

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE RESÍDUO
AGROINDUSTRIAL DE GOIABA

Recife

2010

ROSILDA JOSEFA DO NASCIMENTO

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE RESÍDUO
AGROINDUSTRIAL DE GOIABA**

Dissertação submetida à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr. Enayde de Almeida Melo

Recife
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE RESÍDUO
AGROINDUSTRIAL DE GOIABA

Por Rosilda Josefa do Nascimento

Esta dissertação foi julgada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em 25/02/2010 pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimento em sua forma final.

Banca Examinadora

Profª Drª: Vera Lúcia Arroxelas Galvão de Lima
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profª Drª Nonete Barbosa Guerra
Universidade Federal de Pernambuco

Profº Dr Egídio Bezerra Neto
Universidade Federal Rural de Pernambuco

A Deus, pela presença constante em minha vida.

A minha mãe, Josefa, pelo amor,
suporte, força e incentivo, sempre.

Ao meu irmão querido, Roberto, pelo carinho,
ajuda e amizade.

A Cláudio, pelo amor, carinho, ajuda, compreensão,
paciência e por acreditar em mim sempre.

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para realização dessa etapa de minha vida, meu sincero reconhecimento e agradecimento, em especial:

À Professora Enayde de Almeida Melo, por ter sido uma grande orientadora e pelo apoio na realização desta dissertação.

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco– (Facepe) pela bolsa cedida.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco – (UFRPE).

A empresa FRUTOTAL, pela doação dos resíduos de goiaba.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aos colegas de pós-graduação, Ana Carolina, Anízia, Armando, Cristina e Janusa pelos momentos de companheirismo.

Aos professores do Departamento de Ciências Domésticas e do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

As grandes amigas do laboratório Ana Paula, Carla, Lídia, Naíra, Patrícia e Viviane pela amizade e apoio de sempre.

A Cristiane pela inestimável contribuição na elaboração deste trabalho e por nossa amizade. Muito Obrigada!

As minhas grandes amigas Alessandra, Denise e Paulinha pelo apoio e incentivo de sempre.

As minhas amigas Beatriz, Bruna e Zoraide, por vibrarem com minhas conquistas.

A todas as pessoas citadas e aquelas que possa ter esquecido, o meu carinho e amizade.

MUITO OBRIGADA!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS – ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico

BHA – Butil-hidroxianisol

BHT – Butil-hidroxitolueno

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EA – Atividade anti-radical

EC₅₀ – Concentração mínima da substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH.

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FAO – Food and Agriculture Organization

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

HO₂· – Radical hidroperoxila

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

O₂^{·-} – Radical superóxido

OH· – Radical hidroxil

PG – Propil-galato

RDC – Resolução da diretoria colegiada

TEAC – Capacidade antioxidante equivalente ao trolox

TBHA – Terc-butilhidroquinona

TROLOX – 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico

WHO – World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Quantidade produzida de goiabas (toneladas) Brasil e região geográfica.....	23
Figura 2: Área plantada de goiabas (hectares) Brasil e região geográfica.....	24
Figura 3: Valor da produção (mil reais) Brasil e região geográfica.....	24
Figura 4: Estrutura química e tipos de flavonóides.....	28
Figura 5: Principais grupos de flavonóides.....	28
Figura 6: Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b).....	30
Figura 7: Estrutura química das cumarinas.....	30
Figura 8: Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O). Várias espécies reativas de O_2 são formadas no processo.....	33
Figura 9: Estrutura química de antioxidantes sintéticos: BHA - butil-hidroxianisol; BHT- butil-hidroxitolueno; TBHQ - terc-butil hidroquinona; PG - propil galato.....	37
Figura 10: Reação química entre o BHT e o radical DPPH'.....	41
Figura11: Estabilização do radical ABTS ^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.....	41
Figura 12: Descoloração do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico.....	42
Artigo 1	
Figura 1: Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba em sistema β -caroteno/ ácido linoléico contendo 100mg/L de fenólicos totais. (Os valores referem-se a média de três determinações. Médias seguidas por letras iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan $p>0,05$).....	73

Figura 2: Cinética da ação antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba e do ácido ascórbico e BHT (concentração final de 100mg/L) em sistema da co-oxidação do B-caroteno/ ácido linoléico.....75

Figura 3: Atividade antioxidante em sistema da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico do extrato hidroacetônico de resíduo agroindustrial de goiaba associado ao BHT - concentração final: 100mg/L de fenólicos (80/20= 80mg/L de BHT/20mg/L fenólicos extrato; 60/40= 60mg/L de BHT/40mg/L fenólicos extrato; 40/60= 40mg/L de BHT/60mg/L fenólicos extrato; 20/80= 20mg/L de BHT/80mg/L fenólicos extrato; 100/0= 100mg/L de BHT/0mg/L fenólicos extrato; 0/100= 0mg/L de BHT/100mg/L fenólicos extrato). (Os valores referem-se à média de três determinações. Médias seguidas por letras iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan $p>0,05$).....78

Figura 4: Cinética da ação antioxidante do extrato de resíduo agroindustrial de goiaba associado ao BHT (concentração final de 100mg/L) em sistema da cooxidação do B-caroteno/ ácido linoléico. (* 80mg/L de BHT/20mg/L fenólicos extrato; **60mg/L de BHT/40mg/L fenólicos extrato; ***40mg/L de BHT/60mg/L fenólicos extrato; ****20mg/L de BHT/80mg/L fenólicos extrato; *****100mg/L de BHT/0mg/L fenólicos extrato; *****0mg/L de BHT/100mg/L fenólicos extrato).....79

Figura 5: Atividade antioxidante de extrato de resíduo agroindustrial de goiaba, BHT e ácido ascórbico (AA) (140mg/L), em emulsão de ácido linoléico (método tiocianato férrico).....81

Figura 6: Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba, BHT e ácido ascórbico (AA) (240mg/L) em emulsão de ácido linoléico (método tiocianato férrico).....81

Artigo 2

Figura 1: Atividade antioxidante (% de sequestro do radical DPPH) de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba (semente) comparada à solução de BHT e Ácido Ascórbico (AA) aos 5 minutos da reação.....101

Figura 2: Atividade antioxidante (% de sequestro do radical DPPH) do extrato hidroacetônico do resíduo (semente) agroindustrial de goiaba associado ao BHT -

concentração final: 100mg/L de fenólicos (100/0= 100mg/L de BHT/0mg/L fenólicos extrato; 0/100= 0mg/L de BHT/100mg/L fenólicos extrato; 80/20= 80mg/L de BHT/20mg/L fenólicos extrato; 60/40= 60mg/L de BHT/40mg/L fenólicos extrato; 40/60= 40mg/L de BHT/60mg/L fenólicos extrato; 20/80= 20mg/L de BHT/80mg/L fenólicos extrato). (Os valores referem-se a média de três determinações. Médias seguidas por letras iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Ducan $p>0,05$).....103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classe de compostos fenólicos em plantas.....27

Tabela 2: Fontes endógenas e exógenas de geração de EROs.....35

Tabela 3: Doenças relacionadas com a geração de EROs.....35

Artigo 1

Tabela 1: Concentração do extrato do resíduo agroindustrial de goiaba (em fenólicos totais) e do BHT submetidos aos ensaios da atividade antioxidante em sistema da co-oxidação do β -caroteno /ácido linoléico.....67

Tabela 2: Teor de fenólicos totais em resíduo agroindustrial de goiaba (semente) utilizando processo de extração sequencial.....70

Tabela 3: Parâmetros cinéticos dos extratos hidroacetônico e hidrometanólico de resíduo agroindustrial de goiaba, na concentração final de 100mg/L, determinados em sistema da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico.....76

Tabela 4: Parâmetros cinéticos do extrato hidroacetônico do resíduo agroindustrial de goiaba associado ao BHT determinados em sistema da co-oxidação do β -caroteno e ácido linoléico.....79

Tabela 5: Inibição da peroxidação do ácido linoléico (%)* por ação de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba, BHT e ácido ascórbico (método Tiocianato férrico).....82

Artigo 2

Tabela 1: Concentração do extrato do resíduo agroindustrial de goiaba (em fenólicos totais) e do BHT submetidos ao ensaio da capacidade de sequestro do radical DPPH*.....97

Tabela 2: Teor de fenólicos totais em extrato de resíduo agroindustrial de goiaba (semente) utilizando processo de extração sequencial.....99

Tabela 3: Valores de EC_{50} , de T_{EC50} e classificação cinética e anti-radical de extratos de resíduos agroindustrial de goiaba.....102

Tabela 4: Capacidade de sequestro do radical $ABTS^{•+}$ de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba.....104

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1. GOIABA.....	22
2.2. COMPOSTOS FENÓLICOS.....	26
2.2.1. <i>Flavonóides</i>	27
2.2.2. <i>Ácidos Fenólicos</i>	29
2.2.3. <i>Propriedade funcional dos compostos fenólicos</i>	30
2.3. RADICAIS LIVRES.....	31
2.4. ANTIOXIDANTE.....	36
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
4. OBJETIVOS.....	57
4.1. GERAL.....	58
4.2. ESPECÍFICOS.....	58
5. RESULTADOS.....	59
5.1. ARTIGO 1: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DE GOIABA EM SISTEMA MODELO.....	60
5.2. ARTIGO 2: CAPACIDADE DE EXTRATOS DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DE GOIABA EM SEQUESTRAR RADICAIS LIVRES....	90
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	109

RESUMO

Diante da elevada produção de resíduo agroindustrial e da possibilidade deste material conter fitoquímicos bioativos, este trabalho objetivou avaliar o potencial antioxidante de resíduo de goiaba (semente) proveniente de uma indústria de polpas de frutas congeladas. Extratos hidroacetônico, hidrometanólico, hidroetanólico e aquoso, obtidos por extração sequencial, foram utilizados para quantificar o teor de fenólicos totais e determinar a atividade antioxidante em sistema da co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico e pelo método tiocianato férrico e a capacidade de seqüestrar radicais livres [DPPH[•] (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)]. Os extratos hidroacetônico e hidrometanólico exibiram os maiores teores de fenólicos totais (5.317,27 e 2.176,46 μ g em equivalente de catequina mL⁻¹, respectivamente), sendo, portanto, o aquoso e hidroetanólico excluídos da avaliação do potencial antioxidante. O extrato hidroacetônico exibiu elevado percentual de inibição da oxidação (81,95%) no ensaio da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico; elevado percentual de inibição da peroxidação do ácido linoléico (74,32% e 80,13%, respectivamente, nas concentrações de 140 e 240mg/L); boa capacidade de sequestrar o radical DPPH (percentual de sequestro >60%, baixo valor de EC₅₀ e de T_{EC50}, e médio EA); e o radical ABTS^{•+} (875,79 mM TEAC.g⁻¹). O extrato hidrometanólico exibiu baixo percentual de inibição da oxidação (38,92%) no ensaio da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico; inibição da peroxidação do ácido linoléico de 50,50% e 73,70% (nas concentrações de 140 e 240mg/L, respectivamente); e fraca capacidade de sequestrar o radical DPPH (percentual de sequestro < 30%, alto valor de EC₅₀ e de T_{EC50}, e baixo EA) e o radical ABTS^{•+} (57,16 mM TEAC.g⁻¹). Ao associar o extrato hidroacetônico com o BHT, em diferentes concentrações, o percentual de sequestro do DPPH e de inibição da oxidação, em sistema da co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico foi semelhante ao do BHT isolado, demonstrando haver sinergismo entre eles. O extrato hidroacetônico do resíduo agroindustrial de goiaba apresenta um expressivo potencial anti-radical, uma vez que demonstrou eficiência na captura dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, relevante ação antioxidante em meio lipídico, além de sinergismo com o BHT. Desta forma, o resíduo agroindustrial de goiaba surge como alternativa de antioxidante natural.

Palavras-chave: resíduo agroindustrial de goiaba; semente de goiaba; fenólicos totais, atividade antioxidante; atividade anti-radical

ABSTRACT

Considering the high production of agri-industrial waste and the possibility of this material have bioactive phytochemicals, this work aimed to evaluate the antioxidant potential of the guava waste (seed) from an industry of frozen fruit pulps. Hydroacetone, hydroethanolic, hydromethanolic and aqueous extracts, obtained by sequential extraction procedure, were submitted to the determination of total phenolic and antioxidant activity in β -carotene/linoleic acid co-oxidation system and by ferric thiocyanate method and screened for their free [DPPH[•] (1,1-diphenyl-2-picrilhidrazil) and ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzotiazolina 6-sulfonic acid))] scavenging activity. The hydroacetone and hydromethanolic extracts exhibited the highest content of total phenolics (5317.27 and 2176.46 μg catechin equivalent mL^{-1} , respectively), while the aqueous and hydroethanolic extracts were excluded from antioxidant analysis. Hydroacetone extract exhibited high percentage of the inhibition of oxidation (81.95%) in β -carotene/linoleic acid co-oxidation system; high percentage of the inhibition of linoleic acid peroxidation (74.32% and 80.13% at concentrations 140 and 240mg/L, respectively), good DPPH[•] scavenging activity (scavenging percentage >60%; low value of EC_{50} and $\text{T}_{\text{EC}_{50}}$, middle value of AE), and good ABTS^{•+} scavenging activity (875.79mM TEAC.g⁻¹). The hydromethanolic extract exhibited low percentage of the inhibition of oxidation (38.92%) in β -carotene/linoleic acid co-oxidation system, inhibition of linoleic acid peroxidation of the 50.50% and 73.70% (at concentrations 140 and 240mg/L, respectively), DPPH[•] scavenging activity (scavenging percentage < 30%, high EC_{50} and $\text{T}_{\text{EC}_{50}}$, and low value of AE), and bad ABTS^{•+} scavenging activity (57.16 mM TEAC.g⁻¹). Combining of the hydroacetone extract with BHT at different concentrations, the scavenging activity and inhibition of oxidation, in β -carotene/linoleic acid co-oxidation system were similar to that BHT alone, which demonstrated synergism between them. Hydroacetone extract from guava waste (seeds) has a significant potential antioxidant since it has shown better performance in scavenging DPPH[•] and ABTS^{•+} radical, important antioxidant activity in lipid emulsion system, and synergism with BHT. Thus, the agri-industrial waste from guava can be considered as alternative of natural antioxidants.

Keywords: Agri-industrial waste, guava seed, total phenolics, antioxidant activity, anti radical activity.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta uma das maiores diversidades de espécies frutíferas do mundo em função de sua vasta extensão territorial e ampla variação climática. A produção brasileira de frutas superou 43 milhões de toneladas em 2007, ocupando a terceira colocação na classificação dos principais países produtores (IBRAF, 2007). De todo território nacional, a região Nordeste se destaca por produzir grande variedade de frutos tropicais, nativos e exóticos, com boas perspectivas para exploração econômica, em decorrência de suas condições edafoclimáticas (SACRAMENTO; SOUZA, 2000). Neste cenário destaca-se a goiaba (*Psidium guajava* L.), fruta nativa da América tropical, bastante apreciada pelo aroma e sabor característico e conhecida por ter ácido ascórbico em quantidade apreciável.

A produção brasileira de goiaba, no ano de 2006, foi de 328.255 toneladas, e os Estados de Pernambuco e São Paulo com uma produção de 102.671 e 118.520 toneladas, respectivamente, destacam-se como os mais produtivos (IBGE, 2007). Vale destacar que a maior parte da produção é destinada à indústria para a produção de doce, suco, geléia, polpa congelada, entre outros. Do processo de beneficiamento deste fruto há o descarte das sementes que junto com parte da fração da pele e polpa, não separada no processo físico de despulpamento, compõem o resíduo.

Para prevenir à oxidação lipídica em alimentos, a indústria tem adicionado aos produtos com teores significativos de ácido graxos polinsaturados, antioxidantes sintéticos dentre os quais, os mais largamente empregados são o butil-hidroxi-tolueno (BHT), butil-hidroxi-anisol (BHA) e butil-hidroquinona terciária (t-BHQ) e, em alguns casos, a ação sinérgica do ácido cítrico é indispensável. Entretanto, a inocuidade dos antioxidantes sintéticos vem sendo questionada uma

vez que alguns estudos têm demonstrado que podem favorecer efeitos mutagênicos e carcinogênicos (BIRCH et al., 2001). Sendo assim, os antioxidantes naturais surgem como alternativa aos sintéticos, visto que podem agir de forma semelhante na prevenção da oxidação lipídica.

A assertiva de Guo et al. (2003) de que algumas frutas podem potencialmente conter maior teor de compostos antioxidantes nas sementes e casca do que na polpa, tem apontado para a viabilidade de uso deste material na extração de antioxidantes naturais. Assim, a constatação da elevada proporção de resíduos provenientes da indústria processadoras de frutas e de seu potencial antioxidante, motivou a implementação deste estudo com vistas a investigar o potencial antioxidante de resíduos (sementes) de goiaba, provenientes de uma indústria de polpa de frutas tropicais congelada, na perspectiva de empregá-lo como inibidor da oxidação lipídica em alimentos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. GOIABA

A Goiabeira, *Psidium guajava* L, pertencente à família das Myrtaceae, é originária da América Tropical, possivelmente entre o México e o Peru, onde ainda pode ser encontrada em estado silvestre. Sua capacidade de dispersão e rápida adaptação a diferentes ambientes possibilitaram a propagação desta *Myrtaceae* por amplas áreas tropicais e subtropicais do globo, sendo até considerada uma praga em algumas regiões (MENZEL, 1985).

O “fruto da goiabeira, a goiaba, denominado na Espanha e nos Estados Unidos por “guayabo” e “*guava*”, respectivamente, é uma baga de forma arredondada ou ovalada, polpa de coloração branca ou avermelhada com numerosas pequenas sementes (JIMÉNEZ-ESCRIG et al., 2001). Essa fruta de sabor e aroma agradáveis possui quantidade regular de ácidos, açúcares, e pectinas, além de taninos, flavonóides, óleos essenciais, alcoóis sesquiterpenóides e ácidos triterpenóides (IHA, et al., 2008). Segundo Gongatti Netto et al., (1996), a goiaba é um dos frutos de maior importância nas regiões subtropicais e tropicais, não só devido ao seu elevado valor nutritivo, mas também pela excelente aceitação para o consumo *in natura* e grande aplicação industrial, além de se desenvolver em condições adversas de clima.

