



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

DAIANE MARTINS SCHMELING

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,
HIPOLIPIDEMIANTE, HIPOGLICEMIANTE E
ANTIOBESIDADE DE EXTRATOS DE CASCA DE NOZ-
PECÃ [*CARYA ILLINOINENSIS* (WANGENH) C. KOCH]**

**FLORIANÓPOLIS
2015**

Daiane Martins Schmeling

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,
HIPOLIPIDEMIANTE, HIPOGLICEMIANTE E
ANTILOBESIDADE DE EXTRATOS DE CASCA DE NOZ-
PECÁ [*CARYA ILLINOINENSIS (WANGENH) C. KOCH*]**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Jane Mara Block

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Schmeling, Daiane Martins

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, HIPOLIPIDEMIANTE,
HIPOGLICEMIANTE E ANTIPOBESIDADE DE EXTRATOS DE CASCA DE
NOZ-PECÃ [*CARYA ILLINOINENSIS (WANGENH) C. KOCH*] / Daiane Martins
Schmeling ; orientadora, Jane Mara Block – Florianópolis, SC, 2015

118 p.

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de
Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Inclui referência

1. Ciência dos Alimentos. 2. casca de noz-pecã. 3. atividade antioxidante. 4.
dislipidemias. I. Block, Jane Mara. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,
HIPOLIPIDEMIANTE, HIPOGLICEMIANTE E
ANTIOBESIDADE DE EXTRATOS DE CASCA DE NOZ-
PECÃ [*CARYA ILLINOINENSIS (WANGENH) C. KOCH*]**

Por

Daiane Martins Schmeling

Dissertação aprovada como requisito final para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela Comissão formada por:

Presidente: _____
Prof^ª Dr^a Jane Mara Block (UFSC)

Membro: _____
Prof^ª Dr^a Maria Cláudia Santos da Silva - Departamento de Análises Clínicas (UFSC)

Membro: _____
Prof^ª Dr^a Rozangela Curi Pedrosa - Departamento de Bioquímica (UFSC)

Membro: _____
Prof^ª Dr^a Edna Regina Amante - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFSC)

Coordenador: _____
Prof^ª Dr^a Roseane Fett - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFSC)

Florianópolis, 2015.

*Dedico este trabalho
ao meu Deus e Senhor por ter concedido o desejo do meu coração e
ser meu sustento em cada dia,
a minha mãe, Mariana, por ter sido instrumento para me trazer a
vida,
e a minha amiga, Josiane, por ser exemplo de cumplicidade e de
trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus e Senhor por seu imensurável amor, por todas as oportunidades que tem me concedido em cada dia e por sua companhia me guiando e orientando conforme seus planos e propósitos.

À minha família pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos independentes da situação.

Ao meu querido Ira por me apoiar e incentivar, por todos os dias que podemos compartilhar e por sua compreensão durante este mestrado.

Aos mais que amigos que conquistei e me conquistaram, principalmente a você Josi pelo exemplo de ser humano que és e toda a dedicação em me ajudar e por muitas vezes até me acolher, mais que irmã, amiga sem palavras para agradecer por tudo que fizesse por mim, estará nas minhas orações. A minha querida Veronica pela incansável dedicação em cuidar de mim como uma filha com esse amor do Pai e inúmeras orações pronunciadas antes mesmo de eu entrar neste departamento. As maninhas Ju e Letícia, amigas desde Pelotas, meninas obrigada pelo apoio, colaboração e carinho. As “nozes” do Laboratório de Óleos e Gorduras pelo incentivo e amizade. E, não menos importante, as queridas Lu, Val, Nath e Nadia pela confiança, ajuda e aprendizados no Labioex.

À minha orientadora prof^a Jane pela oportunidade concedida, confiança, paciência e compreensão.

A prof^a Rozangela por ter me acolhido no Labioex e sua equipe de alunos e colaboradores por ter concedido a oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao prof^o Pedro por disponibilizar de seu laboratório para finalização de obtenção dos extratos.

Aos colegas do departamento de Ciências de Alimentos pelos conhecimentos compartilhados e colaboração.

Ao secretário do departamento Sergio pela ajuda, orientações burocráticas e pelas conversas de incentivo.

A todos os professores e demais colaboradores do programa de Pós-Graduação pela colaboração na realização e conclusão deste trabalho.

À Indústria de Nozes Divinut Ltda, pelo fornecimento das amostras.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

Os compostos fenólicos presentes em alimentos e em subprodutos do processamento de alimentos têm recebido uma atenção significativa na literatura, devido às suas propriedades antioxidantes intrínsecas. No sul do Brasil, cascas de noz-pecã [*Carya illinoensis* (WANGENH) C. Koch] têm sido tradicionalmente utilizadas para a preparação de chá, que apresenta propriedades benéficas para a saúde humana, incluindo a redução dos níveis de colesterol e glicose, a prevenção de distúrbios gastrointestinais e redução de peso, entre outros efeitos. Neste estudo, foram obtidos extratos aquoso e hidroalcoólico de cascas de noz-pecã e caracterizados por teor de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu), taninos condensados, capacidade antioxidante (ABTS e DPPH) e potencial de inibição da peroxidação lipídica (TBARS). O efeito da administração dos extratos sobre a absorção de triglicerídeos, colesterol total plasmático, diminuição de atividade de lipídica, atividades hipoglicêmica e anti-obesidade foram determinados em camundongos BALB/c. Além disso, foi avaliado o efeito dos extratos sobre o sistema de defesa antioxidante endógena dos camundongos. Os extratos aquoso e hidroalcoólico mostraram níveis elevados de compostos fenólicos (465,0 e 688,1 mg GAE/g), taninos condensados (2351,6 e 2795,8 mg CE/g), atividade antioxidante de 80 e 85 % (DPPH) e 88 % e até 96 % (ABTS), respectivamente. Os extratos reduziram a lipoperoxidação *in vivo* em homogenatos de fígado (taxa de inibição de até 59 %), sendo eficazes na inibição da absorção do colesterol total (49,9 % e 32,2 % para os extratos aquoso e hidroalcoólico, respectivamente) e de triglicerídeos (46 % e 51 % dos extratos aquoso e hidroalcoólico, respectivamente). Os níveis de glicose no sangue foram modificados nos animais tratados com os extratos (em torno de 60 % de redução), o que também impediu o ganho de peso induzido pela dieta hipercalórica (9,25 % e 11,25 % em comparação com o grupo de controle negativo e Lovastatina, respectivamente). Os extratos apresentaram atividade antioxidante sobre as condições de estresse oxidativo e foram capazes de modular o sistema de defesa antioxidante endógeno.

Palavras chaves: Compostos fenólicos, casca de noz-pecã, atividade antioxidante, dislipidemias, glicemia, obesidade.

ABSTRACT

Phenolic compounds present in foods and in by-products from food processing have received significant attention in literature due to their intrinsic antioxidant properties. In southern Brazil, pecan nut [*Carya illinoensis* (WANGENH) C. Koch] shells have traditionally been used for the preparation of tea drinks, which exhibits beneficial properties to human health, including the lowering of the cholesterol and glucose levels, the prevention of stomach and intestinal disorders and weight reduction, among others effects. In this study we determined the aqueous and hydroalcoholic extracts of pecan nut shells and characterized them by total phenolic content (Folin-Ciocalteu), condensed tannins, antioxidant capacity (ABTS and DPPH) and potential for inhibition of lipid peroxidation (TBARS). The effect of administration of the extracts on the absorption of triglycerides, total serum cholesterol, lipid lowering activity, hypoglycemic and anti-obesity activities was determined in BALB/c mice. In addition, the effect of the extracts on the endogenous antioxidant defense system of the mices was evaluated. The aqueous and hydroalcoholic extracts showed high levels of phenolic compounds (465.0 and 688.1 mg GAE/g), condensed tannins (2351.6 and 2795.8 mg CE/g), antioxidant activity of 80 % and 85 % (DPPH) and, 88 and to 96 % (ABTS), respectively. The extracts reduced *in vivo* TBARS in mice liver (inhibition ratios of up to 59 %) and also were effective in the inhibition of the absorption of total cholesterol (49.9 % and 32.2 % for aqueous and hydroalcoholic extracts, respectively) and triglycerides (46 % and 51 % for aqueous and hydroalcoholic extracts, respectively). The a blood glucose level was modified in the animals treated with the extracts (about 60 % of reduction), which also prevented weight gain induced by the high calorie diet (9,25 % e 11,25 % compared to the negative control group and Lovastatina, respectively). The extracts showed antioxidant activity on the conditions of oxidative stress and were able to modulate the endogenous antioxidant defense system.

Keywords: Phenolic compounds, pecan nut shell, antioxidant activity, dyslipidemia, glycemia, obesity.

LISTA DE FÍGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: Reações de oxidação lipídica.....	27
Figura 2. Mecanismo de ação dos antioxidantes primários	36
Figura 3. Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos	38
Figura 4. Molécula de tocoferóis.....	39
Figura 5. Estrutura química dos ácidos benzoicos	41
Figura 6. Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos	41
Figura 7. Estrutura química das cumarinas	41
Figura 8. Estrutura química do núcleo flavânico	42
Figura 9. Estrutura química do ácido elágico e do ácido gálico	43
Figura 10. Estrutura química das procianidinas	43
Figura 11. Fluxograma do beneficiamento da Noz Pecã:	46
Figura 12. Radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico ..	51
Figura 13. Fórmula estrutural do Trolox (6-hidroxil-2,5,7,8 tetrametilcroman-2 ácido carboxílico) [Fonte: Cachichi, 2002].....	51
Figura 14: Exemplo de mudança de cor do radical DPPH após reagir com antioxidante. Adaptado de Pereira (2010).....	53
Figura 15: Representação da reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com o malonaldeído (MDA).....	54

CAPÍTULO 2

Figura 1.2: Efeito dos extratos da casca de <i>Carya illinoensis</i> (10mg/kg) sobre os níveis plasmáticos de triglicerídeos após 3, 6 e 9 horas de tratamento.....	80
Figura 2.2: Efeito dos extratos da casca de <i>Carya illinoensis</i> (10mg/kg) sobre os níveis plasmáticos de colesterol total	81
Figura 3.2: Efeito dos extratos da casca de <i>Carya illinoensis</i> (10mg/kg) sobre os níveis plasmáticos de triglicerídeos após 30 dias de tratamento	82
Figura 4.2: Efeito dos extratos da casca de <i>Carya illinoensis</i> (10mg/kg) sobre os níveis plasmáticos de colesterol total após 30 dias de tratamento.....	84
Figura 5.2: Efeito dos extratos da casca de <i>Carya illinoensis</i> (10mg/kg) sobre os níveis plasmáticos de glicose após 30 dias de tratamento	85
Figura 6.2: Efeito antiobesidade dos extratos da casca de <i>Carya illinoensis</i> (10mg/kg) após 30 dias de tratamento	86

CAPÍTULO 3

Figura 1.3: Inibição da peroxidação lipídica nos animais tratados com os extratos de casca de <i>Carya illinoensis</i>	103
Figura 2.3: Determinação do conteúdo de glutathiona reduzida nos animais tratados com os extratos de cascas de <i>Carya illinoensis</i>	104
Figura 3.3: Perfil da atividade da enzima SOD nos animais tratados com os extratos da casca de <i>Carya illinoensis</i>	105
Figura 4.3: Perfil da atividade da enzima CAT nos animais tratados com os extratos da casca de <i>Carya illinoensis</i>	106
Figura 5.3: Perfil da atividade da enzima GPx nos animais tratados com os extratos da casca de <i>Carya illinoensis</i>	107
Figura 6.3: Perfil da atividade da enzima GR nos animais tratados com os extratos da casca de <i>Carya illinoensis</i>	108
Figura 7.3: Perfil da atividade da enzima GST nos animais tratados com os extratos da casca de <i>Carya illinoensis</i>	109

SUMÁRIO

1.	Introdução	21
2.	Objetivos	23
2.1	Objetivo geral	23
2.2	Objetivos específicos	23
CAPÍTULO 1		25
1.	Revisão Bibliográfica	27
1.1.	Oxidação lipídica em alimentos	27
1.2.	Oxidação e Estresse Oxidativo <i>in vivo</i>	28
1.3.	Doenças relacionadas ao processo oxidativo	30
1.3.1	Dislipidemias	30
1.3.2	Obesidade.....	31
1.3.3	Diabetes	32
1.4.	Determinação de marcadores e de defesas antioxidantes.....	32
1.5.	Antioxidantes	34
1.5.1	Compostos Fenólicos de Fontes Vegetais	40
1.6.	Noz-pecã	45
1.6.1	Características, produção e beneficiamento	45
1.6.2	Casca da noz-pecã	47
1.7.	Extração de antioxidantes naturais com a energia de ultrassom.....	48
1.8.	Métodos para determinação da atividade antioxidante de matérias-primas vegetais	50
1.8.1.	Captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfônico) (ABTS●+)	50
1.8.2.	Atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)	52
1.8.3.	Potencial de inibição da peroxidação lipídica <i>in vitro</i> – TBARS	53
2.	Referências Bibliográficas	54
CAPÍTULO 2		67
Extratos da casca de noz pecã [<i>Carya illinoensis</i> (Wangenh) C. Koch] apresentam efeitos hipolipidemiante, hipoglicemiante e antiobesidade em camundongos Balb-C isogênicos		
1.	Introdução.....	69
2.	Materiais e Métodos.....	71
2.1	Obtenção do pó e dos extratos da casca de <i>Carya illinoensis</i>	71
2.2	Determinação de compostos fenólicos totais dos extratos de casca de <i>Carya illinoensis</i>	71

2.3	Ensaio <i>in vivo</i>	75
2.3.1	Reagentes	75
2.3.2	Dieta	75
2.3.3	Animais	75
2.3.4	Ensaio Agudos	76
2.3.4.1	Inibição da absorção de Triglicerídeos	76
2.3.4.2	Inibição da absorção de Colesterol Total	76
2.3.5	Ensaio Crônicos	77
2.3.5.1	Atividades hipolipidemiante e hipoglicêmica	77
2.3.5.2	Atividade antiobesidade	77
2.4	Análise Estatística.....	78
3.	Resultados	78
3.1	Caracterização dos extratos da casca de <i>Carya illinoensis</i>	78
3.2.	Ensaio <i>in vivo</i>	79
3.2.1	Redução das concentrações plasmáticas de triglicerídeos.....	79
3.2.2	Redução das concentrações plasmáticas de colesterol total.....	80
3.2.3	Redução das concentrações plasmáticas de triglicerídeos.....	81
3.2.4	Redução das concentrações plasmáticas de colesterol total.....	82
3.2.5	Redução das concentrações plasmáticas de glicose.....	84
3.2.6	Determinação do Efeito Antiobesidade	86
4.	Discussão.....	87
5.	Conclusão.....	89
6.	Agradecimentos	89
7.	Referências Bibliográficas	90

