



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

LORENA PEDREIRO MACIEL

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS
FENÓLICOS PADRÕES E SUAS MISTURAS POR DISTINTOS
MÉTODOS ANALÍTICOS

BELÉM

2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Lorena Pedreiro Maciel

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS
FENÓLICOS PADRÕES E SUAS MISTURAS POR DISTINTOS
MÉTODOS ANALÍTICOS

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Hervé Rogez

Belém
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Lorena Pedreiro Maciel

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS FENÓLICOS
PADRÕES E SUAS MISTURAS POR DISTINTOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

DATA DA AVALIAÇÃO:

CONCEITO: _____

Banca Examinadora

Profº Dr. Hervé Rogez

(FEA/ ITEC/UFPA – Orientador)

Profº Dr. Evaldo Martins da Silva

(PoGAL/UFPA - Membro)

Profº Dr. Milton Nascimento da Silva

(FQ/ICEN/UFPA - Membro externo)

AGRADECIMENTOS

A minha família que me dá o apoio que preciso. Amo muito vocês e como dizia Clarisse Lispector “amar os outros é a única salvação individual que conheço: ninguém estará perdido se der amor e às vezes receber amor em troca”, por isso, obrigado!

Ao professor Hervé Rogez, pelo seu acompanhamento científico valioso e pela paciência.

Aos funcionários e professores da FEA, pela ajuda durante esses anos.

Aos professores Jesus Souza e Evaldo Martins, pelos ensinamentos preciosos e pela amizade.

Ao professor José Pio e ao discente Fabrício Quadros da Faculdade de Química da UFPA, pela disponibilidade e ajuda na realização de parte importante deste trabalho.

Ao professor José Carlos da Faculdade de Engenharia Química da UFPA, pela assistência nas análises eletroquímicas.

Aos amigos Anne Suellen, Camila Bastos, Thais Franco, Evelyn Damasceno, Victor Lamarão, Barbara Siqueira, Alessandra Eluan e Nay Tavares pela valiosa amizade, estando ao meu lado nos momentos em que precisei.

Àos membros da nata do LEQ Anderson Pereira, Carissa Bichara, Fagner Aguiar, Ivonete Quaresma, Darly Pompeu, Diego Aires, Leandro Marinho, Fábio Moura e Antonio que me proporcionaram belos momentos de descontração.

E aos colegas da Usina de alimentos: Socorro, Jonas, Sthephano, Carol, Tati, Priscila, Marília e Rogério.

Tudo o que existe é de uma grande exatidão. Pena é que a maior parte do que existe com essa exatidão nos é tecnicamente invisível. O bom é que a verdade chega a nós como um sentido secreto das coisas. Nós terminamos adivinhando, confusos, a perfeição. (Clarisse Lispector).

RESUMO

Um estudo comparativo da atividade antioxidante de seis compostos fenólicos padrões de diferentes classes e suas misturas foi realizado por distintos métodos analíticos. Utilizou-se um planejamento experimental de misturas do tipo Simplex Centróide com concentração total de compostos fenólicos de 1mM. A atividade antioxidante foi avaliada pelas metodologias de Folin-Ciocalteu (FC), do seqüestro do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH), do TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), do ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) e pela determinação do potencial de oxidação por voltametria cíclica. A partir dos resultados obtidos, pôde-se afirmar que os flavonóides são mais antioxidantes que os ácidos fenólicos e que o meio reacional da técnica analítica afeta significativamente a reatividade dos compostos. Os potenciais de oxidação observados para a quercetina (0,616V) e para o ácido ferrúlico (0,916V), de alta e baixa atividade antioxidante, respectivamente, confirmaram que quanto menor o potencial maior a força antioxidante do composto. Os métodos ORAC e FC apresentaram a menor e a maior reprodutibilidade, respectivamente. Evidenciou-se que a expressão do conteúdo total de compostos fenólicos pelo método de FC em um único composto fenólico pode ser importante fonte de erro, além de ser pouco sensível às interações. Foram observadas algumas correlações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os métodos, porém relativamente fracas, reforçando a necessidade da utilização de no mínimo dois métodos para a avaliação da atividade antioxidante. Interações entre compostos fenólicos foram detectadas pelos métodos TEAC, DPPH e ORAC e modificações nos espectros de absorção das misturas reforçaram a teoria da existência de sinergismo e antagonismo.

ABSTRACT

A comparative study of the antioxidant activity of six standards of phenolic compounds of different classes and their mixtures was performed by different analytical assays. An experimental design of mixtures of Simplex Centroid type was used at a final and total concentration of phenolic compounds of 1mM. The antioxidant activity was evaluated by the methods of Folin-Ciocalteu (FC), inhibition of radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC), Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and the oxidation power by cyclic voltammetry. From the results, it could be pointed out that flavonoids are more antioxidants than the phenolic acids and that the reaction medium of the analytical assay significantly affects the reactivity of the compounds. The oxidation power of quercetin (0.616 V) and ferulic acid (0.916 V) negatively correlated with the highest and lowest antioxidant activity, respectively, confirming that the lower is the potential, the higher the antioxidant activity of the compound. The ORAC and FC assays showed the lowest and highest reproducibility, respectively. Interestingly, the only expression of the total content in phenolic compounds by FC method in gallic acid equivalents is an important source of error and is not very sensitive to interactions. Significant correlations ($p < 0.05$) between methods could be observed, meanwhile very low, reinforcing the need to use at least two methods for evaluating the antioxidant activity. Interactions between phenolic compounds were detected with TEAC, DPPH and ORAC assays and registered changes in the spectrophotometric profiles of mixtures reinforced the existence of synergism and antagonism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1. Estrutura e principais exemplos e fontes alimentares dos ácidos fenólicos.	15
Figura 1. Estrutura geral dos flavonóides.....	15
Figura 2. Principais classes de flavonóides.	16
Quadro 2. Principais grupos de flavonóides, componentes individuais e fonte alimentícia. .	17
Quadro 3. Espécies oxigenadas reativas importantes <i>in vivo</i>	19
Figura 3. Mecanismo de ação de um antioxidante fenólico.....	21
Figura 4. Indicação da conjugação possível na estrutura geral dos ácidos cinâmicos.	22
Figura 5. Indicação da metoxilação na estrutura do ácido ferrúlico.....	22
Figura 6. Indicação das características estruturais dos flavonóides responsáveis pela eficiência máxima no potencial antioxidante.	23
Quadro 4. Comparação de métodos de avaliação da capacidade antioxidante.....	24
Figura 7. Princípio do método TEAC.....	25
Figura 8. Radical DPPH	26
Figura 9. Gráfico da área sob a curva.....	27
Figura 10. Reciclagem entre catequina (CH) e malvidina-3-glucosídeo (MH) na inibição da peroxidação lipídica.....	30
Figura 11. Espaço experimental para três fatores independentes (cubo) e mistura de três componentes (triângulo).	31
Quadro 5. Descrição dos compostos fenólicos utilizados.	33
Figura 12. Potenciostato/Galvanostato (a) e eletrodos (b) usados na voltametria cíclica.	41
Figura 13. Atividade antioxidante de compostos fenólicos padrões medida pelo método TEAC.....	43
Figura 14. Atividade antioxidante de compostos fenólicos padrões medida pelo método DPPH.....	44
Figura 15. Atividade antioxidante de compostos fenólicos padrões medida pelo método de Folin-Ciocalteu	44
Figura 16. Atividade antioxidante de compostos fenólicos padrões medida pelo método ORAC.....	45
Figura 17. Equilíbrio protolítico do ácido gálico e pKa dos ácidos fenólicos estudados.....	46
Figura 18. Voltamogramas cíclicos para soluções de 1 mM de (A) ácido caféico, (B) ácido ferrúlico, (C) ácido gálico, (D), catequina, (E) quercetina e (F) rutina em metanol. Taxa de varredura: 100 mVs ⁻¹	47

Figura 19. Curvas de quantificação do conteúdo de seis compostos fenólicos pelo método de FC.....	51
Figura 20. Efeito estimado das variáveis e suas interações sobre a atividade antioxidante medida pelo método TEAC.	53
Figura 21. Efeito estimado das variáveis e suas interações sobre a atividade antioxidante medida pelo método DPPH.	54
Figura 22. Efeito estimado das variáveis e suas interações sobre a atividade antioxidante medida pelo método ORAC.	54
Figura 23. Varredura espectrofotométrica das soluções padrões de catequina, quercetina e das misturas (teórica e prática) em tampão fosfato pH 7,4, 75 mM.	56
Figura 24. Varredura espectrofotométrica das soluções padrões de ácido ferrúlico, catequina e das misturas (teórica e prática) em tampão fosfato pH 7,4, 75 Mm.....	56
Figura 25. Varredura espectrofotométrica das soluções padrões de catequina, rutina e das misturas (teórica e prática) em tampão fosfato pH 7,4, 75 mM.	57
Figura 26. Varredura espectrofotométrica das soluções padrões de ácido gálico, rutina e das misturas (teórica e prática) em metanol.....	57
Figura 27. Varredura espectrofotométrica das soluções padrões de ácido ferrúlico, catequina, ácido gálico e das misturas (teórica e prática) em etanol	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição e concentração de compostos fenólicos em frutos de açaí.....	18
Tabela 2. Soluções 1 a 1 de compostos fenólicos com concentração total de 1 mM.	35
Tabela 3. Soluções 2 a 2 de compostos fenólicos com concentração total de 1 mM.	35
Tabela 4. Soluções 3 a 3 de compostos fenólicos com concentração total de 1 mM.	35
Tabela 5. Soluções 4 a 4 de compostos fenólicos com concentração total de 1 mM.	37
Tabela 6. Soluções 5 a 5 de compostos fenólicos com concentração total de 1 mM.	37
Tabela 7. Solução 6 a 6 de compostos fenólicos com concentração total de 1 mM.....	37
Tabela 8. Análise de variância dos resultados de atividade antioxidante obtidos por diferentes métodos analíticos.	42
Tabela 9. Potencial de oxidação dos compostos fenólicos estudados em metanol com concentração de 1mM.....	48
Tabela 10. Amplitude de valores obtidos em quatro métodos estudados	50
Tabela 11. Coeficientes de correlação entre os métodos analíticos estudados.....	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Compostos fenólicos	14
2.1.1 <i>Estrutura e classificação</i>	<i>14</i>
2.1.1.1 Os ácidos fenólicos.....	17
2.1.1.2 Os flavonóides.....	17
2.1.2 <i>Compostos fenólicos no contexto amazônico</i>	<i>17</i>
2.2 Antioxidantes	18
2.2.1 <i>Aspectos gerais</i>	<i>18</i>
2.2.2 <i>Atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e flavonóides puros</i>	<i>21</i>
2.3 Métodos de avaliação da atividade antioxidante	23
2.3.1 <i>Introdução</i>	<i>23</i>
2.3.2 <i>Método Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)</i>	<i>26</i>
2.3.3 <i>Método 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....</i>	<i>27</i>
2.3.4 <i>Método de Folin-Ciocalteu (FC)</i>	<i>24</i>
2.3.5 <i>Método Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC).....</i>	<i>25</i>
2.3.6 <i>Voltametria cíclica</i>	<i>28</i>
2.4 Mistura de antioxidantes	29
2.5 Planejamento experimental de misturas	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Reagentes.....	33
3.2 Compostos fenólicos	33
3.3 Planejamento experimental	34
3.4 Medida da atividade antioxidante.....	37
3.4.1 <i>Método TEAC</i>	<i>37</i>
3.4.2 <i>Método DPPH</i>	<i>38</i>
3.4.3 <i>Método de Folin-Ciocalteu.....</i>	<i>39</i>
3.4.4 <i>Método ORAC</i>	<i>39</i>
3.4.5 <i>Voltametria cíclica</i>	<i>40</i>
3.5 Tratamento estatístico.....	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
4.1 Atividade antioxidante dos compostos fenólicos padrões	41
4.2 Influência do meio reacional do método analítico sobre a atividade antioxidante.....	46

4.3 Potencial de oxidação dos compostos fenólicos padrões	46
4.4 Comparação entre os métodos.....	46
4.5 Interações antioxidantes.....	53
5 CONCLUSÕES.....	59
BIBLIOGRAFIA	60

1 INTRODUÇÃO

Evitar fenômenos de degradação dos constituintes dos alimentos tem sido uma preocupação constante na indústria. A oxidação lipídica é um deles. Ela se inicia com a formação de radicais livres e os hidroperóxidos formados podem causar alterações sensoriais indesejáveis em óleos, gorduras ou alimentos que os contêm, produzindo odor e sabor desagradáveis, diminuindo seu tempo de vida útil (SHAHIDI; JANIYHA, e WANASUNDARA, 1992; FRANKEL, 2005). Porém, com a utilização de antioxidantes nos produtos alimentares uma conservação prolongada é alcançada, uma vez que são substâncias capazes de reduzir a velocidade de oxidação ou retardar a mesma. Os antioxidantes permitem, com isso, manter as qualidades nutricionais dos alimentos (HALLIWELL et al., 1995).

Como o emprego de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos tem sido alvo de questionamentos quanto a sua inocuidade, as pesquisas encontram-se voltadas para a busca de compostos naturais que exibam esta propriedade funcional (MELO e GUERRA, 2002). Destacam-se, nesse sentido, os compostos fenólicos. A Amazônia tem um grande potencial a ser explorado de maneira sustentável como fornecedora desses compostos com alta atividade antioxidante. Tem-se, por exemplo, o açaí que é uma fonte rica em compostos fenólicos bioativos e as folhas de *Inga edulis*, que apresentam elevada capacidade antioxidante relacionada aos compostos fenólicos identificados.

Os compostos fenólicos constituem um dos mais numerosos e amplos grupos de substâncias distribuídos no reino vegetal. Os flavonóides e os ácidos fenólicos são os mais comuns. São poderosos antioxidantes naturais, atuando de maneira eficiente na captura de radicais livres e sua atividade depende da estrutura química (VILLAÑO et al., 2005).

Para se determinar a eficiência dos antioxidantes, uma diversidade de métodos *in vitro* vem sendo usada. Substratos, meios e mecanismos reacionais diferentes são aplicados nos testes. Vários artigos de síntese já foram publicados sobre este tema e os pareceres divergem consideravelmente. Além disso, alguns estudos vêm mostrando que misturas de fenólicos podem interagir e assim afetar a capacidade antioxidante total de uma mistura (IACOPINI et al., 2008). Faz-se necessário, então, um maior conhecimento a respeito de quais são essas interações, em que métodos elas são detectadas e quais mecanismos regem a sua atuação.

Com base nessas considerações, o objetivo desse estudo é classificar os compostos fenólicos de diferentes classes em função de sua atividade antioxidante, verificando se há presença de interação, através de diferentes métodos analíticos, aplicando o planejamento experimental de misturas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são aqueles que apresentam em sua estrutura pelo menos um anel benzênico com uma ou mais hidroxilas diretamente ligada(s) ao anel (MELLO e GUERRA, 2002). Eles constituem o maior e mais distribuído grupo de metabólitos do reino vegetal, desempenhando papel importante no crescimento e no metabolismo das plantas e fazendo parte da alimentação humana e animal (TEISSEDRE et al., 1996).

A importância que apresenta o estudo de substâncias fenólicas é considerável no que se refere às áreas da saúde e agro-alimentar. Essas substâncias intervêm nas reações de escurecimento e, em geral, possuem propriedades antioxidantes (ROBARDS et al., 1999).

2.1.1 Estrutura e classificação

Os compostos fenólicos se caracterizam pela enorme diversidade de formas encontradas nas suas estruturas, levando a sua subdivisão em vários subgrupos.

Dentre as milhares de estruturas fenólicas atualmente conhecidas, que vão desde moléculas simples a moléculas altamente polimerizadas, destacam-se os flavonóides e os ácidos fenólicos, que são os antioxidantes fenólicos naturais mais comuns (MADHAVI; SINGHAI e KULKARNI, 1995; SCALBERT e WILLIAMSON, 2000). Os polifenóis de alto peso molecular são os taninos condensados (proantocianidinas) e os taninos hidrolisáveis. Eles estão presentes em grãos, legumes, frutas, ervas e bebidas derivadas de plantas (HAGERMAN et al., 1998).

2.1.1.1 Os ácidos fenólicos

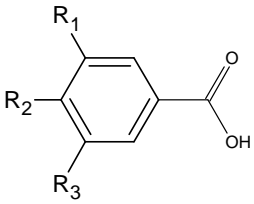
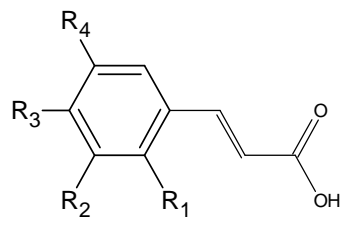
Os ácidos fenólicos podem ser subdivididos em dois grupos: os derivados do ácido cinâmico e os derivados do ácido benzóico (HELLER, 1986).

Os ácidos benzóicos apresentam uma estrutura C_6-C_1 . Eles são amplamente distribuídos na natureza, possivelmente por sua simplicidade estrutural química e por estarem no início da síntese dos compostos fenólicos (ROBARDS et al., 1999).

Os ácidos cinâmicos apresentam estrutura química C_6-C_3 . Assim como os ácidos benzóicos, eles são largamente distribuídos (ROBARDS et al., 1999), sendo o ácido caféico e o ferrúlico, os mais encontrados (YANG et al., 2001).

O Quadro 1 apresenta as estruturas básicas, os principais exemplos e algumas fontes alimentares dos ácidos fenólicos.

Quadro 1. Estrutura e principais exemplos e fontes alimentares dos ácidos fenólicos.

Estrutura	Exemplos	Fontes alimentares
<p><i>Derivados do ácido benzóico</i></p> 	<p>Ácido gálico $R_1 = R_2 = R_3 = OH$ Ácido Protocatecúico $R_1 = H, R_2 = R_3 = OH$ Ácido Vanílico $R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = OCH_3$</p>	Chocolate, vinho, soja
<p><i>Derivados do ácido cinâmico</i></p> 	<p>Ácido caféico $R_1 = R_4 = H, R_2 = R_3 = OH$ Ácido ferrúico $R_1 = R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = OCH_3$ Ácido <i>p</i>-cumárico $R_1 = R_2 = R_4 = H, R_3 = OH$</p>	Tomate, espinafre, aspargos, milho, arroz, vinho branco, maçã, azeitona, café

Fonte: RICE-EVANS; MILLER e PAGANGA, 1997; PENNINGTON, 2002.

2.1.1.2 Os flavonóides

Os flavonóides representam um vasto grupo de substâncias fenólicas de baixo peso molecular com estruturas químicas e características diversas (HEIM; TAGLIAFERRO e BOBILYA, 2002). A estrutura dos flavonóides é a $C_6-C_3-C_6$ que consiste em dois anéis benzênicos, A e B e um anel C com um átomo de oxigênio substituindo o carbono, como se pode visualizar na Figura 1.

