAP	141
Figura 25. Atividade antioxidante dos extratos etanólico e aquoso do cotilédone semente de girassol, associadas com diferentes concentrações de BHT no ensaio DPPH	142
Figura 26. Atividade antioxidante dos extratos etanólico e aquoso do cotilédone da semente de girassol, associadas com diferentes concentrações de BHT no ensaio ORAC	142
Figura 27. Percentagem de aumento do período de indução do extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol rajada e do BHT, associadas com o BHA no método Rancimat a 100° C	145

LISTA DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1. Principais métodos baseados no seqüestro de radicais livres	59
Quadro 2. Principais métodos que empregam lipídeos como substrato	69
Quadro 3. Principais métodos para avaliação da atividade antioxidante total e do dano oxidativo <i>in vivo</i>	80
Quadro 4. Resumo do experimento com animais de laboratório	109

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Composição centesimal (base úmida) da semente de girassol rajada em g/100 g de amostra ($\pm$ desvio padrão)	114
Tabela 2. Perfil de ácidos graxos da fração lipídica da semente estudada	116
Tabela 3. Teor de fenólicos totais da semente de girassol rajada em g/100 g de amostra ($\pm$ desvio padrão)	118
Tabela 4. Teor de matéria seca dos extratos obtidos por extração seqüencial com solventes de diferentes polaridades	120
Tabela 5. Percentagem de inibição da oxidação dos extratos do cotilédone da semente de girassol rajada no sistema β -caroteno e ácido linoléico	122
Tabela 6. Parâmetros cinéticos do potencial antioxidante no sistema β -caroteno e ácido linoléico dos extratos etanólico e aquoso do cotilédone da semente de girassol	127
Tabela 7. Atividade antioxidante dos extratos etanólico e aquoso do cotilédone da semente de girassol no FRAP	130
Tabela 8. Atividade antioxidante dos extratos etanólico e aquoso do cotilédone da semente de girassol no ensaio DPPH	134
Tabela 9. Atividade antioxidante dos extratos etanólico e aquoso do cotilédone da semente de girassol no ensaio ORAC	138

Tabela 10. Percentagem de aumento do período de indução do extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol no método Rancimat a 110°C	145
Tabela 11. Compostos fenólicos presentes no extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol rajada	148
Tabela 12. Peso (g) dos animais dos grupos controle e experimentais G1 e G2, durante 29 dias	150
Tabela 13. Perfil de ácidos graxos do tecido adiposo dos animais do grupo controle e experimentais G1 e G2, que receberam extrato aquoso durante 29 dias	152
Tabela 14. Peroxidação lipídica no tecido adiposo dos animais do grupo controle e experimentais G1 e G2, que receberam o extrato aquoso durante 29 dias	153
Tabela 15. Perfil de ácidos graxos do tecido cerebral dos animais do grupo controle e experimentais G1 e G2, que receberam o extrato aquoso durante 29 dias	156
Tabela 16. Peroxidação lipídica no tecido cerebral dos animais do grupo controle e experimentais G1 e G2, que receberam o extrato aquoso durante 29 dias	157

Tabela 17. Perfil de ácidos graxos do tecido hepático dos animais do grupo controle e experimentais G1 e G2, que receberam o extrato aquoso durante 29 dias	160
Tabela 18. Peroxidação lipídica no tecido hepático dos animais do grupo controle e experimentais G1 e G2, que receberam o extrato aquoso durante 29 dias	161
Tabela 19. Perfil de ácidos graxos plasmáticos dos animais do grupo controle e experimentais G1 e G2, que receberam o extrato aquoso durante 29 dias	164
Tabela 20. Peroxidação lipídica plasmática dos animais do grupo controle e experimentais G1 e G2, que receberam o extrato aquoso durante 29 dias	165

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropano)diidrocloreto
ABTS ^{·+}	Radical 2,2-azinobis-(3-etilbnzotiazolina-6-sulfonato)
AOM	Método Oxigênio Ativo
AUC	Área sob a curva
BHT	Hidroxibutiltolueno
BHA	Hidroxibutylanisol
BSA	Albumina sérica bovina
CG	Cromatografia a gás
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL-EM	Cromatografia líquida-espectrometria de massa
DCFH	Diclorofluoresceína-diacetato
DHA	ácido docosaheptaenóico
DPPH [·]	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EDTA	Etileno diamino tricloro acético
EAq	Extrato aquoso
EEta	Extrato etanólico
F1 e F2	Fatores cinéticos
FL	Fluoresceína

FRAP	Poder antioxidante em redução férrica
FRASC	Poder antioxidante em redução férrica e concentração de ácido ascórbico
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
MDA	Malonaldeído
$\text{NO}^\cdot$	Radical óxido nítrico
$\text{ROO}^\cdot$	Radical peroxil
$\text{O}_2^\cdot$	Radical superóxido
$\text{OH}^\cdot$	Radical hidroxil
ORAC	Capacidade de absorção do radical oxigênio
OSI	Índice de estabilidade do óleo
PI	Período de indução
PUFAs	Ácidos graxos poliinsaturados
R ou β -PE	R ou β -Picoeritrinas
RMF	Resíduo mineral fixo
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Substâncias reativas oxigenadas
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TEAC	Capacidade antioxidante em equivalente TROLOX
Tg	Tangente
TMP	1,1,3,3-tetrametoxipropano
TPTZ	Tripiridiltriazina
TRAP	Parâmetro armadilha radical total
TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetracromano-2-carboxílico

LISTA DE SÍMBOLOS

mg	Miligramma
mL	Mililitro
mm	Milimetro
M	Molaridade de soluções
nm	Nanômetro
N	Normalidade de soluções
nMol	Nanomol
µg	Microgramma
µL	Microlitro
µM	Micromol
v/v	Volume/volume
ppm	partes por milhão
p/v	Peso/volume

RESUMO

No presente trabalho foi avaliada a capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos do cotilédone da semente de girassol rajada, obtidos por extração seqüencial com solventes de diferentes polaridades, bem como avaliado o potencial antioxidante *in vivo* do extrato que apresentou maior capacidade *in vitro*. Todos os parâmetros *in vitro* (sistema β -caroteno/ácido linoléico, métodos FRAP, DPPH, ORAC e Rancimat) indicaram o extrato aquoso (EAq) como o de maior capacidade. Neste extrato, o ácido clorogênico (12,88%) foi identificado como o principal componente dos ácidos fenólicos. Na avaliação da capacidade antioxidante *in vivo*, ambas as determinações empregadas (TBARS e perfil de ácidos graxos) indicaram o EAq como capaz de exercer um efeito protetor sobre os ácidos graxos poliinsaturados dos tecidos adiposo, cerebral, hepático e plasmático de ratos Wistar machos recém-desmamados.

ABSTRACT

The aims of this work were to evaluate the *in vitro* antioxidant capacity of listed sunflower cotyledon extracts, obtained by a sequential extraction with solvents of different polarities, and to evaluate the *in vivo* antioxidant potential of the sample extract with highest *in vitro* capacity. All the *in vitro* parameters (β -carotene/linoleic acid system, FRAP, DPPH, ORAC and Rancimat methods) indicated the aqueous extract (EAq) as the extract with highest capacity. In this extract, the chlorogenic acid (12.88%) was identified as the principal fraction of phenolic acids. In the *in vivo* antioxidant capacity evaluation, both determinations used (TBARS and fatty acids profile) gave indication that the EAq was capable to exercise a protective effect on the polyunsaturated fatty acids of the adipose, cerebral, hepatic and plasm tissues of Wistar male rats just-weaned.

1. INTRODUÇÃO

Com o crescimento do consumo de óleo comestível, a produção mundial de girassol nos últimos 10 anos tem sido variável. Atualmente os líderes mundiais na produção desta semente são a antiga União Soviética, a Argentina, os Estados Unidos e a China. Existem hoje basicamente dois tipos de sementes de girassol comercialmente cultivadas: uma pequena e preta, processada em óleo e farinha, e outra rajada, que em nosso país vem sendo empregada como alimento para pássaros e outras aves mas poderia também se prestar ao consumo humano através de uma variedade de produtos alimentícios.

A semente de girassol rajada é rica em proteínas e fibra dietética. É ainda excelente fonte de vitaminas e minerais. Pesquisas recentes sugerem também que esta semente é boa fonte de fitoquímicos, incluindo tocoferóis, colina, betaína, lignina, arginina e ácidos fenólicos.

Os compostos fenólicos têm recebido crescente interesse nos últimos anos, uma vez que são encontrados em quantidades substanciais em plantas e que o consumo de vegetais ou bebidas ricas nos mesmos pode reduzir o risco do desenvolvimento de várias doenças devido, entre outras, a sua atividade antioxidante.

Assim, vários estudos têm analisado o potencial antioxidante de uma grande variedade de alimentos. Como consequência, apareceram também vários ensaios para avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* em diferentes tipos de amostras, particularmente em matrizes complexas como vinho, frutas e outros vegetais. Estes ensaios envolvem diferentes mecanismos do sistema de defesa antioxidante, desde a

quelação de íons metálicos até a medida da prevenção do dano oxidativo à biomoléculas, e oferecem resultados numéricos distintos e difíceis de comparar.

Da mesma forma, também tem sido propostos diferentes ensaios para a avaliação da atividade antioxidante *in vivo*.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos do cotilédone da semente de girassol (*Helianthus annuus* L.) rajada, obtidos a partir de um processo de extração seqüencial com solventes de diferentes polaridades, bem como avaliar a capacidade antioxidante *in vivo* do extrato da amostra que apresentou maior capacidade antioxidante *in vitro*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 As sementes e sua importância

Sabe-se que as sementes são o órgão das plantas responsável pela perpetuação da espécie e carregam, por isso, toda a informação genética necessária para a formação de um novo indivíduo.

Além disso, as sementes armazenam nutrientes (proteínas, glicídeos, lipídeos, vitaminas e minerais) necessários ao seu desenvolvimento embrionário, cuja finalidade é formar uma planta jovem que possua substâncias necessárias à sua proteção (MURRAY, 1984), tais como fatores antinutricionais, hidrolases, glicoproteínas e compostos fenólicos. Estas substâncias atuam modificando propriedades da matriz extracelular, possuem atividade antimicrobiana ou catalisam a síntese de produtos com esta atividade, bem como possuem atividade antitripsínica e de hemaglutinação ou mesmo não apresentam funções conhecidas (BOWLES, 1990; FERNANDES, 1993).

Sabe-se também que cerca de 70% de todo o consumo humano de alimentos é representado por sementes (cereais e leguminosas) e que esses grãos constituem cerca de 50 e 70% do total de proteínas e calorias ingeridas através da dieta, respectivamente (ESKIN, 1990). Na dieta brasileira, estes grãos são representados principalmente pelo arroz e feijão. Entretanto, outros grãos ou sementes podem ser complementarmente incorporados ao nosso hábito alimentar, enriquecendo o valor nutritivo da nossa dieta.

2.2 A semente de girassol

O girassol é planta da família *Compositae*. Acredita-se que a forma selvagem desta planta seja originária das Américas, podendo ser encontrado em seu estado mais selvagem desde as planícies do noroeste do Canadá até a América do Sul. Foi uma colheita comum entre as tribos americanas, que o cultivaram com uma variedade de sementes coloridas incluindo a preta, a branca, a vermelha e as riscadas de branco e preto. Evidências sugerem que seu cultivo pode ter se dado há 3.000 anos a.C, tendo sido domesticado antes mesmo do milho (ÚNGARO, 2000).

Em 1569, exploradores espanhóis levaram o girassol para a Espanha como planta ornamental e como hortaliça. Somente em 1716, uma patente inglesa foi concedida para a prensagem da semente e obtenção do óleo que, por volta de 1830, foi manufaturado para uso comercial e doméstico em toda a Europa (HOLLIDAY & PHILLIPS, 2001).

No início do século XVIII o girassol foi introduzido na Rússia como planta ornamental e, posteriormente, se desenvolveu como a maior cultura de sementes para a produção de óleo (CAVASIN JR., 2001).

No final do século XIX, a semente russa fez seu caminho de volta a América e, em 1926, ocorreu o primeiro processo comercial para extração do óleo a partir da semente de girassol nos Estados Unidos (HOLLIDAY & PHILLIPS, 2001).

Uma vez que é fonte considerável de óleo vegetal, nos anos pós-guerra e mais particularmente no final dos anos 60, esforços foram feitos para se estabelecer o

girassol como uma colheita de sementes oleaginosas em outras partes do mundo. Através de programas de cultura da planta, híbridos foram desenvolvidos com vista a substituir as variedades polinizadas, buscando um aumento no rendimento por acre e no conteúdo do óleo, uniformidade no peso e maturidade da planta bem como maior resistência a doenças (MORRINSON, HAMILTON & KALU, 1995).

Desde então, com o crescimento do consumo de óleo comestível, a produção mundial de girassol tem sido variável. Nos últimos 10 anos, a produção desta semente elevou-se de uma média de 23,5 milhões de toneladas, em meados da década de 90 (AGRICULTURE AND AGRI-FOOD CANADA, 2000), para 27,3 milhões de toneladas entre 1999 e 2000. Porém, declinou para 21,4 milhões de toneladas entre 2001 e 2002 (AGRICULTURE AND AGRI-FOOD CANADA, 2003), elevando-se novamente para 24,4 milhões de toneladas em 2004. Atualmente, os líderes mundiais na produção de semente de girassol são a antiga União Soviética, a Argentina, os Estados Unidos e a China (CENTER FOR AGRICULTURAL POLICY AND TRADE STUDIES, 2004).

A FIGURA 1 mostra a produção mundial de semente de girassol entre 2003 e 2004.

FIGURA 1. Produção mundial de girassol (24,4 Mt) entre 2003 e 2004

2.2.1 Cultivo

O cultivo do girassol é relativamente fácil, podendo se desenvolver e produzir satisfatoriamente em locais onde outras espécies são bastante prejudicadas pela falta de chuvas. A produção tende a ser mais elevada quando o girassol é plantado após leguminosas e cereais, devido ao fato destes serem imunes a maior parte dos fungos e plantas daninhas que parasitam o girassol e melhorarem as condições do

solo. Grãos como soja e milho são os mais adequados a serem plantados antes do girassol. A rotatividade das culturas de soja e girassol melhora em cerca de 15% a produção de ambas, enquanto que o milho e girassol produz, em média, 30% a mais (ANGELINI, ÚNGARO & TURATTI, 1999).

Entretanto, apesar de estar entre as quatro maiores culturas em utilização no mundo, o Brasil ainda não está totalmente envolvido com a cultura do girassol. Contudo, devido a sua importância econômica, o girassol vem lentamente conquistando espaço e despertando a curiosidade e o interesse dos produtores rurais brasileiros (REGITANO D' ARCE, 1997).

2.2.2 Comercialização

O girassol é uma planta da qual tudo se aproveita: raízes (reciclagem de nutrientes e matéria orgânica para o solo), hastes (material para forragem acústica), folhas (adubação verde, juntamente com as hastes), flores (extração de mel) e sementes (ÚNGARO, 2000).

Existem hoje basicamente dois tipos de sementes comercialmente cultivadas: uma pequena e preta, rica em óleo, processada em óleo e farinha e outra mais larga e rajada que, a exemplo do que ocorre em outros países como os EUA onde também é chamada de "confectionery varieties", pode servir ao consumo humano através de produtos alimentícios, de aperitivos a pães, devido a sua riqueza em nutrientes (HOLLIDAY & PHILLIPS, 2001).

Entretanto, mais de 90% da produção mundial de semente de girassol destina-se a elaboração de óleo comestível e somente os 10% restantes vêm sendo empregados para alimentação animal e consumo humano (MORRISON, HAMILTON & KALU, 1995).

A semente para a produção de óleo é cultivada exclusivamente para este fim. Não se encontra registro de consumo humano de girassol oleaginoso. Sua alta percentagem de casca seria um impedimento (REGITANO-D' ARCE, 1997).

No final dos anos 80, houve em nosso país um aumento significativo na demanda pelo óleo de girassol, considerado mais saudável devido ao maior teor de gorduras poliinsaturadas e também maior teor de ácido linoléico, um ácido graxo essencial ao organismo humano. Como consequência, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) estimulou o fomento da cultura do girassol no sul do país, como uma alternativa para a soja ou para cultivá-lo em seguida a ela, antes do trigo. Entretanto, problemas com doenças interromperam a expansão da mesma e as indústrias de óleo passaram a importar girassol da Argentina. Na década seguinte, a cultura ganhou novo incentivo com a introdução de práticas agrícolas e de sementes melhoradas geneticamente, que levaram a rendimentos maiores e, adicionalmente, com o projeto de construção de uma indústria de óleo vegetal totalmente adaptada e projetada para trabalhar com a semente de girassol no próprio país (REGITANO-D'ARCE, 1991). A área cultivada com girassol cresceu gradativamente em nosso país nos últimos anos, tendo saltado de 11 mil hectares, em 1997, para os atuais 55,8 mil hectares. Os maiores produtores brasileiros de semente de girassol são os estados de Goiás (34,5 mil hectares) e Mato Grosso do

Sul (8,3 mil hectares) (BUNGE, 2004). Apesar destas iniciativas, a possibilidade de expansão deste mercado em nosso país ainda é grande, pois produzimos somente cerca de 4,5% do óleo de girassol que consumimos anualmente. O restante continua sendo importado, sobretudo da Argentina.

Quanto a farinha ou farelo de girassol, rico em proteína, seu emprego na alimentação humana ainda é pequeno. Referências são encontradas na literatura de administração destes grãos e farelos a animais, substituindo parte da ração ocupada pelo algodão, milho ou soja (O' BRIEN, 1998).

Por outro lado, a semente rajada, que serve para consumo como tal, requer casca espessa e macia, tamanho e cor uniforme. Neste caso, o conteúdo de óleo não é o critério mais relevante. Em nosso país, a semente rajada vem comumente sendo comercializada como alimento para pássaros e outras aves. Seu consumo direto na alimentação humana dá-se mais comumente na região sul, onde os emigrantes europeus têm o hábito de consumirem suas amêndoas torradas (ANGELINI, ÚNGARO & TURATTI, 1999).

2.2.3 Valor nutritivo

A semente de girassol rajada possui elevado teor de proteína que, embora não forneça todos os aminoácidos essenciais, quando combinada com grãos como fonte complementar de proteína, eleva o valor biológico das proteínas vegetais. Segundo Holliday & Phillips (2001), sendo rica em fibra dietética, o consumo de semente de girassol poderia auxiliar na redução do colesterol sanguíneo, na diminuição da

incidência de câncer, hipertensão e obesidade. A semente de girassol é ainda excelente fonte de vitaminas e minerais, incluindo tiamina, folato, vitamina B₆, vitamina E, ferro, fósforo, magnésio, zinco, cobre e selênio. Vários destes micronutrientes têm sido relacionados com benefícios à saúde.

Ainda de acordo com Holliday & Phillips (2001), pesquisas recentes sugerem também que a semente de girassol é boa fonte de fitoquímicos, incluindo tocoferóis, colina, betaína, lignina, arginina e ácidos fenólicos. Nos últimos anos estudos epidemiológicos têm mostrado que o consumo humano de muitos destes fitoquímicos pode reduzir o risco de aparecimento de várias doenças devido, entre outras, a atividade antioxidante dos mesmos (DUTHIE, GARDNER & KYLE, 2003).

Contudo, a maioria dos estudos tem dado grande importância ao β -caroteno, tocoferol e ácido ascórbico, apesar da existência de vários outros componentes nos alimentos vegetais com atividade antioxidante, além dessas vitaminas tradicionais (DUTHIE, DUTHIE & KYLE, 2000). O número de artigos publicados sobre os compostos fenólicos ainda é escasso.

2.3 Os compostos fenólicos da dieta

Como serão discutidos nas seções que se seguem, os compostos fenólicos constituem um dos mais numerosos e amplamente distribuídos grupos de metabólitos secundários de plantas, cuja atividade antioxidante depende em grande parte da estrutura química dos mesmos (SCALBERT & WILLIAMSON, 2000).

2.3.1 Origem e funções na planta

O metabolismo das plantas é dividido didaticamente em primário e secundário. As substâncias que são comuns aos seres vivos e essenciais para a manutenção das células (lipídeos, proteínas, glicídeos, ácidos nucleicos) são originadas do metabolismo primário. As substâncias oriundas a partir de rotas biossintéticas diversas e que estão restritas a determinados grupos de organismos, são produtos do metabolismo secundário (VICKERY & VICKERY, 1981).

No ESQUEMA 1 encontram-se representadas as inter-relações entre o metabolismo primário e secundário nas plantas.

Biogeneticamente, os compostos fenólicos procedem de duas rotas metabólicas: a rota do ácido chiquímico, onde se formam principalmente fenilpropanóides, e a rota do ácido acético, cujos principais produtos são os fenóis simples. A combinação de ambas leva à formação dos flavonóides, grupo de compostos fenólicos mais abundantes na natureza (SÁNCHEZ-MORENO, 2002^a).

A maioria dos compostos fenólicos de plantas é sintetizada através da via fenilpropanóide, a qual se inicia com o ácido 4-hidroxi-cinâmico (ácido *p*-cumárico) derivado da fenilalanina. A fenilalanina é desaminada a ácido cinâmico, o qual entra na via fenilpropanóide (HOLLMAN, 2001).

ESQUEMA 1. Inter-relações entre o metabolismo primário e secundário nas plantas

Substituições do ácido cinâmico com grupos hidroxil ou metoxil nas posições 3 e 5 dão origem aos ácidos caféico, ferúlico e sinápico. Adicionalmente, a partir do ácido hidroxicinâmico, pelo encurtamento ou alongamento da cadeia sem formação de anel, são formados compostos como o ácido benzóico e derivados, estirenos, acetofonas e gingeróis. A adição de ésteres cíclicos na cadeia lateral produz hidroxycumarinas e cromononas e várias reações de condensação com os resíduos malonil produzem xantonas, estilbenos e flavonóides (DUTHIE, DUTHIE & KYLE, 2000).

Pelas vias biossintéticas para síntese de flavonóides, através de etapas de condensação e polimerização ainda não bem elucidadas, são formados os taninos não hidrolisáveis ou condensados. Os taninos hidrolisáveis são derivados do ácido gálico ou ácido hexahidroxidifênico (STAFFORD, 1983).

Assim, todos estes compostos possuem como característica comum a presença de pelo menos um anel aromático hidroxil-substituído (MORTON *et al.*, 2000).

Outra característica destas substâncias é apresentarem-se comumente ligadas a outras moléculas, freqüentemente a açúcares (glicosil-resíduos) e proteínas. A existência de compostos fenólicos na forma livre nos tecidos das plantas também ocorre, porém é menos comum (SOARES, 2002) possivelmente devido ao fato de serem tóxicos quando em estado livre e detoxificados, pelo menos em parte, quando ligados. Em função disto, possuem um papel relacionado a proteção da planta contra insetos e outros animais. Muitos compostos fenólicos de baixo peso molecular, como o timol, são empregados na medicina como anti-sépticos devido a sua toxicidade.

São também os diferentes tipos de ligações entre o resíduo glicosil e os flavonóides como, por exemplo, as antocianinas que levam aos diferentes derivados que ampliam a faixa de cores e gradações coloridas das flores (HARBORNE, 1980).

Desta forma, os compostos fenólicos são essenciais para a fisiologia e metabolismo celular, estando envolvidos em várias funções na planta tais como propriedades sensoriais (cor, aroma, sabor e adstringência), estrutura, polinização e resistência a pragas, predadores e processos germinativos da semente pós-colheita bem como crescimento, desenvolvimento e reprodução, entre outras (TOMÁS-BARBERÁN & ESPÍN, 2001).

Por se constituírem em um amplo número de estruturas heterogêneas, que englobam desde moléculas mais simples até compostos altamente polimerizados, os compostos fenólicos podem ser classificados sob diferentes aspectos.

2.3.2 Classificação

Quanto ao seu esqueleto carbônico, os compostos fenólicos podem ser divididos em 16 classes principais (HARBORNE, 1989; HARBORNE, 1994). Na FIGURA 2 encontram-se as estruturas químicas básicas das principais classes de compostos fenólicos.

Classe	Esqueleto Básico	Estrutura Básica
Fenóis simples	C_6
Benzoquinonas	C_6
Ácidos Fenólicos	C_6-C_1
Acetofenonas	C_6-C_1
Ácidos fenilacéticos	C_6-C_2
Ácidos Hidroxicinâmicos	C_6-C_3
Fenilpropenos	C_6-C_3
Cumarinas, isocumarinas	C_6-C_3
Cromonas	C_6-C_3
Naftoquinonas	C_6-C_6
Xantonas	$C_6-C_6-C_6$
Estilbenos	$C_6-C_3-C_6$
Antraquinonas	$C_6-C_6-C_6$
Flavonóides	$C_6-C_3-C_6$
Lignanas, neolignanas	$(C_6-C_3)_2$	
Ligninas	$(C_6-C_3)_2$	

FIGURA 2 - Estruturas químicas básicas das principais classes de compostos fenólicos

Quanto a sua distribuição na natureza, os compostos fenólicos podem ser divididos em três classes: pouco distribuídos (como os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona, o resorcinol e os aldeídos derivados dos ácidos benzóicos, que são constituintes dos óleos essenciais como a vanilina), largamente distribuídos (divididos em flavonóides e derivados, ácidos fenólicos como o benzóico e o cinâmico, bem como os derivados dos mesmos, e cumarinas), e polímeros (como os taninos e as ligninas) (SOARES, 2002).

Quanto a localização na planta (livres na fração solúvel da célula ou ligados a compostos da parede celular), juntamente com a estrutura química destas substâncias, os compostos fenólicos podem ainda ser classificados em: solúveis, como os fenóis simples, flavonóides e taninos de baixo e médio peso molecular não unidos a compostos de membrana, e insolúveis, constituídos basicamente pelos taninos condensados, ácidos fenólicos e outros compostos fenólicos de baixo peso molecular unidos a polissacarídeos da parede celular ou proteínas formando complexos estáveis insolúveis. Esta classificação é útil do ponto de vista nutricional na medida em que o destino metabólico no trato gastrointestinal, bem como os efeitos fisiológicos de cada grupo, vão depender, em grande parte, de suas características de solubilidade. Os compostos fenólicos insolúveis não são digeridos e podem ser recuperados, parcialmente ou totalmente, de forma quantitativa nas fezes enquanto uma parte dos solúveis pode atravessar a barreira intestinal e ser encontrada no sangue, como tais ou como metabólitos (glucosono e sulfoconjugados), exercendo efeitos fisiológicos (SÁNCHEZ-MORENO, 2002^a).

Pesquisas recentes têm demonstrado que vários destes produtos fenólicos da via biossintética fenilpropanóide de plantas possuem considerável atividade antioxidante (HOLLMAN, 2001).

2.3.3 Atividade antioxidante

A efetividade antioxidante de muitos compostos fenólicos é, essencialmente, resultado da facilidade com a qual um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxil (OH) da estrutura aromática é doado para um radical livre, bem como a habilidade da mesma em suportar um elétron não-emparelhado através do deslocamento do mesmo ao redor de todo o sistema de elétron da molécula (DUTHIE, GARDNER & KYLE, 2003).

Assim, a eficiência dos compostos fenólicos como antioxidantes depende de um número de determinantes estruturais, incluindo o número e posição dos grupos OH, o tipo e posição da glicosilação e o grau de impedimento estérico ao lado da abstração de hidrogênio. O fenol por si só é inativo como antioxidante. Entretanto, os compostos *orto* e *para*-difenois possuem atividade antioxidante, a qual aumenta com a substituição de seus átomos de hidrogênio por grupos etil ou *n*-butil (SÁNCHEZ-MORENO, 2002^b).

Em função disto, os compostos fenólicos incluem-se principalmente na categoria de antioxidantes seqüestradores de radicais livres, interrompendo a reação em cadeia provocada por estes. Os radicais fenoxilo formados, devido a conformação molecular, são intermediários bastante estáveis e não iniciam facilmente uma nova

reação em cadeia. Estes radicais intermediários atuam reagindo com outros radicais livres terminando as reações de propagação (SHAHIDI & WANASUNDARA, 1992).

Todavia, os compostos fenólicos podem também exercer sua ação antioxidante através de outros mecanismos, tais como quelantes de íons metálicos que catalisam reações de peroxidação lipídica e, desta forma, também previnem a geração de radicais livres de iniciação através das reações de Fenton (DUTHIE, DUTHIE & KYLE, 2000).

O comportamento antioxidante dos compostos fenólicos parece também estar relacionado com a sua capacidade de inibir a ação da enzima lipoxigenase (MARTÍNEZ-VALVERDE, PERIAGO & ROS, 2000).

Entre os compostos fenólicos com uma reconhecida atividade antioxidante, destacam-se:

2.3.3.1 Flavonóides

De acordo com o grau de hidroxilação e presença de uma C₂-C₃ dupla ligação no anel pirona heterocíclico, os flavonóides podem ser divididos em 13 classes (SÁNCHEZ-MORENO, 2002^a), sendo as mais importantes representadas pelos flavonóis, flavanóis, flavonas, isoflavonas, antocianinas, proantocianidinas e flavanonas (SCALBERT & WILLIAMSON, 2000). Dentro destas classes existem numerosas variações estruturais de acordo com o grau de hidrogenação e hidroxilação dos três sistemas de anéis destes compostos. Os flavonóides também ocorrem como derivados metilados e sulfatados, conjugados com monossacarídeos e

dissacarídeos e formando complexos com oligossacarídeos, lipídeos, aminas, ácidos carboxílicos e orgânicos, sendo conhecidos hoje aproximadamente 8.000 compostos (DUTHIE, GARDNER & KYLE, 2003).

As estruturas químicas das principais classes de flavonóides encontram-se na FIGURA 3.

Enquanto os membros de algumas classes (por exemplo, flavononas) são incolores, os de outras (por exemplo, antocianinas) são sempre coloridos, como os pigmentos de flores e outras partes das plantas (HARBORNE, 1980).

Os flavonóides são importantes constituintes da dieta humana (HERTOG, HOLLMAMN & VENEMA, 1992; JOVANOVIC *et al.*, 1994), sendo os polifenóis mais comumente distribuídos nos vegetais e também os mais estudados. Estão entre os mais potentes antioxidantes de plantas (BRAVO, 1998).

A atividade antioxidante ótima dos flavonóides se relaciona com a presença de grupos hidroxil nas posições 3' e 4' do anel B, os quais conferem uma elevada estabilidade ao radical formado, participando no deslocamento do elétron, e uma dupla ligação entre os carbonos C₂ e C₃ do anel C em conjugação com o grupo carbonilo na posição C₄, o qual torna possível o deslocamento de um elétron do anel B. Finalmente, grupos hidroxil livres na posição 3 do anel C e na posição 5 do anel A, juntamente com o grupo carbonilo na posição 4, também são importantes para a atividade antioxidante destes compostos. A quercetina, um flavonóide que reúne todas estas características, é um dos antioxidantes naturais mais potentes (SÁNCHEZ-MORENO, 2002^b).

Flavonóide	Estrutura Básica
Diidrocalconas
Auronas
Flavonas
Flavonóis
Diidroflavonóis
Flavanonas
Flavanóis
Flavandióis ou leucoantocianidinas
Antocianidinas
Isoflavonóides
Biflavonóides

FIGURA 3. Estruturas químicas das principais classes de flavonóides

A FIGURA 4 mostra a estrutura básica e o sistema de numeração dos flavonóides.

FIGURA 4. Estrutura básica e sistema de numeração dos flavonóides

A eficiência dos flavonóides diminui com a substituição de grupos hidroxil por açúcares, sendo os glicosídeos menos antioxidantes que suas agliconas correspondentes (RICE-EVANS, MILLER & PAGANGA, 1996).

2.3.3.2 Taninos

Os taninos são compostos fenólicos de peso molecular de intermediário a elevado (500 a 3.000 D) (SÁNCHEZ-MORENO, 2002^a) e podem ser classificados em dois grandes grupos: taninos hidrolisáveis e taninos não-hidrolisáveis ou

condensados (CHUNG *et al.*, 1998). Existe um terceiro grupo de taninos, os phlorotaninos, que são encontrados somente em algas marinhas marrons, não sendo comumente consumidos por humanos (RAGAN & GLOMBITZA, 1986).

Os taninos hidrolisáveis possuem um núcleo central de glicose, ou um álcool poliídrico, esterificado parcial ou completamente com o ácido gálico ou o ácido hexaidroxidifênico formando os galotaninos e elagitaninos, respectivamente (OKUDA, YOSHIDA & HATANO, 1995). Estes metabólitos são prontamente hidrolisáveis com ácidos, bases ou enzimas. Contudo, podem também oxidativamente se condensar a outras moléculas galoil e hexaidroxidifênica e formar polímeros de elevado peso molecular. O tanino hidrolisável melhor conhecido é o ácido tânico, o qual é um galotanino constituído de uma molécula de glicose pentagaloil que pode, adicionalmente, se esterificar com outras cinco unidades de ácido gálico (BRAVO, 1998).

Os taninos condensados são polímeros de catequina e/ou leucoantocianidina não prontamente hidrolisáveis por tratamento ácido (SOARES, 2002) e constituem a principal fração fenólica responsável pelas características de adstringência dos vegetais. Embora o termo taninos condensados ainda seja amplamente empregado, o termo quimicamente mais descritivo “proantocianidinas” vem ganhando mais aceitação. Estas substâncias são flavonóides poliméricos que formam os pigmentos antocianidinas. As proantocianidinas mais amplamente estudadas estão baseadas nas flavan-3-óis(-)-epicatequina e (+)-catequina (STAFFORD, 1983).

