



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA –
UESB
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, BIOQUÍMICA E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM
GENÓTIPOS DE URUCUEIROS (*Bixa orellana* L.)**

ALANA ROCHA LEMOS

ITAPETINGA - BAHIA

2008

ALANA ROCHA LEMOS

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, BIOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM GENÓTIPOS DE URUCUEIROS (*Bixa
orellana* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração em Engenharia de Processos de Alimentos, para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: *DSc.* Marcondes Viana da Silva

Co-Orientador: *DSc.* Abel Rebouças São José

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL

2008

633.86 L871a	<p>Lemos, Alana Rocha.</p> <p>Atividade antioxidante em genótipos de urucueiros (<i>Bixa orellana</i> L.) / Alana Rocha Lemos. – Itapetinga: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2008. 65p. il.</p> <p>Dissertação do Programa de Pós-Graduação “<i>Stricto Sensu</i>” do Curso de Mestrado em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação do Prof. DSc. Marcondes Viana da Silva e co-orientação do Prof. DSc. Abel Rebouças São José.</p> <p>1. Urucum – Atividade antioxidante. 2. Urucum – Compostos Fenólicos. 3. Sistema Modelo β-caroteno/ácido linoléico – Atividade antioxidante. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. II. Silva, Marcondes Viana da. III. São José, Abel Rebouças. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD(21): 633.86</p>
-----------------	---

Catalogação na Fonte:

Cláudia Aparecida de Souza – CRB 1014-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por assunto:

1. Urucum – Atividade antioxidante
2. Urucum – Compostos fenólicos
3. Urucum – Taninos condensados
4. Sistema Modelo β -caroteno/ácido linoléico – Atividade antioxidante
5. Antioxidantes Naturais
6. Extração Sólido/Líquido




DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

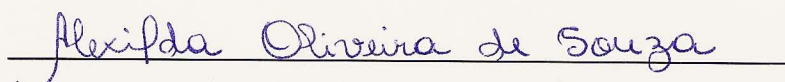
Título: "CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, BIOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM GENÓTIPOS DE URUCUEIROS (*Bixa Orellana*, L.)".

Autor (a): ALANA ROCHA LEMOS

Orientador (a): Prof. Dr. Marcondes Viana da Silva

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE PROCESSOS DE ALIMENTOS, pela Banca Examinadora.


Prof. Marcondes Viana da Silva, DSc., UESB


Prof.^a. Alexilda Oliveira de Souza, DSc., UESB


Prof.^a. Luzimar Gonzaga Fernandez, DSc., UFBA

Data da Realização: 25 de agosto de 2008.

Ao Prof. *DSc.* Marcondes Viana da Silva, pela vontade em transmitir conhecimentos, compreensão, paciência e valiosa amizade demonstrada em todas as etapas desse trabalho.

OFEREÇO

À Deus, Inteligência Suprema e
Causa Primária de todas as coisas.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte do verdadeiro amor.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Professor Marcondes Viana da Silva, pela brilhante orientação, competência e educação, auxílio em solucionar os imprevistos. Enfim, por todo cuidado e amizade dispensados nesse período, fica registrado a minha eterna gratidão.

Ao Professor Abel Rebouças São José, pelos conhecimentos transmitidos no decorrer do curso.

À Coordenação do Colegiado do Mestrado em Engenharia de Alimentos, na pessoa do Professor Modesto Antonio Chaves sempre buscando o melhor.

Às Secretárias da Pós-Graduação Bárbara Rita e Viviane, sempre dispostas em resolver nossos problemas.

À Banca Examinadora, Professoras Alexilda Oliveira de Sousa e Luzimar Gonzaga Fernandez, por ter aceitado o convite em contribuir com esse trabalho.

Aos Professores Mara Albuquerque e Aureliano Vieira Pires, por terem concedido as instalações do Laboratório de Fisiologia Animal e Lab. de Forragem e Pastagens, respectivamente, para condução parcial do experimento.

Aos Professores Renata Bonomo e Rafael Fontan, coordenadores do Laboratório de Engenharia de Processos, pela boa vontade em ceder alguns materiais necessários ao longo do trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Alimentos, por serem parte fundamental na aquisição de conhecimentos indispensáveis para a minha formação profissional.

Aos colegas de laboratório Monalisa Dutra e Newton Júnior, pela ajuda fundamental nas análises, sem ajuda de vocês, o trabalho teria sido ainda mais árduo.

À todos os colegas da turma (Michelle, Eron, Gabi, Tati, Ingrid, Candinha, Rafael, Alex, Dani e Lidi) pelo apoio e por tornarem prazerosa a convivência durante o curso.

Um agradecimento especial à colega Andréia Alves de Paula, pela amizade espontânea e sincera, pelas discussões acerca das metodologias em comum ao nosso trabalho, parceira nos imprevistos no decorrer do experimento e tantas dificuldades enfrentadas, que só serviram para o nosso amadurecimento; a sua presença ajudou a tornar mais agradável este desafio.

Ao Professor Paulo Bonomo, Tia Calila e Ellen Godinho, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos vigilantes e porteiros da UESB, pelo cuidado e proteção transmitidos especialmente nas madrugadas que passamos realizando o experimento.

À todos os funcionários da Biblioteca do Campus de Itapetinga, em especial Rogério, Dadá e Kaka pela torcida, bem como auxílio na confecção da ficha catalográfica e revisão das referências bibliográficas.

Aos meus pais e irmãos, pelo amor dedicado e por acreditarem no meu potencial.

A todos os meus amigos, especialmente à família “Centro Espírita Servos do Senhor”, que de uma forma ou de outra, contribuiu para realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

LEMOS, A. R. **Caracterização Físico-Química, Bioquímica e Avaliação da Atividade Antioxidante em Genótipos de Urucueiros (*Bixa Orellana* L.)**. Itapetinga – BA: UESB, 2008. 65p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia de Alimentos – Engenharia de Processos de Alimentos).*

O presente foi conduzido nos Laboratórios de Química Analítica e Bioquímica, Fisiologia Animal e Nutrição Animal da UESB, Campus de Itapetinga e objetivou estabelecer a caracterização físico-química e bioquímica em cinco genótipos de *Bixa orellana*, (*Piave vermelha*, *Piave vermelha gigante*, *CPATU 0060*, *Bico de Pato I* e *Peruana Paulista*), bem como determinar a medida da atividade antioxidante (AA) *in vitro* dos extratos etanólicos PA e hidroetanólicos (80:20, v.v⁻¹) etanol:água. Foi determinada a composição centesimal das amostras, incluindo as determinações de umidade, extrato etéreo, carboidratos totais, proteína bruta, cinzas e fibra bruta. Os extratos obtidos a partir dos solventes extratores foram determinados os fenóis totais (FT) utilizando o método de *Folin-Ciocalteu* e a medida da AA empregando o sistema β -caroteno/ácido linoléico. Os resultados obtidos foram comparados com dois antioxidantes sintéticos, butil-hidroxitolueno (BHT) e ácido gálico. Como aporte à quantificação dos FT foi determinado os teores de antocianinas totais, flavonóis totais, taninos condensados (método da vanilina e método do butanol ácido), onde os resultados obtidos variaram respectivamente entre 0,1069 e 0,3819 $\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$; 1,53 à 3,44 $\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$, 227,70 à 481,58 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ e 176,63 à 232,58 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$. Os teores de carotenóides totais variaram entre 3,40 a 12,60 mg g^{-1} . Os teores de FT dos genótipos analisados apresentaram valores médios de 776,02 a 1498,48 $\text{mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$ de amostra e 297,08 à 450,97 $\text{mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$ (peso seco) para os extratos hidroetanólicos e etanólicos, respectivamente. A medida da AA para os extratos hidroetanólicos variou entre 48,31 % e 70,10 %. Valores inferiores foram obtidos para AA dos extratos etanólicos (18,91 % a 35,26 %). Foi observado correlação linear entre o conteúdo de FT e AA para extratos hidroetanólicos ($R = 0,8908$) e extratos etanólicos ($R = 0,8690$). Os resultados revelaram que o genótipo CPATU 0060 apresentou teores expressivos de FT favorecendo à destacada AA. Considerando a ampla aplicação do urucum na indústria de alimentos e farmacêutica, os resultados obtidos sugerem que os grãos desse genótipo possam ser considerados como uma fonte potencial de antioxidante natural, devendo o seu consumo ser estimulado.

Palavras-chave: atividade antioxidante, compostos fenólicos, sistema modelo β -caroteno/ácido linoléico, antioxidantes naturais, extração sólido-líquido.

Orientador: Marcondes Viana da Silva, DSc., UESB e Co-orientador: Abel Rebouças São José, DSc., UESB

ABSTRACT

LEMOS, A. R. **Antioxidant Activity in Genotypes of Urucueiros (*Bixa Orellana* L.)**. Itapetinga – BA: UESB, 2008. 65p. (Dissertation – Master Degree in Food Engineering – Food Process Engineering).*

The aim of this study was conducted in the laboratories of Analytical Chemistry and Biochemistry, Animal Physiology and Animal Nutrition of UESB, Campus Itapetinga to establish the physical-chemistry and biochemical characterization of five genotypes of *Bixa orellana*, (*Piave vermelha*, *Piave vermelha gigante*, *CPATU 0060*, *Bico de Pato I*, and *Peruana Paulista*), as well as to determine the measurement of the antioxidant activity (AA) *in vitro* of the ethanolics PA and hydroethanolics (80:20, v.v¹) ethanol-water extracts. The centesimal composition of the samples was determined, including moisture determinations, ethereal extract, total carbohydrates, crude protein, ashes and crude fiber. The total phenols were determined from the extracts obtained using the *Folin-Ciocalteu* (FT) method, and the antioxidant activity (AA) using the system β -carotene/linoleic acid method. The results obtained were compared with two synthetic antioxidants, butyl-hidroxitolueno (BHT) and gallic acid. As a contribution to the quantification of FT, the amounts of total anthocyanins, total flavonoids, and condensed tannins (vanillin method and butanol acid method) were established. The results obtained varied respectively between 0.1069 and 0.3819 $\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$; 1.53 to 3.44 $\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$, 227.70 to 481.58 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$, and 176.63 to 232.58 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$. The amounts of total carotenoids varied among 3.40 to 12.60 mg g^{-1} . The amount of FT of the analyzed genotypes presented medium values from 776.02 to 1498.48 $\text{mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$ in the sample and 297.08 to 450.97 $\text{mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$ (dry weight) for the extracts hydroethanolics and ethanolics, respectively. The measure of AA for the extracts hydroethanolics varied between 48.31% and 70.10%. Lower values were obtained for AA from the extracts ethanolics (18.91 % to 35.26%). Lineal correlation was observed between the amount of FT and AA for hydroethanolic extracts ($R = 0.8908$) and ethanolic extracts ($R = 0.8690$). The results revealed that the genotype CPATU 0060 presented expressive amount of FT favoring outstanding AA. Considering the wide application of the urucum by food and pharmaceutical industries, the obtained results suggest that the grains of that genotype can be considered as a potential source of natural antioxidant, and therefore its consumption should be stimulated.

Key-words: phenolics compounds, antioxidant activity, system model β -caroteno/linoleic acid natural antioxidants.

*Advisor: Marcondes Viana da Silva, *DSc.*, UESB e Co-advisor: Abel Rebouças São José, *DSc.*, UESB

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Mecanismo Simplificado da Autoxidação Lipídica	15
Figura 2.	Distribuição Eletrônica nos Orbitais Moleculares (π^*) do Oxigênio no Estado Fundamental Triplete e no Estado Excitado Singlete	16
Figura 3.	Esquema Simplificado da Oxidação Lipídica por Fotoxidação	16
Figura 4.	Detoxificação Enzimática realizada por Sod, Cat e GPx	18
Figura 5.	Estruturas Químicas dos Ácidos Gálico (I) e Elágico (II) de Ocorrência Natural em Vegetais	22
Figura 6.	Estrutura Química Básica Representativa para o Ácido Coumárico e para o Ácido Caféico	22
Figura 7.	Estrutura Química Básica Representativa dos Flavonóides e Isoflavonas	23
Figura 8.	Estrutura Básica de uma Molécula de Antocianina	24
Figura 9.	Estrutura Básica de um Flavonol	24
Figura 10.	Estrutura dos Taninos Condensados (Proantocianidina)	25
Figura 11.	Estrutura de um Tanino Hidrolisável	26
Figura 12.	Rota Biossintética Simplificada de Compostos Fenólicos	28
Figura 13.	Gráfico Representativo da Curva Oxidativa obtida no Sistema Modelo β -caroteno/ácido linoléico dos Extratos Etanólicos de Urucum	49
Figura 14.	Gráfico Representativo da Curva Oxidativa obtida no Sistema Modelo β -caroteno/ácido linoléico dos Extratos Hidroetanólicos de Urucum	50
Figura 15.	Correlação entre os Teores de Fenólicos Totais e a Medida da Atividade Antioxidante dos Extratos Hidroetanólicos	50
Figura 16.	Correlação entre os Teores de Fenólicos Totais e a Medida da Atividade Antioxidante dos Extratos Etanólicos	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Classificação dos Compostos Fenólicos de acordo com a Cadeia Principal	21
Tabela 2.	Classificação dos Compostos Fenólicos de acordo com a Massa Molar	21
Tabela 3.	Composição Centesimal dos Genótipos de Urucueiros	41
Tabela 4.	Teor de Carotenóides Totais	42
Tabela 5.	Teores de Antocianinas Totais e Flavonóis Totais em Urucum	43
Tabela 6.	Teores de Taninos Condensados pelo Método da Vanilina e pelo Método do Butanol Ácido em Sementes de Urucum	44
Tabela 7.	Teores de Fenóis Totais nos Extratos Etanólicos e Hidroetanólicos de Urucum	46
Tabela 8.	Percentual de Inibição Oxidativa do β -caroteno dos Extratos Etanólicos de Urucueiros	47
Tabela 9.	Percentual de Inibição Oxidativa do β -caroteno dos Antioxidantes Sintéticos	48

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butil hidroxi tolueno
Cat	Catalase
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DPPH	2,2 difenil-1-picril-hidrazil
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GAE	Equivalente em Ácido Gálico
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GST	Glutathione S-transferase
FT	Fenóis Totais
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
IA	Indústria de Alimentos
IAL	Instituto Adolfo Lutz
ITAL	Instituto de Tecnologia em Alimentos
OMS	Organização Mundial de Saúde
O ₂	Oxigênio Molecular
¹ O ₂	Oxigênio Singlete
PA	Pureza Analítica
RFC	Reagente de <i>Folin-Ciocateau</i>
RL	Radical Livre
SAEG	Sistema para Análises Estatísticas e Genética
SOD	Superóxido Dismutase
TBHQ	Butil Hidroquinona Terciária
TEAC	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

SUMÁRIO

Introdução	09
1. Revisão Bibliográfica	12
1.1. Urucum	12
1.2. Oxidação Lipídica	14
1.2.1. Efeitos Oxidativos do Metabolismo Celular	16
1.2.2. Antioxidantes	18
1.3. Compostos Bioativos	19
1.3.1. A Multifuncionalidade dos Compostos Fenólicos	20
1.3.1.1. Dieta e Biodisponibilidade	26
1.3.1.1. Biossíntese dos Compostos Fenólicos	28
1.4. Substituição dos Antioxidantes Sintéticos pelos Antioxidantes Naturais	29
1.5. Métodos de Extração e Quantificação de Polifenóis	30
1.6. Métodos de Quantificação da Atividade Antioxidante	32
2. Objetivos	34
2.1. Objetivo Geral	34
2.2. Objetivos Específicos	34
3. Material e Métodos	35
3.1. Preparo da Matéria-Prima	35
3.2. Determinações Físico-Químicas	35
3.3. Determinações Bioquímicas	36
3.3.1. Determinação de Carotenóides Totais	36
3.3.2. Determinação de Antocianinas e Flavonóis Totais	37
3.3.3. Determinação de Protoantocianidinas (Taninos Condensados)	37
3.3.3.1. Método da Vanilina	37
3.3.3.2. Método do Butanol Ácido	38
3.4. Obtenção dos Extratos	38
3.4.1. Determinação Espectrofotométrica de Compostos Fenólicos Totais	39
3.4.2. Determinação da Atividade Antioxidante dos Compostos Fenólicos	39
3.5. Análises Estatísticas	40
4. Resultados e Discussão	42
4.1. Determinação Físico-química das Matérias-primas	42
4.2. Determinação de Carotenóides Totais	43
4.3. Determinação de Antocianinas e Flavonóis Totais	44
4.4. Determinação de Taninos Condensados	45
4.5. Determinação de Fenóis Totais	46
4.6. Determinação da Atividade Antioxidante	48
5. Conclusões	53
6. Perspectivas	54
Referências	55

INTRODUÇÃO

A *Bixa orellana* L. (urucum) é uma importante fonte de matéria-prima empregada na indústria brasileira de alimentos, especialmente na produção de embutidos, massas, queijos, sorvetes e confeitarias, dentre outras, correspondendo a aproximadamente 90 % do mercado de corantes. Em nível mundial, representa cerca de 70 % do mercado de corantes naturais empregados na indústria de alimentos (IA). Apesar da sua utilização há muitos séculos como corante pelos índios, seu uso comercial é algo recente e vem aumentando cada vez mais em função das exigências do mercado por produtos mais “saudáveis” uma vez que a legislação proíbe o uso de determinados corantes artificiais em alimentos e cosméticos (SÃO JOSÉ, 2006).

O Brasil é o maior produtor mundial de urucum e seus corantes nas formas lipossolúveis/ hidrossolúveis podem chegar a substituir totalmente o beta caroteno sintético na indústria de massas e na aplicação em margarinas, gerando uma maior necessidade de sementes de qualidade. A tendência do mercado relativo aos produtos do urucum para o ano de 2008 aponta uma expectativa de intensa procura por parte das empresas processadoras, em contrapartida, uma melhor oferta de sementes em todas as regiões produtoras do país (CRISTIAN HANSEN, 2007).

Segundo BOBBIO e BOBBIO (2001), a exploração de corantes provenientes de fontes naturais assume destaque na IA porque a cor desperta o interesse do consumidor, desempenhando papel mercadológico. A manutenção da cor natural em alimentos pode ser fortemente influenciada pelo processamento, resultando freqüentemente na degradação de pigmentos, exigindo a adição de corantes naturais ou artificiais. Os extratos de urucum, além de proporcionarem cor, um dos mais importantes atributos na aceitação e escolha de um produto alimentício, podem apresentar propriedades antioxidantes benéficas à saúde humana.

Os alimentos sofrem inúmeras mudanças durante o processamento, embalagem e distribuição. A lipoperoxidação é uma das maiores causas de danos químicos, resultando em rancificação e deterioração da qualidade nutricional, mudança nos padrões de qualidade como estabilidade da cor, odor, sabor (*off-flavour*) e textura, sendo reconhecida como um dos principais fatores limitantes da vida útil dos produtos alimentícios e levando a formação de compostos potencialmente tóxicos ao ser humano (GRAY, 1996).

O emprego de agentes antioxidantes visando prevenir a deterioração oxidativa de produtos alimentícios é um procedimento rotineiro na tecnologia de alimentos. A Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº. 23, de 15 de fevereiro de 2005, relaciona

um total de onze aditivos permitidos, utilizados em alimentos gordurosos, classificados como antioxidantes (ANVISA, 2006).