CAPÍTULO 395

O papel de extratos de casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] sobre o estresse oxidativo induzido por dieta hipercalórica em camundongos Balb-C isogênicos

1.	Introdução.....	96
2.	Materiais e Métodos.....	97
2.1	Obtenção do pó e dos extratos da casca de <i>Carya illinoensis</i>	97
2.2	Determinação de compostos fenólicos totais dos extratos de casca de <i>Carya illinoensis</i>	98
2.3	Ensaio <i>in vivo</i>	98
2.3.1	Animais	98
2.3.2	Dieta.....	98
2.3.3	Submissão dos animais ao estresse oxidativo crônico	99
2.3.4	Preparo dos homogenatos de fígado	99
2.3.5	Análise dos marcadores de estresse e defesas antioxidantes	100

2.3.5.1	Avaliação da lipoperoxidação	100
2.3.5.2	Determinação do conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) ...	100
2.3.5.3	Avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD)	100
2.3.5.4	Avaliação da atividade da enzima catalase (CAT).....	101
2.3.5.5	Avaliação da atividade da Glutathiona peroxidase (GPx)	101
2.3.5.6	Avaliação da atividade da Glutathiona redutase (GR)	101
2.3.5.7	Avaliação da atividade da Glutathiona S-transferase (GST) ..	102
2.4	Análise estatística.....	102
3.	Resultados	102
3.1	Determinação de Compostos fenólicos totais	102
3.2	Análises dos marcadores de estresse e defesas antioxidantes	102
3.2.1	Avaliação da lipoperoxidação	102
3.2.2	Determinação do conteúdo de glutathiona reduzida (GSH)	103
3.2.3	Avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD)	104
3.2.4	Avaliação da atividade da catalase (CAT)	105
3.2.5	Avaliação da atividade da Glutathiona peroxidase (GPx)	106
3.2.6	Avaliação da atividade da Glutathiona redutase (GR)	107
3.2.7	Avaliação da atividade da Glutathiona S-transferase (GST) ..	108
4.	Discussão	109
5.	Conclusão.....	112
6.	Agradecimentos	112
7.	Referências Bibliográficas	113

1. Introdução

A sociedade moderna e tecnológica tem modificado seus padrões comportamentais com reflexos imediatos nos hábitos de vida e, por consequência, nos padrões nutricionais e terapêuticos do homem ocidental. Com isso distúrbios metabólicos como a obesidade e suas comorbidades estão se tornando problemas de saúde pública.

Por outro lado, a busca e o aumento do consumo de alimentos naturais de elevada qualidade nutricional estimula a produção e as pesquisas relacionadas a alimentos e plantas medicinais que possuam compostos com efeitos benéficos à saúde. Essas investigações envolvem pesquisas multidisciplinares que buscam elucidar os mecanismos de ação, além de caracterizar substâncias capazes de atuarem contra inúmeras doenças, o que possibilita a descoberta de compostos bioativos e até o desenvolvimento de novos fármacos (BALUNAS; KINGHORN, 2005; TRIGGLE, 2007; LAM, 2007).

Entre os compostos bioativos muito estudados em função da atividade antioxidante comprovada estão os compostos fenólicos. O consumo destas substâncias, presentes na maioria das frutas e vegetais, tem sido associado à potencialização de efeitos promotores da saúde humana através da prevenção e tratamento de várias doenças como a inibição da oxidação do LDL colesterol e consequente redução do colesterol total plasmático. Além disso, ação anti-inflamatória, antiplaquetária e efeitos antialérgicos têm sido reportados na literatura (VILLARREAL-LOZOYA et al., 2007; CREWS et al., 2005; KOO; SUHAILA, 2001).

A noz pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] apresenta teores elevados de compostos fenólicos e de taninos condensados, principalmente nas cascas, que são um resíduo do processamento (WORLEY, 1994). No sul do Brasil as cascas são comercializadas em pedaços ou trituradas para o preparo de chá, onde são atribuídos ao seu consumo diversos benefícios à saúde como proteção contra o câncer, hipercolesterolemia, diabetes, artrites e obesidade, entre outros.

Efeitos antioxidantes de extratos de casca de noz pecã já foram observados tanto em sistemas *in vitro* (PRADO et al., 2014; RIBEIRO, 2014) e *in vivo* (ABDALLAH et al., 2011; MÜLLER et al., 2013). Desta forma, é possível que o extrato da casca de noz pecã também possa ser uma fonte alternativa para ingestão de antioxidantes naturais, conferindo maior proteção antioxidante aos sistemas biológicos.

Sabe-se que o sistema de defesa antioxidante biológico é constituído de um arranjo de diversos componentes lipossolúveis

(vitamina E, carotenoides), hidrossolúveis (ácido ascórbico, glutationa) e enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, glutationa peroxidase, glutationa s-transferase, glutationa redutase) que podem ter origem no próprio organismo ou adquiridas através da dieta (SILVA et al., 2010). Em condições normais suas propriedades são suficientes para suprir os radicais livres gerados, sob a forma de espécies reativas de oxigênio (ERO).

No entanto, há situações em que o equilíbrio entre a produção de ERO e as defesas antioxidantes pode ser destruído devido uma produção excessiva dessas espécies, ou porque existe um déficit nas defesas antioxidante da célula. Este desequilíbrio denomina-se de estresse oxidativo. Nessas situações, as ERO em excesso podem oxidar e danificar lipídeos, proteínas e DNA, levando à modificação e inibição da função normal desses componentes. Este estresse está associado como causa de muitas doenças incluindo dislipidemias, diabetes, obesidade, entre outras.

Sabe-se que a obesidade é um problema de saúde pública e uma doença multifatorial complexa caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo em relação à massa magra tecidual. O excesso de tecido adiposo, por sua vez está associado à resistência à insulina, hiperglicemia, hipertensão arterial sistêmica e dislipidemias. Quadros de obesidade, resistência à insulina e dislipidemia apresentam diminuição dos mecanismos de defesa antioxidante e a instalação do estresse oxidativo em função da elevação das ERO que causam a oxidação de componentes da membrana celular.

Portanto, o consumo de extratos da casca de noz pecã, pode constituir um mecanismo preventivo ou terapêutico para esses processos patológicos que envolvem oxidação como mecanismo de desenvolvimento ou consequência da doença.

2. Objetivo

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antioxidante, hipolipidemiante, hipoglicemiante e antiobesidade de extratos da casca de noz pecã [*Carya Illinoensis* (Wangenh) C. Koch] em camundongos Balb/C isogênicos.

2.2 Objetivos específicos

•
Obter extratos aquoso e hidroalcolólico da casca de *Carya Illinoensis* através do método de infusão assistida por ultrassom.

- Quantificar nos extratos obtidos os compostos fenólicos totais e taninos condensados por espectrofotometria no UV.
- Determinar atividade antioxidante pelos ensaios ABTS e DPPH e potencial de inibição de peroxidação lipídica *in vitro* pelo ensaio TBARS dos extratos obtidos.
- Avaliar os efeitos agudos de inibição da absorção de triglicerídeos e colesterol total plasmáticos dos extratos suplementados em camundongos Balb/c isogênicos.
- Determinar a atividade hipolipidemiante, hipoglicemiante e antiobesidade dos extratos suplementados em camundongos Balb/c isogênicos alimentados com dieta hipercalórica.
- Determinar o efeito dos extratos sobre o sistema de defesa antioxidante endógeno de camundongos Balb/c isogênicos alimentados com dietas normal e hipercalórica.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIGRÁFICA

1. Revisão Bibliográfica

1.1 Oxidação lipídica em alimentos

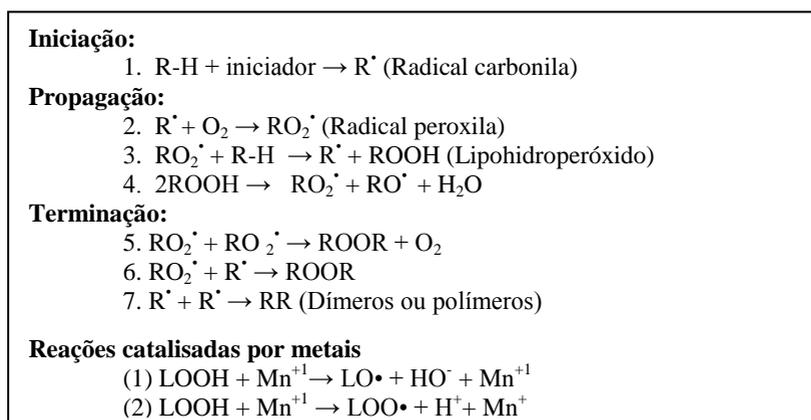
A fração lipídica dos alimentos está relacionada a diversas propriedades sensoriais, como aroma, coloração, textura, suculência, estabilidade das proteínas, vida de prateleira e conteúdo calórico (ALLEN; FOEGEDING, 1981).

Durante o processamento e o armazenamento de alimentos que contém lipídeos em sua constituição, o principal mecanismo de deterioração é a oxidação lipídica (TABEE et al., 2008). A oxidação dos constituintes lipídicos implica em alterações na qualidade dos alimentos que podem ser percebidas pelas mudanças nas características sensoriais, no valor nutricional e pela produção de compostos potencialmente tóxicos.

Os processos de oxidação lipídica envolvem a reação de ácidos graxos insaturados com agentes sensibilizadores, podem ocorrer por oxidação enzimática, fotoxidação e/ou autooxidação (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2009). Portanto, a estabilidade de determinado alimento fonte de lipídios depende da proporção de ácidos graxos saturados e insaturados (TIRITAN; BEUX, 2006).

Considera-se então, a oxidação como um fenômeno químico complexo, envolvendo reações radicalares capazes de auto propagação, e que dependem do tipo de ação catalítica (temperatura, íons metálicos, radicais livres e pH). No decurso da reação, ela é classicamente dividida em três fases: iniciação, propagação e terminação, (Figura 1) (BORGES et al., 1999).

Figura 1: Reações de oxidação lipídica



A fase que corresponde às reações de iniciação da oxidação de lipídeos pode ser promovida por dois grupos de fatores, (1) pelo impacto ou absorção de energia ou (2) por reações redox (SLATER et al., 1987). Portanto, o início do processo de oxidação lipídica decorre da interação de um iniciador reagindo com o ácido graxo insaturado. Acontece a retirada de um átomo de hidrogênio do carbono metilênico adjacente à ligação dupla *cis* do ácido graxo insaturado, resultando na formação de radicais alílicos (SEVANI; HOCHSTEIN, 1985; KANNER, 1994).

A reação continua na etapa de propagação que leva à formação de diversos peróxidos, que podem ser mensurados, servindo como índice da oxidação lipídica (GRAY, 1978; WANG et al., 1995; HALLIWELL; CHIRICO, 1993).

Íons de metais de transição, como Fe^{n+} e Cu^{n+} , podem participar do processo catalisando a formação de radicais lipídicos alcóxila, peróxila e hidroxila a partir dos hidroperóxidos (GARDNER, 1989; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

As reações oxidativas continuam a ocorrer até a fase de terminação. Com o esgotamento dos substratos, as reações vão cessando e inicia-se a formação dos produtos finais estáveis ou não reativos (KUBOW, 1992; SEVANI; HOCHSTEIN, 1985).

Para que a oxidação ocorra nem todas as formas do oxigênio são promotoras da oxidação lipídica. Deste modo, a reação de adição de um elétron ao oxigênio molecular (O_2) leva à formação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (considerado instável por possuir número ímpar de elétrons na última camada). O ânion superóxido é considerado uma espécie relativamente pouco reativa, e ainda que tenha baixa afinidade por biomoléculas, ele dá origem a radicais de elevado potencial pró-oxidante (DUTHIE, 1993; HALLIWELL, 1994; KANNER, 1994; FERRARI, 1998).

Para controlar a oxidação lipídica, diversos antioxidantes, tanto sintéticos quanto naturais (extratos naturais ricos em tocoferóis, outros extratos de vegetais e especiarias ricos em carotenoides) têm sido empregados em alimentos (PEARSON et al., 1977; LADIKOS; LOUGOVOIS, 1990; DONNELLY; ROBINSON, 1995; GRAY et al., 1996).

1.2 Oxidação e Estresse Oxidativo *in vivo*

Os lipídeos no organismo fazem parte da fração fosfolipídica, que constituem as membranas celulares e organelas e da fração triglicéridica, que é constituída dos lipídeos neutros, presentes em adipócitos ou no

interior de células musculares representando uma fonte de reserva energética (ALLEN; FOEGEDING, 1981).

Durante o metabolismo normal, ocorre oxidação de componentes. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com adição de quatro elétrons, resultando na formação de água (H_2O). Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}), hidroxila (OH^{\cdot}), e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria, e a reatividade das espécies reativas de oxigênio (ERO) é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons (COHEN, 1989).

A oxidação de componentes como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídios, principalmente ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) são, portanto, mediadas por espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), conhecidas genericamente como radicais livres (RL) que alteram a permeabilidade, fluidez e integridade das membranas (MAHATTANATAWEE et al., 2006; STAHL et al., 2001).

Uma vez produzidas, as ERO são majoritariamente removidas pelas defesas antioxidantes da célula, sendo a manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo (VALKO et al., 2007).

As defesas antioxidantes produzidas pelo organismo podem ser enzimáticas ou não enzimáticas. Exemplo destas defesas são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutaciona peroxidase (GPx), a glutaciona redutase (GR), entre outras. Entre as defesas antioxidantes não enzimáticas destacam-se compostos como a glutaciona (GSH) o α -tocoferol (vit. E), o ácido ascórbico (vit. C), o ácido lipóico, os carotenoides, os flavonóides, entre outros (VALKO et al., 2007).

O desequilíbrio entre o sistema de defesas antioxidantes e a geração das ERO é denominado de estresse oxidativo e apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (BONNES; GUÉRIN, 1992; BARREIROS; DAVID, 2006).

Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Esses danos celulares encontram-se aumentados, por exemplo, nos indivíduos obesos, e predispõem às comorbidades, como hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, eventos tromboembólicos, diabetes mellitus, além de neoplasias (GILLER; SINGLER, 1995; ROMERO et al., 1998; CARNEIRO et al., 2003; FERREIRA et al., 2007; ALVES et al., 2011; ZHANG et al., 2011).

1.3 Doenças relacionadas ao processo oxidativo

1.3.1 Dislipidemias

As dislipidemias são consideradas alterações metabólicas decorrentes de distúrbios no metabolismo lipídico, que ocasionam alterações nos valores plasmáticos das lipoproteínas, tanto no metabolismo do colesterol quanto dos triglicerídeos (SBC, 2007).

De acordo com a etiologia, as dislipidemias podem ser classificadas em primárias e secundárias, sendo as primárias resultantes de causas genéticas, dentre as quais se destacam a hipercolesterolemia familiar, a hiperlipidemia familiar combinada (manifesta-se pelo aumento das concentrações plasmáticas de colesterol total (CT) e triglicérida (TG), nem sempre simultaneamente e hipercolesterolemia poligênica (forma mais comum, com envolvimento de genes distintos, os quais promovem aumento das concentrações de lipoproteína de baixa densidade - LDL). As dislipidemias secundárias são aquelas relacionadas às doenças como diabetes mellitus tipo 2, hipotireoidismo, insuficiência renal crônica, hepatopatias coleostáticas crônicas, obesidade, ou aos efeitos de medicamentos ou ainda devido a hábitos de vida inadequados (tabagismo, etilismo, sedentarismo, alimentação desbalanceada) (SBC, 2007).

A dieta é um dos fatores preponderantes ao desenvolvimento de dislipidemias, o que é demonstrado por vários estudos, onde a alta ingestão de ácidos graxos saturados e de colesterol, assim como de ácidos graxos isômeros trans, está associada às dislipidemias e doenças cardiovasculares (DCV) (CASTRO et al., 2004; CERVATO; VIEIRA, 2003; DEBOER et al., 2003; NICKLAS et al., 2002; TWISK et al., 1996). Segundo Rimm et al. (1998), a redução da ingestão de vitaminas e minerais, associada à dieta rica em alimentos industrializados e gorduras, também pode aumentar o risco de aparecimento de DCV.

Sendo o contrário verdadeiro, a adequação de uma dieta moderada em gordura (em torno de 25 % do total de recomendação energética diária) está associada a concentrações plasmáticas diminuídas

de colesterol e menor incidência de DCV (SCHAEFER, 2002). Porém, mais importante do que a quantidade total de gordura ingerida é a qualidade deste nutriente, a simples substituição de gordura saturada por insaturada reduz a concentração plasmática de CT e LDL (DEWAILLY, et al., 2001; DJOUSSÉ et al., 2001; SCHAEFER, 2002). Além desses nutrientes, o tratamento ou prevenção das dislipidemias pode envolver o uso de outros componentes alimentares, como fitoesteróis, ácido linolênico, compostos fenólicos, e outros (BROWN et al., 1999; DAVY et al., 2002; SBC, 2007).

1.3.2 Obesidade

A obesidade é uma doença que se caracteriza pelo acúmulo excessivo de gordura corporal. É um grave problema de saúde pública nos países desenvolvidos, e um crescente problema nos países em desenvolvimento (REXRODE et al., 1997; MARTORELL et al., 1998; WHO, 2000). O determinante imediato para o desenvolvimento da obesidade é a alta ingestão energética associada ao sedentarismo (REXRODE et al., 1997).

Ela está associada a um quadro de inflamação crônica de baixo grau, que predispõe à resistência à insulina e ao desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2, o que implica aumento do risco para DCV, sendo que a gravidade desta doença pode ser medida por complicações com associação a diversas doenças e agravos à saúde (KENNEDY et al., 2009).

Estudos verificaram que a obesidade está diretamente relacionada a alterações nas funções endócrinas e metabólicas do tecido adiposo, sendo que em indivíduos obesos, esse tecido aumenta a capacidade de síntese de moléculas com ação pró-inflamatórias (BULLO et al., 2007; SHAH; MEHTA; REILLY, 2008).

O tratamento da obesidade é benéfico na medida em que a perda de peso reduz o risco de mortalidade e morbidade. Ainda que a perda de peso moderada, 5 a 10 % do peso inicial, já leva a efeitos benéficos para a saúde (GOLDESTEIN, 1992; VAN GAAL, 1997).

Dentre os tratamentos mais comuns para a redução da obesidade e suas comorbidades, verifica-se que a modulação da dieta com introdução de alimentos considerados funcionais está crescendo a cada dia (GOLDESTEIN, 1992; VAN GAAL, 1997).

1.3.3 Diabetes

Diabetes é uma desordem metabólica caracterizada pelo aumento de glicemia (hiperglicemia), decorrente da falta de insulina ou incapacidade desta exercer adequadamente seus efeitos nos tecidos-alvos, e, cronicamente está associada à disfunção e falência de vários órgãos, especialmente dos olhos, rins, coração e vasos sanguíneos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006). Globalmente, a sua prevalência tende a aumentar, devido ao envelhecimento e a mudanças socioeconômicas (KING *et al.*, 1998).

Para conviver com a doença há necessidade de um controle rigoroso da glicemia, uma vez que ainda não existe cura. O tratamento convencional, antes do advento da insulina exógena e hipoglicemiantes orais, ocorria a base de plantas medicinais para o controle do diabetes, pois são importantes fontes de substâncias potencialmente terapêuticas (GRAY; FLATT, 1999).

Estudos esclarecem que existem vias e enzimas específicas que podem ser moduladas, como a via poliol e a enzima aldose redutase, podendo reduzir os danos causados pelo diabetes descompensado (LEE, 2002). No contexto da expansão mundial da diabetes, uma intensa procura de novos compostos com potencial anti-diabético é necessário. Flavonoides como compostos fenólicos não só inibem a via do poliol, mas também estão envolvidos na prevenção da superprodução de superóxido e nos processos de quelação de íons metálicos (FUENTE; MANZANARO, 2003).

1.4 Determinação de defesas antioxidantes

Os processos oxidativos podem ser evitados por meio da modificação das condições ambientais ou pela utilização de mecanismos antioxidantes com propriedades de impedir ou diminuir o desencadeamento das reações oxidativas e, assim, reduzir a indução de danos (SIES, 1993; SEIFRIED, 2007).

Os principais meios de defesa antioxidantes no organismo podem ser divididos em dois grupos (1) enzimáticos, tais como, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e, glutathione redutase (GR); e (2) não enzimáticos, micromoléculas, que podem ter origem no próprio organismo ou são adquiridas através da dieta, tais como, β -caroteno, selênio, α -tocoferol, compostos fenólicos, vitamina C e glutathione (YU, 1994; COULTER; FEHILY; STRAIN, 1999).

O sistema antioxidante enzimático constitui a primeira linha de defesa endógena ao ataque de ERO. As enzimas antioxidantes impedem a formação de ERO ou evitam sua interação com alvos celulares, bloqueando, portanto, a etapa de iniciação da cadeia radicalar (ROVER; HÖEHR; VELLASCO, 2001).

A enzima SOD catalisa a destruição do radical ânion superóxido $O_2^{\cdot-}$, convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Existem duas formas de SOD no organismo, a primeira contém Cu^{2+} e Zn^{2+} como centros redox e ocorre no citosol, sendo que sua atividade não é afetada pelo estresse oxidativo. Secundariamente, ocorre o Mn^{2+} como centro redox na mitocôndria e sua atividade aumenta com o estresse oxidativo (BABIOR; BRAZ, 1997).

A enzima catalase que atua na dismutação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água (BABIOR; BRAZ, 1997).

E a GSH em conjunto com duas enzimas GPx e GR. Esse sistema também catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, sendo que a glutatona opera em ciclos entre sua forma oxidada e sua forma reduzida. A GSH reduz o H_2O_2 a H_2O em presença de GPx, formando uma ligação dissulfeto e, em seguida, a GSH é regenerada pela GR (BABIOR; BRAZ, 1997).

A glutatona peroxidase (GPx), que controla os níveis de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos oriundos do ataque de espécies radicalares, possui uma característica importante, apresentando um resíduo de cisteína contendo selênio covalentemente ligado ao restante da enzima (ROVER JR et al., 2000). A deficiência de selênio no organismo apresenta uma diminuição na atividade desta enzima em sua forma reduzida, e tem sido associada com alterações no metabolismo celular. Neste sentido, o controle dos níveis de glutatona (GSH), substrato da enzima GPx, torna-se importante (ROVER JR et al., 2000).

A glutatona (GSH) é um tripeptídeo composto de aminoácidos não essenciais (glutamina, cisteína e glicina), sendo marcador da saúde celular e indicativa de lesão oxidante quando seus níveis apresentam-se baixos. Ela pode estar no organismo nas formas reduzida ou oxidada, atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (JORDÃO JR et al., 1998).

A atividade antioxidante de compostos ingeridos através da dieta podem favorecer as defesas antioxidantes endógenas ou agir em sinergismo com as mesmas. Os antioxidantes não enzimáticos provenientes da dieta podem, portanto, prevenir danos oxidativos por interação direta e indireta com as ERO, mantendo o equilíbrio dinâmico

entre a produção de oxidantes e a concentração de compostos antioxidantes minimizando os danos oxidativos no organismo (CHIDAMBARA; MURTHY; JAYAPRAKASHA; SINGH, 2002, SINGH et al., 2008, ALVES et al., 2010).

1.5 Antioxidantes

O retardo de reações de oxidação por determinados compostos foi inicialmente registrado por Berthollet, em 1797, e depois esclarecido por Davy, em 1817 (BAILEY, 1996). O atual conhecimento das propriedades de inúmeros produtos químicos para prevenir ou retardar a oxidação teve início com estudos clássicos de Moureu e Dufraise. Durante a I Guerra Mundial e pouco depois, estes pesquisadores testaram a atividade antioxidante de mais de 500 compostos. Esta pesquisa básica, combinada com a vasta importância da oxidação em praticamente todas as operações de manufatura, desencadeou uma busca por aditivos químicos a fim de controlar a oxidação, que ainda hoje está em curso (BAILEY, 1996).

Define-se os antioxidantes como compostos que, quando presentes em baixas concentrações comparados a do substrato oxidável (ácidos graxos poliinsaturados, proteínas, carboidratos ou DNA), podem retardar a reação de oxidação atuando nas etapas das reações em cadeia do processo oxidativo (ZHENG; WANG, 2001; FENNEMA, 1993).

Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), antioxidante é a substância que retarda o aparecimento de alterações oxidativas no alimento (SOUSA et al., 2007). Já para a FDA (*Food and Drug Administration*), antioxidantes são substâncias utilizadas para preservar alimentos através do retardamento da deterioração, rancidez e descoloração, decorrentes da autooxidação. Essas substâncias retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres, complexação de metais e redução de oxidantes (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Para que uma substância possa ser um antioxidante, ela precisa possuir uma estrutura química que lhe permita não apenas ligar radicais livres, mas também estabilizá-los para que os mesmos não possam propagar o processo oxidativo. Do ponto de vista químico, as estruturas fenólicas e polifenólicas são as mais adequadas para atuarem como antioxidantes, já que podem estabilizar um radical livre de oxigênio ou um ácido graxo doando um hidrogênio e estabilizando internamente o radical livre originado, formando um produto estável (VALENZUELA; NIETO, 2001).

Além dos sistemas antioxidantes nos alimentos sabe-se que para alcançar uma proteção eficiente, os tecidos dispõem de um sistema antioxidante integrado, que consiste em um arranjo de diversos componentes lipossolúveis (vitamina E, carotenoides), hidrossolúveis (ácido ascórbico, glutatona) e enzimáticos (glutatona peroxidase, superóxido dismutase, catalase) (SILVA et al., 2010).

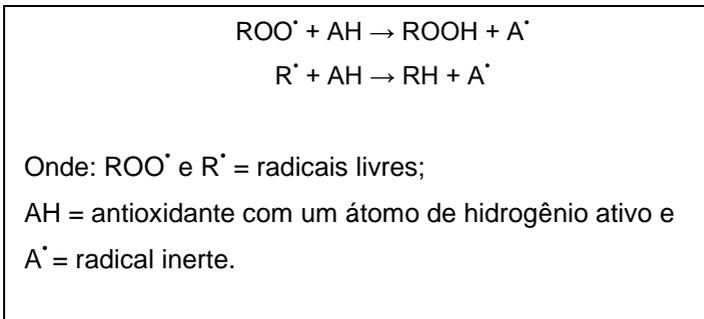
Em resumo, os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podem ser captados por outro antioxidante (ANDRADE et al., 2007).

No Brasil, o uso destes antioxidantes é controlado pelo Ministério da Saúde. Atualmente é permitido o uso dos antioxidantes: ácido ascórbico; ácido cítrico; ácido fosfórico; ácido nerdiidroguaiarético; butil-hidroxi-anisol (BHA); butil-hidroxi-tolueno (BHT); citrato de monoisopropila; lecitina; galato de propila (PG) ou de duodecila ou de octila; resina de guáiac; tocoferóis; etileno-diamino-tetracetato de cálcio e de sódio (EDTA); citrato de monoglicerídeo; e terc-butil-hidroquinona (TBHQ) (BAILEY, 2006). A legislação brasileira limita a aplicação de BHA e TBHQ em concentrações máximas de 200 mg/kg e de 100 mg/g para BHT (BRASIL, 2004).

As substâncias antioxidantes podem apresentar diferentes propriedades protetoras e agir em diversas etapas do processo oxidativo, funcionando por diferentes mecanismos de ação, sendo, classificadas em duas categorias principais: antioxidantes primários e antioxidantes secundários.

Os antioxidantes primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação de oxidação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia. Os átomos de hidrogênio doados pelos antioxidantes são abstraídos pelos radicais livres ($R\cdot$ e $ROO\cdot$) mais facilmente de que os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas. Estes radicais ($A\cdot$), estabilizados por ressonância, não têm a capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas e constituem-se espécies inativas para reação em cadeia (WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005).