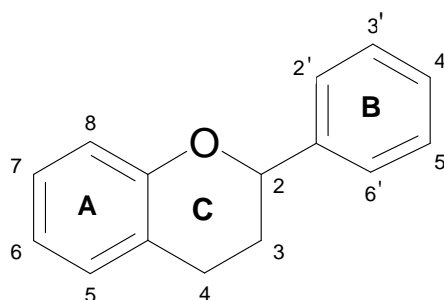


Figura 1. Estrutura geral dos flavonóides.

Essa estrutura permite diversas substituições nos anéis A, B e C, resultando numa grande série de compostos. Os flavonóides são divididos em classes de acordo com seu nível de oxidação no anel C: antocianidinas, flavanóis, flavanonas, flavonóis, entre outros, conforme mostra a Figura 2 (MADHAVI; SINGHAI e KULKARNI, 1995).

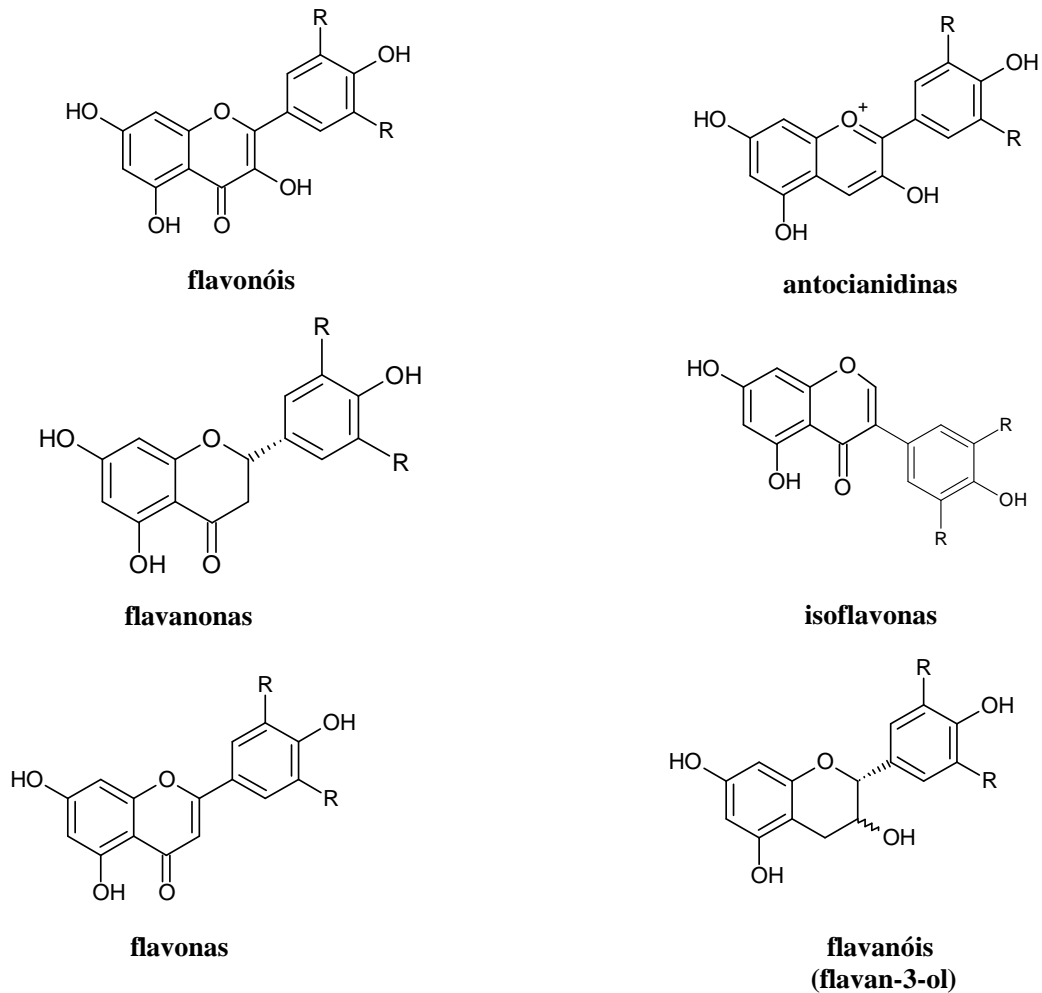


Figura 2. Principais classes de flavonóides.

Os flavonóides estão presentes em um grande número de alimentos de origem vegetal tal como legumes, frutas, cereais, além de bebidas como vinho, cerveja e chá verde (MARTIN e ANDRIANTSITOHAINA, 2002).

O principal flavanol é a catequina, o qual é abundante em folhas, chá verde, vinho tinto, chocolate, maçã. A quercetina é o principal flavonol da dieta humana e está presente em vários legumes, particularmente em cebolas, verduras e frutas (Quadro 2) (YANG et al., 2001; ROSS e KASSUM, 2002).

Quadro 2. Principais grupos de flavonóides, componentes individuais e fonte alimentícia.

Grupo	Exemplo de composto	Fonte
Flavonas	Apigenina	Casca de maçã, aipo
	Luteolína	Morango, pimenta
	Tricetina	Brócolis
Flavonóis	Campferol	Aipo, maçã, pêsego, pêra, ameixa
	Miricetina	Cascas de frutas, vinho tinto
	Rutina	Uvas, cebola
	Quercetina	Alface, azeitonas, cebola, maçã, salsa, brócolis, ameixa
Flavanonas	Hesperidina	Frutos cítricos
	Narigina	Casca de cítricos
Flavanóis	Epicatequina	Vinho tinto, maçã
	Catequina	Chá verde, vinho, maçã, chocolate
	Galocatequina	Chá verde
Antocianinas	Cianidina	Amora, açaí
	Delfinidina	Cerejas
	Malvidina	Uvas
	Perlagonoidina	Framboesa
	Peonidina	Vinho tinto
	Petunidina	Morango, cascas de frutas com pigmentos escuros

Fonte: RICE-EVANS; MILLER e PAGANGA, 1997; NIJVELDT et al., 2001; PENNINGTON, 2002.

2.1.2 Compostos fenólicos no contexto amazônico

A Amazônia, com sua biodiversidade enorme, tem um grande potencial a ser explorado de maneira sustentável como fornecedora de biocompostos com alta atividade antioxidante, em particular os compostos fenólicos.

Tem-se, por exemplo, o açaí (*Euterpe oleracea*), um fruto regional que vem ganhando destaque, principalmente por apresentar capacidade antioxidante elevada devido a sua alta concentração de antocianinas e tocoferóis (Rogez, 2000). A Tabela 1 apresenta a composição e concentração em compostos fenólicos dos frutos de açaí, segundo Pacheco-Palencia, Duncan e Talcott (2009).

Tabela 1. Composição e concentração de compostos fenólicos em frutos de açaí.

Composto fenólico	Concentração (mg/Kg de açaí)
Ácido protocatecuico	1,77 ± 0,11
Ácido <i>p</i> -hidroxi benzóico	1,80 ± 0,13
(+)-catequina	5,11 ± 0,22
Ácido vanílico	5,05 ± 0,27
(-)-epicatequina	1,07 ± 0,10
Ácido ferrúlico	0,98 ± 0,10
Ácido siringico	10,1 ± 0,93
Isoorientina	23,6 ± 1,07
Orientina	47,7 ± 2,04
Cianidina-3-rutinosídeo	1.256 ± 38,1
Cianidina-3-glicosídeo	947 ± 29,0

Fonte: Pacheco-Palencia, Duncan e Talcott (2009).

Pode-se afirmar que a cianidina-3-rutinosídeo é o composto encontrado em maior concentração no açaí, sendo ela pertencente ao grupo das antocianinas. A cianidina-3-glicosídeo é o segundo composto em maior quantidade. Dentre os flavanóis, a (+)-catequina aparece em quantidade aproximadamente cinco vezes superior a (-)-epicatequina.

As folhas de *Inga edulis*, árvore difundida na floresta secundária tropical da região amazônica, também se mostraram como boa fonte das substâncias fenólicas. Um estudo realizado por Souza et al. (2007) identificou diversos destes compostos, dentre eles o ácido gálico, a catequina e a epicatequina, e indicou que a elevada atividade antioxidante medida pelo método ORAC do extrato seco dessas plantas tem contribuição significativa desses fenólicos (cerca de 10%).

Adicionalmente, sabe-se que na flora amazônica muitas plantas, geralmente desconhecidas dos cientistas, são usadas há muitos anos por povos nativos para curar doenças degenerativas. O estudo destas plantas medicinais pode conduzir à descoberta de novas fontes antioxidantes, com um incentivo simultâneo à preservação das plantas e um desenvolvimento sustentável na região (SILVA et al., 2007).

2.2 Antioxidantes

2.2.1 Aspectos gerais

Como conceito geral, os antioxidantes são substâncias que, ao estarem presentes em pequenas concentrações quando comparadas ao substrato oxidável (lipídios, proteínas,

DNA ou carboidratos) retardam ou previnem significativamente a oxidação do mesmo (HALLIWELL, 1994).

Os alimentos estão sujeitos a sofrerem, durante o processamento e a estocagem, reações químicas que podem alterar, indesejavelmente, as características do produto final. Uma destas reações é a oxidação dos lipídeos, que ocorre com os ácidos graxos insaturados por ataque do oxigênio reativo e é geradora de radicais livres. Radicais livres são quaisquer espécies capazes de existir independentemente, que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, o que as torna altamente reativas (JADHAVI et al., 1995).

No organismo humano, o metabolismo normal produz constantemente radicais livres que podem reagir acidentalmente com proteínas, DNA e RNA, promovendo, assim, vários tipos de doenças degenerativas, como câncer, aterosclerose e outras (HALLIWELL, 1996). As reações radicalares são iniciadas por espécies químicas denominadas espécies oxigenadas reativas (*Reactive Oxygen Species* ou ROS). Estas são responsáveis pela maioria das degradações radicalares, entre elas, a degradação de compostos fenólicos *in vivo*, em razão de numerosas vias que conduzem à sua formação (ROBARDS et al., 1999). O Quadro 3 apresenta as espécies oxigenadas reativas mais importantes *in vivo* (ARUOMA et al., 1997).

Quadro 3. Espécies oxigenadas reativas importantes *in vivo*.

Espécie
$O_2^{\bullet-}$ (radical superóxido)
O_2 singleto
H_2O_2 (peróxido de hidrogênio)
ROOH (peróxidos derivados de lipídeos)
HOCl (ácido hipocloroso)
RO^{\bullet} (radical alcoxila)
RO_2^{\bullet} (radical peroxila)
$NO^{\bullet}, NO_2^{\bullet}, ONOO^-$ (peroxinitrito)
OH^{\bullet} (radical hidroxila)

Um grande número de antioxidantes, sintetizados pelas células ou ingeridos através dos alimentos, fornecem uma defesa natural contra as espécies oxigenadas reativas (NUTTAL; KENDALL e MARTIN, 1999; ALHO e LEINONEN, 1999). Os antioxidantes apresentam-se, então, como uma alternativa para minimizar os danos oxidativos nos seres vivos e prevenir a deterioração oxidativa dos alimentos. No entanto, o interesse pelos antioxidantes naturais tem destaque diante da comprovação de efeitos maléficos causados por doses elevadas de antioxidantes sintéticos.

Os compostos antioxidantes atuam sobre a formação dos radicais livres, durante o processo oxidativo, através de diversos mecanismos de ação, entre eles:

a) Captura de oxigênio singlete

As moléculas inibidoras do efeito do oxigênio singlete impedem a iniciação de uma parte importante de reações de degradação e podem, então, ser consideradas como antioxidantes preventivos (FRANKEL e MEYER, 2000).

Certas moléculas naturais são caracterizadas por esta propriedade antioxidante, como por exemplo, o β -caroteno, o ácido ascórbico e os flavonóides (HALLIWELL, 1994; RICE-EVANS; MILLER e PAGANGA, 1997).

b) Inibição de enzimas oxidantes

A atividade de certas enzimas pode gerar espécies iniciadoras de reações radicalares, isto é o caso especial da xantina oxidase. As moléculas capazes de inibir estas enzimas podem ser consideradas como antioxidantes (FRANKEL e MEYER, 2000). A xantina oxidase é inibida pelos flavonóides, particularmente pelas flavonas (HARBONE e WILLIAMS, 2000).

c) Enzimas antioxidantes

Dentre os numerosos meios de proteção dos seres vivos perante as espécies químicas reativas, existe uma bateria de enzimas capazes de reconhecer especificamente as biomoléculas degradadas (DNA e proteínas), de eliminá-las e substituí-las (HALLIWELL, 1994). Certas enzimas se encarregam também de neutralizar diretamente os iniciadores de reações radicalares, ou reduzindo as espécies radicalares, ou reciclando os antioxidantes oxidados. As principais enzimas que intervêm nesses mecanismos são: superóxido dismutase (na presença do cofator), catalase e glutathione peroxidase.

d) Quelação de íons metálicos

Os íons metálicos, em particular o cobre e o ferro, são iniciadores muito importantes de reações radicalares e sua imobilização sob a forma de complexos organometálicos é, por isso, um mecanismo antioxidante muito importante (FRANCIS, 1989). Os flavonóides que possuem um anel B substituído por dois grupos hidroxilas em posição *orto* são, sob esse aspecto, muito eficazes (RICE-EVANS; MILLER e PAGANGA, 1996).

Outras moléculas como o ácido cítrico, o etileno diamino, o ácido fosfórico e o ácido ascórbico são também complexantes do cobre e ferro (HAMILTON et al., 1997).

e) Captura de radicais livres

A família mais importante de antioxidante é aquela que agrupa as moléculas capazes de transferir um átomo de hidrogênio para uma espécie radicalar, seguindo um esquema reacional do tipo:



Esses antioxidantes agem durante as etapas de propagação das reações radicalares. O poder antioxidante é influenciado pela força da ligação A-H. Assim, quanto mais fraca a energia de ligação da ligação A-H, mais a atividade antioxidante será importante (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1996; ROBARDS et al., 1999).

Os compostos fenólicos possuem esse mecanismo de ação. Podem, por conjugação, estabilizar o radical fenoxil formado (Figura 3) (RICE-EVANS; MILLER e PAGANGA, 1996).

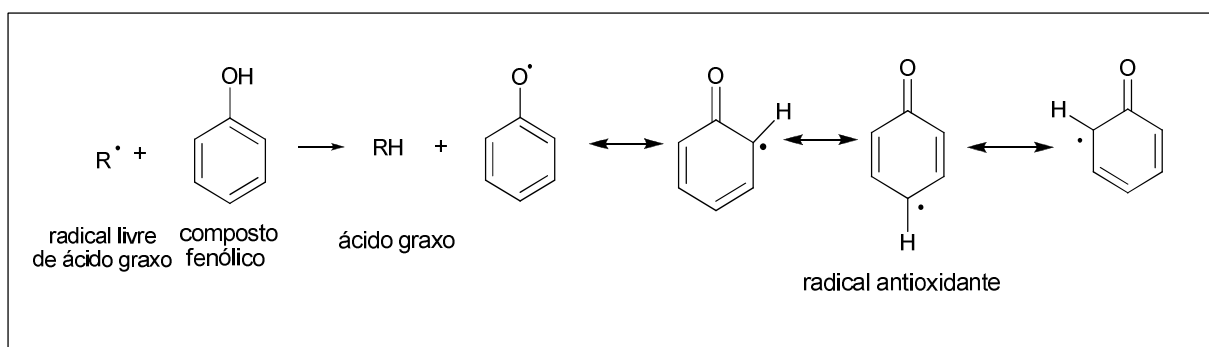


Figura 3. Mecanismo de ação de um antioxidante fenólico.

2.2.2 Atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e flavonóides puros

De um modo geral, as características químicas dos compostos fenólicos definem sua atividade antioxidante. As duas condições básicas obrigatórias para uma substância fenólica ser definida como um antioxidante são: a) quando presente em pequenas concentrações em relação ao substrato oxidável retarda ou evita a oxidação do mesmo e b) o radical resultante formado após a transferência de elétrons e/ou átomos de H deve ser estável.

Sabe-se que a capacidade de seqüestro de radicais é devido à habilidade de doação de elétrons e/ou H. Sendo assim, quanto maior o número de hidroxilas, maior a possibilidade de atividade de seqüestro de radicais livres. A disponibilidade das hidroxilas depende da estrutura química e da conformação espacial, a qual pode modificar a reatividade das moléculas (PINELO et al., 2004).

A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos depende basicamente do número de hidroxilas. Em geral, a atividade antioxidante dos derivados do ácido cinâmico é maior que do

ácido benzóico. A presença do grupo $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ na estrutura do ácido cinâmico aumenta sua capacidade de estabilizar radicais livres, pois há conjugação possível da dupla ligação com as duplas ligações do anel (Figura 4) (RICE-EVANS; MILLER e PAGANGA, 1996).

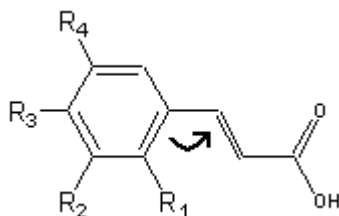


Figura 4. Indicação da conjugação possível na estrutura geral dos ácidos cinâmicos.

Sabe-se também que a metoxilação de hidroxila(s) ligada(s) ao anel fenólico, como o ácido ferrúlico (Figura 5), resulta no decréscimo na capacidade de sequestro de radicais (RICE-EVANS; MILLER e PAGANGA, 1996).

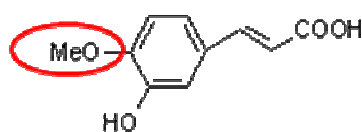


Figura 5. Indicação da metoxilação na estrutura do ácido ferrúlico.

Os flavonóides são os mais eficientes entre as moléculas antioxidantes e sua eficácia nessa função tem sido o objeto de várias pesquisas. Sua atividade depende de vários fatores, dentre os quais a substituição de átomos de hidrogênio, no anel B, por hidroxilas, desempenha o papel mais importante (RICE-EVANS; MILLER e PAGANGA, 1997; ROBARDS, 1999).

A deslocalização eletrônica entre o anel B e o resto da molécula permite uma boa estabilização do radical formado e contribui assim para o aumento da atividade antioxidante da molécula.

Segundo Robards (1999), três características na estrutura dos flavonóides são indicadas como as responsáveis pela eficiência máxima no potencial antioxidante (Figura 6):

- 1) Duas hidroxilas (3' e 4') no anel B conferem alta estabilidade ao radical formado, participando do deslocamento do elétron;
- 2) Uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 em conjugação com a função 4-oxo no anel C, responsável pelo deslocamento do elétron do anel B;
- 3) Os grupos 3 e 5-OH com a função 4-oxo.