São vários os antioxidantes sintéticos utilizados na IA, a exemplo do butil hidroxil tolueno (BHT), propil galato (PG) e butilhidroquinona (TBHQ), com o objetivo de estender a vida útil do produto final e minimizar perdas nutricionais através da inibição da oxidação do substrato. Não obstante, inúmeras são as preocupações quanto ao potencial tóxico e mutagênico destas substâncias (NAMIKI, 1990). A partir da década de 80, as pesquisas com antioxidantes naturais vem sendo amplamente divulgadas buscando seu emprego em produtos alimentícios e de uso farmacêutico, tendo como alvo a substituição de antioxidantes sintéticos, os quais têm uso limitado, considerando o potencial carcinogênico, dentre outras patologias (ZHENG e WANG, 2001; MELO e GUERRA, 2002). Assim sendo, é crescente a investigação de fitomoléculas antioxidantes de fontes naturais, quer isoladas ou associadas a outros antioxidantes conferindo efeito sinérgico, de modo a inibir ou retardar a lipoperoxidação em alimentos (SHAHIDI *et al.*, 2007).

Os compostos fenólicos de fontes vegetais têm sido amplamente pesquisados como fonte de antioxidantes naturais. Estão presentes em várias partes da planta: frutos, folhas, sementes e raízes (RICE-EWANS, MILLER e PAGANGA, 1997). Os fitoquímicos antioxidantes mais abundantes incluem os flavonóides (NIJVELDT, 2001), tocoferóis, derivados do ácido cinâmico e ácidos orgânicos polifuncionais (MOREIRA e MANCINI FILHO, 2003).

Os processos de separação e isolamento dos compostos fenólicos de suas matrizes são muito complexos, razão pela quais muitos destes não são produzidos em grande escala (CHIANG *et al.*, 2001; MURGA *et al.*, 2002). Vários são os trabalhos buscando melhor método de extração e solvente utilizado para se quantificar os compostos fenólicos, bem como tecnologia para se verificar a capacidade antioxidante dessas substâncias. A literatura diverge quanto ao melhor solvente empregado para extração, utilizando métodos convencionais como *Soxhlet* (NGUYENLE *et al.*, 1995), ultra-som, agitação mecânica com barra magnética (WANG e MURPHY, 1994) e extração supercrítica (ARAUJO, 2007). A solução metanólica (80 %, v.v⁻¹) apresenta-se como o melhor solvente para extração destas fitomoléculas (SETCHELL *et al.*, 1987; BARNES *et al.*, 1994).

Segundo FRANCO (2007), em 2006 o Brasil produziu cerca de 13000 t/ano de sementes de urucum e deste montante, o Nordeste contribuiu com 47,88 % dessa produção (6.225 t). Considerando ampla aplicação do urucum na IA, numerosas evidências sobre as destacadas atividades biológicas dos compostos fenólicos, bem como a escassez de estudos relativos aos fenólicos nos grãos desta especiaria com

potencial antioxidante na peroxidação lipídica, o presente estudo teve como objetivo caracterizar física e bioquimicamente os cinco genótipos de *Bixa orellana* (*Piave vermelha*, *Piave vermelha gigante*, *CPATU 0060*, *Bico de Pato I* e *Peruana Paulista*) e avaliar a atividade antioxidante dos seus extratos obtidos a partir dos solventes: etanol PA (pureza analítica) e solução hidroetanólica (80:20, v.v⁻¹) etanol:água utilizando o sistema β -caroteno/ácido linoléico.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. URUCUM (*Bixa orellana* L.)

O urucum é o fruto do urucuzeiro, árvore da família Bixáceas (*Bixa orellana*), nativa da América tropical, encontrada no ecossistema florestal do trópico úmido brasileiro. É uma planta de desenvolvimento rápido, que chega a atingir 6 metros de altura, com um potencial de produção de 40 a 50 anos.

Segundo COSTA (2007), o cultivo desta espécie têm se estendido bastante para as áreas tropicais, uma vez que é pouco exigente quanto ao tipo de solo. As necessidades atuais da indústria brasileira revelam que o Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de urucum, cujo volume atual é estimado em 9.000 toneladas anuais (CRISTIAN HANSEN, 2007). No estado da Bahia, a área plantada e a produção de urucum em 2006 foram de 1500 hectares e 1800 t, respectivamente (FRANCO, 2007).

No mercado brasileiro de sementes de *B. orellana*, cerca de 60 % são canalizadas à produção de colorífico, 25 % para exportação *in natura* e 15 % para fabricação de corantes. Segundo CARVALHO (1999), no ano de 1999 o Brasil forneceu cerca de 40 % da produção mundial de sementes, exportando principalmente para Estados Unidos, Inglaterra, França e Japão.

A *Bixa orellana* L. apresenta uma grande variabilidade, desde árvores com caules verdes, flores brancas e frutos amarelos ou verdes, até árvores com caules vermelhos, flores rosas e frutos de cor púrpura. Levando em consideração essas características, as variedades são agrupadas conforme a forma e cor dos frutos, a quantidade de cerdas e o conteúdo de bixina. Dessa forma, existem variedades com frutos esféricos, frutos amarelos, alaranjados, verdes, com muitos pêlos ou glabras (SOLARZANO, 1991).

Dentre os diversos genótipos conhecidos, a variedade *Bico de pato* foi a primeira a ser introduzida na Bahia e a *Peruana paulista*, desenvolvida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) é a mais produzida no Brasil, apresentando a maior quantidade de bixina (FRANCO, 2002). O genótipo *Piave* é reconhecida como a de melhor atributo função da produção de corante e rendimento, sendo a mais usada pelas indústrias de corantes líquidos.

Segundo OLIVEIRA (2005), de acordo com as sementes, apresenta: 40 a 45 % de celulose; 3,5 a 5,5 % de açúcares; 0,3 % a 0,9 % de óleo essencial; 3 % de óleo fixo; 1,0 % a 4,5 % de pigmento; 13 % a 16 % de proteína como também alfa e beta caroteno além de taninos e saponinas. Apresenta ainda 17,5 % de lipídeos na forma de

ácido linolênico, α linoléico e oléico. Possui ainda 10,6 % de aminoácidos, seis dos oito aminoácidos essenciais contemplados no padrão recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). As cinzas (5,4 %) apresentaram alto conteúdo de fósforo, ferro e zinco, com reduzido teor de cálcio. Além da bixina e norbixina, outros carotenos são encontrados em menores quantidades no arilo da semente do urucum, estando isobixina, beta caroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina e a orellina, dentre outros (OLIVEIRA, 2005).

HABORNE 1994 relatou o isolamento dos flavonóides 7-glicosil-apigenina, 7-bissulfato-apigenina, 7-glicosil luteolina, 7-bissulfato luteolina em sementes de urucum. Ensaio com flavonóides têm sido realizados demonstrando diversas atividades biológicas e influência entre o consumo de alimentos ricos em flavonóides e doenças cardíacas (LESLIE et al., 1989; SAMMAN et al., 1998). Pesquisas têm sido feitas empregando extratos de plantas contendo flavonóides e utilizando modelos em animais que foram induzidas doenças vasculares (RAJENDRAN *et al.*, 1997).

Muitas informações referentes à composição química da semente de urucum são encontradas na literatura. Contudo, talvez pelas diferentes procedências das plantas, métodos analíticos empregados, ou ainda devido à própria instabilidade apresentada por alguns de seus componentes, os percentuais variam consideravelmente.

Além da sua utilização como condimento culinário, vulgarmente conhecido como colorau, o urucum é usado na produção de alguns derivados do leite (margarina, manteiga, queijo tipo prato e *light*, sorvete tradicional e *light*), produtos cárneos (salsicha, hambúrguer e salame), produtos de panificação, doces e cereais, dentre outros. Na indústria farmacêutica é utilizado no fabrico de medicamentos antifebris e antigripais, queimadura, clareamento dental, tosse e asma. Nos cosméticos, pode ter aplicação na produção de shampoos, condicionadores, esmaltes, bronzeadores, artigos de maquiagem, tintura para cabelos, perfumes, dentre outros (FRANCO, 2002).

Existem alguns estudos que avaliaram as propriedades antioxidantes da bixina, como seqüestradora de oxigênio singlete (DI MASCIO et al., 1989) enquanto que KIOKIAS e GORDON (2003) relataram o efeito da adição de bixina ou norbixina na oxidação térmica de óleo.

Entretanto, são escassos os trabalhos sobre compostos fenólicos e sua atividade anti-antioxidante em extratos de urucum. SILVA e TAKEMURA (2006), determinaram a medida da atividade antioxidante de alguns extratos hidroetanólicos, dentre eles da *B. orellana*. CARDARELLI e MERCADANTE (2006), determinaram propriedades antioxidantes de extratos de urucum a partir de diferentes solventes.

1.2. OXIDAÇÃO LIPÍDICA

A oxidação lipídica é uma das mais importantes reações químicas responsáveis pela deterioração da qualidade dos alimentos, estando relacionada com o desenvolvimento de sabores e odores indesejáveis, causadas por complexas reações de oxidação, hidrólise, polimerização, pirólise, dentre outras, sofridas pelos ácidos graxos insaturados, resultando na formação de compostos poliméricos potencialmente tóxicos, impróprios para o consumo. Compromete ainda, a biodisponibilidade de vitaminas, proteínas e pigmento, reduzindo o valor nutricional dos alimentos (ADDIS, 1986; TAWFIK e HUYGHEBAERT, 1997).

A maioria dos substratos orgânicos é facilmente susceptível à oxidação pelo oxigênio molecular (O_2). Entretanto, particular atenção tem sido dada aos lipídeos considerando os danos resultantes dos produtos de sua oxidação para as membranas celulares, vitaminas, hormônios, dentre outras, indispensáveis para a homeostase celular (HUANG *et al.*, 2002; GINSBURG *et al.*, 2001).

Os lipídios insaturados são biomoléculas facilmente susceptíveis à formação de radicais livres (RL), neste processo estão envolvidos principalmente derivados de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio, quimicamente são definidas como átomos ou moléculas que contêm um ou mais elétrons não pareados, caracterizando-se por apresentar alta reatividade química. São geradas no corpo humano, por sistemas endógenos expostos a diferentes condições físico-químicas ou estados patológicos, sendo, portanto espécies químicas iniciadoras da peroxidação lipídica (DEVASAGAYAM *et al.*, 2004).

O interesse por RL têm se intensificado nos últimos anos, os quais são apontados como substâncias provocadoras de diversas patologias estando implicado em alterações funcionais dos lipídios, proteínas e DNA (BAGCHI *et al.*, 2000). Deste modo, estudos sobre os sistemas de oxido-redução, envolvendo a peroxidação lipídica, espécies oxidantes, toxinas ambientais, xenobióticos, mediadas por RL e a relação desses sistemas com eventos patológicos pode está envolvido na etiologia de enfermidades, tais como: artrites reumatóide (NARENDHIRAKANNAN *et al.*, 2005), aterosclerose (SPITELLER, 2005), envelhecimento (HARMAN, 1993), isquemia de órgãos (CANNON, 2005), disfunções gastrintestinais (THOMAS e BALASUBRAMANIAN, 2004), carcinogênese (BARTSCH e NAIR, 2004), AIDS (RABAUD *et al.*, 1997), doença de Alzheimer (ZHU, 2004) e mal de Parkinson (BEAL, 2003).

Os mecanismos reacionais da oxidação lipídica dependem de diversos fatores que controlam a estabilidade lipídica, podendo ser influenciados pela estrutura

química do lipídio, o número e a natureza das insaturações, fatores ambientais (exposição à luz, O₂, temperatura), íons metálicos (cobre e ferro), atividade de água, reações ionizantes, presença de enzimas (metaloproteínas e lipoxigenases) e pigmentos (KANNER e ROSENTHAL, 1992; ST ANGELO, 1996). Além disto, a oxidação lipídica também é influenciada pelas condições de processamento, a exemplo de trituração, torrefação, moagem, entre outros, favorecendo a ação enzimática provocada pela ruptura dos compartimentos celulares (HASENHUETTL e WAN, 1992).

KANNER e ROSENTHAL (1992), propuseram o mecanismo da autoxidação lipídica como sendo uma reação em cadeia dos RL, em três estágios, conforme esquema simplificado ilustrado na Figura 1.

INICIAÇÃO	RH	→	R [•] + H [•]
	R [•] + O ₂	→	ROO [•]
PROPAGAÇÃO	ROO [•] + RH	→	ROOH + R [•]
	ROOH	→	RO [•] + OH [•]
TERMINAÇÃO	R [•] + R [•]	→	R - R
	2ROO [•]	→	R ₁ - CO - R ₂ + R ₁ - CHOH - R ₂ + O ₂

Figura 1. Mecanismo Simplificado da Autoxidação Lipídica. Sendo: RH = ácido graxo insaturado; R[•] = radical livre; ROO[•] = radical peróxil e ROOH = hidroperóxido.

A abstração do átomo de hidrogênio do grupo metilênico do ácido graxo insaturado pelo O₂ na presença de catalisadores, caracteriza a reação de iniciação com a formação progressiva de RL. Na segunda etapa oxidativa, ocorre a inserção do O₂ aos RL, atuando como propagadores da reação, resultando em um processo autocatalítico, sendo transformados nos correspondentes peróxidos, identificados como produtos primários da oxidação lipídica. Finalmente, os peróxidos resultantes são decompostos em intermediários de sua decomposição em álcoois, aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos e ácidos (GIROTTI, 1998; GERMAN, 1999).

Diferentemente da autoxidação, a fotoxidação não envolve a participação de RL, sendo um mecanismo com adição direta do oxigênio em seu estado singlete (¹O₂), na formação de peróxidos altamente reativos. Embora os processos possam ocorrer simultaneamente, o mecanismo de fotoxidação consiste primariamente na conversão do O₂ no estado fundamental triplete para o estado excitado singlete, como pode ser observado na seqüência de reações apresentadas na Figura 2. Estas reações acontecem na presença de fotossensores como, clorofila, riboflavina e mioglobina, absorvendo energia eletromagnética da região de visível e ultravioleta próximo. Subsequentemente, o fotossensor transfere o excesso de energia para o O₂, sendo

convertido para $^1\text{O}_2$; podendo reagir por adição com os ácidos graxos insaturados formando peróxidos com conseqüente alteração na posição da dupla ligação e posterior decomposição, originando aldeídos, álcoois, hidrocarbonetos, entre outras, conforme representado na Figura 2 (ARAÚJO, 1999; MACHADO, 2000).

ESTADO	ORBITAIS π^*	ENERGIA (kcal/mol)
Oxigênio triplete $^3\text{O}_2$ ($^1\Sigma_g^-$)	$\uparrow \uparrow$	
Oxigênio singlete $^1\text{O}_2$ ($^1\Sigma_g^+$)	$\uparrow \downarrow$	37,5
Oxigênio singlete $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$)	$\uparrow \downarrow$	22,5

Figura 2. Distribuição Eletrônica nos Orbitais Moleculares (π^*) do Oxigênio no Estado Fundamental Triplete e no Estado Excitado Singlete.

Conforme pode ser observado na Figura 3, o oxigênio no estado singlete excitado pode apresentar-se em duas formas $^1\Sigma_g^+$ e $^1\Delta_g$, portanto, superiores ao estado fundamental triplete. A primeira forma de oxigênio tem vida média menor do que a segunda e decai rapidamente para o estado $^1\Delta_g$. Considerando estas características apresentadas, a única forma de $^1\text{O}_2$ que apresenta interesse em sistemas biológicos é a forma $^1\Delta_g$ denotada por $^1\text{O}_2$. Sendo assim, serão importantes alvos biológicos para oxidação de moléculas como ácidos graxos insaturados, proteínas e DNA (SZPRINGER *et al.*, 2004).

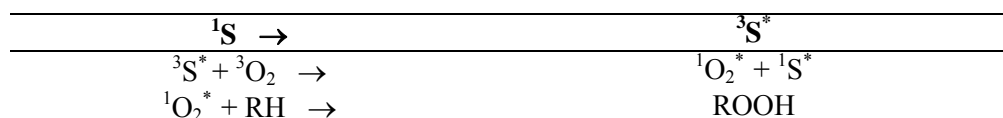
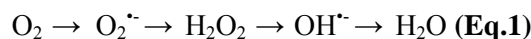


Figura 3. Esquema Simplificado da Oxidação Lipídica por Fotoxidação. ^1S = Sensor no estado singlete; $^3\text{S}^*$ = sensor no estado triplete; $^3\text{O}_2$ = oxigênio molecular no estado fundamental triplete; $^1\text{S}^*$ = Sensor no estado singlete excitado; RH = ácido graxo insaturado; ROOH = peróxido.

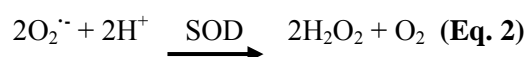
1.2.1. Efeitos Oxidativos do Metabolismo Celular

A energia requerida para manutenção da atividade celular é dependente da oxidação das biomoléculas. Nesta etapa são produzidos RL, como hidroxil (OH^\bullet) e ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), bem como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), reconhecidas como ERO. Destacando-se pela grande reatividade, provocam a lipoperoxidação celular bem como a oxidação de proteínas e do DNA (HAMID *et al.*, 2002).

As ERO são resultantes da redução do O_2 até a água, ao nível mitocôndria pela inserção de quatro elétrons a molécula de oxigênio, conforme a equação 1, ilustrada abaixo (ROVER JUNIOR *et al.*, 2001).



Considerando os danos celulares causados pela formação das ERO estão disponíveis sistemas de defesa antioxidante atenuadores destas espécies nos organismos vivos de modo a garantir a homeostase celular. As defesas antioxidantes enzimáticas incluem a atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (Cat), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR) e glutathione S-transferase (GST). Para minimizar os efeitos tóxicos dos RL formados, é necessário um adequado equilíbrio das enzimas antioxidantes supracitadas (SIES, 1993 e BONNEFOY *et al.*, 2002). Os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) se dismutam por ação da atividade da SOD, produzindo H_2O_2 e O_2 como mostra a equação 2:



A dismutação é uma reação onde duas moléculas idênticas são transformadas em compostos diferentes. No caso da SOD, um íon superóxido oxida o outro, gerando O_2 e H_2O_2 . A enzima SOD é decisiva quanto à proteção contra a toxicidade pelo oxigênio e seus radicais. Estão invariavelmente presentes nos organismos aeróbios e ausentes nos anaeróbios obrigatórios (OLIVEIRA, 2008).

A enzima catalase tem como função principal dismutar o H_2O_2 formando água e O_2 (FRIDOVICH, 1998). Na reação da Cat, que inativa o H_2O_2 , uma das suas moléculas é oxidada a O_2 e a segunda é reduzida à água, mostrada na equação 3.



A GPx, por sua vez, reduz o H_2O_2 peróxidos alifáticos e os aromáticos à água e seu correspondente álcool inerte, em uma reação que necessita da presença da glutathione reduzida (GSH) como fonte de equivalentes redutores, conforme está apresentada na equação 4.



O resumo da detoxificação enzimática realizado pela SOD, Cat, GPx e GR está esquematizado na Figura 4.