Frankel (1980) apresentou o mecanismo de ação representado pela Figura 2:

Figura 2. Mecanismo de ação dos antioxidantes primários

Os principais antioxidantes primários e mais conhecidos deste grupo são os polifenóis BHA, BHT, TBHQ e PG, que são sintéticos, e os tocoferóis, que são naturais (NAMIKI, 1990). Estes últimos também podem ser classificados como antioxidantes biológicos (NAMIKI, 1990; BAILEY, 1996).

Os antioxidantes secundários atuam como sinergistas dos antioxidantes primários por atuarem como quelantes e/ou sequestrantes de metais, como removedores de oxigênio através de reações químicas estáveis que tornam as moléculas de oxigênio indisponíveis para atuarem como propagadores da autoxidação (WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005).

Além disso, esses antioxidantes podem atuar como agentes redutores, retardando o processo oxidativo, e ainda eles têm a capacidade de prover hidrogênios para os antioxidantes primários; decompor hidroperóxidos para espécies não radicalares; desativar o oxigênio singlete e absorver a radiação ultravioleta (WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005).

Como exemplos dos quelantes de metais, destacam-se os ácidos: cítrico; málico; succínico; tartárico; EDTA; e os fosfatos. Já os considerados exemplos de agentes redutores e removedores de oxigênio têm-se os ácidos ascórbicos e eritórbicos; o eritorbato de sódio; o palmitato de ascorbila e os sulfitos (WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005; MADHAVI; SALUNKHE, 1995; RAMALHO; JORGE, 2006).

Conforme Pereira (2010), os antioxidantes podem ser agrupados segundo os seus mecanismos de ação (Tabela 1).

Tabela 1. Mecanismos de ação dos antioxidantes.

Tipo de Antioxidantes	Mecanismos de Ação	Compostos
Antioxidantes	Inativam os radicais livres lipídicos	Compostos fenólicos
Estabilizadores de Hidroperóxidos	Previnem a decomposição de hidroperóxidos em radicais livres	Compostos fenólicos
Sinergistas	Promovem a atividade dos antioxidantes	Ácido cítrico, ácido ascórbico
Inativadores metálicos	Ligam metais pesados tornando-os inativos	Ácido fosfórico, compostos de Maillard, ácido cítrico
Desativadores de oxigênio singlete	Transformam o oxigênio singlete em oxigênio triplete	Carotenoides
Substâncias que reduzem hidroperóxido	Reduzem hidroperóxidos por vias não radicais	Proteínas e aminoácidos

Adaptado de Pereira (2010).

Quanto às fontes, os antioxidantes estão naturalmente presentes nos alimentos, podem ser adicionados ou formados durante o processamento. Quando adicionados em alimentos devem ser razoáveis no preço, compatíveis com o alimento, estáveis nas condições de processamento e armazenamento, efetivos em baixas concentrações, seguros, permitidos pela legislação e não devem alterar características como sabor, odor, cor e textura. A ação dos antioxidantes nos alimentos depende, entre outros fatores, da concentração, polaridade e presença de outros antioxidantes (RAFECAS et al., 1998; WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005; CHOE; MIN, 2009).

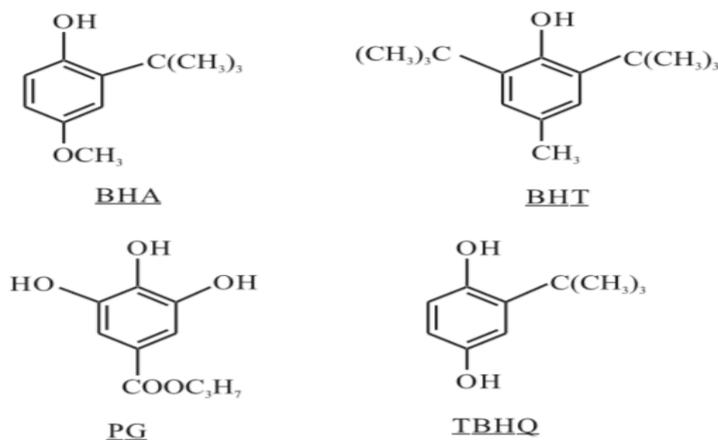
As moléculas típicas de antioxidantes são derivadas das formas isoméricas dos polifenóis e flavonas, isoflavonas, flavonóis, catequinas, cumarinas, ácidos fenólicos (derivados dos ácidos benzóico e cinâmico), derivados de polimerização (taninos e ligninas) e outras substâncias encontradas nos vegetais (PRADO, 2009).

Em relação à origem, os antioxidantes são classificados como sintéticos e naturais. Geralmente os antioxidantes sintéticos são

compostos derivados de estruturas fenólicas, um anel aromático substituído por grupamentos hidroxila (OH), com mais de um grupo OH ou metoxila. Estes antioxidantes estabilizam ácidos graxos em alimentos por meio da reação com radicais livres, onde ocorre a quelação de íons metálicos e interrupção da oxidação lipídica (WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005).

Os antioxidantes sintéticos mais empregados são o BHA, BHT, TBHQ e o ácido cítrico, este como sinergista (SHAHIDI; ZHONG, 2005). A estrutura fenólica destes compostos (Figura 3) permite a doação de um próton a um radical livre, regenerando a molécula do acilglicerol interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres. Assim, os derivados fenólicos transformam-se em radicais livres. Entretanto, estes radicais podem se estabilizar sem promover ou propagar reações de oxidação (BUCK, 1981).

Figura 3. Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos



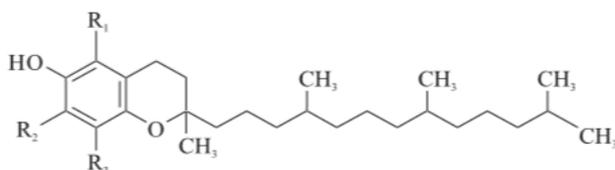
Porém, pesquisas têm sido dirigidas no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles (SOARES, 2002).

Os antioxidantes naturais mais usados são o ácido ascórbico e seus derivados, carotenoides, tocoferóis, tocotrienóis e compostos fenólicos de extratos de diversas fontes vegetais (WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005). A legislação brasileira permite a adição de 300 mg/kg

de tocoferóis em óleos e gorduras, como aditivos intencionais, com função de antioxidante (ABIA, 1999).

Os tocoferóis e os tocotrienóis, chamados de vitamina E, são adicionados como antioxidantes para estabilizar óleos e gorduras. Essa vitamina possui estruturas químicas derivadas do anel cromanol, alterados por um grupamento hidroxila e por um, dois ou três grupos metílicos no anel fenólico e diferem no fato de os tocoferóis possuírem longa cadeia lateral terpênica com ligações saturadas e os tocotrienóis possuírem ligações insaturadas (POKORNÝ; PARKÁNYIOVÁ, 2005). Existem quatro tipos segundo a localização dos grupos metila no anel: α , β , γ , δ (Figura 4).

Figura 4. Molécula de tocoferóis



α - tocoferol: $R_1 = R_2 = R_3 = CH_3$

β - tocoferol: $R_1 = R_3 = CH_3$; $R_2 = H$

γ - tocoferol: $R_1 = H$; $R_2 = R_3 = CH_3$

δ - tocoferol: $R_1 = R_2 = H$; $R_3 = CH_3$

Já os compostos fenólicos compõem a grande classe dos fitoquímicos alimentares. Sua fórmula química contém pelo menos um anel aromático, ao qual está unida uma (ou mais) hidroxila(s). Existe grande variedade de compostos fenólicos, classificados em dois grandes grupos, flavonoides e não flavonoides (KARAKAYA, 2004).

Estes compostos são considerados como os antioxidantes mais ativos nos vegetais, sendo encontrados com grande frequência (BIANCHI, 1999). No entanto, os estudos sobre os efeitos benéficos à saúde humana só foram intensificados a partir da década de 90 (CERQUEIRA, 2007).

Por suas propriedades redutoras e estruturas químicas, estas substâncias têm capacidade de sequestrar radicais livres, com ação no processo oxidativo, sendo os intermediários formados relativamente estáveis em função da ressonância do anel aromático nas suas estruturas (YAMAGUCHI, 1998). A maioria dos compostos fenólicos são

encontrados na natureza conjugados com açúcares na forma de ésteres ou de heterosídeos (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

Os antioxidantes biológicos, compostos por enzimas, como, por exemplo, as glucose oxidases, superóxido dismutases, catalases, peroxidases e metaloproteínas também fazem parte dos mecanismos endógenos de defesa de vegetais e são responsáveis pela remoção de oxigênio ou compostos muito reativos (WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005).

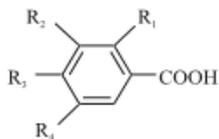
1.5.1 Compostos fenólicos de fontes vegetais

Diversas são as pesquisas com objetivo de separação, identificação, quantificação e utilização dos compostos fenólicos. Observa-se, no entanto problemas metodológicos, pois, para além de englobarem uma gama de substâncias (fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos e ligninas), estes compostos são, na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativos e suscetíveis à ação de enzimas (SOARES, 2002).

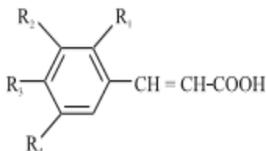
São substâncias que existem principalmente nas plantas, mas que podem também ser provenientes do catabolismo dos aminoácidos. As principais fontes desses compostos na dieta humana são os alimentos vegetais (cereais, frutas e legumes) e os seus derivados (sucos, vinho, cerveja e chá). A importância dada a estes compostos deve-se ao fato de muitos possuírem propriedades benéficas para a saúde humana (MARQUES et al., 2004; GONÇALVES, 2007).

Os fenólicos possuem pelo menos um anel aromático no qual, um hidrogênio ou mais é substituído por um grupamento hidroxila (PODSEDEK, 2007). São divididos em fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (ANGELO; JORGE, 2007; BOUDET, 2007).

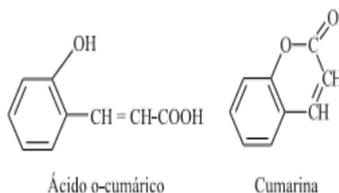
Os ácidos fenólicos caracterizam-se pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula (FERGUSON, HARRIS e EUR, 1998). São divididos em três grupos; o primeiro é composto pelos ácidos benzoicos, que possuem sete átomos de carbono (C6 – C1), suas fórmulas gerais e denominações estão representadas na Figura 5. O segundo grupo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C6 – C3), sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal (Figura 5). As cumarinas são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido o-cumárico (Figura 7) (SOARES, 2002).

Figura 5. Estrutura química dos ácidos benzoicos (SOARES, 2002).

Ácido salicílico: $R_1 = \text{OH}; R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$
 Ácido gentísico: $R_1 = R_4 = \text{OH}; R_2 = R_3 = \text{H}$
 Ácido *p*-hidroxibenzoico: $R_1 = R_2 = R_4 = \text{H}; R_3 = \text{OH}$
 Ácido protocatequínico: $R_1 = R_4 = \text{H}; R_2 = R_3 = \text{OH}$
 Ácido vanílico: $R_1 = R_4 = \text{H}; R_2 = \text{OCH}_3; R_3 = \text{OH}$
 Ácido gálico: $R_1 = \text{H}; R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}$
 Ácido siringico: $R_1 = \text{H}; R_2 = R_4 = \text{OCH}_3; R_3 = \text{OH}$

Figura 6. Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos (SOARES, 2002).

Ácido cinâmico: $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$
 Ácido *o*-cumárico: $R_1 = \text{OH}; R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$
 Ácido *m*-cumárico: $R_1 = R_3 = R_4 = \text{H}; R_2 = \text{OH}$
 Ácido *p*-cumárico: $R_1 = R_3 = R_4 = \text{H}; R_2 = \text{OH}$
 Ácido caféico: $R_1 = R_4 = \text{H}; R_2 = R_3 = \text{OH}$
 Ácido férúlico: $R_1 = R_4 = \text{H}; R_2 = \text{OCH}_3; R_3 = \text{OH}$
 Ácido sinápico: $R_1 = \text{H}; R_2 = R_4 = \text{OCH}_3; R_3 = \text{OH}$

Figura 7. Estrutura química das cumarinas (SOARES, 2002).

A combinação mais importante destes ácidos ocorre com o ácido caféico, que associado a um álcool-ácido cíclico, denominado ácido quínico, origina o ácido clorogênico (TAPIERO et al., 2002; GARAMBONE; ROSA, 2007). O ácido 5-*o*-cafeoilquínico é o mais comum dos ácidos clorogênicos e o mais conhecido dos fenóis

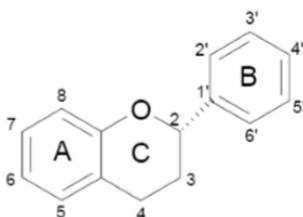
dietéticos biologicamente ativos (CLIFFORD, 2000; JOHNSTON; CLIFFORD; MORGAN, 2003).

De acordo com Melo e Guerra (2002); Burns et al., (2001) os compostos fenólicos podem também ser divididos em flavonoides e não flavonoides (ácidos).

Os flavonoides podem ser chamados também de polifenóis e em geral estão presentes em plantas na forma de glicosídeos, participando de importantes funções no crescimento, desenvolvimento e na defesa de vegetais contra ao ataque de patógenos. É uma das substâncias responsáveis pela atribuição do perfil sensorial de frutas, atribuindo-lhes o corpo característico. Mais de 6.000 diferentes estruturas já foram identificadas e este número continua a aumentar (AHERNE; O'BRIEN, 2002; BOBBIO; BOBBIO, 1989; CORDENUNSI et al., 2002; FENNEMA, 1993; SLUIS et al., 2001). Os principais representantes dos flavonóides são a micertina, quercetina, campferol e fisetina (LEE et al., 2003; SCALBERT; JOHNSON; SALTMARSH, 2005; CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

A estrutura química dos flavonóides é descrita como C6-C3-C6 com dois anéis fenólicos (A e B) e um anel heterocíclico pirânico (C) que os une. A Figura 8 ilustra a estrutura geral do núcleo flavânico da qual se constituem os flavonoides.

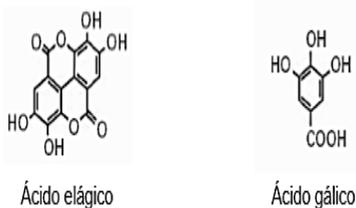
Figura 8. Estrutura química do núcleo flavânico. Adaptado por Gonçalves (2007).