A produção brasileira nos últimos anos tem sido relativamente estável. Em 2001, a produção foi de 281.102 Toneladas, apresentando discreto aumento, chegando a atingir, em 2007, 316.301 Toneladas (Figura 1). No território nacional, a plantação de goiabas concentra-se, principalmente, nas regiões Sudeste e Nordeste (Figura 2), as quais se configuram como as mais produtoras. Em termos

monetários, a goiaba gerou para o Brasil um valor de R\$ 1.089.774 no período de 2001 a 2007 (Figura 3) (IBGE, 2009). Vale ressaltar que a produção brasileira de goiaba destina-se quase que totalmente ao mercado interno que, nos últimos sete anos, vem experimentando significativo aumento de oferta.

Esse fruto é bastante consumido na forma *in natura*, no entanto a maior parte da produção brasileira é destinada à indústria para a produção de doce, suco, geléia, polpa congelada, entre outros. O processamento de goiaba para obtenção de polpa é uma atividade agroindustrial importante na medida em que agrega valor econômico à fruta, evitando desperdícios e minimizando as perdas que podem ocorrer durante a comercialização do produto *in natura* (FURTADO et al, 2000). Além disso, esse produto é bastante utilizado como matéria prima para indústrias secundárias.

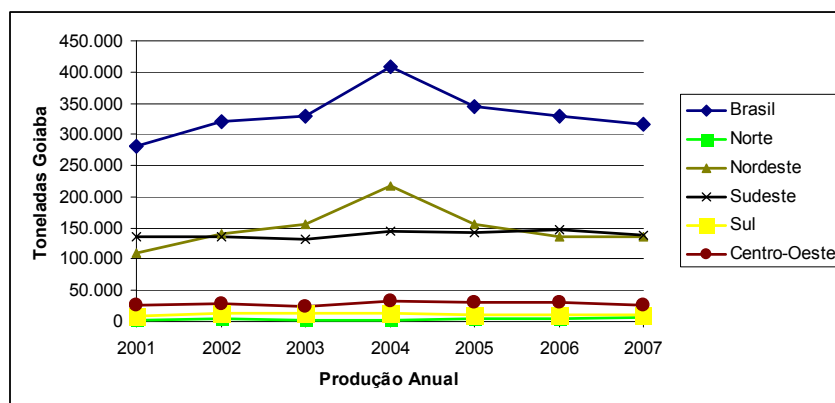


Figura 1: Produção brasileira de goiabas (toneladas) por região geográfica. Fonte: IBGE (2009).

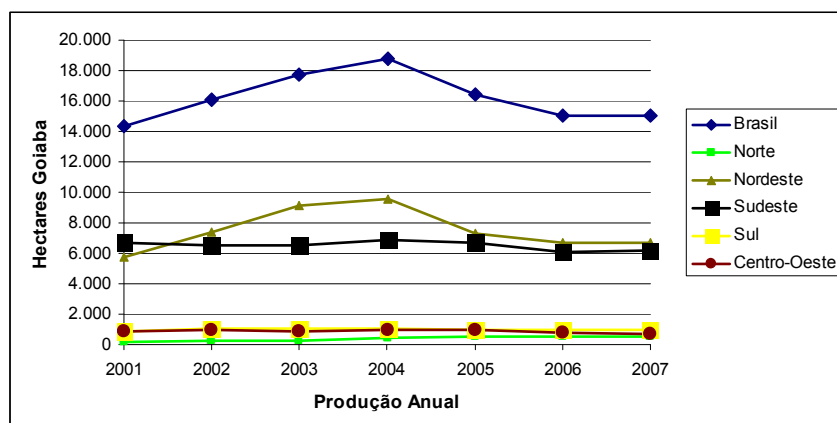


Figura 2: Área plantada de goiabas (hectares) por região geográfica do Brasil. Fonte: IBGE (2009).

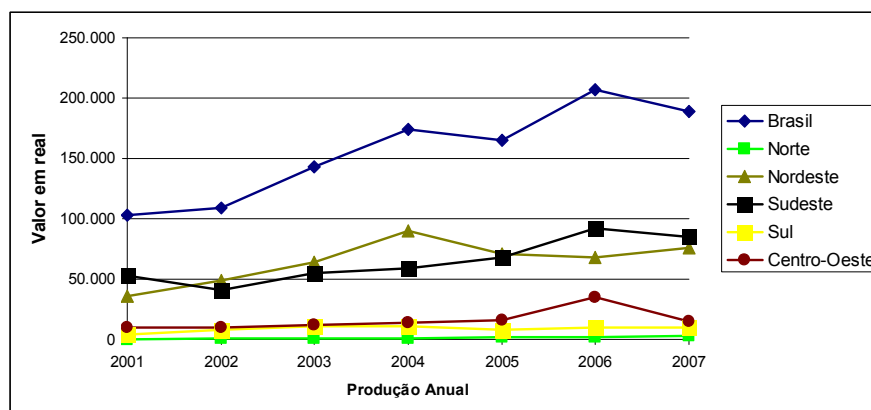


Figura 3: Valor da produção brasileira (mil reais) de goiaba por região geográfica. Fonte: IBGE (2009).

Vale destacar que a agroindústria brasileira é um dos principais segmentos da economia nacional, com importância tanto para abastecimento interno como para o desempenho exportador do País, com destaque para o preparo e abate de carnes, fabricação e refino de açúcar, laticínios, panificação e fabricação de massas, óleos vegetais e indústrias de sucos (LIRA, 2008). Neste contexto, o processamento de produtos agrícolas tem gerado uma grande quantidade de subprodutos oriundos do tratamento industrial, a exemplo de semente e cascas

de vegetais (SILVA FILHO, ARMELIN, SILVA, 1999). No caso da goiaba utilizada na produção de sucos e doces são gerados, aproximadamente, 30% de seu peso em resíduos que é constituído principalmente por sementes (SILVA, 1999), representando uma quantia estimada em 19.000 toneladas de resíduo descartado anualmente (CÔRREA et al, 2005). Por serem estes subprodutos caracterizados frequentemente como potenciais poluidores ambientais, ações que minimizem o volume desses resíduos pode se apresentar como uma alternativa bem sucedida para a indústria de alimentos e bebidas (AMANTE et al., 1999; HENNINGSSON et al., 2004).

Vários estudos vêm demonstrando que este material ainda contém quantidades significantes de fitoquímicos, dentre os quais se destacam os polifenóis. Segundo Hassimotto, Genovese e Lajolo (2005), o teor de fenólicos totais em polpa de goiaba vermelha (124,0 mg 100⁻¹g) foi menor do que o encontrado na pele desta fruta (420 mg 100⁻¹g). Soong e Barlow (2004) relatam que os fenólicos totais de sementes de várias espécies de frutos, como manga, “longan, abacate, e jaca” foram maiores do que os da polpa. Em função da presença destes fitoquímicos, os resíduos agroindustriais de frutos apresentam-se como fonte potencial antioxidante, conforme demonstrado por Bocco, et al. (1998) ao determinar a ação antioxidante de sementes de citrus; Wolfe; Wu; Liu, (2003) ao estudar o potencial antioxidante de casca de maçã; Shui e Leong (2006) ao investigar a ação antioxidante de resíduo de carambola; Mielnik, et al. (2006) ao determinar a atividade antioxidante de sementes de uvas, Caetano et al. (2009) ao estudar a ação antioxidante de resíduo agroindustrial de acerola, entre outros.

2.2. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos ou polifenóis, produtos secundários do metabolismo vegetal, apresentam em sua estrutura um anel aromático com uma ou mais hidroxila e constituem um amplo e complexo grupo de fitoquímicos, com mais de 6000 estruturas conhecidas (LEE et al., 2005; MARTINEZ-VALVERDE, PERIAGO e ROS, 2000). Estes compostos encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal, englobam desde moléculas simples até aquelas com elevado grau de polimerização e estão presentes nos vegetais tanto nas formas livres como complexados a açúcares e proteínas (BORGUINI, 2006). A diversidade estrutural dos polifenóis se deve a grande variedade de combinações que ocorre na natureza, permitindo categorizá-los em várias classes como demonstrado na Tabela 1. Dentre estas classes, destacam-se a dos flavonóides e a dos ácidos fenólicos por serem largamente distribuídos na natureza e os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural (SOARES, 2002).

Tabela 1. Classe de compostos fenólicos em plantas.

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C6
Ácidos hidroxibenzóicos	C6–C1
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C6–C2
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C6–C3
Nafitoquinonas	C6–C4
Xantonas	C6–C1–C6
Estilbenos, antoquinonas	C6–C2–C6
Flavonóides	C6–C3–C6
Lignanas, neolignanas	(C6–C3) ₂
Ligninas	(C6–C3) _n
Taninos condensados	(C6–C3–C6) _n

FONTE: Harborne (1989); Harborne, Baxter, Moss (1999) citados por Angelo; Jorge (2007).

2.2.1. Flavonóides

Os flavonóides, compostos largamente distribuídos no reino vegetal, comumente encontrados em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos ou agliconas. Estes compostos possuem estrutura fenilbenzopirona (C₆–C₃–C₆), onde as duas partes da molécula com seis carbonos são anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel γ pirano, denominado de anel C (Figura 4). Em função das substituições que ocorrem no anel C, os flavonóides são reunidos em diversos importantes grupos, como Flavanóis, Flavonóis, Flavonas, Antocianidinas, Isoflavonóides, Flavanonas (Figura 5) (HOULIHAN, 1985). As substituições que ocorrem nos anéis A e B dão origem a diversos compostos dentre de cada grupo,

os quais apresentam variação no número e posição de hidroxilas e metoxilas presentes nos dois anéis aromáticos

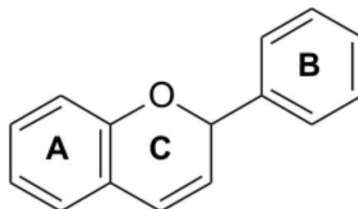


Figura 4: Estrutura química dos flavonóides

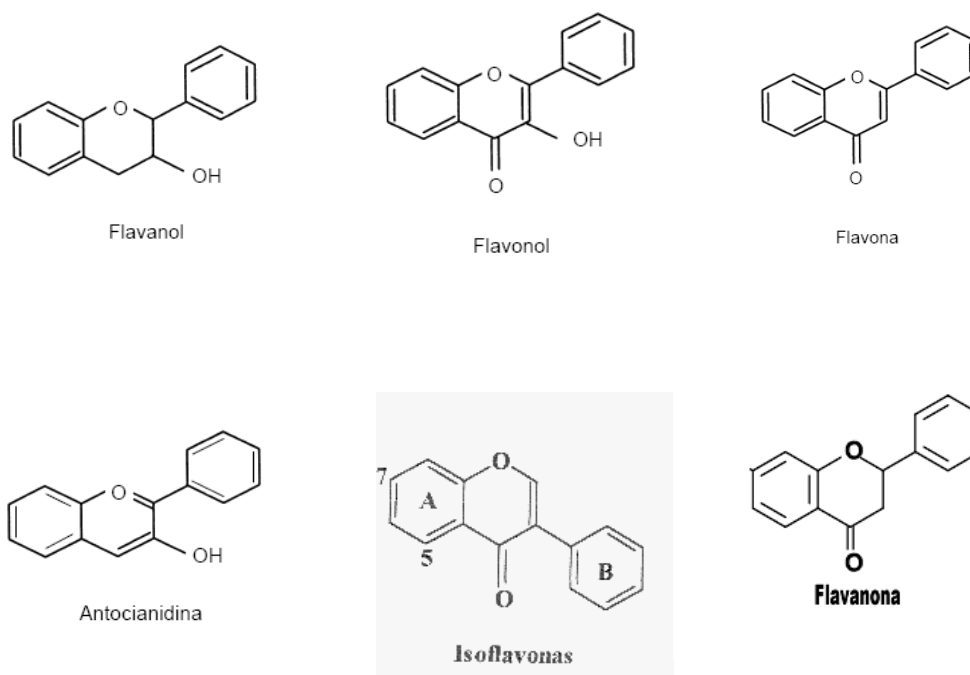


Figura 5: Principais grupos de flavonóides

Nos vegetais, a distribuição dos flavonóides depende de diversos fatores de acordo com o filo/ordem/família do vegetal bem como da variação das espécies (BOBBIO e BOBBIO, 1992; FENNEMA, 1993; BURNS et al., 2001). Flavonas e flavonóis são os dois principais grupos encontrados na natureza.

Dentre os flavonóis, as agliconas, campferol, quercetina e miricetina são as mais comuns e a apigenina, luteolina e tricetina os composto do grupo das flavonas mais frequentemente encontrados nos vegetais (BOBBIO e BOBBIO, 1992 e HARBORNE, 1973).

2.2.2. Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos estão divididos em dois grupos (Figura 6). No primeiro encontram-se os derivados dos ácidos hidroxibenzóicos, constituídos por sete átomos de carbono (C_6-C_1). Estes compostos apresentam grupo carboxílico ligado ao anel aromático. Destacam-se os ácidos protocatecuíco, vanílico, siríngico, gentísico, salicílico e gálico como os mais comuns. No segundo grupo encontram-se os derivados dos ácidos hidroxicinâmico, constituídos por nove átomos de carbono (C_6-C_3), dos quais três formam uma cadeia lateral. Os ácidos p-cumárico, caféico, ferúlico e sináptico são os derivados dos ácidos hidroxicinâmico mais comumente encontrados no reino vegetal. A ciclização da cadeia lateral do ácido p-cumárico dá origem a um terceiro grupo de fenólicos denominados cumarinas (Figura 7) (SOARES, 2002).

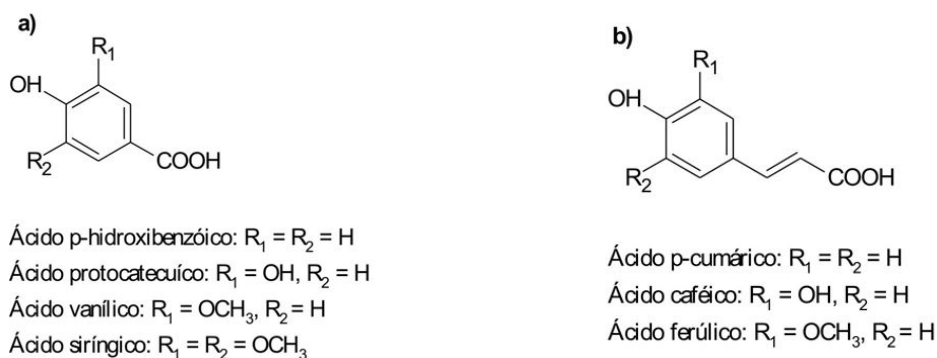


FIGURA 6: Estrutura química dos ácidos hidroxibenzoicos (a) e hidroxicinâmicos (b).

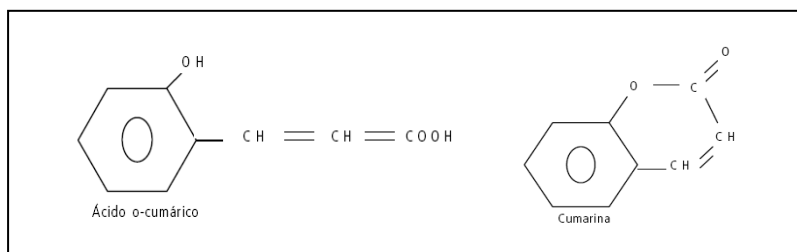


Figura 7: Estrutura química das cumarinas.

2.2.3. Propriedade funcional dos compostos fenólicos

As evidências científicas permitem afirmar que a propriedade antioxidante dos vegetais se deve, principalmente, a seus compostos fenólicos. A eficiência antioxidante destes compostos bioativos depende de sua estrutura e da sua concentração no alimento. Por sua vez, a quantidade destas substâncias em vegetais é amplamente influenciada por fatores genéticos e condições ambientais, além do grau de maturação e variedade da planta, entre outros aspectos.

A estrutura molecular dos polifenóis e, mais especificamente, a posição e o grau de hidroxilação do anel aromático têm influência direta sobre a atividade antioxidante destes compostos, bem como sobre o seu mecanismo de ação

(SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992; OU et al. 2002). A hidroxila existente na posição *orto* com o grupo metoxila, doador de elétrons, aumenta a estabilidade do radical fenoxil e a eficiência antioxidante do composto (CUVELIER; RICHARD; BERSSET, 1992). Uma segunda hidroxila na posição *orto* ou *para*, também aumenta a atividade antioxidante. O ácido caféico, que apresenta essa característica, possui uma atividade antioxidante maior do que o ácido ferúlico (CHEN; HO, 1997). Vale destacar que a ação sequestrante desse composto parece estar relacionada aos grupos hidroxil localizados na posição *para* no anel aromático.

Os flavonóides atuam como antioxidantes primários, interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou de hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis. Dentre estes compostos, os flavonóis em especial, atuam também como antioxidante secundário, retardando a etapa de iniciação da autoxidação através da complexação com metais (SHI; NIKI, 1998; MELO; GUERRA, 2002; PIETTA, 2000).

2.3. RADICAIS LIVRES

As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres (HALLIWELL, 1994). Atualmente, estas moléculas são também conhecidas por Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). A configuração química destas moléculas as torna altamente instáveis, com meia-vida curtíssima

e quimicamente muito reativas. Esses radicais são encontrados em todos os sistemas biológicos, podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana celular e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996; YU, ANDERSON, 1997).

A geração de radicais livres constitui uma ação contínua e fisiológica, cumprindo funções biológicas essenciais. São formados em um cenário de reações de óxido-redução, provocando ou resultando dessas reações. Podem ceder o elétron solitário e serem oxidados; ou podem receber outro elétron e serem reduzidos (POMPELLA, 1997). Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O (Figura 8). Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}), hidroxila (OH^{\cdot}), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria, e a reatividade das EROs é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons (COHEN, 1989).

O radical superóxido (ou ânion superóxido) ($O_2^{\cdot-}$) é o mais comum e abundante radical existente nas células (BOVERIS, 1998). Apesar de seu nome sugerir alto poder oxidante, esse radical atua na maioria das reações como um agente redutor (OGA, 2003). Pode ser gerado em eventos de transporte de elétrons que ocorrem em cloroplastos e microssomos do retículo endoplasmático, ou por reações de autooxidação do oxigênio molecular (SANTORO e THIELE, 1997). Mesmo sendo considerado pouco reativo em soluções aquosas, tem sido observada lesão biológica secundária a sistemas geradores de $O_2^{\cdot-}$ (seja enzimático, fagocítico ou químico) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990).