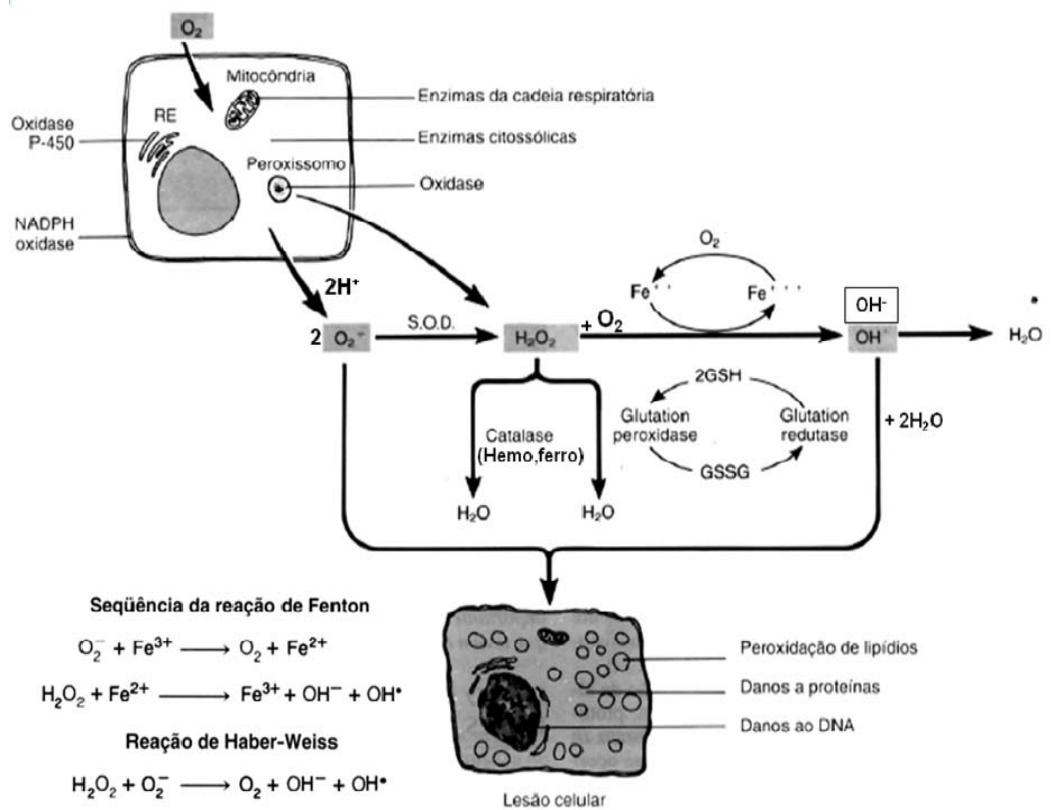
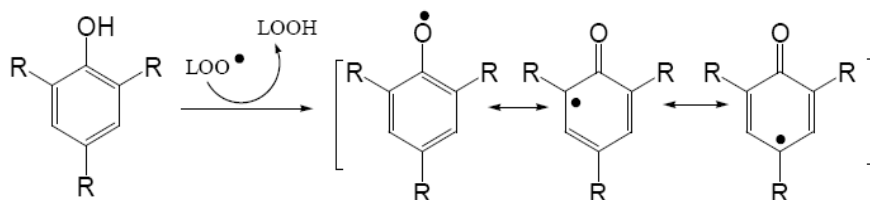


Figura 4. Detoxificação Enzimática realizada por SOD, Cat e GPx (Adaptado de SALVADOR e HENRIQUES, 2004).

1.2.2. Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias que atuam em baixas concentrações em substratos oxidáveis inibindo ou retardando significativamente a lipoperoxidação (HALLIWELL, 1995). Estas moléculas são agrupadas de acordo seu mecanismo de ação: antioxidantes primários e sinérgicos (SUHAJ, 2006). Os primários atuam retardando ou inibindo a iniciação, podendo ainda interromper a propagação em cadeia dos radicais. Na classe dos antioxidantes sinérgicos estão incluídos os agentes queladores de metais, de oxigênio singlete e atenuadores dos peróxidos, podendo deste modo, atuarem por diversos mecanismos reacionais, reduzindo radicais fenoxil quando associado ao ácido ascórbico ou palmitato de ascorbila. Enquanto os removedores de oxigênio são oxidados pela remoção do oxigênio livre e finalmente os agentes complexantes atuam seqüestrando íons metálicos, essenciais para as reações iniciais da autoxidação, neste grupo são utilizados o ácido cítrico, o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e os derivados do ácido fosfórico (FENNEMA, 2000).

A equação 5 ilustra o mecanismo reacional através da transferência de um átomo de hidrogênio ao radical peroxil, sendo o radical resultante do antioxidante estabilizado por ressonância e são relativamente inativos e, portanto incapazes de iniciar ou propagar reações oxidativas.



Equação 5. Ação dos Antioxidantes Não-enzimáticos: transferência de um átomo de hidrogênio para o radical peroxil e a formação de um radical fenoxil estável.

1.3. COMPOSTOS BIOATIVOS

Segundo GARCIA *et al.* (1994), mais de 365 mil espécies de plantas já foram catalogadas em todo o mundo. Destas, apenas 1.100 espécies foram exploradas em termos de identificação de compostos bioativos e conseqüente propriedades medicinais. Ainda, segundo os mesmos autores, estimativas da OMS, apontam que mais de 25 mil espécies de plantas são conhecidas no mundo e delas são extraídos remédios fitoterápicos. Um percentual de 40 % de todos os medicamentos existentes no mercado mundial é proveniente de fontes biológicas e deste, 60 % são obtidos de plantas (OLIVEIRA, 2005).

A presença de compostos bioativos em plantas têm sido potencialmente explorada nos últimos anos, devido à crescente popularidade dos medicamentos fitoterápicos (DINIZ, 2007). São compostos que normalmente não estão envolvidos nas funções vitais das plantas, com características químicas bastante diversas e às vezes bem complexas. Ao contrário das substâncias do metabolismo primário, que fazem parte da atividade celular de praticamente todos os seres vivos, no metabolismo secundário são encontradas apenas em grupos restritos de plantas.

A busca por plantas como fontes de compostos bioativos, que são reconhecidos por suas propriedades benéficas à saúde humana tem sido alvo de muitos cientistas em todo mundo (STRINGHETA, 2004). Os carotenóides estão na lista dos compostos bioativos considerados funcionais, alimentos estes, capazes de prevenir

doenças. De acordo com RODRIGUEZ-AMAYA (1999) e FONTANA (2000), os carotenóides mais comumente encontrados nos alimentos vegetais são o beta-caroteno (cenoura), licopeno (tomate), várias xantofilas (zeaxantina, luteína e outras estruturas oxigenadas do milho, da manga, do mamão e da gema de ovo) e a bixina (obtido do urucum).

Outro grupo de compostos bioativos bastante pesquisados atualmente são os compostos fenólicos. Estudos permitem afirmar que a atividade antioxidante de vegetais se deve principalmente à presença dessas substâncias, devido às suas propriedades de oxido-redução, podendo desempenhar importante papel na absorção e neutralização de RL.

Estudos epidemiológicos, alguns flavonóides (metabólitos secundários agrupado na classe dos fenólicos), apresentam-se relacionados à prevenção de doenças provocadas pelo envelhecimento, que pode ser justificado devido à sua ação antioxidante. Segundo KOO e SUHAILA (2001), os flavonóides agem prevenindo o consumo de vitamina C, evitando que RL se formem pelo oxigênio, que é supostamente a causa para o desenvolvimento de câncer e doenças coronárias. Os RL podem atacar biomoléculas; especialmente lipídios, proteínas ou DNA, podendo ser preservados pela ação dos antioxidantes (BIRCH *et al.*, 2001; BRENNAN e PAGLIARINI, 2001; SELLAPAN, AKOH e KREWER, 2002; ZHENG e WANG, 2001).

1.3.1. A Multifuncionalidade dos Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários com importantes funções fisiológicas e morfológicas, amplamente distribuídos no reino vegetal (HARBORNE, 1994). Atualmente são conhecidos mais de 8.000 destas fitomoléculas, integrando um grande grupo de compostos bioativos que vão desde moléculas fenólicas simples a estruturas poliméricas com massa molar.

A maioria dos compostos fenólicos naturais encontra-se conjugados com mono e polissacarídeos bem como a outros grupos funcionais tais como, ésteres e metil ésteres (WATERMAN e MOLE, 1994).

Segundo HARBONE (1994), os compostos fenólicos podem ser classificados em dois grandes grupos: os fenóis simples, apresentando único anel aromático, contendo uma ou mais hidroxilas substituintes e os polifenóis, que são constituídos de duas ou mais unidades monoméricas, fenólicas, até compostos poliméricos. Em função da heterogeneidade estrutural dos compostos fenólicos, uma outra classificação

foi proposta, baseada na cadeia carbônica principal que constitui o composto polifenólico, conforme ilustrado na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos Compostos Fenólicos de acordo com a Cadeia Principal.

ESTRUTURA	CLASSE
C ₆	Fenóis
C ₆ -C ₁	Ácidos Hidrocibenzóicos
C ₆ -C ₂	Ácidos hidroxicinâmicos, cumarinas e cromanas
C ₆ -C ₃	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C ₆ -C ₄	Naftoquinonas
C ₆ -C ₁ -C ₆	Benzofenonas e Xantonas
C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenos e antraquinonas
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonóides: flavonóis, antocianinas, chalconas, flavonóis, flavonas e isoflavonas
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonóides
(C ₆ -C ₁) _n	Taninos hidrolisáveis
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Taninos condensados ou proantocianidinas
C ₆ – Anel benzênico	

Alternativamente, estas moléculas podem ser classificadas com base na massa molar: baixa, média e alta, segundo ESCARPA e GONZALES (2001). Assim sendo, é apresentada na Tabela 2, a classificação dos compostos polifenólicos de acordo com as massas molares.

Tabela 2. Classificação dos Compostos Fenólicos de acordo com a Massa Molar

MASSA MOLAR	CADEIA PRINCIPAL	CLASSE
Baixa	C ₆ -C ₁	Ácidos hidroxibenzóicos
	C ₆ -C ₃	Ácidos hidroxicinâmicos
Média	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonóides
	(C ₆ -C ₁) _n	Taninos hidrolisáveis
Alta	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Taninos condensados

Os fenóis e ácidos hidroxibenzóicos são estruturalmente representados pelas cadeias principais C₆ e C₆-C₂, respectivamente. Desempenham funções metabólicas vitais durante a germinação e crescimento dos vegetais. O ácido gálico é o mais comum entre os ácidos hidroxibenzóicos, ocorrendo tanto na forma livre quanto na forma polifenólica. Os ácidos elágico e gálico, também ocorrem como estrutura monomérica dos taninos hidrolizáveis (ESCARPA e GONZALES, 2001; HARBORNE 1994). Na Figura 5, são apresentadas as estruturas químicas dos ácidos hidroxibenzóicos mais frequentemente encontrados nos vegetais.

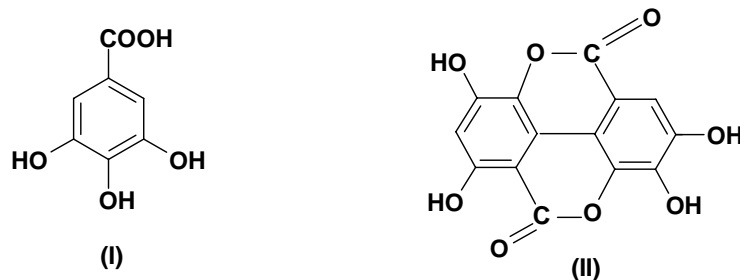


Figura 5. Estruturas Químicas dos Ácidos Gálico (I) e Elágico (II) de Ocorrência Natural em Vegetais.

Os derivados dos fenilpropanóides apresentam uma estrutura básica conforme ilustrada na Figura 6. Nesta classe, os ácidos coumárico, cafeico, ferúlico e sinápico são os mais comuns, podendo ser encontrados livres ou associados a outros compostos (ESCARPA e GONZALES 2001; HARBORNE 1994).

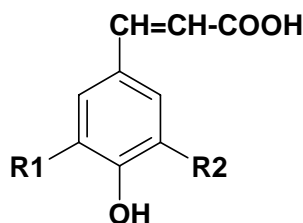


Figura 6. Estrutura Química Básica representativa para o Ácido Coumárico. $R_1 = OH$ e $R_2 = H$ para o Ácido Caféico.

Os flavonóides são compostos fenólicos com 15 átomos de carbono e que se encontram distribuídos no reino vegetal em mais de 2.000 espécies nas mais diversas famílias. Desempenham importante papel na fisiologia vegetal, uma vez que atua na proteção contra agentes oxidantes, tais como, raio ultravioleta e controlam os níveis das auxinas reguladoras do crescimento e diferenciação dos vegetais (SALISBURY e ROSS, 1992).

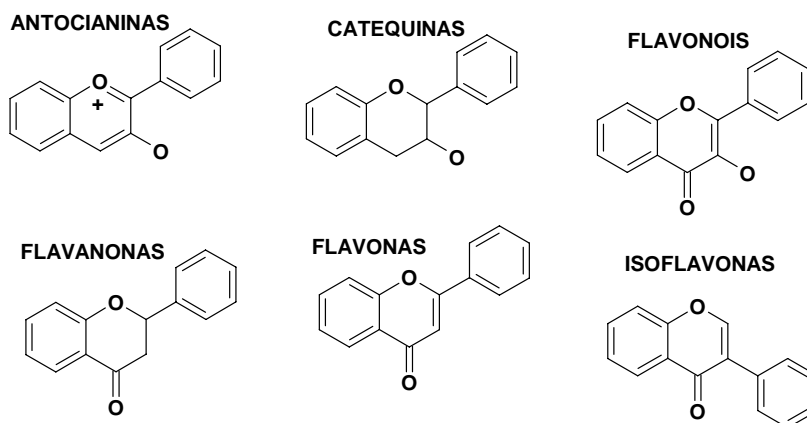


Figura 7. Estrutura Química Básica representativa dos Flavonóides e Isoflavonas

Considerando a diversidade estrutural dos compostos fenólicos, vários procedimentos analíticos têm sido estabelecidos para avaliar a capacidade antioxidante de diferentes matizes. Alguns deles determinam a habilidade dos antioxidantes em sequestrar RL gerados no meio da reação, outros avaliam a eficiência dos antioxidantes em inibir a peroxidação lipídica por meio da quantificação dos produtos da reação, como dienos conjugados e hidroperóxidos, bem como dos produtos de decomposição da peroxidação lipídica ou medindo a inibição da oxidação do lipídio do sistema pelo antioxidante a ser testado. Apesar da multiplicidade de métodos para avaliar a atividade antioxidante, não existe um protocolo analítico universal (FRANKEL e MEYER 2000; MARTÍNEZ-FLÓREZ *et al.*, 2002). Assim sendo, faz-se necessário avaliar a capacidade antioxidante por diferentes ensaios, com mecanismo de ações diferentes.

De acordo com BORS *et al.* (1990), a habilidade antioxidante dos flavonóides depende das propriedades redox de seus grupos hidroxifenólicos e da relação estrutural entre as diferentes partes da estrutura química. Três requisitos estruturais que possivelmente são responsáveis pela atividade de neutralização de radicais livres exercida por esta classe de compostos, são apresentados a seguir:

- presença do grupo orto-dihidroxi ou grupo catecol no anel B, o que confere uma maior estabilidade à forma radicalar, pois contribui para a dispersão dos elétrons;
- ligação dupla conjugada com a função 4-oxo, aumentando a dispersão eletrônica a partir do anel B;
- grupos hidroxilo nas posições 3 e 5 com função oxo, que promove a dispersão eletrônica do grupo 4-oxo para estes dois substituintes.

As antocianinas fazem parte do grupo dos flavonóides que são compostos fenólicos caracterizados pelo núcleo básico flavílio (cátion 2-fenilbenzopirílio) que consiste de dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos e condensada por um oxigênio. A molécula de antocianina é constituída por duas ou três porções, uma aglicona (antocianidina), um grupo de açúcares e, frequentemente, um grupo de ácidos orgânicos (FRANCIS, 1989).

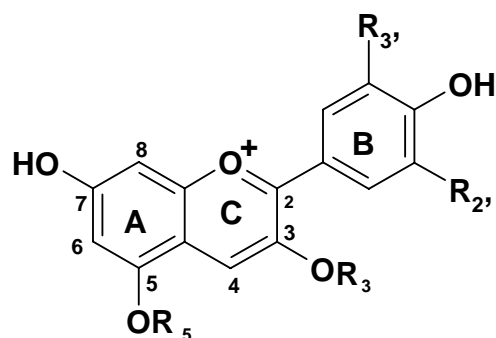


Figura 8. Estrutura Básica de uma Molécula de Antocianina. Os grupos substituintes $R_{3'}$ e $R_{5'}$ podem ser H, OH ou OCH_3 enquanto que R_3 e R_5 são açúcares.

Na literatura, encontram-se diversos métodos utilizados para quantificar as antocianinas em alimentos e todos têm como procedimento básico, a extração prévia dessas substâncias (REVILLA *et al.*, 1998). O fato do cátion flavílio ser estável em pH ácido levou a utilização de solventes contendo ácidos orgânicos na extração de antocianinas de frutas e vegetais (MACHEIX *et al.*, 1990). Em se tratando de sucos de frutas e vegetais, a preparação das amostras é realizada pela diluição em alcoóis acidificados, podendo posteriormente passar por uma filtração (FRANCIS, 1982). Nos vegetais e frutas frescas, são poucos os compostos que absorvem energia na região de absorção máxima das antocianinas (465 à 550 nm), possibilitando a quantificação destas substâncias através de métodos espectrofotométricos simples em comprimentos de onda adequados (WROLSTAD, 1976).

Outro grupo importante de flavonóides são os flavonóis, e que o diferencia dos demais flavonóides é a presença do grupo hidroxílico (na posição 3) e do grupo carbonílico (na posição 4) no anel C. Os flavonóis ocorrem em alimentos geralmente como *O*-glicosídeos, com mono, di ou trissacarídeos ligados em sua maioria, na posição 3, e em alguns casos, na posição 7. Os flavonóis mais encontrados são a quercetina, miricetina e kaempferol (MATSUBARA e RODRIGUEZ-AMAYA, 2006).

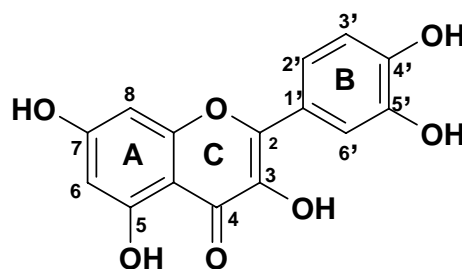
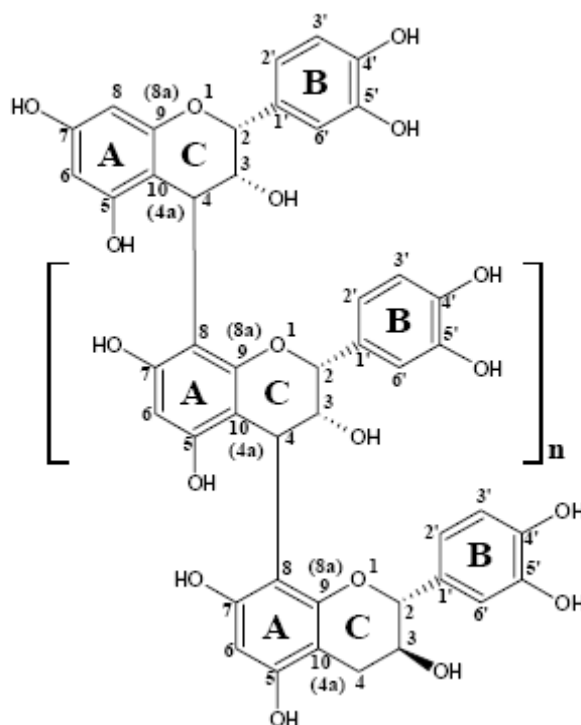


Figura 9. Estrutura Química Básica de um Flavonol.