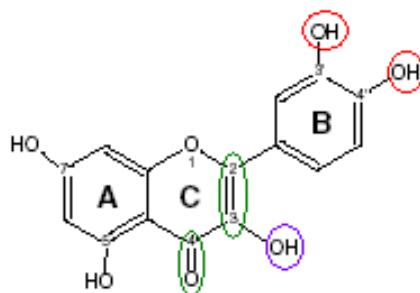


Figura 6. Indicação das características estruturais dos flavonóides responsáveis pela eficiência máxima no potencial antioxidante.

Vale ressaltar que os flavonóides têm sua atividade diminuída quando são glicosilados na posição 3 (RICE-EVANS; MILLER e PAGANGA, 1997; ROBARDS, 1999).

2.3 Métodos de avaliação da atividade antioxidante

2.3.1 Introdução

Como há um crescente interesse na eficácia e na função de antioxidantes naturais nos alimentos e sistemas biológicos, o teste da atividade antioxidante tem recebido mais atenção.

Diversos métodos têm sido propostos, no entanto não existe ainda um método de referência. Para se obter uma avaliação correta da atividade antioxidante é necessária a utilização de testes distintos, incluindo diferentes mecanismos de inibição da oxidação, como no amplo estudo realizado recentemente por Seeram et al. (2008) que comparam a atividade antioxidante de diversas matrizes alimentares através de quatro ensaios diferentes. Porém, pode-se encontrar equívocos na interpretação de resultados devido à ausência de um método consistente, assim como à complexidade dessas amostras, que muitas vezes apresentam interações potenciais entre diferentes antioxidantes (HUANG; OU e PRIOR, 2005; CAO e PRIOR, 1999).

As análises são normalmente classificadas em duas categorias, em função das reações implicadas: baseadas em reações de transferência de átomo de hidrogênio (TAH) e transferência de elétron (TEL) (HUANG; OU e PRIOR, 2005; PRIOR; WU e SCHAICH, 2005). Entretanto, o mecanismo da reação pode ser difícil de distinguir, já que, aparentemente, a reação de transferência de átomo de hidrogênio pode ser o resultado de uma

transferência acoplada de elétron-próton (HUANG; OU e PRIOR, 2005; WICKS; WOOD e GARG, 2006).

A maioria das análises baseadas no TAH implica um conjunto de reações, onde ocorre a competição entre os antioxidantes e o substrato com os radicais peroxil produzidos termicamente pela decomposição de compostos *azo*. As análises baseadas no TEL medem a capacidade de um antioxidante de reduzir um oxidante, que altera de cor uma vez reduzido. O grau de descoloração ou mudança de cor é proporcional à capacidade antioxidante (HUANG; OU e PRIOR, 2005; PRIOR; WU e SCHAICH, 2005).

Em função desses mecanismos, a habilidade dos compostos fenólicos em liberar um elétron e/ou um átomo de H pode ser quantificada pelo potencial redox padrão (E^0) e pela energia de dissociação de ligação para a ligação O-H (DANGLES, 2006).

Entre os protocolos de medida da capacidade antioxidante, o Quadro 4 enumera os principais métodos de análises utilizados atualmente, mostrando a diferença entre os mesmos quanto ao mecanismo, ao gerador de radicais livres, ao meio reacional, ao ponto final, ao método de quantificação e ao tipo de antioxidante avaliado (PRIOR; WU e SCHAICH, 2005).

Quadro 4. Comparação de métodos de avaliação da capacidade antioxidante.

Método	Mecanismo	Gerador	Meio	Ponto final	Quantificação	Tipo de antioxidante
ORAC	TAH	AAPH	pH 7,4	Tempo fixo	AUC	L e H
TRAP	TAH	AAPH	pH 7,4	Fase de latência	IC ₅₀ , tempo de latência	H
FRAP	TEL	TPTZ/Fe ³⁺	pH 3,6	Tempo variável	ΔDO tempo fixo	H
TEAC	TEL e TAH	ABTS	pH 7,0/EtOH	Tempo	ΔDO tempo fixo	L e H
FC	TEL	Reagente de FC	pH > 10	Tempo fixo	ΔDO tempo fixo	H
DPPH	TEL	DPPH	MeOH	IC ₅₀	ΔDO tempo fixo	H
TOSC	TAH	KMBA-ABAP	pH 7,4	IC ₅₀	AUC	H
TBARS-LDL	TAH	AAPH	pH 7,4	Fase de latência	Tempo de latência	H
Dienos-LDL	TEL	Cu ²⁺	pH 7,4	Fase de latência	Tempo de latência	H
Hemólise	TAH	AAPH	pH 7,4	Fase de latência	ΔDO tempo fixo	H

AAPH: 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride; ABAP: 2'-azobis-amidinopropane; ABTS: 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonate; AUC: Area under the curve (Área sob a curva); DO: Densidade óptica; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; FC: Folin-Ciocalteu; FRAP: Ferric reducing ability of plasma; KMBA: α-keto-γ-methiolbutyric acid; LDL: Low density lipoprotein (Lipoproteína de baixa densidade); L: Lipofílico; H: Hidrofílico; ORAC: Oxygen radical absorbance capacity; TAH: Transferência do átomo de hidrogênio; TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances; TEL: Transferência de elétron; TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity; TOSC: Total oxidant scavenging capacity; TPTZ: 2,4,6-Tripyridyl-1,3,5-Triazine; TRAP: Total radical-trapping antioxidant parameter.

2.3.2 Método Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

Embora o TEAC seja na maioria das vezes classificado como reação de transferência de elétrons, na realidade o seu radical pode ser neutralizado através desse mecanismo e por transferência de átomo de hidrogênio. Os mecanismos de reatividade são, assim, difíceis de

serem interpretados sem informação detalhada sobre a composição e estruturas de antioxidantes que são testados (PRIOR; WU e SCHAICH, 2005).

O princípio deste método baseia-se na captura do radical $ABTS^{+\bullet}$ (ácido 2'-azinobis (3-etilbenzeno-tiazolina-6-sulfônico)) azul-esverdeado, relativamente estável, pelo antioxidante, convertendo-o num produto incolor (Figura 7). O radical $ABTS^{+\bullet}$ é gerado via reação de oxidação do ABTS com o persulfato de potássio (RE et al., 1999). O grau de descoloração reflete a cinética de diminuição da concentração do radical $ABTS^{+\bullet}$, podendo ser caracterizado por um máximo de absorbância a 415, 645, 734 e 815 nm. Dentre eles, 415 e 734 nm são adotados para o acompanhamento espectrofotométrico da reação. O valor TEAC é determinado pela comparação à capacidade de captura do Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) em um tempo fixo (PRIOR; WU e SCHAICH, 2005). O Trolox, de fórmula molecular $C_{14}H_{18}O_4$, é o equivalente hidrossolúvel da vitamina E e possui propriedades antioxidantes poderosas.

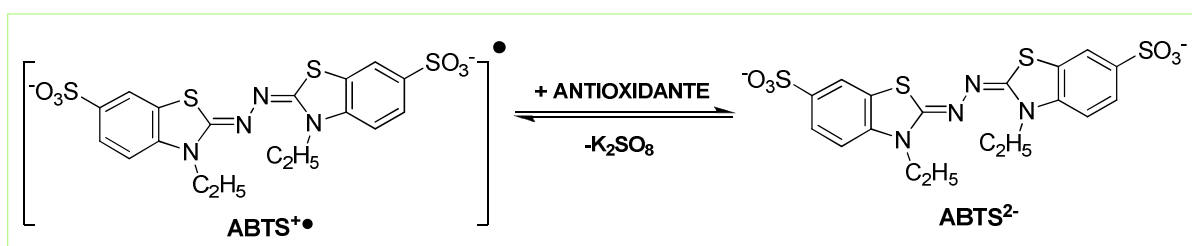


Figura 7. Princípio do método TEAC.

O valor TEAC pode não ser o real para reações lentas, pois usando-se um ponto final de curta duração (4 ou 6 minutos) é possível resultar em valores menores.

2.3.3 Método 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

O DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) é um radical orgânico que tem absorbância no UV- visível a 515 nm (Figura 8). Este radical é bastante estável em solução alcoólica. O método baseia-se na facilidade com que a forma radicalar recebe um elétron (e um átomo de hidrogênio) retirado de um substrato (PRAKASH, 2001). A descoloração resultante é monitorada a 515 nm por espectrofotometria, à temperatura ambiente, eliminando o risco de degradação térmica das moléculas testadas (PRIOR; WU e SCHAICH, 2005).

Acreditava-se que o método DPPH era uma medida de transferência de átomos de hidrogênio; no entanto, Foti, Daquino e Geraci (2004) verificaram que esta metodologia

está baseada principalmente em uma reação de transferência de elétrons, visto que a mudança do átomo hidrogênio é uma reação marginal, porque acontece muito lentamente em solventes como metanol e etanol.

A quantidade de DPPH[•] removida do meio, acompanhada pela diminuição na absorbância da solução do radical, é proporcional à atividade “sequestradora” da amostra, sendo possível, portanto, assumir que a inibição de DPPH[•] é equivalente à atividade antioxidante das substâncias presentes na amostra (ESPÍN et al., 2000). Essa inibição pode ser comparada ao Trolox e a atividade antioxidante expressa em μMolar de equivalentes Trolox (FERNÁNDEZ-PACHÓN et al., 2006).

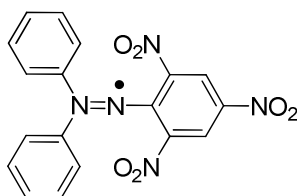


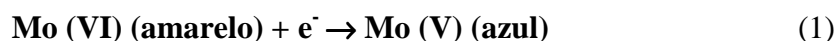
Figura 8. Radical DPPH

2.3.4 Método de Folin-Ciocalteu (FC)

O método de Folin-Ciocalteu vem sendo usado há décadas para quantificar os fenóis totais em produtos naturais, mas o mecanismo básico é uma reação de oxidação/redução e, como tal, pode ser considerado um método de medida da atividade antioxidante (PRIOR; WU e SCHAICH, 2005).

A metodologia original foi desenvolvida em 1927, na qual a oxidação dos fenóis é feita por um reagente de molibdotungstênio, resultando em produtos coloridos com $\lambda_{MÁX}$ de 745 a 750nm. Singleton e Rossi (1965) propuseram um método que utiliza o reagente molibdotungstênio-forfórico heteropoliânion, que reduz mais especificamente os fenóis, em meio básico (com solução de carbonato de sódio, pH~10), sendo empregado o ácido gálico como padrão de referência.

A dissociação de um próton do fenol conduz a um ânion fenolato que é capaz de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu. Acredita-se que o molibdênio é o mais fácil a ser reduzido no complexo, ocorrendo, então, a reação de transferência do elétron entre os redutores e Mo (VI) (Equação 1) (HUANG; OU e PRIOR, 2005).



O método de Folin-Ciocalteu pode sofrer interferência de algumas substâncias (ex. vitamina C, Cu(I), aminoácido, etc.) (PRIOR; WU e SCHAICH, 2005).

2.3.5 Método Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

A análise ORAC tem sido freqüentemente utilizada para avaliar a atividade antioxidante relativa de diferentes amostras biológicas e de alimentos. Baseia-se na medida da diminuição da concentração de um substrato oxidável durante o tempo, por fluorescência e o seu mecanismo de reação consiste na transferência de um átomo de hidrogênio. Diferenças na velocidade de decaimento relativo da fluorescência em relação aos controles são indicativos de atividades anti ou pró-oxidantes do material testado (CAO e PRIOR, 1999; CALDWELL, 2003 e PRIOR et al., 2003).

A fluorescência do substrato diminui na presença de radicais peróxil produzidos pela decomposição térmica do 2,2'-azinobis (-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) em fase aquosa. O período de proteção do substrato contra o AAPH é diretamente ligado à concentração de antioxidante. Mais recentemente, a fluoresceína (FL), um substrato não protéico, substituiu progressivamente a β -ficoeritrina (CAO e PRIOR, 1999; CALDWELL, 2003; PRIOR et al., 2003).

O método utiliza uma técnica de medida da área sob a curva (*Area Under the Curve- AUC*) para a quantificação, o que permite combinar ao mesmo tempo a percentagem de inibição e a medida do tempo de inibição da ação dos radicais livres pelos antioxidantes, em só um valor (Figura 9). Esse é um dos fatores que torna este um método de referência (CAO et al., 1995; PRIOR; WU e SCHAICH, 2005).

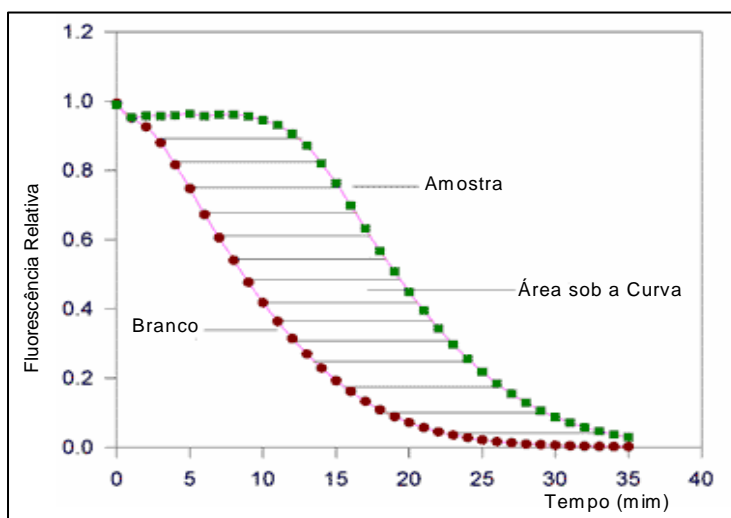
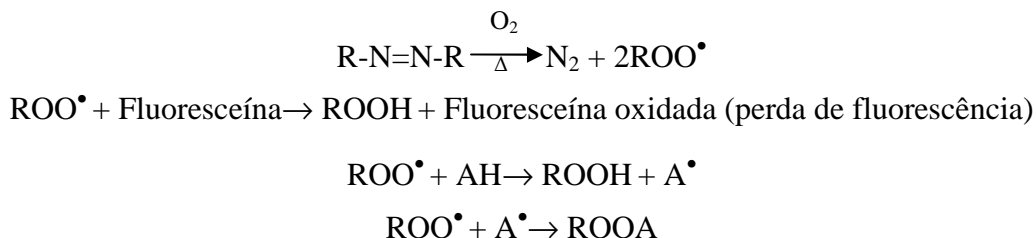


Figura 9. Gráfico da área sob a curva.

Enfim, o método ORAC permite estudar a atividade antioxidante em condições particulares de temperatura (37°C), pH (7,4), substrato oxidável e na presença de uma substância que provoque a oxidação (AAPH).

A formação dos radicais a partir do AAPH e o mecanismo reacional podem ser observados segundo esquema a seguir:



Os valores de ORAC são relatados geralmente como equivalentes de Trolox. Uma curva padrão é gerada usando a área sob a curva para várias concentrações padrões de Trolox, e os equivalentes da amostra são calculados usando regressão linear ($Y = a + bX$) entre a concentração de Trolox (Y) e a área sob a curva de decaimento da fluoresceína (X) ($\text{AUC}_{\text{amostra}} - \text{AUC}_{\text{branco}}$) (PRIOR; WU e SCHAICH, 2005).

2.3.6 Voltametria cíclica

Os diversos métodos envolvendo radicais propostos para testar as propriedades antioxidantes não informam quantitativamente a facilidade relativa de oxidação, um fator importante na atividade antioxidante (KILMARTIN; ZOU e WATERHOUSE, 2001).

Os compostos são antioxidantes em virtude de sua habilidade de se comportar como redutores em solução, tendendo serem oxidados na presença de eletrodos inertes (KILMARTIN; ZOU e WATERHOUSE, 2001).

A voltametria cíclica é um método eletroanalítico usado extensamente para determinar as propriedades redox de moléculas em solução e vem sendo utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de amostras biológicas e alimentos. As informações geradas por este método indicam quantitativamente a habilidade do composto em doar elétrons (CHEVION; ROBERTS e CHEVION, 2000).

A capacidade antioxidante total da amostra é uma função da combinação de dois parâmetros analíticos, o primeiro é o potencial de oxidação (anódico E_a e catódico E_c), que reflete especificamente o poder redutor do composto. O segundo é a intensidade da corrente gerada (I), refletindo a concentração do(s) componente(s) (CHEVION; ROBERTS e CHEVION, 2000).

Experimentalmente, inicia-se a aplicação do potencial de um valor no qual nenhuma redução ocorre. Com o aumento do potencial para regiões mais negativas (catódica) ocorre a redução do composto em solução, gerando um pico de corrente proporcional à concentração deste composto. Quando o potencial já tiver atingido um valor no qual nenhuma reação de redução ocorre, o potencial é varrido no sentido inverso, até o valor inicial, e no caso de uma reação reversível, os produtos que tiverem sido gerados no sentido direto (e se localizam ainda próximos à superfície do eletrodo) serão oxidados, gerando um pico simétrico ao pico da redução (CHEVION; ROBERTS e CHEVION, 2000). Tem-se como exemplos de reações reversíveis a catequina e a rutina dissolvidas em solução de 12% etanol, 0,033 M de ácido tartárico com adição de NaOH a pH 3,6 (KILMARTIN; ZOU; WATERHOUSE, 2002).

Em reações eletroquímicas reversíveis as espécies são estáveis e trocam elétrons rapidamente com o eletrodo de trabalho. Neste caso, o potencial redox padrão (E^0) é a média entre o potencial anódico e catódico, como mostra a Equação 2 (CHEVION; ROBERTS e CHEVION, 2000).

$$E^0 = \frac{(E_a + E_c)}{2} \quad (2)$$

2.4 Mistura de antioxidantes

Atualmente, é possível encontrar na literatura vários estudos que tentam esclarecer o comportamento antioxidante de alguns compostos individualmente. Porém, muito pouco é conhecido sobre os resultados da mistura deles nas propriedades antioxidantes e, como consequência, na estabilidade dos alimentos (PINELO et al., 2004). Sabe-se, contudo, que os compostos antioxidantes podem apresentar interação dependendo da sua concentração e da metodologia aplicada para avaliar a atividade antioxidante (HEO et al., 2007).

A capacidade antioxidante total em frutas, legumes e seus produtos processados é atribuída a diferentes tipos de interação: sinérgica, antagônica e ao efeito aditivo (HEO et al., 2007).