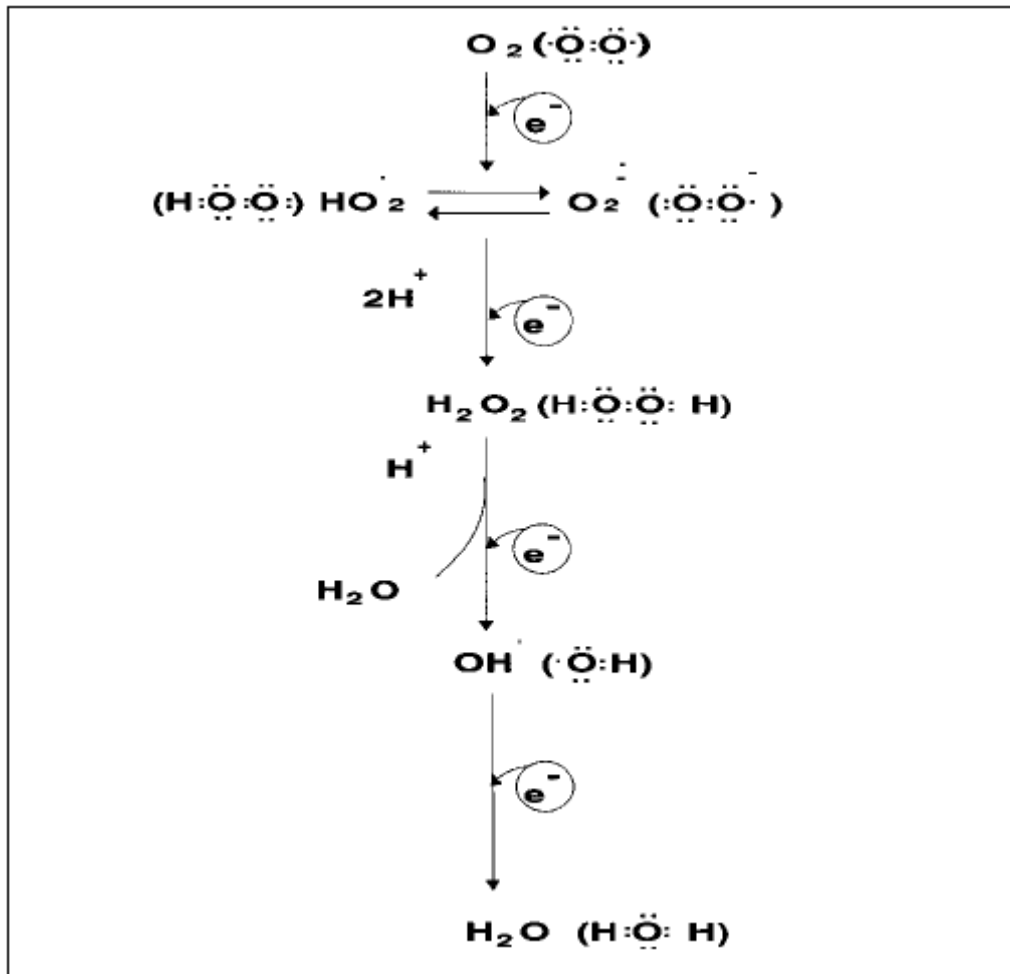


Figura 8: Redução tetra- e pentavalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O). Várias espécies reativas de O_2 são formadas no processo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O radical hidropoxila ($\text{HO}_2\cdot$), forma protonada do radical superóxido, ou seja, possui o próton hidrogênio, é mais reativo que o superóxido, por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$), considerado o mais reativo em sistemas biológicos, uma vez que ocorre combinação extremamente rápida desse radical com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido. Assim, o hidroxila produzido próximo ao DNA que tenha um metal fixado pode promover modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação

do DNA. O radical hidroxila pode também inativar várias proteínas (enzimas e da membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS), além de iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) embora não seja um radical livre tendo em vista a ausência de elétrons desemparelhados na última camada, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, pois participa da reação que produz o OH^\bullet . O H_2O_2 tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe. Assim, é altamente tóxico para as células e esta toxicidade pode ser aumentada de dez para mil vezes quando em presença de ferro, como ocorre, por exemplo, na hemocromatose transfusional (EATON, 1991 apud FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

As EROs podem ser geradas por fontes endógenas ou exógenas (Tabela 2). Os processos biológicos que normalmente ocorrem no organismo, tais como: redução de flavinas e tióis; resultado da atividade de oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases; presença de metais de transição no interior da célula e de sistemas de transporte de elétrons dão origem as EROs endógenas. Enquanto que as fontes exógenas geradoras de radicais livres incluem tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (SOARES, 2002). Os sistemas biológicos controlam estes fatores oxidativos via diversos mecanismos antioxidantes que restringem a reatividade dos radicais livres. Muitos componentes da dieta, essenciais ou não, podem contribuir para estes sistemas de defesa antioxidantes (DECKER, 1997).

Assim, se houver estímulo exagerado na produção dessas espécies, de modo a suplantarem as defesas naturais do organismo, as EROs passam a ser

nocivas, podendo desencadear uma série de doenças crônicas degenerativas não transmissíveis (Tabela 3) (FLOYD, 1997, HATHERILL, 1991 apud FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Evidencia-se que as EROs encontram-se relacionada há cerca de 60 condições clínicas, entre elas a catarata, a aterosclerose, o câncer, doenças cardiovasculares, alterações no sistema nervoso, entre outras (LANGSETH, 1995).

Tabela 2- Fontes endógenas e exógenas de geração de EROs.

Endógenas	Exógenas
Respiração aeróbica	Ozônio
Inflamações	Radiações gama e ultravioleta
Peroxisomos	Medicamentos
Enzimas do citocromo P450	Dieta
	Cigarro

Fonte: BIANCHI; ANTUNES, 1999.

Tabela 3- Doenças relacionadas com a geração de EROs

Artrite	Disfunção cerebral
Aterosclerose	Cardiopatias
Diabetes	Enfisema
Catarata	Envelhecimento
Esclerose múltipla	Câncer
Inflamações crônicas	Doenças do sistema imune

Fonte: BIANCHI; ANTUNES, 1999.

O papel das reações dos radicais livres nas doenças humanas, biologia, toxicologia, e na deterioração de alimentos tornou-se uma área de intenso

interesse. A oxidação lipídica é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis em alimentos, tornando-os impróprios para consumo, além de também provocar outras alterações que irão afetar não só a qualidade nutricional, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, mas também a integridade e segurança dos alimentos, através da formação de compostos poliméricos potencialmente tóxicos (RAMALHO; JORGE, 2006). Assim, lipoperoxidação é um ponto importante na indústria alimentícia, onde a oxidação é minimizada em alimentos contendo lipídios através do uso de antioxidantes durante a industrialização (BAGGIO, 2006).

2.4. ANTIOXIDANTE

Antioxidante são substâncias que podem retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou de outras moléculas, evitando o início ou a propagação das reações em cadeia de oxidação. Estes compostos, geralmente apresentam estrutura química aromática e contém pelo menos uma hidroxila, podendo ser sintéticos, como o butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butil hidroquinona (TBHQ) e o propil galato (PG), largamente utilizados pela indústria de alimentos, ou naturais, substâncias bioativas tais como organosulfurados, fenólicos e terpenos, que fazem parte da constituição de diversos alimentos (FENNEMA, 1993; BRENNAN e PAGLIARINI, 2001; ZHENG e WANG, 2001).

O uso dos antioxidantes sintéticos teve início nos anos 40. A estrutura fenólica destes compostos (Figura 9) permite a doação de um próton a um radical livre, regenerando, assim, a molécula do acilglicerol e interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres. Dessa maneira, os derivados fenólicos

transformam-se em radicais livres. Entretanto, estes radicais podem se estabilizar sem promover ou propagar reações de oxidação (RAMALHO; JORGE, 2006).

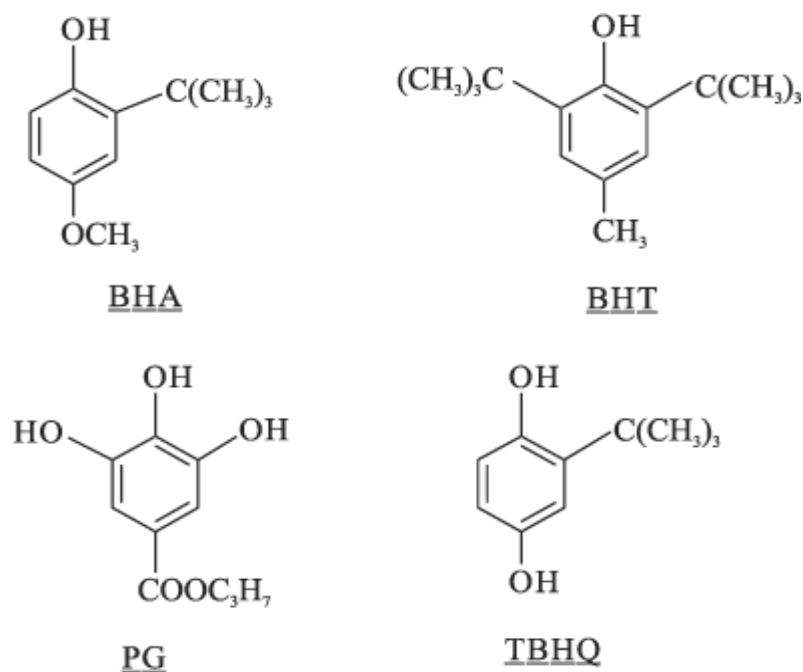


Figura 9 – Estrutura química de antioxidantes sintéticos: BHA - butil-hidroxianisol; BHT- butil-hidroxitolueno; TBHQ - terc-butil hidroquinona; PG - propil galato.

Estudos toxicológicos têm demonstrado que os antioxidantes sintéticos apresentam efeito nocivo ao organismo. O BHT vem sendo relacionado ao desenvolvimento de doenças pulmonares (HOCMAN, 1988). O BHA mostrou induzir hiperplasia gastrointestinal em roedores por um mecanismo desconhecido; e o TBHQ a redução do nível de hemoglobina e a hiperplasia de células basais (CRUCES-BLANCO, et al. 1999; MADHAVI; SALUNKHE, 1995 apud RAMALHO; JORGE, 2006). Frente aos efeitos adversos, o uso dos antioxidantes sintéticos é

limitado em muitos países. No Brasil, o Ministério da Saúde através da Resolução da diretoria colegiada- RDC Nº 64, de 16 de setembro de 2008 estabelece como concentração máxima permitida, 0,02g. 100g⁻¹ para BHA, BHT, TBHQ e PG (ANVISA, 2010).

Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de encontrar antioxidantes provenientes de fontes naturais, que possam atuar sozinhos ou sinergicamente com outros aditivos, como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e limitar o uso dos antioxidantes sintéticos (DURAN e PADILLA, 1993). Neste sentido, na literatura encontram-se vários estudos desenvolvidos por diversos pesquisadores. Na década de 50, CHIPAULT et al. (1952) investigaram a atividade antioxidante de 32 especiarias, das quais o alecrim e a sálvia foram consideradas as mais eficazes. Posteriormente, esta ação foi constatada na soja e produtos de soja (PRATT; BIRAC, 1979), na canela (MANCINI FILHO et al., 1998), na maçã (LEJA; MARECZEK; BEN, 2003), no espinafre e repolho (ISMAIL, MARJAN; FOONG, 2004), no coentro (MELO, MANCINI FILHO, GUERRA, 2005), entre outros.

Os resíduos agroindustriais por, ainda, conterem quantidade relevante de compostos fenólicos são vistos como fontes interessantes de antioxidantes naturais (MOURE et al., 2001; LAPORNIK, et al, 2005). O potencial antioxidante destes subprodutos da indústria de alimentos tem sido constatado por vários estudos. Extratos obtidos a partir de sementes de uvas exibiram 75 a 90% de atividade antioxidante (JAYAPRAKASHA; SINGH; SAKARIAH, 2001). Atividade antioxidante in vivo de extrato da semente de uva foi relatada por Sato (2001). Ajila et al (2007) estudaram compostos bioativos e o potencial antioxidante de

extratos provenientes da casca de manga, relatando uma alta atividade antioxidante deste material em diferentes sistemas. Extrato obtido a partir de resíduo agroindustrial de acerola exibiu ação antioxidante, com destaque para o hidroacetônico que se mostrou mais eficiente em sequestrar o radical DPPH (CAETANO, et al., 2009).

A eficiência antioxidante de compostos bioativos em alimentos de origem vegetal depende de sua estrutura e da sua concentração no alimento. Por sua vez, a quantidade destas substâncias em vegetais é amplamente influenciada por fatores genéticos e condições ambientais, além do grau de maturação e variedade da planta, entre outros. O substrato utilizado no ensaio, o solvente e pela técnica de extração utilizada, também, são fatores que influenciam a capacidade antioxidante (MOURE, et al, 2001; NACZK e SHAHIDI, 2004).

No que se refere aos solventes orgânicos, frequentemente são usadas soluções aquosas de etanol, metanol e acetona, entre outras, em diferentes concentrações, cuja eficácia dependerá da polaridade dos polifenóis presentes na amostra, bem como, do grau de polimerização e da sua interação com os outros constituintes (NACZK e SHAHIDI, 2004). Além disso, recomenda-se a combinação de pelo menos dois ciclos de extração, de modo a garantir a eficácia do processo, permitindo extrair compostos com diferentes estruturas químicas (PÉREZ-JIMÉNEZ, et al., 2008).

A diversidade química existente entre os compostos antioxidantes, em especial entre os compostos fenólicos, impõe a necessidade de avaliar a capacidade antioxidante por diversos ensaios, com mecanismo de ação diferente. Neste sentido, vários ensaios têm sido desenvolvidos, alguns deles determinam a habilidade do antioxidante em sequestrar espécies reativas geradas no meio da

reação. Outros avaliam a eficiência do antioxidante em inibir a peroxidação lipídica por meio da quantificação dos produtos da reação - dienos conjugados e hidroperóxidos; quantificação dos produtos da decomposição da peroxidação lipídica, ou medição da inibição da oxidação do lipídio do sistema pelo antioxidante a ser testado (FRANKEL; MEYER, 2000; ANTOLOVICH et al., 2002; GIADA; MANCINI-FILHO, 2004). Estes ensaios diferem tanto em relação ao mecanismo de reação, como no que se refere às espécies-alvo, às condições em que ocorre a reação e na forma de expressar os resultados.

Dentre os métodos que determina a habilidade dos antioxidantes em sequestrar radicais, destacam-se aqueles que envolvem um radical cromóforo, simulando as espécies reativas de oxigênio, dos quais os mais utilizados são o DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e o ABTS⁺• [2,2'-azino-bis(3-etil-benzolona-6-sulfonado)]. Estes métodos, por serem práticos, rápidos e sensíveis, são amplamente empregados (ARNAO, 2000). No primeiro, a solução metanólica do DPPH•, de coloração púrpura, absorve luz no comprimento de onda de 517 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R•), o DPPH• é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H) (Figura 10). Nesta reação, a solução metanólica de DPPH•, inicialmente de coloração violeta, torna-se amarelada e o grau desta descoloração, que é monitorada espectrofotometricamente, indica a habilidade do antioxidante em sequestrar o radical livre. Os resultados podem ser expressos em porcentagem de sequestro de radicais /ou por porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

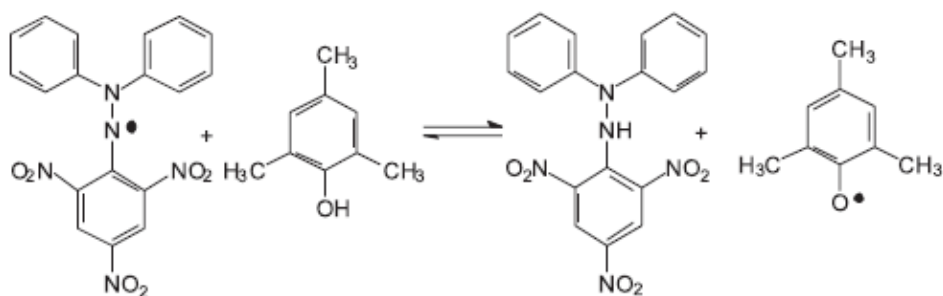


Figura 10: Reação química entre o BHT e o radical DPPH'

No método do $ABTS^{+\bullet}$, o radical monocátion, cromóforo verde/azul, é gerado pela oxidação de ABTS [2,2'-azino-bis(3-etil-benzolína-6-sulfonado)] com persulfato de potássio. A adição do antioxidante ao radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS, promovendo a supressão da cor da solução (Figura 11). O grau deste descolorimento é usado para avaliar a atividade oxidante RE, et al.,(1999), de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al., 2005).

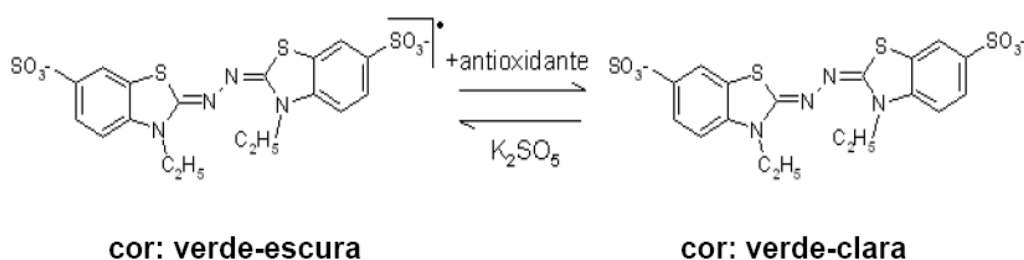


Figura11: Estabilização do radical $ABTS^{+\bullet}$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.