Os taninos pertencem a uma outra parte dos compostos fenólicos, se apresentando sob a forma de ésteres ou de heterosídeos sendo, portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares, por serem altamente reativos quimicamente, formando pontes de hidrogênio, intra e intermoleculares e facilmente oxidáveis tanto por meio de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, a exemplo do cloreto férrico.

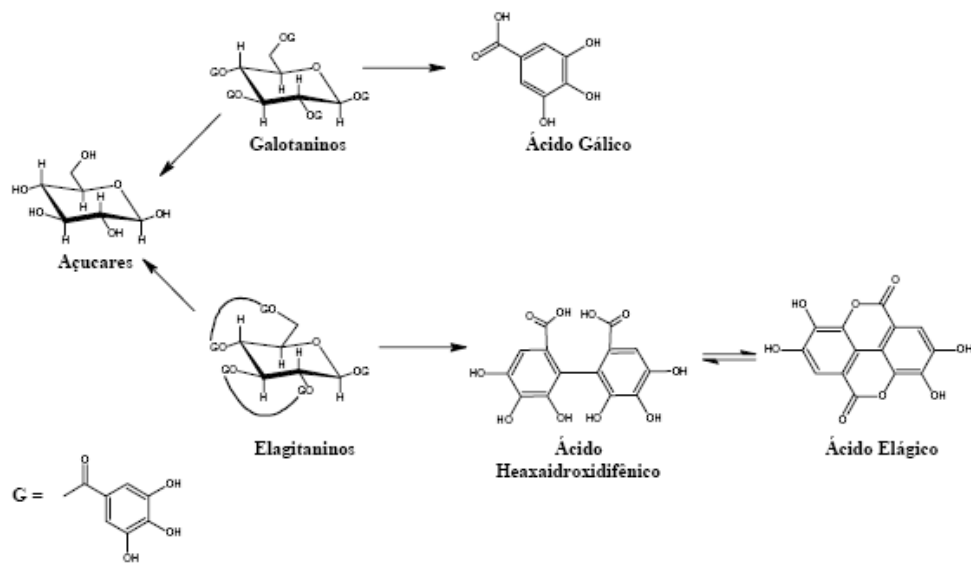
Os taninos são compostos fenólicos de grande interesse econômico e ecológico, classificados em condensados e hidrolisáveis. Os taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros de flavonóides, cujos monômeros são ligados através de uma ligação carbono-carbono. Como metabólitos secundários são responsáveis por conferir um aspecto adstringente a algumas frutas e produtos vegetais, em consequência da precipitação de glucoproteínas salivares, ocasionando a perda do poder lubrificante (MONTEIRO *et al.*, 2005).



Fonte: QUEIROZ *et al.* (2002).

Figura 11. Estrutura química representativa de um tanino hidrolizável.

Segundo HELDT (1997), os taninos hidrolisáveis, consistem de ésteres de ácidos gálico e elágicos glicolisados, formados a partir do chiquimato, onde o grupo hidroxila do açúcar são estereificados com os ácidos fenólicos; e os condensados, largamente encontrados no reino vegetal, são polímeros de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol, produtos do metabolismo do fenilpropanol (MONTEIRO *et al.*, 2005).



Fonte: QUEIROZ *et al.* (2002).

Figura 11. Estrutura química representativa de um tanino hidrolizável.

Os taninos vegetais têm sido quantificados por diversos tipos de ensaios. Em se tratando de taninos condensados, os métodos para determinação mais utilizados são o butanol-HCl e a vanilina. O método vanilina depende da reação da vanilina com os taninos condensados para formação de complexos coloridos. A eficiência deste método está intimamente ligada ao solvente utilizado na extração, a concentração e natureza do ácido, tempo de reação, bem como da temperatura e concentração da vanilina. O método do butanol ácido é referido como o melhor, devido sua alta seletividade (HAGERMAN e BUTLER, 1989).

1.3.1.2. Dieta e Biodisponibilidade

Considerando a ampla distribuição dos compostos fenólicos no reino vegetal, bem como os seus efeitos benéficos a saúde, estas fitomoléculas têm sido alvo de um vasto campo de estudos nos últimos anos. Até meados dos anos 90, as investigações relativas aos antioxidantes eram concentradas nas vitaminas, carotenóides e minerais (SCALBERT *et al.*, 2005). Ensaio utilizando flavonóides e outros polifenóis com propriedades antioxidantes e seus efeitos na prevenção de doenças ocorreu na realidade após 1995. A lenta evolução destas investigações pode está relacionada com a diversidade de estruturas químicas destas moléculas nos alimentos (MANACH *et al.*, 2004). Além de apresentar atividades biológicas distintas mostradas em vários estudos *in vitro* (KUNTZ *et al.*, 1999; BREINHOLT e LARSEN 1998).

De acordo com SCALBERT *et al.*, (2005) os polifenóis são os antioxidantes comumente encontrados na dieta. Sua ingestão dietética sugerida é de 1g dia⁻¹, quantidade superior a todas as outras classes de antioxidantes da dieta. Assim sendo, este valor corresponderá a aproximadamente 10 vezes a ingestão de vitamina C, e 100 vezes a ingestão de vitamina E e carotenóides. As principais fontes dietéticas são frutas, chás, café, vinho tinto, especiarias, cereais, chocolate, dentre outras (WILLIAMSON e ANACH, 2005).

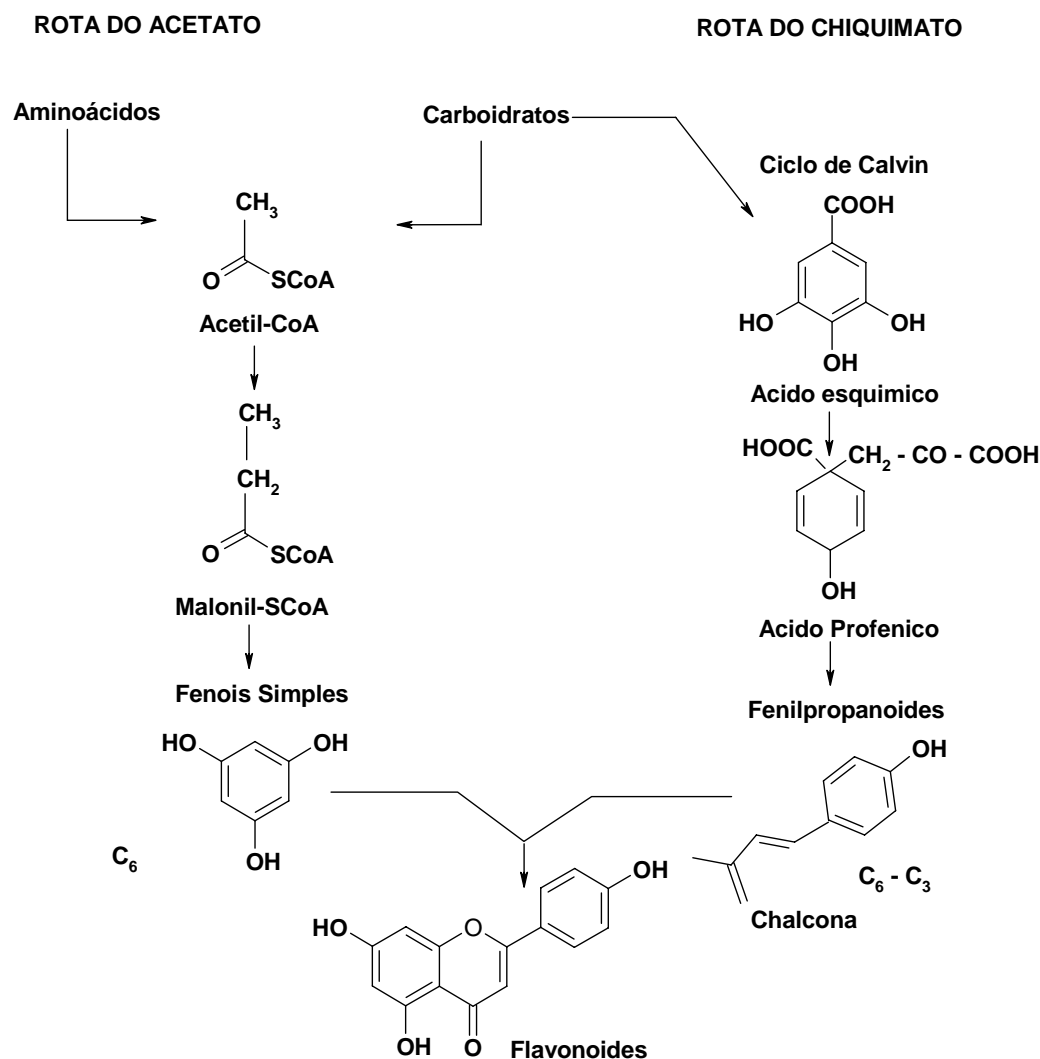
Estudos revelam evidências consistentes da contribuição dos polifenóis na prevenção de doenças cardiovasculares, câncer e osteoporose e sugerem ainda funções na prevenção de doenças neurodegenerativas e diabetes (SCALBERT *et al.*, 2005). Entretanto, são limitadas as informações relativas às recomendações dietéticas para uma população ou para uma doença específica.

A biodisponibilidade dessas fitomoléculas requer, provavelmente, eficaz conversão dos glicosídeos para as respectivas formas agliconas pelas β -glicosidases intestinais microbianas. Posteriormente, são absorvidas pelos enterócitos, ou biotransformadas em metabólitos específicos pelas UDP-glucuroniltransferases e sulfotransferases da mucosa intestinal e do fígado (HENDRICH, 2002).

A biodisponibilidade dos polifenóis é influenciada pelos constituintes da matriz alimentícia em estudo. Interações entre polifenóis com proteínas e polissacarídeos, podem ocorrer e, conseqüentemente, interferir na absorção. Efeitos da fisiologia intestinal envolvendo pH, fermentação intestinal, excreção biliar, tempo de trânsito intestinal, dentre outros, também são fatores relevantes na absorção dos polifenóis. Uma metodologia eficiente para avaliação da absorção e metabolismo intestinal de polifenóis envolve a perfusão intestinal *in situ* no intestino delgado de cobaias. A utilização dessa técnica permite a manipulação de parâmetros intestinais e biliares, para avaliação da biodisponibilidade dos polifenóis bem como de outros compostos bioativos (SILBERBERG, 2006).

1.3.1.3. Biossíntese dos Compostos Fenólicos

ESCARPA e GONZALES (2001) demonstram duas rotas distintas para a biossíntese dos compostos fenólicos: biossíntese a partir do acetato e biossíntese pela via do chiquimato. Produtos intermediários destas rotas resultam em outros metabólitos secundários importantes como os flavonóides, taninos, dentre outros. Na Figura 12 estão apresentadas as rotas biossintéticas simplificadas dos compostos fenólicos.



Fonte: ESCARPA e GONZALES (2001)

Figura 12. Rota biossintética simplificada dos compostos fenólicos.

1.4. SUBSTITUIÇÃO DOS ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS PELOS ANTIOXIDANTES NATURAIS

O interesse maior pelos antioxidantes naturais teve início na década de 80 diante da comprovação de efeitos maléficos causados por doses elevadas de BHT, BHA e T-BHQ sobre o peso do fígado e considerável aumento do retículo endoplasmático, entre outras (DURÁN e PADILLA, 1993). Diante disso, muitas pesquisas começaram a ser desenvolvidas na busca de métodos para identificação e purificação de novos compostos com atividade antioxidante, provenientes de fontes naturais, que pudessem atuar sozinhos ou sinergicamente com outros aditivos, como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e limitar o uso dos antioxidantes sintéticos. As pesquisas permitem afirmar que a propriedade antioxidante das especiarias e de outros vegetais se deve, principalmente, a presença de compostos fenólicos. A maioria destes compostos, com exceção do tocoferol, possui grupos funcionais ativos na posição *orto* enquanto que nos antioxidantes sintéticos, com exceção dos galatos, esses grupos encontram-se na posição *para*, sem que haja mudança na ação (POKORNÝ, 1991).

A determinação da atividade antioxidante de produtos naturais teve início com CHIPAULT *et al.* (1952) em especiarias, ingredientes utilizados em alimentos desde os primórdios da história, não somente para melhorar ou ressaltar as características sensoriais dos alimentos, mas também para preservá-los. Diversas pesquisas de porte nacional e internacional sobre propriedade antioxidante de vegetais foram realizadas nos últimos 20 anos em decorrência da busca de um estilo de vida mais saudável e da constatação de que certos alimentos apresentam substâncias biologicamente ativas que trazem benefícios à saúde ou efeitos fisiológicos desejáveis (PARK *et al.*, 1997). Neste contexto, os vegetais que apresentam propriedade antioxidante integram o grupo destas substâncias, denominadas funcionais, por estarem potencialmente envolvidas na redução do risco de doenças (KROON e WILLIAMSON, 1999).

FOOTE e DENNY (1968), atribuíram ao β -caroteno a capacidade de reprimir a formação de oxigênio singlete, mostrando ação supressora dos radicais ativos pelo bloqueio do oxigênio singlete, quando adicionado em sistema contendo óleo de soja, reduzindo o nível da oxidação (LEE e MIN, 1988; WARNER e FRANKEL, 1987).

Observa-se ainda, que a maioria das investigações realizadas restringiu-se à verificação da atividade antioxidante, sem, contudo isolarem e identificarem o composto ativo. A atividade antioxidante de um composto proveniente de uma fonte natural é influenciada por diversos fatores, tais como: país ou região na qual a planta foi cultivada; substrato lipídico utilizado no ensaio; o solvente e a técnica empregada

na extração; a forma da especiaria testada (pó, extrato ou fração isolada), conforme estabelecido por FRANKEL (1993).

MARTÍNEZ-TOMÉ et al. (2001) estudaram a atividade antioxidante em condimentos como colorau (*Bixa orellana*), páprica (*Capsicum annum*), cominho (*Cuminum cyminum*), orégano (*Origanum vulgare*) e açafrão (*Crocus sativus*) comparando com três antioxidantes sintéticos (BHA, BHT e PG). Em cinco ensaios diferentes, concluíram que essas especiarias apresentam boas propriedades antioxidantes, sendo que em alguns testes sua ação se mostrou superior às substâncias sintéticas, sendo que o orégano se destacou das demais. Isso é um indicativo positivo em se tratando da substituição de compostos sintéticos por naturais em alimentos, uma vez que além de fornecerem cor e aroma, esses condimentos também irão auxiliar na melhor conservação dos alimentos protegendo-os da oxidação.

1.5. MÉTODO DE EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS

Os polifenóis são substâncias que variam de estrutura simples a estruturas complexas altamente polimerizadas, incluindo quantidades variáveis de ácidos fenólicos, fenilpropanóides, antocianinas e taninos e possíveis ligações com carboidratos, proteínas e outros compostos. Deste modo, faz-se necessário procedimentos extras de extração com vistas a purificar e remover substâncias não fenólicas (BEAL, 2006).

PEREIRA et al. (2007) fizeram um estudo otimizando a extração de compostos fenólicos em amora-preta usando quatro solventes puros (água, metanol, acetona e etanol); misturas de solventes (70 % metanol: 30 % água, 70 % etanol: 30 % água, 70 % etanol: 30 % água, 50 % metanol: 50 % etanol, 45 % metanol: 45 % etanol: 10 % água e 45 % metanol: 45 % etanol: 10 % acetona) e ainda, utilizaram solventes (água, metanol e etanol) acidificados com HCl variando suas concentrações em 0,15 %, 0,10 %, 0,01 % e 0,005 %.

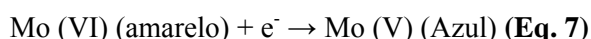
KOZLOWSKA et al. (1983) extraíram ácidos fenólicos com metanol 80 %. Outros solventes, como etanol e acetona, já foram utilizados na extração de fenólicos, freqüentemente adicionados à água em diferentes proporções (ANTOLOVICH et al., 2002).

Os métodos *Folin-Denis* e *Folin-Ciocalteu* são exemplos de métodos utilizados para a determinação de fenólicos totais (SALUNKHE et al., 1989). Várias técnicas cromatográficas já foram desenvolvidas para identificar e quantificar fenólicos específicos. No entanto, apenas polifenóis passíveis de extração sob condições específicas podem ser estudados através dos métodos descritos

(ANTOLOVICH *et al.*, 2002). HILLIS e SWAIN (1959) observaram que, após extração exaustiva, alguns fenólicos adicionais puderam ser extraídos com a mudança do solvente.

As análises desses compostos são influenciadas pela sua estrutura química, método de extração empregado, tamanho das partículas da amostra, tempo e condições de armazenamento, bem como pelo método de análise, seleção de padrões e presença de substâncias interferentes, como gorduras, terpenos e clorofilas. Por essas razões, nenhum método de extração é totalmente eficiente na extração de todos os fenólicos ou de uma classe específica de compostos fenólicos em alimentos. Os solventes mais frequentemente utilizados para a extração de compostos fenólicos incluem metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformamida e suas combinações (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

A determinação de fenólicos totais em produtos naturais foi desenvolvida por FOLIN e CIOCATEAU (1927) e tem sido crescente o número de publicações utilizando este método com adaptação propostas por (SINGLETON e ROSSI, 1965; SPANOS, 1990; WROLSTAD, 1990; WETTASINGHE e SHAHIDI, 1999), dentre outros. Este ensaio fundamenta-se nas propriedades óxido-redutoras dos compostos fenólicos bem como na capacidade destes em formar complexos com diferentes metais. Os fenólicos são oxidados a fenolatos em meio alcalino pelo reagente de Folin Ciocateau (RFC), sendo este constituído por uma mistura de ácidos fosfotungstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) os quais são reduzidos a uma mistura de óxidos azuis de tungstênio (W_8O_{23}) e de molibdênio (Mo_8O_{23}). A coloração azul obtida está relacionada com o potencial redox dos grupos fenólicos, possuindo uma absorção de máximo a 773 nm, detectando os polifenóis totais usualmente expressos com equivalente de ácido gálico ou catequina. A equação estequiométrica da reação não está completamente elucidada. PRIOR *et al.* (2005) demonstraram que o Mo (VI) é facilmente reduzido no complexo, entre as substâncias redutoras e o molibdênio (VI) conforme demonstrado nas equações 6 e 7:



Embora o RFC seja rotineiramente utilizado na quantificação de fenólicos antioxidantes, este ensaio não é específico, pois outros compostos podem ser também reduzidos quando presentes na matriz em estudo, tais como o ácido ascórbico, açúcares, aminas aromáticas, dióxido de enxofre, ácidos orgânicos dentre outras HUANG *et al.* (2005). Deste modo, FURLONG *et al.* (2003) propuseram a partição

do extrato em hexano e subsequente precipitação com Ba (OH)₂ (hidróxido de bário) e ZnSO₄ (sulfato de zinco) para minimizar a presença de interferentes no ensaio. A dissociação do fenol em meio alcalino (pH ~ 10) resulta no ânion fenolato, sendo este capaz de reduzir o RFC. Assim sendo, os óxidos azuis de tungstênio (W₈O₂₃) e de molibdênio (Mo₈O₂₃) entre os fenolatos e o RFC são independentes da estrutura química do composto fenólico e como regra geral, o complexo de coordenação é formado entre o centro metálico e o composto fenólico (HUANG *et al.*, 2005).