Como exemplo, uma interação sinérgica foi reportada por Rosseto et al. (2002) em que, segundo os autores, a malvidina-3-glucosídeo após se tornar um radical ($M\bullet$), resultado da doação de H para o radical peroxila, era regenerado pela catequina, sendo possível seqüestro de mais radicais livres e conseqüentemente um incremento significativo na eficiência antioxidante da mistura desses compostos (Figura 10) medida pela inibição da peroxidação lipídica.

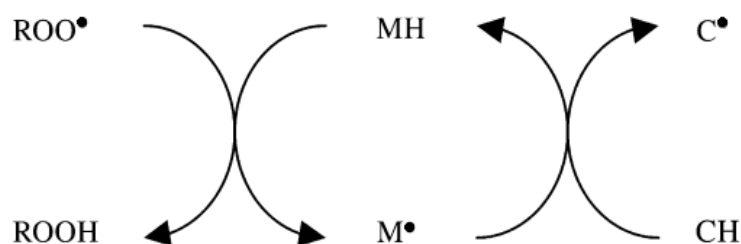


Figura 10. Reciclagem entre catequina (CH) e malvidina-3-glucosídeo (MH) na inibição da peroxidação lipídica.

Um acréscimo também foi notado na atividade antioxidante, medida pela captura do radical peroxinitrito (ONOO^\cdot), da combinação de $25\mu\text{M}$ de quercetina, rutina e resveratrol, totalizando uma mistura de $75\mu\text{M}$ (IACOPINI, 2008).

A mistura entre catequina, resveratrol e quercetina, todas com concentração de 10^{-4} M em etanol, promoveu um efeito antagônico na atividade antioxidante, medida pelo método DPPH, no trabalho realizado por Pinelo et al. (2004).

Esse mesmo tipo de interação ocorreu entre algumas misturas que eram compostos pelo ácido elágico, catequina, cianidina, ácido caféico e quercetina na avaliação da oxidação de LDL, em concentrações de $2,5\ \mu\text{M}$ cada, totalizando misturas de $5\ \mu\text{M}$ com dois componentes e $7,5\ \mu\text{M}$ com três componentes. Os autores do estudo chegaram a conclusão que o ácido elágico exerce um significativo efeito antagônico na atividade antioxidante em todas as combinações contendo catequina devido à ponte de hidrogênio formada entre o grupo *o*-difênol da catequina e a carbonila do ácido elágico (MEYER; HEINONEN e FRANKEL, 1998).

Chama-se de efeito aditivo quando a capacidade antioxidante total de uma mistura de compostos fenólicos é equivalente a soma das atividades individuais de cada composto. Esse efeito foi observado por Heo et al. (2007), através do método de sequestro do radical ABTS, em misturas de vários compostos fenólicos, assim como no trabalho realizado por Meyer, Heinonen e Frankel (1998).

2.5 Planejamento experimental de misturas

O experimento com misturas é aquele no qual dois ou mais componentes são misturados, em quaisquer proporções, obtendo-se uma resposta para cada conjunto de

componentes. Duas considerações são importantes: as propriedades de uma mistura são determinadas pelas proporções de seus componentes e as proporções dos diversos componentes são dependentes entre si. Para otimizar as propriedades de uma mistura mudando a sua formulação, deve-se sempre obedecer a regra de que a soma dos componentes tem que resultar em 100% (BARROS NETO; SCARMINIO e BRUNS, 2003; CORREA; HOTZA e SEGADÃES, 2004).

Para uma mistura qualquer de q componentes, pode-se escrever:

$$\sum_{i=1}^q x_i = x_1 + x_2 + \dots + x_q = 1 \quad (3)$$

Onde q é o número de componentes na mistura e x_i é a proporção dos componentes na mistura (Equação 3).

Em sistemas com três fatores independentes, a figura básica seria um cubo e os experimentos corresponderiam a qualquer ponto dentro desse cubo. Entretanto, como os componentes da mistura devem obedecer à restrição $x_1 + x_2 + x_3 = 1$, um triângulo equilátero inscrito no cubo é definido, como mostra a Figura 11 (BARROS NETO; SCARMINIO e BRUNS, 2003; CORREA; HOTZA e SEGADÃES, 2004).

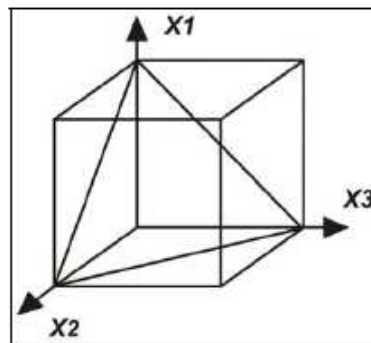


Figura 11. Espaço experimental para três fatores independentes (cubo) e mistura de três componentes (triângulo).

Em um planejamento de mistura, as proporções de cada elemento estão restritas por uma fronteira. Combinando-se estas fronteiras cria-se o que se denomina “Região Simplex”. Os tipos principais são:

a) Planejamento em rede simplex: representado por seis pontos no triângulo. Neste tipo de planejamento os pontos dos experimentos estão distribuídos nos vértices (componentes puros) e nos lados (misturas binárias) do triângulo.

b) Planejamento simplex centróide: este planejamento acrescenta ao simplex em rede um ponto central no triângulo que correspondente à mistura em partes iguais.

A função resposta (Y) pode ser expressa como um polinômio de primeiro, segundo ou terceiro grau e é calculada por regressão, a partir de valores da propriedade obtida experimentalmente envolvendo os componentes puros e outras misturas de composição variada.

Segundo Barros Neto, Scarminio e Bruns (2003), o modelo mais simples é o linear, que procura explicar o comportamento de uma propriedade apenas com os resultados obtidos com a utilização de cada componente individualmente (Equação 4). Pode-se ter, além deste, o modelo quadrático, que considera os efeitos das interações de dois componentes (Equação 5), e modelo cúbico especial que considera os efeitos das interações dos três componentes (Equação 6).

$$Y_i = b_1 * x_1 + b_2 * x_2 + b_3 * x_3 \quad (4)$$

$$Y_i = b_1 * x_1 + b_2 * x_2 + b_3 * x_3 + b_{12} * x_1 * x_2 + b_{13} * x_1 * x_3 + b_{23} * x_2 * x_3 \quad (5)$$

$$Y_i = b_1 * x_1 + b_2 * x_2 + b_3 * x_3 + b_{12} * x_1 * x_2 + b_{13} * x_1 * x_3 + b_{23} * x_2 * x_3 + b_{123} * x_1 * x_2 * x_3 \quad (6)$$

Onde:

Y_i = Variável resposta do modelo;

b_i = Coeficientes da equação;

x_i = Proporção do componente na mistura.

O modelo ajustado a partir do planejamento de mistura pode ser representado graficamente por uma superfície de resposta.

3 MATERIAL E MÉTODOS

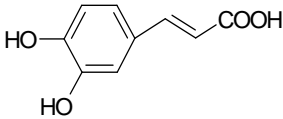
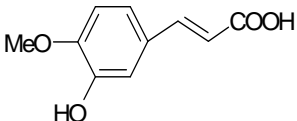
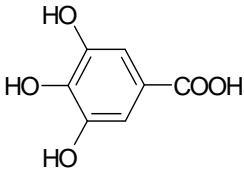
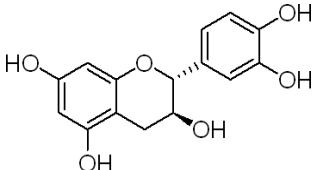
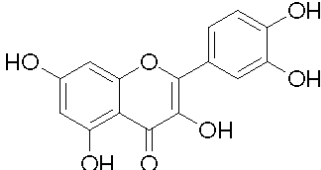
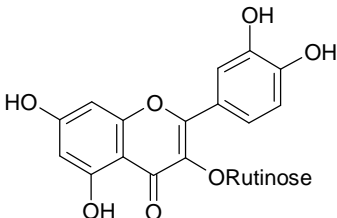
3.1 Reagentes

Folin-Ciocalteu 2N, 2,2'-azinobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH), Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico), fluoresceína sódica, 2,2-difenil-1-picrihidrazila (DPPH) e 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) foram comprados da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO). Persulfato de potássio, nitrato de sódio e etanol foram adquiridos da Synth (Diadema, SP). Metanol foi obtido da CRQ (Diadema, SP).

3.2 Compostos fenólicos

Os seis compostos fenólicos padrões utilizados para o plano de mistura foram: o ácido caféico (Fluka, Buchs, Suíça), o ácido ferrúlico (Sigma, Steinhelm, Alemanha), o ácido gálico (Sigma, Steinhelm, Alemanha), a catequina (Fluka, Buchs, Suíça), a quercetina (Sigma, Steinhelm, Alemanha) e a rutina (Sigma, Steinhelm, Alemanha). Uma descrição mais detalhada desses compostos é apresentada no Quadro 5.

Quadro 5. Descrição dos compostos fenólicos utilizados.

Composto	Estrutura	Classe	Massa molar (g/mol)
Ácido caféico		Ácido cinâmico	180,16
Ácido ferrúlico		Ácido cinâmico	194,20
Ácido gálico		Ácido benzóico	170,10
Catequina		Flavanóis	290,28
Quercetina		Flavonóis	338,2
Rutina		Flavonóis	664,60

3.3 Planejamento experimental

Uma planificação experimental do tipo Simplex-Centróide contendo 63 soluções foi utilizada, considerando a mistura de seis variáveis (Ácido gálico, Ácido ferrúlico, Ácido caféico, Catequina, Quercetina e Rutina). Essas soluções tinham um total de 1mM de compostos fenólicos. Todas as combinações foram testadas (seis soluções 1 a 1, quinze 2 a 2, vinte 3 a 3, quinze 4 a 4, seis 5 a 5 e uma com os 6 compostos) (Tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente). Para misturas de i compostos ($2 \leq i \leq 6$), cada composto encontrou-se na concentração de i^{-1} mM.

Foram feitas quatro replicatas das soluções puras dos ácidos caféico e gálico, da catequina, quercetina, rutina e da mistura contendo todos os seis compostos e três repetições da solução pura de ácido ferrúlico. O preparo das soluções foi feito aleatoriamente. Elas foram mantidas a -20°C e sob atmosfera de nitrogênio até análise.

Ensaio	Ac. caféico	Ac. ferrúlico	Ac. gálico	Catequina	Quercetina	Rutina
1	1	-	-	-	-	-
2	-	1	-	-	-	-
3	-	-	1	-	-	-
4	-	-	-	1	-	-
5	-	-	-	-	1	-
6	-	-	-	-	-	1

Tabela 2. Soluções 1 a 1 de compostos fenólicos com concentração total de 1 mM.

Tabela 3. Soluções 2 a 2 de compostos fenólicos com concentração total de 1 mM.

Ensaio	Ac. caféico	Ac. ferrúlico	Ac. gálico	Catequina	Quercetina	Rutina
7	0,50	0,50	-	-	-	-
8	0,50	-	0,50	-	-	-
9	0,50	-	-	0,50	-	-
10	0,50	-	-	-	0,50	-
11	0,50	-	-	-	-	0,50
12	-	0,50	0,50	-	-	-
13	-	0,50	-	0,50	-	-
14	-	0,50	-	-	0,50	-
15	-	0,50	-	-	-	0,50
16	-	-	0,50	0,50	-	-
17	-	-	0,50	-	0,50	-
18	-	-	0,50	-	-	0,50
19	-	-	-	0,50	0,50	-
20	-	-	-	0,50	-	0,50
21	-	-	-	-	0,50	0,50

Tabela 4. Soluções 3 a 3 de compostos fenólicos com concentração total de 1 mM.

Ensaio	Ac. caféico	Ac. ferrúlico	Ac. gálico	Catequina	Quercetina	Rutina
22	0,33	0,33	0,33	-	-	-
23	0,33	0,33	-	0,33	-	-
24	0,33	0,33	-	-	0,33	-
25	0,33	0,33	-	-	-	0,33
26	0,33	-	0,33	0,33	-	-
27	0,33	-	0,33	-	0,33	-
28	0,33	-	0,33	-	-	0,33
29	0,33	-	-	0,33	0,33	-
30	0,33	-	-	0,33	-	0,33
31	0,33	-	-	-	0,33	0,33
32	-	0,33	0,33	0,33	-	-
33	-	0,33	0,33	-	0,33	-
34	-	0,33	0,33	-	-	0,33
35	-	0,33	-	0,33	0,33	-
36	-	0,33	-	0,33	-	0,33
37	-	0,33	-	-	0,33	0,33
38	-	-	0,33	0,33	0,33	-
39	-	-	0,33	0,33	-	0,33
40	-	-	0,33	-	0,33	0,33
41	-	-	-	0,33	0,33	0,33

Tabela 5. Soluções 4 a 4 de compostos fenólicos com concentração total de 1 mM.

Ensaio	Ac. caféico	Ac. ferrúlico	Ac. gálico	Catequina	Quercetina	Rutina
42	0,25	0,25	0,25	0,25	-	-
43	0,25	0,25	0,25	-	0,25	-
44	0,25	0,25	0,25	-	-	0,25
45	0,25	0,25	-	0,25	0,25	-
46	0,25	0,25	-	0,25	-	0,25
47	0,25	0,25	-	-	0,25	0,25
48	0,25	-	0,25	0,25	0,25	-
49	0,25	-	0,25	0,25	-	0,25
50	0,25	-	0,25	-	0,25	0,25
51	0,25	-	-	0,25	0,25	0,25
52	-	0,25	0,25	0,25	0,25	-
53	-	0,25	0,25	0,25	-	0,25
54	-	0,25	0,25	-	0,25	0,25
55	-	0,25	-	0,25	0,25	0,25
56	-	-	0,25	0,25	0,25	0,25

Tabela 6. Soluções 5 a 5 de compostos fenólicos com concentração total de 1 mM.

Ensaio	Ac. caféico	Ac. ferrúlico	Ac. gálico	Catequina	Quercetina	Rutina
57	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	-
58	0,20	0,20	0,20	0,20	-	0,20
59	0,20	0,20	0,20	-	0,20	0,20
60	0,20	0,20	-	0,20	0,20	0,20
61	0,20	-	0,20	0,20	0,20	0,20
62	-	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20

Ensaio	Ac. caféico	Ac. ferrúlico	Ac. gálico	Catequina	Quercetina	Rutina
63	0,167	0,167	0,167	0,167	0,167	0,167

3.4 Medida da atividade antioxidante

3.4.1 Método TEAC

O protocolo TEAC utilizado foi o adaptado por Silva et al. (2007) a partir do proposto por Re et al. (1999), usando o radical cátion ABTS^{•+} e microplacas. A análise foi conduzida em espectrofotômetro Biotrak (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 750 nm.

A solução estoque de 10 mL de ABTS^{•+} (7 mM) foi preparada em água ultra-pura usando 1mL de persulfato de potássio (25,4 mM) como agente oxidante. Esta solução foi mantida ao abrigo de luz por no mínimo 16 horas em temperatura ambiente, para permitir a

formação total dos radicais. A solução de trabalho do ABTS^{•+} foi obtida diluindo-se a solução estoque em etanol até atingir absorvância entre 0,39-0,42.

O valor TEAC é determinado pela comparação à capacidade de captura do antioxidante Trolox. Assim, a cada dia de análise preparou-se uma curva de calibração. A solução estoque de Trolox (40 mM) foi preparada em etanol e armazenada a -20°C sob atmosfera do nitrogênio. A partir desta solução foram feitas diluições para obter-se a reta de calibração com 5 concentrações diferentes: 4 µM, 8 µM, 12 µM, 16µM, 20 µM.

Uma alíquota de 10 µL da amostra diluída em etanol ou Trolox foi colocada na microplaca (96 poços, transparente, Nalge Nunc International, Rochester, NY) e a reação começou após a adição de 190 µL da solução de trabalho do ABTS^{•+}. O grau de descoloração reflete a cinética de diminuição da concentração do radical e foi acompanhado por 6 minutos.

O valor TEAC foi calculado pela medida da área sob a curva derivada da porcentagem de inibição da absorvância em função do tempo. O cálculo da área sob a curva foi realizado para a diluição da amostra que teve uma porcentagem de inibição final entre 20% e 80%. As amostras foram analisadas em triplicata.

A atividade antioxidante das amostras foi expressa em µM ET (Equivalentes Trolox), calculada pela Equação 7.

$$\text{TEAC } (\mu\text{M ET}) = \frac{\text{AUC}_{\text{AMOSTRA}}}{\alpha \text{ Trolox}} \times \text{Diluição} \quad (7)$$

Em que:

AUC_{AMOSTRA} = a área sob a curva de inibição da amostra

α Trolox = coeficiente angular obtido da curva de calibração

O calculo da área sob a curva (AUC) da amostra e do Trolox é dado na Equação 8.

$$\text{AUC} = \left(\% \text{Inb}_{(t=0)} \times 0.5 + \sum_{i=2}^{36} \% \text{Inb}_{(t=10 \times i)} \right) \times 10 \quad (8)$$

Sendo % Inb a porcentagem de inibição no tempo *t*(s) e que é dada ela Equação 9:

$$\% \text{Inb} = \frac{A_B - A_A}{A_B} \times 100 \quad (9)$$

Onde: A_B e A_A são valores de absorvância do branco e da amostra, respectivamente.

3.4.2 Método DPPH

O método DPPH de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) foi modificado para este trabalho.

A mistura reacional foi composta pela adição de 2925 μL da solução metanólica de DPPH \bullet (25 mg/L, preparada ao abrigo da luz) e 75 μL da amostra apropriadamente diluída em metanol. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (Ultrospec 2000, UV/Visible–Pharmacia Biotech, Suécia) a 515 nm até 20 minutos de reação, sendo as amostras diluídas de maneira a apresentarem absorbância constante nesse período (valor final equivalente a menos de 1% da absorbância inicial). As leituras foram feitas em duplicata.

Soluções padrões de Trolox foram analisadas para a construção da curva de calibração. A partir de uma solução estoque de 5 mM, preparada com metanol e armazenada a -20°C , foram feitas cinco concentrações: 800, 500, 250, 100 e 25 μM . A curva foi preparada a cada dia de análise. As atividades de seqüestro do radical de cada amostra foram calculadas como a porcentagem de inibição do radical DPPH \bullet (%Inb), segundo a Equação 9 acima, em que a absorbância do branco e da amostra são as lidas no término da reação.

O valor da atividade antioxidante foi expresso em $\mu\text{M ET}$ (Equivalentes Trolox) a partir do coeficiente de regressão (α) calculado da curva de calibração (Equação 10):

$$\text{DPPH } (\mu\text{M ET}) = \frac{\% \text{ Inibição}}{\alpha} \times \text{Diluição} \quad (10)$$

3.4.3 Método de Folin-Ciocalteu

Foi utilizado o método de Singleton e Rossi (1965), modificado para uso em microplacas.