Dentre os ensaios que utilizam lipídios como substrato destacam-se o método da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico e do tiocianato férrico. O

sistema da co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico para determinação da atividade antioxidante de extratos de alimentos foi primeiramente empregado por MARCO (1968) e modificado por (HAMMERSCHMIDT E PRATT, 1978). Neste método, os produtos da degradação do ácido linoléico pela oxidação, devido a diferentes indutores (luz, oxigênio, calor), são medidos indiretamente pela taxa de destruição oxidativa do β -caroteno (Figura 12) (ANTOLOVICH et al., 2002; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).



Figura 12: Descoloração do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico.

O método tiocianato férrico é utilizado para medir a quantidade de peróxido gerado durante a oxidação de uma solução de ácido linoléico incubada sob aquecimento (50°C). Os peróxidos formados reagem com Fe^{2+} dando origem ao Fe^{3+} que complexa com íons tiocianato (SCN^-), tornando a solução avermelhada. A intensidade da cor vermelha é monitorada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 500 nm (LIU e YAO, 2007).

Considerando a possibilidade de muitas plantas – *in natura*, processadas ou seus resíduos agroindustriais – serem fontes de antioxidantes, e os efeitos nocivos dos antioxidantes sintéticos, evidencia-se a importância de averiguar o potencial antioxidante de resíduos agroindustriais, material fartamente produzido durante o processamento de vegetais. Desta forma, justifica-se o propósito de quantificar a ação antioxidante de resíduo agroindustrial de goiaba (sementes), em ensaios que utilizam lipídios como substrato e que determinam a habilidade de sequestrar radicais livres, com vistas a empregá-lo como inibidor da oxidação lipídica em alimentos em alimentos.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJILA, C.M.; NAIDU, K.A.; BHAT, S.G.; PRASADA RAO, U.J.S.; Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. **Food Chemistry**, Washington, v.105, n.3, p.982-988, 2007.

AMANTE, E.R.; CASTILHO JUNIOR, A.B.; KANZAWA, A.; ENSSLIN, L.; MURAKI, M. Um panorama da tecnologia limpa na indústria de alimentos. **Revista da Sociedade Brasileira de Alimentos**, Campinas, v. 33, n. 1, p. 16-21, 1999.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v.350, n.1, p.103-108, 1996.

ANGELO P.M., JORGE N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.66, n.1, p. 1-9, 2007.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, London, v. 127, n. 1, p. 183-198, 2002.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDA 64 de 16 de setembro de 2008. Disponível em WWW.anvisa.gov.br, acesso em 11/01/2010.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, n. 11, p. 419-421, 2000.

BAGGIO, J. **Avaliação dos resíduos (casca e pó orgânico) de café (coffea arabica l.) como provável fonte de substâncias bioativas**. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

BIANCHI M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n.2: p. 123-130, 1999.

BIRCH, A.E., FENNER, G.P.; WATKINS, R.; BOYD, L.C. Antioxidant proprieties of evening primrose seed extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.49, n.9, p. 4502-4507, 2001.

BOBBIO, P.A. ; BOBBIO, F.O. **Química do processamento de alimentos**. 2.ed. São Paulo : Varela, 1992.

BOCCO, A.; CUVELIER, M-E; RICHARD, H.; BERSET, C. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v.46, n.6, p.2123-2129, 1998.

BORGUINI, R.G. Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional. Tese de Doutorado em Saúde Pública. Universidade de São Paulo. 2006.

BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. **Medicina**. Buenos Aires, v. 58, n.4, p. 350-356, 1998.

BRENNAN, O.V.; PAGLIARINI, E. Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v. 49, n. 10, p. 4841–4844, 2001

BURNS, J.; GARDNER, P.T.; MATTHEWS, D.; DUTHIE, G.G.; LEAN, M.E.J.; CROZIER, A. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v.49, n. 12, p. 5797-5808, 2001.

CAETANO, A.C.S.; MELO, E.A.; LIMA, V.L.A.G.; MACIEL, M.I.S.; ARAÚJO, C.R. Extração de antioxidantes de resíduos agroindustriais de acerola. **Brazilian Journal of Food and Technology**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 155-160, 2009.

CHEN, J.H.; HO, C.T. Antioxidant activities of acid caffeic and its related hydroxycinnamic acid compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v. 45, n. 7, p. 2374-2378, 1997.

CHIPAULT, J.R.; MIZUN, G.H.; HAWKINS, J.M.; LUNDBERG, W.O. The antioxidant properties of natural spices. **Food Research**, Chicago, v. 17, n.1-6, p. 46-55, 1952.

COHEN, M.V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Annals of Internal Medicine**, v. 111, n. 11, p. 918-931, 1989.

CÔRREA, M.C.M.; FERNANDES, G.C.; PRADO, R.M.; NATALE, W. Propriedades químicas do solo tratado com resíduo orgânico da indústria processadora da goiaba. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 2, p. 241-243, 2005.

CRUCES-BLANCO, C.; SEGURA-CARRETERO, A.; RAMÍREZ-GARCÍA, M.I.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. A Simple and Rapid Phosphorimetric Method for the Determination of α -Naphthaleneacetamide in Fruit Samples. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v 75, n. 4, p. 377 – 385, 1999.

CUVELIER, M.E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Comparison of antioxidative activity of some acid-phenols; structure-activity relationship. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 56, n. 2, p. 324-235, 1992.

DECKER, E.A. Phenolics: Prooxidants or Antioxidants? **Nutrition Reviews**, v. 55, n. 11, p. 396-398, 1997.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2. p. 446-452, 2006.

DURÁN, R.M.;PADILLA, B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v.44, n.2, p.101-106, 1993.

FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos**. 2ª ed. Zaragoza: Acribia, 1993.

FERREIRA, A. L. A; MATSUBARA, L.S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionados, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FRANKEL, E. N.; MEYER, A.S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidant. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n.13, p. 1.925-1.941, 2000.

FURTADO, A. A. L; CABRAL, L. M. C., ROSA, M. F., MODESTA, R. C. D., PONTES, S. M. Avaliação microbiológica e sensorial da polpa de goiaba tratada termicamente. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v.22, n.especial, p.91-95, 2000.

GIADA, M.L.R.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante in vitro de compostos fenólicos de alimentos. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, São Paulo, v. 28, p.91-107, 2004.

GONGATTI NETTO, A.; GARCIA, A.E.; ARDITO, E.F.G.; GARCIA, E.C.; BLEINROTH, E.W.; MATALLO, M.; CHITARRA, M.I.F.; BORDIN, M.R. **Goiaba para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita**. Brasília: EMBRAPA – SPI, 1996. 35p.: il. (Publicações Técnicas FRUPEX; 20).

GUO, C.; YANG, J.; WEI, J.; LI, Y.; XU, J.; JIANG, Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. **Nutrition Research**, Washington, v.23, n.12, p.1719-1726, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymology**, v. 186, p. 81-85, 1990.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE; J.M.C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 246, p. 501-514, 1986.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, New York, v.52, n.8, p.253-265, 1994.

HARBORNE, J.B. *Phytochemical Methods*. London: Chapman and Hall, 1973. 278p.

HAMMERSCHMIDT, P.A.; PRATT, D.E. Phenolic antioxidants of dried soybeans. **Journal of Food Science**, v.43, n. 2, p. 556-559, 1978.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v.53, n.8, p.2928-2935, 2005.

HENNINGSSON, S.; HYDE, K.; SMITH, A.; CAMPBELL, M. The value of resource efficiency in food industry: a waste minimization project in East Anglia, UK. **Journal of Cleaner Production**, v. 12, n.5, p. 505-512, 2004.

HOCMAN, G. Chemoprevention of cancer: phenolic antioxidants (BHT, BHA). **The International Journal of Biochemistry**, v. 20, n.7, p. 639-651, 1988.

HOULIHAN, C. M.; HO, C.; CHANG, S. S. The structure of rosmariquinone - a new antioxidant isolated from *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 62, n. 1, p. 96-98, 1985.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago v. 53, n.6, p.1841-1856, 2005.

IHA, M.S.; MIGLIATO, K.F.; VELLOSA, J.C.R.; SACRAMENTO, L.V.S.; PIETRO, R.C.L.R.; ISAAC, V.L.B.; BRUNETTI, I.L.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Paraíba, v.18, n. 3, p. 387-393, 2008.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA Pesquisa Agrícola Municipal. Rio de Janeiro. Disponível em www.sidra.ibge.gov.br - acessado: 26 de dezembro de 2007.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA Produção Agrícola Municipal. Rio de Janeiro. Disponível em www.sidra.ibge.gov.br Acesso em 18 de agosto de 2009.

IBRAF – INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. Disponível em www.ibraf.org.br Acesso em 26 de novembro de 2009.

ISMAIL, A.; MARJAN, Z.M.; FOONG, C.W. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. **Food Chemistry**, Washington, v.87, n.4, p. 581-586, 2004.

JAYAPRAKASHA, G.K; SINGH, R.P; SAKARIAH. K.K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. **Food Chemistry**, Washington, v. 73, n. 3, p. 285-290, 2001.

JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RINCÓN, M.; PULIDO, R.; SAURA-CALIXTO, F. Guava fruit (*P. guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v. 49, n. 11, p. 5489-5493, 2001.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas v.25, n.4, p. 726-732, 2005.

LANGSETH, L. Oxidant, antioxidants and disease prevention. **ILSI Europe**, p. 4-13, 1995.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A.G.; Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, v.71, n.2, p.214–222, 2005.

LEJA, M.; MARECZEK, A.; BEN, J. Antioxidant properties of two apple cultivars during long-term storage. **Food Chemistry**, Washington, v.80, n.3, p. 303-307, 2003.

LEE, SJ; UMANO, K; SHIBAMOTO, T; LEE, KG. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, Washington; v. 91, n. 1, p. 131-137. 2005

LIRA, R. C. Valor nutricional e utilização de resíduo da goiaba (*Psidium guajava L*) e do tomate (*Lycopersicum esculentum Mill.*) na alimentação de frango de corte. Recife 2008, 92p. Tese (Doutorado em Zootecnia) UFRPE, 2008.

LIU, Q.; YAO, H. Antioxidant activities of barley seeds extracts. **Food Chemistry**, Washington, v.102, n.3, p.732–737,2007.

MANCINI FILHO, J.; VAN-KOIJ, A.; MANCINI, D.A.P.; COZZOLINO, F.F.; TORRES, R.P. Antioxidant activity of cinnamon (*Cinnamomun zeylanicum*, Breyne) extracts. **Bolletino Chimico Farmaceutico**, v.137, n.11, p.443-447, 1998.

MARTÍNEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M.J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Archivos Latinoamericanos de Nutrition**, v. 50, n. 1, p. 5-18, 2000.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B.; Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim. SBCTA**, Campinas: v.36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MELO, E.A; MANCINI FILHO, J.; GUERRA, N.B. Characterization of antioxidant compounds in aqueous coriander extract (*Coriandrum sativum L.*). **Lebensmittel Wissenschaft und Techonologie**, v.38, n.1, p.15-19, 2005.

MENZEL, C.M. Guava: an exotic fruit with potencial in Queensland. **Queensland Agricultural Journal**, Brisbane, v. 3, n. 2, p. 93-98, 1985.

MIELNIK, M.B.; OLSEN, E.; VOGT, G.; ADELIN, D.; SKREDE, G. Grape seed extract as antioxidant in cooked, cold stored turkey meat. **Lebensmittel Wissenschaft und Techonologie**, v.39, n.3, p.191-198, 2006.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, Washington, n. 72, p. 145-171, 2001.

NACZK, M.; SHAHIDI, F.; Extraction and analysis of phenolics in food, **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95–111, 2004.

OGA, Z. **Fundamentos de toxicologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003, p. 39-44.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays:a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v. 50, p.2914-2919, 2002.

PRATT, D.E.; BIRAC, P.M. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. **Journal of Food Science**, v.44, n.6, p.1720-1722, 1979.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; DÍAZ-RUBIO, M.E.; SERRANO, J.; GONI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant, food, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, Toronto, v.41, n.3, p.274-285, 2008.

PIETTA, P.; SIMONETTI, P.; MAURI, P. Antioxidant activity of selected medicinal plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, 46, 4487–4490, 2000.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v. 67, n. 5, p. 289-297, 1997.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.4, p.755-760, 2006.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.;RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

SACRAMENTO, C.K.; SOUZA, F. X. **Cajá (*Spondias mombin L.*)**. Jaboticabal: FUNEP, (Série Frutas Nativas), 42p. 2000.

SANTORO, N., THIELE, D. J. Oxidative stress responses in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: **Yeast Stress Responses**. Ed. S. Hohmann and W. H. Mager. Heidelberg: Springer-Verlag GmbH & Co. KG, p. 171-212, 1997.

SATO, M.; BAGCHI D.; TOSAKI, A.; DAS, D.K., Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia/reperfusion-induced activation of JNK-1 and C-JUN. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, n.6, p.729–737, 2001.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D.; Phenolic antioxidants. **CRC-Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.32, n.1, p.67-103, 1992.

SHI, H.; NIKI, E. Stoichiometric and kinetic studies on ginkgo biloba extract and related antioxidants. **Lipids**, v.33, n.4, p.365-370, 1998.

SHUI, G.; LEONG, L.P. Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. **Food Chemistry**, Washington, v.97, n.2, p. 277-284, 2006.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SILVA FILHO, J.C.S.; ARMELIN, M.A.J.A.; SILVA, A.G. Determinação da composição mineral de subprodutos agroindustriais utilizados na alimentação animal pela técnica de ativação neutrônica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 235-241, 1999.

SILVA, J.D.A. Composição química e digestibilidade in situ de semente de goiaba (*Psidium guajava L.*). Recife 1999, 34p. Dissertação (Mestrado em produção animal) UFRPE, 1999.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOONG, Y.Y.; BARLOW, P.J.; Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, Washington, v. 88, n.3 p.411–417, 2004.

WOLFE, K.; WU, X.; LIU, R.H. Antioxidant activity of apple peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v.51, n.3, p.609-614, 2003.

YU, T-W., ANDERSON, D. Reactive oxygen species-- induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, Amsterdam, v.379, n.2, p.201-210, 1997.

ZHENG, W.; WANG, S.Y.; Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v.49, n.11, p. 5165-5170, 2001.

4. OBJETIVOS

4.1. GERAL

Averiguar o potencial antioxidante de extratos obtidos a partir de resíduo de goiaba (semente) proveniente de uma indústria de polpas congeladas de frutas.

4.2. ESPECÍFICOS

Quantificar o teor de polifenóis extraídos do resíduo agroindustrial (semente) de goiaba.

Avaliar a capacidade antioxidante de extratos de resíduo de goiaba por diferentes métodos.

5. RESULTADOS

**5.1. ARTIGO 1: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE RESÍDUO
AGROINDUSTRIAL DE GOIABA EM SISTEMA MODELO.**

Resumo

No processamento da goiaba para obtenção de doce, suco, entre outros, há a formação de uma elevada quantidade de resíduo, representado principalmente pelas sementes. Considerando que este material apresenta em sua composição compostos bioativos, objetivou-se neste trabalho avaliar o teor de fenólicos totais e o potencial antioxidante de extratos de resíduo da goiaba (semente) proveniente de uma indústria de polpas de frutas congeladas. Extratos hidroacetônico, hidrometanólico, hidroetanólico e aquoso, obtidos por extração sequencial, foram utilizados para a quantificação de fenólicos totais e para a determinação da atividade antioxidante em sistema da co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico e da inibição da peroxidação do ácido linoléico - método tiocianato férrico. Os extratos hidroacetônico e hidrometanólico exibiram os maiores teores de fenólicos totais (5.317,27 e 2.176,46 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente), enquanto que o hidroetanólico e o aquoso os mais baixos teores destes constituintes, sendo, portanto, excluídos da avaliação do potencial antioxidante. Em sistema da co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico, o extrato hidroacetônico exibiu o mais elevado percentual de inibição da oxidação (81,95%), superior a do hidrometanólico (38,92%). Os extratos hidroacetônico e hidrometanólico, com valores de F1 inferior a 1, foram eficientes no início do processo oxidativo, embora exibam atividade pró-oxidante na etapa de propagação da cadeia oxidativa. O extrato hidroacetônico associado ao BHT em quantidades inferiores a 40mg/L exibiu atividade antioxidante estatisticamente semelhante a do BHT na concentração de 100mg/L. Nas concentrações de 140 e 240 mg/L, a ação do extrato hidroacetônico (74,32% e 80,13%) sobre a peroxidação do ácido linoléico foi superior a do extrato hidrometanólico (50,50% e 73,70%). Em meio lipídico, o extrato hidroacetônico do resíduo agroindustrial de goiaba exibiram ação antioxidante relevante. Este extrato associado ao BHT demonstrou ser eficiente em bloquear o início da reação de oxidação. Desta forma, o resíduo agroindustrial de goiaba surge como uma interessante fonte alternativa de antioxidante natural.

Palavras-chave: Resíduo agroindustrial; compostos fenólicos, atividade antioxidante em meio lipídico.

INTRODUÇÃO

A goiabeira, *Psidium guajava L.*, originária da América Tropical produz fruto de importância para as regiões subtropicais e tropicais, não só devido ao seu valor nutritivo, mas também pela excelente aceitação para o consumo *in natura* e grande aplicação industrial (GONGATTI NETTO et al., 1996). A goiaba, além de possuir quantidade regular de ácidos, açúcares e pectinas, apresenta em sua constituição taninos, flavonóides, óleos essenciais, alcoóis sesquiterpenóides e ácidos triterpenóides (IHA et al., 2008). Muitos destes compostos exibem propriedade antioxidante que atuam minimizando os danos oxidativos causados ao organismo pelas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, prevenindo doenças crônicas degenerativas não transmissíveis, como câncer, aterosclerose, entre outras (JACOB; BURRI, 1996).

Dentre as frutas tropicais brasileiras, a goiaba ocupa lugar de destaque, levando o Brasil a ser considerado um dos maiores produtores mundiais da fruta. Segundo IBGE (2009), a produção brasileira de goiaba nos últimos anos tem sido relativamente estável, variando de 281.102 toneladas em 2001 para 316.301 em 2007. A maior parte desta produção é destinada à indústria para a produção de doce, suco, geléia, polpa congelada, entre outros. No processo de beneficiamento de frutos há o descarte das sementes que junto com parte da fração da pele e da polpa, não separada no processo físico de despulpamento, compõem o resíduo que usualmente é descartado pela agroindústria. No caso da goiaba destinada à produção de sucos e doces, aproximadamente, 30% do peso do fruto é resíduo, constituído, principalmente, por sementes (SILVA, 1999). Desta forma, considerando que as cascas e as sementes de certos frutos exibem atividade antioxidante mais elevada do que a polpa (GUO et al., 2003; SOONG; BARLOW,

2004; AJILA et al., 2007b), este resíduo pode, ainda, conter significativa quantidade de compostos bioativos, conferindo a este material um potencial antioxidante.