Outra classe de compostos fenólicos refere-se aos taninos. Os taninos são compostos com altas massas molares, que além das reações normais das moléculas fenólicas, apresentam a capacidade de reagir com alcaloides, gelatina e outras proteínas formando precipitados. Estes compostos que precipitam proteínas podem ser divididos em taninos hidrolisáveis e taninos condensados (procianidinas) (GONÇALVES, 2007).

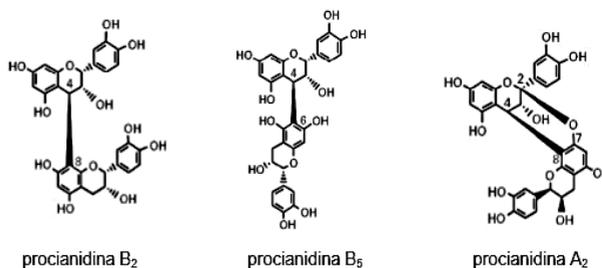
Os taninos hidrolisáveis são compostos que têm como base um ácido fenólico, o ácido gálico (taninos gálicos) e o ácido elágico (taninos elágicos) (Figura 9) ligados a uma molécula de açúcar. Na maior parte dos casos, estes se encontram na natureza sobre a forma de ésteres múltiplos com açúcares, formando estruturas complexas.

Figura 9. Estrutura química do ácido elágico e do ácido gálico. Adaptado de Del Rio et al., (2010).



Os taninos condensados, também designados como procianidinas (Figura 10), são polímeros constituídos por duas ou mais unidades de flavonóides. Existem na natureza hidroxilados nas posições 5 e 7 do anel A, variando na estereoquímica do carbono 3 do anel C e no grau de hidroxilação do anel B.

Figura 10. Estrutura química das procianidinas. Adaptado de Del Rio et al., (2010)



Em função da diversidade dos compostos fenólicos, sabe-se que o potencial antioxidante de um composto fenólico depende da sua estrutura, incluindo não apenas a sua polaridade, como também a

natureza e a posição dos grupos constituintes na sua estrutura (SOARES, 2002).

De acordo com Halliwell et al. (1995), os compostos fenólicos podem atuar como antioxidantes por várias vias, a partir da eliminação de radicais livres, pela absorção de radicais de oxigênio e como quelantes de íons metálicos (SU et al., 2007).

Devido às suas propriedades redutoras e estrutura química os ácidos fenólicos desempenham importante papel na neutralização de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (FARAH; DONANGELO, 2006; SOUSA et al., 2007).

Os polifenóis têm recebido atenção de pesquisadores por seus numerosos efeitos biológicos, como sequestrador de espécies radicalares de oxigênio (SHAN; CAI; SUN; 2005; ANGELO; JORGE, 2007; D'ARCHIVIO et al., 2007), modulação da atividade de algumas enzimas específicas, inibição da proliferação celular, bem como seu potencial como agente antibactericida, antialérgico e antiinflamatório (BRAVO, 1998; MANACH et al, 2004; LAJOLO; HORST; 2009).

Em estudos epidemiológicos, determinados flavonoides apresentam-se associados à proteção contra doenças do envelhecimento, devido à sua ação antioxidante (BIRCH et al., 2001; BRENNAN; PAGLIARINI, 2001; KOO; SUHAILA, 2001; SLUIS et al., 2001; VINSON et al., 2001; SELLAPAN; ZHENG; WANG, 2001; WANG; ZHENG, 2001; AKOH; KREWER, 2002; YILDRIM; MAVI; KARA, 2002).

Sob a perspectiva nutricional, os flavonoides são agentes antioxidantes capazes de inibir a oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL), reduzir significativamente a tendência às doenças tromboticas e estão associados à prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes e câncer (YANG; WANG, 1993; RAUHA et al., 2000; SALONEN, 2002; JOHNSTON; CLIFFORD; MORGAN, 2003).

Além disso, estes apresentam diversos efeitos bioquímicos e farmacológicos, dentre estes se destacam as ações antioxidante, anti-inflamatória e antiplaquetária, além de anti-álérgicos, podendo inibir receptores celulares ou enzimas destacando-se a prostaglandina sintetase, a lipoxigenase e a ciclooxigenase, todas relacionadas diretamente com a tumorigênese (ANGELO; JORGE, 2007; TAPIERO et al., 2002).

Quando em alimentos, os flavonoides agem de forma a poupar o consumo de vitamina C, evitando a formação de radicais livres (KOO; SUHAILA, 2001). Ainda, os fenólicos são possíveis substituintes dos

antioxidantes sintéticos, amplamente utilizados na conservação de alimentos lipídicos por chegarem a aumentar a vida útil desses produtos entre 15 % e 20 % (DURAN; PADILLA, 1993).

Em relação às fontes naturais de compostos fenólicos, as nozes se destacam por apresentar cerca de 78 % de ácido gálico na sua composição, podendo ser encontrados também os ácidos elágico, p-hidroxibenzóico, protocatequínico, vanílico, e quantidades traços dos ácidos siríngico e p-cumárico (SENER; HORVAT; FORBUS, 1980; VILLARREAL-LOZOYA; LOMBARDINI; CISNEROS-ZEVALLOS, 2007).

1.6 Noz pecã

1.6.1 Características, produção e beneficiamento

A noz pecã (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch) pertence à família *Junglandaceae* (VENKATACHALAM, 2004) e é proveniente da noqueira pecã, árvore de grande porte e que apresenta longevidade superior a 200 anos (INC, 2008).

O fruto da noqueira pecã é considerado uma drupa, pois os frutos crescem agrupados em cachos que contém normalmente de três a oito unidades, com epicarpo que se separa do fruto na maturação. As nozes apresentam casca de coloração marrom escura com manchas negras, de espessura bastante variada (POLETTTO et al., 2012).

A noz pecã é oriunda da América do Norte, mais especificamente do centro sul dos Estados Unidos e norte do México. A produção comercial ocorre na Austrália, no sul da África, em Israel, na Argentina, no Chile e no sul do Brasil (JOLY, 1993; HANACOCK, 1997).

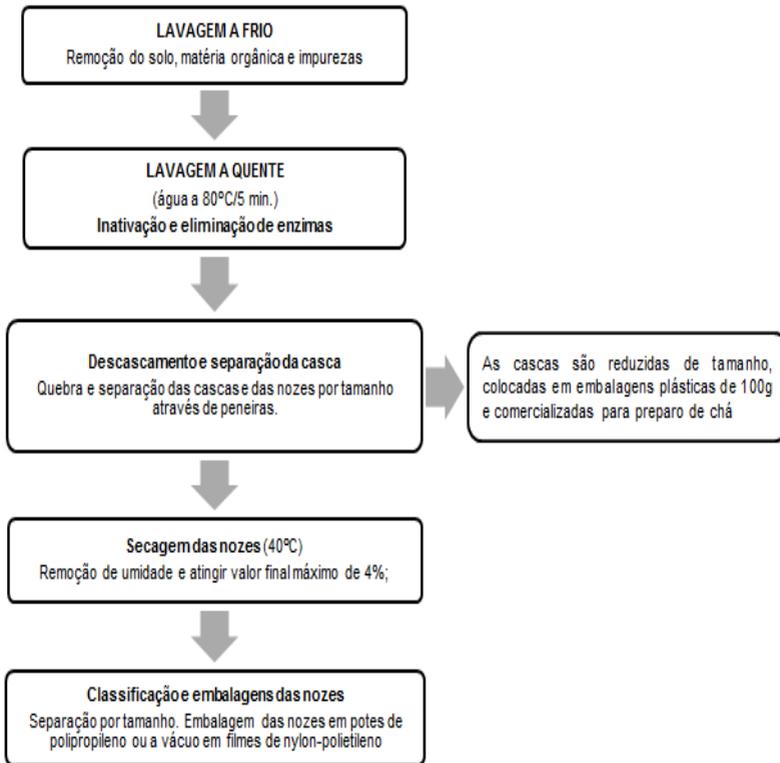
O cultivo da noqueira pecã no Brasil foi iniciado pelos imigrantes norte-americanos, que se estabeleceram em Santa Bárbara do Oeste e Americana no Estado de São Paulo. Sua produção mais significativa na América Latina está no município de Cachoeira do Sul, no Rio Grande do Sul, na região sul do Brasil (RIO GRANDE DO SUL, 2008).

Existem cerca de 1000 variedades de noz pecã nomeadas no mundo (SANTERRE, 1994). No Brasil as principais cultivares de noqueira pecã são oriundas dos Estados Unidos e as consideradas mais significativas são Mahan, Frotscher, Schley, Barton, Shawnee, Cape Fear, Chickasaw, Choctaw, Desirable, Imperial, Importada, Burkett, Chpecear, Shoshone (POLETTTO et al., 2012).

A maturação ocorre nos meses de março a maio, podendo variar em função das condições genéticas das plantas (LUZ et al., 2001; POLETTTO et al., 2012). Estando os frutos maduros ocorre à abertura do epicarpo e a queda dos frutos, dessa forma, acontece a colheita e os frutos são conduzidos a indústria beneficiadora.

De acordo com Oro (2007), e Prado (2008), o beneficiamento ocorre conforme ilustrado na Figura 11:

Figura 11. Fluxograma do beneficiamento da Noz Pecã:



A noz pecã é consumida crua, tostada, salgada ou caramelizada com açúcar ou mel e, em função do seu sabor e aroma agradável e sua crocância, é utilizada em produtos de padaria, confeitaria, na decoração de cookies, bolos, doces, tortas e sorvetes (SWINK, 1996).

A amêndoa é caracterizada por ser rica em lipídeos (entre 65 e 75 %), além disso, contém proteínas (9,9 %), carboidratos e fibras totais

(7,8 %), água (3,7 %) e cinzas ou minerais (1,4 %), fornecendo cerca de 726,6 kcal/100g (ORO et al., 2008). Na composição lipídica os ácidos graxos predominantes são o oleico e o linoleico (62,3 e 27,5 % respectivamente) e em concentrações menores os ácidos graxos palmítico (5,65 %), esteárico (2,84 %) e gadoleico (0,24 %) (ORO et al., 2008).

Do processamento da amêndoa também é possível se obter o óleo, considerado gourmet (SHAHIDI; MIRALIAKBARI, 2005; VENKATACHALAM, 2004).

1.6.2 Casca de noz pecã

Ainda que, a amêndoa da noz pecã seja amplamente consumida em sua forma *in natura* o processamento da noz pecã resulta na obtenção de casca, de 40 a 50 % do volume total da produção (WORLEY, 1994).

No sul do Brasil a casca de noz pecã é comercializada para o preparo de chá indicado para prevenção e tratamento de diversas doenças como diabetes, hipercolesterolemia, artrites, doenças coronarianas, câncer, entre outras (DIVINUT, 2014). Pesquisas científicas já avaliaram o efeito hepatoprotetor e também contra a toxicidade provocada pelo fumo, com provável relação à atividade antioxidante (MÜLLER et al., 2013; RECKZIEGEL et al., 2011).

Observa-se, no entanto, que ainda não foram comprovados cientificamente outros efeitos associados ao consumo do chá, como ação antiobesidade e hipocolesterolêmica, evidenciando-se assim uma lacuna a ser investigada.

Quanto a composição nutricional a casca da noz pecã apresenta um valor calórico de 331 kcal/100g e cerca de 48,6 % de fibras; 29,6 % de carboidratos; 16,8 % de umidade; 2,2 % de proteínas e 1,1 % de lipídios totais (PRADO et al., 2009a).

Em relação aos compostos bioativos presentes na casca da noz pecã destacam-se os compostos fenólicos, como os taninos e ácidos fenólicos responsáveis por características de cor e o sabor adstringente do chá produzido a partir da casca. Esses compostos estão em uma concentração total em média de 450 mg/g (equivalentes de ácido clorogênico) e são responsáveis por alta atividade antioxidante, que chega a média de 600 mg/g de equivalentes em Trolox em infusões aquosas. Além disso, contém cerca de 630 mg/g de equivalentes de catequina e taninos condensados (VILLARREAL-LOZOYA; LOMBARDINI; CISNEROS-ZEVALLOS, 2007; PRADO et al., 2014).

Ressalta-se que alguns taninos presentes na casca da noz pecã podem ser lixiviados para o interior das nozes durante o pré-condicionamento antes de serem quebradas no processo de descascamento (HEATON; WORTHINGTON, 1975).

Existem poucos dados na literatura referente à composição fenólica da casca da noz pecã. De acordo com De La Rosa et al., (2011) foram detectados os ácidos gálico e elágico em experimento utilizando-se cromatografia de alta eficiência (CLAE) acoplada a espectrômetro de massas. Já Prado et al. (2014) identificaram três ácidos fenólicos (gálico, clorogênico e p-hidroxibenzoico) e dois compostos flavonoides (subclasse flavan-3-ol: epigallocatequina e epicatequina galato).

Tendo em vista a presença significativa dos compostos fenólicos na casca da noz pecã e seu potencial antioxidante buscam-se métodos para aumentar o rendimento de extração, favorecendo desta forma sua capacidade antioxidante e fitoterápica.

1.7 Extração de antioxidantes naturais com ultrassom

Extrair significa remover, de modo mais seletivo e mais completo possível, as substâncias ou fração ativa de interesse contidas no vegetal, através de um líquido ou mistura de líquidos tecnologicamente apropriados e seguros toxicologicamente (SIMÕES et al., 2004). Na escolha do método de extração, é necessário avaliar a eficiência, a estabilidade dos extratos, a disponibilidade dos meios e o custo do processo escolhido, levando em conta a finalidade do extrato que se deseja preparar (MIYAKE, 2013).

A extração é a primeira alteração de grande importância para produção do extrato (MIYAKE, 2013). Para aumentar a solubilidade dos componentes e da taxa de transferência de massa, uma das técnicas convencionais de extração utilizada é a infusão, que ocorre por aquecimento, ebulição ou sob refluxo (XIA et al., 2006).

A aplicação da infusão se dá, normalmente, às partes vegetais moles, que devem ser contundidas, cortadas ou pulverizadas, com objetivo de que possam ser mais facilmente penetradas e extraídas (SIMÕES et al., 2004).

Uma desvantagem da extração por infusão consiste no fato dos extratos possuírem compostos voláteis, polifenóis, os quais são instáveis termicamente e, dependendo do tempo e da temperatura, podem sofrer degradação durante o processo de infusão acarretando em alterações de sabor, aroma e qualidade da cor do extrato (XIA et al., 2006).