As estruturas químicas dos taninos hidrolisáveis e condensados encontram-se representadas na FIGURA 5.

Casuarictina (elagitanino)

Proantocianidinas ou taninos condensados

FIGURA 5. Estruturas químicas dos taninos hidrolisáveis e condensados

Embora a atividade antioxidante dos taninos tenha sido muito menos caracterizada do que a dos flavonóides, pesquisas recentes têm mostrado que o grau de polimerização destas substâncias está relacionado com a atividade antioxidante das mesmas. Nos taninos condensados e os hidrolisáveis (elagitaninos) de alto peso molecular, esta atividade pode chegar a ser de quinze a trinta vezes superior a atribuída aos fenóis simples (SÁNCHEZ-MORENO, 2002^b).

2.3.3.3 Calconas e cumarinas

As calconas são intermediárias na biossíntese dos flavonóides, sendo que as mais frequentemente encontradas nos alimentos são a floretina e seu glicosídeo floridzina (floretina 2'-o-glicose), a calconaringernina e a arbutina. A floretina e floridzina são características das maçãs. A calconaringenina é característica dos tomates e a arbutina das pêras. A arbutina é também encontrada no morango, trigo e seus derivados, assim como em quantidades traços no chá, café, vinho tinto e brócolis. Em algumas espécies de plantas, são os principais pigmentos das flores amarelas (KARAKAYA, 2004).

A FIGURA 6 mostra a estrutura química básica das calconas.

FIGURA 6. Estrutura química básica das calconas

Como os outros fenilpropanóides, as cumarinas constituem uma classe de metabólitos secundários de plantas derivados do ácido cinâmico, por ciclização da cadeia lateral do ácido *o*-cumárico (MATERN, LÜER & KREUSCH, 1999). As cumarinas são mais comuns na natureza na forma de glicosídeos como, por exemplo, umbeliferona, aesculetina, escopoletina, etc, sendo encontradas principalmente no azeite de oliva, na aveia e em especiarias (SÁNCHEZ-MORENO, 2002^a).

A estrutura química básica das cumarinas encontra-se na FIGURA 7.

FIGURA 7. Estrutura química básica das cumarinas

Apesar dos dados ainda serem limitados, sabe-se que as calconas e cumarinas possuem atividade antioxidante (PRATT & HUDSON, 1990).

2.3.3.4 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são frequentemente encontrados em frutas e outros vegetais e em infusões como café e chá (LAKENBRINK *et al.*, 2000; CARTRON *et al.*, 2001, MOREIRA & MANCINI-FILHO, 2003).

Estes compostos podem ser divididos em dois grupos: ácidos benzóicos e ácidos cinâmicos e seus derivados. Os ácidos benzóicos possuem sete átomos de carbono (C_6-C_1) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. Os ácidos cinâmicos possuem nove átomos de carbono (C_6-C_3), sendo os de sete mais comumente encontrados nos vegetais (SOARES, 2002).

Estas substâncias caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula. Podem constituir cerca de um terço dos compostos fenólicos da dieta humana e são encontradas como ésteres, apresentando-se tanto na forma solúvel, acumulando-se nos vacúolos, quanto insolúvel como componentes da parede celular (YANG *et al.*, 2001).

As fórmulas gerais e denominações dos principais ácidos benzóicos e cinâmicos encontram-se nas FIGURAS 8 e 9, respectivamente.

FIGURA 8. Fórmula geral e denominações dos ácidos benzóicos

No grupo dos ácidos benzóicos (figura 8) destacam-se os ácidos protocatequínico, vanílico, siringico, gentísico, salicílico, *p*-hidroxibenzóico e gálico (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004).

$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H \rightarrow$ Ácido cinâmico; $R_1 = OH \rightarrow$ Ácido o-cumárico;
 $R_2 = OH \rightarrow$ Ácido m-cumárico; $R_3 = OH \rightarrow$ Ácido p-cumárico; $R_2 = R_3 = OH \rightarrow$ Ácido Caféico; $R_2 = OCH_3$; $R_3 = OH \rightarrow$ Ácido Ferúlico; $R_2 = R_4 = OCH_3$; $R_3 = OH \rightarrow$ Ácido Sinápico

FIGURA 9. Fórmula geral e denominações dos ácidos cinâmicos

Entre os ácidos cinâmicos (figura 9), os ácidos *p*-cumárico, ferúlico, caféico e sinápico são os mais comuns na natureza. O ácido caféico é encontrado em muitas frutas, tais como maçã, ameixa, tomate e uva. O ácido ferúlico apresenta-se ligado a hemicelulose da parede celular através de ligações ésteres e é encontrado em fontes alimentares tais como o farelo de trigo (YANG *et al.*, 2001).

Os ácidos cinâmicos raramente se encontram livres nas plantas, apresentando-se geralmente na forma de ésteres, associados a um álcool-ácido cíclico como o ácido quínico, originando os ácidos isoclorogênico, neoclorogênico, criptoclorogênico e o clorogênico, um éster cafeoil, que é a combinação mais importante (SOARES, 2002).

Na FIGURA 10 encontra-se a estrutura química do ácido clorogênico.

FIGURA 10. Estrutura química do ácido clorogênico

Diversos estudos têm sido desenvolvidos visando verificar a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos. Sabe-se que estes compostos e seus ésteres apresentam uma elevada atividade antioxidante, principalmente os ácidos hidroxibenzóico, hidroxicinâmico, caféico e clorogênico, e que, embora outras características também contribuam para a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e seus ésteres, esta atividade é geralmente determinada pelo número de grupos hidroxil presentes na molécula dos mesmos. De um modo geral, os ácidos cinâmicos hidroxilados são mais efetivos que seus ácidos benzóicos homólogos (SÁNCHEZ-MORENO, 2002^b).

A hidroxila do ácido ferúlico, existente na posição *orto* com o grupo metoxila doador de elétrons, é um fator que aumenta a estabilidade do radical fenoxil bem como a eficiência antioxidante deste ácido. A presença de uma segunda hidroxila na

posição *orto* ou *para* também aumenta a atividade antioxidante dos compostos fenólicos. O ácido caféico, que apresenta esta característica, possui uma atividade antioxidante maior do que a do ácido ferúlico. O efeito seqüestrante do radical hidroxil parece estar diretamente relacionado aos grupos localizados na posição *para* no anel aromático. Da mesma forma, os ácidos sinápico e *p*-cumárico são antioxidantes mais efetivos do que os derivados do ácido benzóico, tais como protocatequínico, siríngico e vanílico, devido a dupla ligação presente molécula dos derivados do ácido cinâmico ($-\text{HC}=\text{CH}-\text{COOH}$), que participa da estabilização do radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado, enquanto que os derivados do ácido benzóico não apresentam essa característica (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004).

O café torrado é rico em compostos fenólicos, especialmente ácido clorogênico, cerca de 7% do peso seco dos grãos (YANG *et al.*, 2001) e 15% do café instantâneo seco. O ácido clorogênico é o substrato chave para a oxidação enzimática que leva a reação de escurecimento do café (KING & YOUNG, 1999). Estudos demonstraram que os ácidos clorogênicos do café podem agir como antioxidantes dos aldeídos (FERNANDES *et al.*, 2001). Igualmente, o ácido clorogênico é capaz de inibir a síntese da 8-hidroxideoxiguanosina, uma das maiores formas de dano oxidativo do DNA, tanto *in vitro* como *in vivo* (SAKAMOTO *et al.*, 2003). Contudo, os efeitos inibitórios do ácido clorogênico em espécies radiculares específicas não são bem entendidos. Em função disto, Zhang *et al.* (2003), empregando a Espectroscopia por Ressonância de Elétrons em combinação com técnicas de captura de spins para detectar radicais livres e o 5-5-dimetil-1-pirrolina-

N-óxido como um reagente trapping spin enquanto a reação de Fenton foi usada como fonte de radical hidroxil, verificaram que o ácido clorogênico é capaz de seqüestrar radicais hidroxil de uma maneira dose-dependente. Os parâmetros cinéticos IC_{50} e $V_{máx}$, para seqüestro de radical hidroxil pelo ácido clorogênico, foram de 110 e 1,27 $\mu M/sec$, respectivamente. A taxa constante para o seqüestro do radical hidroxil pelo ácido clorogênico foi de $7,73 \times 10^9 M^{-1} sec^{-1}$. Este estudo sugere que as propriedades antioxidantes do ácido clorogênico podem envolver um efeito seqüestante do radical hidroxil.

Por outro lado, nos ácidos benzóicos, a presença de grupo carboxilato tem uma influência negativa em relação a capacidade de doação de hidrogênio dos hidroxibenzoatos (SÁNCHEZ-MORENO, 2002^b).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é de interesse nutricional, uma vez que tem sido associada a potencialização de efeitos promotores da saúde humana através da prevenção de várias doenças (LAMPE, 1999). Adicionalmente, em alguns casos, estes compostos também vêm sendo empregados com propósitos terapêuticos, devido as suas propriedades farmacológicas (PERCIVAL, 1998).

2.3.4 Benéficos à saúde

Até poucos anos atrás, a maioria dos estudos sobre os compostos fenólicos de vegetais deu-se em relação aos efeitos deletérios dos mesmos. Os taninos, um dos componentes majoritários deste grupo, devido ao grande número de grupos hidroxilas que contém entre outros grupos funcionais (1 a 2 por 100 D), são capazes

de formar complexos fortes com proteínas, amido e outras moléculas, principalmente enzimas digestivas, reduzindo a digestibilidade dos alimentos. Da mesma forma, através da união com os seus grupos hidroxilas e carbonilas, os taninos possuem a capacidade de quelar cátions divalentes, principalmente Fe e Zn, reduzindo a biodisponibilidade destes minerais (BRAVO, 1998).

Recentemente, o grande interesse nos compostos fenólicos se deve a atividade antioxidante dos mesmos e suas possíveis implicações benéficas à saúde humana. Estes fitoquímicos, tradicionalmente considerados como antinutrientes e, ainda hoje, como não-nutrientes porque não são conhecidos estados de deficiência para os mesmos, vêm sendo vistos atualmente como um grupo de micronutrientes presentes no reino vegetal que é parte importante da dieta humana e animal. Os próprios taninos condensados e hidrolisáveis (elagitaninos) de alto peso molecular, já que não são absorvidos pela mucosa, vêm sendo vistos como antioxidantes insolúveis que podem apresentar sua elevada atividade antioxidante no trato gastrointestinal, protegendo as proteínas, lipídeos e glicídeos do dano oxidativo durante a digestão (MARTÍNEZ-VALVERDE, PERIAGO & ROS, 2000).

Sabe-se que os organismos vivos estão sujeitos a ação de formas de oxigênio extremamente reativas, denominadas de “Substâncias Reativas do Oxigênio” ou ROS, que são continuamente produzidas por fatores endógenos (respiração, algumas funções imunes mediadas pelas células) e exógenos (fumo, fumaça de exaustão de automóveis, pesticidas, etc) (DRÖGE, 2002). Uma carga hiperfisiológica destes radicais livres causa desequilíbrio no fenômeno homeostático entre oxidantes e antioxidantes no organismo, levando ao estresse oxidativo que está sendo sugerido

como causa de várias doenças como AIDS (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004), catarata (THIAGARAJAN *et al.*, 2001; MELOV *et al.*, 2005), osteoporose (SCALBERT, JOHSON & SALTMARSH, 2005) entre outras.

Resultados de análises genômica dão suporte à idéia de que a hiperlipidemia é meramente um fator de risco e o estresse oxidativo a causa da aterogênese (TIWARI, 2004). Acredita-se que o estresse oxidativo, especialmente a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) pelos radicais livres, contribui para todos os estágios do processo aterosclerótico (MOURE *et al.*, 2001; FOTI, PIATTELI & RUBERTO, 1996) e é um intermediário crucial no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A LDL oxidada é facilmente adsorvida por macrófagos e forma células esponjosas que, ao crescer, dão lugar às placas ateroscleróticas que obstruem os vasos impedindo o fluxo sanguíneo para os tecidos ou sofrendo uma ruptura, o que desencadeia uma trombose (SÁNCHEZ-MORENO, 2001^b). O tecido privado de sangue morre. Quando parte do músculo cardíaco é afetado tem-se o ataque cardíaco e quando o cérebro é atingido tem-se um Acidente Vascular Cerebral (AVC). Existem vários tipos de AVC: trombose cerebral e embolismo cerebral, também classificados como AVC isquêmico e hemorragia subaracnóide, respectivamente, e hemorragia intracerebral também classificada como AVC hemorrágico. A trombose cerebral é o tipo mais comum e ocorre quando um trombo se desenvolve na parede de uma artéria cerebral geralmente danificada pela aterosclerose. Contudo, através da inibição da modificação da LDL que leva ao acúmulo de colesterol na lesão aterosclerótica, os antioxidantes poderiam ter efeitos

anti-escleróticos e anti-trombóticos, podendo contribuir com um papel potencialmente protetor nas doenças cardiovasculares (HOLLMAN, 2001).

Estudos também oferecem evidência de que a hiperglicemia leva ao aumento da produção de ROS, causando uma elevação do estresse em uma série de tecidos. Na ausência de uma resposta apropriada da cadeia de antioxidantes endógenos ao estresse oxidativo elevado, ocorre o desequilíbrio redox, que ativa as vias de sinalização intracelular sensíveis ao estresse, cuja maior consequência é a expressão de produtos de gens que causam dano celular e, finalmente, as complicações tardias do diabetes. Além de ter um papel chave nas complicações tardia do diabetes, estas vias ou as vias similares parecem ter também um papel na mediação da resistência a insulina e na secreção reduzida da mesma. Entretanto, os antioxidantes/seqüestradores de radicais livres poderiam prevenir os efeitos da hiperglicemia, bem como os dos ácidos graxos livres, que levam a disfunção celular e, finalmente, as complicações tardias do diabetes (TIWARI, 2004).

2.3.4.1 Antioxidantes e câncer

A carcinogênese é outro processo patológico que também vem sendo associado ao estresse oxidativo. O câncer é o ponto final de um processo de múltiplos estágios, envolvendo uma seqüência de eventos que ocorrem durante alguns anos ou até décadas (YANG *et al.*, 2001). Os múltiplos estágios da doença podem ser divididos em quatro etapas: iniciação, promoção, progressão e metástase.

Cada estágio provavelmente envolve tanto mudanças epigenéticas quanto genéticas (BISHOP, 1991).

A FIGURA 11 mostra os estágios do desenvolvimento do câncer e as interações potenciais previstas dos compostos fenólicos de plantas.

FIGURA 11. Estágios do desenvolvimento do câncer e interações potenciais dos compostos fenólicos de plantas

A ativação metabólica do carcinógeno é uma reação dependente de radical livre e o dano oxidativo ao DNA tem um papel chave no processo mutagênico. As células do câncer, particularmente aquelas que são altamente invasivas ou metastásicas, requerem um certo nível de estresse oxidativo para manter um balanço que favoreça a proliferação ou a apoptose (morte) celular. Estas células geram amplas, porém tolerável, quantidades de H_2O_2 que aparentemente funcionam como moléculas sinalizadoras na via proteína-quinase mitogênica, ativando constantemente fatores de transcrição redox-sensitivos e genes-resposta que estão envolvidos na sobrevivência das células cancerosas bem como na sua proliferação. Em sistemas biológicos, o DNA danificado pode ser reparado enzimaticamente e as células recuperam as suas funções normais. Todavia, se a célula contendo o DNA danificado se divide antes do seu DNA ser recuperado, o resultado é uma alteração genética permanente, primeiro passo na carcinogênese, pois o mau reparo do DNA pode resultar em mutações tais como substituições de bases e deleção levando a carcinogênese (TIWARI, 2004). As células que se dividem mais rapidamente são as mais susceptíveis a carcinogênese do que as células que se dividem lentamente porque existe menos oportunidade para o reparo do DNA nestas antes da divisão celular (LANGSETH, 1995). Os compostos fenólicos ingeridos na dieta poderiam inibir a carcinogênese afetando os eventos moleculares em todos os estágios do processo, conforme pode se visto na figura 11, resultando em uma redução potencial do risco de câncer, de forma possivelmente mais efetiva do que quando aplicado

topicamente ou injetado (YANG *et al.*, 2001). No estágio inicial do processo, os compostos fenólicos com propriedades antioxidantes poderiam inativar as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que têm papel importante na carcinogênese, impedindo o desencadeamento do processo comumente catalizado pelas enzimas citocromo P-450. Outra forma de prevenção do processo carcinogênico seria estimulando a excreção de substâncias xenobióticas, estranhas ao organismo e, por isso, potencialmente carcinogênicas, e seus intermediários pela ativação das fases I e II dos sistemas de enzimas envolvidos na eliminação de compostos do organismo (MARTÍNEZ-VALVERDE, PERIAGO & ROS, 2000). Contudo, a indução das enzimas da fase I pode também ser deletéria porque pode aumentar a ativação dos chamados pré-carcinógenos a genuínos carcinógenos. Os compostos fenólicos têm se mostrado capazes de inibir as enzimas da fase I e, assim, teriam um efeito anticarcinogênico. Entretanto, os compostos fenólicos poderiam ter um papel também nos estágios mais avançados do desenvolvimento do câncer. Se o dano foi causado e os mecanismos ativos de reparo do DNA falharem, a célula iniciada pode ser morta por apoptose. Os compostos fenólicos têm sido relatados como estimulantes da apoptose. Adicionalmente, quando uma célula iniciada escapa a apoptose, a proliferação de células tumorais pode ser prevenida pelo bloqueio da replicação das células iniciadas. Existe evidência crescente de que os processos oxidativos contribuem para o estágio de promoção da carcinogênese e que os antioxidantes poderiam causar a regressão das lesões pré-malignas ou inibir seu desenvolvimento (LANGSETH, 1995). Os compostos fenólicos podem prevenir a proliferação de células tumorais pelos mecanismos de inativação ou baixa regulação das enzimas pró-oxidantes e

enzimas de sinalização da transdução (YANG *et al.*, 2001). Vários compostos fenólicos são efetivos na inibição das enzimas pró-oxidantes xantina-oxidase, cicloxygenase e lipoxigenase. As proteínas quinases tomam um importante papel no sinal intracelular de transdução.

Estas quinases estão envolvidas na regulação da proliferação celular, diferenciação e transformação. A inibição destas quinases pode reverter ou suprimir os processos carcinogênicos. O sistema imune humano tem um papel central na proteção contra vários fatores externos de promoção de doença e podem também proteger contra células tumorais. Os compostos fenólicos de plantas têm se mostrado capazes de afetar um número de aspectos do sistema imune. O estágio final do processo do câncer envolve o crescimento do tumor com destruição dos tecidos ao seu redor, aumentando a formação de novos vasos de sangue (angiogênese) para levar nutrientes às células cancerosas em multiplicação e espalhá-las para os outros tecidos (metástase). Existe evidência que os compostos fenólicos de plantas podem tomar um papel benéfico também nestes últimos estágios, inibindo a angiogênese e também a invasão de células tumorais pela inibição da collagenase tipo IV (HOLLMAN, 2001).

2.3.4.2 Antioxidantes e envelhecimento

Evidências genéticas também ligam o estresse oxidativo a amplitude de vida. Os organismos multicelulares geralmente sofrem mudanças qualitativas com o tempo (envelhecimento) que estão associadas com a degeneração progressiva de funções

biológicas, elevada suscetibilidade à doenças e elevada possibilidade de morte dentro de um determinado período de tempo. A teoria do envelhecimento devido aos radicais livres declara que o processo degenerativo relacionado a idade é, em uma larga extensão, consequência do dano causado pelos radicais livres (DRÖGE, 2002). Assim, o envelhecimento é também o maior fator de risco para doenças neurodegenerativas, incluindo mal de Alzheimer e de Parkinson. O risco de adquirir Alzheimer é considerável nos países com maior expectativa de vida. O Alzheimer é a forma mais comum de demência, onde a sensibilidade seletiva e vulnerabilidade dos neurônios são as características mais importantes da doença. Já a doença de Parkinson é uma síndrome neurológica que se manifesta por qualquer combinação de tremor em repouso, rigidez, bradiquinesia e perda de reflexos posturais. O quadro neuropatológico do Parkinson é a degeneração seletiva dos neurônios dopaminérgicos no sistema nigrostriatal. Estes neurônios sintetizam e liberam dopamina e a perda da influência dopaminérgica em outras estruturas no ganglio basal leva aos sintomas clássicos da doença de Parkinson. A teoria do envelhecimento pelos radicais livres sugere que o estresse oxidativo está envolvido na patogênese destas doenças, podendo induzir o dano neuronal levando, finalmente, a morte neuronal por apoptose ou necrose. Todavia, os antioxidantes poderiam atuar através da neutralização do processo desencadeado pelos radicais livres protegendo contra o processo degenerativo relacionado a idade e, desta forma, prevenindo o dano neuronal que desencadeia tais doenças (TIWARI, 2004).

2.3.4.3 Antioxidantes e malária

No Brasil, aproximadamente toda a transmissão da malária (99%) ocorre na bacia do Amazonas, habitada por quase 20 milhões de pessoas, representando aproximadamente 12% da população brasileira. A incidência de malária no país aumentou durante os últimos anos, com mais de 630.000 casos relatados em 1999 (MARRELLI *et al.*, 2005). O *Plasmodium falciparum*, parasita da malária, é transmitido por um mosquito e, através de sucessivos estágios do seu ciclo de vida, invade o fígado e eritrócitos de humanos infectados. A infecção pode ser fatal se progredir para anemia severa ou malária cerebral, através da adesão dos eritrócitos infectados aos capilares cerebrais. As desordens da célula vermelha incluem uma variedade de hemoglobinopatias, bem como deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase. Todas estas condições têm como chave metabólica comum o fato do eritrócito infectado pelo parasita estar sob constante estresse oxidativo causado por ROS e Espécies Reativas de Nitrogênio (RNS) exógenas, produzidas pelo sistema imune (fagócitos) do hospedeiro como um mecanismo de defesa contra o parasita, bem como pela produção endógena de ROS e liberação de ferriprotoporfirina IX tóxica gerados durante a digestão da hemoglobina da célula hospedeira pelo parasita e concomitantes reações bioquímicas. Pequenas quantidades de ROS podem ser também produzidas pelo transporte de elétrons mitocondrial e por vários outros processos metabólicos da célula hospedeira (BOZDECH & GINSBURG, 2004).

As fontes de ROS durante a vida intraeritrocítica do *P. falciparum* encontram-se representadas na FIGURA 12.

FIGURA 12. Fontes de ROS durante a vida intraeritrocítica do *P. falciparum*

A exposição do parasita aos radicais livres parece favorecer o crescimento e diferenciação do mesmo, pois o *P. falciparum* é altamente adaptável ao estresse oxidativo ao qual é exposto durante os estágios eritrocíticos de seu ciclo de vida. O parasita é dotado de um mecanismo de proteção que envolve uma completa rede de enzimas e proteínas, empregando também atividades redox para regular a atividade das enzimas. No centro do sistema de defesa do parasita estão as superóxidos dismutases e peroxidases tioredoxina-dependente. O parasita contém também um complexo sistema redox glutatona funcional. Pesquisas recentes têm mostrado que, em adição a estes sistemas redox citosólicos, o parasita também tem um importante

sistema de defesa antioxidante mitocondrial e é sugerido que o ácido lipóico toma parte importante na defesa desta organela contra o dano oxidativo (MÜLLER, 2004).

Por outro lado, vários estudos têm relatado mudanças físico-químicas na membrana das células vermelhas infectadas, induzidas pelo estresse oxidativo responsável pela peroxidação lipídica da membrana e hemólise observadas na malária (DAS & NANDA, 1999). Assim, se os antioxidante da dieta podem modular os efeitos das infecções, por mecanismos que incluem prevenção do dano aos tecidos pelos ROS e manutenção da função imune, é altamente possível que possam afetar o curso da malária (DAVIS *et al.*, 1993).

Adicionalmente ao exposto até aqui, outras patologias também estão sendo relacionadas ao estresse oxidativo. Estudos têm associado a artrite reumatóide a este processo. A artrite reumatóide é uma doença autoimune sistêmica caracterizada pela inflamação crônica das articulações com infiltração de macrófagos e células T ativadas. Vários estudos sugerem que a produção de radicais livres no local da inflamação pode contribuir decisivamente para a patogênese da doença (DRÖGE, 2002), abrindo perspectiva para mais uma possível ação benéfica dos antioxidantes naturais à saúde humana.

Numerosos estudos *in vitro* têm mostrado que os compostos fenólicos de plantas são potentes antioxidantes, podendo afetar diversos processos em células de mamíferos que, se ocorrem também *in vivo*, podem prevenir o aparecimento de diversas doenças associadas ao estresse oxidativo (SÁNCHEZ-MORENO, 2002^b). Estes compostos têm se mostrado capazes de seqüestrar diferentes radicais livres do meio de reação, inibir a peroxidação lipídica e prevenir o dano oxidativo a

biomoléculas vitais como lipídeos, proteínas e DNA (DUTHIE, DUTHIE & KYLE, 2000).

Adicionalmente, propriedades farmacológicas relacionadas com a prevenção e/ou melhora do estado de saúde têm sido atribuídas aos compostos fenólicos. Entre estas se destacam seus efeitos vasodilatadores, antiinflamatórios, bactericida, estimuladores da resposta imune, antialergênicos, antivirais, estrogênicos e inibidores das enzimas fosfolipase A₂, ciclooxigenase, lipoxigenase, xantina oxidase e glutathione redutase (PERCIVAL, 1998).

Para algumas classes de compostos fenólicos, existem hoje suficientes estudos de intervenção para indicar o tipo e magnitude dos efeitos destes em humanos, com base nas mudanças de curta duração em biomarcadores. As isoflavonas (genisteína e daidzeína) encontradas na soja têm efeitos significantes na saúde óssea entre mulheres pós-menopausa, juntamente com alguns efeitos hormonais. As catequinas monoméricas, encontradas em elevadas concentrações especialmente no chá, têm efeitos nos biomarcadores antioxidantes do plasma e metabolismo energético. As procianidinas, catequinas oligoméricas encontradas em concentrações elevadas no vinho tinto, uva, cacao e maçã, têm pronunciados efeitos no sistema vascular, incluindo a atividade antioxidante do plasma. A quercetina, principal representante da classe flavonol e encontrada em elevadas concentrações na cebola, maçã, vinho tinto, brócolis e chá, influencia alguns marcadores carcinogênicos e tem pequenos efeitos nos biomarcadores antioxidantes do plasma *in vivo*, embora alguns estudos tenham falhado em encontrar este efeito. Todavia,

comparados com os efeitos dos compostos fenólicos *in vitro*, os efeitos *in vivo*, embora significantes, são mais limitados (WILLIAMSON & MANACH, 2005).

As propriedades biológicas dos compostos fenólicos dependem da biodisponibilidade dos mesmos (SCALBERT & WILLIAMSON, 2000) e o pouco entendimento da biodisponibilidade destes compostos pode levar a afirmações excessivas no que diz respeito a atividade antioxidante dos mesmos *in vivo* baseadas na extrapolação de dados *in vitro*. Assim, um conhecimento aprofundado da biodisponibilidade dos compostos fenólicos é essencial para o entendimento dos benefícios dos mesmos à saúde humana.

Apesar disso, pouco se sabe a respeito do comportamento destes compostos *in vivo*, sua absorção, farmacocinética e destino metabólico (DUTHIE, GARDNER & KYLE, 2003). Os compostos fenólicos não têm sido intensamente estudados *in vivo* porque foram por longo tempo considerados não absorvíveis (CAO *et al.*, 2001). Uma evidência mais direta da biodisponibilidade de alguns compostos fenólicos tem sido obtida pela medida da concentração plasmática e urinária dos mesmos depois da ingestão tanto de compostos puros quanto de alimentos, bebidas ou extrato de plantas com conteúdo conhecido dos compostos de interesse (SCALBERT & WILLIAMSON, 2000).

2.3.5 Biodisponibilidade

Sabe-se hoje que a biodisponibilidade dos compostos fenólicos pode variar grandemente de um composto para o outro, de forma que os compostos fenólicos

mais abundantes na dieta não são necessariamente aqueles que levam a concentrações mais elevadas de metabólitos ativos nos tecidos (MANACH *et al.*, 2005). As propriedades químicas, desconjugação/reconjugação no intestino, absorção intestinal e enzimas disponíveis para o metabolismo dos compostos fenólicos são fatores que influenciam na biodisponibilidade dos mesmos (YANG *et al.*, 2001).

Desta forma, o primeiro passo a ser considerado é a absorção intestinal destes compostos.

2.3.5.1 Absorção

Um conceito comumente aceito é que os compostos fenólicos são absorvidos por difusão passiva. Para tanto, os compostos fenólicos glicosilados, ou seja, aqueles presentes nos vegetais ligados a açúcares como β -glicosídeos e considerados muito hidrofílicos para serem absorvidos por difusão passiva no intestino delgado, precisam ser convertidos à aglicona pelas glicosidases dos alimentos, da mucosa intestinal ou da microflora do cólon para serem absorvidos. Entretanto, como aparentemente as enzimas capazes de hidrolisar as ligações β -glicosídicas não são secretadas no intestino nem estão presentes na parede intestinal, são as bactérias do cólon que hidrolisam os compostos fenólicos glicosídicos. Porém, ao mesmo tempo, degradam as agliconas liberadas. Desta forma, a capacidade de absorção do cólon seria menor do que a do intestino delgado. Conseqüentemente, somente uma pequena absorção de compostos fenólicos glicosilados seria esperada (SÁNCHEZ-MORENO, 2002^a).

Todavia, o metabolismo microbiano merece uma atenção especial porque pode hidrolisar muitos compostos fenólicos a fenólicos mais simples que são comuns a vários destes compostos. Além disso, alguns dos metabólitos microbianos podem ter efeitos biológicos únicos, tais como a isoflavona daidzeína da soja que é convertida a equol pela microflora intestinal em 30 a 40% das pessoas que a ingerem e o equol apresenta-se na corrente sanguínea das mesmas. Existe evidência crescente de que os “produtos equol” exercem melhores efeitos em alguns biomarcadores, tais como densidade mineral óssea, depois do consumo de isoflavonas do que os não produtos da mesma. Estudos de intervenção mostraram também um efeito para as procianidinas. Contudo, a identidade do composto ou compostos ativos não está clara. Embora as procianidinas intactas tenham alguns efeitos biológicos, são pobremente absorvidas nesta forma. Assim, as espécies ativas poderiam ser metabólitos. Alguns metabólitos de baixo peso molecular foram identificados em humanos depois do consumo das procianidinas do cacao, mas a atividade biológica destes metabólitos não é conhecida e permanece por ser investigada. Estes são alguns exemplos no qual a microflora intestinal ativa um composto fenólico a um mais potente composto biologicamente ativo. Desta forma, o metabolismo pela microflora precisa ser melhor entendido porque a microflora intestinal provavelmente toma o papel mais importante na atividade biológica de muitos compostos fenólicos (WILLIAMSON & MANACH, 2005).

Por outro lado, as catequinas que ocorrem nos alimentos somente sob a forma de agliconas, deveriam ser melhor absorvidas em relação aos outros compostos fenólicos. Entretanto, dados claros da absorção das catequinas ainda não estão

disponíveis. Nos alimentos, são encontradas ainda quantidades substanciais de catequinas poliméricas ou proantocianidinas. Estudos *in vitro* usando uma monocamada de células Caco-2 intestinal humana mostraram que dímeros e trímeros das mesmas foram absorvidos em uma extensão similar a da (+)-catequina. Porém, polímeros com um mais alto grau de polimerização não foram absorvidos (HOLLMAN, 2001).

Contudo, estudos posteriores em humanos mostraram que muitos compostos fenólicos podem ser absorvidos, ao menos em parte, intactos ao nível intestinal e em quantidades mais elevadas do que as suas agliconas correspondentes. Flavonóides como a quercetina e a genisteína, assim como fenóis simples e ácidos fenólicos, podem ser diretamente absorvidos através da mucosa intestinal (SÁNCHEZ-MORENO, 2002^a). A absorção da quercetina ingerida regularmente nos alimentos foi estudada em indivíduos ileostomizados, os quais possuem redução de cólon com flora bacteriana. Estes indivíduos mostraram-se capazes de sobrepor o problema da degradação microbiana, pois a absorção da quercetina glicosídeo da cebola foi duas vezes mais elevadas nos mesmos em relação a sua aglicona pura (HOLLMAN *et al.*, 1995). Outro estudo em modelo de ileostomia mostrou que o ácido clorogênico, um dos maiores ésteres do ácido cinâmico cuja ingesta varia grandemente e pode ser de até 800 mg/dia entre bebedores de café (MANACH *et al.*, 2005), foi também absorvido intacto no intestino delgado na proporção de 33% (OLTHOF, HOLLMAN & KATAN, 2001).