A mistura para a reação é composta de: 250 μL de amostra (água destilada para o branco), 125 μL de solução de Folin-Ciocalteu 1N e 625 μL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 75 g/L. Após o período de incubação de 30 minutos, 200 μL foram repassados para os poços da microplaca (96 poços, transparente, Nalge Nunc International, Rochester, NY) e a absorbância lida a 750 nm em espectrofotômetro Biotrak (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A análise foi realizada em duplicata.

O resultado foi calculado a partir de uma curva padrão de ácido gálico e expresso como mM de Equivalentes Ácido Gálico (EAG) ou mg EAG/L em função da discussão a ser feita.

3.4.4 Método ORAC

O protocolo ORAC usado neste trabalho foi o adaptado a partir do método desenvolvido por Ou, Hampsch-Woodill e Prior (2001) e do modificado por Huang et al. (2002), para uso em microplacas, usando fluoresceína.

A análise foi realizada em microplacas para fluorimetria de 96 poços (Greiner - Alemanha) e em fluorímetro de microplaca (Bio-Tek Instruments, Inc, USA). Um volume de 25 μL da amostra foi misturada com 150 μL de fluoresceína (55,5 nM) e incubada por 15 minutos a 37°C na microplaca antes da injeção automática de 25 μL da solução de AAPH (153 mM). A fluorescência foi acompanhada durante 50 minutos por leituras com intervalos de 1 minuto ($\lambda_{\text{excitação}}= 485 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emissão}}= 520 \text{ nm}$). Soluções de Trolox foram preparadas para a curva de calibração (4, 8, 20 e 32 μM), sendo feitas a cada dia de análise. Todas as soluções foram diluídas em tampão fosfato (75 mM, pH 7,4).

As amostras foram analisadas em três diluições, considerando-se a média como valor ORAC final, como recomendado por Huang et al. (2002). A quantificação da atividade antioxidante está baseada no cálculo da área sob a curva de decaimento da fluorescência como proposto por Cao e Prior (1999).

A partir da curva padrão, os equivalentes de Trolox da amostra foram calculados utilizando a seguinte equação: $y = ax + b$; entre a concentração de Trolox (x) (μM) e a área sob a curva de decaimento da fluoresceína (y) (AUC amostra – AUC branco). Os valores ORAC foram expressos como micromolar de equivalentes Trolox ($\mu\text{M ET}$).

3.4.5 Voltametria cíclica

O protocolo utilizado por Kilmartin, Zou e Waterhouse, (2001) foi usado para avaliar a atividade antioxidante por voltametria cíclica. Esta análise foi realizada apenas com as soluções de compostos fenólicos puros diluídos em metanol. As soluções metanólicas foram feitas com 0,1M de nitrato de sódio para servir de eletrólito. Os sais utilizados para o preparo dos tampões já desempenham esse papel.

Os voltamogramas cíclicos foram obtidos através de um Potenciostato/Galvanostato Autolab (Eco Chemie Bv, Utrecht, Holanda) (Figura 8a) a uma taxa de varredura de 100 mV/s e a varredura feita de -100 mV a 1200 mV, repetida 3 (três) vezes em seqüência.

Os eletrodos utilizados foram: carbono vítreo (disco de 3 mm polido com alumina), como eletrodo de trabalho; Ag/AgCl como referência e de platina como auxiliar (Figura 12b).

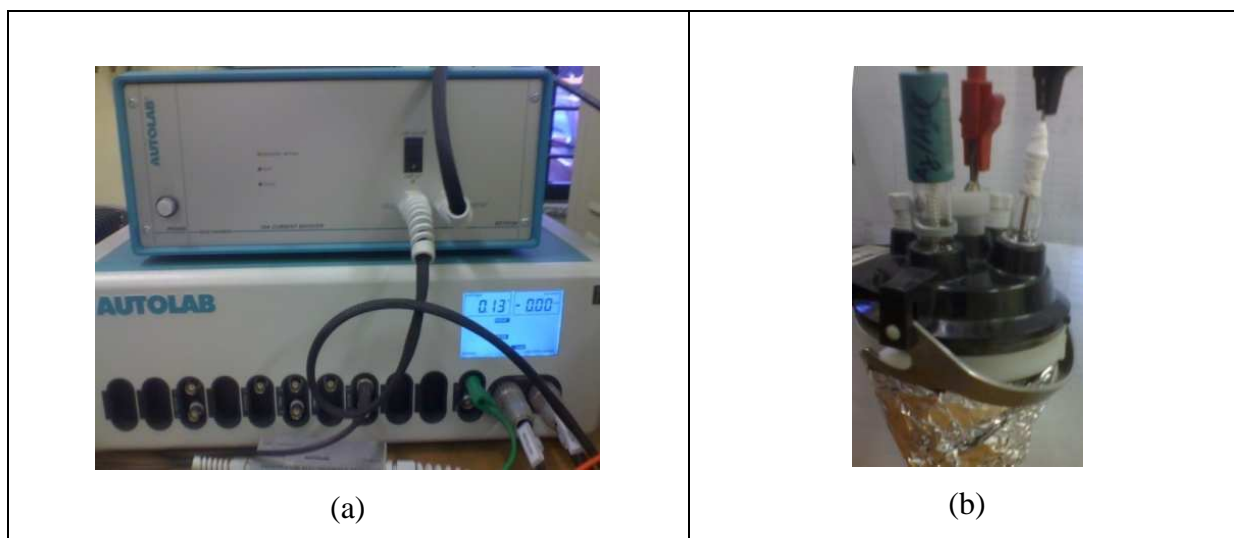


Figura 12. Potenciostato/Galvanostato (a) e eletrodos (b) usados na voltametria cíclica.

3.5 Tratamento estatístico

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, estudo de correlação e teste de diferença de médias (Teste de Tukey), com auxílio dos programas STATISTICA release 7.0 (Stat-Soft Inc., Tulsa, OK) e Excel (Microsoft Corporation, 2003).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Atividade antioxidante dos compostos fenólicos padrões

O resultado da atividade antioxidante medida pelos métodos ORAC, TEAC, DPPH e FC para cada solução analisada encontra-se em anexo.

A Tabela 8 mostra os resultados da análise de variância (ANOVA) para cada método utilizado, indicando o modelo que foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$) para prever a resposta (atividade antioxidante), assim como a qualidade do mesmo.

Tabela 8. Análise de variância dos resultados de atividade antioxidante obtidos por diferentes métodos analíticos.

O modelo cúbico especial significativo para os métodos TEAC e DPPH indica a presença de interações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre três componentes, enquanto que para o método ORAC, o modelo quadrático indica interações entre dois compostos apenas; por fim, o modelo linear para o método de FC indica que não houve

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
TEAC (Modelo Cúbico Especial)					
Modelo	25364491	40	634112	3,71	<0,001
Falta de Ajuste	4573378	25	207881	1,56	0,153
Erro Puro	2935177	25	133417		
Erro Total	7508555	50	170649		
Total Ajustado	32873046	90	391346		
DPPH (Modelo Cúbico Especial)					
Modelo	33388804	40	834720	8,99	<0,001
Falta de Ajuste	2602021	26	118274	1,83	0,091
Erro Puro	1296040	24	64802		
Erro Total	3898061	50	92811		
Total Ajustado	37286865	90	454718		
FC (Modelo Linear)					
Modelo	17,99975	5	3,599950	204,48	<0,001
Falta de Ajuste	0,78915	57	0,013845	0,54	0,974
Erro Puro	0,68972	28	0,025545		
Erro Total	1,47887	85	0,017606		
Total Ajustado	19,47862	90	0,218861		
ORAC (Modelo Quadrático)					
Modelo	523515386	20	26175769	6,83	<0,001
Falta de Ajuste	168681346	42	4016223	1,13	0,371
Erro Puro	95706603	28	3544689		
Erro Total	264387949	70	3831709		
Total Ajustado	787903336	90	8852846		

nenhuma interação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) detectada por este método.

Os resultados indicam também que o modelo significativo para cada método apresenta um bom ajuste para os dados experimentais através da não-significância da 'Falta de Ajuste' ($p > 0,05$).

Nas Figuras 13, 14, 15 e 16 estão representadas as médias e os desvios padrões dos valores de atividade antioxidante dos seis compostos puros.

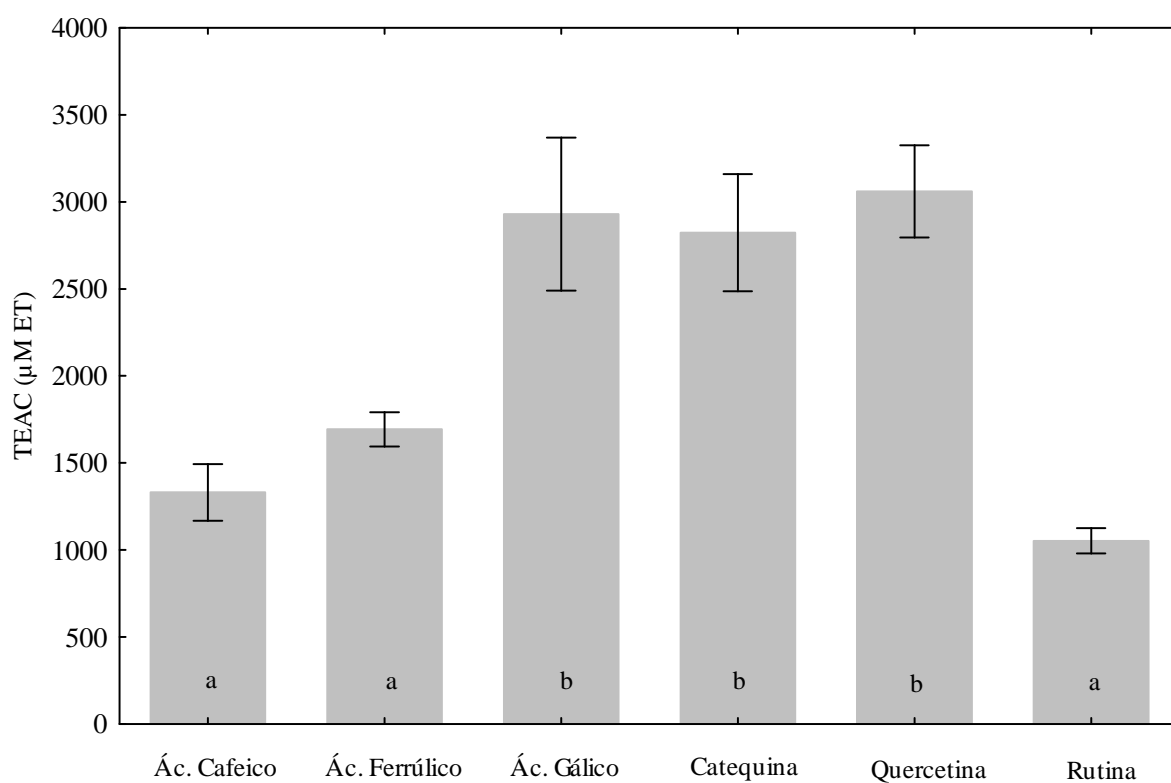


Figura 13. Atividade antioxidante de compostos fenólicos padrões medida pelo método TEAC (Colunas com a mesma letra representam valores não significativamente diferentes pelo teste de Tukey para $p < 0,05$; as barras de erros significam ± 1 *desvio padrão).

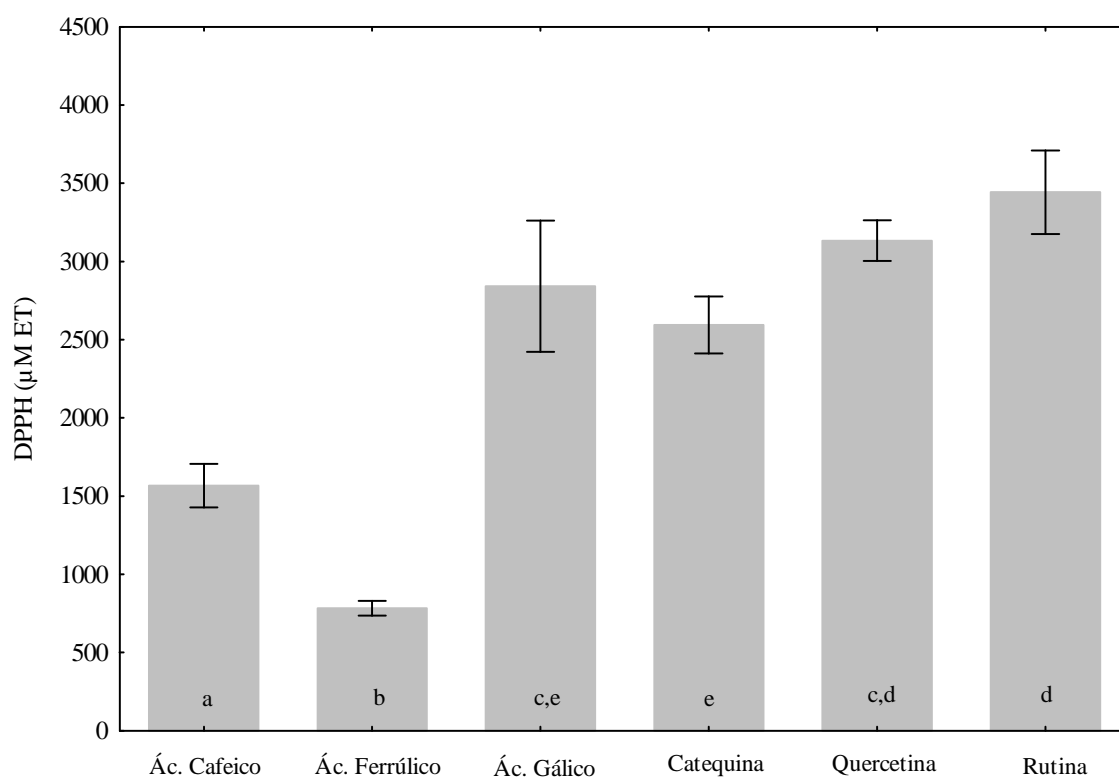


Figura 14. Atividade antioxidante de compostos fenólicos padrões medida pelo método DPPH (Colunas com a mesma letra representam valores não significativamente diferentes pelo teste de Tukey para $p < 0,05$; as barras de erros significam ± 1 *desvio padrão).

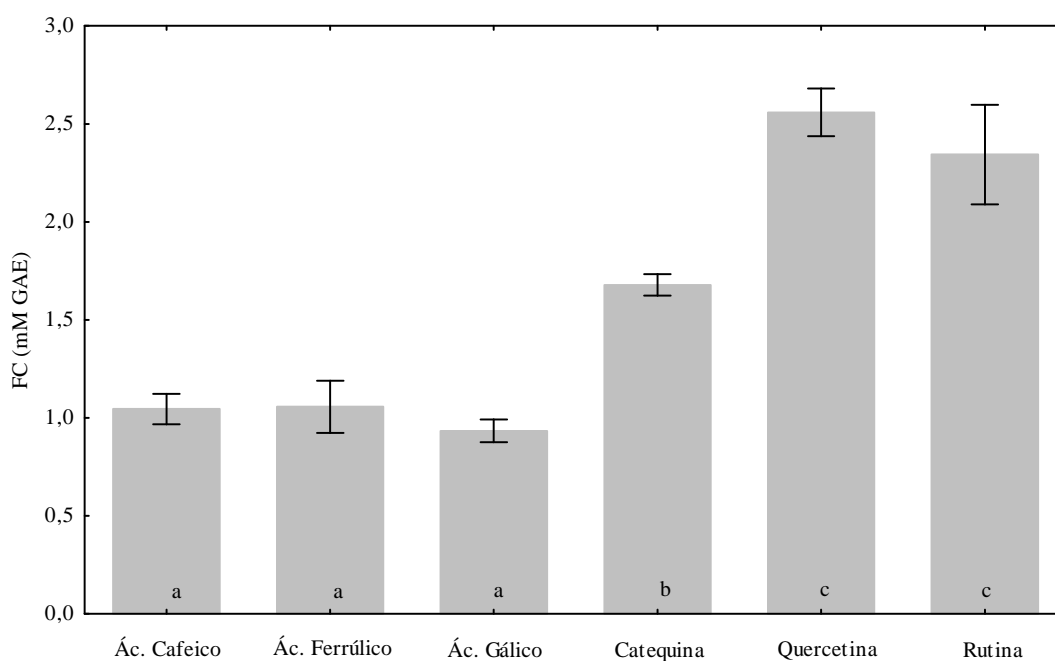


Figura 15. Atividade antioxidante de compostos fenólicos padrões medida pelo método de Folin-Ciocalteu (Colunas com a mesma letra representam valores não significativamente diferentes pelo teste de Tukey para $p < 0,05$; as barras de erros significam ± 1 *desvio padrão).

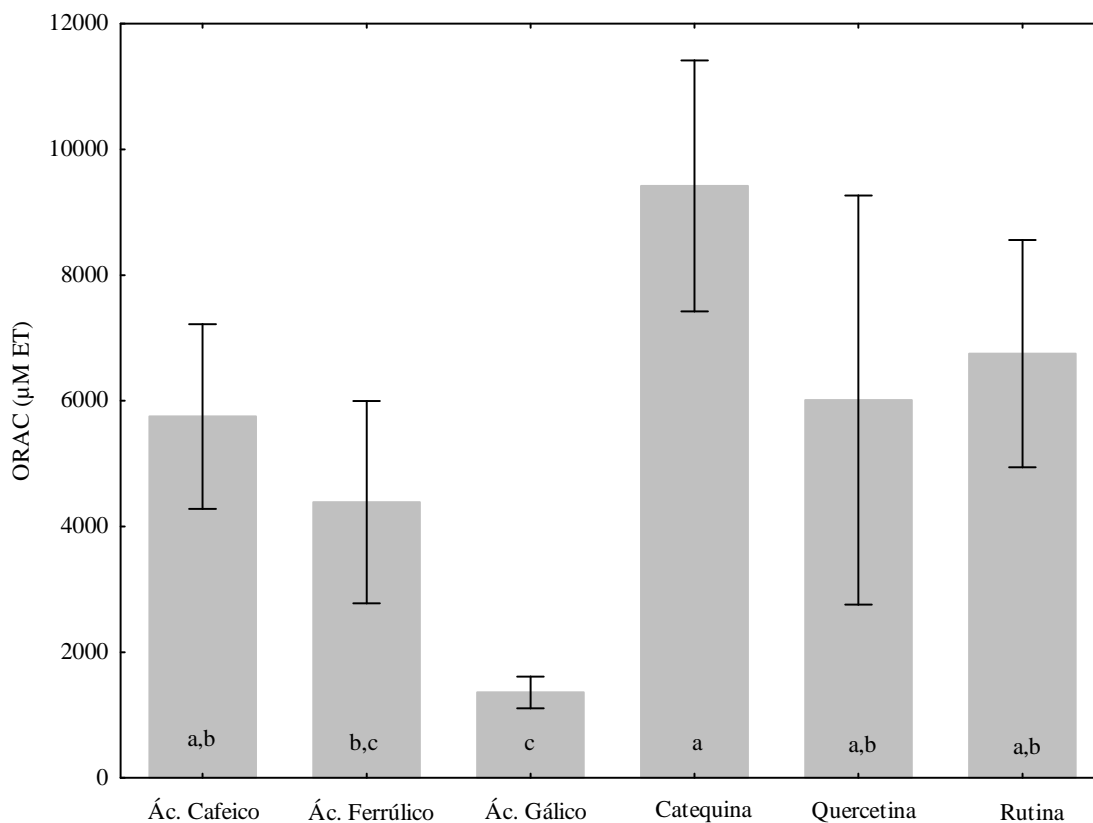


Figura 16. Atividade antioxidante de compostos fenólicos padrões medida pelo método ORAC (Colunas com a mesma letra representam valores não significativamente diferentes pelo teste de Tukey para $p < 0,05$; as barras de erros significam ± 1 *desvio padrão).