A extração assistida por ultrassom enquadra-se nos métodos não tradicionais de extração e isolamento de componentes bioativos de matérias primas vegetais. Entre as vantagens atribuídas a esta técnica estão: a redução do tempo de extração; melhora na eficiência de extração; aumento do rendimento; utilização de temperaturas baixas evitando danos térmicos. Esta técnica é considerada simples, rápida, de elevada reprodutibilidade e baixo custo, apresentando ainda a possibilidade do uso de amostras de quantidades e tamanhos variados (SALISOVÁ et al., 1997; VALACHOVIC et al., 2001; PANIWNKYK et al., 2001; MELECCHI et al., 2006).

O mecanismo de ação do ultrassom consiste na transformação de energia elétrica em energia mecânica através de dispositivos transdutores ultrassônicos, que provocam uma vibração mecânica em alta frequência que se propagam por meio de materiais como o aço inoxidável, o vidro, entre outros (KORN et al., 2005).

Esta energia mecânica é chamada de cavitação ultrassônica, ou seja, ciclo de formação, crescimento e colapso de bolhas micrométricas durante a sonicação. Com os colapsos das bolhas de cavitação ocorre liberação de energia para o meio gerando aumento de temperatura e de pressão. Este processo favorece a extração de espécies químicas provenientes de materiais sólidos, bem como a dissolução dos mesmos (KORN et al., 2005).

A eficiência de extração e diminuição do tempo de extração é atribuída ao rompimento celular juntamente com penetração do solvente para o interior das células através do jato ultrassônico e liberação dos componentes dentro da célula (JIANYONG et al., 2001; MELECCHI et al., 2006; JACQUES et al., 2007). Em alguns casos a moagem da matéria prima antes da extração é recomendada com o objetivo de aumentar o contato da mesma com o solvente extrator (VINATORU, 2001).

Este tipo de técnica vem sendo utilizada para extração de componentes com potenciais atividades biológicas como, por exemplo, flavonoides, polifenóis, hidrocarbonetos saturados, ésteres de ácidos graxos, esteróides, triterpenóides e saponinas (JIANYONG et al., 2001; PANIWNKYK et al., 2001; ALBU et al., 2004; SCHINOR et al., 2004; MELECCHI et al., 2006) e, para o isolamento de componentes voláteis de produtos naturais em temperatura ambiente com solventes orgânicos (ALISSANDRAKIS et al., 2003).

Para uma extração adequada é de extrema importância o estabelecimento de valores apropriados dos parâmetros relacionados às propriedades biológicas do material a ser extraído como o tempo de

extração, volume de solvente e a polaridade do solvente (SALISOVÁ et al., 1997).

1.8 Métodos para determinação da atividade antioxidante de matérias-primas vegetais

Existem na literatura inúmeros métodos para determinação da atividade antioxidante de alimentos ou de outras substâncias, o que todos eles têm em comum é a presença de um agente oxidante, de um substrato adequado e de uma medida do ponto final (LIMA, 2008). Atualmente preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas, pois nenhum ensaio usado isoladamente para determinar a capacidade antioxidante será o reflexo da “capacidade antioxidante total” de uma amostra (PRIOR; CAO, 1999).

A capacidade antioxidante pode ser expressa por meio de vários parâmetros, incluindo a remoção de um radical peroxil (ORAC - *oxygen radical absorbance capacity*, TRAP - *total reactive antioxidant potential*), a capacidade de redução de metal (FRAP - *ferric reducing antioxidant power*, CUPRAC - *cupric ion reducing antioxidant capacity*), a capacidade de remoção de radical orgânico (ABTS - 2,2'-azino-bis (ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico), DPPH - peroxidação do 2,2-difenil-1-picrylhidrazil) e a quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídeos (TBARS, a oxidação do LDL, co-oxidação do β -caroteno) (SANCHEZ-MORENO et al., 1998).

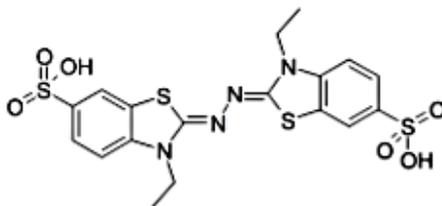
A captação de radicais é o principal mecanismo de ação dos antioxidantes nos alimentos (PEREIRA, 2010). O uso de espécies radicalares com máximo de absorção na zona do visível, tais como o radical gerado a partir do ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico (ABTS) (Figura 12), ou o radical 2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) são as bases das duas metodologias *in vitro* usadas frequentemente em ensaios preliminares, anteriores à separação e caracterização dos compostos bioativos (SOUTINHO, 2012).

1.8.1 Captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfônico) (ABTS^{•+})

A descoloração do radical monocatión (ABTS^{•+}) é chamada de método ABTS, também denominado por alguns autores como método da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox[®], que correspondente

à sigla em inglês TEAC (*Trolox*[®] *Equivalent Antioxidant Capacity*) (RE et al., 1999; KUUSKOSKI et al., 2005; RUFINO et al., 2007b).

Figura 12. Radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico.



Sendo que, Trolox[®] é o nome comercial da Hoffman-La Roche para o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Figura 13), um análogo hidrossolúvel da vitamina E, uma substância química de referência largamente utilizada como padrão para investigação da capacidade antioxidante em diferentes metodologias e em aplicações bioquímicas a fim de reduzir o estresse oxidativo (MANSUR, 2011).

Figura 13. Fórmula estrutural do Trolox (6-hidroxil-2,5,7,8 tetrametil-croman-2 ácido carboxílico) [Fonte: Cachichi, 2002].



No método ABTS para determinação da capacidade antioxidante, o radical $ABTS^{\bullet+}$ é produzido a partir de um precursor, o ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico, sendo este um composto cromóforo quimicamente estável, com alta solubilidade em água e um máximo de absorvância a 414nm, e de medidas secundárias de absorvância a 645, 734 e 815nm (MILLER, 1993).

O método ABTS está baseado na habilidade dos antioxidantes em capturar o cátion $ABTS^{\bullet+}$. Esta captura causa um decréscimo na absorvância, que é lida a partir da mistura do radical com o antioxidante

em diferentes tempos, sendo representadas graficamente (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006).

Apesar da facilidade e simplicidade com que esta metodologia é executada, o controle rigoroso das condições reacionais é fundamental para a obtenção de resultados fiáveis (MAGALHÃES et al., 2005).

1.8.2 Atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

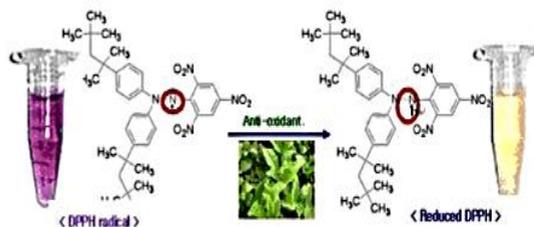
A descoloração do radical livre estável DPPH^{*} (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl), foi originalmente desenvolvido por Blois (1958), amplamente utilizado para medir a capacidade de captura deste radical por substâncias antioxidantes presentes em vegetais e de interesse tecnológico, alimentar, farmacológico e toxicológico (MAMBRO; FONSECA, 2005; RUFINO et al., 2007a).

Sendo assim, entre os métodos existentes baseados no sequestro de radicais livres, o DPPH• é frequentemente escolhido na investigação da capacidade antioxidante de diferentes amostras, por ser um método espectrofotocolorimétrico, rápido, de baixo custo e capaz de determinar o poder redutor das substâncias analisadas (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; MENEZES; VICENTINO, 2007; RUFINO et al., 2010).

O radical DPPH livre e estável tem capacidade de reagir com doadores de hidrogênio. Na presença de substâncias antioxidantes o mesmo recebe H⁺ sendo então reduzido. A capacidade da amostra de reduzir o DPPH, ou seja, evitar sua oxidação é evidenciado pela percentagem de DPPH restante no sistema. Deste modo, a percentagem de DPPH restante é proporcional à concentração de antioxidante (SANCHEZ-MORENO, 2002; BONDET et al., 1997).

O radical livre estável DPPH• possui coloração violeta e absorve luz a 518 nm. Quando o radical é reduzido pelo antioxidante da amostra, a solução violeta sofre descoloração para o amarelo claro (Figura 14). Assim quanto mais clara torna-se a solução, mais forte o potencial antioxidante da amostra analisada. A maioria dos trabalhos publicados expressa o resultado das substâncias antioxidantes analisadas como a concentração necessária para se obter 50 % do efeito antioxidante máximo estimado (CE 50) (MENSOR, 1999).

Figura 14. Exemplo de mudança de cor do radical DPPH após reagir com antioxidante. Adaptado de Pereira (2010).



Na maioria dos casos, o método DPPH é utilizado para medir a captação de radicais após 30 minutos depois de iniciada a reação, esse é um radical estável e com baixa taxa de deterioração e reatividade com a maioria dos compostos. Assim sendo, apenas reagentes redutores fortes são capazes de reagir com estes radicais estáveis num modo estequiométrico. A baixa absorbância obtida indica que ocorreu atividade sequestradora de radicais livres (BORGES et al., 2011).

Quando comparados os métodos, percebe-se que o radical catiônico ABTS é mais reativo que o radical DPPH, logo, a reação ocorre completamente após 1 minuto. Estes dois métodos colorimétricos são relativamente simples e não necessitam de temperaturas altas para a sua execução (Borges et al., 2011).

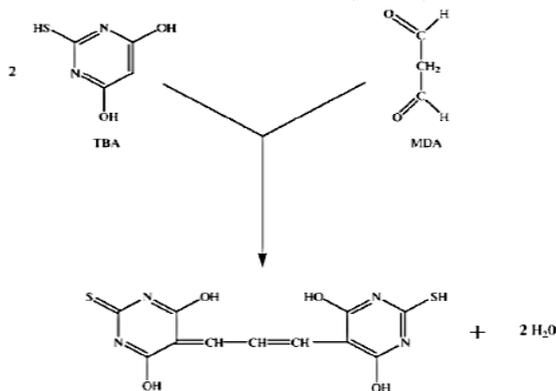
1.8.3. Potencial de inibição da peroxidação lipídica *in vitro* (TBARS)

Nas técnicas de determinação da oxidação lipídica, os substratos lipídicos são diversos como o ácido linoleico, os ésteres metílicos dos ácidos graxos, a LDL (lipoproteína de baixa densidade) e ainda os lipossomos. Essa oxidação pode ser iniciada pela adição de íons metálicos (Cu^+ , Fe^{2+}), de AAPH [2,2-azobis (aminopropano) dihidroclorido], de peróxido de hidrogênio, ou ainda pela aplicação de calor (ANTOLOVICH et al., 2002).

Os marcadores usados para monitorar a peroxidação lipídica pertencem à classe das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, essa peroxidação lipídica origina produtos secundários como alcanos, aldeídos e isoprostanos que podem ser utilizados para avaliar o status oxidativo de materiais biológicos. Entre os biomarcadores mais avaliados para a peroxidação lipídica estão o malondialdeído (MDA) e o

F₂-isoprostano (DOTAN et al., 2004), os quais podem ser determinados pelo método TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico), no qual se faz reagir o MDA com duas moléculas do ácido tiobarbitúrico (TBA) (Figura 15), em meio ácido, e em alta temperatura, para formar um pigmento rosado, que pode ser medido fluorometricamente ou espectrofotometricamente de 532 ou 535 nm (SÁNCHEZ-MORENO, 2002; VASCONCELOS et al., 2007).

Figura 15: Representação da reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com o malonaldeído (MDA) Fonte: Willianson, Henley e Floyd (2003).



2 Referências Bibliográficas

- ABIA – Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação; **Compêndio da Legislação de Alimentos: Consolidação das Normas e Padrões de Alimentos**, 7^a ver., São Paulo, 1999, vol. 1.32.
- ALBU, S.; JOYCE, E.; PANIWNKYK, J.P.; LORIMER, J.P.; MASON, T.J. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, p. 261-265, 2004.
- ALISSANDRAKIS, E., DAFERERA, D.; TARANTILIS, P.A.; POLISSIOU, M.; HARIZANIS, P.C. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey. **Food Chemistry**, v. 82, p. 575-582, 2003.
- ALLEN, E.; FOEGEDING, E.A. Some lipid characteristics and interactions with muscle foods: a review. **Food Technology**, Chicago, v.35, n.5, p.253-257, 1981.

- ALVES, M.R.M.; ALVES, J.R.; PEREIRA, L.T.A.; WARTHA, E.R.A.; GUIMARAES, A.O.; BOAVENTURA, R.F. Avaliação do estresse oxidativo em indivíduos obesos no pré-operatório de cirurgia bariátrica. **Arq Bras Cir Dig.** 2011; 24. Suppl 1:9. Medline.
- ANDRADE, C.A.; COSTA, C.K.; BORA, K.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G; KERBER, V.A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acácia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 231-235, 2007.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- BABIOR, B.M. Superoxide: a two-edged sword. *Braz J Med Biol Res* 30(2) 1997.
- BAILEY, A.E.; *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, 5th ed., John Wiley: New York, 1996, vol. 3.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr** 1999;12(2):123-30.
- BIRCH, A.E.; FENNER, G.P.; WATKINS, R.; BOYD, L.C. Antioxidant proprieties of evening primrose seed extracts. **Food Chemistry**. Chicago, v.49, p. 4502-4507, 2001.
- BOBBIO, F.O; BOBBIO, P.A. **Introdução a química de alimentos**. 2 Edição, Livraria Varela Ltda, São Paulo, 1989.
- BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmitt Wissenschaft Technologie* **Food Sci Technol**. 1997.
- BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A.; SILVA, F.A.M.; Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22(1), p. 94-103, 1999.
- BRAVO, L.; Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317- 333, 1998.
- BRENNA, O.V.; PAGLIARINI, E. Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **J. Agric. Food Chemistry**. Chicago: v.49, p. 4841-4844, 2001.
- BROWN, L.; ROSNER, B.; WILLET W.W.; SACKS F.M. Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analyses. **Am J Clin Nutr**, v. 69, p 30-42, 1999.
- BUCK, D.F.; **J. Am. Oil Chem. Soc.** 1981, 58, 275.
- BULLO, M.; CASAS-AGUSTENCH, P.; MIGO-CORREIG, P.; ARANCETA, J.; SALAS-SALVADO, J. Inflammation, obesity and

comorbidities: the role of diet. **Public Health Nutr.** 2007;10(10A):1164-72.