Na literatura são encontrados também estudos que sugerem que um sistema de transporte ativo pode estar envolvido na absorção dos compostos fenólicos

glicosilados. A biodisponibilidade da quercetina glicosídeo foi muito maior do que a de quercetina rutinosídeo em humanos, sugerindo que o glicosídeo é ativamente absorvido no intestino delgado. Entretanto, os carreadores de membrana que poderiam estar envolvidos na absorção destes compostos não têm sido identificados (MANACH *et al.*, 2004). Já o ácido cinâmico livre e o ferúlico são absorvidos por um processo de transporte ativo carreador-mediado Na^+ -dependente no jejuno de ratos (KARAKAYA, 2004). Este processo pode também ser comum na absorção de outros compostos fenólicos. Yang *et al.* (2001) sugerem ainda que os efeitos de certas bombas de fluxo, tais como P-glicoproteínas e proteínas associadas multi-drogas resistentes, na biodisponibilidade dos compostos fenólicos da dieta também sejam mais intensamente investigados. Assim, os mecanismos de absorção dos compostos fenólicos ainda não estão claros.

2.3.5.2 Metabolismo

Uma vez absorvidos, se desconhece as rotas metabólicas que os compostos fenólicos de plantas seguem para a sua transformação e eliminação. Não obstante, duas rotas possíveis devem ser consideradas no metabolismo dos mesmos: tecidos como o fígado e os rins e o cólon, onde a microflora intestinal degrada estes compostos (HOLLMAN, 2001).

As possíveis rotas envolvidas no metabolismo dos compostos fenólicos estão ilustradas na FIGURA 13.

FIGURA 13. Rotas envolvidas no metabolismo dos compostos fenólicos de plantas

Na primeira rota, as enzimas de biotransformação localizadas principalmente no fígado agem sobre os compostos fenólicos e seus metabólitos do cólon. Contudo, os rins e o intestino delgado também contêm enzimas capazes de biotransformação destes compostos. Os compostos fenólicos são prontamente conjugados por glicuronidação e sulfatação, que são os principais mecanismos implicados no

metabolismo dos mesmos. Podem sofrer também um processo de metilação (MANACH *et al.*, 2004). A conjugação dos grupos hidroxil polar com o ácido glicurônico é catalisada pelas glicuronosil-transferases-UDP microsomal (UGT), utilizando o ácido glicurônico-UDP como cofator. Entre as isoformas das UGT, a família UGT1A é a principal fonte de enzimas para a glicuronidação dos compostos fenólicos. Contudo, as enzimas UGT responsáveis pela conjugação de diferentes compostos fenólicos ainda precisam ser caracterizadas. A conjugação dos grupos hidroxil polar com o sulfato é catalisada pelas sulfotransferases citosólicas (SULT) com a 3'-fosfoadenosina 5-fosfosulfato (PAPS) como o doador de sulfato. Embora a fenol SULT (SULT1A) catalise a sulfatação de fenóis, os papéis de diferentes isoformas SULT na conjugação de diferentes tipos de compostos fenólicos requerem mais investigação. A catecol-o-metiltransferase (COMT) catalisa a transferência de um grupo metil da S-adenosil-L-metionina (SAM) para os compostos fenólicos, inativando os dois grupos hidroxil aromáticos adjacentes (*orto*) dos flavonóides e seus metabólitos do cólon (HOLLMAN, 2001). A molécula dos compostos fenólicos fornece múltiplos sítios potenciais para estas reações podendo, por exemplo, ser metilada e seguida por glicuronidação ou sulfatação em outros sítios. A seqüência e extensão destas reações dependem de vários fatores: especificidade da enzima pelo substrato (que determina a reatividade e a posição da conjugação), disponibilidade das enzimas de conjugação e seus respectivos cofatores (que são afetados por espécies diferentes), polimorfismo genético, indução da enzima, dieta e estado metabólico. As doses dos compostos fenólicos da dieta e os substratos competitivos, tais como medicação, também podem saturar o sistema de enzima ou depletar os

cofatores e afetar a extensão da conjugação. Esta é dose e tempo-dependente e tem amplas variabilidades individuais. Os conjugados são excretados com a bile no intestino (YANG *et al.*, 2001).

A segunda rota metabolicamente ativa é o cólon, onde os microrganismos degradam não só os compostos fenólicos da dieta que não foram absorvidos no trato gastrointestinal superior, mas também os que foram absorvidos e secretados na bile. As bactérias do cólon produzem enzimas que irão reduzir os compostos fenólicos conjugados a agliconas, das quais uma parte é reabsorvida e encerra o ciclo enterohepático, enquanto o restante é degradado pelas bactérias intestinais liberando ácidos fenólicos que são absorvidos e, finalmente, excretados através da urina (SÁNCHEZ-MORENO, 2002^a).

Contudo, os dados a respeito destes metabólitos em humanos são limitados aos flavonóides. Assim, pesquisas adicionais sobre a biodisponibilidade dos compostos fenólicos precisam ser desenvolvidas (KARAKAYA, 2004).

Apesar dos limitados conhecimentos nesta área, sabe-se que em geral o metabolismo diminui a atividade antioxidante dos compostos fenólicos da dieta porque a maioria dos grupos hidroxil fenólicos são afetados pelo mesmo. A conjugação destes grupos hidroxil com o ácido glicurônico, sulfato e glicina irá diminuir sua atividade antioxidante. A atividade antioxidante dos ácidos fenilacéticos hidroxilados, maiores metabólitos da quercetina, é muito menor do que a da quercetina de origem, porém similar a da vitamina E (HOLLMAN, 2001).

Por outro lado, os mecanismos responsáveis pelos efeitos prejudiciais à saúde causados pelo estresse oxidativo são pouco entendidos (JACKSON, 1999). Como

consequência, não está claro se efeitos análogos aos *in vitro* realmente ocorrem *in vivo*, seguindo o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos.

Os estudos epidemiológicos avaliando o papel dos compostos fenólicos têm fornecido resultados contraditórios. A disparidade entre os dados *in vitro* e os estudos epidemiológicos pode refletir, em parte, a biodisponibilidade e o metabolismo relativamente pobre, bem como excreção rápida de tais compostos quando ingeridos. Adicionalmente, compostos fenólicos com maior atividade antioxidante *in vitro* podem ser os mais extensamente metabolizados *in vivo*, comparados com aqueles com menos arranjos oxidáveis em grupos hidroxila nas estruturas de anel (DUTHIE, GARDNER & KYLE, 2003).

As pesquisas com humanos sobre os efeitos antioxidantes de bebidas ricas em compostos fenólicos ainda são limitadas e os resultados inconclusivos, porque apesar dos vários métodos existentes ainda existe uma carência de métodos confiáveis para a quantificação da atividade antioxidante *in vivo* (JACKSON, 1999). Não obstante, conforme exposto nas seções que se seguem, diferentes métodos têm sido desenvolvidos objetivando medir a capacidade antioxidante de amostras biológicas.

Por outro lado, em função dos possíveis efeitos promotores à saúde dos compostos fenólicos, vários estudos têm analisado também o potencial antioxidante de uma grande variedade de alimentos, particularmente semente de cacao, batata, tomate, espinafre, feijões e condimentos, bem como frutas, como “cherries” e citrus. Porém, capacidade antioxidante também tem sido relatada para bebidas alcoólicas como “whiskey”, “sakê” e “sherries” (MOURE *et al.*, 2001). O vinho tinto contém uma

variedade de compostos fenólicos, sendo os mais abundantes as antocianinas (MORTON *et al.*, 2000; PELLEGRINI *et al.*, 2003). Os chás preto e verde têm sido extensamente estudados, uma vez que podem conter até 30% do peso seco como compostos fenólicos (THIAGARAJAN *et al.*, 2001), assim como o café (SAKAMOTO *et al.*, 2003; PANZELLA *et al.*, 2003; NOIROT *et al.*, 2003; DE PAULIS *et al.*, 2004). As sementes como tamarindo, canola, sésamo, linhaça e girassol são outras possíveis fontes de antioxidantes naturais (DUTHIE, DUTHIE & KYLE, 2000).

Além do interesse nutricional, a atividade antioxidante dos compostos fenólicos é também de interesse tecnológico. Estes compostos intervêm como antioxidantes naturais dos alimentos. Assim, a preparação e obtenção de alimentos com elevado teor destas substâncias supõem uma redução da utilização de antioxidantes sintéticos, obtendo-se alimentos mais saudáveis que podem chegar a ser incluídos no grupo dos alimentos funcionais (MARTÍNEZ-VALVERDE, PERIAGO & ROS, 2000).

Desta forma, várias plantas também têm sido estudadas como fontes de antioxidantes naturais potencialmente seguros em substituição aos artificiais, assim como de mais baixo custo de obtenção e alta eficiência em relação aos antioxidantes naturais que vem sendo empregados na indústria de alimentos (ácido ascórbico, tocoferóis). Dos vários compostos que têm sido isolados, muitos deles são polifenóis. Uma ampla faixa de compostos fenólicos de plantas, de alto e baixo peso molecular, apresentando propriedades antioxidantes tem sido estudada e proposta para proteção contra oxidação lipídica dos alimentos (MOURE *et al.*, 2001).

Entretanto, da mesma forma que *in vivo*, não existem hoje métodos aprovados ou padronizados para a determinação da atividade antioxidante *in vitro*. Os vários métodos que têm sido desenvolvidos para este fim são ensaios baseados em diferentes mecanismos de reação e oferecem resultados numéricos distintos, difíceis de comparar (GIADA & MANCINI-FILHO, 2004).

2.4 Métodos para avaliação da atividade antioxidante

Quanto a solubilidade, os antioxidantes podem ser fisicamente classificados em dois grupos: antioxidantes hidrofílicos, tais como vitamina C e a maioria dos compostos fenólicos, e antioxidantes lipofílicos, principalmente vitamina E e carotenóides. Assim como os antioxidantes hidrofílicos, os antioxidantes lipofílicos tem um papel importante no extenso espectro de processos bioquímicos e fisiológicos. A atividade antioxidante ótima dos mesmos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, é de interesse primário uma vez que, diferente dos antioxidantes hidrofílicos os quais não acumulam no corpo e são excretados na urina, os antioxidantes lipofílicos penetram na membrana da célula lipoprotéica mais rapidamente e, desta forma, chegam a um alto nível de disponibilidade. Embora os antioxidantes lipofílicos sejam altamente biodisponíveis, não é tarefa fácil medir acuradamente a atividade antioxidante dos mesmos *in vitro*, pois dos vários métodos disponíveis para este fim a maioria é conduzida em sistema aquoso não sendo, portanto, adequada para antioxidantes lipofílicos (HUANG *et al.*, 2002).

2.4.1 Principais métodos *in vitro*

A grande diversidade química existente torna os compostos fenólicos difíceis de separar bem como quantificar individualmente em matrizes biológicas (PRIOR & CAO, 2000). Assim, vários ensaios *in vitro* vêm sendo desenvolvidos para avaliar a atividade antioxidante total de diferentes amostras, particularmente em matrizes complexas tais como vinhos, frutas e outros vegetais (GIADA & MANCINI-FILHO, 2004). Estes ensaios têm sido necessários devido a dificuldade de se medir cada componente antioxidante separadamente e as interações potenciais entre os diferentes componentes antioxidantes em amostras complexas (CAO & PRIOR, 1999). São ensaios que envolvem diferentes mecanismos do sistema de defesa antioxidante, desde a decomposição de peróxidos, avaliação do seqüestro de radicais ou quelação de íons metálicos (PULIDO, BRAVO & SAURA-CALIXTO, 2000), até a medida da prevenção do dano oxidativo a biomoléculas, tais como proteínas ou DNA (MOURE *et al.*, 2001).

Desta forma, alguns ensaios determinam a habilidade dos antioxidantes para seqüestrar radicais livres gerados no meio de reação, outros medem o seqüestro de espécies radicalares estáveis pelos antioxidantes ou a eficiência dos antioxidantes em remover radicais oxigênio gerados por sistema enzimático ou, ainda, a inibição da peroxidação lipídica pelos antioxidantes, quantificando produtos tais como dienos conjugados, peróxidos lipídicos ou hidroperóxidos, bem como produtos da

decomposição de peróxidos lipídicos, tais como malonaldeído determinados pelo método TBARS (PULIDO, BRAVO & SAURA-CALIXTO, 2000).

Na medida da ação protetora dos antioxidantes contra a oxidação lipídica, diferentes substratos têm sido empregados como, por exemplo, triacilgliceróis puros, óleos vegetais (girassol, soja, oliva, palma), óleo de peixes (altamente sensíveis a deterioração oxidativa por serem ricos em ácidos graxos poliinsaturados) ou banha, bem como outros substratos de oxidação, tais como ácidos graxos livres, fosfolípidos e lipoproteínas. Lipossoma e microssoma, em um sistema semelhante as condições práticas *in vivo* devido a similaridade entre a composição da membrana lipídica e aquela das membranas biológicas, têm sido intensamente usados para avaliação da atividade antioxidante de um composto, assim como a inibição da oxidação da LDL do plasma sanguíneo de ratos ou de humanos *in vitro*, já que a oxidação das mesmas contribui para a patogênese da arteriosclerose. Muitos sistemas alimentares são emulsões e o estudo da oxidação lipídica em sistemas emulsificados também tem sido desenvolvido. Igualmente, diferentes sistemas de indução da peroxidação, tais como solventes orgânicos ou micelas aquosas ou reversas têm sido desenvolvidas. Opcionalmente, cátions metálicos (Fe^{+3} e Cu^{+2}) podem ser empregados como catalisadores durante os ensaios de oxidação e também moléculas orgânicas com um metal complexado, tais como hemoglobina. A atividade antioxidante depende do metal empregado para gerar espécies reativas e determina se o antioxidante estudado pode agir também como pró-oxidante (MOURE *et al.*, 2001).

Em função disto, em estudos com compostos modelos, dramáticas diferenças no potencial antioxidante de compostos fenólicos foram observadas podendo um

composto modelo mostrar-se fortemente antioxidante em um método enquanto em outro apresentar características pró-oxidante (FRANKEL & MEYER, 2000). Contudo, os compostos fenólicos de ocorrência natural, diferentemente dos antioxidantes sintéticos hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT), mostraram atividade pró-oxidante em baixas concentrações quando avaliados por alguns métodos (ANTOLOVICH *et al.*, 2002). Adicionalmente, um fenômeno conhecido como “paradoxo polar” também tem sido repetidamente relatado: antioxidantes hidrofílicos são mais efetivos do que antioxidantes lipofílicos em volumes elevados de óleo, enquanto antioxidantes lipofílicos apresentam maior atividade em emulsões. Por outro lado, o conhecimento ainda é limitado de como a partição e a efetividade antioxidante de compostos fenólicos naturais são governados pela estrutura química dos mesmos em sistemas heterofásicos (FRANKEL & MEYER, 2000).

Desta forma, para melhor compreender a capacidade fisiológica dos compostos fenólicos, deve-se considerar que *in vitro* a atividade antioxidante dos mesmos varia não somente em função da estrutura química destas substâncias mais também do tipo e polaridade do solvente empregado em sua extração, dos procedimentos de isolamento e da pureza dos compostos estudados, do substrato a ser protegido pelos antioxidantes bem como se o ensaio será desenvolvido em sistema aquoso ou lipídico. Alguns estudos têm sugerido que o fator determinante da atividade antioxidante *in vitro* é a natureza lipofílica das moléculas e a afinidade do antioxidante por lipídeos (MOURE *et al.*, 2001).

A seguir encontram-se alguns importantes métodos para avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos de alimentos.

2.4.1.1 Métodos baseados no seqüestro de radicais livres

A maioria dos métodos para avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos é baseada na capacidade destes em seqüestrarem radicais livres do meio. Para se medir esta capacidade, testes com diferentes radicais têm sido desenvolvidos, tais como os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxil ($OH^{\bullet}$), óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), peroxil ($ROO^{\bullet}$), 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) ou ABTS⁺ e 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]) (SÁNCHEZ-MORENO, 2002^C).

Estes ensaios são divididos em dois grandes grupos: ensaios de inibição, onde a extensão do seqüestro de um radical livre pré-formado, pela doação de H^+ ou elétron, é comparada com a de um composto antioxidante padrão (geralmente o TROLOX ou ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetracromano-2-carboxílico, um análogo hidrossolúvel da vitamina E ou α -tocoferol) e usada como indicador da atividade antioxidante e vários outros ensaios, envolvendo a presença de um sistema antioxidante durante a geração do radical (RE *et al.*, 1999).

Portanto, cada um destes ensaios envolve a geração de um radical diferente, agindo através de uma variedade de mecanismos, bem como a medida de uma gama de produtos finais, em tempo fixo ou sobre um intervalo de tempo. Tais métodos são usados para avaliar a atividade antioxidante de compostos simples e extratos de alimentos.

Um resumo dos principais métodos encontra-se no QUADRO 1.

QUADRO 1. Principais métodos baseados no seqüestro de radicais livres.

MÉTODO	RADICAL LIVRE EMPREGADO	SISTEMA SOLVENTE	CONDIÇÕES/ INDUTORES DA REAÇÃO	MEDIÇÃO/ QUANTIFICAÇÃO	REFERÊNCIA
FRAP	Fe^{+3} / TPTZ	Aquoso	pH 3,6 , 37°C, 4 min. ou temperatura ambiente, 6 a 8 min.	Δ 593 nm, quantidade de Fe^{+3} reduzida	Benzie & Strain, 1999
Descoloração do ABTS	$\text{ABTS}^{\cdot+}$	Etanol	30°C, ABTS e persulfato de potássio	Δ 734 nm, % inibição do radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$	Re et al., 1999
ORAC	$\text{ROO}^{\cdot}$	Tampão fosfato pH 7,0	37°C, AAPH, 30 min., β ou R-PE pH 7,0 ou fluoresceína pH 7,4	Emissão 565 nm – Excitação 540 nm, AUC da fluorescência da PE	Cao & Prior, 1999
DPPH	$\text{DPPH}^{\cdot}$	Metanol	20 min – 6 h	Δ 515 nm, Descoloração do radical $\text{DPPH}^{\cdot}$	Blois, 1958
Metasulfato-NADH fenazina	Superóxido $_2^{\cdot-}$ ^{- d}	Tampão fosfato pH 7,4	25°C, Fenazina metasulfato-NADH, NBT	Δ 560 nm, Redução do NBT, % inibição	Robak & Gryglewski, 1988
Xantina-xantina-oxidase	$\text{O}_2^{\cdot-}$	Tampão fosfato pH 7,5	25°C, xantina, 30 min.	Δ 290 nm, % inibição da atividade da enzima	Noro <i>et al.</i> , 1983

Entre os métodos empregados para a avaliação das propriedades dos antioxidantes de seqüestro de radical livre, os descritos a seguir são os mais representativos.

2.4.1.1.1 Ensaio do Poder Antioxidante pela Redução Férrica (FRAP)

Inicialmente designado para determinar a capacidade antioxidante do plasma e posteriormente aplicado a outros substratos tais como alimentos, o ensaio FRAP, ou Ensaio da Habilidade do Plasma para Redução Férrica, foi renomeado para Ensaio do Poder Antioxidante para Redução Férrica (PULIDO, BRAVO & SAURACALIXTO, 2000). Este ensaio baseia-se na medida direta da habilidade dos antioxidantes (redutores) da amostra em reduzirem, em condições de baixo pH, o complexo Fe^{+3} /tripiridiltriazina (TPTZ), presente em excesso estequiométrico, para a forma ferrosa Fe^{+2} , de intensa cor azul e absorção máxima a 593 nm (OU *et al.*, 2002).

Os valores do ensaio FRAP são obtidos monitorando a referida redução, através da medida da absorbância da amostra estudada a 593 nm, lida contra um branco de reagentes, em um pré-determinado intervalo de tempo depois da mistura reagente/amostra, e comparada com aquela contendo íons ferrosos em concentração conhecida (BENZIE & STRAIN, 1996). Esta redução está diretamente relacionada ao poder redutor total dos antioxidantes doadores de elétron presentes na amostra (BENZIE & STRAIN, 1999), sendo a absorbância a 593 nm proporcional ao poder

antioxidante para redução férrica (valor FRAP) (OU *et al.*, 2002). As mudanças na absorbância são lineares sobre uma ampla faixa de concentração em misturas antioxidantes e solução contendo um antioxidante na forma purificada. Assim, o ensaio FRAP pode ser desenvolvido em uma ampla faixa de fluidos biológicos complexos tais como extratos etanólico e aquoso de drogas, alimentos e plantas, incluindo frutos e sementes oleaginosas, bem como solução simples e heterogênea de antioxidantes puros (BENZIE & STRAIN, 1999).

Recentemente, em um estudo comparativo da potência antioxidante da genisteína e da daidzeína com seus glicosídeos correspondentes isolados da soja, o ensaio FRAP foi um dos métodos empregados por Lee *et al.* (2005) para determinação da capacidade antioxidante das amostras. Este método foi também amplamente empregado por Halvorsen *et al.* (2002), em um estudo de varredura sistemática de antioxidantes totais em plantas comestíveis, incluindo frutos e sementes oleaginosas tais como amêndoas, avelãs e castanha de caju, bem como amendoim, gergelim e girassol.

O ensaio FRAP é econômico, os reagentes são simples de se preparar, os resultados são altamente reproduzíveis e o procedimento é direto e rápido (BENZIE & STRAIN, 1999). A principal desvantagem deste método é de que a capacidade redutora medida pode não refletir necessariamente a atividade antioxidante. Uma vez que o método não inclui um substrato oxidável, nenhuma informação é fornecida sobre as propriedades protetoras dos antioxidantes (FRANKEL & MEYER, 2000). Em adição, o ensaio não mede os antioxidantes contendo grupos –SH (PRIOR & CAO, 2000).

O ensaio FRAP pode também ser desenvolvido em uma versão modificada, conhecida como Ensaio do Poder Antioxidante para Redução Férrica e Concentração de Ácido Ascórbico (FRASC), fornecendo simultaneamente três índices do estado antioxidante – poder redutor (antioxidante) total, concentração absoluta de ácido ascórbico e contribuição relativa do ácido ascórbico para o poder antioxidante total da amostra (BENZIE & STRAIN, 1999).

Por outro lado, uma aproximação mais biológica quanto a capacidade antioxidante dos compostos estudados envolve a geração de radicais livres de significado fisiológico, tais como o radical peroxil. O ensaio mais comum a este respeito é o ORAC (HOLLMAN, 2001).

2.4.1.1.2 Ensaio da Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC)

Originalmente, o ensaio ORAC baseia-se na detecção do dano químico as β ou R-Picoeritrinas (β ou R-PE), proteínas que funcionam como componentes armazenadores de luz em cianobactérias e algas vermelhas. A fluorescência destas proteínas constitui a base da medida sensível da integridade física e química das mesmas (CAO, ALESSIO & CUTLER, 1993). Sob as condições do ensaio, a perda da fluorescência da PE na presença de radicais livres é tomada como índice de dano oxidativo a proteína. A inibição da ação do radical livre pelo antioxidante, o que reflete na proteção contra a perda de fluorescência da PE, é a medida da sua atividade antioxidante contra radicais livres. Além do uso da β ou R-PE, como

indicador sensível ao ataque do radical livre, e do TROLOX como padrão, o ensaio original emprega a 2,2'-azobis(2-amidinopropano)diidroclorido ou AAPH, a 37°C, como sistema gerador de radical livre ROO[•] e a técnica da área sob a curva (AUC) ou curva decrescente de fluorescência da amostra comparada com o branco, para a quantificação da capacidade antioxidante. O AAPH sofre decomposição espontânea e produz radicais ROO[•] como uma taxa primariamente determinada pela temperatura (CAO & PRIOR, 1999).

Com a medida da fluorescência da PE, como aplicada no ensaio ORAC, existe muito menos interferência de compostos coloridos comparado com as medidas de absorbância usadas em outros métodos similares. Este é um importante fator a considerar, particularmente quando frutas e outros vegetais bem como suplementos naturais são analisados quanto a sua capacidade antioxidante (PRIOR & CAO, 2000).

Assim, o método ORAC tem sido empregado por diferentes autores para a determinação da capacidade antioxidante, particularmente de frutas. Contudo, Adamson *et al.* (1999), usando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de fase normal para quantificação das procianidinas de amostras de pasta de cacau e de chocolate, correlacionaram o conteúdo destas substâncias com a atividade antioxidante total das amostras empregando o método ORAC como um indicador da atividade biológica potencial das amostras.

Por outro lado, devido a razão molar muito alta (>2.000) do AAPH para o antioxidante usado neste procedimento, o ensaio ORAC tem elevada especificidade e

mede a capacidade de um antioxidante em remover diretamente os radicais livres. A técnica AUC combina a percentagem de inibição e a extensão do tempo de inibição da ação do radical livre pelo antioxidante em uma única quantidade, o que a faz superior aos outros métodos similares que usam percentagem de inibição em um tempo fixo ou a extensão do tempo de inibição a uma percentagem de inibição fixa. O radical $\text{ROO}^\bullet$ é o mais comum em sistemas biológicos, dando aos resultados do ensaio ORAC relevância para sistemas biológicos. O ensaio possui também a vantagem adicional de permitir o uso de outras fontes oxidantes, tais como radicais $\text{OH}^\bullet$ e metais de transição como o Cu^{+2} (PRIOR & CAO, 2000). As PEs comercialmente disponíveis, tanto β -PE quanto R-PE, são misturas de moléculas de PE com diferentes pesos moleculares e podem ser usadas no ensaio. O mesmo comprimento de onda de excitação (540 nm) e filtro de emissão (565 nm) podem ser usados para monitorar a fluorescência de ambas (CAO & PRIOR, 1999).

Todavia, o uso da PE como prova de fluorescência tem suas limitações: 1) O decréscimo na fluorescência da PE não é linear com o tempo e as formas das curvas de decréscimo diferem na presença de diferentes antioxidantes bem como com diferentes concentrações do mesmo antioxidante. 2) A PE não é fotoestável e, depois de exposta a luz de excitação por um certo período de tempo, pode ser fotodescorada. 3) Finalmente, a PE interage com polifenóis devido a ligação protéica não-específica. Assim, o cálculo da AUC aparentemente leva a suposições errôneas de linearidade e reações de similaridades (OU, HAMPSCH-WOODILL & PRIOR, 2001).

Contudo, a principal desvantagem do método ORAC é que se assume que o mecanismo oxidativo e o de proteção da fluorescência da PE correspondem aos de substratos biológicos críticos. A oxidação da porção foto-receptora da PE (34 grupos prostéticos tetrapirrólicos lineares ligados covalentemente) na medida da fluorescência também não reflete necessariamente a extensão da proteção antioxidante contra dano oxidativo à própria proteína (FRANKEL & MEYER, 2000).

Devido a estes problemas um aprimoramento do ensaio ORAC tem sido desenvolvido e validado usando a Fluoresceína ou FL (3',6'-diidroxispiro[isobenzofurano-1[3H], 9'[9h]-xanteno]-3- μ m) 48nM, em tampão fosfato 75 mM, pH 7,4, pré-incubada a 37°C por 15 minutos, como prova de fluorescência (OU, HAMPSCH-WOODILL & PRIOR, 2001).

Entretanto, a aplicação do ensaio ORAC continuava limitada a antioxidantes hidrofílicos, devido ao ambiente aquoso dos mesmos. Visando a expansão do corrente ensaio ORAC/FL para antioxidantes lipofílicos, a β -ciclodextrina aleatoriamente metilada ou CDAM (oligossacarídeos cíclicos (α -1,4)ligados da α -D-glucopirranose) foi introduzida para melhorar a solubilidade dos antioxidantes lipofílicos em água. A CDAM contém uma cavidade central relativamente hidrofóbica e uma superfície externa hidrofílica. Esta propriedade tem sido útil às indústrias farmacêutica e de alimentos na melhora da solubilidade dos compostos lipossolúveis, em um ambiente aquoso. A CDAM a 7% (p/v), em uma mistura de acetona a 50% em água, foi suficiente para solubilizar os compostos de vitamina E e outros antioxidantes fenólicos lipofílicos em tampão fosfato 75 mM, pH 7,4. Pela primeira vez, usando o TROLOX como padrão, os valores do ensaio ORAC para α -tocoferol,

(+)- γ -tocoferol, (+)- δ -tocoferol, α -tocoferolacetato, tocotrienóis, 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol e γ -orizanol puderam ser determinados. A informação estrutural do α -tocoferol oxidado, obtida pela Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massa (CL-EM) revela que o mecanismo para a reação entre vitamina E e radical ROO $\cdot$ segue o mecanismo da transferência de átomo de hidrogênio, o que está de acordo com a noção de que a vitamina E é um antioxidante bloqueador da cadeia de peroxidação (HUANG *et al.*, 2002).

Outros métodos baseados no seqüestro de radicais livres têm sido relatados. Porém, o que utiliza a reação com o DPPH tem recebido maior atenção (SÁNCHEZ-MORENO, LARRAURI & SAURA-CALIXTO, 1998).

2.4.1.1.3 Ensaio do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

O ensaio DPPH baseia-se no seqüestro do radical estável DPPH $\cdot$ do meio pelos antioxidantes da amostra (BLOIS, 1958). O radical DPPH $\cdot$ foi um dos mais antigos radicais sintéticos usados para se estudar os efeitos estruturais na atividade de antioxidantes fenólicos. Este radical comercialmente disponível serve como radical oxidável a ser reduzido pelo antioxidante (AH) bem como indicador para a reação $\text{DPPH} \cdot + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A} \cdot$ (FRANKEL & MEYER, 2000).

O grau de descoloração do radical DPPH $\cdot$, a 515 nm, pela ação dos antioxidantes é medido espectrofotometricamente em uma solução metanólica até a

absorbância permanecer constante e indica a eficiência de remoção do antioxidante adicionado (SÁNCHEZ-MORENO, LARRAURI & SAURA-CALIXTO, 1998).

Um índice antioxidante foi proposto como parâmetro para se determinar a “eficiência antiradical” (EA), baseado na quantidade de antioxidante requerida para um decréscimo de 50% (EC_{50}) na concentração inicial do radical DPPH $\cdot$ e o tempo necessário para se atingir o estado constante ($T_{EC_{50}}$) na concentração de radical DPPH $\cdot$ ($EA = 1/EC_{50} \times T_{EC_{50}}$) (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER & BERSET, 1995).

O método DPPH vem sendo muito empregado por diferentes autores para determinação da capacidade antioxidante de vários alimentos, entre eles frutos e sementes oleaginosas. Krings & Berger (2001) determinaram a capacidade antioxidante dos extratos etanólicos de alguns alimentos tostados, tais como a avelã e a amêndoa doce, empregando o método DPPH. Siriwardhana & Shahidi (2002), empregaram o método DPPH para determinar a capacidade anti-radical dos extratos etanólicos de amostras de amêndoa e seus produtos. Na determinação da capacidade antioxidante do extrato metanólico da lignina glicosídeos da farinha de semente de gergelim preta não torrada, Shyu & Hwang (2002) também empregaram o método DPPH. Suja, Jayalekshmy & Arumughan (2004) empregaram o método DPPH no estudo do comportamento de remoção de radical livre dos compostos antioxidantes do extrato metanólico de semente de gergelim. Mais recentemente, método DPPH foi também empregado por Xu, Chen & Hu (2005) para determinação da atividade antioxidante do pigmento marrom e dos extratos da semente de gergelim preta.

Contudo, este ensaio é limitado porque o radical DPPH[•] interage com outros radicais (alquil) e a curva resposta/tempo para atingir o estado constante não é linear com diferentes proporções de antioxidante/DPPH (FRANKEL & MEYER, 2000).

No que se refere ao segundo grupo de metodologias, as usadas para a avaliação do grau de eficácia de sistemas antioxidantes são as mesmas que se utiliza para a determinação da estabilidade oxidativa de sistemas lipídicos, resultando da aplicação de técnicas analíticas muito diversas (cromatografia, espectrofotometria, condutimetria, polarografia), assim como da adoção de diferentes condições de ensaio e da medida de diferentes indicadores da oxidação, conforme descrito a seguir.

2.4.1.2 Métodos que empregam lipídeos como substrato

Neste grupo de metodologias, a grande diversidade de métodos analíticos (químicos, físicos e/ou físico-químicos) propostos também coloca algumas dificuldades de seleção quanto a escolha do método mais adequado para um determinado estudo de avaliação da capacidade antioxidante. Da mesma forma, a diversidade das condições de ensaio (substratos lipídicos, concentrações, tempo de oxidação, temperaturas, oxigenação) e dos sistemas modelos usados tem gerado algumas dificuldades no que diz respeito a interpretação e comparação dos resultados obtidos através destas metodologias (SILVA, BORGES & FERREIRA, 1999).

Um resumo dos principais métodos encontra-se no QUADRO 2.

QUADRO 2. Principais métodos que empregam lipídeos como substrato.

MÉTODO	SISTEMA SOLVENTE	CONDIÇÕES/ INDUTORES DA REAÇÃO	MEDIÇÃO/ QUANTIFICAÇÃO	REFERÊNCIA
Sistema β-caroteno e ácido linoléico	Aquoso	50° C em cubetas, Diferentes indutores, Ácido linoléico com β -caroteno emulsificados em Tween	Δ 470 nm, % de inibição da oxidação do β -caroteno	Miller, 1971
Dienos conjugados	Tampão pH 7,4	37 ou 40° C, minutos, AAPH Ácido linoléico emulsificado em SDS	Δ 234 nm, Dienos conjugados	Huang <i>et al.</i> , 1996
TBARS	Tampão pH 1,0 - 2,0	100° C, TBA, íon Cu^{+2} , Fe^{+3} ou AAPH Ácido linoléico emulsificado em Tween ou SDS	Δ 532 - 535 nm, Valor TBA	Winterbourn, Gutteridge & Halliwell, 1985
Índice de Peróxido	—	Iodeto de potássio, amido, Tiossulfato de potássio	milimoles de O_2 ativo/ Kg de matéria graxa	Hamilton <i>et al.</i> , 1983
LDL humana	PBS	2-várias horas, Cu^{+2} , metamioglobina	Hexanal, Δ 234 nm Dienos conjugados, Tempo de indução, 50% de oxidação ou % inibição	Esterbauer <i>et al.</i> , 1989
Rancimat	Aquoso	110-140° C, Ar seco ou O_2	Tempo de indução	Hasenhuetti & Wan, 1992

Dentre estes métodos, os descritos a seguir são os mais usados ou foram alvo de maior atenção na última década.