Merece destaque o grande interesse por antioxidantes naturais tendo em vista os efeitos deletérios sobre a saúde exercidos pelos antioxidantes sintéticos, aditivos utilizados pela indústria de alimentos para inibir a oxidação lipídica (NAKATANI, 1997). Neste sentido, pesquisas estão voltadas para a busca de compostos naturais que apresentem esta propriedade funcional, com vistas a substituir ou reduzir o uso dos antioxidantes sintéticos. Nesta perspectiva, o resíduo da agroindústria vem sendo utilizado para a extração de compostos antioxidantes, como relatado por Moure et al. (2001). Em estudos mais recentes foi detectada relevante ação antioxidante em resíduos da vinicultura (LAFKA et al., 2007); em resíduo de carambola (SHUI; LEONG, 2006); em casca de manga (AJILA et al., 2007a); em resíduo de acerola, maracujá e abacaxi (OLIVEIRA et al., 2009); em resíduo agroindustrial de acerola (CAETANO et al., 2009), entre outros.

Assim, frente à elevada proporção de resíduos agroindustriais e da presença de fitoquímicos bioativos neste material, este estudo objetivou investigar a capacidade antioxidante do resíduo agroindustrial de goiaba com vistas à utilização de seu potencial como aditivo alimentar.

Material e Métodos

Material

Resíduo agroindustrial de goiaba (sementes) foi cedido, no mês Setembro/2008, por uma indústria produtora de polpa de frutas congelada (FRUTOTAL), localizada na cidade do Recife-PE. Este material, coletado diretamente da linha de produção, foi imediatamente transportado para o Laboratório de Análises Físico-químicas de Alimentos, do Departamento de Ciências Domésticas da UFRPE para serem submetidos à secagem, a 40°C, em estufa com circulação de ar, até atingir umidade igual ou inferior a 10%. Em seguida, os resíduos desidratados foram triturados, em multiprocessador (Tecnal), passados em tamis de 80 mesh para obtenção de um pó uniforme que foi acondicionado em sacos de polietileno, e mantido sob congelamento (-18°C) durante o desenvolvimento dos experimentos.

Métodos

Obtenção dos extratos

Os extratos hidroacetônico, hidrometanólico, hidroetanólico e aquoso foram obtidos de uma mesma amostra por processo de extração sequencial. O resíduo desidratado (170g) foi mantido, por 20 minutos, sob agitação permanente, em acetona a 80% (700mL), em temperatura ambiente (25°C ± 2°C), e em seguida, filtrado. O resíduo desta filtração foi submetido ao mesmo processo de extração

por mais dois períodos de 20 minutos, totalizando 60 minutos de extração. Os filtrados resultantes foram combinados, concentrados sob pressão reduzida a 40° C, e o volume ajustado para 50 mL. O resíduo foi reutilizado para a extração com metanol a 80% e, subsequentemente, com etanol a 80% e água nas condições acima descritas. Os extratos obtidos foram acondicionados em recipientes tampados, de cor âmbar, e mantidos sob congelamento (-18°C) até o momento das análises. O processo de extração foi efetuado em triplicata.

Fenólicos Totais

A concentração dos compostos fenólicos totais foi determinada por espectrofotometria, utilizando reagente Folin-Ciocalteau (Merck), segundo a metodologia descrita por Wettasinghe e Shahidi (1999) e curva padrão de catequina. Os resultados foram expressos em mg de fenólicos totais em equivalente de catequina por 100g do resíduo e em µg de fenólicos totais em equivalente de catequina por mL do extrato.

Ensaio da Atividade Antioxidante em emulsão do ácido linoléico

1- Co-oxidação do β-caroteno e ácido linoléico

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada utilizando método descrito por Marco (1968), modificada por Hammerschmidt e Pratt (1978), como segue: A solução de β-caroteno (1 mL), preparada pela dissolução de 1 mg de β-caroteno em 10 mL de clorofórmio, foi colocada em um balão de fundo redondo,

contendo 20 mg de ácido linoléico e 200 mg do emulsificante Tween 20. Após a remoção do clorofórmio, em evaporador rotatório a 50°C, 50 mL de água destilada foram adicionados sob agitação vigorosa. Alíquotas (5 mL) desta emulsão foram transferidas para uma série de tubos de ensaios contendo 0,2 mL dos extratos, atingindo concentração final de 100mg/L de fenólicos totais. Em seguida, os tubos foram colocados em banho-maria a 50°C, durante 105 min, e a absorbância mensurada a 470 nm, nos intervalos de tempo de 0, 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 105. A atividade antioxidante foi expressa como percentual de inibição da oxidação, calculada em relação a 100% da oxidação do controle (sem antioxidante), conforme expressão abaixo:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{\text{Taxa de degradação do controle} - \text{taxa de degradação da amostra}}{\text{Taxa de degradação do controle}} \times 100$$

1.1- Estudo cinético da atividade antioxidante no sistema da co-oxidação do β -caroteno /ácido linoléico

A eficiência da atividade antioxidante dos extratos foi estimada a partir da relação entre a tangente das curvas cinéticas do extrato e do controle (sem adição de antioxidante), em duas partes da curva, entre 15 e 45 minutos e entre 75 e 105 minutos, segundo metodologia descrita por Silva, Nascimento e Moreira (2007). Na primeira parte da curva, o valor obtido (F1) indica a eficiência do antioxidante de bloquear a reação em cadeia através da interação com os radicais peróxidos, enquanto que na segunda parte da curva o valor obtido (F2) indica a

eficiência do antioxidante em participar de outras reações durante o processo oxidativo, como por exemplo, a decomposição dos hidroperóxidos, produzindo espécies radicalares que aceleram a oxidação no sistema.

1.2- Atividade antioxidante do extrato do resíduo agroindustrial de goiaba associado ao BHT.

Diferentes concentrações do extrato do resíduo agroindustrial de goiaba, associadas a diferentes concentrações BHT (Tabela 1), de modo que a concentração final atingisse a 100mg/L, foram submetidas aos ensaios da atividade antioxidante em sistema da co-oxidação do β -caroteno /ácido linoléico.

Tabela 1: Concentração do extrato do resíduo agroindustrial de goiaba (em fenólicos totais) e do BHT submetidos aos ensaios da atividade antioxidante em sistema da co-oxidação do β -caroteno /ácido linoléico

Tratamentos	Extrato (mg/L)	BHT (mg/L)
1	100	0
2	80	20
3	60	40
4	40	60
5	20	80
6	0	100

2- Inibição da peroxidação do ácido linoléico - Método Tiocianato Férrico

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada utilizando o método tiocianato férrico descrito por Jayaprakasha, Shigh e Sakariah (2001). A emulsão do ácido linoléico foi preparada homogeneizando 0,28g de ácido linoléico, 0,28g de Tween 20, como emulsificante, e 50mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,0). Alíquotas dos extratos, com concentração final de fenólicos totais de 140ppm e de 240ppm, foram individualmente misturadas com 2,5mL da emulsão do ácido linoléico e 2,5mL tampão fosfato 0,2 M (pH 7,0), acondicionadas em frasco de vidro âmbar, com tampa rosqueável, e encubada em estufa com circulação de ar a $50^{\circ}\text{C} \pm 1$. Em período regular de tempo (a cada 48h), 0,1 mL desta solução foi retirado e adicionado a 5 mL de etanol 75% (v/v), 0,1 mL de tiocianato de amônio 30% (p/v) e 0,1 mL de cloreto ferroso 0,02M em HCl 3,5%. Após, exatamente 3 minutos à temperatura ambiente ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) foi medida a absorvância a 500nm, em espectrofotômetro Shimadzu UV-1650PC. O experimento foi encerrado no momento em que o controle (amostra sem adição de antioxidante) atingiu um valor máximo de absorvância. O grau da inibição da peroxidação do ácido linoléico foi calculado usando expressão algébrica:

$$\% \text{ inibição} = \frac{[\text{absorvância média final do controle} - \text{absorvância média final da amostra}]}{\text{absorvância média final do controle}} \times 100$$

Como termo de comparação foi utilizado à atividade antioxidante do antioxidante sintético BHT (butil-hidroxitolueno) e do ácido ascórbico, determinada nas mesmas condições dos dois ensaios acima descritos.

Análise estatística

Todas as determinações foram efetuadas em triplicata e os resultados submetidos à análise de variância e teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico “Statistic - for Windows”.

Resultados e Discussão

Fenólicos Totais

O processo de extração sequencial utilizando solventes de diferentes polaridades e três ciclos de extração para cada solvente possibilitou a extração de compostos fenólicos em quantidade variada (Tabela 2). O extrato hidroacetônico exibiu o maior teor de fenólicos totais, diferindo estatística dos demais extratos. O extrato aquoso e o hidroetanólico apresentaram significativamente os mais baixos teores destes constituintes, sendo, portanto excluídos dos experimentos. Evidencia-se, portanto, que a solubilidade dos compostos fenólicos em um determinado solvente é uma característica peculiar do fitoquímico relacionada à polaridade dos polifenóis presentes na amostra, bem como ao grau de polimerização e da interação com outros constituintes (NACZK e SHAHIDI, 2004). Sendo assim, a combinação de pelo menos dois ciclos de extração utilizando-se solventes orgânicos aquosos, com diferentes polaridades, de modo a extrair compostos com diferentes estruturas químicas é importante para se atingir a eficiência do processo de extração (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2008)

Outros materiais têm exibido quantidades significantes de compostos fenólicos. Em uma variedade de goiaba sem semente, produzida na Tailândia, a quantidade de fenólicos totais extraída com concentrações diferentes de metanol, etanol, acetona e água foi de 109 a 155; 123 a 185; 166 a 191 e 153mg GAE/100g de peso fresco, respectivamente (ALOTHMAN et al., 2009). Soares et al. (2008b) relatam teor de 219,56 a 1.242,78 mg GAE 100g⁻¹ em extrato hidroacetônico de cascas de uvas das cultivares *Isabel* e *Niágara*, respectivamente. A partir do bagaço de maçã cv. Gala, utilizando acetona nas concentrações de 75% e 100% (v/v), Soares et al. (2008a) extraíram teor de fenólicos totais de 467,24 ± 7,20mg GAE 100g⁻¹ e de 522,74 ± 4,02 mg GAE 100 g⁻¹ de peso seco do resíduo, respectivamente. Oliveira et al. (2009) relataram que o extrato metanólico obtido a partir de resíduos de acerola, maracujá e abacaxi apresentou teor de fenólicos totais de 681; 275 e 103mg GAE 100g⁻¹, respectivamente.

Tabela 2: Teor de fenólicos totais em resíduo agroindustrial de goiaba (semente) utilizando processo de extração sequencial.

EXTRATOS	Teor de fenólicos totais	
	mg em equivalente de catequina. 100g ⁻¹	µg em equivalente de catequina. mL ⁻¹
Hidroacetônico (80%)	156,40 ^a	5.317,27 ^a
Hidrometanólico (80%)	64,00 ^b	2.176,46 ^b
Hidroetanólico (80%)	15,13 ^c	514,23 ^c
Aquoso (100%)	15,00 ^c	498,80 ^c
Total	250,53	8.506,76

Os valores referem-se a média de três determinações. Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan p>0,05).

Estudos têm revelado que as cascas e as sementes de certos frutos exibem quantidade de compostos bioativos mais elevada do que a polpa, e que o perfil dos fitoquímicos antioxidantes é diferenciado nestas partes do vegetal (GUO et al., 2003; SOONG; BARLOW, 2004; AJILA et al., 2007). Este fato foi constatado em goiaba vermelha cuja quantidade de fenólicos totais da polpa (124,0 mg 100⁻¹g) foi inferior a encontrada em pele desta fruta (420mg 100⁻¹g) (HASSIMOTTO; GENOVESE; LAJOLO, 2005). O teor de fenólicos presentes em sementes de goiaba deste estudo (250,53mg 100g⁻¹) foi superior ao encontrado em polpa, porém inferior ao detectado em pele de goiaba vermelha relatado por esses autores.

Os extratos hidroetanólico e aquoso por terem exibido os menores teores de fenólicos totais foram excluídos dos experimentos. Assim, os ensaios da ação antioxidante foram desenvolvidos com os extratos hidroacetônico e hidrometanólico.

Determinação da Capacidade Antioxidante

Em vegetais, em especial em frutas, uma grande variedade de compostos antioxidantes fazem parte de sua composição. A mensuração da capacidade antioxidante de cada composto isoladamente torna-se muito difícil. Neste sentido, vários métodos têm sido desenvolvidos para determinar a capacidade antioxidante de diferentes amostras (GUO et al., 2003). Alguns deles determinam a habilidade dos antioxidantes para sequestrar radicais livres gerados no meio da reação, outros avaliam a eficiência dos antioxidantes em inibir a peroxidação lipídica através da quantificação dos produtos da reação, como dienos

conjugados e hidroperóxidos, bem como dos produtos de decomposição da peroxidação lipídica ou medindo a inibição da oxidação do lipídio do sistema pelo antioxidante a ser testado (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; FRANKEL; MEYER, 2000; ALOTHMAN et al., 2009). Não obstante a diversidade de métodos para avaliar a atividade antioxidante, não existe um procedimento metodológico universal (FRANKEL; MEYER, 2000). Este fato impõe a necessidade de avaliar a capacidade antioxidante por diferentes ensaios. Assim, para investigar a capacidade antioxidante do resíduo agroindustrial de goiaba foram utilizados dois ensaios empregando ácido linoléico como substrato.

- Sistema da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico

A atividade antioxidante dos extratos mensurada em sistema da co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico encontra-se apresentada na Figura 1. O extrato hidroacetônico exibiu uma forte ação antioxidante, porém estatisticamente inferior a do antioxidante sintético BHT e superior a do ácido ascórbico. O extrato hidrometanólico exibiu fraca capacidade antioxidante, no entanto foi estatisticamente superior a do ácido ascórbico.

A propriedade antioxidante dos fenólicos tem mostrado ser dependente da solubilidade do composto (FRANKEL et al., 1994). Segundo Porter et al. (1997), em emulsão de óleo, os antioxidantes hidrofílicos são mais efetivos do que os hidrofóbicos uma vez que atuam na interface óleo-água. Por sua vez, os antioxidantes hidrofóbicos inibem a oxidação na fase lipídica das emulsões. Em emulsões lipídicas, os fenólicos geralmente encontram-se equilibrados em água, emulsificante (Tween 20), micelas e fase lipídica, aumentando sua propriedade hidrofílica, com conseqüente aumento da inibição da oxidação lipídica (SAIJA, et

al., 1995). É possível que os compostos fenólicos do extrato hidroacetônico tenham atingido este equilíbrio, enquanto que os do extrato hidrometanólico tenham permanecido prioritariamente na fase lipídica do sistema, justificando, assim, a ação antioxidante exibida por estes extratos.

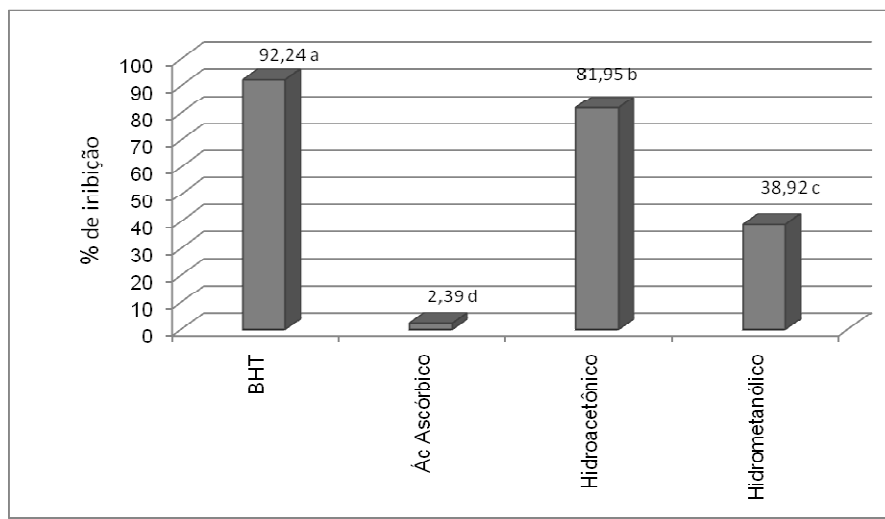


Figura 1: Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba em sistema β -caroteno/ ácido linoléico contendo 100mg/L de fenólicos totais. (Os valores referem-se a média de três determinações. Médias seguidas por letras iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan $p > 0,05$).

Outros resíduos agroindustriais também têm mostrado ação antioxidante em sistema modelo da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico, a exemplo dos extratos etanólicos acidificados obtido a partir do bagaço, semente e pele de uva roxa. Estes extratos, em diferentes concentrações, exibiram ação antioxidante que variou de 20 a 89%; 25 a 89% e de 11 a 86%, respectivamente (NEGRO; TOMMASI; MICELI, 2003). Broinizi et al. (2007) relatam que os extratos aquoso e alcoólico do bagaço de caju, em diferentes concentrações, apresentaram percentual de inibição da oxidação entre 17 a 33% e 32 a 50% respectivamente,

evidenciando ser a ação antioxidante dependente da concentração usada no ensaio. No caso deste estudo, estabeleceu-se a concentração de 100mg/L de modo a viabilizar a comparação da ação antioxidante dos extratos com o BHT, uma vez que a legislação brasileira estabelece como limite de adição do antioxidante sintético em alimentos a concentração de 200mg/L (BRASIL, 2009).