CARNEIRO, G.; FARIA, A.N.; RIBEIRO FILHO, F.F.; GUIMARÃES, A.; LERÁRIO, D.; FERREIRA, S.R. Influência da distribuição da gordura corporal sobre a prevalência de hipertensão arterial e outros fatores de risco cardiovascular em indivíduos obesos. **Rev Ass Med Bras.** 2003; 49

CASTRO, L.C.V.; FRANCESCHINI, S.C.C.; PRIORE, S.E.; PELÚZIO, M.C.G. Nutrição e doenças cardiovasculares: os marcadores de risco em adultos. **Rev Nutr**, v.17, n.3, p.369-377, jul/set. 2004.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterocíclicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, G.G.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6.ed., ver., Porto Alegre /Florianópolis, Ed. Universidade/ UFGRS/ Ed. da UFSC, 2007

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H.G. de; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CERVATO, A.M.; VIEIRA, V.L. Índices dietéticos na avaliação da qualidade global da dieta. **Ver Nutr**, v.16, n.3, p.347-355, jul/set. 2003.

CHOE, E; MIN, D.B. Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods. *Comprehensive reviews in food Science and food safety*, v. 8, 2009.

CLIFFORD, M.N.; Chlorogenic acids and other cinnamates nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1033-1042, 2000.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annals Institute Super Sanità**, v. 43, n. 4, p. 348-361, 2007.

DAVY, B.M.; DAVY, K.P.; HO, R.C.; BESKE, S.D.; DAVRATH, L.R.; MELBY, C.L. Highfiber oat compared with wheat cereal consumption favorably alters LDL-cholesterol subclass and particle numbers in middle-aged and older men. **Am J Clin Nutr**, v. 76, p. 351-357, 2002.

DEBOER, S.W.; THOMAS, R.J.; BREKKE, M.J.; HOFFMAN, R.S.; MENZEL, P.A.; AASE, L.A.; HAYES, S.N.; KOTTKE, T.E. Dietary Intakes of fruits, vegetables, and fat in Olmsted County, Minnesota. **Mayo Clin Proc**, v. 78, n. 2, p. 161-166, 2003.

DEWAILLY, E.E. ; BLANCHET, C.; GINGRAS, S.; LEMIEUX, S.; SAUVÉ, L.; BERGERON, J.; HOLUB, B.J. Relations between n-3

- fatty-acid status and cardiovascular disease risk factors among Quebecers. **Am J Clin Nutr.** v. 74, n. 5, p. 603-11, 2001.
- DJOUSSÉ, L.; PANKOW, J.S.; ECKFELDT, J.H.; FOLSOM, A.R.; HOPKINS, P.N.; PROVINCE, M.A.; HONG, Y.; ELLISON, R.G. Relations between dietary linolenic acid and coronary artery disease in the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. **Am J Clin Nutr.** v. 74, n. 5, p. 612-9, 2001.
- DEL RIO, D.; BORGES, G.; CROZIER, A. Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. **British Journal of Nutrition**, 104, 2010.
- DONNELLY, J.K.; ROBINSON, D.S. Invited review: free radicals in foods. *Free Radical Research*, **Chur**, v.22, n.2, p.147-176, 1995.
- DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS RJ, GENOVESE MI, LAJOLO FM. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciênc Tecnol Aliment**; 26(2):446-52, 2006.
- DUTHIE, G.G.; Lipid peroxidation. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v.47, n.11, p.759-764, 1993.
- FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.23-26, 2006.
- FENNEMA, O.R.; **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1993.
- FERGUSON, L.R.; HARRIS, P.J.; **Eur. J. Cancer Prev.** 1999, 8, 17.
- FERRARI, C.K.B.; Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. **Rev. Nutr.**, Campinas, 11(1): 3-14, jan./jun., 1998.
- FERREIRA, A.P.; OLIVEIRA, C.E.R.; FRANÇA, N.M. Síndrome metabólica em crianças obesas e fatores de risco para doenças cardiovasculares de acordo com a resistência à insulina (HOMA-IR). **J Pediatr.** 2007; 83.
- FRANKEL, E.N.; *Prog. Lip. Res.*1980, 19, 1.
- FUENTE, J.A.; Manzanaro, S., 2003. Aldose reductase inhibitors from natural sources. **Nat. Prod. Rep.** 20, 243–251.
- GARAMBONE, E.; ROSA, G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. **Alimentos e Nutrição**, v.18, n.2, p. 229-235, abr./jun. 2007
- GARDNER, H.W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. **Free Radical Biol. Med.**, v.7, p.65-86, 1989.
- GILLER, G.; SINGLER, K. Oxidative stress and living cells. **Folia. Microbiol.**, v.40, n.2, p.131-152, 1995.

- GOLDSTEIN, D.J. Beneficial Health Effects of Modest Weight Loss. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**. Indianapolis. Vol. 16. 1992. p. 397-415.
- GONÇALVES, R. **Estudo da inibição de tripsina por compostos fenólicos isolados de fontes naturais. Efeito antinutricional de bebidas comuns**. Tese de mestrado. Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Setembro, 2007.
- HALLIWEL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROUMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Food Chem Toxicol**. 33(7):601-17, 1995.
- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean?. **Br J Pharmacol**.; 142:231-55, .
- HALLIWELL, B. Radicales libres, antioxidantes y enfermedad humana: ¿Curiosidad, causa o consecuencia? **Lancet**, v.26, n.2, p.109-113, Edición española), 1994.
- HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.57, n.5, p.S715-S725S, 1993. Supplement.
- HANACOCK, B.G. Development of Pecan Industry. In: Texas Pecan Handbook. Texas Agricultura, 1997.
- INC – International Nut Tree Council – disponível em: <www.nuthealth.org>, acesso em 28/01/2008.
- JACQUES, R.S.; FREITAS, L.S.; PÉREZ, V.F.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, A.P.; OLIVEIRA, J.V.; CARAMÃO, E.B. The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparison with maceration. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, p. 6-12, 2007.
- JIANYONG, W.; LIDONG, L.; FOO-TIM, C. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 347-352, 2001.
- JOHNSTON, K.L.; CLIFFORD, M.N.; MORGAN, L.M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 78, n. 4, p. 728- 733, 2003.
- JOLY, A.B. Botânica: Introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Nacional, 222 p., 1993.
- JORDÃO, A.A.JR.; CHIARELLO, P.G.; BERNARDES, M.S.M. VANUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, Ribeirão Preto; 31: 434-49, 1998.

- KANNER, J. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. **Meat Science**, Essex, v.36, n.1/2, p.169-189, 1994.
- KARAKAYA S. Bioavailability of phenolic compounds. **Crit Rev Food Sci Nutr** 44(6):453-64, 2004;.
- KENNEDY, A.; MARTINEZ, K.; CHUANG, C.C.; LAPOINT, K.; MCINTOSH, M. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. **J Nutr**;139(1):1-4, 2009.
- KING, H.; AUBERT, R.E.; HERMAN, W.H. Global burden of diabetes, 1995–2025: prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care** 21, 1414– 1431, 1998.
- KOO, H.M.; SUHAILA, M. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. **J. Agric. Food Chemistry**. Chicago: v.49, n. 6, p. 3106-3112, 2001.
- KORN, M.; PEREIRA, M.G.; BORGES, S.S. Algumas aplicações analíticas dos ultra-sons. Boletim da Sociedade Portuguesa de Química, n. 96, p. 51-55, 2005.
- KUBOW, S. Lipid oxidation products in food and atherogenesis. *Nutrition Reviews*, New York, v.51, n.2, p.33-40, 1993.
- KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI FILHO J.; Fett, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Cien Tecnol Aliment**; 25(4):726-32, 2005.
- LAJOLO, F.M.; HORST, M.A. Biodisponibilidade de compostos bioativos em alimentos. In: Silvia Maria Franciscato Cozzolino. (Org.). **Biodisponibilidade de nutrientes**. 3 ed. São Paulo: Ed. Manole, 2009, v.1, p. 772-807.
- LEE, K.W.; KIM, Y.J.; LEE, H.J.; LEE, C.Y. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p.7292–7295, 2003.
- LEE, H.S. Rat lens aldose reductase inhibitory activities of Coptis japônica Root-derived isoquinoline alkaloids. **J. Agric. Food Chem.** 50, 7013, 2002.
- LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 37, n. 3, set./dez., 2001.
- MADHAVI, D.L.; SALUNKHE, D.K. Antioxidants. In: MAGA, J.A.; TU, A.T. *Food Additive Toxicology*. 1.ed., v.1, New York-Basel-Hong Kong, EUA, Marcel Dekker, Inc.1995.

- MAHATTANATAWEE, K.; MANTHEY, J.A.; TALCOTT, S.T.; GOODNER, K.; BALDWIN, E.A. Total antioxidant activity and fiber content of select Floridagrown tropical fruits. **J Agric Food Chem.** 54:7355-63, 2006.
- MANACH, C., SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p.727-747, 2004.
- MARQUES, C.; DUTHOIT, M.; ALVARENGA, B.; ROSEIRO, L.B. **Implementação e validação do método de Folin-Ciocalteu para a determinação do teor em compostos fenólicos totais – aplicação a extratos de flor de cardo e queijo.** Tese de Licenciatura, Instituto Politécnico de Beja, Escola Superior Agrária de Beja, Beja (2004).
- MARTORELL, R.; KHAN, L.K.; HUGHES, M.L.; GRUMMER-STRAWN, L.M. Obesity in Latin American women and children. **The Journal of Nutrition.** Atlanta. Vol. 9. Num. 128. 1998. p.1464-1473.
- MELECCHI, M.I.S.; PÉRES, V.F.; DARIVA, C.; ZINI, C.A.; ABAD, F.C.; MARTINEZ, M.M.; CARAMÃO, E.B. Optimization of the sonication extraction method of Hibiscus tiliaceus L. flowers. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 13, p. 242-250, 2006.
- MILLER, N.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M.J.; GOPINATHANN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clin Sci**;84(4):407-12, 1993.
- MÜLLER, L.G.; PASE, C.S.; RECZIEGEL, P.; BARCELOS, R.C.S.; BOUFLUER, N.; PRADO, A.C.P.; FETT, R.; BLOCK, J.M.; PAVANATO, M.A.; BAUERMAN, L.F.; ROCHA, J.B.T.; BERGER, M.E. Hepatoprotective effects of pecan nutshells on ethanol-induced liver damage. **Exp. Toxicol. Pathol.** 65 (1–2), 165–171, 2013.
- NAMIKI, M.; Crit. Rev. **Food Sci. Nutr.** 1990, 29, 273.
- NICKLAS, T.A.; DWYER, J.; FELDMAN, H.A.; LUEPKER, R.V.; KELDER, S.H.; NADER, P.R. Serum cholesterol levels in children are associated with dietary fat and fatty acid intake. **J Am Diet Assoc**, v. 102, p. 511-17, 2002.
- ORO, T. **Composição nutricional, compostos bioativos e vida útil de noz e óleo extrairgem de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch].** 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, (2007).
- ORO, T.; OGLIARI, P.J.; AMBONI, R.D.M.C.; BARRERA-ARELLANO, D. y BLOCK, J.M. Evaluación de la calidade durante el almacenamiento de nueces Pecán [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C.

- Koch] acondicionadas em diferentes envases. **Grasas y Aceites**, n.2 (abril/junio), **In Press**, 2008.
- PANIWNYK, L.; BEAUFOY, E.; LORIMER, J.P.; MASON, T.J. The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 299-301, 2001.
- PEARSON, A.M., GRAY, J.I., WOLZAK, A.M., HORENSTEIN, N.A. Safety implications of oxidized lipids in muscle foods. **Food Technology**, Chicago, v.37, n.7, p.121-129, 1983.
- PEREIRA, M.O.S. **Estudo comparativo de Métodos de Avaliação da Capacidade Antioxidante de Compostos Bioativos**. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia. (2010)
- PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Res Int**, 39:791-800, 2006;
- PODSEDEK, A. Natural antioxidants capacity of brassica vegetables: a review. **J Food Compos Anal** 2007;40:1-11.
- POKORNÝ, J.; PARKÁNYIOVÁ, J. Lipids with antioxidant properties. *Healthful Lipids*. **AOCS Press**, 2005.
- POLETTO, T. et al. **Análise de características dos frutos de cultivares de Nogueira-pecã cultivadas no Rio Grande do Sul**. XVI Simpósio de Ensino, Pesquisa e Extensão. Santa Maria, 2012.
- PRADO, A.C.P. **Avaliação da atividade antioxidante da casca e torta de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]**, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, (2008).
- Prado A. Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais. Dissertação [Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos] - Universidade de São Paulo; 2009.
- PRADO, A.C.P.; ARAGÃO, A.M.; FETT, R.; BLOCK, J.M. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]. **Braz. J. Food Technol**; v. 12, n. 4, p. 323-332, 2009^a.
- PRIOR RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radic BIOL Med**;27(11/12):1173-81, 1999
- RAFECAS, M.; GUARDIOLA, F.; ILLERA, M.; CODONY, R.; BOATELLA, J. Liquid chromatographic determination of phenolic antioxidants in bakery products. **Journal of Chromatography A**, v.822, p.305 - 309, 1998.

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

RAUHA, J.P. et. al. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam: v.56, n.1, p. 3-12, 2000.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biol. Med.** V.26, p.1231-1237, 1999.

REXRODE, K.M.; HENNEKENS, C.H.; WILLET, W.C.; COLDITZ, G.A.; STAMPFER, M.J.; RICH-EDWARDS, J.W. A prospective study of body mass index, weight change, and risk of stroke in women. **The Journal of the American Medical Association**. Boston. Vol. 19. Num. 277. p.1539-1545, 1997.

RIMM, E.B.; WILLET, W.C.; HU, F.B.; SAMPSON, L.; COLDITZ, G. A.; MANSON, J. E.; HENNEKENS, C.; STAMPFER, M. J. Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. **JAMA**, v. 279, n. 5, p. 359-64, 1998.

ROMERO, F.J., BOSCH-MORELL, F., ROMERO, M.J. ROMERO, B. MARIN, N., ROMA, J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. **Environ. Health. Perspect.**, v.106, p.1229-1234, 1998.