Constata-se que, no geral, os flavonóides têm predominância no topo da classificação, indicando que essa classe tem maior potencial antioxidante que os ácidos fenólicos. Esse fato é explicado pela estrutura química dos flavonóides, nos quais: 1) a presença de mais grupos hidroxilas leva a uma maior possibilidade de doar átomos de hidrogênio, e 2) o maior número de ligações duplas é responsável por um maior deslocamento de elétrons (Rice-Evans, Miller & Paganga, 1996).

Analisando mais detalhadamente os resultados de cada método, pode-se comprovar o fato de a reatividade de alguns compostos diferirem. Há compostos antioxidantes que não reagem com determinadas espécies oxidantes. É o caso da rutina, que mostra pouca reatividade com o radical ABTS, resultando em baixa atividade no método TEAC, assim como já observado por Villaño et al. (2005) que justifica esse fato pela presença de glicosilação na posição 3 do anel C na estrutura desse flavonol.

4.2 Influência do meio reacional do método analítico sobre a atividade antioxidante

Um comportamento que se pode observar é a forte influência do meio reacional da técnica analítica na reatividade dos compostos. No ORAC e FC, que empregam meios aquosos e mais básicos, os três ácidos fenólicos apresentaram as menores atividades. Porém, nos métodos TEAC e DPPH, que empregam meios alcoólicos, o ácido gálico consegue destaque. Stratil, Klejdus & Kubán (2006) também verificaram a alta capacidade de reação deste ácido fenólico com os radicais nesses dois últimos métodos, justificando o fato pelo seu maior número de hidroxilas ativas (3 grupos OH).

Possivelmente, um fator determinante responsável por essa conduta é o efeito do pH na atividade antioxidante dos ácidos fenólicos. Nos pH's dos métodos ORAC e FC (7,4 e ~10 respectivamente) o ácido carboxílico da estrutura já encontra-se em forma dissociada (como por exemplo o ácido caféico na Figura 17). Baseando-se na lei de interações eletrostáticas (Lei de Coulomb), o elétron, que encontra-se em ressonância na estrutura do composto após ficar desemparelhado com a transferência de seu par, apresenta uma força de repulsão próximo ao grupo carregado (O^-), já que ambos possuem carga negativa, diminuindo uma possibilidade de ressonância nesta posição. Assim, nos meios mais ácidos (TEAC e DPPH), o ácido gálico consegue apresentar um maior potencial antioxidante, já que na forma protonada é possível um maior deslocamento do elétron.

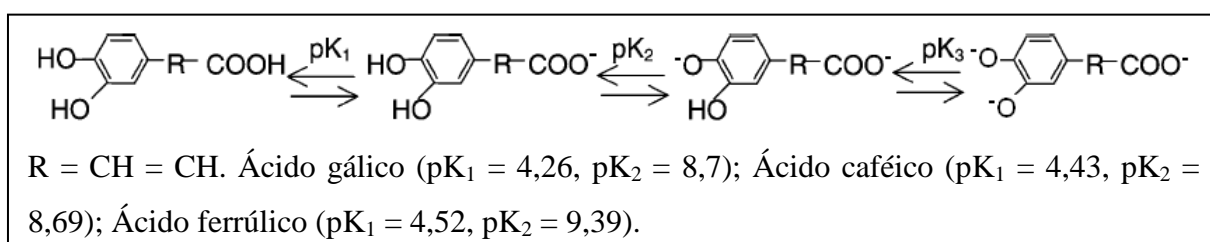


Figura 17. Equilíbrio protolítico do ácido caféico e pKa dos ácidos fenólicos estudados (Fonte: IUPAC (1979a), IUPAC (1979b); Smith e Martell (1989); Beltrán et al. (2003)).

4.3 Potencial de oxidação dos compostos fenólicos padrões

Foi possível obter voltamogramas típicos para os seis fenólicos padrões apenas em meio metanólico (Figura 18).

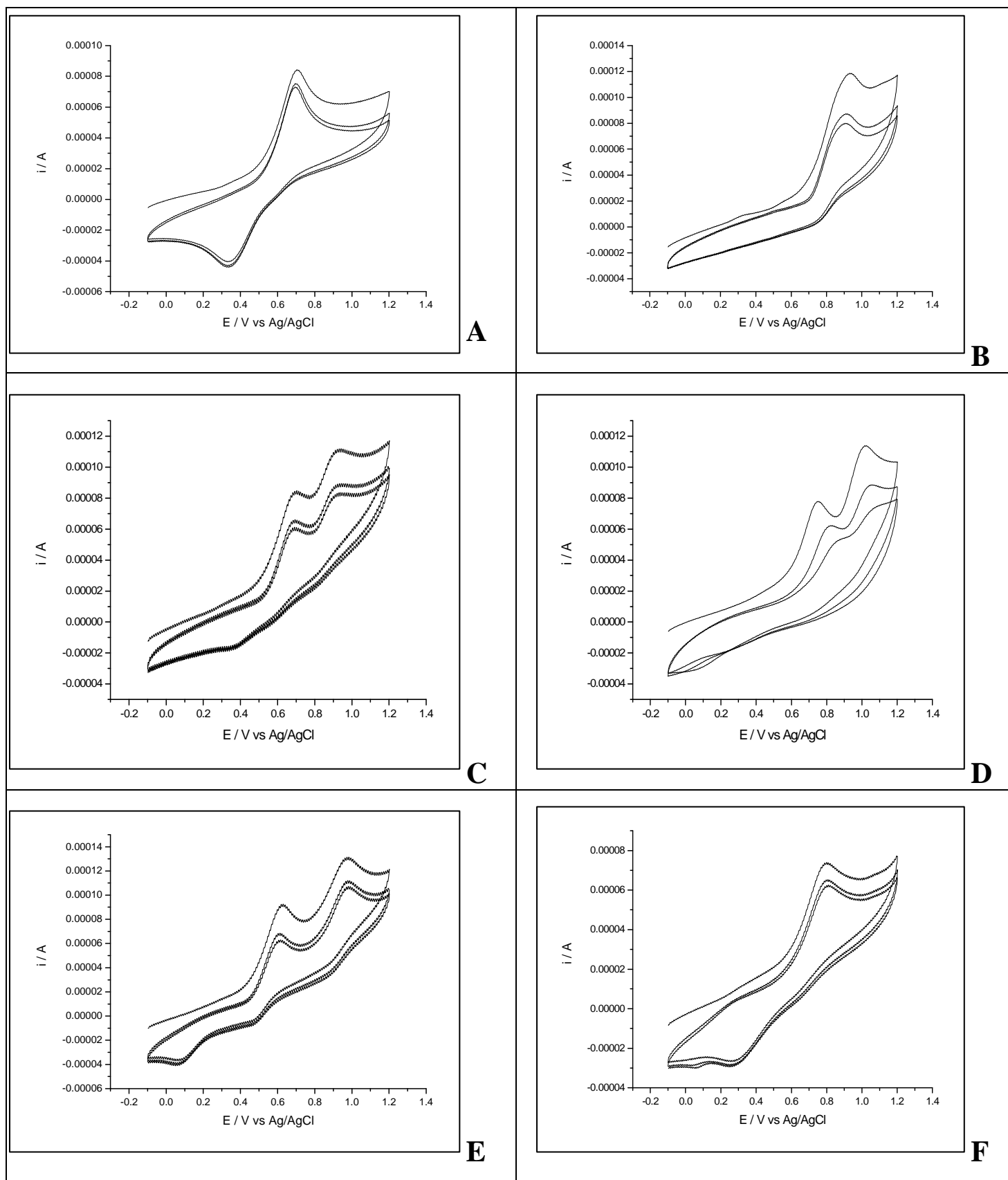


Figura 18. Voltamogramas cíclicos para soluções de 1 mM de (A) ácido caféico, (B) ácido ferrúlico, (C) ácido gálico, (D), catequina, (E) quercetina e (F) rutina em metanol. Taxa de varredura: 100 mVs^{-1} .

Na voltametria cíclica com o aumento do potencial para regiões mais positivas (anódicas) ocorre a oxidação do composto em solução, gerando um pico de corrente proporcional à concentração deste composto. Quando o potencial já tiver atingido um valor no qual nenhuma reação de oxidação ocorre, o potencial é varrido no sentido inverso (região catódica), até o valor inicial, e no caso de uma reação reversível, os produtos que tiverem sido gerados no sentido direto (e se localizem ainda próximos à superfície do eletrodo) serão reduzidos, gerando um pico simétrico ao pico da oxidação. O potencial observado no pico gerado na região anódica é o chamado potencial de oxidação. Na Tabela 9 encontram-se os valores dos potenciais de oxidação dos seis compostos fenólicos em meio metanólico. Os valores apresentados nesta tabela mostraram excelente reprodutibilidade, com desvios padrões menores que 0,02 V.

Tabela 9. Potencial de oxidação dos compostos fenólicos estudados em metanol com concentração de 1mM.

Composto fenólico	Pico observado	Potencial de oxidação (V)*
Ácido caféico	Primeiro	0,698 ^a
Ácido ferrúlico	Primeiro	0,916 ^c
Ácido gálico	Primeiro	0,696 ^a
	Segundo	0,935
Catequina	Primeiro	0,755 ^b
	Segundo	1,017
Quercetina	Primeiro	0,616 ^d
	Segundo	0,977
Rutina	Primeiro	0,802 ^b

* Valores de potencial com a mesma letra representam valores não significativamente diferentes pelo teste de Tukey para $p < 0,05$.

O potencial de oxidação medido desta forma está relacionado com a força redutora do fenólico. Isto é relevante para a sua ação antioxidante. Aqueles com menor potencial de oxidação seriam capazes de capturar facilmente os radicais livres, bem como a reconstituição de outras espécies oxidadas (Blasco, González & Escarpa, 2004).

Segundo Kilmartin, Zou & Waterhouse (2002), moléculas que apresentam o grupo orto-difenol, possuem potencial de oxidação mais baixo (é um grupo fácil de ser oxidado). Esse fato pode ser observado para o ácido gálico e a quercetina, dando destaque para a quercetina que apresentou o menor potencial de oxidação dentre todos os compostos (Tabela

9), esperando-se, com isso, que apresente um elevado “poder antioxidante”. Essa confirmação vem pela elevada atividade demonstrada por esse composto nos métodos utilizados neste trabalho (Figuras 13, 14, 15 e 16). A rutina e a catequina são exceções, pois apresentaram potências mais elevadas dentre as moléculas que possuem o grupo orto-difenol, como também visto por Kilmartin, Zou & Waterhouse (2002).

No presente trabalho, o ácido ferrúlico apresenta-se como o composto fenólico de maior potencial (Tabela 9), episódio já esperado devido à falta do grupo orto-difenol e principalmente pela presença do grupo metil em sua estrutura, que é responsável pelo aumento significativo no potencial de oxidação (Gaspar et al, 2009). É esperado, portanto, que este composto seja menos ativo como antioxidante, fato este confirmado pela sua baixa atividade antioxidante nos quatro métodos aqui avaliados (Figuras 13, 14, 15 e 16).

Vale ressaltar que o poder redutor dos antioxidantes é conhecido por ser regulado por propriedades químicas como seus potenciais de ionização (PI) e as energias de dissociação da ligação O-H, com o PI como o maior contribuinte. Por outro lado, os mecanismos específicos da oxidação de fenóis também envolvem complexos processos termodinâmicos como transporte de massa, absorção e reações eletroquímicas/químicas (por exemplo, reação de dimerização) (Cheng & Li, 2004).

O comportamento eletroquímico das moléculas estudadas está de acordo com trabalho realizado por Kilmartin, Zou & Waterhouse (2001), que avaliou as propriedades redox de diversos compostos, dentre eles os seis aqui estudados, e também observou a quercetina com baixo potencial de oxidação e o ácido ferrúlico como um dos maiores potenciais dentro do grupo de moléculas.

O voltamograma do ácido caféico mostra que sua oxidação foi reversível, ou seja, os produtos desta reação foram reduzidos no eletrodo de carbono vítreo, gerando um pico de corrente negativa (catódico) na varredura inversa. Esse fato foi também observado com a quercetina e a rutina (Figura 6). A reversibilidade não está relacionada com a estabilidade dos compostos fenólicos, mas fornece um parâmetro adicional que pode ajudar a identificar os compostos fenólicos presentes em uma mistura complexa (Kilmartin, Zou & Waterhouse, 2002).

4.4 Comparação entre os métodos

Segundo Prior, Wu & Schaich (2005) características como extensão analítica e reprodutibilidade são fundamentais para um método de avaliação da capacidade

antioxidante, assim como o reconhecimento de interferentes. Estes mesmos autores propõem os métodos ORAC, TEAC e FC como os padrões para essa função em alimentos. Porém, os resultados deste estudo, indicados pelas Figuras 13, 14, 15 e 16 e pela Tabela 10, mostra que a análise ORAC, mesmo apresentando uma maior amplitude de valores, possui altos desvios entre as replicatas, assim como o TEAC. O método de Folin-Ciocalteu possui a melhor reprodutibilidade de valores dentre as quatro metodologias.

Certos autores reconhecem a fragilidade do método ORAC quanto à reprodutibilidade dos resultados por ser um ensaio altamente sensível a temperatura. Seerum et al. (2008) verificaram que uma pequena variação da temperatura na placa utilizada na leitura das amostras leva a uma significativa redução na reprodutibilidade dos resultados. Thaipong et al. (2006) também chegaram a essa afirmação quando verificaram diferenças significativas entre as replicatas no método ORAC, assim como no método ABTS, para amostras de extratos de goiaba. Eles constataram também que o valor da leitura tende a ser maior na parte superior e na parte esquerda dos 96 poços da placa, afirmando, com isso, que a localização das amostras na placa induz a um aumento da taxa de erro nos ensaios.

Tabela 10. Amplitude de valores obtidos em quatros métodos estudados.

Método	Valor mínimo-valor máximo
ORAC	1172 – 17059 (μ M ET)
FC	0,88 – 2,82 (mM EAG)
TEAC	644 – 3570,8 (μ M ET)
DPPH	726,2 – 3901,4 (μ M ET)

ET: Equivalente Trolox; EAG: Equivalente Ácido Gálico.

Vale destacar que o propósito inicial do método de Folin-Ciocalteu, na maioria dos trabalhos científicos, é de expressar a concentração total em compostos fenólicos numa solução. Porém, o fato de ele ter proporcionado resultados de 0,88 a 2,82 mM Equivalentes Ácido Gálico para os compostos aqui estudados, demonstra claramente que a estimacão usual desse conteúdo baseada em um único padrão é grosseira, tornando o método comprovadamente debilitado para este fim. Para melhor representar este evento, quantificou-se pelo método os seis compostos fenólicos utilizados neste estudo em quatro

concentrações distintas, sendo os resultados expressos em mg EAG/L como é usualmente encontrado na literatura (Figura 19).

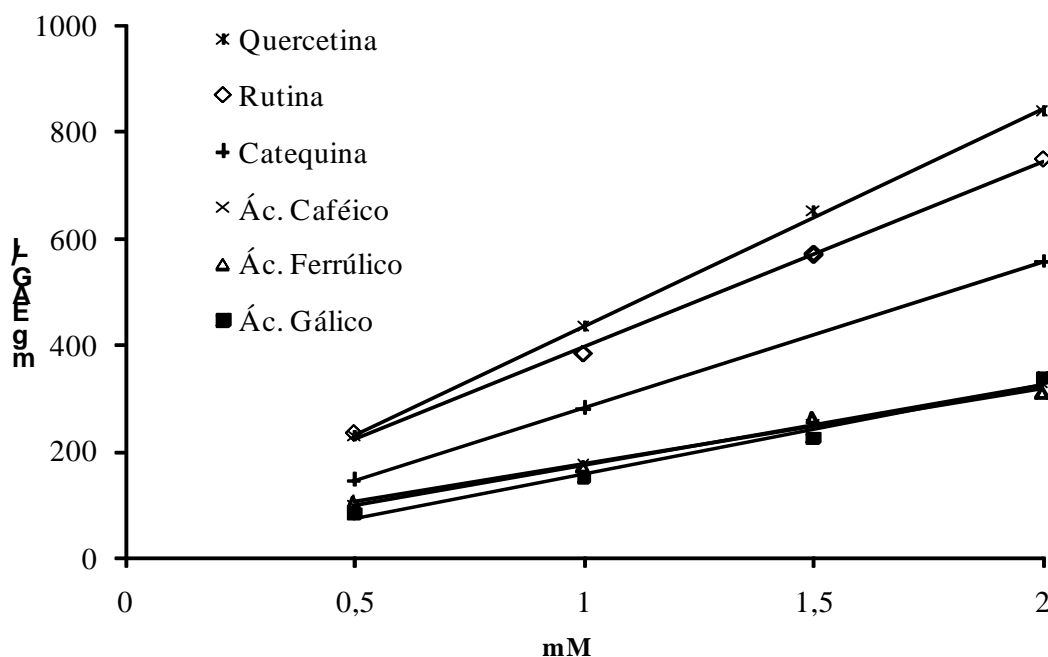


Figura 19. Curvas de quantificação do conteúdo de seis compostos fenólicos pelo método de FC.

Através da figura, observa-se a diferença do coeficiente angular dos ácidos fenólicos e dos flavonóides. Assim, a expressão dos resultados como equivalentes molares de ácido gálico para a avaliação do conteúdo total de amostras, como matrizes vegetais, resultará em erros significativos se a maioria dos compostos fenólicos não forem ácidos fenólicos como o ácido gálico. Souza (2007) também chegou a essa conclusão. Seu trabalho comparou coeficientes obtidos por regressão linear de oito compostos fenólicos, incluindo o ácido gálico, dosados pelo método de Folin-Ciocalteu. O ácido gálico também apresentou coeficiente angular distinto (0,0197) dos demais fenólicos (em média 0,03).