O extrato hidroacetônico e o hidrometanólico do resíduo agroindustrial de goiaba exibiram ação antioxidante superior a dos extratos acetônicos do bagaço de uva das variedades *Tannat* e *Anceleta*, cuja inibição da oxidação foi de 13 a 24 e de 6 a 29%, respectivamente (ROCKENBACH et al., 2008). A ação antioxidante do resíduo agroindustrial determinada neste estudo também foi superior a dos extratos metanólicos de morango, amora e açaí, os quais exibiram ação antioxidante entre 30 a 70% (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Para melhor entender o mecanismo de ação dos compostos fenólicos presentes nos extratos do resíduo agroindustrial de goiaba, foram construídas curvas cinéticas da inibição da oxidação no sistema modelo da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico (Figura 2). Evidencia-se que o extrato hidroacetônico, ao longo do tempo de reação (105 minutos), apresentou comportamento cinético semelhante ao do BHT, havendo um leve decaimento da ação após 40 minutos da reação. No entanto, o extrato hidrometanólico nos minutos iniciais da reação exibiu um decaimento da ação que ao longo do tempo de reação tornou-se significativo quando comparado com o BHT. A ação antioxidante do ácido ascórbico diminuiu progressivamente durante a reação, atingindo valores próximos aos do controle (sem antioxidante).

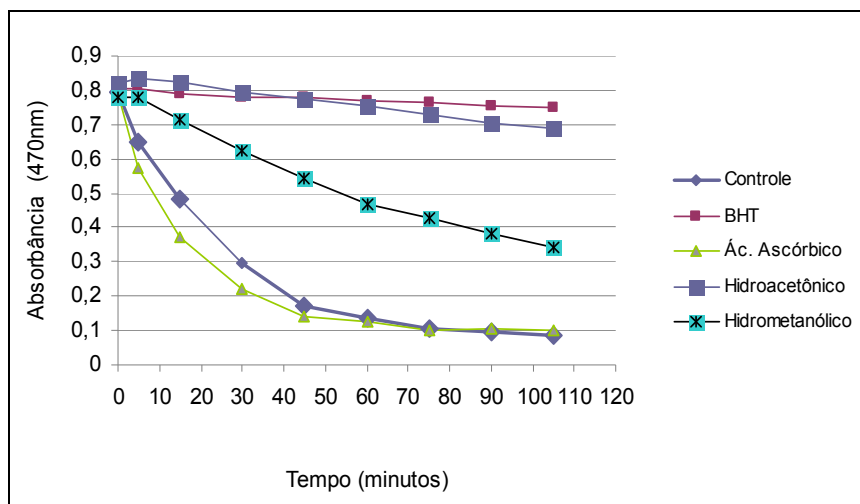


Figura 2: Cinética da ação antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba e do ácido ascórbico e BHT (concentração final de 100mg/L) em sistema da cooxidação do B-caroteno/ ácido linoléico.

A partir das tangentes das curvas cinéticas foi calculado o Fator 1 (F1) e o Fator 2 (F2) (Tabela 3). Segundo Yanishlieva e Marinova (1995), o F1 representa a efetividade do antioxidante em bloquear as reações em cadeia, ocasionadas pelos radicais livres, na etapa de iniciação da oxidação; enquanto que o F2 representa a possibilidade do antioxidante de participar de reações em uma etapa mais adiantada do processo da reação de oxidação, como a decomposição de hidroperóxidos e estabilização de compostos formados ao longo do processo de oxidação. Quanto menor o valor de F1, mais eficientes são os compostos da amostra em retardar ou inibir o processo oxidativo. O valor de F2 tende a ser maior que o do F1, porém para o desempenho do antioxidante ser satisfatório este valor não deve ser superior a 1.

Analisando os dados da Tabela 3 evidencia-se que dentre os extratos, o hidroacetônico apresentou o mais baixo valor de F1, seguido do extrato hidrometanólico, demonstrando ser eficiente no início do processo oxidativo. No entanto, a eficiência deste extrato foi inferior a do BHT que apresentou o valor

mais baixo de F1. O valor de F2 dos dois extratos foi superior a 1, revelando que os compostos antioxidantes presente participam de outras reações, formando espécies radicalares que aceleram o processo oxidativo do sistema, exibindo, portanto, uma atividade pró-oxidante na etapa de propagação da cadeia oxidativa. O ácido ascórbico, embora tenha exibido ação antioxidante muito baixa, na concentração utilizada no experimento, não atuou como pró-oxidante na fase de propagação.

Tabela 3: Parâmetros cinéticos dos extratos hidroacetônico e hidrometanólico de resíduo agroindustrial de goiaba, na concentração final de 100mg/L, determinados em sistema da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico.

Extratos	Fatores	
	F1	F2
Hidroacetônico	0,17 ^c	1,9 ^b
Hidrometanólico	0,54 ^b	4,39 ^a
Ácido Ascórbico	0,77 ^a	0,11 ^d
BHT	0,04 ^d	0,75 ^c

F1 – relação entre as tangentes das curvas cinéticas da solução-padrão ou teste e o controle entre 15 e 45 min; F2 – relação entre as tangentes das curvas cinéticas da solução-padrão ou teste e o controle entre 75 e 105 min. Os valores referem-se a média de três determinações. Médias seguidas por letras iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan $p > 0,05$.

A eficiência do extrato hidroacetônico do resíduo agroindustrial de goiaba, relativa à fase inicial do processo oxidativo, foi superior a dos extratos de semente de linhaça. Segundo estudo desenvolvido por Galvão et al. (2008), o fator cinético (F1) calculado, utilizando 100 μ L e 200 μ L do extrato aquoso, etéreo e alcoólico de linhaça foi de 0,45 e 0,35; 0,99 e 0,95; 1,01 e 0,89 respectivamente. O extrato aquoso e alcoólico do bagaço de caju, em três concentrações diferentes, na etapa

inicial do processo oxidativo também se mostrou eficiente em bloquear a formação inicial de radicais livres *in vitro* (F1= 0,4; 0,6; 0,5 e 0,4; 0,4; 0,3, respectivamente). Enquanto que para a fase de propagação, verificada pelos valores de F2, os extratos não demonstraram eficiência antioxidante, pois atingiram valores superiores a 1 (BROINIZI et al., (2007).

O extrato hidroacetônico foi associado ao BHT com vistas a averiguar a possibilidade de reduzir a quantidade do antioxidante sintético, e o percentual de inibição da oxidação encontra-se expresso na Figura 3. Observa-se que utilizando 20 ou 40mg/L do extrato (concentração relacionada ao teor de fenólicos totais) associado a 80 ou 60mg/L de BHT, o percentual de inibição da oxidação foi estatisticamente semelhante ao do BHT na concentração de 100mg/L. Assim, evidencia-se efeito sinérgico do extrato hidroacetônico associado ao BHT em quantidades inferiores a 40mg/L. Rockenbach et al., (2008), também, evidenciaram efeito sinérgico ao associar o BHT com extratos etanólico e acetônico de uvas das variedades *Tannat* e *Ancelota*, cuja ação antioxidante foi semelhante a do antioxidante sintético isolado e superior a obtida pelos extratos. No entanto, a associação que utilizou maior teor do extrato e menor quantidade de BHT exibiu ação antioxidante inferior a do extrato e do BHT isolado. Evidencia-se, portanto, que concentração do extrato maior que 60mg/L não apresenta eficácia em sistema da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico.

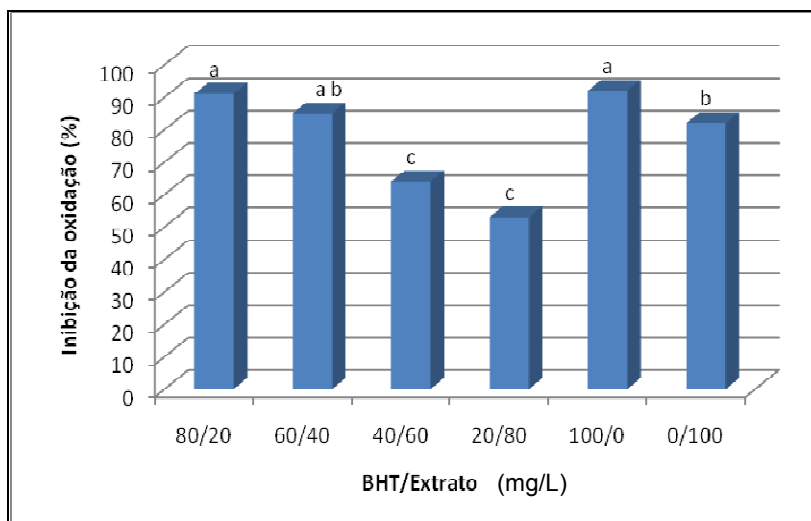


Figura 3: Atividade antioxidante em sistema da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico do extrato hidroacetônico de resíduo agroindustrial de goiaba associado ao BHT - concentração final: 100mg/L de fenólicos (80/20= 80mg/L de BHT/20mg/L fenólicos extrato; 60/40= 60mg/L de BHT/40mg/L fenólicos extrato; 40/60= 40mg/L de BHT/60mg/L fenólicos extrato; 20/80= 20mg/L de BHT/80mg/L fenólicos extrato; 100/0= 100mg/L de BHT/0mg/L fenólicos extrato; 0/100= 0mg/L de BHT/100mg/L fenólicos extrato). (Os valores referem-se à média de três determinações. Médias seguidas por letras iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan $p>0,05$).

A Figura 4 demonstra o comportamento cinético da associação do extrato hidroacetônico com o BHT. Evidencia-se que a partir dos 15 minutos da reação ocorreu um declínio da ação antioxidante, o qual se torna mais acentuado ao longo do tempo de reação nas associações em que o extrato encontra-se em maior concentração.

Na Tabela 4, observa-se que o extrato hidroacetônico associado ao BHT foi eficiente em bloquear o início da reação de oxidação, no entanto a maior eficiência é evidenciada com as menores concentrações do extrato. Para a fase de propagação, verificada pelos valores de F2, todos os ensaios utilizando o extrato não demonstraram eficiência antioxidante, pois atingiram valores superiores a 1.

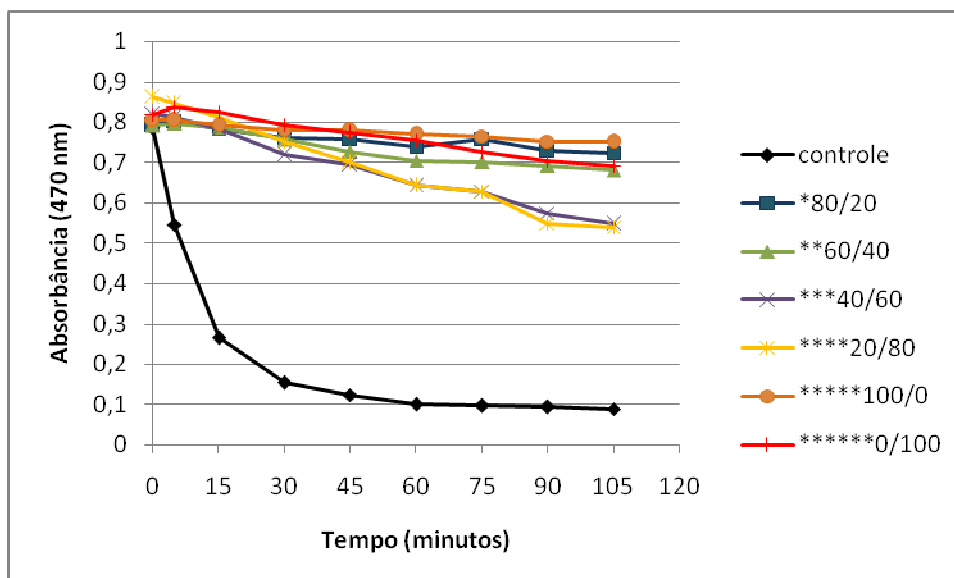


Figura 4: Cinética da ação antioxidante do extrato de resíduo agroindustrial de goiaba associado ao BHT (concentração final de 100mg/L) em sistema da cooxidação do B-caroteno/ ácido linoléico. (* 80mg/L de BHT/20mg/L fenólicos extrato; **60mg/L de BHT/40mg/L fenólicos extrato; ***40mg/L de BHT/60mg/L fenólicos extrato; ****20mg/L de BHT/80mg/L fenólicos extrato; *****100mg/L de BHT/0mg/L fenólicos extrato; *****0mg/L de BHT/100mg/L fenólicos extrato)

Tabela 4: Parâmetros cinéticos do extrato hidroacetônico do resíduo agroindustrial de goiaba associado ao BHT determinados em sistema da co-oxidação do β -caroteno e ácido linoléico.

BHT (mg/L)	Extrato (mg/L)	Fatores	
		F1	F2
100	0	0,04 ^d	0,75 ^d
0	100	0,17 ^c	1,9 ^c
80	20	0,17 ^c	4,33 ^b
60	40	0,42 ^b	2,59 ^c
40	60	0,64 ^a	10,0 ^a
20	80	0,80 ^a	10,85 ^a

F1 – relação entre as tangentes das curvas cinéticas da solução-padrão ou teste e o controle entre 15 e 45 min; F2 – relação entre as tangentes das curvas cinéticas da solução-padrão ou teste e o controle entre 75 e 105 min. Os valores referem-se a média de três determinações. Médias seguidas por letras iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan $p > 0,05$.

- **Inibição da peroxidação do ácido linoléico - Método Tiocianato Férrico**

Neste ensaio, os hidroperóxidos gerados durante a oxidação do ácido linoléico reagem com o sulfato ferroso, dando origem ao sulfato férrico e, em seguida, ao tiocianato férrico, de cor vermelho sangue, que é monitorado espectrofotometricamente.

Nas Figuras 5 e 6, evidencia-se que a absorvância do sistema, com e sem antioxidante, aumentou ao longo do tempo de incubação, tendo o controle (amostra sem adição de antioxidante), atingido as 168h, o mais elevado valor, seguido de um decréscimo da densidade ótica, momento em que foi interrompido o ensaio. Segundo Hua-Ming, et al., (1996), este decréscimo da densidade ótica revela a interrupção da oxidação em decorrência da não disponibilidade do ácido linoléico no meio da reação e do surgimento de produtos secundários oriundos da degradação dos hidroperóxidos.

O extrato hidroacetônico, independente da concentração utilizada, exibiu a maior atividade antioxidante, porém inferior a do BHT. Ao empregar concentração mais elevada (240mg/L) os extratos exibiram ação antioxidante semelhante, entretanto inferior ao BHT.

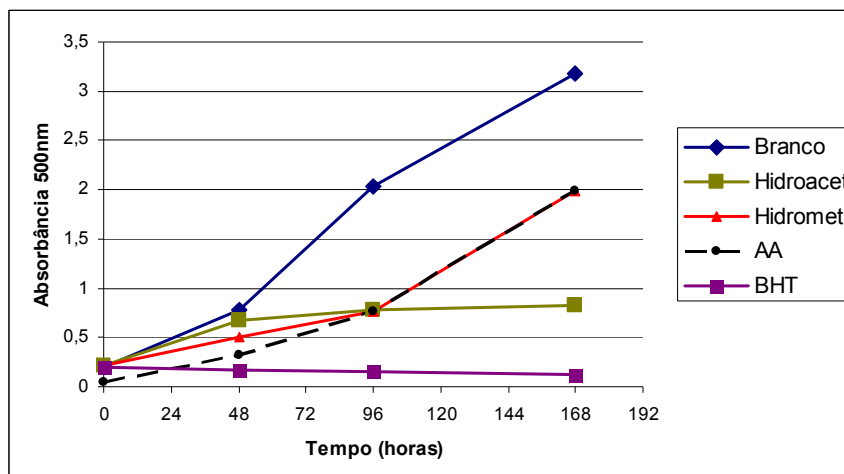


Figura 5: Atividade antioxidante de extrato de resíduo agroindustrial de goiaba, BHT e ácido ascórbico (AA) (140mg/L), em emulsão de ácido linoléico (método tiocianato férrico).

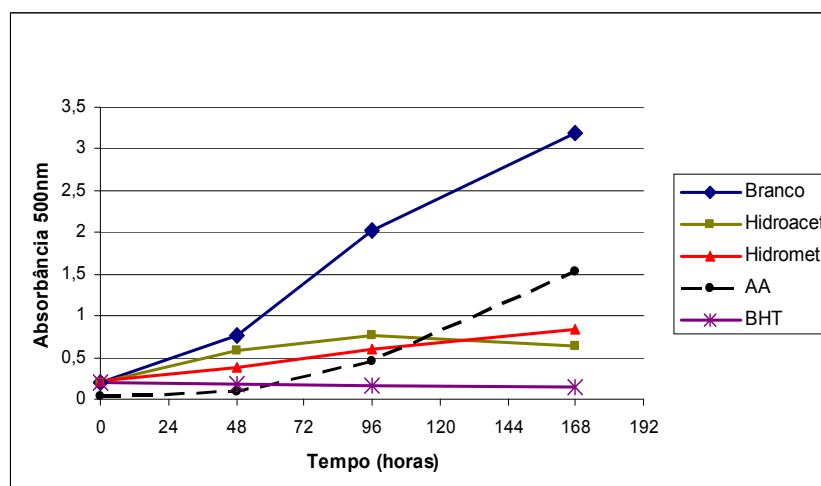


Figura 6: Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba, BHT e ácido ascórbico (AA) (240mg/L) em emulsão de ácido linoléico (método tiocianato férrico).

Em termos percentuais, a inibição da peroxidação do ácido linoléico pelos extratos hidroacetônico e hidrometanólico, nas concentrações de 140 e 240mg/L, as 168h do período de incubação, foi de 74,32% e 80,13%; e de 50,50% e 73,70%, respectivamente (Tabela 5). O aumento do percentual de inibição da

oxidação do ácido linoléico em função da concentração de fenólicos totais dos extratos foi estatisticamente significativo, apenas, para extrato hidrometanólico.

A ação antioxidante dos extratos de resíduo agroindustrial de goiaba sobre a peroxidação do ácido linoléico foi inferior a de extratos de outros materiais relatados na literatura. Extratos de cevada obtidos com o emprego de vários solventes extratores (metanol, etanol e acetona a 70%), após 9 dias de incubação, exibiram ação antioxidante, entretanto o maior percentual foi atingido pelo extrato hidroacetônico, cuja ação foi semelhante a do BHT (LIU; YAO, 2007). O percentual de inibição da peroxidação atingido pelo extrato bruto e o óleo essencial de alfavaca foi de 96,39% e 92,44%, respectivamente (PEREIRA; MAIA, 2007). Jayaprakasha, Shigh e Sakariah (2001) relatam que extratos de semente de uva, obtidos com o uso de acetona, metanol e quatro diferentes concentrações de acetato de etila apresentaram ação antioxidante sobre a peroxidação do ácido linoléico, entretanto o extrato obtido com acetato de etila e água (17:3) apresentou, após 100h de incubação, o maior percentual de inibição (86%).