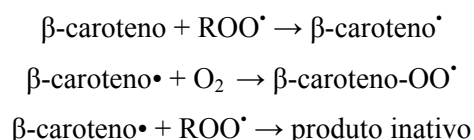
Na literatura estão disponíveis diversas publicações utilizando o RFC para quantificação de fenóis totais relacionado com a medida da atividade antioxidante (EMMONS e PETERSOM, 1999; YEN *et al.*, 2005; ABEROUMAND e DEOKULE 2008), sendo que na maioria destes ensaios, apresentou-se uma correlação linear entre estas determinações, embora KAHKONEN *et al.*, 1999 e ISMAIL *et al.* 2004 não observaram existir correlação. Sendo assim, tal divergência pode está relacionada à ausência na padronização dos métodos para detecção dos fenóis.

1.6. MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Segundo GRAZZIONI *et al.*, (2005), distintos métodos têm sido desenvolvidos para obter a diferenciação (qualitativa ou quantitativa) da atividade antioxidante de compostos, tanto através de testes sem a utilização de células (testes químicos) ou utilizando culturas celulares (testes biológicos).

O sistema β -caroteno/ácido linoléico trata-se de um ensaio espectrofotométrico baseado na descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa de um ácido graxo (RUFINO *et al.*, 2006). A determinação é efetuada a 470 nm, na presença e ausência de um antioxidante. É um método simples e sensível. A co-oxidação do β -caroteno é normalmente efetuada num meio emulsionado, o que origina muitas vezes falta de reprodutibilidade dos valores de absorbância medidos. Acresce ainda a dificuldade de interpretação dos resultados devida à interação do β -caroteno com o oxigênio. Apesar dos inconvenientes referidos, o método é amplamente usado. Como não recorre a altas temperaturas, permite a determinação do poder antioxidante de compostos termo-sensíveis e a avaliação qualitativa da eficácia antioxidante de extratos vegetais (SILVA *et al.*, 1999). Após descoloração do fundo amarelo, a persistência de mancha com essa cor indica presença de compostos com atividade antioxidante.

O conjunto de equações abaixo, ilustra o mecanismo simplificado da oxidação do β -caroteno. Este composto nas condições estabelecidas pela reação é sensível à oxidação quando exposto ao ar, luz e temperatura. A atuação antioxidante do β -caroteno é observada pela remoção de RL.



O método ABTS (2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) é um dos mais utilizados entre os testes indiretos de avaliação da atividade antioxidante, que consiste em monitorar o decaimento do radical ABTS produzido pela oxidação do 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), provocada pela adição de uma amostra contendo fenólicos. A quantidade de ABTS consumida está relacionada à reação com os fenólicos presentes na amostra, a qual é expressa em equivalentes Trolox (unidades de concentração). Sua principal limitação é geral a todos os métodos indiretos de avaliação da atividade antioxidante: o valor TEAC (capacidade antioxidante frente equivalente ao trolox) está demonstrando de forma efetiva a capacidade da amostra estudada em reagir com o ABTS e não sua capacidade em inibir o processo oxidativo. A reação com o ABTS ocorre de forma lenta com vários fenólicos e amostras de produtos naturais (CAMPOS *et al.*, 1996). Além disso, o resultado da determinação do TEAC depende do tempo de incubação, assim como a razão entre a quantidade de amostra e a concentração do radical. A pequena seletividade do ABTS na reação com doadores de hidrogênio é mais uma limitação do método (ARTS *et al.*, 2004).

Outro método muito utilizado é o DPPH (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila), que é um radical estável em solução e que reage com compostos capazes de doar elétrons. Para essa análise, prepara-se uma solução alcoólica de DPPH, que absorve no comprimento de onda próximo à 517 nm, e à medida que seu elétron deixa de ser desemparelhado, a absorção decresce e ocorre a mudança de cor frente às moléculas antioxidantes envolvidas (DI MAMBRO *et al.*, 2005). Após o equilíbrio da reação mede-se a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50 % do DPPH (SILVA *et al.*, 1999). Um ponto negativo é que, o pH do meio reacional, que é em torno de 5,5, é diferente do pH fisiológico, acarretando numa desvantagem pela dificuldade de transferir os resultados para as condições *in vivo* (DI MAMBRO, *et al.*, 2005).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Caracterizar os cinco genótipos de urucueiros (*Piave vermelha*, *Piave vermelha gigante*, *CPATU 0060*, *Bico de pato I* e *Peruana paulista*) quanto às propriedades físico-químicas e bioquímicas, e avaliar a atividade antioxidante em um sistema modelo β -caroteno/ácido linoléico.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a composição centesimal dos cinco genótipos de urucueiros;
- Estabelecer as determinações bioquímicas dos compostos bioativos presentes nas sementes dos genótipos de urucueiros: flavonóis, protoantocianidinas e carotenóides (totais), taninos condensados (método vanilina e método butanol ácido);
- Testar dois solventes na extração de compostos fenólicos: etanol e solução hidroetanólica álcool etílico PA: água (80:20, v.v⁻¹);
- Quantificar os compostos fenólicos totais pelo método de *Folin-ciocauteau*;
- Avaliar a atividade antioxidante, utilizando o sistema modelo β -caroteno/ácido linoléico;
- Verificar a correlação entre o teor de fenólicos totais e atividade antioxidante.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido nos Laboratórios de Química Analítica e Bioquímica, Fisiologia Animal e Nutrição Animal da UESB, Campus de Itapetinga.

Foram utilizados grãos de urucum (*Bixa orellana* L.) dos genótipos *Piave vermelha*, *Piave vermelha gigante*, *CPATU 0060*, *Bico de pato I* e *Peruana paulista*, cedidos gentilmente pelo banco ativo de germoplasma da UESB, Campus de Vitória da Conquista, no mês de setembro de 2007.

Os genótipos selecionados para esse estudo são os mais cultivados no Brasil. *Piave vermelha*, *Piave vermelha gigante* e *CPATU 0060*, destacando-se pela boa produtividade, associado à elevados teores de bixina nas sementes, variando entre de 3,5 % a 6 %. O genótipo de *Bico de pato* é o mais cultivado no Extremo Sul da Bahia e possui elevada produtividade. Apresenta limitado teor de bixina, variando entre 2,1 a 3,3 %. Trata-se de um dos mais vigorosos genótipos no Brasil.

3.1. Preparo da Matéria-Prima

Os grãos de urucum provenientes dos cinco genótipos tiveram os teores de umidade ajustados para 10 % em estufa com circulação de ar forçada à temperatura de 50 °C. Posteriormente foram trituradas para redução do seu tamanho, utilizando um moinho de bancada da Marca Marconi, visando aumentar a área interfacial para transferência de massa e conseqüentemente aumentar a extração dos compostos bioativos. Os grãos triturados foram classificados em peneiras *Tyler* com tamanho da partícula igual 180 µm.

As frações obtidas foram acondicionadas a vácuo utilizando uma seladora da Marca Macsul Modelo Plus em sacos de polipropileno e mantidas em local seco à temperatura ambiente, protegido de luz.

3.2. Determinações Físico-Químicas

Determinou-se a umidade dos grãos por gravimetria pelo método de secagem em estufa, a temperatura de 105 °C durante 24 horas segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985).

O teor de cinzas foi determinado de acordo com metodologia proposta pela AOAC (1995). Pesou-se cerca de 1 g de amostra moída e submeteu-se à incineração em mufla da marca Fornos Lavoisier Modelo 400 C à 550 °C por 4 horas até obtenção do resíduo de coloração cinza esbranquiçada.

Os lipídios totais foram determinados segundo procedimento recomendado pela AOAC (1995), mediante extração em extrator *Soxhlet* da Marca Marconi Modelo Ma 044, utilizando 1 g de amostra moída utilizando o éter etílico PA como solvente extrator durante 8 horas.

O teor de proteínas foi determinado pelo método semi-micro Kjeldhal proposto por SILVA e QUEIROZ (2002) recolhendo-se a amônia liberada em ácido bórico a 4 %. O fator de conversão nitrogênio/proteínas foi de 6,25.

O teor de fibra bruta foi determinado segundo método proposto por (SILVA e QUEIROZ, 2002) utilizando 0,5 g de amostra.

O conteúdo de carboidratos foi determinado por diferença conforme AOAC (1997), calculou-se a média da porcentagem de água, proteína bruta, lipídeos, fibra bruta e cinzas, sendo o restante considerado carboidrato.

3.3. Determinações Bioquímicas

3.3.1 Determinação de Carotenóides Totais

Para determinação dos carotenóides adotou-se o procedimento proposto por KIMURA, M. e RODRIGUES-AMAYA (2003).

Foram homogeneizados em almofariz 0,3 g da amostra com 1,0 g de celite em 50 mL de acetona PA previamente resfriada. A mistura foi filtrada em papel de filtro, sendo o filtrado particionado com 20 mL de éter de petróleo em funil de separação. Posteriormente o conteúdo foi lavado com 150 mL de água destilada por seis vezes até a completa remoção da acetona. O extrato etéreo foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL acoplado a um funil contendo 5 g de sulfato de sódio anidro sob um papel de filtro para remoção da água residual. Posteriormente, ajustou-se o volume da solução com éter de petróleo. A absorvância foi imediatamente medida a 450 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV mine 1240.

Para quantificar os carotenóides totais utilizou-se a seguinte expressão:

$$\text{Carotenóides totais } (\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}) = \frac{A \cdot \text{volume (mL)} \cdot 10^4}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot \text{peso da amostra (g)}} \cdot 100$$

Onde: $A_{450\text{nm}}$ = absorvância; volume = volume total do extrato (50 mL);

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ = coeficiente de extinção molar do β -caroteno em éter de petróleo = 2592.

3.3.2. Determinação de Antocianinas e Flavonóis Totais

As antocianinas e os flavonóis totais foram determinados de acordo com o procedimento proposto por LEES e FRANCIS (1972).

Foram homogeneizados em um erlemeyer de 125 mL revestido com papel alumínio 0,5 g da amostra em 30 mL da solução extratora etanol 95 % em HCl 1,5N (85:15, v.v⁻¹) e estocados por 12 horas a 4 °C. Os filtrados foram coletados em balões volumétricos de 100 mL revestidos com papel alumínio, o resíduo foi lavado exaustivamente com a solução extratora até completa remoção dos pigmentos. O volume foi completado para 100 mL com a solução extratora, mantendo-se a mistura em repouso por 2 horas à temperatura ambiente (28 ± 2° C). A absorbância foi medida a 535 nm e 374 nm para quantificação das antocianinas e flavonóis, respectivamente. Os resultados foram expressos em µg de quercetina. 100 g⁻¹ de peso seco.

Para quantificar os flavonóis totais e antocianinas totais, utilizou-se as seguintes expressões:

$$\text{Antocianinas totais } (\mu\text{g de quercetina g}^{-1}) = A_{535} \cdot Fd \cdot \frac{10}{\bar{E}}$$

Onde: $A_{535\text{nm}}$ = absorbância à 535 nm;

\bar{E} = 765 (coeficiente de extinção molar para quercetina 1%) à 535 nm;

Fd = fator de diluição.

$$\text{Flavonóis totais } (\mu\text{g de quercetina g}^{-1}) = A_{374} \cdot Fd \cdot \frac{10}{\bar{E}}$$

Onde: A_{374} = absorbância à 374 nm;

\bar{E} = 982 (coeficiente de extinção molar para quercetina 1%) à 374 nm;

Fd = fator de diluição.

3.3.3. Determinação de Proantocianidinas (Taninos Condensados)

3.3.3.1. Método da Vanilina

Para o teor das proantocianidinas foi adotado o procedimento proposto por TIITTO-JULKUNEM (1985).

Foram homogeneizados 0,5 g de amostra em 30 mL de solução aquosa de acetona 80 % (v.v⁻¹), sob agitação constante em agitador magnético, Marca Fisaton Modelo 752 por 20 minutos à temperatura ambiente (28 ± 2° C). A mistura foi filtrada e o resíduo ressuspensão em 30 mL da solução aquosa de acetona 80 % (80:20, acetona

PA: água, v.v⁻¹). Este procedimento foi repetido por duas vezes. Os extratos resultantes foram combinados e o volume final ajustado para 100 mL com o mesmo solvente. Em um tubo de ensaio previamente revestido com papel alumínio, foram transferidos 0,5 mL do extrato obtido, e 3 mL da solução metanólica vanilina (4 %, m.v⁻¹). A mistura foi homogeneizada vigorosamente em agitador de tubos. Posteriormente foram adicionados 1,5 mL de HCl concentrado, e novamente agitado, sendo mantidos à temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ \text{C}$) por 20 minutos. Procedeu-se a leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV mine 1240 a 500 nm. Para obtenção das curvas analíticas lineares utilizou-se uma solução estoque na concentração de 25 mg/mL e posterior diluição seqüencial variando sua concentração de 1,0 até 3,0 mg de equivalente de catequina mL⁻¹. Os resultados foram expressos em mg de catequina. 100 g⁻¹ de peso seco.

3.3.3.2. Método do Butanol Ácido

Para esta análise foi adotado o procedimento proposto por PORTER *et al* (1986). Foram homogeneizados em um tubo de ensaio 200 mg de amostra em 10 mL de uma solução aquosa de acetona a 70 % (70:30, acetona PA: água, v.v⁻¹) por 10 minutos em agitador magnético Marca Fisaton Modelo 752-A. Uma alíquota de 0,5 mL desta mistura foi transferida para um tubo de ensaio, com adição de 3 mL do reagente butanol-HCl (95:5, v.v⁻¹) e 0,1 mL do reagente férrico (2 g de sulfato de ferro II amoniacal em 100 mL da solução de HCl 2N). Agitou-se o conteúdo do tubo e, posteriormente, foi mantido à temperatura de 100 °C em banho-maria Marca Fizaton Modelo 562A por 1 hora. Os tubos foram resfriados e as absorbâncias medidas a 550 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV mine 1240. Para obtenção das curvas analíticas lineares utilizou-se uma solução estoque na concentração de 25 mg mL⁻¹ e posterior diluição seqüencial variando sua concentração de 0,2 até 1,2 mg de equivalente de catequina mL⁻¹. Os valores foram expressos em mg de catequina 100 g⁻¹ de peso seco. Todas as amostras analisadas foram previamente despigmentadas utilizando-se uma solução de éter de petróleo PA em ácido acético glacial (99:1, v.v⁻¹).

3.4. Obtenção dos Extratos

Os extratos etanólicos e hidroetanólicos foram obtidos por processo de extração utilizando 5 g de amostra desidratada mantida por 30 minutos, sob agitação constante, em 50 mL dos respectivos solventes, à temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ \text{C}$). Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 3600 g, por 10 minutos. Após

transferência do sobrenadante, o resíduo foi novamente submetido ao processo de extração anteriormente descrito e os sobrenadantes combinados. Os extratos foram clarificados utilizando solução de hidróxido de bário 0,3 M e sulfato de zinco à 5 % e imediatamente filtrados em papel de filtro e após essa etapa foi realizada a partição com hexano em funil de separação até a remoção completa de interferentes na análise, segundo metodologia proposta por FURLONG (2003). As amostras assim obtidas foram concentradas em evaporador rotativo Marca Fizatton à temperatura de 50 °C e transferidas para tubos de ensaio com tampa e acondicionadas à -18 °C. Os extratos concentrados foram liofilizados em liofilizador Marca Labconco à pressão de 0,180 mBar e temperatura de -59 °C por 30 horas.

3.4.1. Determinação Espectrofotométrica de Compostos Fenólicos Totais

Para determinação do teor de compostos fenólicos totais, foi adotado procedimento proposto por WETTASINGHE e SHAHIDI (1999), utilizando o reagente de *Folin-Ciocalteu* (RFC).

Foram homogeneizados em tubos de ensaios 0,5 mL do RFC, 0,5 mL de extrato e 1,0 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO₃). O volume da mistura foi ajustado para 10 mL pela adição de 8 mL de água destilada e submetidos a agitação vigorosa em agitador de tubos da Marca Quimis Modelo Q-220B2. A mistura foi mantida em repouso à temperatura ambiente (28 ± 2 °C) por 25 minutos e após este tempo, foi centrifugado a 3600 x g por 5 minutos. A amostra em branco foi constituída de 0,5 mL do RFC, 0,5 mL do solvente correspondente, 1 mL de solução saturada de NaHCO₃ e 8 mL de água destilada. O teor de compostos fenólicos totais foi determinado a 773 nm em espectrofotômetro da Marca Shimadzu Modelo UV Mini 1240. Para obtenção das curvas analíticas lineares, foi utilizado uma solução estoque de ácido gálico na concentração de 1 mg mL⁻¹. As sol-estoques foram diluídas de modo a obter concentrações de 0,3 até 0,0125 mg de equivalente de ácido gálico mL⁻¹. O total de compostos fenólicos nos extratos obtidos foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico 100 g⁻¹ da amostra desidratada.

3.4.2. Determinação da Atividade Antioxidante dos Compostos Fenólicos

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada utilizando-se um sistema modelo β-caroteno-ácido linoléico adotando o procedimento proposto por MARCO (1968); MILLER (1971) e LEE *et al.* (1995) modificado por EMMONS e PETERSON (1999).

Os extratos foram avaliados comparativamente de acordo com a capacidade de inibir a oxidação da emulsão β -caroteno-ácido linoléico através da diminuição da intensidade da cor resultante. A solução de β -caroteno foi preparada pela dissolução de 2 mg de β -caroteno em 20 mL de clorofórmio. O sistema β -caroteno-ácido linoléico (Emulsão A) foi constituído de 3 mL da solução de β -caroteno, 40 mg de ácido linoléico e 400 mg do emulsificante Tween 20. Após a dissolução da mistura, removeu-se o solvente em evaporador rotativo a 50 °C. À mistura seca foram adicionados 100 mL de água destilada e oxigenada sob agitação vigorosa. Aliquotas de 3 mL da emulsão A foi transferida para uma seqüência de nove tubos de ensaio contendo 40 μ L dos respectivos extratos obtidos. Com o material do primeiro tubo, realizou-se a leitura imediata a 773 nm em espectrofotômetro da Marca Shimadzu Modelo UV Mini 1240, tempo zero, os demais foram encubados em banho-maria à 45 °C para monitoramento da reação de oxidação, sendo as leituras realizadas em intervalos de 15 minutos até perfazer um total de 2 horas. A amostra em branco foi constituída de 3 mL da emulsão ácido linoléico-tween 40 (Emulsão B) e água destilada aerada. A amostra controle foi preparada adicionando 3 mL da emulsão A em uma seqüência de nove tubos de ensaio e 40 μ L do respectivo solvente. A ação antioxidante da amostra foi comparada à dois antioxidantes sintéticos, BHT e ácido gálico, ambos na concentração de 1g do antioxidante. 100 m L⁻¹ de etanol PA, que foram determinadas nas mesmas condições acima descritas.