2.4.1.2.1 Sistema β -caroteno e ácido linoléico

O sistema modelo β -caroteno e ácido linoléico para determinação da capacidade antioxidante de extratos de alimentos foi primeiramente empregado por Marco (1968) e modificado por Miller (1971). Neste método, os produtos da degradação do ácido linoléico pela oxidação, devida a diferentes indutores (oxigênio, luz, calor), são medidos indiretamente pela taxa de destruição oxidativa do β -caroteno, determinada espectrofotometricamente a 450-470nm (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

O sistema β -caroteno e ácido linoléico é um dos métodos que vem sendo mais empregados nos estudos da avaliação da capacidade antioxidante de frutos e sementes ricas em lipídeos. Melo & Mancini-Filho (1989) empregaram o sistema β -caroteno e ácido linoléico para verificação da capacidade antioxidante do extrato metanólico do fruto do dendezeiro. Amarowicz *et al.* (1996) empregaram este método para determinação da capacidade antioxidante do extrato etanólico de semente de mostarda. Em um estudo para se medir a capacidade antioxidante dos extratos da casca e do germe da aveia, Emmons & Petterson (1999) também empregaram o sistema β -caroteno e ácido linoléico. Este método foi ainda empregado por Wettasinghe & Shahidi (1999) na avaliação das propriedades antioxidante e de

remoção de radical dos extratos etanólicos de semente de borage (*Borago officinalis* L.). Matthaus (2002) empregou o sistema β -caroteno e ácido linoléico para avaliação da capacidade antioxidante de extratos isolados de resíduos de várias sementes oleaginosas, entre elas a canola, o girassol e a mostarda.

Entretanto, o método mais comumente usado para detecção da oxidação lipídica é o ensaio TBARS (SCHMEDES & HOLMER, 1989), conforme descrito a seguir.

2.4.1.2.2 Ensaio das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

O ensaio TBARS baseia-se na reação do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) com os produtos da decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos insaturados, resultantes da oxidação de um substrato lipídico (WINTERBOURN, GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1985). Um dos principais produtos formados é o malonaldeído (MDA), um aldeído com átomos de carbono que reage com 2 moléculas de TBA formando um pigmento vermelho/violeta (TBARS), que é medido espectrofotometricamente a uma absorvância máxima de 532-535 nm. A reação ocorre em meio ácido (pH 1,0-2,0) e elevada temperatura (100° C) para aumentar tanto a velocidade quanto a sensibilidade (SILVA, BORGES & FERREIRA, 1999).

O procedimento envolve duas etapas distintas: primeiro, o substrato é oxidado com a adição de um íon metálico de transição, como cobre ou ferro, ou uma fonte de radical livre como o AAPH (também referido como ABAP). Em seguida, a extensão da

oxidação é determinada pela adição do TBA e medida espectrofotométrica do produto (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

A adição de um antioxidante inibe a oxidação e, desta forma, a absorção é reduzida. Os resultados são tipicamente quantificados contra uma curva de calibração para o malonaldeído bis(dimetilacetal) ou malonaldeído bis(dietilacetal) e expressos em valor TBA, definido como peso, em mg, de TBA por Kg de amostra (SILVA, BORGES & FERREIRA, 1999). Os resultados podem também ser descritos em termos de percentagem de inibição da oxidação (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

Embora a reação não seja muito específica e as condições de reação tenham um efeito significativo no desenvolvimento da cor, pois é determinado tanto o MDA já formado naturalmente da decomposição do hidroperóxido quanto o liberado secundariamente devido a etapa de aquecimento na reação TBA (SCHEMEDES & HOLMER, 1989), o ensaio TBARS é usado frequentemente. O procedimento pode ser melhorado pelo uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia a Gás (CG) ou CG-EM, para caracterizar espécies aldeídicas individuais, o que não identifica a fonte de MDA nas amostras ou elimina a possibilidade de um composto com propriedades espectrais similares coeluírem (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

Além do ácido linoléico, numerosos substratos têm sido usados na determinação do TBARS, incluindo outros ácidos graxos, tais como o metil linoleato, bem como amostras de tecidos e LDL. Vários sistemas ácido linoléico modelo têm sido desenvolvidos, incluindo emulsões do mesmo com dodecil sulfato de sódio (SDS) ou Tween. Todavia, apesar de serem frequentemente usados, emulsificados

em Tween ou SDS, as desvantagens do uso de ácidos graxos livres como substratos para avaliação de antioxidantes têm sido relatadas. Estes lipídeos não são modelos apropriados de substratos para alimentos, os quais consistem principalmente de triglicerídeos. O ácido linoléico, ao contrário dos triglicerídeos, forma micelas em sistemas aquosos, as quais têm propriedades coloidais diferentes afetando fortemente o comportamento tanto dos iniciadores da oxidação quanto dos antioxidantes. A maior polaridade do metil linoleato comparada a dos triglicerídeos também seria esperada afetar a atividade relativa dos antioxidantes hidrofílicos comparados aos lipofílicos. O uso de emulsificantes com carga é outro fator que marcadamente afeta a atividade antioxidante. O SDS é frequentemente empregado para testar antioxidantes em sistemas aquosos, juntamente com o ácido linoléico. Antioxidantes os quais estão largamente presentes como ânions nas condições teste, de pH de cerca de 7,0-7,4, são inefetivos em sistemas aquosos emulsificados com SDS pois não podem contactar o lipídeo oxidável dentro das micelas SDS devido a repulsão exercida pela carga negativa do emulsificante SDS. Por estas razões, é altamente desejável se evitar o uso de ácidos graxos livres, notadamente o ácido linoléico, como substratos devido ao comportamento coloidal dos mesmos, que é diferente tanto dos triglicerídeos quanto dos fosfolipídeos em sistemas aquosos (FRANKEL & MEYER, 2000).

Outro método que vem recebendo atenção é o método Rancimat.

2.4.1.2.3 Método Rancimat

A estabilidade oxidativa dos óleos e gorduras comestíveis é um importante parâmetro para a avaliação da qualidade dos mesmos. A autooxidação é efetuada pelo oxigênio atmosférico (LÄUBLI & BRUTTEI, 1986).

Testes rápidos para predizer a resistência dos óleos e gorduras a oxidação têm sido procurados. Os mais antigos e mais comumente usados são o teste do forno Schaal e o Método Oxigênio Ativo (AOM) (HASENHUETTI & WAN, 1992) ou teste de Swift (SILVA, BORGES & FERREIRA, 1999).

Os testes de estabilidade em óleos e gorduras comestíveis recorrem a condições padronizadas de oxidação acelerada (oxigenação intensiva, tratamento térmico e/ou catálise metálica) e permitem estimar de forma rápida a estabilidade oxidativa de uma matéria graxa ou a eficácia teórica de um antioxidante isolado ou em associação. São testes específicos para a análise da oxidação em alimentos, sendo altamente relevantes para as condições as quais óleos e gorduras estão sujeitos, tais como no processo de produção, manipulação de alimento ou uso doméstico (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

O procedimento requer equipamento simples e pode ser usado como um método geral para determinação da atividade antioxidante, através da seleção de substratos tais como banha, óleo comestível ou um substrato modelo como o metil linoleato. O lipídeo é exposto a uma corrente de ar seco ou de oxigênio, a uma temperatura de 100-140° C, e o progresso das curvas de oxidação decorrente pode ser seguido pela determinação periódica do índice de peróxido ou outro parâmetro,

tal como condutividade ou conjugação de dienos. Estas curvas compreendem uma fase de indução, na qual praticamente nenhum dos produtos secundários é formado, e uma fase de oxidação, durante a qual uma grande elevação no índice de peróxido e produtos voláteis é detectada (LÄUBLI & BRUTTEI, 1986). A adição de um antioxidante resulta na inibição da oxidação. Os resultados são quantificados pela medição do tempo de indução do controle e da amostra, com a mais longa indução indicando melhor atividade (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

O aparelho Rancimat (METROHM AG, CH-9100 Herisau, Switzerland) tem sido apresentado como um método para se determinar a resistência de um óleo a oxidação. As condições de trabalho são semelhantes as do AOM, embora neste caso se avaliem os produtos secundários de oxidação ao invés de peróxidos. Vários estudos na literatura têm sustentado uma correlação entre o AOM e o Índice de Estabilidade do Óleo (OSI) determinado pelo Rancimat. O método empregado neste aparelho baseia-se no registro das variações da condutividade da água destilada, na qual se faz a coleta dos ácidos de baixo peso molecular obtidos após a iniciação forçada da oxidação a elevada temperatura. Grande parte dos produtos voláteis formados pela termo-decomposição consistem em ácido fórmico, que é recolhido em água destilada, medido condutimetricamente e a condutividade plotada automaticamente. O progresso das curvas de oxidação determinadas desta maneira virtualmente se assemelham ao do índice de peróxido. O t_i (ponto de maior inflexão) é determinado graficamente depois do término do experimento (ponto de interseção tangencial). As vantagens da técnica Rancimat são que ela é uma medida contínua, a qual não requer determinações analíticas periódicas, bem como o aparelho não

requer supervisão durante o curso de um experimento. Contudo, o método condutimétrico apresenta inconvenientes pois, assim como no AOM, só se obtém resultados mensuráveis para níveis de oxidação elevados ($IP > 100$), muito além do ponto correspondente ao aparecimento de *off flavors*. Em adição, a semelhança de todos os testes que recorrem a uma oxigenação intensiva a altas temperaturas, os produtos de decomposição que se formam nas condições térmicas do ensaio ($T > 100^{\circ}\text{C}$) não são da mesma natureza dos obtidos nas condições normais de armazenamento. Para minimizar estes inconvenientes, verifica-se hoje em dia uma tendência a efetuar as determinações a temperaturas mais baixas ($60\text{-}90^{\circ}\text{C}$). Finalmente, as condições térmicas usadas tornam impossível a avaliação da capacidade antioxidante de compostos termolábeis, os quais podem decompor-se ao longo do ensaio. Por outro lado, os testes acelerados são de grande utilidade quando se comparam óleos quanto a estabilidade geral dos mesmos a oxidação, mas possuem a desvantagem de falharem ao predizer a estabilidade, particularmente quanto ao início e natureza dos *off flavors* nos produtos contendo lipídeo (HASENHUETTI & WAN, 1992).

Existem outros aparelhos no mercado destinados a avaliação rápida do estado de oxidação lipídica, particularmente de óleos alimentares, como o Foodoil-sensor (Northern Technologies International) que permite acompanhar o aumento da constante dielétrica do óleo ao longo do processo de degradação oxidativa (SILVA, BORGES & FERREIRA 1999).

Assim, existe hoje uma grande diversidade de métodos para se avaliar a atividade antioxidante total *in vitro* dos compostos fenólicos de alimentos. Porém, dos vários métodos disponíveis, a maioria é conduzida em sistema aquoso não sendo adequada para antioxidantes lipofílicos ou misturas. Todos fornecem somente uma direção sobre a atividade antioxidante dos mesmos (MOURE *et al.*, 2001) e apresentam vantagens e desvantagens (van den BERG *et al.*, 1999). Desta forma, a atividade antioxidante *in vitro* pode e deve ser avaliada com diferentes testes para diferentes mecanismos. Contudo, todos estes ensaios baseados em reações químicas diferentes oferecem resultados diferentes. Em virtude da grande diversidade de resultados numéricos distintos obtidos a partir destes métodos, metodologias mais específicas e protocolos de ensaio mais válidos quanto a substratos, condições de análise, concentrações e cálculos, tornam-se necessários para se trazer alguma ordem à situação atualmente existente neste importante campo de estudo (FRANKEL & MEYER, 2000).

Por outro lado, questões semelhantes as da determinação da atividade antioxidante *in vitro* também envolvem a determinação da atividade antioxidante *in vivo*.

2.4.2 Principais métodos *in vivo*

Os organismos vivos desenvolveram um complexo sistema de defesa antioxidante para combater espécies reativas que são prejudiciais à saúde dos mesmos. Além das enzimas de defesa antioxidante (catalase, peroxidase, superóxido

dismutase), compostos não-enzimáticos tais como albumina, GSH (hormônio do crescimento), ácido úrico e bilirrubina bem como nutrientes como ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno e flavonóides também constituem importantes componentes deste sistema. Assim, é essencial medir todos estes antioxidantes na avaliação da capacidade do sistema de defesa antioxidante do organismo (CAO & PRIOR, 1998).

Contudo, o número de diferentes antioxidantes no plasma, soro, urina e outras amostras biológicas torna difícil medir cada antioxidante separadamente. A possível interação que existe entre estes diferentes antioxidantes *in vivo* poderia também tornar a medida de cada antioxidante individualmente menos representativa do estado antioxidante geral (PRIOR & CAO, 1999).

Desta forma, diferentes métodos têm sido desenvolvidos e empregados com objetivo de determinar a atividade antioxidante total de amostras biológicas subsequente a ingestão de preparações ricas em antioxidantes naturais (DUTHIE, DUTHIE & KYLE, 2000).

Estes ensaios têm sido classificados como método de inibição. Muitos métodos de inibição, além de envolverem um pró-oxidante, geralmente um radical livre, envolvem também um substrato oxidável. O dano oxidativo induzido ao substrato pelo pró-oxidante é inibido na presença de um antioxidante. Esta inibição é medida e relacionada a atividade antioxidante do antioxidante em estudo (RICE-EVANS, 2000).

Entretanto, paradoxalmente, os ensaios da atividade antioxidante total não medem o poder antioxidante total. Em geral, medem predominantemente antioxidantes de baixo peso molecular, de quebra de cadeia, excluindo a contribuição das enzimas antioxidantes e proteínas ligadoras de metal (PRIOR & CAO, 1999).

Uma avaliação mais abrangente da capacidade antioxidante *in vivo*, incluiria a medida de todos estes antioxidantes, embora isto fosse consumidor de tempo, dinheiro e, em alguns casos, tecnicamente difícil (YOUNG, 2001).

Por outro lado, os alvos do ataque de radicais livres no organismo são os lipídeos, proteínas e DNA. Assim, os métodos para avaliação do dano oxidativo *in vivo* envolvem a medida de produtos da peroxidação lipídica, avaliação da oxidação do DNA, das proteínas e perda de tióis, bem como determinação de marcadores moleculares do estresse ou adaptação. Contudo, as metodologias disponíveis para medida do dano oxidativo *in vivo* são escassas.

Um resumo dos principais métodos para avaliação da atividade antioxidante total e para medida do dano oxidativo *in vivo* encontra-se no QUADRO 3.

QUADRO 3. Principais métodos para avaliação da atividade antioxidante total e do dano oxidativo *in vivo*

GRUPO	MÉTODO	REFERÊNCIA
Atividade antioxidante total	FRAP	Benzie & Strain, 1999
	ORAC	Cao & Prior, 1999
	TEAC	Miller <i>et al.</i> , 1993
	TRAP	Wayner <i>et al.</i> , 1985
	DCFH-DA	Valkonen & Kuusi, 1997
	Voltametria cíclica	Kohen <i>et al.</i> , 1999
Dano oxidativo	<u>Lipídeos</u>	
	Perfil de ácidos graxos (CG)	Hartman & Lago, 1973
	Dienos conjugados	Dormandy & Wickens, 1987
	TBARS	Winterbourn, Gutteridge & Halliwell, 1985
	<u>DNA</u>	Dizdaroglu, 1991
	<u>Proteínas e perda de tióis</u>	Levine <i>et al.</i> , 1994; Miller <i>et al.</i> , 1990
	<u>Marcadores moleculares</u>	Grootveld & Halliwell, 1987; Kaur & Halliwell, 1996

Dentre estes métodos, a avaliação do dano oxidativo através da medida da peroxidação lipídica tem sido a mais comumente empregada.

2.4.2.1 Avaliação da peroxidação lipídica

Os métodos para quantificação da peroxidação lipídica podem ser divididos em dois grupos: medida da perda de substrato (conteúdo de ácidos graxos) e quantificação de produtos da peroxidação lipídica (primários e secundários).

2.4.2.1.1 Medida da perda de substrato

A determinação do perfil de ácidos graxos da amostra é comumente usada para se avaliar o conteúdo de ácidos graxos em fluídos biológicos ou tecidos. Contudo, esta determinação não é prática para várias situações *in vivo* pois fornece somente informação do desaparecimento do substrato, detectando poucas mudanças associadas a oxidação *in vivo* (JACKSON, 1999).

Todavia, o processo de peroxidação lipídica resulta em um número de produtos, os quais têm sido medidos como indicadores potenciais da degradação lipídica mediada por radicais livres.

2.4.2.1.2 Quantificação de produtos da peroxidação lipídica

A peroxidação de ácidos graxos insaturados resulta na formação de estruturas de dienos conjugados, que absorvem luz no comprimento de onda de 230-235 nm e podem ser quantificado espectrofotometricamente. Estudos mostram a elevação destas substâncias em animais e humanos associadas ao estresse oxidativo. Entretanto, existe considerável controvérsia no que diz respeito a origem deste material. Além disso, outros compostos (purinas, pirimidinas, heme proteínas) também absorvem a 234 nm. Desta forma, seu valor como índice da peroxidação lipídica em humanos é questionável. Por outro lado, os hidroperóxidos lipídicos também são produtos primários da peroxidação lipídica. Os ensaios para medi-los são mais específicos e sensíveis do que para outros produtos da mesma. Contudo, estas substâncias são instáveis e existe ausência de níveis detectáveis em alguns fluídos e tecidos (JACKSON, 1999).

Atualmente, a maioria das pesquisas estuda os produtos secundários da degradação lipídica como método primário para se avaliar o processo. O principal ensaio a este respeito é o método TBARS/MDA (WINTERBOURN, GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1985), descrito na seção 2.4.1.2.2.

Todavia, embora originalmente empregado para medir o conteúdo de MDA da amostra, tem se tornado aparente que este teste não é específico para MDA e outros produtos da degradação lipídica. Assim, várias modificações e variações deste teste têm sido publicadas propondo a elevação de sua sensibilidade e/ou melhora de sua

especificidade. Contudo, o método TBARS pode somente fornecer um guia para a possibilidade de peroxidação lipídica elevada em tecidos biológicos (JACKSON, 1999).

Mais recentemente tem-se empregado técnicas baseadas na CLAE para medir produtos específicos da peroxidação lipídica. A mais popular é a análise de MDA, tanto diretamente quanto pela sua reação com o TBA (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

Outras análises, tais como a dos hidroxinonenais, também são tomadas algumas vezes. Porém, os dados disponíveis indicando se tais determinações oferecem significativa vantagem sobre as análises do MDA por CLAE são insuficientes (JACKSON, 1999).

Uma determinação que pode, em princípio, oferecer considerável vantagem aos estudos com humanos é a análise do etano e/ou pentano no ar expirado. A natureza reproduzível e não evasiva desta determinação levou a vários trabalhos visando o desenvolvimento de metodologias apropriadas para a mesma. Contudo, esta determinação requer extremo cuidado e complexo sistema para obter resultados válidos. O etano e pentano são produtos da peroxidação dos ácidos graxos n-3 e n-6, respectivamente, mas também são encontrados em concentrações relativamente altas no ar, derivados principalmente da emissão industrial e exaustão de veículos. Desta forma, os indivíduos estudados precisam respirar ar livre de hidrocarbono antes da determinação. Todavia, parece que estes gases se dissolvem nos fluídos dos tecidos e o tempo de respiração necessário para remoção dos mesmos não tem sido claramente definido, podendo ser significativo (pelo menos sete dias). O período para remoção destes é particularmente relevante em estudos de músculo, onde

rápidas mudanças induzidas pelo exercício no fluxo sanguíneo parece liberarem hidrocarbonos estocados suficientes para mascarar mudanças devido a peroxidação lipídica (SNYDER, BALKE & OERTES, 1987).

Assim, os ensaios para avaliação da atividade de radicais livres em sistemas biológicos são múltiplos. Porém, apesar das várias publicações de novos métodos e modificações de métodos já existentes para a avaliação da atividade de radical livre em materiais biológicos, ainda existe carência de determinações confiáveis para quantificação da atividade antioxidante *in vivo*. A análise de vários indicadores relacionados e o emprego de diferentes métodos também parece ser a maneira mais confiável de se avaliar este processo *in vivo* (JACKSON, 1999).

Levando-se em consideração todos os aspectos expostos até aqui, verifica-se que as pesquisas envolvendo os antioxidantes naturais devem prosseguir, já que estas têm se mostrado de suma importância para a indústria de alimentos, tanto no sentido de obter aditivos alimentícios com menos efeitos colaterais em relação aos antioxidantes sintéticos que vêm sendo empregados, quanto para saúde coletiva na busca por alimentos que possuam em sua composição substâncias de excelência no que diz respeito aos aspectos funcionais no combate aos radicais livres e todos os possíveis prejuízos que estes podem causar à saúde humana (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004).

Neste contexto, os frutos e as sementes oleaginosas são de grande interesse pois se sabe que são ricos em compostos fenólicos e que estes, por possuírem características antioxidantes, podem contribuir para as propriedades nutricionais e funcionais dos alimentos que os contêm (EMMONS & PETERSON, 1999).

Para a determinação da atividade antioxidante total *in vitro* destes alimentos, os estudos iniciais têm empregado diferentes métodos, destacando-se entre eles o método FRAP, o método ORAC, o método DPPH (BLOMHOFF, 2005) e o sistema β -caroteno e ácido linoléico. Recentemente, Blomhoff (2005) empregaram o método FRAP na elaboração de uma “tabela do teor de antioxidantes totais” de mais de 2.000 itens alimentícios coletados mundialmente, incluindo nozes como a amêndoa e a avelã e sementes oleaginosas como o girassol e o gergelim. Amarowicz, Naczki & Shahidi (2000^a) determinaram a capacidade antioxidante da casca da semente de canola e de colza empregando o sistema β -caroteno e ácido linoléico, assim como o método DPPH. Em outro estudo, Amarowicz, Naczki & Shahidi (2000^b) também empregaram o sistema β -caroteno e ácido linoléico e o método DPPH na avaliação da atividade antioxidante de várias frações de fenólicos não taninos da casca da canola. Suja, Jayalekshmy & Arumughan (2005) determinaram a capacidade antioxidante no extrato metanólico da torta de gergelim empregando o sistema β -caroteno e ácido linoléico e o método DPPH.

Assim, um estudo que se propõe a investigar através de diferentes métodos a capacidade antioxidante, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, dos compostos fenólicos do cotilédono da semente de girassol (*Helianthus annuus* L.) rajada seria relevante.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo teve por objetivo geral a avaliação do cotilédone da semente de girassol (*Helianthus annuus* L.) rajada como fonte de antioxidantes naturais benéficos à saúde.

3.2 Objetivos específicos

1. Caracterização química da semente de girassol estudada.
2. Determinação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos do cotilédone da mesma, obtidos a partir de um processo de extração seqüencial com solventes de diferentes polaridades, empregando diferentes métodos: sistema β -caroteno e ácido linoléico, ensaio FRAP, ensaio DPPH e ensaio ORAC, bem como método Rancimat.
3. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato da amostra de maior atividade antioxidante *in vitro*.
4. Avaliação da atividade antioxidante *in vivo* do extrato de maior atividade antioxidante *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Amostra

A semente de girassol (*Helianthus annuus* L.), classe rajado, tipo 1, híbrido M 734, safra 2001, recém-colhida, foi importada da Argentina pela empresa Dow Agrosciences e recebida para análise 3 meses após a colheita.

As sementes foram armazenadas em câmara fria a uma temperatura de 4° C, embaladas em sacos plásticos vedados, até o momento do preparo para as análises.

4.1.2 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes: β -caroteno 30% FS da Sté. Chimique Roche S. A.; ácido linoléico, Tween 40, BHT (2,6-di-terci-butil-4-metil fenol), DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) 90%, β -Picoeritrinas, fosfato de potássio anidro, fosfato de sódio anidro, ácido clorogênico, ácido benzóico, ácido salicílico, ácido transcinâmico, ácido pirogálico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido gentísico, ácido o-cumárico, ácido protocatequínico, ácido quínico, ácido p-cumárico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido caféico, ácido sinapínico, ácido tiobarbitúrico e BSA (albumina sérica bovina) da Sigma[®]; TROLOX (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2 ácido carboxílico) e AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano diidroclorido) da Aldrich[®]; TPTZ

(2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina) da Fluka; Ferro(III)clorido-6-hidrato e Ferro(II)sulfato heptahidrato da Riedel-de Haën[®]; Reagente de Folin-Ciocalteu, n-butanol e TMP (1,1,3,3-tetrametoxipropano) da Merck[®].

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.1.3 Animais

No ensaio biológico foram utilizados 24 ratos machos albino da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade Albinus Rodentia), recém-desmamados, obtidos a partir da colônia mantida no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo da amostra

As cascas, correspondendo a 36,7% do grão, foram removidas manualmente e os cotilédones, por concentrarem quase todos os compostos fenólicos presentes na semente de girassol, foram separados, triturados em micro-moinho analítico Polymix A10, Kinematica, à temperatura ambiente e tamisados (tamis 20 mesh). A farinha obtida foi acondicionada em frascos plásticos, em atmosfera de nitrogênio, e mantida à temperatura de -18 ° C até a realização de cada determinação.

4.2.2 Determinação da composição centesimal

4.2.2.1 Determinação do teor de umidade e substâncias voláteis a 105°C

Na determinação do teor de umidade da amostra foi empregado o método gravimétrico da dessecação em estufa a 105° C (AOAC, 1995), que se baseia na determinação da perda de peso da amostra submetida ao aquecimento sucessivo em estufa a 105° C até peso constante.

A análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos em g/100 g de amostra.

4.2.2.2 Determinação do teor de lipídeos totais

Os lipídeos totais foram determinados pelo método de Soxhlet (AOAC, 1995).

A análise foi efetuada em triplicata e os resultados expressos em g/100 g de amostra integral.

4.2.2.3 Determinação do teor de proteínas totais

A determinação do teor de proteínas totais foi efetuada através do método de micro-Kjeldahl (AOAC, 1995), onde o nitrogênio presente na amostra foi convertido para proteína por multiplicação pelo fator 5,30.

A análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos em g/100 g de amostra.

4.2.2.4 Determinação do teor de Resíduo Mineral Fixo (RMF)

A fração RMF foi determinada gravimetricamente, com base na perda de peso da amostra submetida ao aquecimento a 550° C (AOAC, 1995).

A análise foi efetuada em triplicata e os resultados expressos em g/100 g de amostra.

4.2.2.5 Determinação do teor de glicídeos totais por diferença

A fração glicídeos totais foi obtida por diferença, a partir do somatório das determinações de umidade, proteínas, lipídeos e RMF e subtraídas de 100. Considera-se glicídeos totais os componentes glicídicos da amostra mais fibras.

4.2.3 Caracterização da fração lipídica

4.2.3.1 Obtenção da fração lipídica

A fração lipídica da amostra estudada foi obtida segundo o método descrito por Folch, Lees & Sloane Stanley (1957).

Um grama de farinha do cotilédone da semente de girassol foi homogeneizado por um minuto com 10 mL de metanol. Em seguida, foram adicionados 20 mL de clorofórmio e a mistura foi homogeneizada por mais 2 minutos. O sobrenadante foi filtrado em funil de *Büchner* e o precipitado homogeneizado com 30 mL da mistura clorofórmio/metanol (2:1 v/v). O sobrenadante foi filtrado e o resíduo lavado com 30 mL da mistura de clorofórmio/ metanol (2:1 v/v). O filtrado foi recolhido em proveta de 250 mL com tampa esmerilhada e teve seu volume aferido para adicionar 1/4 deste volume medido de KCl 0,88% em água. A fase superior foi desprezada por aspiração a vácuo. O volume foi mais uma vez aferido para ser adicionado 1/4 da mistura de metanol/ água (1:1 v/v). A mistura foi homogeneizada manualmente. A fase superior foi eliminada por aspiração a vácuo, sendo a fase inferior filtrada em sulfato de sódio anidro e evaporado em rota-evaporador, com temperatura monitorada a 40°C. O extrato etéreo obtido foi ressuspendido em 5 mL de clorofórmio e empregado na determinação de ácidos graxos da amostra por cromatografia a gás.

4.2.3.2 Esterificação, identificação e quantificação dos ácidos graxos por cromatografia a gás

Os ácidos graxos totais do cotilédone da semente de girassol estudada foram determinados por cromatografia a gás, conforme descrito por Hartman & Lago (1973).

Para esterificação e posterior análise cromatográfica, foram tomados 0,345 mL do extrato obtido no item 4.2.3.1 e evaporado em atmosfera de nitrogênio. Em seguida, foram adicionados 2 mL de NaOH metanólico a 0,5 N e a amostra homogeneizada e mantida em banho-maria fervente por 5 minutos. Depois da amostra esfriada, foi adicionado 6 mL da mistura de esterificação e, em seguida, a mistura foi levada ao banho fervente por mais 3 minutos. Após esse procedimento, a amostra foi esfriada novamente e adicionados 5 mL de solução saturada de cloreto de sódio e a mistura foi homogeneizada em um agitador de tubos. A fração dos metil ésteres foi extraída com três porções sucessivas de 2 mL de hexano. Na fase superior extraída, foram adicionados 5 mL de uma solução saturada de cloreto de sódio. Em seguida, a fase superior que foi evaporada em atmosfera de nitrogênio e adicionado 1 mL de hexano para determinação dos ácidos graxos por cromatografia a gás.

A identificação foi realizada em um cromatógrafo a gás SHIMADZU, GC-17A, equipado com detector de ionização em chama, conectado a um integrador CG. A coluna utilizada foi a *super carbowax* 30 com 30 metros de comprimento e 0,25 mm

de diâmetro interior. O gás de arraste foi o hélio, com fluxo de 1mL/m. A programação de temperatura na coluna foi de 150° C inicial, com um acréscimo de 6° C/min, até atingir 230° C. Já a temperatura da câmara injetora foi de 230° C e a do detetor de 250° C. A identificação e quantificação dos ácidos graxos presentes no cotilédono da semente de girassol estudada foi realizada com base nos tempos de retenção relativa e na concentração dos ácidos graxos da solução padrão (C:12/C:22 - Sigma®). A quantificação foi realizada com base na percentagem da área dos picos, sendo, então, os resultados expressos em percentagem.

4.2.4 Determinação de fenólicos totais

4.2.4.1 Extração dos fenólicos totais

O extrato contendo os compostos fenólicos totais do cotilédono da semente de girassol rajada foi obtido segundo Fantozzi & Montedoro (1978), conforme descrito a seguir.

Foram pesadas 10 g de farinha do cotilédono da semente de girassol estudada que, em seguida, foram homogenizadas com 100 mL de uma mistura metanol/água (80/20 v/v) por 1 hora. Após a homogeneização, a mistura foi filtrada e o volume novamente corrigido para 100 mL com metanol.

4.2.4.2 Dosagem dos fenólicos totais

A concentração de fenólicos totais no extrato obtido foi determinada, espectrofotometricamente, de acordo com o método descrito por Swain & Hillis (1959), através do emprego do reagente de Folin-Ciocalteu e do ácido clorogênico como padrão.

4.2.5 Obtenção dos extratos

4.2.5.1 Extração seqüencial com solventes de diferentes polaridades

A partir de um processo de extração seqüencial com solventes de diferentes polaridades (éter etílico, álcool etílico e água) foram também obtidos extratos da amostra, segundo o descrito por Moreira (1999), porém partindo de quantidade inicial de 8 g de farinha do cotilédone da semente de girassol, conforme descrito no ESQUEMA 2.

FARINHA DO COTILÉDONE DA SEMENTE DE GIRASSOL RAJADA (8 g)

ESQUEMA 2. Obtenção dos extratos da farinha do cotilédone da semente de girassol por extração seqüencial com solventes de diferentes polaridades, segundo Moreira (1999).

4.2.5.2 Determinação do teor de matéria seca dos extratos

Para efeito de cálculo da concentração dos extratos obtidos na extração seqüencial, foi avaliado o teor de matéria seca nos extratos etéreo, etanólico e aquoso da farinha do cotilédono da semente de girassol estudada, conforme o procedimento descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). A determinação foi realizada em triplicata para cada extrato.

4.2.6 Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

Na literatura podem ser encontrados diferentes métodos para determinação da atividade antioxidante total *in vitro*. Geralmente, o ácido ascórbico é usado como padrão de referência e, mais recentemente, o TROLOX, um análogo hidrossolúvel da vitamina E. A capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos etanólico e aquoso, obtidos da farinha do cotilédono da semente de girassol rajada por extração seqüencial, foi determinada empregando-se diferentes métodos, conforme descrito a seguir. A capacidade antioxidante do extrato etéreo não foi determinada devido ao elevado teor de lipídeos extraídos que dificultou a leitura da densidade ótica desta fração.