Tabela 5: Inibição da peroxidação do ácido linoléico (%) por ação de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba, BHT e ácido ascórbico (método Tiocianato férrico).

Extrato	Inibição da peroxidação (%) as 168 horas	
	140mg/L	240mg/L
Hidroacetônico	74,32% ^{b A}	80,13% ^{b A}
Hidrometanólico	50,50% ^{c B}	73,70% ^{bc A}
Ácido ascórbico	55,93% ^{c B}	68,06% ^{c A}
BHT	95,94% ^{a A}	95,20% ^{a A}

Os valores referem-se a média de três determinações. Médias seguidas por letras minúsculas iguais, na coluna, e letras maiúsculas iguais, na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ($p > 0,05$).

Conclusão

Os resultados obtidos permitem inferir que em meio lipídico o extrato hidroacetônico do resíduo agroindustrial de goiaba exibe ação antioxidante relevante. Este extrato por ação sinérgica com o BHT demonstrou ser eficiente em bloquear o início da reação de oxidação, entretanto na fase de propagação não apresentou a mesma eficiência, revelando que os compostos antioxidantes presentes participam de outras reações, acelerando o processo oxidativo. Desta forma, o resíduo agroindustrial de goiaba surge como uma fonte alternativa de antioxidante natural.

Referência Bibliográfica

AJILA, C.M.; NAIDU, K.A.; BHAT, S.G.; PRASADA RAO U.J.S. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. **Food Chemistry**, Washington, v.105, n.3, p. 982-988, 2007a.

AJILA, C.M., BHAT, S.G., PRASADA RAO, U.J.S., Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. **Food Chemistry**, Washington, v.102, n.4, p.1006-1011, 2007b.

ALOTHMAN, M.; BHAT, R.; KARIM, A.A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. **Food Chemistry**, Washington, v 115, n, 3, p.785-788, 2009.

BRASIL. Resolução RDC nº 23, de 15 de fevereiro de 2005. "Regulamento Técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e

seus limites máximos para a categoria de alimentos óleos e gorduras – subcategoria creme vegetal e margarinas”, <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/aditivos.htm>, acessada em Outubro 2009.

BROINIZI, P.R.B.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; NOVOA, A.J. V.; TORRES, R.P.; AZEREDO, H.M.C.; ALVES, R.E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.4, p. 902-908, 2007.

CAETANO, A.C.S.; MELO, E.A.; LIMA, V.L.A.G.; MACIEL, M.I.S.; ARAÚJO, C.R. Extração de antioxidantes de resíduos agroindustriais de acerola. **Brazilian Journal of Food and Technology**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 155-160, 2009.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-52, 2006.

FRANKEL, E.N.; HUANG, S-W; KANNER, J.; GERMAN, J.B. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v.42, n. 5, p.1054-1059, 1994.

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidant. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1.925-1.941, 2000.

GALVÃO, E.L.; SILVA, D.C.F.; SILVA, J.O.; MOREIRA, A.V.B.; SOUSA, E.M.B.D. Avaliação do potencial antioxidante e extração subcrítica do óleo de linhaça. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n. 3, p. 551-557, 2008.

GONGATTI NETTO, A.; GARCIA, A.E.; ARDITO, E.F.G.; GARCIA, E.C.; BLEINROTH, E.W.; MATALLO, M.; CHITARRA, M.I.F.; BORDIN, M.R. **Goiaba para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita**. Brasília: EMBRAPA – SPI, 1996. 35p.: il. (Publicações Técnicas FRUPEX; 20).

GUO, C.; YANG, J.; WEI, J.; LI, Y.; XU, J.; JIANG, Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. **Nutrition Research**, Washington, v.23, n.12, p.1719-1726, 2003.

HAMMERSCHMIDT, P.A.; PRATT, D.E. Phenolic antioxidants of dried soybeans. **Journal of Food Science**, v.43, n. 2, p. 556-559, 1978.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v.53, n.8, p.2928-2935, 2005.

HUA-MING, C., KOJI, M., FUMIO, Y., KIYOSHI, N. Antioxidant activity of Designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from Digests of a Soyabean Protein. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Chicago, v.44, n. 9, p.2619-2623, 1996.

IHA, M.S., MIGLIATO, K.F.; VELLOSA, J.C.R.; SACRAMENTO, L.V.S.; PIETRO, R.C.L.R.; ISAAC, V.L.B.; BRUNETTI, I.L.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Paraíba, v.18, n. 3, p. 387-393, 2008.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA Produção Agrícola Municipal. Rio de Janeiro. Disponível em www.sidra.ibge.gov.br Acesso em 18 de agosto de 2009.

JACOB, R. A; BURRI, B. Oxidative damage and defense. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.63, n.6, p. 985- 990.1996.

JAYAPRAKASHA, G.K; SINGH, R.P; SAKARIAH. K.K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. **Food Chemistry**, Washington, v. 73, n. 3, p. 285-290, 2001.

LAFKA, T-I; SINANOGLU, V.; LAZOS, E.S. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. **Food Chemistry**, Washington, v.104, n.3, p.1206-1214, 2007.

LIU, Q.; YAO, H. Antioxidant activities of barley seeds extracts. **Food Chemistry**, Washington, v.102, n.3, p.732–737. 2007.

MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J.M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M.J.; PARAJÓ, J.C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, Washington, v. 72, n. 2, p. 145-171, 2001.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of chromatography A**, Amsterdam, v.1054, n.1-2, p.95-111, 2004.

NAKATANI, N. Antioxidants from spices and herbs. In: SHAIHIDI, F. (Ed.), **Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects and Applications**. AOCS Press, Illinois, p. 64–75, 1997.

NEGRO, C.; TOMMASI, L.; MICELI, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extrats. **Bioresource Technology**., v. 87, n. 1, p. 41-44, 2003.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; BARROS, M.P.; MANO, C.M.; GOULART, M.O.F. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry**, Washington, v.115, n.2, p. 469–475, 2009.

PEREIRA, C.A.M.; MAIA, J.F. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.) **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 624-632, 2007.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; DÍAZ-RUBIO, M.E.; SERRANO, J.; GONI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant, food, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, Toronto, v.41, n.3, p.274-285, 2008.

PORTER, W.L. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. **Toxicological and Industrial Health**, v. 9, n. 1-2, p. 93-122, 1997.

ROCKENBACH, I.I.; SILVA, G.L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E.M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifénóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedade Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28 (supl.), p. 238-244, 2008.

SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, FRANCESCO.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Radical Biology and Medicine**, v.19, n.4, p.481-486, 1995.

SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n.1, p.94-103, 1999.

SILVA, J.D.A. Composição química e digestibilidade in situ de semente de goiaba (*Psidium guajava L.*). Recife 1999, 34p. Dissertação (Mestrado em produção animal) UFRPE, 1999.

SILVA, D.C.F.; NASCIMENTO, M.A.; MOREIRA, A.V.B. Verificação da presença de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes em amostras de café. **Nutrire**, São Paulo, v.32, n.1, p.41-58, 2007.

SHUI, G.; LEONG, L.P. Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. **Food Chemistry**, Washington v.97, n.2, p. 277-284, 2006.

SOARES, M.; WELTER, L.; GONZAGA, L.; LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.3, p. 727-732, 2008a.

SOARES, M. WELTER, L.; KUSKOSKI, E.M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas niágara e isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 1, p. 59-64, 2008b.

SOONG, Y-Y.; BARLOW, P.J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, Washington, v.88, n.3, p. 411-417, 2004.

WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free

radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v.47, n. 5, p.1801-1812, 1999.

YANISHILIEVA, N.V.I.; MARINOVA, E.M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 4, p. 377-382, 1995.

**5.2. ARTIGO 2: CAPACIDADE DE EXTRATOS DE RESÍDUO
AGROINDUSTRIAL DE GOIABA EM SEQUESTRAR RADICAIS LIVRES.**

Resumo

Considerando a elevada produção de resíduos agroindustriais e sendo este material fonte de fitoquímicos bioativos, este trabalho objetivou determinar a atividade anti-radical do resíduo de goiaba (semente) proveniente da indústria de polpa de fruta congelada. Extratos hidroacetônico, hidrometanólico, hidroetanólico e aquoso, obtidos por extração sequencial, foram avaliados quanto o teor de compostos fenólicos totais e capacidade em sequestrar radicais livres por meio do DPPH[•] (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico). Os extratos aquoso e hidroetanólico por apresentarem os mais baixos teores de polifenóis (498,80 e 514,23 µg em equivalente de catequina mL⁻¹, respectivamente), foram excluídos da avaliação da atividade antioxidante. Os extratos hidroacetônico e hidrometanólico exibiram capacidade de sequestrar o radical DPPH acima de 60 e abaixo de 30%, baixo e alto valor de EC₅₀ e de T_{EC50}, e média e baixa eficiência anti-radical (EA), respectivamente. Ao combinar o extrato hidroacetônico e o BHT, em diferentes concentrações, o percentual de sequestro do DPPH foi superior ao do BHT isolado, demonstrando haver sinergismo entre eles. A ação antioxidante do extrato hidroacetônico frente ao radical ABTS^{•+} (875,79 mM TEAC.g⁻¹) foi superior a do extrato hidrometanólico (57,16 mM TEAC.g⁻¹) e a do BHT (188,24 mM TEAC.g⁻¹). O extrato hidroacetônico do resíduo agroindustrial de goiaba apresenta um expressivo potencial anti-radical, uma vez que demonstrou eficiência na captura dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, além de sinergismo com o BHT. Desta forma, pode ser considerado como uma alternativa para obtenção de antioxidante natural.

Palavras-chave: Resíduo agroindustrial; Semente de goiaba; Fenólicos totais, Atividade anti-radical; DPPH; ABTS.

INTRODUÇÃO

Os vegetais, em especial as frutas e seus produtos, são ricos em substâncias antioxidantes, dentre as quais se destacam os compostos fenólicos. Estes compostos, amplamente distribuídos no reino vegetal, apresentam em sua estrutura um anel aromático com uma ou mais hidroxila, que lhes confere propriedade antioxidante (HERNÁNDEZ; PRIETO; GONZÁLES, 1999). Este grupo de compostos que engloba moléculas simples e com alto grau de polimerização se encontram tanto na forma livre como também ligados a açúcares e proteínas (CROFT, 1998; BRAVO, 1998).

Merece destaque a evidência de que as cascas e as sementes de certos frutos exibem elevado teor de fitoquímicos que lhes conferem atividade antioxidante, muitas vezes, mais elevada do que a da parte comestível (GUO et al., 2003; SOONG; BARLOW, 2004; AJILA et al., 2007). Neste contexto, os resíduos resultantes do processo de beneficiamento de frutos constituem uma rica fonte de fitoquímicos bioativos, tornando-se relevante avaliar o potencial antioxidante deste material, especialmente em decorrência do volume de resíduos produzidos pela agroindústria. No caso da goiaba, para a produção de sucos e doces, aproximadamente, 30% do peso do fruto corresponde aos resíduos gerados no processo (SILVA, 1999).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro* de extratos de vegetais, dentre as quais se destacam os métodos baseados na varredura de radicais livres. Os ensaios utilizando radicais 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) e 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) estão entre os mais utilizados na avaliação da capacidade antioxidante de várias categorias de amostras e baseiam-se na capacidade do

radical livre estável em reagir com substâncias doadoras de H (ROGINSKY, LISSI, 2005; SANCHEZ-MORENO, LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998; MENSOR et al., 2001; MAIER et al., 2009).

Assim, considerando a elevada produção de resíduos agroindustriais e sendo este material fonte de fitoquímicos bioativos, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante do extrato de resíduo agroindustrial de goiaba (semente) utilizando métodos baseado na captura de radicais livres.

Material e Métodos

Material

O resíduo agroindustrial de goiaba (semente) foi cedido por uma indústria produtora de polpa congelada de frutas (FRUTOTAL), localizada na cidade de Recife/PE, no mês de Setembro de 2008. Este material, coletado diretamente da linha de produção, foi imediatamente transportado para o Laboratório de Análises Físico-químicas de Alimentos, do Departamento de Ciências Domésticas da UFRPE, para serem submetidos à secagem, a 40°C, em estufa com circulação de ar, até atingir umidade igual ou inferior a 10%. Em seguida, os resíduos desidratados foram triturados, em multiprocessador (Tecnal), passados em tamis de 80 mesh para obtenção de um pó uniforme que foi acondicionado em sacos de

polietileno, e mantido sob congelamento (-18°C) durante o desenvolvimento dos experimentos.

Métodos

Obtenção dos extratos

Os extratos hidroacetônico, hidrometanólico, hidroetanólico e aquoso foram obtidos de uma mesma amostra por processo de extração sequencial. O resíduo desidratado (170g) foi mantido, por 20 minutos, sob agitação permanente, em acetona a 80% (700mL), em temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), e em seguida, filtrado. O resíduo desta filtração foi submetido ao mesmo processo de extração por mais dois períodos de 20 minutos, totalizando 60 minutos de extração. O resíduo foi reutilizado para a extração com metanol a 80% e, subsequentemente, com etanol a 80% e água nas condições acima descritas. Os extratos obtidos foram acondicionados em recipientes tampados, de vidro cor âmbar, e mantidos sob congelamento (-18°C) até o momento das análises. O processo de extração foi efetuado em triplicata.

Determinação de Fenólicos Totais

A determinação do teor de fenólicos totais dos extratos foi efetuada, por método espectrofotométrico, utilizando o reagente Folin-Ciocalteau (Merck),

segundo metodologia descrita por Wettasinghe e Shahidi (1999) e curva padrão de catequina. Os resultados foram expressos em μg de fenólicos totais em equivalente de catequina por mL do extrato.

Determinação da capacidade antioxidante

Capacidade de sequestrar o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•)

A capacidade dos extratos de sequestrar o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•) foi determinada utilizando o método descrito por Brand-Williams et al. (1995), modificado por Sánchez-Moreno, Larrauri, Saura-Calixto (1998). Extratos com diferentes concentrações de fenólicos totais foram adicionados à solução de DPPH• em metanol (0,1M), atingindo a concentração final de fenólicos totais de 20, 40 e 60ppm. A absorbância a 515 nm foi monitorada, em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650PC) até a reação atingir o platô. A capacidade de sequestrar o radical DPPH• foi expressa em percentual, calculada em relação ao controle (sem antioxidante).

A concentração do DPPH• remanescente no meio da reação foi calculada a partir da curva padrão do radical DPPH•, e o percentual de DPPH• remanescente ($\text{DPPH}_{\text{rem}}\%$) de cada concentração do extrato foi calculado utilizando a seguinte expressão:

$$\% \text{ DPPH}_{\text{REM}} = \text{DPPH}_t / \text{DPPH}_{T=0} \times 100$$

Onde: $DPPH_t$ é concentração do radical DPPH no tempo em que a reação atingiu o platô; $DPPH_{T=0}$ é concentração inicial do DPPH (tempo 0 da reação)

Em seguida, a concentração do extrato eficiente para diminuir em 50% a concentração inicial do DPPH• (EC_{50}) foi calculada a partir do gráfico da concentração da amostra (g de fenólicos totais da amostra. $g DPPH^{-1}$) versus $DPPH_{REM}\%$, cujo resultado foi expresso em g de fenólicos totais do extrato por g de DPPH•. A eficiência anti-radical (EA) foi calculada considerando o valor de EC_{50} e o tempo em que foi atingido o EC_{50} (T_{EC50}), conforme expressão abaixo:

$$EA=1/EC_{50}.T_{EC50}$$

O comportamento cinético dos extratos foi classificado em rápido ($T_{EC50} < 5$ minutos), intermediário ($T_{EC50} = 5$ a 30 minutos) ou lento ($T_{EC50} > 30$ minutos), segundo o valor de T_{EC50} , e a eficiência anti-radical, em baixa ($EA < 1$), média ($EA > 1$ e ≤ 5), alta ($EA > 5$ e ≤ 10) ou super alta ($EA > 10$) de acordo com o valor de EA (SÁNCHEZ-MORENO, LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998).

Como termo de comparação foi utilizado à capacidade de sequestro do radical DPPH do BHT e do ácido ascórbico, determinada nas condições acima descritas.

Capacidade de sequestro do radical DPPH• do extrato do resíduo (semente) agroindustrial de goiaba associado ao BHT.

Diferentes concentrações do extrato do resíduo agroindustrial de goiaba, associadas a diferentes concentrações BHT (Tabela 1), de modo que a

concentração final atingisse a 100mg/L, foram submetidas aos ensaios da capacidade de sequestrar o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), cujos resultados foram expressos em percentual, calculado em relação ao controle (sem antioxidante).

Tabela 1: Concentração do extrato do resíduo agroindustrial de goiaba (em fenólicos totais) e do BHT submetidos ao ensaio da capacidade de sequestro do radical DPPH*.

Tratamentos	Extrato (mg/L)	BHT (mg/L)
1	100	0
2	80	20
3	60	40
4	40	60
5	20	80
6	0	100

Capacidade de sequestrar o radical ABTS^{•+}

A capacidade de sequestrar o radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico (ABTS^{•+}) foi determinada segundo o método descrito por RE et al. (1999). O radical ABTS^{•+} foi gerado a partir da reação da solução aquosa de ABTS (7 mM) com 2,45 mM de persulfato de potássio. Esta solução foi mantida ao abrigo da luz, em temperatura ambiente por 16h. Em seguida, a solução do radical foi diluída em etanol até obter uma medida de absorvância de $0,7 \pm 0,05$,

em comprimento de onda de 734 nm. Os extratos com diferentes concentrações de fenólicos totais foram adicionadas a solução do ABTS^{•+}, atingindo concentração final de 5, 10 e 20mg/L, e a absorbância medida, após 6 minutos, em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650PC). A capacidade antioxidante da amostra foi calculada em relação a atividade do antioxidante sintético Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), nas mesmas condições, e os resultados foram expressos em atividade antioxidante equivalente ao Trolox (mMol TEAC.g⁻¹ de fenólicos totais do extrato).