A atividade antioxidante foi expressa como percentual de inibição da oxidação e calculada usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de Inibição} = 100 \frac{DT_c - DT_a}{DT_c}$$

Sendo,

$$DT_c = \text{taxa de degradação do controle} = \ln \frac{A_{t=0}}{A_{t=120}}$$

$$DT_a = \text{taxa de degradação da amostra} = \ln \frac{A_{t=0}}{A_{t=120}}$$

3.5. Análises Estatísticas

Todas as determinações foram efetuadas em triplicata, os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP). A análise de variância (ANOVA)

e comparações múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5 %, usando o Sistema de Análises Estatísticas e Genética (SAEG) versão 8.0. O coeficiente de correlação para determinar a relação entre as variáveis, teor de fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos usando o software Excel.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação Físico-química das Matérias-Primas

A composição centesimal expressa de forma geral, o valor nutritivo de um alimento e corresponde à proporção dos grupos homogêneos de substâncias presentes em 100 g do alimento considerado. São grupos de substâncias homogêneas aquelas encontradas em todos os alimentos: água, lipídeos, proteínas, fibras, cinzas e carboidratos, quando determinado por diferença.

Os resultados obtidos na caracterização físico-química dos genótipos de urucueiros estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Composição Centesimal dos Genótipos de Urucueiros (valores expressos em g 100g⁻¹ de matéria seca).

Variáveis	P.V.	P.V.G	CPATU 0060	B.P	P.P
Umidade	5,32 ± 0,1 a	5,43± 0,6 a	4,34± 0,1 b	6,06± 0,4 a	5,58± 01 a
Cinzas	2,75±0,1 a	3,09±0,1 b	2,46±0,1 c	3,54±0,1 d	3,13±0,1 a
Fibra bruta	3,57±0,8 a	4,39±0,5 a	3,70±0,3 a	3,52±0,1 a	3,84±0,1 a
Proteína	10,87±1,1 a	12,37±1,1 a	10,37±1,3 a	10,95±1,9 a	11,50±0,4 a
Lipídeos	17,09±0,7 a	17,53±3,7 a	19,05±1,5 a	18,15±0,1 a	19,67±1,5 a
Carboidratos	60,40 ±1,6 a	57,19±4,2 a	60,08±1,1 a	57,78±1,1 a	56,28±1,7 a

* P.V – *Piave vermelha*; P.V.G – *Piave vermelha gigante*; B.P – *Bico de pato I* e P.P – *Peruana paulista*. Os dados estão apresentados por média de amostras analisadas em triplicata mais desvio-padrão. Letras diferentes em uma mesma linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A composição centesimal dos vegetais é influenciada por variáveis incluindo, fatores ambientais, procedência dos genótipos, instabilidade apresentada por alguns componentes, métodos analíticos, podendo-se explicar a variação dos resultados obtidos quando comparados ao da literatura.

Os teores de umidade encontrados neste trabalho variaram entre 4,34 % e 6,06 %. CUSTODIO *et al.* (2002) encontraram teores semelhantes variando entre 6,5 % e 7,5 % de umidade.

Os teores médios de proteínas dos genótipos de urucueiros variaram entre 10,37 % e 12,37 %. Estes valores estão em conformidade aos encontrados por PEZZATO *et al.* (2004), os quais obtiveram 11,50 % em estudo relativo ao coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca e proteína bruta de onze alimentos, dentre eles estava incluído o urucum.

Para os valores de cinzas e carboidratos, os teores médios verificados neste trabalho foram de 2,99 % e 58,35 %, respectivamente. Enquanto, FRANCO (2007) encontrou valores médios de 4,6 % e 57,4 % para os teores de cinzas e carboidratos, respectivamente. Os teores de fibra bruta obtidos oscilaram entre 3,52 % e 4,39 % valores inferiores aos obtidos por FRANCO (2007) o qual obteve 12,6 %. A diferença entre esses teores pode ser atribuída ao método analítico empregado, bem como a variedade estudada.

Os teores de extrato etéreo variaram entre 17,09 % e 19,67 %. Valores em torno de 17,5 % para sementes de urucum foram encontrados por OLIVEIRA (2005).

4.2. Determinação de Carotenóides Totais (CT)

Os carotenóides são pigmentos naturais encontrados em frutas, vegetais, flores, dentre outros. O corante natural mais utilizado na IA brasileira é obtido a partir de sementes de urucum (GHIRALDINI, 1989), sendo que a bixina perfaz cerca de 80 % dos carotenóides encontrados nestas sementes (PRESTON e RICKARD, 1980). A estrutura da bixina que possui 25 carbonos e grupo carboxílico é muito diferente dos carotenóides usuais de alimentos (cadeia com 40 carbonos) e foi até o presente momento, encontrada apenas no urucum. Outros apocarotenóides em pequenas frações também foram encontrados somente nas sementes de urucum (JONDIKO e PATTENDEN, 1989; MERCADANTE *et al.*, 1997a, b).

Considerando que o urucum é fonte deste fitonutriente, foi realizada a análise para carotenóides totais nos genótipos estudados, estando os teores apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Teor de Carotenóides Totais (CT) (valores expressos em mg g⁻¹).

GENÓTIPOS	CAROTENÓIDES TOTAIS
<i>Piave vermelha (P.V.)</i>	12,60 ± 0,0 a
<i>CPATU 0060</i>	6,67 ± 1,6 b
<i>Piave vermelha gigante (P.V.G.)</i>	3,40 ± 0,1 c
<i>Bico de pato I (BP)</i>	3,79 ± 0,5 c
<i>Peruana paulista (PP)</i>	3,79 ± 0,2 c

Os dados estão apresentados por média de amostras analisadas em triplicata mais desvio-padrão. Letras diferentes em uma mesma coluna apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Os teores de CT encontrados neste trabalho variaram entre 3,79 e 12,60 mg g⁻¹, onde a variedade *Piave vermelha* apresentou um conteúdo maior dessas

fitomoléculas, diferindo estatisticamente das demais estudadas. Essa diferença já era prevista já que o colorífico é um produto composto pela mistura de fubá ou farinha de mandioca com urucum em pó ou seu extrato oleoso.

TOCCHINI e MERCADANTE (2001), determinaram por CLAE, os teores de bixina e norbixina em sete marcas de colorífico. Os teores de bixina variaram de 1,54 a 3,54 mg g⁻¹ e os de norbixina de 0,021 a 0,066 mg g⁻¹, que comparados aos teores das variedades *Piave vermelha gigante*, *Bico de pato I* e *Peruana paulista*, avaliadas neste trabalho, verifica-se uma grande proximidade (3,40; 3,79 e 3,79 mg g⁻¹, respectivamente).

WILBERG e RODRIGUEZ-AMAYA (1992), determinaram os carotenóides totais de sementes de urucum por CLAE, utilizando o método de padronização externa e adição de padrão, obtendo valores entre 2.370 e 6.370 mg g⁻¹. Neste trabalho, não foi efetuado o fracionamento dos carotenóides, sua quantificação foi determinada considerando o comprimento de onda máximo e o coeficiente de absorvidade recomendado para carotenóides não fracionados (HARRIS, 1977). Não obstante, a composição química de frutos pode ser afetada por diversos fatores, como época de colheita, método de análise empregada, condições edafoclimáticas, genótipos envolvidos, dentre outros. Deste modo, a influência destes fatores poderia também justificar a discrepância evidenciada entre os valores encontrados nestes dois estudos.

4.3. Determinação de Antocianinas e Flavonóis Totais

As antocianinas e os flavonóis são metabólitos secundários que pertencem ao grupo dos flavonóides e são responsáveis pela coloração que varia de vermelho vivo à violeta e de branco à amarelo claro, respectivamente (BOBBIO e BOBBIO, 1995).

Verifica-se na Tabela 5, que os valores encontrados para antocianinas totais em urucum variaram de 0,1069 à 0,3819 µg 100g⁻¹. As variedades *CPATU 0060*, *Piave vermelha gigante* e *Bico de pato I* se mostraram superiores, diferindo significativamente das variedades *Piave vermelha* e *Peruana paulista*.

Para os flavonóis totais, os teores ficaram entre 2,06 e 3,44 µg 100g⁻¹. A variedade *Piave vermelha* apresentou um maior teor de flavonóis totais, diferindo estatisticamente das demais variedades.

Tabela 5. Teores de Antocianinas Totais e flavonóis totais ($\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$) em urucum.

GENÓTIPOS	ANTOCIANINAS TOTAIS	FLAVONÓIS TOTAIS
<i>CPATU 0060</i>	0,3819 \pm 0,1 a	2,94 \pm 0,1 a
<i>Piave vermelha gigante</i> (<i>P.V.G</i>)	0,3004 \pm 0,1 a b	2,06 \pm 0,2 a
<i>Bico de pato I (BP)</i>	0,2240 \pm 0,1 a b	2,40 \pm 0,2 a
<i>Piave vermelha (P.V.)</i>	0,1324 \pm 0,1 c	3,44 \pm 0,3 b
<i>Peruana paulista (P.P)</i>	0,1069 \pm 0,1 c	1,53 \pm 0,1 c

Os dados estão apresentados por média de amostras analisadas em triplicata mais desvio-padrão. Letras diferentes em uma mesma coluna apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Na literatura, não foram encontrados estudos relacionados à quantificação de antocianinas e flavonóis totais em urucum. Apesar dos reduzidos teores encontrados neste trabalho, estudos sistematizados devem ser realizados para elucidações destas fitomoléculas bem como seu efeito sinérgico com outros fenólicos e carotenóides.

4.4. Determinação de Taninos Condensados (TC)

A diversidade na estrutura dos taninos, sua natureza polimérica e a escassez de padrões comerciais específicos são fatores que dificultam a quantificação dessas substâncias em alimentos (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2003).

Para a determinação dos TC foram utilizados dois métodos, empregando reagentes diferentes: vanilina e o butanol acidificado, ensaios analíticos rotineiramente usados para se quantificar esses compostos.

Os resultados obtidos para os TC, utilizando o método da vanilina (MV) oscilaram entre 227,78 e 371,93 mg 100 g⁻¹ conforme teores apresentados na Tabela 6. Enquanto que os TC quantificados pelo método do butanol ácido (MBA), os teores variaram entre 178,63 e 247,03 mg 100 g⁻¹.

Nota-se uma diferença significativa entre os dois métodos, o que já era previsto, uma vez que as análises se baseiam em princípios químicos específicos. Para o MV, a reação envolve uma reação do aldeído aromático (a vanilina) com um anel meta-substituído dos flavonóis, conferindo uma cor vermelha. O MBA está baseado na despolimerização oxidativa de TC em meio ácido (HAGERMAN, 2002).

Para o MV, a variedade CPATU 0060 apresentou um maior teor de TC, diferindo estatisticamente de todos os outros genótipos, enquanto a *Piave vermelha gigante* apresentou o menor teor de TC, também diferindo estatisticamente dos demais

genótipos. Apesar da variedade *Piave vermelha* apresentar uma maior quantidade de TC no MBA, não houve diferença significativa entre as demais variedades.

Tabela 6. Teores de Taninos Condensados (TC) pelo Método da Vanilina (MV) e pelo Método do Butanol Ácido (MBA) em sementes de urucum (valores expressos em mg 100g⁻¹).

GENÓTIPOS	TC (MV)	TC (MBA)
<i>CPATU 0060</i>	481,58± 19,00 a	178,63 ± 24,60 a
<i>Peruana paulista (PP)</i>	371,93± 14,60 b	218,59 ± 28,40 a
<i>Bico de pato I (BP)</i>	347,86± 11,80 b	215,96± 7,00 a
<i>Piave vermelha (P.V.)</i>	343,66± 13,20 b	232,58 ± 25,40 a
<i>Piave vermelha gigante (P.V.G)</i>	227,78± 1,50 c	212,18 ± 8,70 a

Os dados estão apresentados por média de amostras analisadas em triplicata mais desvio-padrão. Letras diferentes em uma mesma coluna apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05)

De acordo com AGOSTINI-COSTA *et al.* (2005), o maior inconveniente do método da vanilina é a sua especificidade reduzida, uma vez que esse reagente pode detectar tanto flavonóides monoméricos como poliméricos, sendo específico para um grupo limitado de compostos que apresentam uma ligação simples na posição 2, 3 e grupos hidroxila na posição alternada no anel A. Enquanto que o MBA, é reconhecidamente o melhor método para determinação de TC, em função da sua significativa seletividade, além do íon férrico conferir um aumento à reprodutibilidade e sensibilidade ao ensaio (HAGERMAN, 2002). Neste método, recomenda-se uma prévia despigmentação da amostra (PORTER, 1986) uma vez que a presença de pigmentos pode interferir sobremaneira na determinação desses compostos. Deste modo, este método é adequado para se quantificar os TC em genótipos de *B. orellana*, já que o urucum, é uma fonte potencial de pigmentos.

4.5. Determinação de Fenóis Totais (FT)

A extração com solventes orgânicos de alta polaridade (metanol, etanol e acetona) e água são freqüentemente utilizados para a extração dos compostos fenólicos (ANDREO e JORGE, 2006; PEREIRA, 2007; JARDINI e MANCINI FILHO, 2007). O etanol e a água são os solventes mais empregados para a extração de polifenóis totais por questões de baixa toxicidade.

Para a extração dos compostos fenólicos foram utilizados dois solventes: etanol PA e uma solução hidroetanólica (80:20, álcool etílico PA: água v.v⁻¹). Para a quantificação desses compostos, os mesmos foram determinados como miligramas (mg) de equivalente em ácido gálico (GAE) por 100 g de peso seco, por meio de curvas analíticas com coeficientes de determinação não inferiores a 0,9991.

Os teores de FT dos genótipos estudados obtidos a partir dos extratos etanólicos e hidroetanólicos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Teores de Fenólicos Totais nos Extratos Etanólicos (ET) e Hidroetanólicos (EHT) de urucum (valores expressos em mg GAE 100g⁻¹)

GENÓTIPOS	EHT	ET
<i>CPATU 0060</i>	1498,48± 141,50 a	450,97 ± 42,20 a
<i>Piave vermelha gigante</i> (P.V.G)	1280,72±14,57 a	310,85±45,87 a
<i>Peruana paulista</i> (P.P)	1024,98 ±33,29 a	382,21±69,72 a
<i>Bico de pato I</i> (BP)	821,15±54,10 a	389,99±22,02 a
<i>Piave vermelha</i> (P.V)	776,02±12,49 a	297,80±35,78 a

Os dados estão apresentados por média de amostras analisadas em triplicata mais desvio-padrão. Letras diferentes em uma mesma coluna apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Os extratos hidroetanólicos oriundo dos genótipos de urucueiro apresentaram teores de FT médios variando de 776,02 e 1498,48 mg GAE 100g⁻¹. Para os extratos etanólicos, os teores de FT variaram de 297,80 à 450,97 mg GAE 100g⁻¹.

A extração dos FT utilizando o etanol à 80 %, foi mais eficiente. Isso se deve a uma maior habilidade extrativa que a solução etanol-água tem, de extrair compostos fenólicos, já que a presença da água aumenta a eficiência de extração dessas substâncias com atividade antioxidante devido à sua polaridade (ANDREO e JORGE, 2006).

CARDARELLI e MERCADANTE (2006) quantificaram os FT utilizando o método do *Folin Ciocauteau* em diferentes extratos obtidos de sementes de urucum. Dentre os solventes testados, o extrato hidroetanólico e etanólico (50:50 v.v⁻¹) apresentaram um teor de FT de 156,50 e 109,80 mg GAE 100 g⁻¹, respectivamente. A discrepância entre os teores de FT pode ser devido à disposição das sementes (ocorrência da trituração e tamanho da partícula), método e tempo de extração utilizado, os genótipos envolvidos no estudo, dentre outros aspectos. BEAL (2006)

verificaram valores altos de FT em frações de gengibre, também determinado pelo método de *Folin Ciocalteu*, variando de 846,37 a 1409,05 mg GAE 100g⁻¹.

De acordo com SHAIIDI e NACZK (1995), é extremamente difícil selecionar a forma mais eficiente de se extrair esses compostos, que podem sofrer a influência de inúmeros fatores, a exemplo da matriz a ser analisada, o solvente extrator, o tamanho das partículas, o tempo e a temperatura de extração. Pesquisas têm sido realizadas buscando definir um sistema de extração com solvente que seja satisfatório para o isolamento de todos ou de classe específica de antioxidantes naturais. Entretanto, diversos fatores estão envolvidos, a exemplo da natureza química desses compostos nos alimentos que varia do simples ao altamente polarizado, a presença de diferentes quantidades desses compostos, além da possibilidade de interação dos mesmos com carboidratos, proteínas e outros componentes dos alimentos. Segundo ANDREO e JORGE (2006), procedimentos adicionais podem ser feitos para purificar o isolado e remover substâncias não-fenólicas. Por esse motivo, neste trabalho, os extratos foram clarificados para remoção de interferentes, segundo metodologia recomendada por FURLONG (2003), utilizando-se de solução de Ba (OH₂) 0,3 M e sulfato de zinco à 5 % e imediatamente filtrados em papel de filtro.

4.6. Determinação da Atividade Antioxidante (AA)

Os antioxidantes sintéticos estão limitados a um máximo de 200 mg/ kg pelos códigos bromatológicos de vários países, e tem sido freqüentemente monitorados devidos possíveis danos que podem provocar ao organismo (BABICH, 1992). Compostos como o β -caroteno agem inibindo a ação do ¹O₂ para evitar que a peroxidação lipídica ocorra. Outras substâncias fenólicas em alimentos, a exemplo dos flavonóides, podem minimizar os riscos causados pelo estresse oxidativo (RUFINO et al., 2006).

O sistema β -caroteno/ácido linoléico é composto pelo ácido linoléico, tween 40 e o β -caroteno. Trata-se de um ensaio espectrofotométrico baseado na co-oxidação do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico (SILVA et al, 1999), isto é, a análise avalia a atividade de inibição de RL produzidos durante a peroxidação do ácido linoléico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Neste trabalho, os extratos de urucum retardaram de forma significativa a descoloração do β -caroteno. Os dados relativos à medida da atividade antioxidante dos extratos de urucum estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Percentual de Inibição da Oxidação do β -caroteno dos Extratos Hidroetanólicos e Etanólicos de urucueiros.

GENÓTIPOS	EHT	ET
<i>Peruana paulista (P.P)</i>	48,31± 6,73 a	35,26 ± 3,56 a
<i>Piave vermelha (P.V)</i>	65,01 ± 1,98 a	34,54 ± 5,26 a
<i>Bico de pato I (BP)</i>	69,94 ± 7,22 a	33,37 ± 1,92 a
<i>Piave vermelha gigante (PV.G)</i>	55,32 ± 5,26 a	21,61 ± 1,26 a
<i>CPATU 0060</i>	70,1± 0,65 a	18,91± 3,34 a

Os dados estão apresentados por média de amostras analisadas em triplicata mais desvio-padrão. Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para os extratos hidroetanólicos, os valores da AA ficaram entre 48,31 % e 70,10 %. Enquanto que os extratos etanólicos, a medida da atividade variou de 18,91 % à 35,26 %. O extrato hidroetanólico da variedade *CPATU 0060* se mostrou superior frente às demais, apresentando um percentual de 70,10 % bem próximo do ácido gálico, um dos antioxidantes sintéticos utilizados como referência, cuja medida da atividade foi 71,01 %, conforme a Tabela 9. Essa capacidade antioxidante deste genótipo pode ser atribuída não apenas aos compostos fenólicos presentes, mas também a uma quantidade considerável de carotenóides totais apresentada pela mesma. Ainda na Tabela 9, verificamos que o antioxidante sintético (BHT) apresentou um percentual de inibição de 99,69 %.