4.2.6.1 Sistema β -caroteno e ácido linoléico

A capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos etanólico e aquoso foi primeiramente determinada através do método desenvolvido por Marco (1968) e modificado por Miller (1971).

Diferentes volumes (50 μ L, 100 μ L e 200 μ L) de cada extrato foram adicionados em tubos de espectrofotômetro juntamente com 5 mL do sistema modelo β -caroteno e ácido linoléico emulsificados em Tween. Esse sistema foi mantido a 50° C e leituras de absorbância em 470 nm foram realizadas em espectrofotômetro BAUSCH & LOMB, modelo Spectronic 20 D, a cada 15 minutos, durante 2 horas. Todas as determinações foram realizadas em triplicatas e acompanhadas de um controle (sem antioxidante) e um com os mesmos volumes de solução de BHT como padrão. As percentagens de inibição da oxidação foram calculadas pelo decaimento da densidade ótica do controle (D.O. inicial – D. O. final), considerado como 100% de oxidação. A queda na leitura da densidade ótica das amostras foi correlacionada com o controle e estabelecida a percentagem de inibição da oxidação, subtraindo-se a percentagem de oxidação de cada amostra de 100.

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

Em seguida, a eficiência da capacidade antioxidante dos extratos etanólico e aquoso da amostra estudada foi estimada pelo método das tangentes (Tg), em duas partes da curva cinética dos mesmos, de acordo com a modificação proposta por Yanishlieva & Marinova (1995). O valor de cada tg é calculado através da relação entre o cateto oposto (CO) e o cateto adjacente (CA) do triângulo obtido em cada uma das partes da curva cinética estudada. O valor do CO de cada triângulo é obtido pela diferença na leitura da absorbância a 470 nm, representada no eixo das ordenadas, e o do CA pela diferença no intervalo de tempo estudado, representado no eixo das abcissas.

O gráfico ilustrativo das tangentes das curvas cinéticas apresentadas pelo meio contendo o extrato e o controle sem antioxidante encontra-se na FIGURA 14.

FIGURA 14. Tangentes das curvas cinéticas apresentadas pelo

O fator F1 é obtido na curva entre 15 e 45 minutos após o início da reação e representa a relação entre as tangentes (Tg) das curvas cinéticas apresentadas pelo meio contendo o extrato e o controle, sem antioxidantes, conforme se segue:

$$F1 = \frac{\text{Tg 1 extrato}}{\text{Tg 1 controle}}$$

Onde: F1 = Fator cinético correspondente a medida na curva entre 15 e 45 minutos após o início da reação.

O fator F1 representa a efetividade do antioxidante em bloquear as reações em cadeia através da interação com os radicais peroxil.

O fator F2 é obtido na curva entre 75 e 105 minutos após o início da reação e representa a relação entre as tangentes (Tg) das curvas cinéticas apresentadas pelo meio contendo o extrato e o controle, sem antioxidante, conforme abaixo:

$$F2 = \frac{Tg \text{ 2 extrato}}{Tg \text{ 2 controle}}$$

Onde: F2 = Fator cinético correspondente a medida na curva entre 75 e 105 minutos após o início da reação.

16432

O fator F2 representa a possibilidade do antioxidante de interferir nas reações de formação de produtos secundários (aldeídos, cetonas, hidroxiácidos, hidrocarbonetos e polímeros) produzidos na etapa de propagação do processo oxidativo, gerando espécies radicalares que aceleram o processo oxidativo do sistema.

Se o valor da razão entre as tangentes for maior que 1, deve existir uma atividade pró-oxidante no extrato (YANISHLIEVA & MARINOVA, 1995).

4.2.6.2 Ensaio do Poder Antioxidante para Redução Férrica (FRAP)

A capacidade antioxidante dos extratos etanólico e aquoso da amostra estudada, frente ao BHT como padrão, foi também avaliada pelo ensaio FRAP (BENZIE & STRAIN, 1999).

O volume de 1,5 mL do reagente FRAP, recém-preparado, foi adicionado de 0,75 mL de diferentes concentrações de cada extrato estudado e do BHT. Os valores do ensaio FRAP foram obtidos monitorando manualmente a redução do complexo Fe^{+3} /tripiridiltriazina para a forma ferrosa azul pelos antioxidantes das amostras, a temperatura ambiente, através da medida da absorbância, em espectrofotômetro HITACHI U-3410 a 593 nm, lida contra um controle (sem antioxidante), a diferentes intervalos de tempo (0 s., 15 s. e, após, a cada 30 segundos), durante um período de monitoramento de 6 minutos depois da mistura reagente/amostra e comparada com aquela contendo Fe^{+2} em concentração conhecida (μM = Valor FRAP). Soluções aquosas de Fe^{+2} , numa faixa de 25 a 100 $\mu\text{M/L}$, foram usadas para calibração. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. A queda na leitura da densidade ótica das amostras e do BHT foi correlacionada com o controle e estabelecido o valor FRAP (μM) das mesmas, conforme abaixo.

$$\text{Valor FRAP da amostra } (\mu\text{M}) = \frac{\Delta A \text{ 593 nm da amostra (0 – 6 min.)}}{\Delta A \text{ 593 nm do padrão (0 – 6 min.)}} \times \text{Valor FRAP padrão } (\mu\text{M})$$

4.2.6.3 Ensaio do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

A capacidade antioxidante dos extratos alcoólico e aquoso da amostra, bem como do padrão BHT, foi ainda avaliada pelo ensaio DPPH (BLOIS, 1958).

Uma alíquota de 0,75 mL de solução metanólica, contendo diferentes concentrações de cada extrato estudado e do BHT como padrão, foi adicionada a 1,5 mL de solução metanólica de DPPH 0,0020 g/L, preparada diariamente, e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotometro HITACHI U-3410 a 517 nm, a cada 1 minuto durante 5 minutos e, em seguida, de 5 em 5 minutos durante um período de monitoramento de 20 minutos. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e acompanhadas de um controle (sem antioxidante). A queda na leitura da densidade ótica das amostras e do BHT foi correlacionada com o controle e estabelecida a percentagem de descoloração do radical DPPH conforme exposto a seguir.

$$\% \text{ Descoloração do DPPH} = \left[1 - \frac{(\text{Absorbância da amostra} - \text{Absorbância do branco amostra})}{\text{Absorbância do branco do ensaio (DPPH)}} \right] \times 100$$

4.2.6.4 Ensaio da Capacidade de Absorção do Radical Orogênio (ORAC)

Finalmente, a capacidade antioxidante dos extratos etanólico e aquoso e do BHT foi avaliada pelo ensaio ORAC (CAO & PRIOR, 1999).

O volume de 1,75 μL de tampão fosfato pH 7,4, pré incubado a 37° C por 15 minutos, foi tomado e adicionado de 100 μL de solução de β -PE 68 mg/L, também pré-incubada a 37° C por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado 100 μL de cada extrato estudado ou de BHT e 50 μL de AAPH 160 mM. Logo após, a perda da fluorescência das β -Pe em presença dos radicais peroxil formados foi monitorada manualmente através da medida da absorbância (f) em fluorímetro HITACHI U-3410 (Ex 540 nm; Em 565 nm), lida contra um controle (sem antioxidante), a cada 5 minutos depois da mistura reagente/amostra, até que a última leitura tivesse declinado para menos de 5% em relação a primeira e comparada com 100 μL de TROLOX em concentração conhecida como padrão. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. A perda de fluorescência das amostras e do BHT foi correlacionada com o controle e estabelecida a AUC para as amostras e o BHT. O resultados foram expressos em valor ORAC relativo (equivalentes de TROLOX), conforme indicado pelas equações (1) e (2) a seguir.

$$\text{AUC} = 1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + f_4/f_0 \dots\dots\dots + f_{34}/f_0 + f_{35}/f_0 \quad (1)$$

$$\begin{array}{l} \text{Valor ORAC} \\ \text{relativo} \end{array} = \frac{[(\text{AUC}_{\text{amostra}} - \text{AUC}_{\text{branco}})]}{(\text{AUC}_{\text{TROLOX}} - \text{AUC}_{\text{branco}})} \times \frac{(\text{molaridade TROLOX})}{\text{molaridade amostra}} \quad (2)$$

4.2.6.5 Método Rancimat

Por ser o extrato que apresentou a maior atividade nos demais métodos *in vitro* empregados, a capacidade antioxidante do extrato aquoso, assim como a do BHT a 100 µg/mL, foi também avaliada em sistema lipídico, usando o aparelho Rancimat 743 da *Metrohm* ligado ao programa PC:743 Rancimat 1.0, onde foi medido o período de indução do óleo de soja contendo o extrato aquoso, usando o teste *Swift* automatizado (HADORN & ZÜRCHER, 1974). O volume do extrato foi previamente calculado com base no peso seco do mesmo para que a sua concentrações no substrato (óleo de soja sem antioxidante da Cargill Agrícola S/A) fosse de 300 µg/mL de óleo.

O volume do extrato aquoso foi tomado em triplicata e colocado no tubos do Rancimat. Em seguida, 3 g de óleo de soja sem antioxidante foi adicionado em cada tubo e a mistura foi homogeneizada por 15 minutos em aparelho ultra-som. Logo após, com a programação de temperatura de 110° C, $\Delta T = 1,5^\circ$ C, fluxo de ar de 20 L/h, os tubos foram acoplados ao aparelho Rancimat até que a curva de condutividade vezes tempo de reação fosse completada para se calcular o período de indução (PI). Um controle foi também preparado com o óleo de soja sem antioxidante. O BHA a 100 µg/mL foi empregado como padrão.

Os resultados foram expressos em percentagem de aumento do período de indução em relação ao controle, conforme a seguir.

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

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

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

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

4.2.7 Identificação de compostos fenólicos

4.2.7.1 Padrões empregados

Os padrões de compostos fenólicos utilizados para a identificação dos compostos fenólicos da amostra foram ácido clorogênico, ácido benzóico, ácido salicílico, ácido transcinâmico, ácido pirogálico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido gentísico, ácido o-cumárico, ácido protocatequínico, ácido quínico, ácido p-cumárico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido caféico e ácido sinapínico.

4.2.7.2 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos por cromatografia a gás

Para a identificação e quantificação dos compostos fenólicos da amostra estudada foi também empregado o extrato da mesma que apresentou maior atividade antioxidante *in vitro*. Para a identificação, utilizou-se o cromatógrafo a gás

SHIMADZU, modelo GC17A. A coluna capilar empregada foi a semipolar DB5, estrutura química de polimetilfenilsiloxana, com 30 metros de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interior. O gás de arraste foi o hélio com fluxo de 1 mL/minuto. A propagação de temperatura na coluna foi isotérmica de 150° C a 300° C, a uma velocidade de 6° C/minuto. A temperatura da câmara injetora foi de 310° C e do detector de 320° C. A identificação e quantificação dos ácidos fenólicos presentes no extrato aquoso da amostra foi realizada com base nos tempos de retenção relativa e na concentração dos ácidos fenólicos da solução padrão. A quantificação foi realizada com base na percentagem da área dos picos.

4.2.8 Determinação da atividade antioxidante *in vivo*

A avaliação da atividade antioxidante *in vivo* foi realizada de acordo com as seguintes etapas:

4.2.8.1 Obtenção do extrato

O extrato aquoso, obtido de acordo com o ESQUEMA 2, foi liofilizado para que a sua concentração inicial de 0,35% (0,7 mg/200 µL) fosse ressuspensa para 0,7% e 2,1%, sendo administrada aos animais dos grupos experimentais 1 e 2, respectivamente, conforme descrito em 4.2.8.3.

4.2.8.2 Preparo da solução placebo

Como placebo foi usada solução aquosa de glicose a 1%, concentração equivalente ao teor de glicídeos do extrato testado. A solução foi preparada e estocada em freezer a uma temperatura de -18°C, até o momento de sua administração aos animais do grupo controle, segundo descrito em 4.2.8.3.

4.2.8.3 Procedimento experimental com animal de laboratório

Um total de 24 ratos machos albinos, recém desmamados, da linhagem Wistar Hannover (*Rattus norvegicus*, variedade Albinus Rodentia) foram obtidos a partir da colônia mantida no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. O experimento teve a duração de 29 dias. Os ratos foram pesados no início do experimento e a cada 7 dias durante o experimento. Foram aleatoriamente divididos em 3 grupos de 8 animais cada e colocados em gaiolas identificadas como controle, grupo experimental 1 (G1) e grupo experimental 2 (G2). Inicialmente, os animais do grupo controle receberam diariamente, por gavagem, e em horários regulares, 200 µL de solução de glicose a 1%. Da mesma forma, os animais dos grupos experimentais G1 e G2 receberam o mesmo volume do extrato aquoso da semente de girassol estudada, nas concentrações de 0,7 % e 2,1 %, respectivamente. A dose fornecida aos animais foi estabelecida considerando-se que um indivíduo de 70Kg, com uma dieta de 2.000 cal/dia, das quais 30% corresponde a lipídeos, e com ingestão máxima de antioxidantes sintéticos da ordem

de 0,02 g % (DECRETO n. 55.871) do total de lipídeos da dieta, ingere 0,2 mg de antioxidantes /Kg de peso corpóreo/dia. O volume inicial administrado aos animais foi corrigido de acordo com o aumento de peso dos mesmos. A alimentação oferecida aos animais foi *ad libitum*, tanto no que se refere a água quanto a ração comercial extrusada e irradiada para roedores adquirida no comércio da cidade de São Paulo. A temperatura da sala experimental foi de $22 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade relativa de $55 \pm 10\%$, sob um ciclo de 12 h luz/escuro. Ao término do experimento, os animais foram sacrificados por decapitação e, em média, 5 ml de amostras de sangue foram coletadas em tubo de centrífuga contendo 200 μL de EDTA a 5%, assim como o fígado, cérebro e tecido adiposo abdominal de cada animal, que foram acondicionados individualmente em papel alumínio identificados e, em seguida, colocados em um recipiente contendo nitrogênio líquido. No laboratório, cada tubo contendo o sangue foi pesado e centrifugado em centrífuga SORVAL Instrument, modelo RC 5C a 3.000 rotações por minuto, a 4°C por 15 minutos. O plasma de cada tubo foi coletado e acondicionado em tubos eppendorf, etiquetados e armazenados junto as demais amostras biológicas no freezer, a uma temperatura de -80°C , para análises posteriores. Um resumo do experimento com os animais encontra-se no QUADRO 4.

QUADRO 4. Resumo do experimento com animal de laboratório.

GRUPO	TRATAMENTO	TEOR DE RESÍDUO SECO NO VOLUME ADMINISTRADO
Controle	8 animais recebendo inicialmente, por gavagem, 200 μ L de solução de glicose a 1%	2 mg
Experimental G1	8 animais recebendo inicialmente 200 μ L, por gavagem, de extrato aquoso de semente de girassol a 0,7%	1,4 mg
Experimental G2	8 animais recebendo inicialmente, por gavagem, 200 μ L de extrato aquoso de semente de girassol a 2,1%	4,2 mg

4.2.8.4 Caracterização da fração lipídica dos tecidos dos animais

A determinação do perfil de ácidos graxos no tecido adiposo, cérebro, fígado e plasma dos animais do grupo controle e dos grupos experimentais G1 e G2, deu-se conforme a seguir.

4.2.8.4.1 Obtenção da fração lipídica

A obtenção da fração lipídica das amostras biológicas foi realizada conforme descrito na seção 4.2.3.1.

4.2.8.4.2 Esterificação, identificação e quantificação dos ácidos graxos por cromatografia a gás

A determinação do perfil de ácidos graxos das amostras biológicas foi realizada conforme descrito na seção 4.2.3.2.

4.2.8.5 Análise da peroxidação lipídica nos tecidos dos animais

4.2.8.5.1 Determinação das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Os homogenatos do tecido adiposo, cérebro e fígado dos animais experimentais foram preparados de acordo com a metodologia descrita por Winterbourn, Gutteridge & Halliwell (1985), para a avaliação da peroxidação lipídica através da medida da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), assim como o plasma.

Pesou-se $0,6 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ de cada tecido, aos quais foi adicionado tampão fosfato de sódio (10 mM), pH 7,4, na proporção de 1:10 (p/v). Após, a mistura foi homogeneizada, centrifugada a 10.000 rotações por minuto, por 10 minutos, em centrífuga SORVAL Instrument modelo RC 5C, à uma temperatura de 4° C. Alíquotas de 500 μL foram tomadas deste sobrenadante, bem como do plasma dos animais, e colocadas em tubo de ensaio. Acrescentou-se 500 μL de HCl a 25% (v/v), 45 μL de BHT a 2% (p/v) em etanol, 500 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1% (p/v) em NaOH

0,05 M. A mistura foi homogeneizada em agitador para tubos. Os tubos foram tampados e levados ao banho-maria fervente por 10 minutos, onde se desenvolveu uma cor avermelhada. Em seguida, foram resfriados em gelo e acrescentou-se 1,5 mL de n-butanol. A mistura foi homogeneizada vigorosamente, depois centrifugada a 4.000 rotações por minuto, por 10 minutos. Finalmente, tomou-se o sobrenadante para ser realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro HITACHI, modelo U-3410, em um comprimento de onda de 532 nm. As determinações foram realizadas em triplicata e a leitura da absorbância foi realizada contra um branco preparado com solução salina 0,9%.

Para a quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), foi utilizado como padrão a 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP). Preparou-se uma solução estoque de TMP na concentração de 6×10^{-6} mol/L. A partir desta solução, foi preparada uma solução 1.000 vezes mais diluída, a qual foi usada na elaboração da curva padrão de TMP nas concentrações de $2,4 \times 10^{-9}$ M a 12×10^{-9} M, para ser relacionada com as concentrações obtidas nas amostras analisada.

Os resultados foram expressos em nMol de MDA/g de tecido adiposo, de cérebro ou de fígado e nMol de MDA/mL de plasma.

4.2.8.5.2 Quantificação do conteúdo de proteína

Para determinação do conteúdo de proteína do homogenato de fígado, cérebro e tecido adiposo, bem como do plasma dos animais estudados, foi empregado o método de Bradford (1976).

Uma alíquota de 40 μL do homogenato de cada tecido, bem como do plasma dos animais, foi tomada e completada para 1 mL com água destilada, em tubo de ensaio. Em seguida, foi adicionada de 200 μL do reagente de Bradford e agitada em vortex. A absorbância foi lida em espectrofotômetro HITACHI, modelo U-3410, a 590nm. A determinação foi realizada em triplicata e um branco foi preparado com 1 mL de água destilada. BSA (albumina bovina sérica), numa concentração de 0,002 a 0,012 $\mu\text{g/mL}$, foi utilizada como padrão. Os resultados foram expressos em mg de proteína/g de tecido adiposo, de cérebro ou de fígado e mg de proteína/mL de plasma.

4.2.8.5.3 Cálculo da peroxidação lipídica

Para o cálculo da peroxidação lipídica no tecido adiposo, cérebro, fígado e plasma dos animais, a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico produzidas e o conteúdo de proteína das amostras dos tecidos foram determinados através da equação da reta ($y = ax + b$), com base na curva padrão de TMP (tetrametoxipropano) e de albumina. Em seguida, os valores de MDA e de proteína encontrados para as amostras foram correlacionados, segundo Mack *et al.* (1991), conforme exposto abaixo:

$X = \text{Absorbância do MDA das amostras/equação da reta padrão do TMP.}$

$Y = \text{Absorbância da proteína/ equação da reta do padrão de proteína (albumina).}$

$X/Y = \text{nMol de MDA/ mg de proteína.}$

4.2.8.6 Análise estatística

Neste estudo os resultados foram apresentados como médias $\pm$ desvio padrão. Para comparação das médias aritméticas foi empregado o teste “F” de Snedecor em análise de variância e, quando significativo o seu valor, foi aplicado o teste de Bonferroni para verificar as diferenças existentes. Adotou-se o nível de significância de 5% de probabilidade, ($P < 0,05$), segundo Rodrigues (2002).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da composição centesimal

A semente de girassol rajada apresentou na sua composição quantidade significativa de lipídeos. Os resultados obtidos na determinação da composição centesimal da semente de girassol estudada encontram-se na TABELA 1.

TABELA 1. Composição centesimal (base úmida) da semente de girassol rajada em g/100 g de amostra ($\pm$ desvio padrão).

AMOSTRA	UMIDADE^a	LIPÍDEOS^a	PROTEÍNAS^a (fator 5,30)	RMF^a	GLÍCÍDEOS POR DIFERENÇA
Semente de Girassol Rajada	4,10 $\pm$ 0,06	57,95 $\pm$ 0,32	19,76 $\pm$ 0,21	2,67 $\pm$ 0,01	15,52

^a Cada valor corresponde a média $\pm$ desvio padrão, n = 3.

Conforme se pode verificar na tabela 1, o teor lipídico de 57,95% $\pm$ 0,32 em base úmida (60,43% em base seca) está acima do valor encontrado na literatura para esta variedade de semente, que é de 50%. O teor de Resíduo Mineral Fixo (RMF) da amostra também foi elevado (2,67% $\pm$ 0,01). Todavia, a quantidade de proteína encontrada (19,76% $\pm$ 0,21) esta ligeiramente abaixo da apresentada na literatura

(21,4%) (HOLLIDAY & PHILLIPS, 2001). O desvio padrão para a fração glicídeos totais, incluindo a fração fibra, não foi apresentado porque este dado foi obtido por diferença das médias dos demais componentes de 100.

As variações observadas no conteúdo de nutrientes da amostra são, provavelmente, devidas a vários fatores tais como condições de cultivo, variações sazonais e cultivar dos grãos. No caso do girassol, as condições climáticas podem influenciar grandemente o conteúdo de lipídeos totais de sementes do mesmo cultivar (MORRISON, HAMILTON & KALU, 1995).

Considerando-se o elevado teor de lipídeos, proteínas e RMF da amostra, pode-se observar o potencial nutricional que a semente de girassol rajada representa na alimentação humana.

5.2 Caracterização da fração lipídica

Usando o método de Hartman & Lago (1973) para obtenção dos ésteres metílicos dos ácidos graxos que compõem a fração lipídica da semente de girassol rajada e cromatografia gasosa capilar, foi obtido o cromatograma apresentado no ANEXO 1.

Os teores dos diferentes ácidos graxos que compõem a fração lipídica da amostra encontram-se na TABELA 2.

TABELA 2. Perfil de ácidos graxos da fração lipídica da semente estudada.

Ácidos Graxos	Saturados (%)^a	Insaturados (%)^a
C 14:0	0,05 ± 0,00	—
C 16:0	5,11 ± 0,01	—
C 18:0	3,43 ± 0,01	—
C 20:0	0,23 ± 0,01	—
C 22:0	0,62 ± 0,01	—
C 24:0	0,17 ± 0,00	—
C 16:1	—	0,07 ± 0,01
C 18:1	—	34,80 ± 0,02
C 18:2	—	55,19 ± 0,05
C 18:3	—	0,05 ± 0,01
C 20:1	—	0,11 ± 0,00
C 22:1	—	0,08 ± 0,01
TOTAL	9,61	90,30

^a Cada valor corresponde a média ± desvio padrão, n = 3.

Na tabela 2 pode-se observar que, entre os ácidos graxos saturados da amostra, destacam-se o palmítico (5,11%±0,01) e o esteárico (3,43%±0,01). Quanto aos insaturados, a amostra apresentou elevado teor de ácido oléico (34,80%±0,02) e

do ácido graxo essencial linoléico ou ômega 6 ($55,19\% \pm 0,05$). Contudo, para o ácido graxo essencial α -linolênico ou ômega 3, a quantidade encontrada foi pequena ($0,05\% \pm 0,01$). Pode-se observar também que o total de ácidos graxos insaturados da amostra (90,30%) é 10 vezes maior do que o de saturados (9,61%). Estes dados estão de acordo com a literatura, pois além de serem ricos em ácidos graxos insaturados, os óleos vegetais como milho, soja, algodão e girassol são as melhores fontes alimentares de ômega 6 (CHOW, 1992).

O teor elevado de ácidos graxos insaturados da semente de girassol sugere a existência de mecanismos na mesma para proteção destes ácidos graxos contra processos oxidativos. Em outras palavras, a presença de compostos com atividade antioxidante tais como os compostos fenólicos.

5.3 Determinação dos fenólicos totais

Sabe-se que os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos nas plantas, desde a raiz até o tecido de aleurona ou protéico das sementes (SINEIRO, DOMINGUEZ & NÚÑEZ, 1989).

Desta forma, foi determinado o teor de fenólicos totais na amostra de semente de girassol rajada. O resultado obtido na determinação de fenólicos totais da amostra encontra-se na TABELA 3.

TABELA 3. Teor de fenólicos totais da semente de girassol rajada em g/100 g de amostra ($\pm$ desvio padrão).

AMOSTRA	Fenólicos Totais (g%) ^a
Semente de Girassol Rajada	1,34 $\pm$ 0,64

^a Valor corresponde a média $\pm$ desvio padrão, n = 3, em ácido clorogênico.

A tabela 3 mostra que o teor de compostos fenólicos da amostra é elevado (1,34g % $\pm$ 0,64). Este nível de compostos fenólicos totais, correspondente a 3,19% na amostra desengordurada, está de acordo com o relatado por Sineiro, Dominguez & Núñez (1989), que é de 3 a 4% (p/p) na farinha de semente de girassol desengordurada.

Como outras sementes, o girassol contém componentes indesejáveis ou substâncias antinutricionais, os quais afetam sua utilização como fonte de proteína dietética. A presença de compostos fenólicos pode afetar a qualidade da proteína do girassol de várias maneiras (reduzindo a digestibilidade; alterando as propriedades sensoriais, vida de prateleira e estabilidade; alterando as propriedades funcionais e comportamento da proteína em sistemas alimentares). Por outro lado, a atividade antioxidante de vários compostos fenólicos tem sido relatada e estes compostos são considerados protetores das membranas contra o dano oxidativo (PEDROSA *et al.*, 2000). Portanto, dentro deste aspecto, abre-se a perspectiva de uma avaliação

visando o balisamento da atividade antinutricional com a ação antioxidante dos compostos fenólicos. Este é um campo de estudo e discussão que deverá ser ampliado cada vez mais no processo de adequação dos compostos considerados nutracêuticos e dos alimentos denominados de funcionais.

Com o intuito de verificar a eventual existência de atividade antioxidante no cotilédone da semente de girassol estudada, foram feitas inicialmente extrações com solventes de diferentes polaridades.

5.4 Determinação do teor de matéria seca dos extratos

A solubilidade de uma substância está diretamente relacionada com a natureza do solvente. Portanto, para se separar substâncias apolares das polares, que apresentam atividade, torna-se necessário fazer a escolha correta dos solventes.

Os resultados da determinação do teor de matéria seca dos extratos obtidos na extração seqüencial com solventes de diferentes polaridades (éter etílico, álcool etílico e água) encontram-se na TABELA 4.

TABELA 4. Teor de matéria seca dos extratos obtidos por extração seqüencial com solventes de diferentes polaridades.

EXTRATO	RESÍDUO SECO MÉDIO (mg/ mL) ^a
Etéreo	22,0
Etanólico	3,3
Aquoso	3,5

^a Cada valor corresponde a média $\pm$ desvio padrão, o qual foi igual a zero para todos os extratos analisados (n=3).

Pode-se verificar na tabela 4 que o mais alto teor de resíduo seco encontra-se no extrato etéreo (22,0 mg/mL), enquanto que os extratos etanólico e aquoso apresentam 3,3 mg/mL e 3,5 mg/mL, respectivamente, indicando a maior presença de compostos de baixa polaridade naquele extrato, mais especificamente os lipídeos encontrados em quantidades elevadas na amostra estudada (57,95%).

Após a obtenção dos extratos da amostra por extração seqüencial, procurou-se avaliar a presença de capacidade antioxidante nos mesmos através do emprego de diferentes metodologias *in vitro*, conforme a seguir.

5.5 Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

Conforme descrito na seção 4.2.6, na avaliação da atividade antioxidante *in vitro* foram utilizados os extratos etanólico e aquoso do cotilédone da semente de girassol estudada. Devido ao elevado teor de lipídeos extraídos, que dificultou a leitura da densidade ótica deste extrato, a capacidade antioxidante do extrato etéreo não foi determinada.

5.5.1 Sistema β -caroteno e ácido linoléico

A capacidade dos extratos etanólico e aquoso do cotilédone da semente de girassol em inibir a oxidação do sistema β -caroteno e ácido linoléico, submetido a condição oxidante, encontra-se apresentada na TABELA 5.

Pode-se observar na tabela 5 que as percentagens de inibição da oxidação dos extratos etanólico (50 μ L= 3,78% $\pm$ 0,11, 100 μ L= 3,37% $\pm$ 0,62 e 200 μ L= 4,20% $\pm$ 0,76) e aquoso (50 μ L= 20,77% $\pm$ 1,04, 100 μ L= 25,69% $\pm$ 0,69 e 200 μ L= 35,11% $\pm$ 0,70) são significativamente menores que as obtidas com o padrão BHT empregado nos mesmos volumes (50 μ L= 63,24% $\pm$ 0,22, 100 μ L= 75,21% $\pm$ 1,34 e 200 μ L= 83,40% $\pm$ 1,42).

TABELA 5. Percentagem de inibição da oxidação dos extratos do cotilédone da semente de girassol rajada no sistema β -caroteno e ácido linoléico.

AMOSTRA	% DE INIBIÇÃO DA OXIDAÇÃO⁴		
	50 μL³	100 μL³	200 μL³
BHT (100 μg/mL)	63,24 $\pm$ 0,22 ^a	75,21 $\pm$ 1,34 ^a	83,40 $\pm$ 1,42 ^a
Eeta¹ (1.100μg/mL)	3,78 $\pm$ 0,11 ^b	3,37 $\pm$ 0,62 ^b	4,20 $\pm$ 0,76 ^b
EAq² (1.166 μg/mL)	20,77 $\pm$ 1,04 ^c	25,69 $\pm$ 0,69 ^c	35,11 $\pm$ 0,70 ^c
EEta + BHT (1:1)	44,75 $\pm$ 1,75 ^d	63,24 $\pm$ 1,04 ^d	76,26 $\pm$ 1,77 ^d
EAq + BHT (1:1)	58,02 $\pm$ 0,86 ^e	71,94 $\pm$ 0,55 ^e	81,15 $\pm$ 1,39 ^a

¹ EEta = Extrato Etanólico.

² EAq = Extrato Aquoso.

³ Cada valor corresponde a média $\pm$ desvio padrão, n = 3.

⁴ Capacidade antioxidante relativa dos extratos, adicionados de 0,2 mL, 0,1 mL ou 0,05 mL em 5mL de solução contendo β -caroteno/ácido linoléico, emulsificante e água, submetido a condições oxidantes. Os resultados das análises espectrofotométricas (470 nm) foram obtidas durante 120 minutos. A absorbância foi comparada ao controle, sem adição de antioxidantes, conforme descrito na seção 4.2.6.1.

^{a, b, c, d, e} Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% (P < 0,05), comparando as amostras e o padrão BHT.

Contudo, entre os extratos, o aquoso foi o que apresentou a melhor capacidade antioxidante, demonstrando que a extração seqüencial com solventes de diferentes polaridades forneceu um extrato mais purificado, com maior conteúdo de compostos antioxidantes e melhor atividade.

Pode-se observar ainda na tabela 5 que, com exceção do extrato etanólico, nos três volumes estudados a atividade antioxidante das amostras aumenta com o aumento do volume.

Suja, Jayalekshmy & Arumughan (2005), comparando a capacidade antioxidante do extrato metanólico da torta de gergelim com a do extrato purificado por extração seqüencial com solventes de diferentes polaridades, verificaram uma maior efetividade do extrato bruto a 100 e 200 ppm, comparável com a do BHT a 200 ppm, enquanto o extrato purificado mostrou capacidade comparável ou maior do que a do BHT nas concentrações de 5, 10, 50, 100 e 200 ppm.

Outros autores, estudando a capacidade antioxidante de extratos de sementes ricas em lipídeos, também encontraram significativa capacidade antioxidante para os mesmos. Jayaprakasha, Singh & Sakarian (2001), avaliando a capacidade antioxidante de extratos de semente de uva, observaram que a 100 ppm a capacidade antioxidante dos extratos ficaram entre 65 e 90%. Quando o solvente usado foi a mistura de etil acetato e água, a capacidade antioxidante do extrato foi mais elevada do que a do BHA na mesma concentração. Wettasinghe & Shahidi (1999), determinando a capacidade antioxidante dos extratos etanólicos da semente de borage (*Borago officinalis* L.), verificaram que o sistema contendo o extrato ao nível de 200 ppm reteve 81% do β -caroteno inicial após duas horas de ensaio enquanto o controle reteve somente 11%.

Adicionalmente, em nosso estudo, quando empregados com o BHT na proporção de 1:1, os extratos etanólico (50 μL = 44,75% $\pm$ 1,75, 100 μL = 63,24% $\pm$ 1,04 e 200 μL = 76,26% $\pm$ 1,77) e aquoso (50 μL = 58,02% $\pm$ 0,86, 100 μL = 71,94% $\pm$ 0,55 e 200 μL = 81,15% $\pm$ 1,39) do cotilédono da semente de girassol rajada apresentaram valores de capacidade antioxidante significativamente maiores que os obtidos para os mesmos extratos individualmente, indicando a existência de ação sinérgica entre cada extrato e o BHT.