Na Tabela 11 encontram-se os valores dos coeficientes de correlação entre os métodos da medida da capacidade antioxidante.

Tabela 11. Coeficientes de correlação entre os métodos analíticos estudados.

	Coeficiente de correlação	n
ORAC vs TEAC	0,0188	90
ORAC vs DPPH	0,2037*	90
ORAC vs FC	0,3374*	90
TEAC vs DPPH	0,3618*	90
TEAC vs FC	0,0343	90
DPPH vs FC	0,6234*	90
VC vs ORAC	0,0361	6
VC vs TEAC	- 0,5664	6
VC vs DPPH	- 0,5502	6
VC vs FC	- 0,2846	6

(*) Estatisticamente significativo para $p < 0,05$; VC: Voltametria Cíclica.

Correlações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) são encontradas entre alguns métodos, porém pouco representativas, já que são baixas. Isso reforça a necessidade da utilização de no mínimo dois métodos para uma avaliação mais apropriada da atividade antioxidante. Recomenda-se, então, os que não apresentaram correlação significativa, como TEAC e ORAC ou TEAC e FC, sendo bastante pertinentes por serem de mecanismos (no primeiro caso) e meios reacionais diferentes. Outros autores também sugerem a utilização de um conjunto de métodos como a forma ideal de avaliar a atividade antioxidante, por exemplo, Tabart et al. (2009), propuseram um meio de normalização da capacidade antioxidante, utilizando uma média ponderada dos resultados de quatro métodos baseados em princípios diferentes: DPPH, ORAC, hemólise e ressonância eletrônica de spin.

Observa-se também que a voltametria cíclica não apresentou correlação com nenhum dos outros métodos, corroborando o fato de a correlação entre potencial redox e métodos baseados na transferência de elétrons ainda não ter sido consistentemente demonstrada. As correlações negativas com os métodos baseados na transferência de elétrons (DPPH, TEAC e FC), apesar de não significativas, sugerem uma tendência inversamente proporcional, ou seja quanto menor o potencial de oxidação maior a atividade antioxidante. Já a correlação mais

baixa com o método ORAC já era esperada por este ser um ensaio baseado em transferência de átomo de hidrogênio.

4.5 Interações antioxidantes

O planejamento experimental de misturas utilizado neste trabalho permite, com auxílio do programa STATISTICA, indicar as possíveis misturas de compostos fenólicos que apresentam efeito sinérgico ou antagônico. Essas interações, nos quatro métodos analíticos, são aqui indicadas pelo gráfico de Pareto (Figuras 20, 21 e 22), que mostra a contribuição real na atividade antioxidante de cada substância e das misturas que apresentam efeito positivo ou negativo sobre a resposta. Apenas as variáveis estatisticamente significativas são apresentadas ($p < 0,05$).

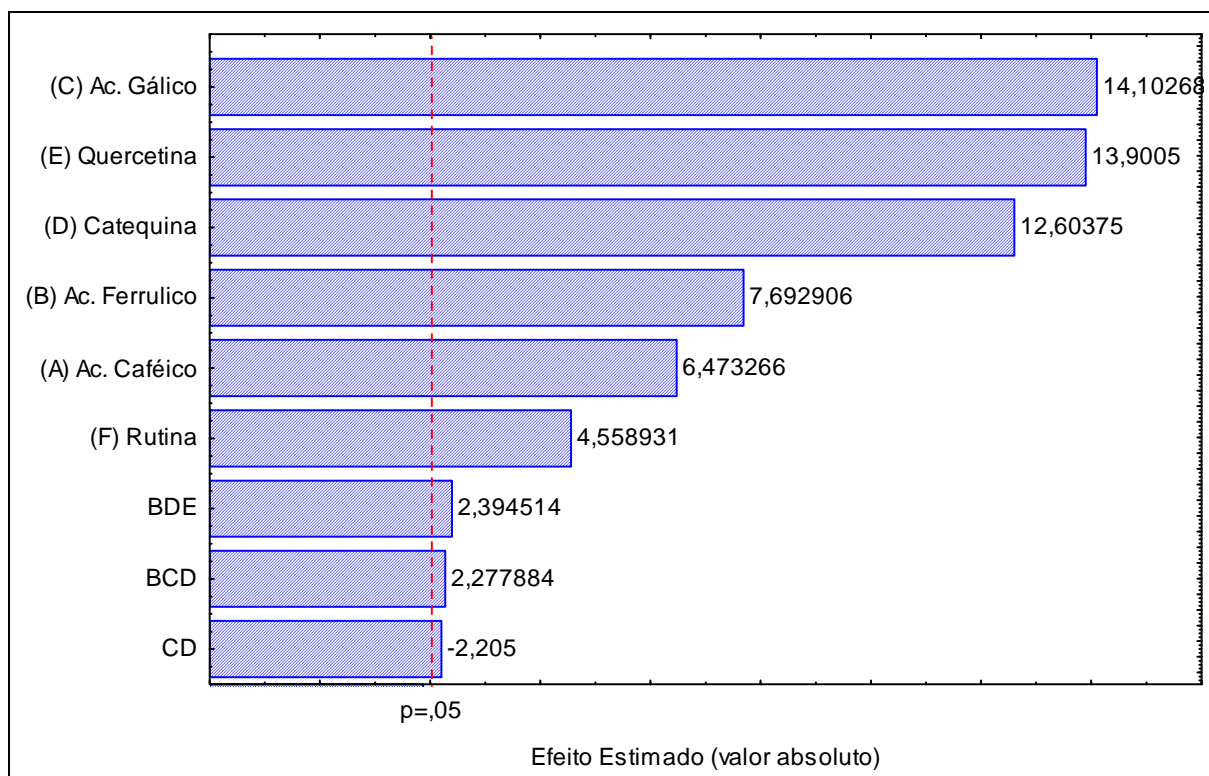


Figura 20. Efeito estimado das variáveis e suas interações sobre a atividade antioxidante medida pelo método TEAC.

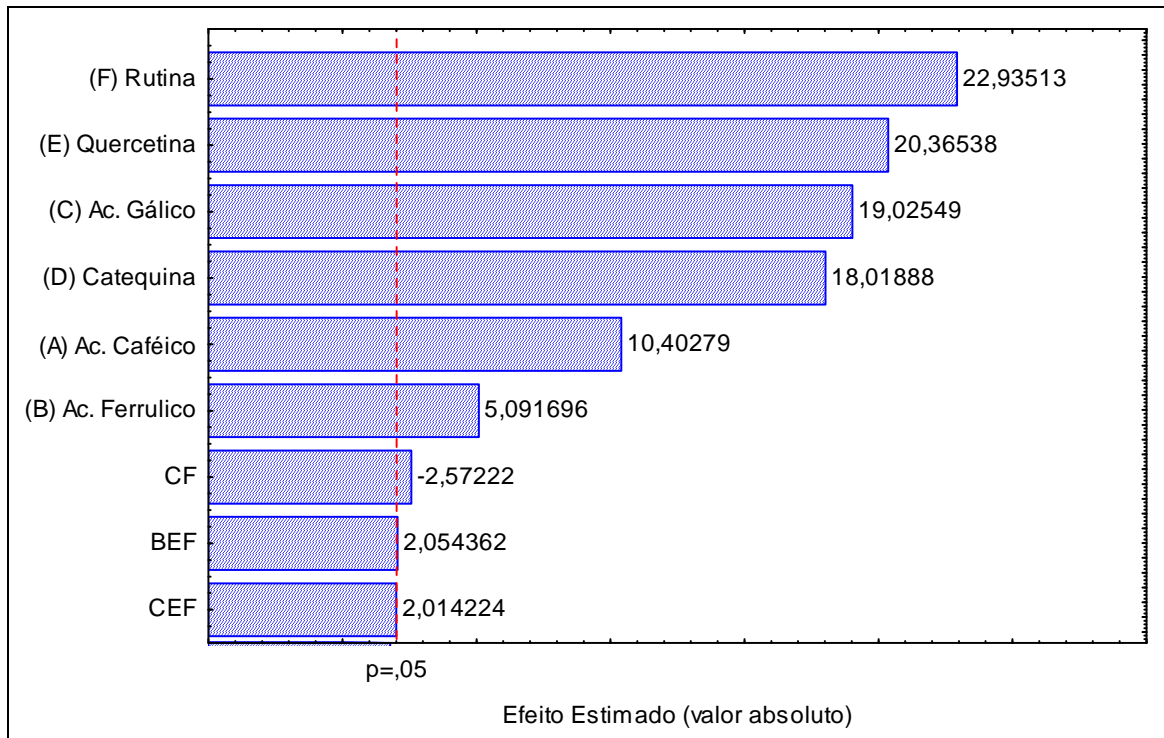


Figura 21. Efeito estimado das variáveis e suas interações sobre a atividade antioxidante medida pelo método DPPH.

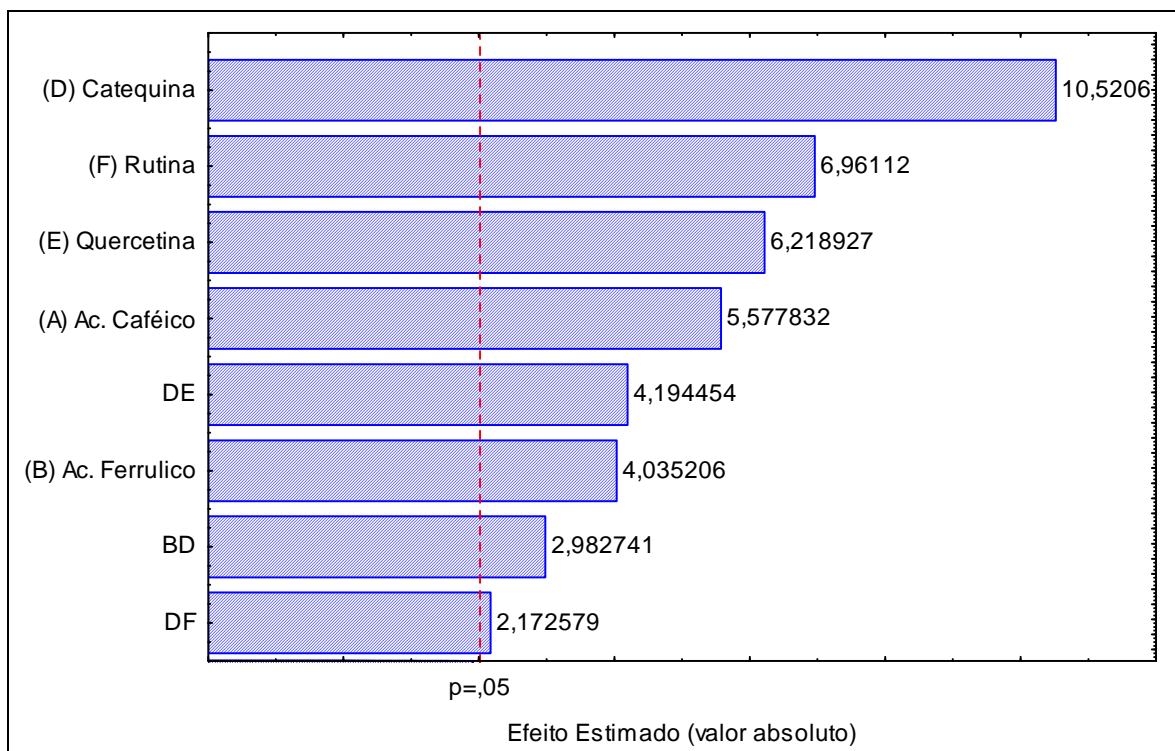


Figura 22. Efeito estimado das variáveis e suas interações sobre a atividade antioxidante medida pelo método ORAC.

O método de FC não demonstrou sensibilidade para reconhecer possíveis interações. Observa-se que os métodos ORAC, TEAC e DPPH apresentaram interações

entre compostos fenólicos estatisticamente significativas, em geral, positivas, demonstrando possível sinergismo. No entanto, foram poucas combinações que apresentaram essa interação, considerando o total de combinações possíveis entre os compostos fenólicos.

Vale ressaltar que mesmo com a presença dessas interações, tanto com efeito positivo quanto negativo sobre a resposta, a contribuição é mínima (valores absolutos de 2 a 4) se comparada aos efeitos dos compostos quando puros.

Um maior efeito da mistura catequina com a quercetina no método ORAC (valor absoluto de 4,2) é observada devido a alguma atividade dos produtos de reação desta última, como já comprovado na literatura (Haenen et al., 2006).

Hidalgo, Sánchez-Moreno e Pascual-Teresa (2010) também observaram interações entre compostos fenólicos, os flavonóides, utilizando DPPH e FRAP. Com o ensaio DPPH, a maioria das combinações promoveu efeitos antagônicos, com exceção de algumas interações sinérgicas como a mistura kaempferol e miricetina.

Uma possível explicação para as interações com acréscimo na atividade antioxidante seria a regeneração entre os antioxidantes, em que um composto fenólico regeneraria o radical resultante da oxidação do outro fenólico, aumentando assim a sua atividade, como ocorreu no trabalho feito por Rosseto et al. (2002) em que a malvidina-3-glucosídeo era regenerada pela catequina, como já demonstrado na Figura 10 promovendo um incremento significativo na eficiência antioxidante desses compostos. Porém, para avaliar essa hipótese, análises mais específicas são requeridas.

Para melhor visualizar os efeitos sinérgicos e antagônicos das misturas apontadas pela análise estatística, estas, assim como os compostos puros, foram submetidas à análise de varredura espectrofotométrica. Uma característica particular da lei de Lambert-Beer é a aditividade das absorvâncias. Teoricamente, o espectro de absorção observado pela mistura será a soma dos espectros individuais que seriam obtidos caso cada uma das espécies estivesse presente sozinha na solução e sob as mesmas condições experimentais, não ocorrendo nenhuma interação entre as espécies. Assim, alguma alteração no perfil espectrofotométrico destas misturas pode indicar a presença de interações entre as moléculas. As misturas que tiveram efeito sobre o ORAC foram diluídas em tampão pH 7,4, sobre o DPPH, em metanol e sobre o TEAC, em etanol, nas mesmas diluições em que se encontravam em cada método.

Os gráficos das varreduras espectrofotométricas de algumas misturas podem ser visualizados nas Figuras 23, 24, 25, 26 e 27.

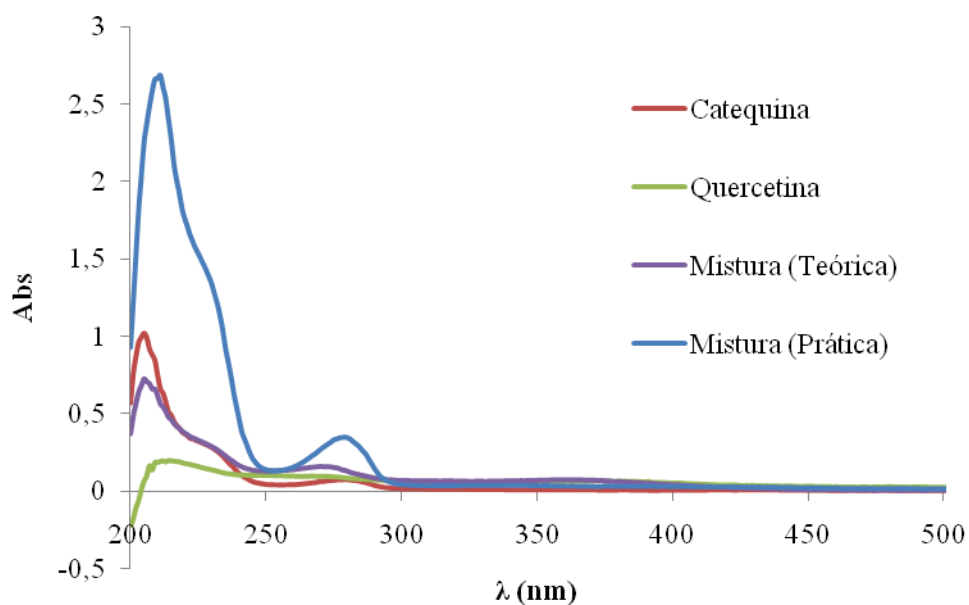


Figura 23. Varredura espectrofotométrica das soluções padrões de catequina, quercetina e das misturas (teórica e prática) em tampão fosfato pH 7,4, 75 mM.

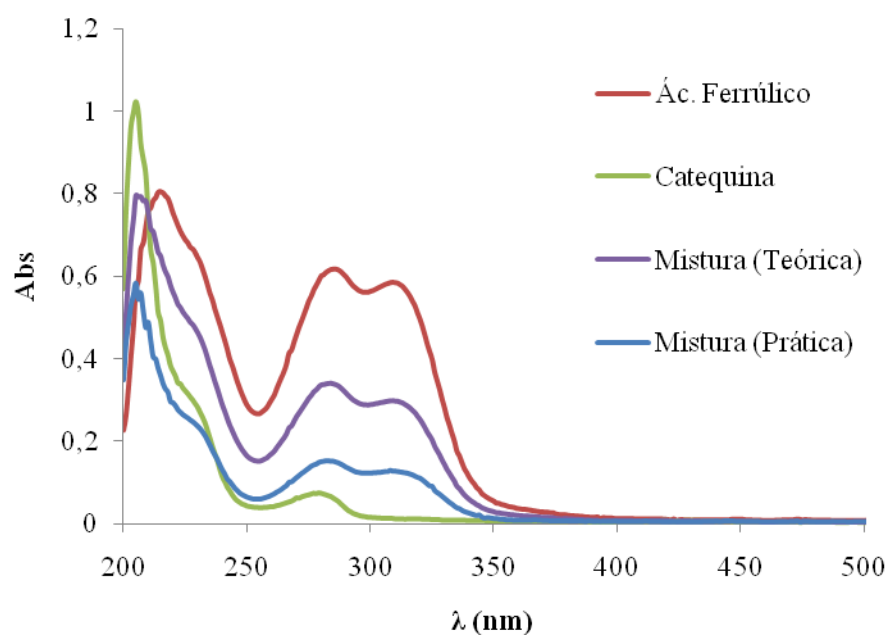


Figura 24. Varredura espectrofotométrica das soluções padrões de ácido ferrúlico, catequina e das misturas (teórica e prática) em tampão fosfato pH 7,4, 75 mM.