Tabela 9. Percentual de inibição da oxidação do β -caroteno dos Antioxidantes Sintéticos

Antioxidantes Sintéticos	Atividade Antioxidante
Ácido Gálico	71,01 ± 1,68
BHT	99,69 ± 0,06

Os dados correspondem à média de amostras analisadas em triplicata mais desvio-padrão.

SILVA e TAKEMURA (2006) analisaram a AA de extratos hidroetanólicos (70:30, álcool etílico PA: água v.v⁻¹ e 50:50, álcool etílico PA: água v.v⁻¹, respectivamente) de *Vernonia condensata*, *Bixa orellana* e *Alternanthera brasiliana* usando o método DPPH. Os extratos de *V. condensata* e *B. orellana* mostraram significativa AA. O extrato hidroetanólico à 70 % do urucum se mostrou mais ativo quando comparado ao extrato à 50 %, com AA de 71,1 % e 43,4 %, respectivamente. Os autores atribuíram esse percentual de AA desses extratos, à presença de

flavonóides, taninos e esteróis, identificados através de análises fitoquímicas. Os valores encontrados neste trabalho se aproximaram dos valores verificados para os genótipos *Peruana paulista* e *CPATU 0060*.

Outro estudo envolvendo a medida da AA em *B. orellana* foi verificado por CARDARELLI e MERCADANTE (2006), onde extratos com diferentes polaridades foram testados, medindo a AA segundo o método do DPPH. Os valores para AA variaram entre 38 % e valores superiores à 100 %, para os extratos hidroetanólicos na proporção de 50 % (etanol-água) e etanólicos, respectivamente.

Não foram encontrados na literatura consultada, trabalhos utilizando o sistema β -caroteno/ácido linoléico para extratos de urucueiros, embora seja um método amplamente empregado.

Não foram encontrados na literatura consultada, trabalhos utilizando o sistema β -caroteno/ácido linoléico para extratos de urucueiros, embora seja um método amplamente empregado. Segundo CARPES (2008), o β -caroteno sofre uma descoloração acelerada na ausência de um antioxidante em função da oxidação associada entre β -caroteno e ácido linoléico e deste modo, geram RL.

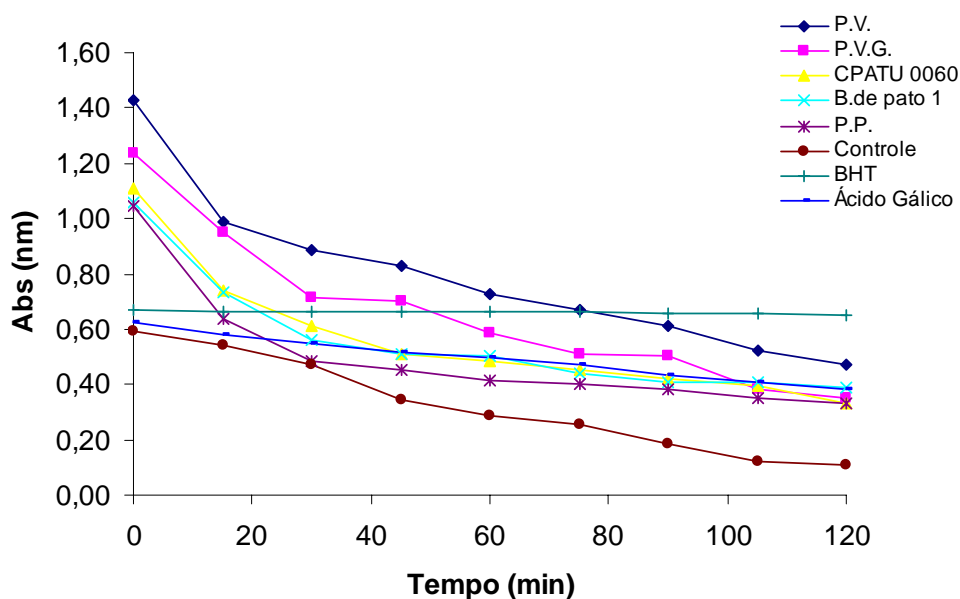


Figura 13. Comportamento da Curva de Inibição Oxidativa obtida no Sistema Modelo β -caroteno/ácido linoléico dos Extratos Etanólicos de Urucum.

As Figuras 13 e 14 demonstram o comportamento dos extratos etanólicos e hidroetanólicos, respectivamente, bem como dos antioxidantes sintéticos (BHT e ácido gálico) e o controle (amostra sem antioxidante) obtido durante o monitoramento das leituras das absorbâncias ao longo dos 120 min à uma temperatura de 50 °C em banho-maria. Os extratos tiveram um decaimento inferior ao controle e bastante parecido com o ácido gálico. Entretanto, o BHT se manteve constante, comprovando a

eficiência desse antioxidante sintético na oxidação do β -caroteno, frente aos extratos em estudo.

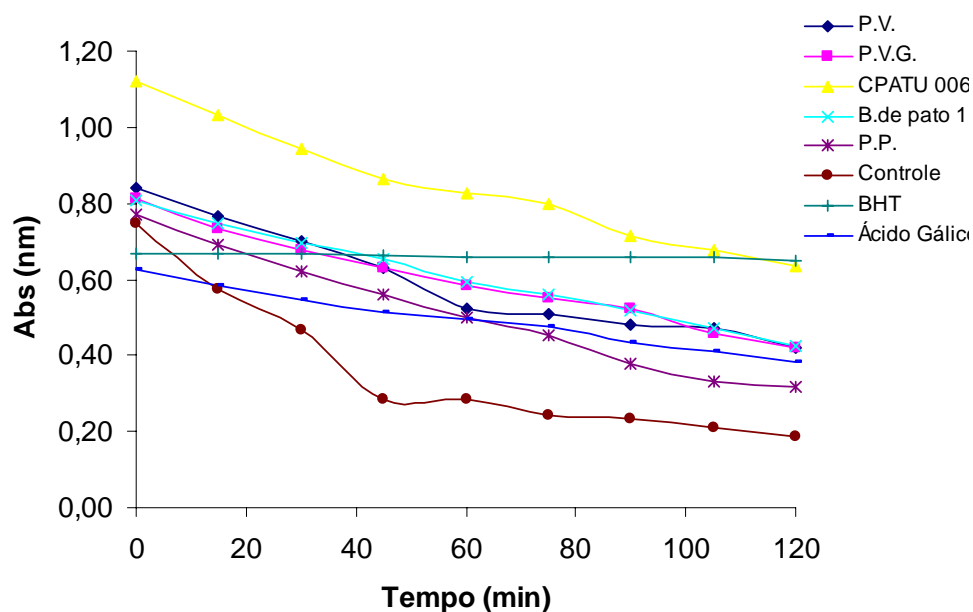


Figura 14. Comportamento da Curva de Inibição Oxidativa obtida no Sistema Modelo β -caroteno/ácido linoléico dos Extratos Hidroetanólicos de Urucum.

Inúmeros autores têm afirmado que existe uma correlação entre o teor de FT e a AA em frutas e hortaliças (KAUR e KAPOOR, 2002). Entretanto, outros autores não têm evidenciado esta correlação (ISMAIL *et al.*, 2004). A composição e a estrutura química do componente bioativo presente no extrato são fatores que contribui para a eficiência do antioxidante natural. A posição e o número de hidroxilas presentes nas moléculas dos polifenóis é um fator importante para esta atividade. Acredita-se que a orto-dihidroilação influencia positivamente para a atividade antioxidante do composto (SHAHIDI, 1992). Assim sendo, a AA de um extrato não pode ser apenas fundamentada no teor de fenólicos totais.

Observou-se uma correlação entre essas duas variáveis (FT e AA) para os extratos hidroetanólicos ($R = 0,8908$) e etanólicos ($R = 0,8690$). Os gráficos das correlações estão apresentados nas Figura 15 e 16.

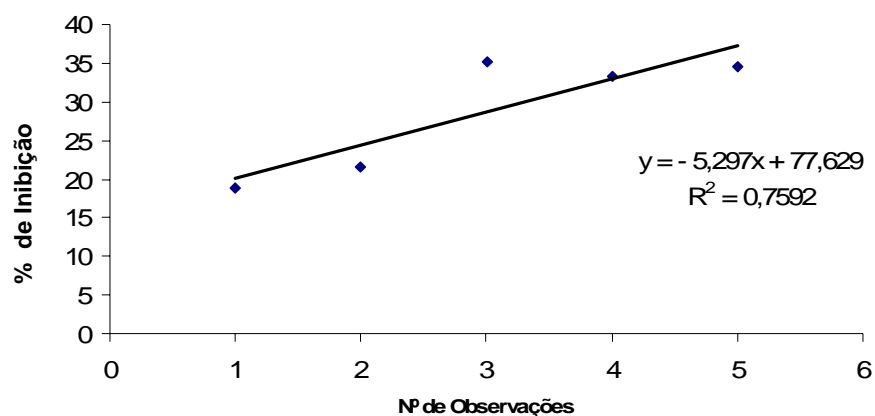


Figura 15. Correlação entre os Teores de FT e a Medida da AA dos Extratos Hidroetanólicos.

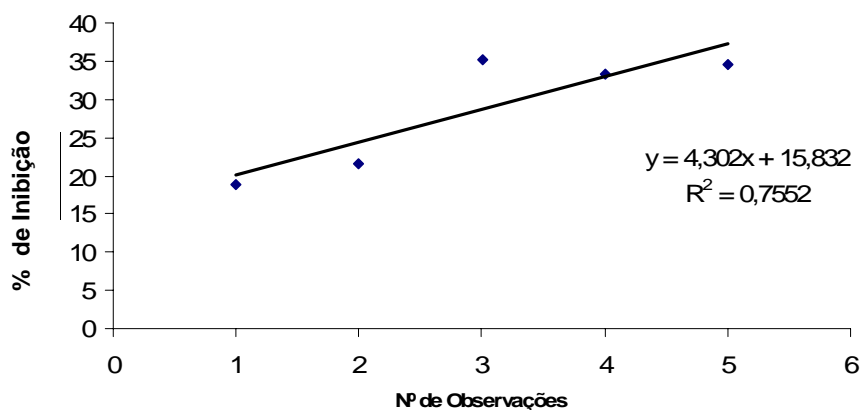


Figura 16. Correlação entre os Teores de FT e a Medida da AA dos Extratos Etanólicos.

Os coeficientes de correlação (R) e de determinação (R^2) para o extrato hidroetanólico de urucum se mostraram superiores quando comparados com MELO et al. (2006), que obtiveram $R = 0,6081/R^2 = 0,3697$ e $R = 0,5294/R^2 = 0,2803$ em extratos metanólicos com 0,1 mL e 0,2 mL de extrato de hortaliças, respectivamente, quando testaram os valores encontrados para a medida da AA no sistema modelo de oxidação do β -caroteno/ácido linoléico e o conteúdo de FT pelo método com RFC..

Segundo MELO *et al.* (2006), existe a possibilidade de fatores relativos ao cultivo do vegetal, a exemplo das condições edafoclimáticas, além das características genéticas da planta, influenciarem o perfil de compostos fenólicos dos extratos e, conseqüentemente, a sua ação antioxidante.

5. CONCLUSÕES

O presente estudo teve como objetivo caracterizar os cinco genótipos de urucueiros (*Piave vermelha*, *Piave vermelha gigante*, *CPATU 0060*, *Bico de pato I* e *Peruana paulista*) quanto às propriedades físico-químicas e bioquímicas, e avaliar a atividade antioxidante (AA) em um sistema modelo β -caroteno/ácido linoléico

Os extratos obtidos a partir dos solventes etanólico PA e hidroetanólicos (80:20, v.v⁻¹) etanol:água foram determinados os fenóis totais (FT) utilizando o método de Folin-Ciocalteu. Os resultados obtidos da extração sólido-líquido, utilizando solução hidroetanólica (80:20, v.v⁻¹) etanol:água variaram entre 776,02 à 1498,48 mg GAE por 100 g de amostra (peso seco), sendo que o maior teor foi verificado no genótipo CPATU 0060. Valores inferiores foram observados para a extração utilizando etanol PA 297,08 à 450,97 mg GAE 100g⁻¹, provavelmente, devido a capacidade extrativa deste solvente nas condições testadas

Como aporte à quantificação dos FT foram determinados os teores de antocianinas totais, flavonóis totais, taninos condensados (método da vanilina e método do butanol ácido), onde os resultados obtidos variaram respectivamente entre, 0,1069 e 0,3819 $\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$; 1,53 à 3,44 $\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$, 227,70 à 481,58 mg 100g⁻¹ e 176,63 à 232,58 mg 100g⁻¹. Os carotenóides totais também foram determinados e seus teores variaram entre 3,40 a 12,60 mg g⁻¹.

A medida da AA variou entre 48,31 % e 70,10 % para os extratos hidroetanólicos e 18,91 % à 35,26 % para atividade antioxidante dos extratos etanólicos. Quanto à medida da AA o genótipo CPATU 0060 apresentou maior capacidade em inibir a oxidação lipídica no sistema modelo β -caroteno/ácido linoléico em relação aos demais genótipos testados, provavelmente, devido ao tipo e natureza química dos fenólicos presentes nesta matriz, merecendo atenção na elucidação e identificação das estruturas químicas dos compostos fenólicos presentes neste genótipo.

Foi observada correlação linear entre o conteúdo de FT e AA para extratos hidroetanólicos (R = 0,8908) e extratos etanólicos (R = 0,8690).

Vale ressaltar que as informações obtidas neste trabalho contribuirão para investigações sistemáticas dos fenólicos totais nesses grãos, considerando as numerosas evidências sobre as destacadas atividades biológicas destas fitomoléculas, além de abrir um amplo campo de pesquisa, considerando a escassez de estudos relativos a estes fitonutrientes presentes nos grãos desta especiaria. Os resultados sugerem que os grãos do urucum podem ser considerados uma fonte potencial de antioxidante natural e seu uso deve ser estimulado.

6. PERSPECTIVAS

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, apresentamos algumas perspectivas para investigações posteriores:

- Realizar estudos visando elucidar e identificar as estruturas químicas dos compostos fenólicos com potencial antioxidante presentes nos extratos analisados;
- Investigar o efeito dos extratos obtidos, associados ou isoladamente, com antioxidantes sintéticos em produtos alimentícios, monitorando a estabilidade oxidativa;
- Realizar teste de citotoxicidade dos extratos obtidos.

REFERÊNCIAS

- ABEROUMAND, A.; DEOKULE, S. S. Comparison of phenolic compounds of some edible plants of Iran and India. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 7, p. 582-585, 2008.
- ADDIS, P. B. Occurrence of lipid oxidation products in foods. **Food Chem Toxicol**, v. 24, p. 1021-30, 1986.
- ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: O Instituto, 1985. v. 1, 533 p.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA – ANVISA, Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=14796&word=>>>, Acessado em 09/05/07.
- AGOSTINI-COSTA, T. de S.; LIMA, A., LIMA, M. V. Determinação de tanino em pedúnculo de caju: método d vanilina versus métodos do butanol ácido. **Química Nova**, v. 26, p. 763-765, 2003.
- ANDREO, D.; JORGE, N. **Antioxidantes naturais: técnicas de extração**. B.CEPPA, Curitiba, v. 24, p. 319-336, 2006.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S., ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, 127, p. 183 – 198, 2002.
- AOAC, Association of Official Agricultural Chemists. Official methods of analysis. 16^a ed., 3^a rev. Gaithersburg: Published by AOAC International.. v.2, cap. 32, p.1-43, 1997
- AOAC, Association of Official Agricultural Chemists. Official methods of analysis. Arlington: **AOAC**, v. 2, cap. 39, p.13-15, 1995
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 2.ed. Viçosa: UFV, 1999. 65p.
- ARAÚJO, J. M. A.; SILVA, M. V.; CHAVES, J. B. P. Supercritical fluid extraction of daidzein and genistein isoflavones from soybean hypocotyl after hydrolysis with endogenous b-glucosidases. **Food Chemistry**, v. 105, p. 266–272, 2007.
- ARTS, M. J. T. J.; HAENEN, G. R. M. M.; VOSS, H., BAST, A. Antioxidant capacity of reaction products limit the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 45 - 49, 2004.
- BABICH, H. Butylated hydroxytoluene (BHT): a review. **Environmental Research**, v.29, p.1-29, 1992.
- BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; STOHS, S. J.; DAS, D. K.; RAY, S. D., KUSZYNSKI, C. A., JOSHI, S. S., PRUESS, H. G. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. **Toxicology**, v. 148, p. 187-97, 2000.

BARNES, S.; KIRK, M.; COWARD, L. Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC-MS. **J. Agr. Food. Chem.**, v. 42, p. 2466-2474, 1994.

BARTSCH, H.; NAIR, J. Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis, **Cancer Detect Prev**, v. 28, p. 385-91, 2004.

BEAL, B. H. **Atividade Antioxidante e Identificação dos Ácidos Fenólicos do Gengibre (*Zingiber officinale*)**. 2006. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BEAL, M.F. Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. **Ann New York Acad Sci**, v. 991, p. 120-31. 2003.

BIRCH, A.E.; FENNER, G. P.; WATKINS, R.; BOYD, L. C. Antioxidant proprieties of evening primrose seed extracts. **J. Agric. Food Chemistry**, v.49, p. 4502-4507, 2001.

BOBBIO, F. O., BOBBIO, P. A. **Química do Processamento de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2001.

_____. **Introdução à química de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela, 1995. 222p.

BONNEFOY, M.; DRAI, J.; KOSTKA, T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. **Presse Medicale**, v. 31, p. 1174-1184, 2002.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Meth Enzymol**, v. 186, p. 343-355. 1990.

BREINHOLT, V.; LARSEN, J.C. Detection of weak estrogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF7 cell proliferation assay. **Chem Res Toxicol**, v.1, p. 622-629, 1998.

BRENNA, O.V.; PAGLIARINI, E. Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **J. Agric. Food Chemistry**, v.49, p. 4841-4844, 2001.

CANNON, R. O. Mechanisms, management and future directions for reperfusion injury after acute myocardial infarction. **Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.**, v. 2, p. 88-94, 2005.

CARDARELLI, C. R. e MERCADANTE, A. Z. Propriedades Antioxidantes e de Cor de Extratos de Urucum. **Congresso Interno de Iniciação Científica**. UNICAMP: Campinas, 2006.

CARPES, S. T. **Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região Sul do Brasil**. 2008. 255p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CARVALHO, P. R. N. Urucum: avanços tecnológicos e perspectivas, **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 49, p. 71-73, 1999.

CHIANG, W.D.; SHIEH, C.J.; CHU, Y.H. Optimization of acid hydrolysis conditions for total isoflavones analysis in soybean hypocotyls by using RSM. **Food Chem**, v. 72, p. 499-503, 2001.

CHIPAULT, J. R.; MIZUN, G.H.; HAWKINS, J.M.; LUNDBERG, W.O. The antioxidant properties of natural spices. **Food Research**, v. 17, p. 46-55, 1952.

CRISTIAN HANSEN. {2007?}. Disponível em:
<http://www.ital.sp.gov.br/quimica/eventos/2007/cadeia_produtiva/palestras_urucum/palestra%203.pdf. Acessado em 06/2008.