Nas FIGURAS 15 e 16 apresentam-se, respectivamente, as curvas da cinética do potencial antioxidante do extrato etanólico e aquoso do cotilédono da semente de girassol rajada no sistema β -caroteno e ácido linoléico.

Na figura 15 pode-se observar uma queda pronunciada no extrato etanólico nos volumes de 50 μL (55 $\mu\text{g/mL}$), 100 μL (110 $\mu\text{g/mL}$) e 200 μL (220 $\mu\text{g/mL}$), correspondendo a 3,78% , 3,37% e 4,20% de inibição da oxidação, respectivamente. A capacidade antioxidante melhora consideravelmente (50 μL =44,75%, 100 μL =63,24% e 200 μL =76,26%) quando este extrato é misturado com o BHT na proporção de 1:1.

FIGURA 15. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etanólico do cotilédone da semente de girassol (G) no sistema β -caroteno e ácido linoléico

FIGURA 16. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol (G) no sistema β -caroteno e ácido linoléico

Na figura 16 pode-se observar uma elevada capacidade antioxidante apresentada pelo extrato aquoso, em relação ao etanólico, nos volumes de 50 μL (58,3 $\mu\text{g/mL}$), 100 μL (116,6 $\mu\text{g/mL}$) e 200 μL (233,2 $\mu\text{g/mL}$), podendo-se verificar um nível de proteção à oxidação de 20,77%, 25,69% e 35,11%, respectivamente.

A elevada capacidade antioxidante do extrato aquoso de semente de girassol rajada sugere que o consumo desta semente pode impedir processos oxidativos *in vivo*, participando do processo de inibição de radicais livres responsáveis pelo desenvolvimento de várias patologias, destacando-se viroses, câncer e aterosclerose, entre outras.

Igualmente, pode-se observar a excelente capacidade antioxidante do extrato aquoso quando misturado com o BHT na proporção de 1:1 (50 μL =58,02%, 100 μL =71,94% e 200 μL =81,15%). Esta ação sinérgica é importante porque supõe uma redução do emprego de antioxidantes sintéticos, devido ao seu potencial de carcinogênese e outros efeitos indesejáveis no organismo (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004), a favor da adição de antioxidantes naturais, potencialmente seguros, para proteção dos alimentos contra a oxidação.

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

A partir dos resultados das curvas cinéticas dos extratos estudados e do padrão BHT, foi elaborada a TABELA 6, onde encontram-se os fatores obtidos das tangentes das mesmas, conforme descrito em 4.2.6.1.1.

TABELA 6. Parâmetros cinéticos do potencial antioxidante no sistema β -caroteno e ácido linoléico do extrato etanólico e aquoso do cotilédono da semente de girassol.

AMOSTRA	VOLUME					
	50 μ L		100 μ L		200 μ L	
	F1	F2	F1	F2	F1	F2
BHT	0,3	0,9	0,2	0,9	0,2	0,5
EEta	0,8	0,4	0,8	1,0	0,8	1,1
EAq	0,6	1,2	0,6	1,1	0,2	0,5
EEta + BHT (1:1)	0,4	1,4	0,3	1,2	0,2	0,6
EAq + BHT (1:1)	0,3	0,9	0,3	0,7	0,2	0,4

EEta = Extrato Etanólico.

EAq = Extrato Aquoso.

F1, F2 = Fatores cinéticos.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 6, os fatores F1 e F2 obtidos, para os extratos estudados, podem ser avaliados através da comparação dos mesmos com os valores de F1 e F2 obtidos para o padrão BHT nos mesmos volumes.

Para o valor de F1, entre os extratos, o extrato aquoso foi o que apresentou a melhor capacidade tanto no volume de 50 μL ($58,3 \mu\text{g/mL} = 0,6$) quanto nos de 100 μL ($116,6 \mu\text{g/mL} = 0,6$). No volume de 200 μL , a capacidade antioxidante do extrato aquoso ($233,2 \mu\text{g/mL} = 0,2$) para o valor de F1 foi comparável ao do padrão BHT 100 $\mu\text{g/mL}$ (0,2) empregado no mesmo volume. Entretanto, quando cada extrato é misturado ao BHT na proporção de 1:1, a capacidade de ambos os extratos melhora.

Para os valores de F2, no volume de 50 μL e de 100 μL , o extrato que apresentou a melhor capacidade foi o etanólico ($55 \mu\text{g/mL} = 0,4$ e $110 \mu\text{g/mL} = 1,0$, respectivamente). No volume de 200 μL , a melhor resposta foi a do extrato aquoso ($233,2 \mu\text{g/mL} = 0,5$). A mistura com o padrão BHT na proporção de 1:1 melhora a capacidade do etanólico a 200 μL (0,6) e do extrato aquoso nos três volumes estudados para o valor de F2. Por outro lado, o extrato aquoso e o etanólico + BHT (1:1) nos volumes de 50 μL (1,2 e 1,4, respectivamente) e 100 μL (1,1 e 1,2, respectivamente), apresentaram o valor da razão entre a tangente do extrato e a tangente do controle sem antioxidantes maior que 1, indicando que deve existir uma atividade pró-oxidante nestas amostras quando empregadas nos volumes mencionados. Estes resultados podem ser explicados pelos estudos que mostram que, diferentemente dos antioxidantes sintéticos BHA e BHT, os compostos fenólicos

de ocorrência natural podem apresentar atividade pró-oxidante a baixas concentrações quando avaliados por alguns métodos, entre eles o sistema β -caroteno e ácido linoléico (ANTOLOVICH *et al.*, 2002). Ao contrário, o extrato etanólico, que entre os extratos demonstrou a melhor capacidade antioxidante a 50 μ L e 100 μ L para os valores de F2, no volume mais elevado (200 μ L) apresentou atividade pró-oxidante (1,1).

Assim, os resultados obtidos para os valores de F1 demonstram que os antioxidantes do extrato aquoso da semente de girassol estudada podem ser efetivos em bloquear as reações em cadeia através da interação com os radicais peroxil. Da mesma forma, os resultados obtidos para os valores de F2 mostram que, em concentrações mais elevadas, os antioxidantes do extrato aquoso poderiam também interferir nas reações que formam os produtos secundários, produzidos na etapa de propagação do processo oxidativo, que podem formar espécies radicalares que aceleram o processo oxidativo do sistema (YANISHLIEVA & MARINOVA, 1995).

5.5.2 Ensaio do Poder Antioxidante para Redução Férrica (FRAP)

Em seguida, a capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos etanólico e aquoso do cotilédone da semente de girassol estudada e do BHT foi avaliada em 6 minutos no ensaio FRAP. Os resultados obtidos por meio desta determinação encontram-se na TABELA 7.

TABELA 7. Capacidade antioxidante dos extratos etanólico e aquoso do cotilédone da semente de girassol no ensaio FRAP.

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO	Valor FRAP (μM) ^{3,4}
BHT	5 $\mu\text{g/mL}$	19,62 $\pm$ 0,86 ^a
	15 $\mu\text{g/mL}$	58,82 $\pm$ 1,38 ^b
	25 $\mu\text{g/mL}$	100,84 $\pm$ 1,77 ^c
EEta ¹	100 $\mu\text{g/mL}$	32,17 $\pm$ 1,12 ^d
	200 $\mu\text{g/mL}$	66,76 $\pm$ 0,50 ^e
	300 $\mu\text{g/mL}$	112,03 $\pm$ 0,47 ^f
EAq ²	30 $\mu\text{g/mL}$	45,27 $\pm$ 0,54 ^g
	60 $\mu\text{g/mL}$	96,03 $\pm$ 1,54 ^h
	90 $\mu\text{g/mL}$	143,76 $\pm$ 2,09 ⁱ

¹ EEta = Extrato Etanólico.

² EAq = Extrato Aquoso.

³ Cada valor corresponde a média $\pm$ desvio padrão, n = 3.

⁴ Capacidade antioxidante de 0,75 mL dos extratos e do BHT, adicionados em 1,5 mL de reagente FRAP. As análises espectrofotométricas (593 nm) foram obtidas durante 8 minutos. A absorbância foi comparada ao controle, sem adição de antioxidantes, conforme descrito na seção 4.2.6.2.

a, b, c, d, e, f, g, h, i Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% ($P < 0,05$), comparando as amostras e o padrão BHT.

A tabela 7 mostra que os valores FRAP dos extratos etanólico (32,17 $\pm$ 1,12 μM , 66,76 $\pm$ 0,50 μM e 112,03 $\pm$ 0,47 μM) e aquoso (45,27 $\pm$ 0,54 μM , 96,03 $\pm$ 1,54 μM e 143,76 $\pm$ 2,09 μM), nas diferentes concentrações estudadas, são significativamente maiores que os obtidos com o BHT (19,62 $\pm$ 0,86 μM , 58,82 $\pm$ 1,38 μM e 100,84 $\pm$ 1,77

μM). Contudo, entre os extratos, o aquoso foi o que apresentou a melhor capacidade antioxidante.

Os resultados obtidos no ensaio FRAP mostram que o extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol rajada possui em sua composição quantidades consideráveis de substâncias capazes de reduzir o Fe^{+3} para Fe^{+2} , ou seja, antioxidantes doadores de elétron. Halvorsen *et al.* (2002), empregando o método FRAP para determinação dos antioxidantes totais das amostras, encontraram um teor mais elevado destes compostos na semente de girassol (5,41 nMol/100g) em relação a outros frutos e sementes oleaginosas analisadas, como a amêndoa (0,44 nMol/100g), a avelã (0,48 nMol/100g) e o gergelim (1,09 nMol/100g).

Nas FIGURAS 17 e 18 apresentam-se, respectivamente, as curvas da cinética do potencial antioxidante do extrato etanólico e aquoso do cotilédone da semente de girassol frente ao BHT no ensaio FRAP.

Na figura 17 pode-se observar um aumento pronunciado no extrato etanólico nas concentrações de 300 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a um valor FRAP de 112,03 μM . A capacidade antioxidante deste extrato cai consideravelmente nas concentrações de 200 $\mu\text{g/mL}$ (66,76 μM) e 100 $\mu\text{g/mL}$ (32,17 μM), sendo mais baixa do que a do BHT a 25 $\mu\text{g/mL}$ (100,84 μM) e a 15 $\mu\text{g/mL}$ (58,82 μM), respectivamente. Neste ensaio, a atividade antioxidante mais baixa foi a do BHT a 5 $\mu\text{g/mL}$ (19,62 μM).

FIGURA 17. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etanólico do cotilédone da semente de girassol (G) no ensaio FRAP

FIGURA 18. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol (G) no ensaio FRAP

Na figura 18 pode-se observar uma elevada capacidade antioxidante apresentada pelo extrato aquoso a 90 $\mu\text{g/mL}$ (143,76 μM) e 60 $\mu\text{g/mL}$ (96,03 μM), em relação ao BHT a 25 $\mu\text{g/mL}$ (100,84 μM). Contudo, a capacidade antioxidante do extrato aquoso cai consideravelmente a 30 $\mu\text{g/mL}$ (45,27 μM), passando a ser mais baixa do que a do BHT a 15 $\mu\text{g/mL}$ (58,82 μM), após 4 minutos de reação. Após este tempo, a capacidade antioxidante do extrato aquoso a 30 $\mu\text{g/mL}$ é superior apenas a do BHT a 5 $\mu\text{g/mL}$ (19,62 μM).

Nas figuras 17 e 18 pode-se observar também as diferentes leituras de absorbância entre as amostras no tempo zero de reação. Estas diferenças podem ser explicadas pelo fato da taxa de redução do Fe^{+3} não ser a mesma para os diferentes antioxidantes, sendo mais rápida em algumas amostras em relação a outras (OU *et al.*, 2002), o que provavelmente gerou as referidas diferenças na leitura inicial das amostras estudadas e dificultou a interpretação dos dados cinéticos das mesmas.

Contudo, os resultados do ensaio FRAP confirmaram a elevada capacidade antioxidante do extrato aquoso, em relação ao extrato etanólico, encontrada no sistema β -caroteno e ácido linoléico.

5.5.3 Ensaio do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

A capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos etanólico e aquoso da amostra de semente de girassol e do BHT foi também avaliada em 20 minutos no ensaio DPPH. Os resultados obtidos encontram-se na TABELA 8.

TABELA 8. Capacidade antioxidante dos extratos etanólico e aquoso do cotilédone da semente de girassol no ensaio DPPH.

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO	% DESCOLORAÇÃO ^{3, 4} DO DPPH
BHT	5 µg/mL	58,93 ±0,79 ^a
	15 µg/mL	80,73 ±0,43 ^b
	50 µg/mL	91,78 ±0,99 ^c
EEta ¹	3 µg/mL	4,94 ±0,68 ^d
	30 µg/mL	15,21 ±1,02 ^e
	300 µg/mL	93,15 ±0,17 ^f
EAq ²	3 µg/mL	17,03 ±0,61 ^g
	15 µg/mL	50,18 ±0,61 ^h
	300 µg/ml	92,25 ±0,46 ^c

¹ EEta = Extrato Etanólico.² EAq = Extrato Aquoso.³ Cada valor corresponde a média ± desvio padrão, n = 3.⁴ Capacidade antioxidante de 0,75 mL dos extratos e do BHT, adicionados em 1,5 mL de solução metanólica de DPPH 0,0020 g/L. As análises espectrofotométricas (517 nm) foram obtidas durante 20 minutos. A absorbância foi comparada ao controle, sem adição de antioxidantes, conforme descrito na seção 4.2.6.3.

a, b, c, d, e, f, g, h Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% (P < 0,05), comparando as amostras e o padrão BHT.

Na tabela 8 pode-se verificar que a percentagem de descoloração do DPPH do extrato etanólico nas concentrações de 3 $\mu\text{g/mL}$ ($4,94\%\pm 0,68$) e 30 $\mu\text{g/mL}$ ($15,21\%\pm 1,02$) são significativamente menores que a obtida com o BHT a 5 $\mu\text{g/mL}$ ($58,93\%\pm 0,79$) e 15 $\mu\text{g/mL}$ ($80,73\%\pm 0,43$). Da mesma forma, a capacidade antioxidante do extrato aquoso a 3 $\mu\text{g/mL}$ ($17,03\%\pm 0,61$) e a 15 $\mu\text{g/mL}$ ($50,18\%\pm 0,61$) são significativamente menores que a obtida com o BHT a 5 $\mu\text{g/mL}$ e 15 $\mu\text{g/mL}$. Contudo, na concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$, a capacidade antioxidante do extrato etanólico ($93,15\%\pm 0,17$) foi significativamente mais elevada do que a do BHT a 50 $\mu\text{g/mL}$ ($91,78\%\pm 0,99$). Contudo, entre os extratos, o aquoso foi o que apresentou a melhor capacidade antioxidante nas concentrações de 3 $\mu\text{g/mL}$ e 15 $\mu\text{g/mL}$. Na concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$, a capacidade antioxidante do extrato aquoso ($92,25\%\pm 0,46$) foi comparável a do BHT a 50 $\mu\text{g/mL}$ ($91,78\%\pm 0,99$).

Empregando o método DPPH, Amarowicz, Naczki & Shahidi (2000^a) encontraram para o extrato bruto da casca da semente de canola uma capacidade antioxidante significativamente superior a da casca da colza. Na concentração de 1 mg, os extratos apresentaram um efeito seqüestrante entre 35,2 e 50,5%.

Nas FIGURAS 19 e 20 apresentam-se, respectivamente, as curvas da cinética do potencial antioxidante do extrato etanólico e aquoso do cotilédone da semente de girassol frente ao BHT no ensaio DPPH.

FIGURA 19. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etanólico do cotilédone da semente de girassol (G) no ensaio DPPH

FIGURA 20. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol (G) no ensaio DPPH

Na figura 19 pode-se observar uma queda pronunciada no extrato etanólico a 300 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a uma percentagem de descoloração do DPPH de 93,15%. A capacidade antioxidante deste extrato cai consideravelmente nas concentrações de 30 $\mu\text{g/mL}$ e 3 $\mu\text{g/mL}$ para 15,21% e 4,94%, respectivamente, abaixo da do BHT a 5 $\mu\text{g/mL}$ (58,93%).

Na figura 20 pode-se observar uma elevada capacidade antioxidante apresentada pelo extrato aquoso a 300 $\mu\text{g/mL}$ (92,25%), próxima a do BHT a 50 $\mu\text{g/mL}$ (91,78%). Na concentração de 15 $\mu\text{g/mL}$, a capacidade antioxidante deste extrato cai para 50,18%. A capacidade antioxidante do extrato aquoso declina consideravelmente a 3 $\mu\text{g/mL}$ (17,03%), passando a ser mais baixa do que a do BHT a 5 $\mu\text{g/mL}$ (58,93%). Contudo, entre os extratos, a capacidade antioxidante do extrato aquoso foi superior a do extrato etanólico nas concentrações de 3 $\mu\text{g/mL}$ e 15 $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados do ensaio DPPH mostraram que o tempo de reação, padronizado em 20 minutos, foi capaz de fornecer uma boa curva cinética. Estes resultados também confirmaram, mais uma vez, a capacidade antioxidante superior do extrato aquoso em relação ao extrato etanólico encontrada no sistema β -caroteno ácido linoléico.

5.5.4 Ensaio da Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC)

Em seguida, a capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos etanólico e aquoso do cotilédono da semente de girassol rajada e do BHT foi avaliada no ensaio ORAC. Os resultados obtidos através desta determinação encontram-se na TABELA 9.

Conforme pode-se verificar na tabela 9, o valor ORAC do extrato etanólico ($0,50 \pm 0,48$) na concentração estudada ($30 \mu\text{g/mL}$) foi significativamente menor do que a do BHT ($2,28 \pm 0,86$). Por outro lado, a capacidade antioxidante do extrato aquoso ($1,50 \pm 0,77$) a $30 \mu\text{g/mL}$ foi comparável a do BHT a $25 \mu\text{g/mL}$.

TABELA 9. Capacidade antioxidante dos extratos etanólico e aquoso do cotilédone da semente de girassol no ensaio ORAC.

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO	VALOR ORAC RELATIVO (eq. TROLOX) ^{3,4}
BHT	$25 \mu\text{g/mL}$	$2,28 \pm 0,86^a$
Eeta ¹	$30 \mu\text{g/mL}$	$0,50 \pm 0,48^b$
Eaq ²	$30 \mu\text{g/mL}$	$1,50 \pm 0,77^{a,b}$

¹ Eeta = Extrato Etanólico.

² EAq = Extrato Aquoso.³

³ Cada valor corresponde a média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$.

⁴ Capacidade antioxidante de $100 \mu\text{L}$ dos extratos e do BHT, adicionados em $1,75 \mu\text{L}$ de tampão fosfato pH 7,4, $100 \mu\text{L}$ de solução de β -PE 68 mg/L e $50 \mu\text{L}$ de AAPH 160 mM. As análises fluorimétricas (Ex 540 nm; Em 565 nm) foram obtidas até que a última leitura tivesse declinado para menos de 5% em relação a primeira. As leituras foram comparadas ao controle, sem adição de antioxidantes, conforme descrito na seção 4.2.6.4.

^{a,b} Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% ($P < 0,05$), comparando as amostras e o BHT.

Nas FIGURAS 21 e 22 apresentam-se, respectivamente, as curvas da cinética do potencial antioxidante do extrato etanólico e do aquoso do cotilédone da semente de girassol rajada frente ao BHT no ensaio ORAC.

FIGURA 21. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etanólico do cotilédone da semente de girassol (G) no ensaio ORAC

FIGURA 22. Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol (G) no ensaio ORAC

A figura 21 mostra que houve uma queda pronunciada no extrato etanólico em relação ao BHT (2,28), correspondendo a um valor ORAC de 0,50.

Por outro lado, na figura 22 pode-se verificar a elevada capacidade antioxidante apresentada pelo extrato aquoso (1,50) em relação ao extrato etanólico. Contudo, comparada ao BHT, a capacidade antioxidante do extrato aquoso cai abaixo deste nos primeiros 65 minutos. Entre 65 e 100 minutos, a capacidade antioxidante do extrato aquoso permanece constante, passando a ser maior do que a do BHT entre 85 e 100 minutos. Após esse tempo, a capacidade antioxidante do extrato aquoso volta a cair, passando novamente a ficar abaixo do BHT aos 130 minutos.

No ensaio ORAC, em concordância com os resultados obtidos nos demais métodos empregados, o extrato aquoso foi o de maior capacidade antioxidante entre os extratos.

Tem-se considerado que os valores obtidos pelos quatro ensaios empregados refletem a atividade antioxidante total. Assim, apesar dos diferentes mecanismos de reação, esses valores deveriam ser comparáveis e a escala de atividade baseada nos mesmos deveria ter uma tendência similar.

AS FIGURAS 23, 24, 25 e 26 mostram a capacidade antioxidante dos extratos etanólico e aquoso do cotilédone da semente de girassol rajada, comparada com diferentes concentrações de BHT, no sistema β -caroteno e ácido linoléico, no ensaio FRAP, no ensaio DPPH e no ensaio ORAC, respectivamente.

FIGURA 23. Atividade antioxidante das frações etanólicas e aquosa do cotilédone da semente de girassol, associadas com diferentes concentrações de BHT no sistema β -caroteno e ácido linoléico

FIGURA 24. Atividade antioxidante das frações etanólicas e aquosa do cotilédone da semente de girassol, associadas com diferentes concentrações de BHT no ensaio FRAP

FIGURA 25. Atividade antioxidante das frações etanólicas e aquosa do cotilédone da semente de girassol, associadas com diferentes concentrações de BHT no ensaio DPPH

FIGURA 26. Atividade antioxidante das frações etanólicas e aquosa do cotilédone da semente de girassol, associadas com o BHT no ensaio ORAC

Pode-se verificar nas figuras 23, 24, 25 e 26 que, em todos os ensaios, o extrato aquoso foi o que apresentou a melhor capacidade antioxidante entre os extratos. Contudo, a atividade antioxidante do BHT variou segundo o sistema investigado, sendo mais baixa no ensaio FRAP em relação aos extratos. A variação nos resultados entre diferentes métodos para determinação da atividade antioxidante *in vitro* tem sido intensamente discutidas com base nos princípios químicos sob os quais se baseiam. Algumas das limitações que vem sendo apontadas para o ensaio FRAP são as de que a escolha do Fe^{+3} a ser reduzido pelo antioxidante parece ser arbitrária e a taxa de reação precisa ser suficientemente rápida para que a reação possa ser completada em um tempo de ensaio muito curto (4 minutos no ensaio original). Porém, nem todos os antioxidantes reduzem o Fe^{+3} a uma taxa rápida, o que provavelmente em nosso estudo gerou problemas quanto a diluição apropriada para o BHT. Finalmente, a reação de redução ocorre em pH baixo de 3,6, o que pode inibir de maneira significativa a transferência de um elétron do antioxidante para o íon férrico (OU *et al.*, 2002).

Contudo, o ensaio FRAP baseia-se em um potencial de redução ligeiramente acima de -200 mV, valor médio útil para determinação de antioxidantes totais relevantes no contexto celular tomando-se por base a glutathiona (GSH) que é o mais importante antioxidante intracelular conhecido. Desta forma, o ensaio FRAP, assim como por exemplo o ORAC que está ligeiramente abaixo de -200 mV, possui provavelmente um potencial de redução apropriado para captar os antioxidantes mais importantes da amostra (BLOMHOFF, 2005).

5.5.5 Método Rancimat

Após os bons resultados apresentados pelo extrato aquoso nos demais ensaios empregados para determinação da atividade antioxidante, na busca de uma melhor aplicação deste extrato no que se refere à indústria de alimentos, foi testada a capacidade do mesmo em sistema lipídico. O sistema lipídico Rancimat é o que se aproxima mais das necessidades da avaliação industrial na estabilidade de óleos e gorduras (MOREIRA & MANCINI-FILHO, 2003).

Na TABELA 10, bem como na FIGURA 27, encontram-se os resultados da percentagem de aumento do período de indução (%PI) do extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol rajada e do BHT, adicionados de óleo de soja refinado, frente ao BHA como padrão no método Rancimat a 110° C.

Conforme pode-se observar na tabela 10 e na figura 27, o aumento do período de indução do extrato aquoso a 300 µg/mL (15,2) foi comparável ao do padrão BHA a 100 µg/mL (16,0±0,86) e significativamente menor ao do BHT a 100 µg/mL (16,3±0,75). Contudo, o aumento do período de indução do BHT a 100 µg/mL foi comparável ao do padrão BHA na mesma concentração.

TABELA 10. Percentagem de aumento do período de indução do extrato aquoso do cotilédono da semente de girassol rajada no método Rancimat a 110° C.

AMOSTRA	% PI ²	PERÍODO DE INDUÇÃO (h)
Branco	0,0	5,78
BHA 100 µg/mL	16,0±0,86 ^{a,b}	6,71
BHT 100 µg/mL	16,3±0,75 ^b	6,80
EAq ¹ 300 µg/mL	15,2±0,00 ^a	6,66

¹ EAq = Extrato Aquoso.

² Percentagem de aumento do período de indução do EAq e do BHA, adicionados de 3g de óleo de soja sem antioxidante, e acoplados ao aparelho Rancimat, com a propagação de temperatura de 110° C, $\Delta T=1,5^\circ \text{C}$ e fluxo de ar de 20 L/h, até que a curva de condutividade vezes tempo de reação fosse completada para se calcular o PI. As leituras foram comparadas ao controle, óleo de soja sem antioxidantes, conforme descrito na seção 4.2.6.5.

^{a,b} Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% ($P < 0,05$), comparando as amostras ao BHT.

FIGURA 27. Percentagem de aumento do período de indução do extrato aquoso do cotilédono da semente de girassol rajada e do BHT, associadas com o BHA no método Rancimat a 110°C

Na estabilidade oxidativa de óleos e gorduras, o efeito de extratos de ervas e especiarias tem sido bem documentado. Comparando as propriedades antioxidantes das especiarias aneto, cominho, orégano, páprica, alecrim e açafrão, a uma concentração de 5%, com as dos aditivos sintéticos BHA, BHT e propil galato, a 100 µg/g, Martinez-Tome *et al.* (2001) observaram que o efeito dos extratos das especiarias mediterrâneas estudadas na estabilidade oxidativa do óleo de oliva refinado, testada no método Rancimat, foi comparável ao dos aditivos comumente empregados em alimentos durante a estocagem (72 h, 2, 4 e 6 meses) a temperatura ambiente. Moreira & Mancini-Filho (2003), empregando o método Rancimat a 100° C, com fluxo de gás de 20 L/h, e utilizando 5 g de óleo de soja sem aditivos adicionados de 100 e 200 ppm de extratos das especiarias canela, erva-doce e mostarda, obtidos de forma seqüencial, encontraram que o extrato aquoso da semente de mostarda a 100 ppm apresentou um dos maiores tempos de indução com 7h16 (19,63% de aumento no tempo do controle). Lalas & Dourtoglou (2003), estudando o efeito do extrato de alecrim na estabilidade do óleo de soja usado na fritura de batata chips através das mudanças no período de indução das amostras de óleo no método Rancimat, demonstraram que no óleo sem extrato o período de indução diminuía com o progresso da fritura. O óleo contendo o extrato de alecrim mostrou maior capacidade antioxidante e reduzido escurecimento e rancidez. Murcia *et al.* (2004), avaliando as propriedades antioxidantes de sete especiarias e comparando-as com a do BHA, BHT e propil galato, empregando o método Rancimat a 100° C, encontraram que a noz-moscada, o gengibre e o alcaçuz melhoraram a estabilidade dos óleos de

girassol, milho e oliva, bem como da manteiga e da margarina, contra a oxidação. Recentemente, um estudo desenvolvido por Liu, Chang & Wiesenborn (2005) empregando o método Rancimat na avaliação da capacidade antioxidante do extrato da soja contendo 20 a 500 ppm de isoflavonas, demonstrou que o extrato da soja teve elevada capacidade antioxidante, existindo uma resposta dose-dependente para a capacidade antioxidante nas concentrações mais baixas.

5.6 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos

Ainda por ser o extrato que apresentou a maior capacidade antioxidante *in vitro*, para identificação e quantificação dos compostos fenólicos da semente de girassol estudada foi empregado o extrato aquoso da mesma. Os resultados, que foram obtidos por cromatografia em fase gasosa, encontram-se na TABELA 11.

A tabela 11 mostra que o ácido clorogênico apresentou-se em quantidade elevada no extrato aquoso da amostra (12,88%) em relação aos demais compostos fenólicos encontrados. Foram identificados também os ácidos caféico (1,24%) e quínico (1,36%). O ácido *p*-hidroxibenzóico apresentou-se em quantidades traços (0,28%).

TABELA 11. Compostos fenólicos presentes no extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol rajada.

ÁCIDO FENÓLICO	QUANTIDADE NA AMOSTRA (%) ^a
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	0,28
Ácido quínico	1,36
Ácido caféico	1,24
Ácido clorogênico	12,88

^a Cada valor corresponde a média $\pm$ desvio padrão, o qual foi igual a zero para todos os extratos analisados (n=3).

Comparando os resultados obtidos com os encontrados na literatura tem-se que, apesar de alguns autores terem identificado somente o ácido clorogênico e o caféico na semente de girassol, outros compostos fenólicos têm sido detectados. Pedrosa *et al.* (2000), estudando os compostos fenólicos da casca e cotilédones de diferentes genótipos de semente de girassol por CLAE e CL-EM, detectaram dois outros compostos, inicialmente chamados de derivados 1 e 2. Os referidos autores relataram, ainda, que quase todos os compostos fenólicos das sementes de girassol estudadas encontravam-se no cotilédone, destacadamente o ácido clorogênico. Contudo, foram encontrados também quantidades traços dos ácidos *p*-hidroxibenzóico, *p*-cumárico, ferúlico, protocatequínico e siríngico nas amostras.

O café é uma bebida que contém quantidades relativamente elevadas de ácido clorogênico, substância que tem mostrado possuir efeitos biológicos tais como antioxidante, antimutagênico e anticarcinogênico, entre outros. Yukawa *et al.* (2004), estudando os mecanismos pelos quais o café afeta a susceptibilidade à oxidação das LDLs e os níveis de lipídeos séricos em humanos, concluíram que a ingesta regular

desta bebida pode afetar favoravelmente o risco de doenças cardiovasculares pela redução da oxidação das LDLs e diminuição dos níveis de LDL-colesterol e MDA séricos.

Por outro lado, em nosso estudo, no cromatograma do extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol rajada (ANEXO 2) pode-se observar picos que não foram identificados pelos tempos de retenção dos padrões empregados, mas que apresentaram áreas bastante pronunciadas. Isto pode ser devido ao fato do extrato aquoso da amostra não ter sofrido purificação e, em consequência, apresentar contaminantes com tempo de retenção próximo ao de alguns compostos fenólicos (MOREIRA & MANCINI-FILHO, 1998).

5.7 Determinação da atividade antioxidante *in vivo*

Na literatura podem ser encontrados vários estudos *in vitro* sobre a atividade antioxidante dos compostos fenólicos. Contudo, os benefícios à saúde advindos da ingestão dietética destes compostos ainda não estão bem documentados.

Desta forma, a avaliação *in vivo* dos efeitos do extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol estudada seria relevante.

5.7.1 Efeitos *in vivo* do extrato aquoso

Na TABELA 12 pode-se ver a média do peso dos animais dos grupos controle e experimentais G1 e G2, que receberam o extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol rajada durante os 29 dias de experimento.

TABELA 12. Peso (g) dos animais dos grupos controle e experimentais G1 e G2, durante 29 dias.

GRUPO DIAS	CONTROLE*	GRUPO G 1*	GRUPO G 2*
0	86,06 ± 6,84	87,60 ± 4,82	80,83 ± 7,54
7	118,00 ± 8,08	115,93 ± 12,44	109,94 ± 10,17
14	152,43 ± 14,40	155,14 ± 12,26	154,26 ± 10,62
21	202,66 ± 18,33	205,20 ± 16,13	185,57 ± 16,59
29	241,93 ± 20,53	244,28 ± 21,57	235,87 ± 19,46
Ganho de peso	155,87^a	156,68^a	154,84^a

* Valores expressos em média ± desvio padrão, n = 8.

^a Não diferem estatisticamente entre si a nível de 5% (P<0,05).

Conforme pode-se constatar na tabela 12, não houve diferença estatisticamente significativa entre o ganho de peso dos animais do grupo controle e dos grupos experimentais G1 e G2, demonstrando assim que o extrato aquoso administrado aos animais dos grupos experimentais não exerceu nenhum efeito antinutricional que comprometesse o crescimento dos mesmos.

5.7.1.1 Avaliação do perfil lipídico e de TBARS no tecido adiposo

O tecido adiposo é um tecido conectivo especializado que funciona como o maior depósito de gordura do organismo na forma de triglicerídeos. Este tecido é encontrado nos mamíferos sob duas diferentes formas: o branco e o marrom. A presença, quantidade e distribuição de cada uma depende da espécie animal. O tecido adiposo mais amplamente distribuído é o branco e possui três funções:

isolamento térmico, proteção contra choques mecânicos e, principalmente, fonte de energia. O tecido adiposo subcutâneo é um isolante térmico especialmente importante no organismo, pois conduz somente 1/3 do calor em relação aos outros tecidos. O tecido adiposo que circunda os órgãos internos tem a função de fixar e fornecer proteção aos mesmos (JOHNSON & GREENWOOD, 1988).