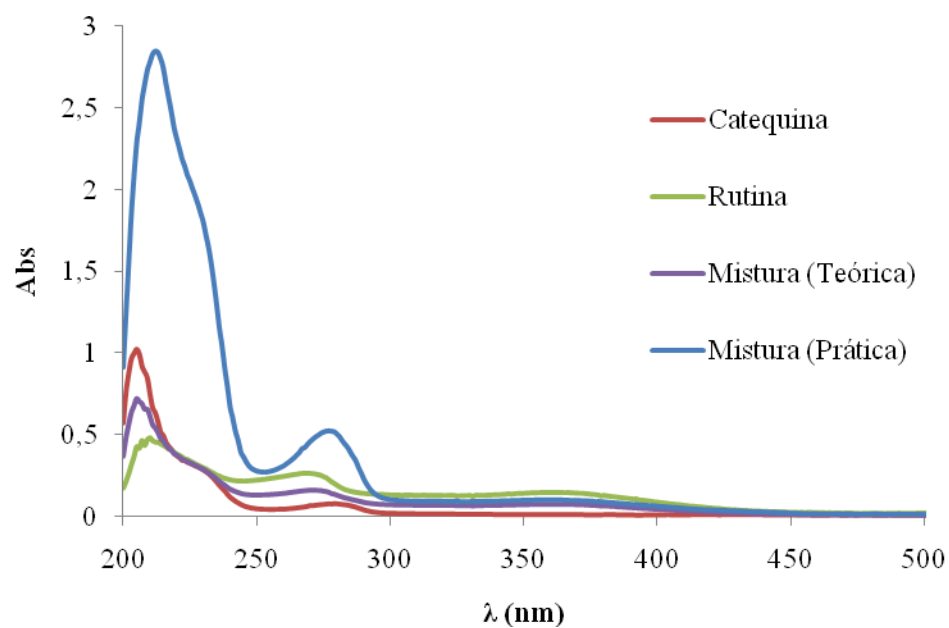


Figura 25. Varredura espectrofotométrica das soluções padrões de catequina, rutina e das misturas (teórica e prática) em tampão fosfato pH 7,4, 75 mM.

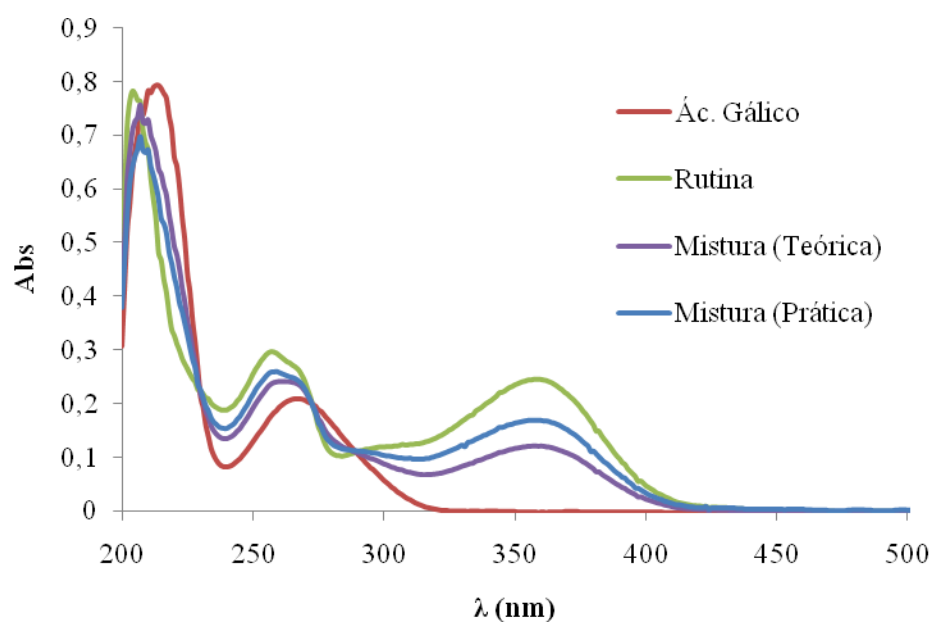


Figura 26. Varredura espectrofotométrica das soluções padrões de ácido gálico, rutina e das misturas (teórica e prática) em metanol.

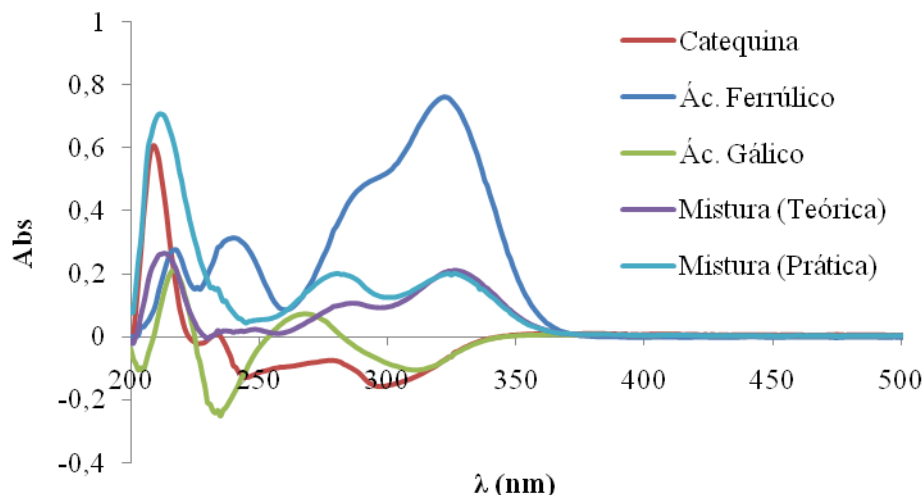


Figura 27. Varredura espectrofotométrica das soluções padrões de ácido ferrúlico, catequina, ácido gálico e das misturas (teórica e prática) em etanol.

Observa-se que as misturas diluídas em tampão fosfato pH 7,4 apresentaram modificações no perfil espectrofotométrico. Nas Figuras 23 e 25, verifica-se claramente que o perfil de absorvância da mistura de compostos fenólicos é maior que o esperado, chamado efeito hiperacrômico. O efeito oposto, o hipocrômico (diminuição da absorvância), foi visualizado na mistura ácido ferrúlico/catequina (Figura 24). Um deslocamento das bandas de absorção para um comprimento de onda maior, o efeito batocrômico, também pode ser visto nas Figuras 23 e 25. Essas mudanças reforçam a idéia da existência de interação entre as moléculas combinadas. Esse aumento na intensidade de absorção, por exemplo, pode estar sendo operado, aparentemente, por pontes de hidrogênio entre as moléculas. Com isso, pode-se dizer que a análise de varredura espectrofotométrica nas misturas que tiveram efeito sobre o ORAC conseguiu apoiar a idéia da presença de interações entre os compostos fenólicos.

Na mistura ácido gálico/rutina em meio metanólico esses deslocamentos não são observados (Figura 26). Pelo gráfico, percebe-se nitidamente que o pico máximo de absorvância apresentado pouco difere do teórico (~10%).

O efeito hiperacrômico também pode ser observado na mistura catequina/ácido ferrúlico/ácido gálico em etanol (Figura 27).

5 CONCLUSÕES

Os flavonóides confirmaram-se como mais poderosos quanto à atividade antioxidante, se comparados aos ácidos fenólicos, por possuírem uma estrutura química que favorece a estabilidade do radical formado.

O ácido gálico foi uma exceção dentre os ácidos fenólicos por apresentar elevada atividade antioxidante, comparável a dos flavonóides, quando medida pelos métodos TEAC e DPPH, ambos de meios alcoólicos, o que leva a indícios da forte influência do meio reacional da técnica analítica na reatividade dos compostos em relação a sua atividade antioxidante.

Os potenciais de oxidação observados nos voltamogramas foram menores para a quercetina e maiores para o ácido ferrúlico, sendo estes de elevada e baixa atividade antioxidante, respectivamente, reforçando a idéia de quanto menor o potencial maior a força antioxidante do composto.

Os resultados demonstraram a fragilidade de alguns métodos estudados e conseqüentemente das discussões e conclusões às vezes tiradas, em que: o método ORAC, mesmo apresentando uma larga amplitude de valores entre compostos (de 1172 a 17059 $\mu\text{M ET}$), possuiu altos desvios; o método de Folin-Ciocalteu mostrou uma boa reprodutibilidade, podendo ser recomendado para avaliar a capacidade antioxidante de substâncias fenólicas individualmente, mas debilitado para quantificar o conteúdo total de fenólicos, além de parecer pouco sensível às interações.

Fracas correlações entre métodos foram observadas (ORAC e DPPH, ORAC e FC, TEAC e DPPH e DPPH e FC), devendo, assim, ser utilizado no mínimo dois métodos para uma avaliação mais consistente da atividade antioxidante, por exemplo: ORAC e TEAC ou FC e TEAC. A medição do potencial de oxidação por voltametria cíclica não apresentou correlação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com nenhum dos demais métodos.

O aparecimento de efeitos hipercrômico, hipocrômico e batocrômico, bem visualizados nas misturas que tiveram efeito sobre o ORAC, reforçam a idéia de sinergismo e antagonismo. Contudo, houve, no geral, a presença de poucas e irrisórias interações entre compostos fenólicos sobre a atividade antioxidante total.

BIBLIOGRAFIA

ALHO H.; LEINONEN J. Total antioxidant measured by chemiluminescence methods, **Methods in Enzymology**, 299, 3-15, 1999.

ARUOMA, O.I; SPENCER, J.P.E.; WARREN, D.; BUTTER, J. HALLIWELL, B. Characterization of food antioxidants illustrated using commercial garlic and ginger preparation. **Food Chemistry**, 60, 149-156, 1997.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, 2ª edição, Editora da Unicamp, Campinas, 2003.

BELTRÁN, J.L.; SANLI, N.; FONRODONA, G.; BARRÓN, D.; ÖZKAN, G.; BARBOSA, J. Spectrophotometric, potentiometric and chromatographic pK_a values of polyphenolic acids in water and acetonitrile-water media. **Analytica Chimica Acta**, 484, 253-264, 2003.

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

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

CALDWELL, C.R. Alkylperoxyl radical scavenging activity of red leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 4589-4595, 2003.

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

CAO, G.; VERDON, C.P.; WU, A.H.B., WANG, H., PRIOR, R.L. Automated Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity with COBAS FARA II. **Clinical Chemistry**, 41, 1738-1744, 1995.

CHEVION, S; ROBERTS, M.A.; CHEVION, M. The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. **Free Radical Biology e Medicine**, 28, 860-870, 2000.

CORREA, S.L.; HOTZA, D.; SEGADÃES, A.M. Uso de técnicas de planejamento experimental e programação não linear para otimização de massas cerâmicas triaxiais. **Revista Matéria**, 9, 271-279, 2004.

DANGLES, O. The physico-chemical properties of polyphenols. How do they relate to their roles in plants, foods and human health. **Agrofood industry hi-tech**, 4, 64-67, 2006.

ESPÍN, J. C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H. J. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetables oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48, 648-656, 2000.

FOTI, M.; DAQUINO, C.; GERACI, C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the dpph radical in alcoholic solutions. **Journal Organic Chemistry**, 69, 2309-2314, 2004.

FRANCIS, F.J. Food colorants: anthocyanins. **Critical reviews in Food Science and Nutrition**, 28, 273-314, 1989.

FRANKEL, E. **Lipid Oxidation**. 2nd edn. Bridgewater: The Oily Press Lipid Library. 2005.

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of Food Science and Agricultural**, 80, 1925-1941, 2000.

HAENEN, G.R.M.M.; ARTS, M. J.T.J.; BAST, A.; COLEMAN, M.D. Structure and activity in assessing antioxidant activity in vitro and in vivo. A critical appraisal illustrated with the flavonoids. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 21, 191-198, 2006.

HAGERMAN, A.E.; RIEDL, K.M.; JONES, G.A.; SOVIK, K.N.; RITCHARD, N.T.; HARTZFELD, P.W.; RIECHEL, T.L. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46, 1887-1892, 1998.

HALLIWELL, B. Free Radicals and Antioxydant: A personal view. **Nutrition Reviews**, 52, 253-265, 1994.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, 33, 601-617, 1995.

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

HAMILTON, R.J. ; KAMU, C. ; PRISK, E.; PADLEY, F.B. ; PIERCE, H. Chemistry of free radicals in lipids. **Food Chemistry**, 60, 193-199, 1997.

HARBONE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, 55, 481-504, 2000.

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

HELLER, W. Flavonoid biosynthesis: an overview. In: MIDDLETON, E.; HARBORNE, J.B. **Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships**, 213. New York: Alan R. Liss, 1986.

HEO, H.J.; KIM, Y. J.; CHUNG, D.; KIM, D. Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. **Food Chemistry**, 104, 87-92, 2007.

HIDALGO, M.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; PASCUAL-TERESA, S. Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. **Food Chemistry**. Article in Press, 2010.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 1841-1856, 2005.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M. F.; JUDITH, A.; PRIOR, R. L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 4437-4444, 2002.

IACOPINI, P.; BALDI, M. ; STORCHI, P.; SEBASTIANI, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, In vitro antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition and Analysis**, 21, 589-598, 2008.

IUPAC. Stability constants of metal-ion complexes. Part B. Organic Ligands. **Pergamon Press**, Oxford, 1979a.

IUPAC. Ionization constants of organic acids in aqueous solutions. **Pergamon Press**, Oxford, 1979b.

JADHAVI, S.J.; NIMBALKAR, S.S.; KULKARNI, A.D.; MADHAVI, D.L. Lipid oxidation in biological and food systems. In: MADHAVI, D.L.; DESHPANDE, S.S.; SALUNKHE, D.K. **Food antioxidants – technological, toxicological and health perspectives**. New York: Marcel Dekker, Inc., 5-63, 1995.

KILMARTIN, P.A.; ZOU, H.; WATERHOUSE, A.L. A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49, 1957-1965, 2001.

KILMARTIN, P.A.; ZOU, H.; WATERHOUSE, A.L. Correlation of wine phenolic composition versus cyclic voltammetry response. **American Journal of Enology and Viticulture**, 53, 2002.

LU, Y.; FOO, L. Y. The polyphenol constituents of grape pomace. **Food Chemistry**, 65, 1-8, 1999.

MADHAVI, D.L.; SINGHAI, R.S.; KULKARNI, P.R. Technology aspects of food antioxidants. In: MADHAVI, D.L.; DESHPANDE, S.S.; SALUNKHE, D.K. **Food antioxidants – technological, toxicological and health perspectives**. New York: Marcel Dekker, Inc., 159-265, 1995.

MARTIN, S.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. **Annales de cardiologie et d'angéiologie**, 51, 304-315, 2002.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presente em alimentos. **Boletim da SBCTA**, 36, 1-11, 2002.

MEYER, A. S.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E.N. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. **Food Chemistry**, 61, 71-75, 1998.

NIJVELDT, R.J.; VAN NOOD, E.; HOORN, D.E.C.; BOELEN, P.G.; NORREN, K.V.; LEEUWEN, A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Journal Clinical and Nutrition**, 74, 418-425, 2001.

NUTTAL, L.; KENDALL, M.; MARTIN, U. Antioxidant therapy for the prevention of cardiovascular disease. **QJM: An International Journal of Medicine**, 92, 239-244, 1999.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49, 4619-4626, 2001.

PACHECO-PALENCIA, L.; DUNCAN, C.E.; TALCOTT, S. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatória*. **Food Chemistry**, 115 (4), 1199-1205, 2009.

PENNINGTON, J.A.T. Food composition databases for bioactive food components. **Journal of Food Composition and Analysis**, 15, 419-434, 2002.

PINELO, M.; MANZOCCO, L.; NUNEZ, M.J.; NICOLI, M. C. Interaction among phenols in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 1177-1180, 2004.

POZO-INSFRAN, D. D., BRENES, C.H., TALCOTT, S.T. Phytochemical composition and pigment stability of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 1539-1545, 2004.

PRAKASH, A. Antioxidant activity. **Medallion Laboratories-Analytical Progress Press**, 19, 1-6, 2001.

PRIOR, R.L.; HUANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 3273-3279, 2003.

PRIOR; R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 10, 4290-4302, 2005.

RE, R.; PELLIGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, 26, 1231-1237, 1999.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic and phenolic acids. **Free Radicals Biology and Medicine**, 20, 933-956, 1996.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in plant science**, 2, 152-159, 1997.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G., SWATSITANG, P., GLOVER, W. Phenolic compounds and their roles in oxidative process in fruits. **Food Chemistry**, 66, 401-436, 1999.

ROSS, J.A.; KASSUM, C.M. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Review of Nutrition**, 22, 19-34, 2002.

ROSSETTO, M.; VANZANI, P.; MATTIVI, F.; LUNELLI, M.; SCARPA, M.; RIGO, A. Synergistic antioxidant effect of catechin and malvidin 3-glucoside on free radical-initiated peroxidation of linoleic acid in micelles. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 408, 239-245, 2002.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of nutrition**, 2000.

SEERAM, N. P.; AVIRAM, M.; ZHANG, Y.; HENNING, S. M.; FENG, L.; DREHER, M.; HEBER, D. Comparison of antioxidant potency of commonly polyphenol-rich beverages in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 1415-1422, 2008.

SHAHIDI, F.; JANIYHA, P. K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 32, 67-103, 1992.

SILVA, E.M.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, 101, 1012-1018, 2007.

SINGLETO, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal Enology Viticulture**, 16, 144-158, 1965.

SMITH, M.; MARTELL, E. Critical stability constants, 6 (supplement section). **Plenum Press**, New York, 1989.

SOUZA, J.N.S. **Etude des propriétés antioxydantes *in vitro* d'extraits de feuilles de *Byrsonima crassifolia* et *Inga edulis* et caractérisation partielle des composés phénoliques**. Tese (Doutorado em Ciências Agrônômicas e Engenharia Biológica). Universidade Católica de Louvain. Louvain la Neuve, 2007.

SOUZA, J.N.S.; SILVA, E.M.; SILVA, M.N.; ARRUDA, M.S.P.; LARONDELLE, Y.; ROGEZ, H. Identification and antioxidant activity of several flavonoids of *Inga edulis* leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 18, 1276-1280, 2007.

STRATIL, P.; KLEJDUS, B.; KUBAN, V. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables-Evaluation of spectrophotometric methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54 (3), 607-616, 2006.

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

TEISSEDRE, P.L.; FRANKEL, E.N.; WATERHOUSE, A.L.; PELEG, H.; GERMAN, J.B. Inhibition of in Vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidant from grapes and wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 70, 55-61, 1996.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOPA, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, 19, 669-675, 2006.

VILLAÑO, D.; FERNANDEZ-PACHON, M.S.; TRONCOSO, A.M.; GARCIA-PARRILLA, M.C. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. **Analytica Chimica Acta**, 538, 391-398, 2005.

YANG, C.S.; LANDAU, J.M.; HUANG, M.T.; NEWMARK, H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review Nutrition**, 21, 381-406, 2001.