COSTA, C. K. **Estudo Fitoquímico de *Bixa Orellana* L., Bixaceae e Aplicação de seu Óleo em Formulação Cosmética**. 2007. 115p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR.

CUSTODIO, C. C.; MACHADO-NETO, N. B.; CASEIRO, R. F.; IKEDA, M., BONFIM, D. C. Germinação de Sementes de Urucum (*Bixa orellana* L.), **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, p.197-202, 2002.

DEVASAGAYAM, T.P.; TILAK, J.C.; BOLOOR, K.K.; SANE, K.S.; GHASKADBI, S.S.; LELE, R.D. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **J. Assoc. Physicians India**, v. 52, p. 794-804, 2004.

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

DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 274, p. 532-538, 1989.

DINIZ, A. C. B. D.; ASTARITA, L. V., SANTAREM, E. R. Alteração dos metabólitos secundários em plantas de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento. **Acta Bot. Brás**, v. 21, p. 443-450, 2007.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema b-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p. 446-452, 2006.

DURÁN, R.M.; PADILLA, B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos, **Grasas y Aceites**, v. 44, p.101-106, 1993.

EMMONS, C.L.; PETERSON, D.M. Antioxidant activity and phenolic contents of oat groats and hulls. **Cereal Chem**, v. 76, p. 902-906, 1999.

ESCARPA, A.; GONZALEZ, M. C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in Foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, p. 57-139, 2001.

FENNEMA, O. R. **Química dos alimentos**. Zaragoza: Acribia. 2000, 1095p.

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. Tyrosine and tryptophan determinations proteins. **J. Biol. Chem**, v.73, p. 627-649, 1927.

FONTANA, J. D., MENDES, S. V., PERSIKE, D. S., PERACETTA, L. F., PASSOS, M. Carotenóides. **Biociência, Ciência & Desenvolvimento**. v.2, p. 40-45, 2000.

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins, In: MARKAKIS, P. **Anthocyanins as Food Colors**. New York: Academic Press, 1982. p. 182-205.

_____. Food colorants: anthocyanins. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, v. 28, p. 273-314, 1989.

FRANCO, C. F. de O. **Mercado de Urucum (*Bixa orellana*) no Brasil**. [2002?]. Disponível em: <http://www.emepa.org.br/uruum_mercado.php>. Acessado em: 31/05/08.

FRANCO, C. F. de O. O Agronegócio do Urucum na Região Nordeste. **1ª Reunião Nacional da Cadeia Produtiva de Urucum**. 2007. CD-Rom.

FRANKEL, E. N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. **Food Sci. Technol**, v. 4, p. 220-225, 1993.

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

FOOTE, C.S.; DENNY, R.W. Chemistry of singlet oxygen quenching by β -carotene. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 90, p. 6233-5, 1968.

FURLONG, E.B.; COLLA, E.; BORTOLATO, D. S.; BAISCH, A.L. M.; SOUZA-SOARES, L.A. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Vetor**, v.13, p. 105-114, 2003.

GARCIA, E. S.; SILVA, A. C. P.; GILBERT, B.; CORRÊIA, C. B. V.; CAVALHEIRO, M. V. S.; SANTOS, R. R.; TOMASSINI, T. Biodiversidade: Perspectivas e Oportunidades Tecnológicas. **Produtos Naturais e Saúde**, 1994. Disponível em: <<http://bdt.fat.org.Br/publicações/padct/bio>>. Acessado em 04/05/08.

GERMAN, J. B. Food processing and lipid oxidation. **Adv. Exp. Med. Biol**, v. 459, p. 23 - 50, 1999.

GINSBURG, G.; O'TOOLE, M.; RIMM, E.; DOUGLAS, P.S.; RIFAI, NADER. Gender differences in exercise-induced changes in sex hormone levels and lipid peroxidation in athletes participating in the Hawaii Ironman triathlon Ginsburg-gender and exercise-induced lipid peroxidation. **Clinica Chimica Acta**, v. 305, p. 131-139, 2001.

GHIRALDINI, J. E. Mercado de corantes naturais. **I Simpósio Internacional de Urucum**, Campinas, SP, Brasil, p. 79-83, 1989.

GIROTTI, A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. **J. Lipid Res**, v. 39, p. 1529-42, 1998.

GRAZZIONI, D. S.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.41, p. 95-100, 2005.

- GRAY, J.L.; GOMAA, E.A.;BUCKLEY, D.J. Oxidative quality and shelf life of meats. **Meat Science**, v.43, p. 111-113, 1996.
- HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. **J. Chem. Ecol.**, v.15, p.1795-1810, 1989.
- HALLIWELL, B. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. **Biochem Pharmacol**, v. 49, p. 1341-1348, 1995.
- HAMID, A. A.; SHAH, Z. M.; MUSE, R.; MOHAMED, S. Characterisation of antioxidative activities of various extracts of *Centella asiatica* (L) Urban. **Food Chemistry**, v. 77, 2002, p. 465-469
- HARBORNE, J.B. **Flavonoids: advances in research since 1986**. London: Champman and Hall, 1994.
- HARMAN, D. Free radical involvement in aging. Pathophysiology and therapeutic implications. **Drugs aging**, v. 3, p. 60-80, 1993.
- HARRIS, R.S. **Effects of agricultural practices on foods of plant origin**. Connecticut: Avi Publishing, 1977. Cap.6, p.33-57.
- HASENHUETTL, G. L.; WAN, P.J. Temperature effects on the determination of oxidative stability with the metrohm rancimat. **J. Am. Oil Chemists' Society**, v. 69, p.525-527, 1992.
- HELDT, H. **Plant Biochemistry and Molecular Biology**, University Press:Oxford, 1997.
- HENDRICH, S. Bioavailability of isoflavonas. **Journal of Chromatography B**, v. 777, p. 203-210, 2002.
- HILLIS, W. E.; SWAIN, T. J. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. II. The analysis of tissues of the victoria plum tree. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, p. 135-144, 1959.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, .R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food Chem**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.
- ISMAIL, A.; MARJAN; Z.M.; FOONG, C.W. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. **Food Chem**, v. 87, p. 581-586, 2004.
- JARDINI. F. A.; MANCINI FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 43, p. 137-147, 2007
- JONDIKO, I. J. O.; PATTENDEN, G. Terpenoids and an apocarotenoids from seeds of *Bixa orellana*. **Phytochem**. v. 28, p. 3159-3162, 1989.
- KAHKONEN, M.P.; HOPIA, A.I.; VUORELA, H.J.; RAUHA J.P., PIHLAJA, K.; KUJALA, T.S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem**, v. 47, p. 3954-3962, 1999.
- KANNER. J.; ROSENTHAL. An assessment of lipid oxidation in foods. **Pure & App. Chern**, v. 64, p. 1959 - 1964, 1992.

- KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. R. Carotenoid composition of hydroponic leafy vegetables. **J. Agric. Food Chemistry**, v.51, 2603-2607, 2003.
- KIOKIAS, S.; GORDON, M. H. Antioxidant Properties of Annatto Carotenoids. **Food Chemistry**, v. 83, p. 523-529 , 2003.
- KOO, H.M.; SUHAILA, M. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. **J. Agric. Food Chemistry**, v.49, p. 3106-3112, 2001.
- KOZLOWSKA, H.; ROTKIEWICZ, D. A.; ZADERNOWSKI, R.; SOSULSKI, F. W. Phenolic acids in rapeseed and mustard. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 60, p. 1119 – 1123, 1983.
- KROON, P. A.; WILLIAMSON, G. Hydrocinnamates in plant and food: current and future perspectives. **J. Sci. Food Agric**, v. 79, p. 355-361, 1999.
- KUNTZ, S.; WENZEL, U.; DANIEL, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. **Eur J Nutr** , v. 38, p. 133- 142, 1999.
- KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **Int. J. Food Sci. Technol**, v. 37, p. 153-161, 2002.
- LEE, E.C. e MIN, D.B. Quenching mechanism of β -carotene on the chlorophyll sensitized photooxidation of soybean oil. **J. Food Sci**, Chicago, v. 53, p. 1894-5, 1988.
- LEE, Y.; HOWARD, L. R.; VILLALON, B. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. **Journal Food Science**, v. 60, p, 473-476, 1995.
- LEES, D. H.; FRANCIS, F. J. Standardization of pigment analyses in cranberries. **HortScience**, v.7, p. 83-84, 1972.
- LESLIE, K.; BLAY, R.; HAISCH, C.; LODGE, A.; WELLER, S. Clinical and experimental aspects of viral myocarditis. **Clinical Microbiology Review**, v. 2, p. 191-203, 1989.
- MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, p. 237-243, 2000.
- MACHEIX, J. J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. **Fruit phenolics**. Boca Raton: CRC Press, 1990. 378 p.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMENEZ ,L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr**, v.79, p. 72-747. 2004.
- MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 45, p. 594-598, 1968.

- MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, CULEBRAS, M.J.; TUÑÓN, M. A. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutr Hosp**, v.17, p. 271-278, 2002.
- MARTÍNEZ-TOMÉ, M.; JIMÉNEZ, A. M.; RUGGIERI, S.; FREGA, N.; STRABBIOLI, R.; MURCIA, M. A. Antioxidant properties of mediterranean spices compared with common food additives. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 1412-1419, 2001.
- MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Conteúdo de Miricetina, Quercetina e Kaempferol em Chás Comercializados no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, p. 380-385, 2006.
- MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Isolation and identification of new apocarotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. **J. Agric. Food. Chem.** V. 45, p. 1050-1054, 1997a.
- MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Isolation and structure elucidation of minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. **Phytochem.** v. 46, p. 1379-1383, 1997b.
- MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da SBCTA**, v. 36, p. 1-11, 2002.
- MELO, E. de A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; LEAL, F. L. L.; CAETANO, A. C. da.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, p. 639-644, 2006.
- MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 48, p. 91, 1971.
- MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P. de., AMORIM, E. L. C. de. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**. v. 28, p. 892-896, 2005.
- MOREIRA, A. V. B.; MANCINI FILHO, J. . Lípides em Alimentação e Nutrição. **Laes & Haes**, São Paulo, v. 01, p. 68-92, 2003.
- MURGA, R.; SANZ, M.T.; BELTRÁN, S.; CABEZAS, J.L. Solubility of some phenolic compounds contained in grape seeds, in supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 23, p. 113-121, 2002.
- NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Critical Rev. Food Science Nut.** v. 29, p. 273-9, 1990.
- NARENDHIRAKANNAN, R. T.; SUBRAMANIAN, S.; KANDASWAMY, M. Free radical scavenging activity of *Cleome gynandra* L. leaves on adjuvant induced arthritis in rats. **Mol Cell Biochem**, v. 276, p. 71- 80. 2005.
- NGUYENLE, T.; WANG, E.; CHEUNG, A. An investigation on the extraction and concentration of isoflavones in soy-based products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, p. 221-232, 1995.
- NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.; HOORN, P. G. B.; NORREN, K.; LEEUWEN, K. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418-425, 2001.

- OLIVEIRA, J. S. de. **Caracterização, Extração e Purificação por Cromatografia de Compostos de Urucum (*Bixa orellana* L.)**. 2005. 215p. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- PARK, Y.K.; KOO, M.H.; CARVALHO, P.O. Recentes progressos dos alimentos funcionais. **Boletim da SBCTA**, v. 31, p. 200-206, 1997.
- PEREIRA, M. C.; GULARTE, J. P.; VIZZOTTO, M. Otimização do processo de extração de compostos fenólicos antioxidantes de amora-preta (*Rubus* sp.). In: **XVI Congresso de Iniciação Científica da UFPEL**, 2007, Pelotas.
- PEZZATO, L. E.; MIRANDA, E. C. de.; BARROS, M. M.; PINTO, L. G. Q.; FURUYA, W. M. Digestibilidade aparente da matéria seca e da proteína bruta e a energia digestível de alguns alimentos alternativos pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 26, p. 329-337, 2004.
- POKORNÝ, J. Natural antioxidants for food use. **Trends in Food Sci. Technol**, v. 2, p. 223-227, 1991.
- PORTER, L. J.; HRSTICH, L. N., CHAN, B. G. **The conversion of procyanidins and prodelfphinidins to cyaniding and delphinidin**. *Phytochemistr*, v. 25, p.223-230, 1986.
- PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the Determination of antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **J. Agric. Food Chem**, v. 53, p. 4290-4302. 2005.
- QUEIROZ, C. R. A. dos A., MORAIS, S. A. L. de., NASCIMENTO, E. A. do. Caracterização dos Taninos da Aroeira-Preta (*Myracrodruon urundeuva*). **R. Árvore**, Viçosa-MG, v.26, p.485-492, 2002
- RABAUD, C.; TRONEL, H.; FREMONT, S.; MAY, T.; CANTON, P.; NICOLAS, J.P. Free radicals and HIV infection. **Ann. Biol. Clin**, v. 55, p. 565-71, 1997.
- RAJENDRAN, S. L.; DEEPALASHMI, P. D.; PARASAKTHY, K.; DEVAARAJ, J. H.; DEVARAJ, S. N. Effect of tincture of carataegus on the LDL-receptor activity of hepatic plasma membrane of rats fed an atherogenic diet. **Atherosclerosis**, v. 123, p. 235-241, 1997.
- REVILLA, E.; RYAN, J. M.; MARTIN-ORTEGA, G. Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grape, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 46, p. 4592-4597, 1998.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids Free Radic. **Biol. Méd.**; v. 20, p.933-56, 1997
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Latin american food sources of carotenoids, **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 49, p. 74- 84, 1999.
- ROVER JUNIOR, L.; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutadiona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.

- RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. da; MANCINI FILHO, J.; MOREIRA, A. V. B. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas no sistema β -caroteno/ácido linoléico. **Comunicado Técnico EMBRAPA**, n. 126: Fortaleza, 2006.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**. Wadsworth Publishing Company, Belmont, California, USA 1992, p.323-325.
- SALUNKHE, O. K.; CHAVAN, J. K. e KADAM, S. S. **Dietary Tannins: Consequences and Remedies**. CRC Press, Boca Raton, FL, 1989.
- SAMMAN, S.; LYONS, P. M.; COOK, N. C. Flavonoids and coronary heart disease: Dietary perspectives. In: EVANS, C. A. R.; PACKER, L. **Flavonoids in Health and Disease**. New York: Marcel Dekker, 1998, p. 469-482.
- SÃO JOSÉ, A. R. **Sustentabilidade do Agronegócio de Corantes Naturais de Urucum (*Bixa Orellana* L.) no Brasil**. Anais do Simpósio Brasileiro de Urucum. 2006.
- SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 45, p. 287-306, 2005.
- SELLAPPAN, S.; AKOH, C. C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. **J. Agric. Food Chemistry**, Chicago: v.50, p. 2432-2438, 2002.
- SETCHELL, K.D.R.; WELSH, M.B. High-performance liquid chromatography analysis of phytoestrogens in soy protein preparations with ultraviolet, electrochemical and thermospray mass spectrometric detection. **Journal Chromatography**, v. 386, p. 315-323, 1987.
- SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Food Sci. Nutr.**, v. 32, p. 67-103, 1992.
- SHAHIDI, F.; ALASALVAR, C.; LIYANA-PATHIRANA, C. M. Antioxidant Phytochemicals in Hazelnut Kernel (*Corylus avellana* L.) and Hazelnut Byproducts. **J. Agric. Food Chem**, v. 55, p. 1212-20, 2007.
- SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic Publishing, 1995. p. 281-319.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defence: review, **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.215, p.213-219, 1993.
- SILBERBERG, M.; MORAND, C.; MATHEVON, T.; BESSON, C.; MANACH, C.; SCALBERT, A.; REMESY, C. The bioavailability of polyphenols is highly governed by capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. **Eur. J. Nutr**, v.45, p. 88-96, 2006.
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. de. **Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Editora UFV: Viçosa-MG, 2002. 235p.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, p. 94-103, 1999.

SILVA, V. T. B.; TAKEMURA, O. S. Determinação da Atividade Antioxidante de Extratos Hidroalcoólicos de *Vernonia condensata* (Asteraceae), *Bixa orellana* (Bixaceae) e *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae). **Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC**. Florianópolis, 2006.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Am. J. Enol.Viti**, v.16, p.144-158, 1965.

SOLARZANO, G. R. de. **El cultivo de onoto em Venezuela**. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuárias, Venezuela, n. 36, abr./jun. 1991. CD-Rom

SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. **Journal of Agricultural e Food Chemistry**, v.38, p. 1565-1571,1990.

SPITELLER, G. The relation of lipid peroxidation processes with atherogenesis: a new theory on atherogenesis. **Mol Nutr Food Res**, v. 49, p. 999 -1013, 2005.

ST ANGELO, A. J. Lipid oxidation on foods. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 36, p. 175-224, 1996.

STRINGHETA, P. C. Compostos Bioativos em Alimentos. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, 2004. Disponível em:
<http://www.biotecnologia.com.br/biochat/artigos/artigo.asp?id=50>. Acesso em 06/06/08

SUHAIJ, M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 531-537, 2006.

SZPRINGER, E.; LUTNICKI, K., MARCINIAK A. Photodynamic therapy-mechanism and employment. **Ann Univ Mariae Curie Sklodowska**, v. 59, p. 498-502, 2004.

TAWFIK, M.S.; HUYGHEBAERT, A. Interaction of packaging materials and vegetable oils: oil stability. **Food Chem**, v. 64, p.451- 459, 1997.

THOMAS, S.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Role of intestine in postsurgical complications: involvement of free radicals. **Free Radic Biol Med**, v. 15, p. 745-56. 2004.

TIITTO-JULKUNEM, R. Phenolic constituents in the leaves of Northern Willows: methods for the analysis of certain phenolics. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, v.33, p.213-217, 1985.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. Extração e determinação por CLAE de bixina e norbixina em coloríficos. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. v.21, p. 310-313, 2001

WANG, H.J.; MURPHY, P.A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year and location. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 42, p. 1674-1677, 1994.

WARNER, K.; FRANKEL, E.N. Effects of β -carotene on light stability of soybean oil. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 64, p. 213-8, 1987.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1994.

WETTASINGHE, M., SHAHIDI, F. Evening Primrose Meal: A Source of Natural Antioxidants and Scavenger of Hydrogen Peroxide and Oxygen-Derived Free Radicals. **J. Agric. Food Chem**, v. 47, p. 1801-1812, 1999.

WILBERG, V. C.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantificação dos carotenóides de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Rev. Bras. Cor. Nat**, v. 1, p. 145-152, 1992.

WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. **Am. J. Clin. Nutr**, v. 81, p. 243–255, 2005.

WROLSTAD, R. E. **Colors and pigment analysis in fruit products**. Corvallis: Oregon Agricultural Experimental Station, 1976. 17 p.

YEN, WEN-JYE; WANG, BOR-SEN.; CHANG, LEE-WEN.; DUH, PIN-DER. Antioxidant properties of roasted coffee residues. **J. Agric. Food Chem**, v.53, p.2658-2663, 2005.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **J. Agric. Food Chem**, v. 49, p. 5165-5170, 2001.

ZHU, X.; SMITH, M.A., PERRY, G., ALIEV, G. Mitochondrial failures in Alzheimer's disease. **Am J Alzheimers Dis Other Demen**, v.19, p. 345-352, 2004.