A composição em ácidos graxos do tecido adiposo depende de vários fatores tais como espécie animal, alimentação e localização. Estudos mostraram que o tecido adiposo abdominal humano é mais rico em ácidos graxos saturados do que o da região glútea (MALCOM *et al.*, 1989).

Os resultados encontrados na determinação do perfil de ácidos graxos do tecido adiposo dos animais do grupo controle e experimentais G1 e G2, que receberam o extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol rajada durante 29 dias, encontram-se na TABELA 13.

Na tabela 13 pode-se observar que, dentre os ácidos graxos insaturados, o ácido graxo C 20:3 n-6 apresentou um aumento estatisticamente significativo para os animais do grupo G1, o que sugere um possível efeito protetor do extrato aquoso sobre este ácido graxo do tecido adiposo dos animais do referido grupo impedindo a perda deste substrato pela oxidação. No tecido adiposo dos animais do grupo G2, entretanto, o ácido graxo C 20:3 n-6 apresentou um valor entre o encontrado para o grupo G1 e o grupo controle, o que sugere que o extrato aquoso também estaria exercendo uma ação protetora sobre o tecido adiposo dos animais deste grupo. A diferença de resultado entre o grupo G1 e G2 para o ácido graxo em questão pode ser devido as limitações do método empregado.

Tabela 13. Perfil de ácidos graxos do tecido adiposo dos animais do grupo controle e experimentais G1 e G2, que receberam extrato aquoso durante 29 dias.

ÁCIDO GRAXO	TEOR (%) [*]		
	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2
C 12:0	0,16 ±0,03 ^a	0,22 ±0,06 ^b	0,17 ±0,04 ^a
C 14:0	0,94 ±0,06 ^a	0,97 ±0,07 ^a	0,93 ±0,11 ^a
C 15:0	0,21 ±0,03 ^a	0,23 ±0,02 ^a	0,23 ±0,02 ^a
C 16:0	18,27 ±1,00 ^a	18,21 ±0,74 ^a	18,22 ±0,55 ^a
C 17:0	0,19 ±0,02 ^a	0,19 ±0,01 ^a	0,20 ±0,01 ^a
C 18:0	2,86 ±0,14 ^a	2,82 ±0,11 ^a	2,93 ±0,13 ^a
Total saturados	22,62	22,64	22,67
C 16:1	2,61 ±0,48 ^a	2,71 ±0,39 ^a	2,70 ±0,24 ^a
C 18:1	27,94 ±0,29 ^a	27,84 ±0,28 ^a	27,79 ±0,25 ^a
C 20:1	0,28 ±0,02 ^a	0,29 ±0,01 ^a	0,30 ±0,02 ^a
Total monoinsaturados	30,83	30,84	30,79
C 18:2	38,99 ±2,24 ^a	39,63 ±1,34 ^a	39,30 ±0,73 ^a
C 18:3	4,10 ±0,23 ^a	4,23 ±0,13 ^a	4,29 ±0,19 ^a
C 20:2	0,30 ±0,02 ^a	0,31 ±0,04 ^a	0,32 ±0,03 ^a
C 20:3 n-6	0,15 ±0,01 ^a	0,18 ±0,01 ^b	0,16 ±0,02 ^{a,b}
C 20:4	1,02 ±0,07 ^a	1,13 ±0,09 ^a	1,13 ±0,15 ^a
C 22:6	0,45 ±0,06 ^a	0,49 ±0,09 ^a	0,49 ±0,06 ^a
Total poliinsaturados	45,01	45,65	45,69

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

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

Nos anexos 3, 4 e 5 encontram-se os cromatogramas dos ácidos graxos do tecido adiposo dos animais do grupo controle e experimentais G1 e G2, respectivamente.

Em seguida, através do método TBARS, foi determinado o índice de peroxidação no tecido adiposo dos animais do grupo controle e dos que receberam o extrato aquoso da semente de girassol rajada em diferentes concentrações. Os resultados obtidos encontram-se na TABELA 14.

Tabela 14. Peroxidação lipídica no tecido adiposo dos animais do grupo controle e experimentais G1 e G2, que receberam extrato aquoso durante 29 dias.

GRUPO	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA*
	(nMol MDA/mg proteína)
Controle	76,02 ±0,54 ^a
G1	75,65 ±0,63 ^a
G2	74,74 ±0,12 ^b

* Valores expressos em média ± desvio padrão, n=8.

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

Conforme pode-se ver na tabela 14, houve uma diminuição estatisticamente significativa no índice de peroxidação lipídica do tecido adiposo dos animais do grupo G2 (74,74 nMol MDA/mg proteína). O mais baixo índice de peroxidação lipídica no tecido adiposo dos animais que receberam o extrato aquoso na concentração mais elevada (2,1%) também sugere um possível efeito protetor deste extrato sobre os ácidos graxos poliinsaturados do referido tecido, impedindo a perda destes substratos pela oxidação.

Na literatura existem poucos trabalhos investigando o efeito protetor de antioxidantes naturais nos diferentes tecidos *in vivo*. Eichenberger *et al.* (2004), investigando a influência e as possíveis interações da suplementação da dieta com vitaminas antioxidantes bem como a estabilidade oxidativa nos diferentes tecidos de porcos, verificaram que a suplementação com vitamina E resultou em mais baixos valores de TBARS na camada de gordura dorsal dos animais que receberam a vitamina (MDA = 0,28 mg/Kg) em relação ao grupo controle (MDA = 0,35 mg/Kg).

5.7.1.2 Avaliação do perfil lipídico e de TBARS no tecido cerebral

Dentre todos os órgãos do corpo humano, exceto o tecido adiposo, o sistema nervoso tem o maior conteúdo de lipídeos. O peso seco do cérebro de um adulto é constituído por cerca de 50 a 60% de lipídeos, dos quais cerca de 35% são ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs). O ácido araquidônico e o DHA, que contém quatro e seis duplas ligações respectivamente, aparecem em maiores concentrações. Vários autores tem proposto a necessidade dos PUFAs de cadeia longa para a evolução

intelectual humana (HAAG, 2003). Assim, devido ao seu elevado teor de ácidos graxos poliinsaturados, o cérebro é especialmente susceptível à destruição pelos radicais livres. Além disso, o cérebro possui capacidade antioxidante relativamente baixa e uma elevada taxa de utilização de oxigênio (VASCONCELLOS *et al.*, 1999).

A TABELA 15 mostra o perfil de ácidos graxos do tecido cerebral dos animais do grupo controle e experimentais G1 e G2 que receberam o extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol rajada durante 29 dias.

Conforme pode-se verificar na tabela 15, exceto para o ácido graxo linoléico (C18:2) cujo teor foi mais baixo para os animais do grupo G2, não foram detectadas variações estatisticamente significativas no teor dos ácidos graxos poliinsaturados do tecido cerebral dos animais que receberam o extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol rajada em relação ao grupo controle. Estes resultados sugerem que, no tecido cerebral, uma possível ação protetora dos antioxidantes da amostra estudada pode se dar de forma mais tardia.

Tabela 15. Perfil de ácidos graxos do tecido cerebral dos animais do grupo controle e experimentais G1 e G2, que receberam extrato aquoso durante 29 dias.

ÁCIDO GRAXO	TEOR (%) [*]		
	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2
C 16:0	17,99 ±0,40 ^a	17,67 ±0,41 ^a	17,69 ±0,75 ^a
C 18:0	17,89 ±0,55 ^a	17,86 ±0,42 ^a	18,07 ±0,44 ^a
C 20:0	0,39 ±0,04 ^a	0,42 ±0,04 ^a	0,39 ±0,07 ^a
C 22:0	0,31 ±0,02 ^a	0,31 ±0,03 ^a	0,31 ±0,05 ^a
C 24:0	0,36 ±0,05 ^a	0,37 ±0,04 ^a	0,36 ±0,04 ^a
Total saturados	36,94	36,63	36,82
C 16:1	0,40 ±0,02 ^a	0,39 ±0,04 ^a	0,39 ±0,05 ^a
C 18:1	18,27 ±0,59 ^a	18,26 ±0,69 ^a	18,03 ±0,69 ^a
C 20:1	1,62 ±0,23 ^a	1,77 ±0,26 ^a	1,75 ±0,31 ^a
Total monoinsaturados	20,29	20,64	20,38
C 18:2	1,63 ±0,28 ^a	1,79 ±0,51 ^a	1,20 ±0,05 ^b
C 20:2	0,22 ±0,03 ^a	0,24 ±0,03 ^a	0,23 ±0,04 ^a
C 20:4	9,72 ±0,42 ^a	9,82 ±0,35 ^a	10,10 ±0,46 ^a
C 20:3 n-6	0,42 ±0,03 ^a	0,44 ±0,03 ^a	0,43 ±0,04 ^a
C 22:6	11,29 ±0,60 ^a	11,39 ±0,47 ^a	11,71 ±0,55 ^a
Total poliinsaturados	23,27	23,68	23,68

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

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

Os cromatogramas dos ácidos graxos do tecido cerebral dos animais do grupo controle e dos experimentais G1 e G2 encontram-se nos anexos 6, 7 e 8.

A TABELA 16 apresenta os resultados da determinação do índice de peroxidação lipídica no tecido cerebral dos animais do grupo controle e dos grupos G1 e G2, que receberam o extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol rajada em diferentes concentrações.

Tabela 16. Peroxidação lipídica no tecido cerebral dos animais do grupo controle e experimentais G1 e G2, que receberam extrato aquoso durante 29 dias.

GRUPO	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA*
	(nMol MDA/mg proteína)
Controle	128,22 ± 0,15 ^a
G1	127,95 ± 0,35 ^a
G2	127,14 ± 0,26 ^b

* Valores expressos em média ± desvio padrão, n=8.

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

Os dados da tabela 16 mostram que houve uma diminuição significativa no índice de peroxidação lipídica do tecido cerebral dos animais do grupo G2 (127,14 nMol MDA/mg proteína), que receberam o extrato aquoso na concentração mais elevada (2,1%), em relação ao grupo controle (128,22 nMol MDA/mg proteína). Estes resultados reforçam os encontrados na determinação do perfil de ácidos graxos do

tecido cerebral no sentido de que o extrato aquoso administrado aos animais exerceu uma ação protetora contra a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados no tecido estudado.

Chowdhury & Soulsby (2002), estudando a peroxidação lipídica no cérebro de ratos machos Sprague-Dawley, demonstraram que o emprego da proteína da soja como antioxidante dietético foi capaz de reduzir os níveis de produtos da peroxidação lipídica neste órgão (10 a 13 $\mu\text{Mol/g}$) quando comparado com aquele de ratos alimentados com dieta regular (16 a 18 $\mu\text{Mol/g}$).

Latha & Pari (2003), examinando o efeito dos antioxidantes do extrato aquoso das flores da *Cássia auriculata* na peroxidação lipídica do cérebro de ratos diabéticos, também encontraram significativo declínio na formação de produtos da peroxidação lipídica no cérebro dos animais tratados com este extrato (1,20 mM/100 g de tecido) em relação aos animais diabéticos (1,75 mM/100 g de tecido), sugerindo um possível papel antiperoxidativo do mesmo.

5.7.1.3 Avaliação do perfil lipídico e de TBARS no tecido hepático

O fígado é a maior víscera do corpo humano, correspondendo a 1/5 do peso corporal em adultos. É, essencialmente, uma massa de células permeadas por um complexo e organizado sistema de canais que transportam o suprimento sanguíneo e a bile. Todo o material proveniente do intestino, com exceção de parte dos lipídeos que é transportada por via linfática, bem como do pâncreas, do baço e do estômago converge para a veia porta que desemboca no fígado que tem as funções de

transformação química de substâncias nutritivas para a assimilação, armazenamento dos produtos desta transformação, transformação química de substâncias tóxicas para excreção principalmente pelos rins, produção de bile, que é o elemento auxiliar da digestão como emulsificante de gorduras, e destruição de células mortas e outros resíduos sanguíneos por ação das células de Kupffer (FIGUEIREDO, 2000).

A TABELA 17 mostra o perfil de ácidos graxos do tecido hepático dos animais do grupo controle e experimentais G1 e G2, que receberam o extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol rajada durante 29 dias.

A ligeira diminuição no teor total de ácidos graxos essenciais (C18:1, C18:2 e C18:3) e aumento no teor dos poliinsaturados de cadeia longa (C 20:3 n-6 e C 20:4) no tecido hepático dos animais dos grupos que receberam o extrato aquoso (G1 e G2)) em relação ao grupo controle, conforme mostra a tabela 17, pode ser explicada pelo fato de que no fígado os ácidos graxos essenciais são convertidos a poliinsaturados de cadeia longa ou outros derivados metabolicamente ativos como prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos. Contudo, este aumento só foi estatisticamente significativo para o grupo G2. Este resultado sugere uma ação inibidora dos compostos fenólicos do extrato aquoso de maior concentração (2,1%) sobre o processo oxidativo no tecido hepático dos animais que o receberam.

Os cromatogramas dos ácidos graxos do tecido hepático dos animais estudados encontram-se nos anexos 9, 10 e 11.

Tabela 17. Perfil de ácidos graxos do tecido hepático dos animais do grupo controle e experimentais G1 e G2, que receberam extrato aquoso durante 29 dias.

ÁCIDO GRAXO	TEOR (%) [*]		
	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2
C 14:0	0,28 ±0,02 ^a	0,25 ±0,02 ^b	0,26 ±0,03 ^b
C 15:0	0,20 ±0,02 ^a	0,20 ±0,02 ^a	0,21 ±0,03 ^a
C 16:0	16,40 ±0,85 ^a	16,95 ±0,89 ^a	17,05 ±0,40 ^a
C 17:0	0,47 ±0,03 ^a	0,49 ±0,05 ^a	0,51 ±0,05 ^a
C 18:0	16,06 ±1,07 ^{a,b}	15,84 ±0,71 ^a	16,90 ±0,81 ^b
Total saturados	33,41	3,73	34,93
C 16:1	0,35 ±0,05 ^a	0,38 ±0,04 ^a	0,43 ±0,06 ^b
C 18:1	9,13 ±0,93 ^a	8,68 ±0,49 ^a	8,83 ±1,08 ^a
C 20:1	0,39 ±0,04 ^a	0,39 ±0,06 ^a	0,33 ±0,07 ^a
Total monoinsaturados	9,87	9,46	9,59
C 18:2	22,59 ±1,39 ^a	21,65 ±0,85 ^a	21,38 ±1,16 ^a
C 18:3 γ	4,10 ±0,23 ^a	4,23 ±0,13 ^a	4,29 ±0,19 ^a
C 18:3	0,69 ±0,16 ^a	0,62 ±0,09 ^a	0,57 ±0,11 ^a
C 20:2	1,31 ±0,20 ^a	1,32 ±0,15 ^a	1,32 ±0,16 ^a
C 20:3 n-6	0,69 ±0,01 ^a	0,73 ±0,07 ^a	0,76 ±0,08 ^b
C 20:4	21,87 ±0,81 ^a	22,75 ±1,15 ^a	23,18 ±1,14 ^b
C 20:5	0,32 ±0,07 ^a	0,33 ±0,07 ^a	0,34 ±0,05 ^a
C 22:6	3,74 ±0,41 ^a	3,81 ±0,37 ^a	4,05 ±0,58 ^a
Total poliinsaturados	51,36	51,35	51,71

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

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

Por outro lado, o aumento da peroxidação lipídica no fígado indica estresse oxidativo hepático. O estresse oxidativo hepático, que pode comprometer as funções do fígado, também pode também ser avaliado pela determinação do índice de peroxidação lipídica através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (FRAGA, LEIBOWITZ & TAPPEL, 1988).

O índice de peroxidação lipídica no tecido hepático dos animais do grupo controle e dos que receberam o extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol rajada em diferentes concentrações podem ser vistos na TABELA 18.

Tabela 18. Peroxidação lipídica no tecido hepático dos animais do grupo controle e experimentais G1 e G2, que receberam extrato aquoso durante 29 dias.

GRUPO	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA*
	(μ Mol MDA/mg proteína)
Controle	32,17 $\pm$ 0,58 ^a
G1	31,63 $\pm$ 0,13 ^a
G2	30,16 $\pm$ 0,10 ^b

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

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

A tabela 18 mostra que houve uma diminuição estatisticamente significativa no índice de peroxidação lipídica no tecido hepático dos animais do grupo G2. A maior proteção do extrato aquoso no tecido hepático dos animais do grupo G2 (30,16 nMoL MDA/mg proteína) sugere uma melhor ação protetora contra a peroxidação lipídica

dos compostos fenólicos presentes no extrato de maior concentração em relação ao grupo G1 (31,63 nMol MDA/mg proteína), que recebeu o extrato a 0,7%, mostrando que os compostos fenólicos do extrato aquoso a 2,1 % poderiam atuar como antioxidantes dos ácidos graxos também neste órgão.

✓ Lima *et al.* (2005) avaliando o potencial antioxidante *in vivo* de uma infusão aquosa de salva (*Salvia officinalis*), observaram que a substituição da água pura pela infusão de salva resultou em uma melhora no estado antioxidante e alguma proteção contra a peroxidação lipídica no hepatócito dos ratos que receberam o chá de salva. Rodrigues *et al.* (2005), estudando a correlação entre capacidade antioxidante *in vitro* de amostras de vinho tinto com quantidades variáveis de compostos fenólicos e álcool e a peroxidação lipídica nos tecidos de ratos adultos, observaram que a concentração de fenólicos das amostras estava negativamente correlacionada com a produção de TBARS no fígado (-0,891), rim (-0,852) e pulmão (-0,790), $p < 0,001$, dos animais que receberam vinho por 4 semanas.

5.7.1.4 Avaliação do perfil lipídico e de TBARS no plasma

Toda a parte líquida do sangue forma o plasma sanguíneo. Cerca de 90% do plasma constituem-se de água, no qual estão dissolvidas as numerosas substâncias existentes no sangue (BAYNES & DOMINICZAR, 2000).

Trabalhos recentes demonstraram que, além das vitaminas antioxidantes, alguns polifenóis como os flavonóides podem ser absorvidos e prevenir a oxidação das LDL plasmáticas (KRIS-ETHERTON & KEEN, 2002). Silva *et al.* (1999^b),

trabalhando com ratos recebendo ração suplementada com quercetina, observaram uma maior resistência do plasma destes à oxidação em relação ao grupo controle sem o antioxidante.

A TABELA 19 mostra os resultados obtidos para o perfil de ácidos graxos do plasma dos animais do grupo controle e experimentais G1 e G2, que receberam o extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol rajada durante 29 dias.

Pode-se observar na tabela 19 que o teor total de ácidos graxos poliinsaturados no plasma dos animais estudados foi maior para os animais dos grupos experimentais G1 e G2 em relação ao grupo controle. Porém, em relação a cada ácido graxo individualmente, o aumento detectado só foi estatisticamente significativo para os ácidos graxos essenciais (C 18:2 e C 18:3) nos animais do grupo G1. Ainda em relação aos poliinsaturados, pode-se observar na referida tabela que os ácidos graxos eicosadienóico (C20:2) e docosaheptaenóico ou DHA (C22:6), presentes no plasma dos animais do grupo G2, não foram detectados nos grupos controle e G1.

Adicionalmente, pode-se observar na tabela 19 que, em relação aos ácidos graxos monoinsaturados, também houve um aumento estatisticamente significativo para o ácido graxo palmitoléico (C16:1) no plasma dos animais dos grupos experimentais G1 e G2 em relação ao controle. Estes resultados mais uma vez reforçam a possível ação protetora dos antioxidantes do extrato aquoso estudado sobre os ácidos graxos insaturados do plasma.

Tabela 19. Perfil de ácidos graxos do plasma dos animais do grupo controle e experimentais G1 e G2, que receberam extrato aquoso durante 29 dias.

ÁCIDO GRAXO	TEOR (%) [*]		
	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2
C 14:0	0,86 ±0,10 ^a	0,59 ±0,08 ^b	0,73 ±0,33 ^a
C 15:0	0,52 ±0,03 ^a	0,37 ±0,03 ^b	0,41 ±0,05 ^b
C 16:0	16,76 ±0,42 ^a	16,70 ±1,15 ^a	16,97 ±1,38 ^a
C 17:0	0,45 ±0,01 ^a	0,39 ±0,06 ^b	0,43 ±0,02 ^a
C 18:0	7,01 ±1,18 ^a	6,70 ±0,93 ^a	7,44 ±1,03 ^a
C 20:0	0,53 ±0,04 ^a	nd	0,46 ±0,09 ^a
C 22:0	0,53 ±0,29	nd	nd
C 24:0	1,58 ±0,29 ^a	1,48 ±0,19 ^a	0,54 ±0,13 ^b
Total saturados	28,24	26,23	26,99
C 16:1	0,57 ±0,11 ^a	0,74 ±0,10 ^b	0,76 ±0,12 ^b
C 18:1	17,71 ±0,21 ^a	18,06 ±1,77 ^a	16,23 ±2,01 ^a
Total monoinsaturados	18,28	18,79	16,98
C 18:2	29,16 ±2,01 ^a	32,55 ±1,66 ^b	28,96 ±4,24 ^a
C 18:3	1,68 ±0,18 ^a	2,11 ±0,41 ^b	2,03 ±0,58 ^a
C 20:2	nd	nd	0,47 ±0,04
C 20:4	11,37 ±0,85 ^a	11,83 ±1,66 ^a	10,36 ±2,14 ^a
C 22:6	nd	nd	1,38 ±0,47
Total poliinsaturados	42,21	46,48	43,20

nd = não identificados

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

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

Os cromatogramas dos ácidos graxos do plasma dos animais do grupo controle e experimentais G1 e G2 encontram-se nos anexos 12, 13 e 14, respectivamente.

O índice de peroxidação lipídica no plasma dos animais do grupo controle e dos que receberam o extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol rajada em diferentes concentrações também foram determinados. Os resultados encontrados estão apresentados na TABELA 20.

Tabela 20. Peroxidação lipídica no plasma dos animais do grupo controle e experimentais G1 e G2, que receberam extrato aquoso durante 29 dias.

GRUPO	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA*
	(nMol MDA/mg proteína)
Controle	3,72 $\pm$ 0,07 ^a
G1	2,60 $\pm$ 0,02 ^b
G2	2,58 $\pm$ 0,05 ^b

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

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

A tabela 20 mostra que houve uma diminuição no índice de peroxidação lipídica no plasma dos animais que receberam o extrato aquoso (G1 = 2,60 nMol MDA/mg proteína e G2 = 2,58 nMol MDA/mg proteína) em relação ao grupo controle

(3,72 nMol MDA/mg proteína), porém entre os grupos G1 e G2 a diferença não foi estatisticamente significativa.

Desta forma, os resultados do perfil de ácidos graxos e índice de peroxidação lipídica no plasma sugerem que os compostos fenólicos do extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol rajada foram absorvidos e transportados ao plasma dos animais experimentais, exercendo uma ação protetora mais imediata do que nos outros tecidos estudados, pois neste tecido diferenças estatísticas significativas foram detectadas tanto para o grupo G2 quanto para o G1, que recebeu o extrato em concentração mais baixa (0,7%).

Na literatura podem ser encontrados alguns trabalhos que confirmam a ação protetora de antioxidantes naturais contra a peroxidação lipídica plasmática. Netzel *et al.* (2001), testando o potencial protetor à saúde de um suco de frutas rico em antioxidantes, observaram que a ingestão de 400 mL do suco por indivíduos saudáveis resultou em um decréscimo significativo (18%) de malondialdeído plasmático após 4 horas. Kim & Lee (2001), investigando o possível efeito protetor de diferentes antioxidantes, entre eles os do ginseng vermelho, na peroxidação lipídica em fumantes, observaram que as concentrações plasmáticas de malondialdeído gradualmente decresceram após a suplementação com 1,8 g de ginseng por um período de 4 semanas.

Assim, em nosso estudo, os resultados da determinação do perfil de ácidos graxos e do índice de peroxidação lipídica nos tecidos analisados mostraram que o método TBARS se mostrou mais sensível para detecção das mudanças associadas a oxidação *in vivo* do que a determinação do perfil de ácidos graxos. Contudo, ambas

as determinações apresentaram um padrão que se repetiu quanto aos resultados encontrados nos diferentes tecidos estudados, sugerindo um possível efeito protetor do extrato aquoso do cotilédone da semente de girassol rajada sobre os ácidos graxos poliinsaturados dos referidos tecidos. Todavia, estes dados devem merecer comprovação por ensaios em longo prazo.

Por outro lado, os resultados positivos obtidos nas diferentes etapas do nosso estudo indicam também a necessidade da realização de estudos adicionais, nesta mesma linha, visando a adequação da dose com o efeito bem como a obtenção de maiores informações no que diz respeito a segurança no consumo de antioxidantes naturais por humanos.

Finalmente, diante dos resultados obtidos, podemos concluir que a semente de girassol rajada tem um potencial de emprego na alimentação humana não somente como fonte de importantes nutrientes, tais como proteínas e lipídios poliinsaturados, mais também como fonte de antioxidantes naturais benéficos à saúde.

6. CONCLUSÕES

1. A semente de girassol rajada apresentou em sua composição quantidades elevadas de compostos fenólicos os quais, identificados por cromatografia em fase gasosa, o ácido clorogênico foi o composto predominante no extrato aquoso.
2. Todos os parâmetros estudados *in vitro* para determinação da capacidade antioxidante dos extratos etanólico e aquoso do cotilédone da semente de girassol estudada, obtidos por extração seqüencial com solventes de diferentes polaridades, forneceram resultados positivos, indicando o extrato aquoso como o de maior capacidade.
3. Quando avaliado *in vivo*, o extrato aquoso não mostrou efeitos antinutricionais aparentes pois os animais que o receberam desenvolveram-se normalmente.
4. Dos dois métodos empregados, o método TBARS se mostrou mais sensível para detecção das mudanças associadas a oxidação *in vivo* em relação a determinação do perfil de ácidos graxos.
5. A avaliação do perfil lipídico e o teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico empregados para a avaliação da atividade antioxidante *in vivo* foram indicativos de que o extrato aquoso do cotilédone da semente de

girassol rajada foi capaz de exercer um efeito protetor sobre os ácidos graxos poliinsaturados dos tecidos estudados. Todavia, estes dados devem merecer comprovação por ensaios a longo prazo.

6. Entre os tecidos estudados, o plasma ofereceu uma resposta mais imediata à administração do extrato aquoso em relação aos tecidos adiposo, cerebral e hepático, pois neste tecido as diferenças estatisticamente significativas foram detectadas tanto para o grupo G2 quanto para o grupo G1, que recebeu o extrato em concentração mais baixa (0,7%).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMSON, G.E.; LAZARUS, S.A.; MITCHELL, A.E.; PRIOR, R.L.; CAO, G.H.; JACOBS, P.H.; KREMERS, B.G.; HAMMERSTONE, J.F.; RUCKER, R.B.; RITTER, K.A.; SCHMITZ, H.H. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.47, n.10, p.4184-4188, 1999.
2. CANADA. Agriculture and Agri-Food Canada. Sunflower seed: situation and outlook. **Bi-Wkly. Bull.**, Winnipeg, v.13, n.2, p.1-4, 2000. Disponível em: <http://www.agr.gc.ca/mad-dam/e/bulletine/v13e/v13n02e.htm>. Acesso em: 19 set. 2004.
3. CANADA. Agriculture and Agri-Food Canada. Sunflower seed: situation and outlook. **Bi-Wkly. Bull.**, Winnipeg, v.16, n.16, p.1-8, 2003. Disponível em: http://www.agr.gc.ca/mad-dam/e/bulletine/v16e/v16n16_e.htm. Acesso em: 15 abr. 2005.
4. AMAROWICZ, R.; WANASUNDARA, V.N.; KARAMAC, M.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of ethanolic extract of mustard seed. **Nahrung-Food**, Weinheim, v.40, n.5, p.261-263, 1996.
5. AMAROWICZ, R.; NACZK, M.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of crude tannins of canola and rapeseed hulls. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.77, n.9, p.957-961, 2000a.
6. AMAROWICZ, R.; NACZK, M.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.48, n.7, p.2755-2759, 2000b.

7. ANGELINI, A.C.; UNGARO, M.R.G.; TURATTI, J.M. Girassol: uma opção de segundo cultivo? **Óleos Grãos**, São Caetano do Sul, v.50, p.36-41, 1999.
8. ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, Letchworth, v.127, p.183-198, 2002.
9. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16.ed. Arlington, 1995. v.2.
10. BAYNES, J.; DOMINICZAR, M.H. **Bioquímica médica**. São Paulo: Manole, 2000. 566p.
11. BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power" the FRAP assay. **Anal. Biochem.**, New York, v.239, p.70-76, 1996.
12. BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods Enzymol.**, San Diego, v.299, p.15-27, 1999.
13. BISHOP, J.M. Molecular themes in oncogenesis. **Cell**, Cambridge, v.64, p.235-248, 1991.
14. BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, London, v.181, n.26, p.1199-1200, 1958.
15. BLOMHOFF, R. Dietary antioxidants and cardiovascular disease. **Curr. Opin. Lipidol.**, Hagerstown, v.16, p.47-54, 2005.
16. BOWLES, D.B. Defense-related proteins in higher plants. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v.59, p.873-907, 1990.

17. BOZDECH, Z.; GINSBURG, H. Antioxidant defense in *Plasmodium falciparum* - data mining of the transcriptome. **Malar. J.**, London, v.3, art.n.23, jul., 2004.
18. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, New York, v.72, p.248-254, 1976.
19. BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm.-Wiss. Technol.**, Amsterdam, v.28, p.25-30, 1995.
20. BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutr. Rev.**, Secaucus, v.56, p.317-333, 1998.
21. FERRARI, R.V. O girassol está invadindo. **Bunge Campo**, São Paulo, v.1, n.5, p.1-4, 2004. Disponível em: <http://www.bunge.com.br/shared/files/campo/BNC5.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2005.
22. CAO, G.; ALESSIO, H.M.; CUTLER, R.G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biol. Med.**, Orlando, v.14, p.303-311, 1993.
23. CAO, G.; PRIOR, R.L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. **Clin. Chem.**, Washington, v.44, n.6, p.1309-1315, 1998.
24. CAO, G.; PRIOR, R.L. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. **Methods Enzymol.**, San Deigo, v.299, p.50-62, 1999.
25. CAO, G.; MUCCITELLI, H.U.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; PRIOR, R.L. Anthocyanins are absorbed in glycated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.73, p.920-926, 2001.

- 26.CARTRON, E.; CARBONNEAU, M.; FOURET, G.; DESCOMPS, B.; LEGER, C.L. Specific antioxidant activity of caffeoyl derivatives and other natural phenolic compounds: LDL protection against oxidation and decrease in the proinflammatory lysophosphatidylcholine production. **J. Nat. Prod.**, Columbus, v.64, p.480-486, 2001.
- 27.CAVASIN Jr., C.P. **A cultura do girasol**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 69p.
- 28.NORTH DAKOTA STATE UNIVERSITY. Department of Agribusiness and Applied Economics. Center for Agricultural Policy and Trade Studies. **Analysis of the world oil crops market**. Fargo, 2004. 34p. (Agribusiness and Applied Economics Report, n.529). Disponível em: <http://www.ag.ndsu.nodak.edu/capts/documents/AGReport529-P.pdf>. Acesso em: 15 maio 2005.
- 29.CHOW, C.K., ed. **Fatty acids in foods and their health implications**. New York: Marcel Dekker, 1992. 890p. (Food Science and Technology: a Series of Monographs and Textbooks, 53).
- 30.CHOWDHURY, P.; SOULSBY, M. Lipid peroxidation in rat brain is increased by simulated weightlessness and decreased by a soy-protein diet. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, Whiting, v.32, p.188-192, 2002.
- 31.CHUNG, K.T.; WONG, T.Y.; WEI, C.I.; HUANG, Y.W.; LIN, Y. Tannins and human health: a review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Philadelphia, v.38, n.6, p.421-464, 1998.
- 32.DAS, B.S.; NANDA, N.K. Evidence for erythrocyte lipid peroxidation in acute *falciparum* malaria. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, Amsterdam, v.93, p.58-62, 1999.
- 33.DAVIS, T.M.E.; GARCIA-WEBB, P.; FU, L.C.; SPENCER, J.L.; BEILBY, J.; GUO, X.B. Antioxidant vitamins in acute malaria. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, Amsterdam, v.87, p.596-597, 1993.

- 34.BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Decreto n.55.871, de 26 de março de 1965**. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=22&word=>. Acesso em: 10 jun. 2005.
- 35.DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acad.**, Curitiba, v.5, n.1, p.33-40, 2004.
- 36.DE PAULIS, T.; COMMERS, P.; FARAH, A.; ZHAO, J.; McDONALD, M.P.; GALICI, R.; MARTIN, P.R. 4-caffeoyl-1,5-quinide in roasted coffee inhibits [³H]naloxone binding and reverses antinociceptive effects of morphine in mice. **Psychopharmacology**, Heidelberg, v.176, p.146-153, 2004.
- 37.DIZDAROGLU, M. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. **Free Radical Biol. Med.**, Orlando, v.10, p.225-230, 1991.
- 38.DORMANDY, T.L.; WICKENS, D.G. The experimental and clinical pathology of diene conjugation. **Chem. Phys. Lipids**, Amsterdam, v.45, p.353-364, 1987.
- 39.DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v.82, p.47-95, 2002.
- 40.DUTHIE, G.G.; DUTHIE, S.J.; KYLE, J.A.M. Plant polyphenols in cancer a heart disease: implications as nutritional antioxidants. **Nutr. Res. Rev.**, Wallingford, v.13, n.1, p.79-106, 2000. [Review].
- 41.DUTHIE, G.G.; GARDNER, P.T.; KYLE, J.A.M. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? **Proc. Nutr. Soc.**, Wallingford, v.62, p.599-603, 2003.
- 42.EICHENBERGER, B.; PFIRTER, H.P.; WENK, C.; GEBERT, S. Influence of dietary vitamin E and supplementation on vitamin E and C content and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in different tissues of growing pigs. **Arch. Anim. Nutr.**, Basingstoke, v.58, n.3, p.195-208, 2004.