Análise estatística

Todas as determinações foram efetuadas em triplicata e os resultados submetidos à análise de variância e teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico “Statistic - for Windows”.

Resultados e Discussão

O processo de extração sequencial utilizando solventes de diferentes polaridades e três ciclos de extração para cada solvente possibilitou a extração de compostos fenólicos em quantidade variada (Tabela 2). O extrato hidroacetônico exibiu o maior teor de fenólicos totais, diferindo estatisticamente dos demais extratos. O extrato aquoso e o hidroetanólico apresentaram significativamente os mais baixos teores destes constituintes, sendo, portanto excluídos dos

experimentos. Evidencia-se, portanto, que a solubilidade dos compostos fenólicos em um determinado solvente é uma característica peculiar do fitoquímico relacionada à polaridade dos polifenóis presentes na amostra, bem como ao grau de polimerização e da interação com outros constituintes (NACZK; SHAHIDI, 2004). Sendo assim, a combinação de pelo menos dois ciclos de extração utilizando-se solventes orgânicos aquosos, com diferentes polaridades, de modo a extrair compostos com diferentes estruturas químicas é importante para se atingir a eficiência do processo de extração (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2008)

Tabela 2: Teor de fenólicos totais em extrato de resíduo agroindustrial de goiaba (semente) utilizando processo de extração sequencial.

EXTRATOS	Teor de fenólicos totais
	(μg em equivalente de catequina. mL^{-1})
Hidroacetônico (80%)	5.317,27 ^a
Hidrometanólico (80%)	2.179,46 ^b
Hidroetanólico (80%)	514,23 ^c
Aquoso (100%)	498,80 ^c

Os valores referem-se a média de três determinações. Médias seguidas por letras iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ($p > 0,05$).

Capacidade de sequestrar o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•)

O método que determina a capacidade de sequestro do radical DPPH• se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para o DPPH•, convertendo-o a sua forma reduzida. Nesta reação, a solução metanólica de DPPH, inicialmente de coloração púrpura, torna-se descolorida, e o grau desta

descoloração indica a habilidade do antioxidante em sequestrar o radical livre. Desta forma, avalia-se o poder redutor de um antioxidante, não sendo possível detectar a ação pró-oxidante de substâncias (DUARTE-ALMEIDA et al. 2006).

A capacidade dos extratos de resíduo de goiaba de sequestrar o radical DPPH•, expressa em percentual de sequestro, encontra-se apresentada na (Figura 1). Evidencia-se que o percentual de sequestro tende a ser dose dependente, destacando-se o extrato hidroacetônico com percentual de sequestro mais elevado, cuja ação, nas concentrações de 40 e 60 mg/L, foi estatisticamente superior a do extrato hidrometanólico e a do BHT, porém semelhante a do ácido ascórbico. Nascimento (2007) e Alothman et al. (2009) relatam resultados semelhantes para resíduo de goiaba e polpa de goiaba sem semente, respectivamente. O extrato hidroacetônico de resíduo de goiaba, aos 15 minutos de reação, exibiu 80% de sequestro do radical DPPH. Extratos de polpa de goiaba, sem semente, obtidos com diferentes concentrações de acetona e de metanol, exibiram, aos 30 minutos de reação, percentuais de inibição que variaram de 93 a 94 e de 67 a 68%, respectivamente (ALOTHMAN et al., 2009).

Outros resíduos de vegetais têm exibido capacidade de sequestro do radical DPPH. A atividade antioxidante de extrato metanólico de acerola também foi dose dependente, atingindo percentual de sequestro do radical DPPH superior a 80% (OLIVEIRA et al., 2009). Broinizi et al. (2007) constataram que o extrato etanólico do bagaço e pedúnculo de caju, nas concentrações de 0,25 mg e 0,5mg, após 30 minutos, exibiram capacidade de sequestro do radical DPPH• superior a 60%, enquanto que na concentração de 0,125 mg esta ação foi de 57% e 36%, respectivamente.

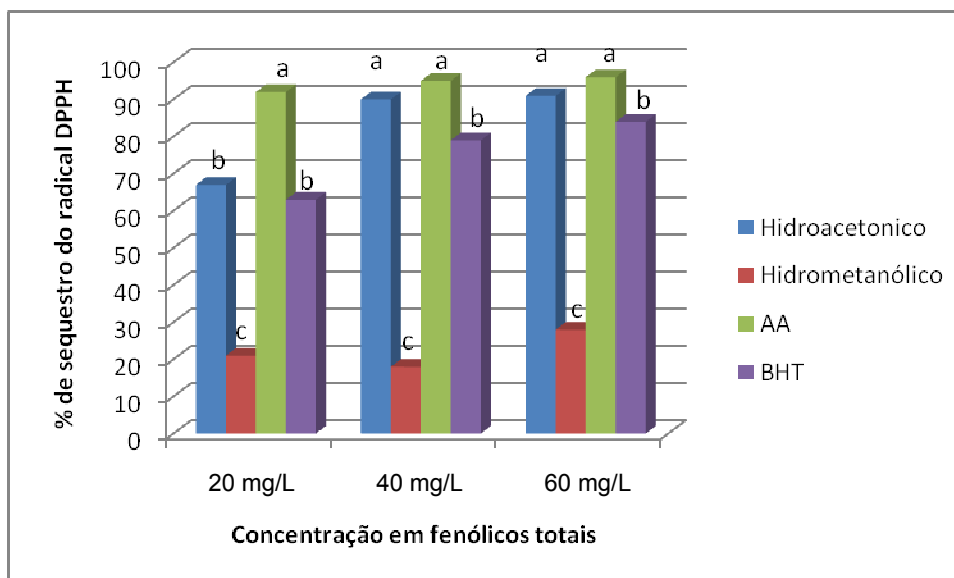


Figura 1: Atividade antioxidante (% de sequestro do radical DPPH) de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba (semente) comparada à solução de BHT e Ácido Ascórbico (AA) aos 5 minutos da reação.

O comportamento cinético e o poder anti-radical dos extratos de resíduo agroindustrial de goiaba encontram-se na Tabela 3. Considerando que o valor EC_{50} é inversamente relacionado à atividade anti-radical, evidencia-se que o extrato hidroacetônico, com o mais baixo valor de EC_{50} , exibiu a melhor capacidade de sequestro do radical DPPH, cuja ação foi estatisticamente semelhante ao BHT. Jiménez-Escrig et al. (2001) evidenciaram elevada capacidade de sequestro em goiaba, com destaque para a fração casca por ter exibido menor valor de EC_{50} ($1,92 \text{ g de goiaba} \cdot \text{g DPPH}^{-1}$) do que a fração polpa da fruta ($3,70 \text{ g de goiaba/g DPPH}^{-1}$). Esta ação está correlacionada ao teor de fenólicos do material empregado no ensaio.

Como base na escala de classificação estabelecida por Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998), descrita na metodologia deste trabalho, evidencia-se que o extrato hidroacetônico, reagiu rapidamente com o radical

DPPH ($T_{EC50} < 5$ minutos), comportamento cinético estatisticamente semelhante ao do BHT e do ácido ascórbico, enquanto que o extrato hidrometanólico obteve valor de T_{EC50} muito superior a 30 minutos, permitindo classificá-lo como lento. Quanto a eficiência anti-radical, evidencia-se que o extrato hidroacetônico exibiu valor de EA estatisticamente semelhante ao do BHT ($EA > 1$ e ≤ 5) e inferior ao do ácido ascórbico, podendo ser classificado como extrato com média eficiência anti-radical. O extrato hidrometanólico exibiu o mais baixo valor de EA, sendo considerado de baixa eficiência anti-radical. Extratos obtidos a partir da casca e da polpa de goiaba obtiveram valores de T_{EC50} (54,74 e 30,75 minutos) e de EA (0,007 e 0,009) (JIMÉNZ-ESCRIG et al., 2001) superiores e inferiores, respectivamente, aos exibidos pelo extrato hidroacetônico do resíduo agroindustrial de goiaba.

Tabela 3: Valores de EC_{50} , de T_{EC50} e classificação cinética e anti-radical de extratos de resíduos agroindustrial de goiaba.

Amostras	EC_{50} (g de fenólicos totais. g DPPH \cdot^{-1})	T_{EC50} (min)	Classificação cinética	EA	Classificação anti-radical
Hidroacetônico	0,43±0,01 ^b	0,71±0,01 ^{bc}	Rápido	3,27 ^b	Média
Hidrometanólico	1,80±0,09 ^a	227,86±2,27 ^a	Lento	0,002 ^c	Baixa
BHT	0,26±0,02 ^{bc}	2,38±0,03 ^b	Rápido	1,62 ^b	Média
Ácido Ascórbico	0,18±0,02 ^c	0,55±0,01 ^c	Rápido	10,10 ^a	Super alta

Os valores referem-se a média \pm desvio padrão de três determinações. Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ($p > 0,05$). EC_{50} = concentração eficiente para diminuir em 50% a concentração inicial do DPPH; T_{EC50} = tempo necessário para atingir o valor de EC_{50} ; EA= eficiência anti-radical = $1/ EC_{50} \cdot T_{EC50}$

A associação do extrato hidroacetônico com o BHT (Figura 2) exibiu percentual de sequestro do radical DPPH \cdot superior a 70%. A análise estatística

dos dados revelou que a ação antioxidante dos ensaios que continham maior concentração de fenólicos totais do extrato hidroacetônico (60 e 80mg/L) é semelhante entre si e superior a do BHT. Evidencia-se, portanto, que a combinação do extrato ao BHT maximizou a ação antioxidante, demonstrado haver sinergismo entre eles, permitindo vislumbrar a possibilidade de minimizar a quantidade do antioxidante sintético em alimentos a níveis inferiores ao estabelecido pela legislação brasileira.

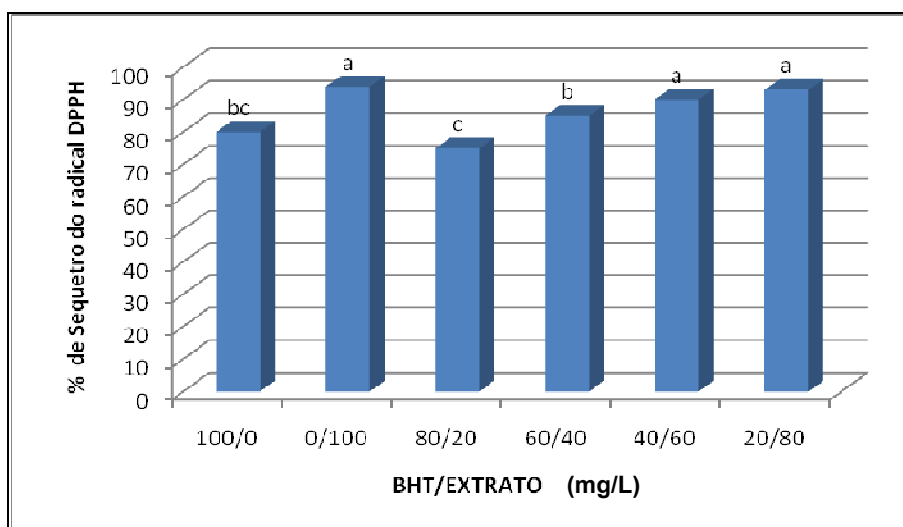


Figura 2: Atividade antioxidante (% de sequestro do radical DPPH) do extrato hidroacetônico do resíduo (semente) agroindustrial de goiaba associado ao BHT - concentração final: 100mg/L de fenólicos (100/0= 100mg/L de BHT/0mg/L fenólicos extrato; 0/100= 0mg/L de BHT/100mg/L fenólicos extrato; 80/20= 80mg/L de BHT/20mg/L fenólicos extrato; 60/40= 60mg/L de BHT/40mg/L fenólicos extrato; 40/60= 40mg/L de BHT/60mg/L fenólicos extrato; 20/80= 20mg/L de BHT/80mg/L fenólicos extrato). (Os valores referem-se a média de três determinações. Médias seguidas por letras iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan $p > 0,05$).

Capacidade de sequestrar o radical ABTS^{•+}

A capacidade de sequestro de radicais livres ABTS^{•+} dos extratos de resíduo agroindustrial de goiaba encontra-se demonstrada na Tabela 4. Evidencia-se que

esta ação foi diferenciada entre os extratos, com destaque para o extrato hidroacetônico que atingiu valor de TEAC superior ao do BHT.

A ação antioxidante do extrato hidroacetônico frente ao radical ABTS foi próxima a do extrato de semente de uva (484,9 a 1048,0 mM TEAC g⁻¹) e superior a do bagaço de maçã cv. Gala (0,02546 mMol.g⁻¹) relatada por Maier et al. (2009) e por Soares et al. (2008a), respectivamente. Soares et al. (2008b) revelam que extratos hidroacetônico de cascas de uvas cultivares *Isabel* e *Niágara* exibiram TEAC de 0,08922 e 0,15731 mMol 100g⁻¹, enquanto que extratos acetônicos (50 e 70%) de bagaço de uva da variedade *Tannat* e *Anceleta* o valor de TEAC foi de 0,4664 e 0,4762 mMol.g⁻¹ e de 0,4034 e 0,3939 mMol.g⁻¹, respectivamente (ROCKENBACH et al.,2008). Evidencia-se, portanto, que o potencial antioxidante do extrato hidroacetônico de resíduo (semente) de goiaba é superior ao da casca de uva. Estes resultados demonstram que o resíduo agroindustrial de goiaba por possuir uma atividade anti-radical expressiva poderia ser considerado como uma fonte interessante de antioxidantes naturais.

Tabela 4: Capacidade de sequestro do radical ABTS^{**} de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba.

Extratos	mM TEAC.g⁻¹
Hidroacetônico	875,79 ± 56,06 ^a
Hidrometanólico	57,16 ± 1,53 ^c
BHT	188,24 ± 8,02 ^b

Os valores referem-se à média de três determinações ± desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan (p>0,05). TEAC: atividade antioxidante em equivalente de Trolox (6 minutos).

Conclusões

O extrato hidroacetônico do resíduo agroindustrial de goiaba apresenta um expressivo potencial anti-radical, uma vez que demonstrou eficiência na captura de radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, além de sinergismo com o BHT. Desta forma, apresenta-se como alternativa de antioxidante natural. No entanto, estudos adicionais são necessários para testar sua ação antioxidante em outras condições experimentais.

Referência Bibliográfica

AJILA, C.M.; NAIDU, K.A.; BHAT, S.G.; PRASADA RAO, U.J.S.; Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. **Food Chemistry**, Washington, v.105, n.3, p.982- 988, 2007.

ALOTHMAN, M.; BHAT, R.; KARIM, A.A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. **Food Chemistry**, Washington, v. 115, n. 3, p.785-788, 2009.

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

BROINIZI, P.R.B.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; NOVOA, A.J.V.; TORRES, R.P.; AZEREDO, H.M.C.; ALVES, R.E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.4, p. 902-908, 2007.

CROFT, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Science**, New York, v.854, p.435-442, 1998.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

GUO, C.; YANG, J.; WEI, J.; LI, Y.; XU, J.; JIANG, Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. **Nutrition Research**, Washington, v.23, n.12, p.1719-1726, 2003.

HERNÁNDEZ, A.M.; PRIETO GONZÁLES, E.A. Plantas que contienen polifenoles. **Revista Cubana de Investigaciones Biomedica**, Ciudad de la Habana v.18, n.1, p. 12-14,1999.

JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RINCÓN, M.; PULIDO, R.; SAURA-CALIXTO, F. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v.49, n.11, p.5489-5493, 2001.

MAIER, T.; SCHIEBER, A.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, Washington, v.112, n.3, p. 551–559, 2009.

MENSOR, L.L; MENEZES, F.S; LEITÃO, G.G; REIS, A.S; DOS SANTOS, T.C; COUBE, C.S; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother Research**, Inglaterra v.15, n.2, p. 127-130, 2001.

NASCIMENTO, R.J.; Capacidade antioxidante de resíduos e polpas de frutas. **Monografia**. 31p., 2007.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of chromatography A**, Amsterdam, v.1054, n.1-2, p.95-111, 2004.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; BARROS, M.P.; MANO, C.M.; GOULART, M.O.F. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry**, Washington, v.115, n.2, p. 469–475, 2009.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; DÍAZ-RUBIO, M.E.; SERRANO, J.; GONI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant, food, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, Toronto, v.41, n.3, p.274-285, 2008.

RE, R. PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

ROCKENBACH, I.I.; SILVA, G.L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E.M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifénóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedade Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28 (supl.), p. 238-244, 2008.

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, Washington, v. 92, n. 2, p.235-254, 2005.

SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F.; A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chicago, v. 76, p.270–276, 1998.

SILVA, J.D.A. Composição química e digestibilidade in situ de semente de goiaba (*Psidium guajava L.*). Recife, 1999, 34p. Dissertação (Mestrado em produção animal) UFRPE, 1999.

SOARES, M.; WELTER, L.; GONZAGA, L.; LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.3, p. 727-732, 2008a.

SOARES, M. WELTER, L.; KUSKOSKI, E.M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas niágara e isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 1, p. 59-64, 2008b.

SOONG, Y.Y.; BARLOW, P.J.; Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, Washington, v. 88, n. 3, p.411–417, 2004.

WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.47, n. 5, p.1801-1812, 1999.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Nas condições em que foram desenvolvidos os experimentos, os resultados obtidos permitem concluir que

- O processo de extração sequencial, utilizando solventes de diferentes polaridades e três ciclos de extração para cada solvente, possibilitou a extração de compostos fenólicos em quantidade variada. Os maiores teores de polifenóis totais foram extraídos com o uso de solvente hidroacetônico e hidrometanólico.
- O extrato hidroacetônico do resíduo agroindustrial de goiaba exibiu melhor ação antioxidante do que o hidrometanólico, demonstrando expressivo potencial anti-radical, uma vez que apresentou eficiência na captura dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, relevante ação antioxidante em meio lipídico, além de sinergismo com o BHT.
- Frente ao potencial antioxidante exibido pelo extrato hidroacetônico, o resíduo agroindustrial de goiaba pode ser apontado como uma fonte alternativa de antioxidante natural. Entretanto, para ser empregado como inibidor da oxidação lipídica em alimentos sua ação antioxidante deve ser testada em outras condições experimentais, além da necessidade de desenvolver estudo econômico e toxicológico.