- 43.EMMONS, C.L.; PETERSON, D.M. Antioxidant activity and phenolic contents of oat groats and hulls. **Cereal Chem.**, Saint Paul, v.76, n.6, p.902-905, 1999.
- 44.ESKIN, N.A.M. **Biochemistry of foods**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1990. 539p.
- 45.ETERBAUER, H.; STRIEGL, G.; PUHL, H.; ROTHENEDER, M. Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low-density lipoprotein. **Free Radical Res. Commun.**, Chur, v.6, p.67-75, 1989.
- 46.FANTOZZI, P.; MONTEDORO, G. Dosage des composés phénoliques dans les drups d'olives à différents stades de maturation. **Ind. Aliment. Agric.**, Paris, v.95, p.1335-1339, 1978.
- 47.FERNANDES, K.V.S. **Characterization and molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor from seeds of cowpea (*Vigna unguiculata*)**. Bristol, 1993. 201p. Tese de Doutorado - Long Ashton Research Station - University of Bristol.
- 48.FERNANDES, S.M.; PINTO, N.A.V.D.; THÉ, P.M.P.; PEREIRA, R.G.F.A.; CARVALHO, V.D. Teores de polifenóis, ácido clorogênico, cafeína e proteína em café torrado. **Rev. Bras. Agrociênc.**, Pelotas, v.7, n.3, p.197-199, 2001.
- 49.FIGUEIREDO, J. **Noções de anatomia e bioquímica**. 2.ed. Rio de Janeiro: ISBN, 2000. p.37-48.
- 50.FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, Birmingham, v.226, p.497-509, 1957.
- 51.FOTI, M.; PIATTELI, M.T.B.; RUBERTO, G. Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system: structure-activity relationship. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.44, p.497-501, 1996.

- 52.FRAGA, C.G.; LEBOVITZ, B.E.; TAPPEL, A.L. Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid–reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. **Free Radical Biol. Med.**, Orlando, v.4, n.3, p.155-161, 1988.
- 53.FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.80, p.1925-1941, 2000.
- 54.GIADA, M.L.R.; MANCINI FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos de alimentos. **Nutrire**, São Paulo, v.28, p.91-107, 2004.
- 55.GOOTVELD, M.; HALLIWELL, B. Measurement of allantoin and uric acid in human body fluids: a potential index of radical reactions *in vivo*. **Biochem. J.**, Colchester, v.243, p.803-808, 1987.
- 56.HAAG, M. Essential fatty acids and the brain. **Can. J. Psychiatry**, Ottawa, v.48, n.3, p.195-203, 2003.
- 57.HADORN, H.; ZÜRCHER, K. Determination of the oxidation stability of oils and fats. **Dtsch. Lebensm.-Rundsch.**, Stuttgart, v.70, p.57-65, 1974.
- 58.HALVORSEN, B.L.; HOLTE, K.; MYHRSTAD, M.C.W.; BARIKMO, I.; HVATTUM, E.; REMBERG, S.F.; WOLD, A.B.; HAFFNER, K.; BAUGEROD, H.; ANDERSEN, L.F.; MOSKAUG, J.O.; JACOBS Jr., D.R.; BLOMHOFF, R. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. **J. Nutr.**, Bethesda, v.132, n.3, p.461-471, 2002.
- 59.ALLEN, J.C.; HAMILTON, R.J., eds. **Rancidity in foods**. London: Applied Science, 1983. p.1.
- 60.HARBORNE, J.B. Plant phenolics. In: BELL, E.A.; CHARLWOOD, B.V.; ARCHER, B., eds. **Secondary plant products**. Berlin: Springer-Verlag, 1980. p.330-402. (Encyclopedia of plant physiology. New Series, v.8).

61. HARBORNE, J.B. Methods in plant biochemistry. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B., eds. **Plant phenolics**. London: Academic Press, 1989. v.1. (Methods in Plant biochemistry).
62. HARBORNE, J.B. **Flavonoids**: advances in research since 1986. London, New York: Chapman and Hall, 1994. p.589-618.
63. HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab. Pract.**, London, v.22, p.475-477, 1973.
64. HASENHUETTI, G.L.; WAN, P.J. Temperature effects on the determination of oxidative stability with the Metrohm Rancimat. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.69, n.6, p.525-527, 1992.
65. HERTOOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; VENEMA, D.P. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.40, p.1591-1598, 1992.
66. HOLLIDAY, R.; PHILLIPS, K. Health benefits of the sunflower kernel. **Cereal Foods World**, Saint Paul, v.46, p.205-208, 2001.
67. HOLLMAN, P.C.H.; DE VRIES, J.H.M.; VAN LEEUWEN, S.D; MENGELERS, M.J.B.; KATAN, M.B. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.62, n.6, p.1276-1282, 1995.
68. HOLLMAN, P.C.H. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects? **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.81, p.842-852, 2001.
69. HUANG, S.W.; HOPIA, A.; SCHWARZ, K.; GERMAN, J.; FRANKEL, E. Antioxidant activity of tocopherol and trolox in different lipid substrates: bulk oils vs. oil-in-water emulsions. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.44, p.444-452, 1996.

70. HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.50, p.1815-1821, 2002.
71. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz:** métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. São Paulo, 1985. v.1, 371p.
72. JACKSON, M.J. An overview of methods for assessment of free radical activity in biology. **Proc. Nutr. Soc.**, Wallingford, v.58, n.4, p.1001-1006, n.4, 1999.
73. JAYAPRAKASHA, G.K.; SINGH, R.P.; SAKARIAH, K.K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. **Food Chem.**, Amsterdam, v.73, p.285-290, 2001.
74. JOHNSON, P.R.; GREENWOOD, M.R.C. The adipose tissue. In: WEISS, L., ed. **Cell and tissue biology:** a textbook of histology. 6.ed. Baltimore: Urban and Schwarzenberg, 1988. p.191-209.
75. JOVANOVIĆ, S.V.; STEENKEN, S.; TOSIC, M.; MARJANOVIĆ, B.; SIMIĆ, M.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Am. Chem. Soc.**, Columbus, v.116, n.11, p.4846-4851, 1994.
76. KARAKAYA, S.; Bioavailability of phenolic compounds. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Philadelphia, v.44, p.453-464, 2004.
77. KAUR, H.; HALLIWELL, B. Salicylic acid and phenylalanine as probes to detect hydroxyl radicals. In: PUNCHARD, N.A.; KELLY, F.J., eds. **Free radicals:** a practical approach. Oxford: Oxford University Press; New York: IRL Press, 1996. p.101-118. (Practical approach series, 168).

- 78.KIM, H.S.; LEE, B.M. Protective effects of antioxidant supplementation on plasma lipid oxidation in smokers. **J. Toxocol. Environ. Health**, Washington, v.63, n.8, p.583-598, 2001.
- 79.KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **J. Am. Diet. Assoc.**, Orlando, v.99, n.2, p.213-218, 1999.
- 80.KRINGS, U.; BERGER, R.G. Antioxidant activity of some roasted foods. **Food Chem.**, Amsterdam, v.72, n.2, p.223-229, 2001.
- 81.KRIS-ETHERTON, P.M.; KEEN, C.L. Evidence that the antioxidant flavonoids in the tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. **Curr. Opin. Lipidol.**, Hagerstown, v.13, p.41-49, 2002.
- 82.LAKENBRINK, C.; LAPEZYNSKI, S.; MAIWALD, B.; ENGELHARDT, U.H. Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.48, p.2848-2852, 2000.
- 83.LALAS, S.; DOURTOGLOU, V. Use of rosemary extract in preventing oxidation during deep-fat frying of potato chips. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.80, n.6, p.579-583, 2003.
- 84.LAMPE, J.W. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.70, p.475S-490S, 1999.
- 85.LANGSETH, L. **Oxidants, antioxidants and disease prevention**. Bruxelas: ILSI, 1995. 26p. (ILSI Europe Concise Monograph Series).
- 86.LATHA, M.; PARI, L. Preventive effects of *Cassia auriculata* L. flowers on brain lipid peroxidation in rats treated with streptozotocin. **Mol. Cell. Biochem.**, Dordrecht, v.243, n.1/2, p.23-28, 2003.

- 87.LÄUBLI, M.W.; BRUTTEL, P.A. Determination of the oxidative stability of fats and oils: comparison between the active oxygen method (AOCS Cd 12-57) and the Rancimat Method. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.63, n.6, p.792-795, 1986.
- 88.LEE, C.H.; YANG, L.; XU, J.Z.; YEUNG, S.Y.V.; HUANG, Y.; CHEN, Z.Y. Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides. **Food Chem.**, Amsterdam, v.49, n.4, p.735-741, 2005.
- 89.LEVINE, R.L.; WILLIAMS, J.A.; STADMAN, E.R.; SHACTER, E. Carbonil assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.**, San Diego, v.233, p.346-359, 1994.
- 90.LIMA, C.F.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M.; FERNANDES-FERREIRA, M.; PEREIRA-WILSON, C. The drinking of a *salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. **J. Ethnopharmacol.**, Amsterdam, v.97, n.2, p.383-389, 2005.
- 91.LIU, J.B.; CHANG, S.K.C.; WIESENBORN, D. Antioxidant properties of soybean isoflavone extract and tofu *in vitro* and *in vivo*. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.53, n.6, p.2333-2340, 2005.
- 92.MACK, J.E.; KERR, J.A.; VREUGDENHIL, P.K.; BELZER, F.O.; SOUTHARD, J.H. Effect of polyethylene glycol on lipid peroxidation in cold-stored rat hepatocytes. **Cryobiology**, New York, v.28, p.1-7, 1991.
- 93.MALCOM, G.T.; BHATTACHARYYA, A.K.; VELEZ-DURAN, M.; GUZMAN, M.A.; OALMANN, M.C.; STRONG, J.P. Fatty acid composition of adipose tissue in humans: differences between subcutaneous sites. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.50, p.288-291, 1989.

- 94.MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.79, p.727-747, 2004.
- 95.MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.81, p.230S-242S, 2005.
- 96.MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.45, p.594-598, 1968.
- 97.MARRELLI, M.T.; FLOETER-WINTER, L.M.; MALAFRONTÉ, R.S.; TADEI, W.P.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FLORES, MENDONZA, C.; MARINOTTI, O. Amazonian malaria vector anopheline relationships interpreted from ITS2 rDNA sequences. **Med. Vet. Entomol.**, Oxford, v.19, n.12, p.208-218, 2005.
- 98.MARTINEZ-TOME, M.; JIMENEZ, A.M.; RUGGIERI, S.; FREGA, N.; STRABBIOLI, R.; MURCIA, M.A. Antioxidant properties of mediterranean spices compared with common food additives. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.64, n.9, p.1412-1419, 2001.
- 99.MARTÍNEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M.J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Arch. Latinoam. Nutr.**, Caracas, v.50, n.1, p.5-18, 2000.
- 100.MATERN, V.; LÜER, P.; KREUSCH, D. Biosynthesis of coumarins. In: BARTON, D.; NAKANISHI, K.; METH-COHN, O.; SANKAWA, V., eds. **Comprehensive natural products chemistry: polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives**. Amsterdam, New York: Elsevier Science, 1999. v.1, p.623-637.

- 101.MATTHAUS, B. Antioxidant activity of extracts isolated from residues of oilseeds, such as rapeseed or sunflower. **Agro Food Ind. Hi-Tech.**, Milano, v.13, n.4, p.22-25, 2002.
- 102.MELO, M.S.O.M.; MANCINI FILHO, J. Antioxidantes naturais do fruto do dendezeiro (*Elaeis guineensis*, Jacq). **Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.25, n.2, p.147-157, 1989.
- 103.MELOV, S.; WOLF, N.; STROZYK, D.; DOCTROW, S.R.; BUSH, A.I. Mice transgenic for Alzheimer disease beta-amyloid develop lens cataracts that are rescued by antioxidant treatment. **Free Radical Biol. Med.**, Orlando, v.38, n.2, p.258-261, 2005.
- 104.MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.48, p.91, 1971.
- 105.MILLER, R.M.; SIES, H.; PARK, E.M.; THOMAS, J.A. Phosphorylase and creatine kinase modification by thiol disulphide exchange and by xanthine oxidase-initiated S-thiolation. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.276, p.355-363, 1990.
- 106.MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M.J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clin. Sci.**, Colchester, v.84, p.407-412, 1993.
- 107.MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.A. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS⁺ radical cation assay. **Free Radical Res.**, Basingstoke, v.26, p.195-199, 1997.
- 108.MOREIRA, A.V.B.; MANCINI FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante da mostarda (*Brassica alba* L.). I. Identificação dos principais compostos participantes da inibição da oxidação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 16, Rio de Janeiro, 1998. **Anais**. Rio de Janeiro: SBCTA, 1998. v.2, p.1077-1080.

- 109.MOREIRA, A.V.B. **Avaliação da atividade antioxidante de semente de mostarda (*Brassica Alba*, L.).** 1. Identificação dos principais compostos responsáveis pela inibição da oxidação. São Paulo, 1999. 120 p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- 110.MOREIRA, A.V.B.; MANCINI FILHO, J. Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva-doce, em sistema aquoso e lipídico. **Nutrire**, São Paulo, v.25, p.31-46, 2003.
- 111.MORRISON, W.H.; HAMILTON, R.J.; KALU, C. Sunflowerseed oil. In: HAMILTON, R.J., ed. **Developments in oils and fats**. London, New York: Blackie Academic, 1995. 269p.
- 112.MORTON, L.W.; CACCETA, R.A.A.; PUDDEY, I.B.; CROFT, K.D. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, Carlton South, v.27, p.152-159, 2000.
- 113.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.
- 114.MÜLLER, S. Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.53, n.5, p.1291-1305, 2004.
- 115.MURCIA, M.A.; EGEA, I.; ROMOJARO, F.; PARRAS, P.; JIMENEZ, A.M.; MARTINEZ-TOME, M. Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives: influence of irradiation procedure. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.52, n.7, p.1872-1881, 2004.

- 116.MURRAY, D.R., ed. **Seed physiology**: development. Sydney, Orlando: Academic Press, 1984. v.1.
- 117.NETZEL, M.; STRASS, G.; JANSEN, M.; BITSCH, I.; BITSCH, R. Bioactive anthocyanins detected in human urine after ingestion of blackcurrant juice. **J. Environ. Pathol., Toxicol. Oncol.**, Congers, v.20, p.89-95, 2001.
- 118.NOIROT, M.; BARRE, P.; DUPERRAY, C.; LOUARN, J.; HAMON, S. Effects of caffeine and chlorogenic acid on propidium iodide-accessibility to DNA: consequences on genome size evaluation in coffee tree. **Ann. Bot.**, Oxford, v.92, p.259-264, 2003.
- 119.NORO, T.; ODA, Y.; MIYASE, T.; UENO, A.; FUKUSHIMA, S. Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.31, n.11, p.3984-3987, 1983.
- 120.O'BRIEN, R.D. **Fats and oils**: formulating and processing for applications. Lancaster: Technomic, 1998. 694p.
- 121.OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Hydrolyzable tannins and related polyphenols. **Fortschr. Chem. Org. Naturst.**, Wien, v.66, p.1-117, 1995.
- 122.OLTHOF, M.R.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B.; Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **J. Nutr.**, Bethesda, v.131, n.1, p.66-71, 2001.
- 123.OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.49, p.4619-4626, 2001.
- 124.OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.50, p.3122-3128, 2002.

- 125.PANZELLA, L.; NAPOLITANO, A.; D'ISCHIA, M. Oxidative conjugation of chlorogenic acid with glutathione: structural characterization of addition products and a new nitrite-promoted pathway. **Bioorg. Med. Chem.**, Amsterdam, v.11, n.22, p.4797-4805, 2003.
- 126.PEDROSA, M.M.; MUSQUIZ, M.; GARCÍA-VALLEJO, C.; BURBANO, C.; CUADRADO, C.; AYET, G.; ROBREDO, L.M. Determination of caffeic and chlorogenic acids and their derivatives in different sunflower seeds. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.80, p.459-464, 2000.
- 127.PELLEGRINI, N.; SERAFINI, M.; COLOMBI, B.; DEL RIO, D.; SALVATORE, S.; BIANCHI, M.; BRIGHENTI, F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. **J. Nutr.**, Bethesda, v.133, p.2812-2819, 2003.
- 128.PERCIVAL, M. Antioxidants. **Clinical Nutrition Insights**, v.10, p.1-4, 1998.
- 129.PRATT, D.E.; HUDSON, B.J.F. Natural antioxidant no exploited commercially. In: HUDSON, B.J.F., ed. **Food antioxidants**. London: Elsevier Applied sciences, 1990. p.171-180.
- 130.PRIOR, R.L.; CAO, G. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biol. Med.**, Orlando, v.27, n.11/12, p.1173-1181, 1999.
- 131.PRIOR, R.L.; CAO, G. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: a review. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.83, n.4, p.950-956, 2000.
- 132.PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.48, p.3396-3402, 2000.

- 133.RAGAN, M.A.; GLOMBITZA, K. Phlorotannin: Brown algal polyphenols. **Prog. Phycol. Res.**, Oxford, v.4, p.177-241, 1986.
- 134.RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biol. Med.**, Orlando, v.26, n.9/10, p.1231-1237, 1999.
- 135.REGITANO D'ARCE, M.A.B. **Extração de óleo de girassol em etanol**: cinética, ácido clorogênico, fração insaponificável. São Paulo, 1991. 145p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- 136.REGITANO D'ARCE, M.A.B. O girassol na alimentação humana. In: REUNIÃO NACIONAL DA PESQUISA DE GIRASSOL, 12, Campinas, 1997. **Resumos**. Campinas, 1997. p.11-12.
- 137.RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biol. Med.**, Orlando, v.20, p.933-956, 1996.
- 138.RICE-EVANS, C.A. Measurement of total antioxidant activity as a marker of antioxidant status *in vivo*: procedures and limitations. **Free Radical Res.**, Basingstoke, v.33, p.559-566, 2000.
- 139.ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R.J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. **Biochem. Pharmacol.**, Amsterdam, v.37, n.5, p.837-841, 1988.
- 140.RODRIGUES, P.C. **Bioestatística**. 3.ed. Niterói: EDUFF, 2002. 339p.
- 141.RODRIGUES, R.; CASTILHO, R.; CARRASCO, R.; HUERTA, P.; MORENO, M. Diminution of tissue lipid peroxidation in rats is related to the *in vitro* antioxidant capacity of wine. **Life Sci.**, Amsterdam, v.76, n.8, p.889-900, 2005.

- 142.SAKAMOTO, W.; ISOMURA, H.; FUJIE, K.; NISHIHARA, J.; OZAKI, M.; YUKAWA, S. Coffea increases levels of urinary 8-hidroxydeoxyguanosine in rats. **Toxicology**, Amsterdam, v.183, p.255-263, 2003.
- 143.SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.76, p.270-276, 1998.
- 144.SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: estructura y clasificación: presencia en alimentos y consumo: biodisponibilidad y metabolismo. **Alimentaria**, Madrid, v.1, p.19-27, 2002a.
- 145.SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos: actividad antioxidante. **Alimentaria**, Madrid, v.1, p.29-40, 2002b.
- 146.SÁNCHEZ-MORENO, C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Sci. Technol. Int.**, London, v.8, p.121-137, 2002c.
- 147.SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, p.2073S-2085S, 2000.
- 148.SCALBERT, A.; JOHNSON, I.T.; SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.81, p.215S-217S, 2005.
- 149.SCHMEDES, A.; HOLMER, G. A new tiobarbituric acid (TBA) method for determining free malondialdehyde (MDA) and hydroperoxides selectively as a measure of lipid peroxidation. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.66, n.6, p.813-817, 1989.
- 150.SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P.K.J.P.D. Phenolic antioxidants. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Philadelphia, v.32, p.67-103, 1992.

- 151.SHYU, Y.S.; HWANG, L.S. Antioxidant activity of the crude extract of lignan glycosides from unroasted Burma black sesame meal. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v.35, n.4, p.357-365, 2002.
- 152.SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Quím. Nova**, São Paulo, v.22, n.1, p.94-103, 1999.
- 153.SILVA, E.L.; PISKULAM, M.; YAMAMOTO, N.; MOON, J.H.; TERÃO, J. Inhibitory effect of quercitin metabolites on rat plasm lipid peroxidation. In: MEETING OF SOUTH AMERICAN GROUP FOR FREE RADICAL RESEARCH, 1, Florianópolis, 1999. **Abstracts**. Florianópolis: CCB/UFRSC, 1999. p.155.
- 154.SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M.J. Compuestos polifenólicos de la harina de girasol: implicaciones tecnologicas y nutricionales. **Alimentaria**, Madrid, v.97, p.89-94, 1989.
- 155.SIRIWARDHANA, S.S.K.W.; SHAHIDI, F. Antiradical activity of extracts of almond and its by-products. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.79, n.9, p.903-908, 2002.
- 156.SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.15, n.1, p.71-81, 2002.
- 157.STAFFORD, H.A. Enzymic regulation of procyanidin biosynthesis, lack of a flav-3-en-3-ol intermediate. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.22, p.2643-2643, 1983.
- 158.SNYDER, M.T.; BALKE, P.O.; OERTER, K.E.; FRANCALANCIA, N.A.; BULL, A.P.; PASKO, K.A.; ROBBINS, M.E. Lipid peroxidation during muscular exercise in man: inferences from the pulmonary excretion of normal-pentane, isopentane and nitrogen. **Proc. Nutr. Soc.**, Wallingford, v.45, n.2, p.A64, 1986.

- 159.SUJA, K.P.; JAYALEKSHMY, A.; ARUMUGHAN, C. Free radical scavenging behavior of antioxidant compounds of sesame (*Sesame indicum* L.) in DPPH center dot system. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.52, n.4, p.912-915, 2004.
- 160.SUJA, K.P.; JAYALEKSHMY, A.; ARUMUGHAN, C. Antioxidant activity of sesame cake extract. **Food Chem.**, Amsterdam, v.91, n.2, p.213-219, 2005.
- 161.SWAIN, T.; HILLIS, W.E. The phenolic constituents of *Punnus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.10, p.63-68, 1959.
- 162.THAGARAJAN, G.; CHANDANI, S.; SUNDARI, C.S.; RAO, S.H.; KULKARNI, A.V.; BALASUBRAMANIAN, P. Antioxidant properties of green and black tea , and their potential ability to retard the progression of eye lens cataract. **Exp. Eye Res.**, Sidcup, v.73, p.393-401, 2001.
- 163.TIWARI, A.K. Antioxidants: new-generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders. **Curr. Sci.**, Bangalore, v.86, n.8, p.1092-1102, 2004.
- 164.TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; ESPÍN, J.C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.81, p.853-876, 2001.
- 165.UNGARO, M.R.G. **Cultura do girassol**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2000. 36p. (Boletim Técnico, v.188).
- 166.VALKONEN, M.; KUUSI, T. Spectrophotometric assay for total peroxil radical-trapping antioxidant potencial in human serum. **J. Lipid Res.**, Birmingham, v.38, p.823-833, 1997.
- 167.VAN DEN BERG, R.; HAENEN, G.R.M.M.; VAN DEN BERG, H.; BAST, A. Applicability of an improved TROLOX equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chem.**, Amsterdam, v.66, n.4, p.511-517, 1999.

- 168.VASCONCELOS, A.P.; MANOLLI, L.P.; SILVEIRA, P.P.; GAMARO, G.D.; TORRES, I.L.S.; DALMAZ, C. Effect of two different models of chronic stress on oxidative stress in cerebral cortex and hippocampus of rats. In: MEETING OF SOUTH AMERICAN GROUP FOR FREE RADICAL RESEARCH, 1, Florianópolis, 1999. **Abstract**, Florianópolis: CCB/UFSC, 1999. p.69.
- 169.VICKERY, M.L.; VICKERY, B. **Secondary plant metabolism**. London: MacMillan, 1981. 335p.
- 170.WAYNER, D.D.M.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.U.; LOCKE, S. Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.187, p.33-37, 1985.
- 171.WETTASHINGHE, M.; SHAHIDI, F. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds. **Food Chem.**, Amsterdam, v.67, n.4, p.399-414, 1999.
- 172.WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.81, p.243S-255S, 2005.
- 173.WINTERBOURN, C.C.; GUTTERIDGE, J.M.; HALLIWELL, B. Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O₂. **J. Free Radical Biol. Med.**, Elmsford, v.1, n.1, p.43-49, 1985.
- 174.YANG, C.S.; LANDAU, J.M.; HUANG, M.T.; NEWMARK, H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annu. Rev. Nutr.**, Palo Alto, v.21, p.381-406, 2001.
- 175.YANISHLIEVA, N.V.I.; MARINOVA, E.M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food Chem.**, Amsterdam, v.54, n.4, p.377-382, 1995.

176. YOUNG, I.S. Measurement of total antioxidant capacity. **J. Clin. Pathol.**, London, v.54, n.5, p.339, 2001.
177. YUKAWA, G.S.; MUNE, M.; OTANI, H.; E, Y.; LIANG, X. M.; IWAHASHI, H.; SAKAMOTO, W. Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low-density lipoproteins and serum lipid levels in humans. **Biochemistry**, Moscow, vol. 69, n. 1, p. 70-74, 2004.
178. XU, J.; CHEN, S.B.; HU, Q.H. Antioxidant activity of brown pigment and extracts from black sesame seed (*Sesamum indicum* L.). **Food Chem.**, Amsterdam, v.91, n.1, p.79-83, 2005.
179. ZHANG, L.Y.; COSMA, G.; GARDNER, H.; VALLYATHAN, V.; CASTRANOVA, V. Effect of chlorogenic acid on hydroxyl radical. **Mol. Cell. Biochem.**, Dordrecht, v.247, n.1/2, p.205-210, 2003.

8. ANEXOS

ANEXO 1. Cromatograma dos ácidos graxos da fração lipídica da semente de girassol (*Helianthus annuus* L.) rajada identificados pelo tempo de retenção

- 1) C 14:0; 2) C 16:0; 3) C 16:1; 4) C 17:0; 5) C 18:0; 6) C 18:1; 7) C 18:2; 8) C 18:3; 9) C 20:0;
10) C 20:1; 11) C 22:0; 12) C 22:1; 13) C 24:0

ANEXO 2. Cromatograma dos compostos fenólicos presentes no extrato aquoso da semente de girassol rajada

1. Ácido *p*-hidroxibenzóico (T=8.401);
2. Ácido quínico (T=13.655);
3. Ácido caféico (T=18.630);
4. Ácido clorogénico (T=34.774)

ANEXO 3. Cromatograma dos ácidos graxos do tecido adiposo dos animais do grupo controle , que receberam extrato aquoso durante 29 dias.

1) C 12:0; 2) C 14:0; 3) C 15:0; 4) C 16:0; 5) C 16:1; 6) C 17:0; 7) C 18:0; 8) C 18:1; 9) C 18:2
10) C 18:3; 11) C 20:1; 12) C 20:2; 13) C 20:3 n-6; 14) C 20:4; 15) C 22:6

ANEXO 4. Cromatograma dos ácidos graxos do tecido adiposo dos animais do grupo experimental G1 , que receberam extrato aquoso durante 29 dias.

1) C 12:0; 2) C 14:0; 3) C 15:0; 4) C 16:0; 5) C 16:1; 6) C 17:0; 7) C 18:0; 8) C 18:1; 9) C 18:2 10) C 18:3; 11) C 20:1; 12) C 20:2; 13) C 20:3 n-6; 14) C 20:4; 15) C 22:6

ANEXO 5. Cromatograma dos ácidos graxos do tecido adiposo dos animais do grupo experimental G2 , que receberam extrato aquoso durante 29 dias.

1) C 12:0; 2) C 14:0; 3) C 15:0; 4) C 16:0; 5) C 16:1; 6) C 17:0; 7) C 18:0; 8) C 18:1; 9) C 18:2
10) C 18:3; 11) C 20:1; 12) C 20:2; 13) C 20:3 n-6; 14) C 20:4; 15) C 22:6

ANEXO 6. Cromatograma dos ácidos graxos do tecido cerebral dos animais do grupo controle, que receberam extrato aquoso durante 29 dias.

- 1) C 16:0; 2) C 16:1; 3) C 18:0; 4) C 18:1; 5) C 18:2; 6) C 20:0; 7) C 20:1; 8) C 20:2; 9) C 20:3 n-6
10) C 20:4; 11) C 22:0; 12) C 24:0; 13) C 22:6

ANEXO 7. Cromatograma dos ácidos graxos do tecido cerebral dos animais do grupo experimental G1 , que receberam extrato aquoso durante 29 dias.

1) C 16:0; 2) C 16:1; 3) C 18:0; 4) C 18:1; 5) C 18:2; 6) C 20:0; 7) C 20:1; 8) C 20:2; 9) C 20:3 n-6
10) C 20:4; 11) C 22:0; 12) C 22:1 13) C 24:0; 14) C 22:6

ANEXO 8. Cromatograma dos ácidos graxos do tecido cerebral dos animais do grupo experimental G2 , que receberam extrato aquoso durante 29 dias.

- 1) C 16:0; 2) C 16:1; 3) C 18:0; 4) C 18:1; 5) C 18:2; 6) C 20:0; 7) C 20:1; 8) C 20:2; 9) C 20:3 n-6
10) C 20:4; 11) C 22:0; 12) C 22:1 13) C 24:0; 14) C 22:6

ANEXO 9. Cromatograma dos ácidos graxos do tecido hepático dos animais do grupo

controle , que receberam extrato aquoso durante 29 dias.

- 1) C 14:0; 2) C 15:0; 3) C 16:0; 4) C 16:1; 5) C 17:0; 6) C 18:0; 7) C 18:1; 8) C 18:2; 9) C 18:3
 10) C 18:3; 11) C 20:1 12) C 20:2 13) C 20:3 n-6 14) C 20:4; 15) C 20:5; 16) C 22:6

ANEXO 10. Cromatograma dos ácidos graxos do tecido hepático dos animais do grupo experimental G1, que receberam extrato aquoso durante 29 dias.

- 1) C 14:0; 2) C 15:0; 3) C 16:0; 4) C 16:1; 5) C 17:0; 6) C 18:0; 7) C 18:1; 8) C 18:2; 9) C 18:3
 10) C 18:3; 11) C 20:1 12) C 20:2 13) C 20:3 n-6 14) C 20:4; 15) C 20:5; 16) C 22:6

ANEXO 11. Cromatograma dos ácidos graxos do tecido hepático dos animais do grupo experimental G2, que receberam extrato aquoso durante 29 dias.

1) C 14:0; 2) C 15:0; 3) C 16:0; 4) C 16:1; 5) C 17:0; 6) C 18:0; 7) C 18:1; 8) C 18:2; 9) C 18:3 y 10) C 18:3; 11) C 20:1 12) C 20:2 13) C 20:3 n-6 14) C 20:4; 15) C 20:5; 16) C 22:6

ANEXO 12. Cromatograma dos ácidos graxos do plasma dos animais do grupo

controle, que receberam extrato aquoso durante 29 dias.

- 1) C 14:0; 2) C 15:0; 3) C 16:0; 4) C 16:1; 5) C 17:0; 6) C 18:0; 7) C 18:1; 8) C 18:2; 9) C 18:3
10) C 20:0; 11) C 20:4 12) C 22:0 13) C 24:0

ANEXO 13. Cromatograma dos ácidos graxos do plasma dos animais do grupo experimental G1, que receberam extrato aquoso durante 29 dias.

1) C 14:0; 2) C 15:0; 3) C 16:0; 4) C 16:1; 5) C 17:0; 6) C 18:0; 7) C 18:1; 8) C 18:2; 9) C 18:3
10) C 20:4; 11) C 24:0

ANEXO 14. Cromatograma dos ácidos graxos do plasma dos animais do grupo experimental G2, que receberam extrato aquoso durante 29 dias.

1) C 14:0; 2) C 15:0; 3) C 16:0; 4) C 16:1; 5) C 17:0; 6) C 18:0; 7) C 18:1; 8) C 18:2; 9) C 18:3
10) C 20:0; 11) C 20:2 12) C 20:4 13) 22:6 14) C 24:0

ANEXO OBRIGATÓRIO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comissão de Ética em Experimentação Animal

Of. CEEA nº 28

CERTIFICADO

*Certificamos que o Projeto “Identificação, quantificação e avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos da semente de girassol (*Helianthus annuus*, L.)” (Protocolo nº23), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). **Maria de Lourdes Reis Giada** e do orientador(a) **Jorge Mancini Filho**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 06/10/2003.*

São Paulo, 07 de outubro de 2003.

Elfriede Bacchi

Prof. Assoc. Elfriede Marianne Bacchi
Coordenadora da CEEA