RUFINO, M.S.M, ALVES RE, BRITO ES, MORAIS SM, SAMPAIO CG, JIMENEZ JP, CALIXTO FDS. **Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Comunicado Técnico Embrapa, 127: 1-4, 2007.

SALISOVÁ, M.; TOMA, S.; MASON, T.J. Comparison of conventional and ultrasonically assisted extractions of pharmaceutically active compounds from *Salvia officinalis*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 4, p. 131-134, 1997.

SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of poly phenols. **J Sci Food Agric**; 76:270-6, 1998.

SCALBERT, A.; JOHNSON, I.T.; SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **American Journal of Clinical Nutrition.**, v. 81(suppl), p. 215S-2177S., 2005.

SCHAEFER, E.J. Lipoproteins, nutrition, and heart disease. **Am J Clin Nutr**, v. 75, n. 2, p. 191- 212, 2002.

SCHINOR, E.C.; SALVADOR, M.J.; TURATTI, I.C.C.; ZUCCHI, O.L.A.D.; DIAS, D.A. Comparison of classical and ultrasound-assisted

- extractions of steroids and triterpenoids from three *Chresta* spp. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, p. 415-421, 2004.
- SENER, S.D.; HORVAT, R.J.; FORBUS JR, W.R. Relation between phenolic acid content and stability of pecans in accelerated storage. **Journal of Food Science**, v. 45, p. 1380 - 1382, 1980.
- SEVANIAN, A.; HOCHSTEIN, P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. **Annual Reviews of Nutrition**, Palo Alto, v.5, p.365-390, 1985.
- SHAHIDI, F.; MIRALIAKBARI, H. Tree Nut Oils. In: SHAHIDI, F. (Ed). **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. v. 3, 6th ed.. John Wiley & Sons, Inc. EUA, 2005.
- SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Antioxidants: Regulatory Status. In: SHAHIDI, F. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects**. 6.ed., v.1, EUA, Wiley – interscience, 2005.
- SHAH A, MEHTA N, REILLY MP. Adipose inflammation, insulin resistance, and cardiovascular disease. **J Parenter Enteral Nutr.** 32(6):638-44. 2008;
- SHAN, B.; CAI, Y.Z.; SUN, M. Antioxidant capacity of 26 species extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal Agriculture of Food Chemistry**, v. 53, p. 7749-7759, 2005.
- SILVA, M.L.C.; COSTA, R.S.; SANTANA, A.S.; KOBLITZ, M.G.B. Compostos fenólicos, carotenóides e actividade antioxidante em produtos vegetais. **Revista Ciências Agrárias**, 3, 669-682, 2010.
- SIMÕES, C. et al Farmacognosia, da planta ao medicamento 5º Ed UFSC, pg 315, 221-224, 2004.
- SLATER, T.F., CHEESEMAN, K.H., DAVIES, M.J., PROUDFOOT, K., XIU, W. Free radical mechanisms in relation to tissue injury. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v.46, n.1, p.1-12, 1987.
- SOARES, S.E. Ácidos Fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, n.1, p.71 -81, 2002.
- SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30: 351-355, 2007.
- SOUTINHO, S.M.A. **Avaliação dos compostos fenólicos e da actividade antioxidante de frutos vermelhos produzidos em modo biológico**. Dissertação Mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar. Instituto Politécnico de Viseu. Escola Superior Agrária de Viseu (2012).

STAHL, W.; AUST, O.; SIES, H.; POLIDORI, M.C. Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: Tocopherols and carotenoids. **J Chromatogr.** 2001; 936:83-93.

SU, M.S.; Chien, P.J. Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. **Food Chemistry**, 104, 182-187, 2007.

SWINK J.W. Pecans as a "young" ingredient. **Food Tech Europe**, v.3, n.2, p. 75 - 76, 1996.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol**, v. 88, n. I, p. 3-19, abril 2007.

TAPIERO, H.; TEW, K.D.; NGUYEN, G.B.; MATHÉ, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, p. 200-207, 2002.

TWISK, J.W.R.; KEMPER, H.C.G.; MELLENBERGH, G.J.; MECHELEN, W.V.; POST, G.B. Relation between the longitudinal development of lipoprotein levels and lifestyle parameters during adolescence and young adulthood. **Ann Epidemiol**, v. 6, n. 3, p. 246-56, 1996.

VALACHOVIC, P.; PECHOVA, A.; MASON, T.J. Towards the industrial production of medicinal tincture by ultrasound assisted extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 111-117, 2001.

VALENZUELA, A.B.; NIETO S.K. Los antioxidantes: protectores de la calidad en La industria alimentaria. **Asociación Argentina de Grasas y Aceites**. Libro 10º Aniversario. Recopilación de Artículos Técnicos de 1990 - 2000. Ed 1 - 41, Tomo III, p. 85 - 94, 2001.

VAN GAAL, L.F.; WAUTERS, M.A.; DE LEEUW, I.H. The Beneficial Effects of Modest Weight Loss on Cardiovascular Risk Factors. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**. Belgium. Vol. 21. Suppl. 1. p.S5-S9, 1997

VENKATACHALAM, M. **Chemical composition of select pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] varieties and antigenic stability of pecan proteins**. 90p. (Dissertation) - College of Human Sciences, The Florida State University, [2004].

VILLARREAL-LOZOYA, J.E.; LOMBARDINI, L.; CISNEROS-ZEVALLOS. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. **Food Chemistry**, v.102, p. 1241-1249, 2007.

- VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 303-313, 2001.
- WANASUNDARA, P.K.P.D.; SHAHIDI, F. Antioxidants: Science, Technology, and Applications. In: SHAHIDI, F. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, **Properties and Health Effects***. 6.ed., v.1, EUA, Wiley – interscience, 2005.
- WHO. World Health Organization. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Geneva: **WHO**; 2000.
- WORLEY, R.E. Pecan physiology and composition. In C. R. Santerre (Ed.), **Pecan technology**. New York: Chapman & Hall, p. 39 – 45, 1994.
- XIA, T.; SHI, S.; WAN, X. Impact of ultrasonic-assisted extraction on the chemical and sensory quality of tea infusion. **Journal of Food Engineering** 74 (2006) 557–560, 2005.
- YAMAGUCHY, T; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAQ, J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 62, n. 6, p. 1201-1204, 1998.
- Zhang Y, Cen X. Reducing selenoprotein P expression suppresses adipocyte differentiation as a result of increased preadipocyte inflammation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 300:77-85, 2011.
- ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 5165 - 5170, 2001.

CAPÍTULO 2

**EXTRATOS DA CASCA DE NOZ PECÃ [*CARYA
ILLINOINENSIS* (WANGENH) C. KOCH] APRESENTAM
EFEITOS HIPOLIPIDEMIANTE, HIPOGLICEMIANTE E
ANTIOBESIDADE EM CAMUNDONGOS BALB-C
ISOGÊNICOS**

Extratos da casca de noz pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] apresentam efeitos hipolipidemiante, hipoglicemiante e antiobesidade em camundongos Balb-C isogênicos

Resumo

Extratos da casca de *Carya illinoensis* são popularmente consumidos como chá para prevenir patologias diversas em função de sua composição fitoquímica que apresenta quantidades significativas de compostos fenólicos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito hipolipidemiante, hipoglicemiante e antiobesidade dos extratos aquoso e hidroalcolico da casca de *Carya illinoensis in vivo*. Camundongos Balb/c foram tratados com 10 mg/Kg de extratos da casca de *Carya illinoensis* e induzidos à hipertrigliceridemia através da ingestão de azeite de oliva e à hipercolesterolemia através da aplicação de Triton WR-1339 (ensaios agudos). Os mesmos efeitos, na redução da glicemia e obesidade através do tratamento com dieta hipercalórica por 30 dias também foram testados. Os resultados demonstraram que os extratos da casca de *Carya illinoensis* foram capazes de reduzir as concentrações plasmáticas de triglicerídeos, colesterol total e glicose em até 60 %, 48 % e 60 % respectivamente, e ainda preveniram o ganho de peso dos animais com dieta hipercalórica. Nos ensaios agudo e crônico de determinação das concentrações plasmáticas de colesterol total, a maior redução foi obtida no tratamento com extrato aquoso da casca de *Carya illinoensis*. Já no ensaio agudo de inibição dos triglicerídeos o extrato hidroalcolico mostrou-se mais efetivo. Os resultados indicam que os extratos aquoso e hidroalcolico da casca de *Carya illinoensis* apresentam atividades hipolipidemiante, hiperglicêmico e efeito antiobesidade.

Palavras-chave: hipolipidemiantes, extrato aquoso, *Carya illinoensis*

1. Introdução

A obesidade é reconhecida como um crescente problema de saúde publica e sua origem é multifatorial, incluindo fatores sociais, comportamentais, psicológicos, metabólicos e genéticos. É uma condição na qual há aumento do tecido adiposo que resulta no acúmulo excessivo de gordura corporal. Esta expansão do tecido adiposo esta relacionada com um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que também são aumentadas em função da produção e

secreção de adipocinas inflamatórias. Todo esse processo pode acarretar em diversas comorbidades como hiperlipidemias e diabetes (ZHANG et al., 2015; HOLTERMAN et al., 2012; SIKARIS 2004).

Associa-se diabetes à obesidade em função do acúmulo de gordura central, especialmente intra-abdominal, que produz alterações na utilização de glicose levando a resistência à insulina através da inibição de sinais de insulina e desregulação de adipocitocinas/adipocinas. A hiperlipidemia, que é caracterizada pelo aumento dos níveis sanguíneos de colesterol e/ou triglicerídeos, é considerada a principal causa de doenças coronarianas (MATSUDA; SHIMOMURA, 2013).

O acúmulo de colesterol/triglicerídeos em eritrócitos, leucócitos, plaquetas e células endoteliais também podem elevar a concentração de EROs, resultando na oxidação de componentes celulares como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídios, principalmente de ácidos graxos polinsaturados (AGPI) e redução do sistema de defesas antioxidante (GILLER; SIGLER, 1995; ROMERO et al., 1998). A reação de EROs com AGPI presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas inicia o processo conhecido como peroxidação lipídica, que é um indicador do estresse oxidativo celular (LIMA; ABDALLA, 2001). Portanto, esta condição favorece a ruptura do equilíbrio redox, contribuindo para o estabelecimento do estresse oxidativo (AFONSO et al., 2013; MIRI et al., 2012; NIELSEN et al., 1997; ANDERSON; CASTELLI; LEVY, 1987).

O papel do estresse oxidativo na iniciação e progressão da obesidade, hiperlipidemia e resistência à insulina conduz à hipótese de que os antioxidantes podem ser utilizados como agentes terapêuticos, diminuindo o estado oxidativo associado com o ganho de peso corporal e suas comorbidades.

Assim, a suplementação com oral de antioxidantes pode revelar-se uma ferramenta não invasiva para prevenir ou reduzir o estresse oxidativo. Uma alternativa de suplementação é o uso de extratos aquoso e hidroalcolico da casca de noz pecã (*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch), os quais são ricos em compostos fenólicos e apresentam potente capacidade antioxidante. Em trabalhos anteriores foram identificados os ácidos gálico, elágico, clorogênico e p-hidroxibenzóico, além dos flavonóides epigallocatequina e epicatequina galato (PRADO et al., 2014; MÜLLER et al., 2013; PORTO et al., 2013).

Popularmente ao consumo do chá da casca de *Carya illinoensis* têm sido atribuídas diversas propriedades benéficas à saúde, tais como

redução do colesterol e dos níveis de glicose, prevenção de distúrbios estomacais e intestinais, redução de peso, entre outros (WORLEY, 1994). O uso de extratos da casca de *Carya illinoensis* já foi associado à proteção hepática contra danos causados pelo álcool, prevenção de desordens extrapiramidais e danos oxidativos provocados pelo fumo. Efeitos esses associados à presença dos compostos fenólicos na matriz vegetal (MÜLLER et al., 2013; TREVIZOL et al., 2011; RECKZIEGEL et al., 2011).

Portanto, considerando a lacuna existente na investigação dos efeitos do uso agudo e crônico de extratos da casca de *Carya illinoensis*, neste trabalho foi estudado o efeito de extratos aquoso e hidroalcolico de *Carya illinoensis* na manutenção dos níveis plasmáticos de colesterol, triglicerídeos, glicose e ganho de peso de camundogos Balb/c isogênicos submetidos à dieta normal e hipercalórica.

2. Materiais e Métodos

2.1 Obtenção do pó e dos extratos da casca de *Carya illinoensis*

As cascas foram trituradas, secas e moídas de acordo com o método proposto por Prado et al. (2009^a). Em seguida, foram submetidas ao processo de torrefação a 100 °C em estufa com circulação de ar e armazenadas com atmosfera de nitrogênio a -24 °C (RODRIGUES et al., 2008).

Os extratos de casca de noz pecã foram obtidos adicionando o pó da casca em etanol absoluto e/ou água destilada a 98/100 °C (10 g/L) e deixados em infusão em ultrassom (modelo EGS-5HD, marca Enge Solutions), em diferentes condições de extração de tempo e temperatura (30 e 60 minutos e 60 e 80 °C) e concentração de solventes água/etanol absoluto (100 %, 80 % e 60 %). Depois as infusões foram filtradas a vácuo, em papel filtro, (Whatman 541, 125 mm) e concentradas em rota evaporador. Os extratos foram secos por atomização em spray dryer utilizando mini spray dryer (modelo B-290 Buchi, Perdizes, São Paulo, Brasil).

2.2 Determinação de compostos fenólicos totais dos extratos de casca de *Carya illinoensis*

A determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais foi realizada utilizando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu proposto

por Beal (2006), Budini, Tonelli e Girotti (1980), com algumas modificações. Alíquotas de 100 µL das amostras na concentração de 0,83 g/L foram oxidadas com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu em balões volumétricos (10 mL). A reação foi neutralizada com 1,5 mL de carbonato de sódio saturado (75 g/L) e os volumes completados com água deionizada.

Após a incubação das amostras por 2 horas a temperatura ambiente e protegidas da luz, a absorbância da solução azul resultante foi medida a 764 nm em espectrofotômetro (modelo Spectrophotometer SP 2000 UV, marca Bel Photonics®). A quantificação foi obtida com base em uma curva padrão de ácido gálico e os resultados expressos em mg GAE/g (mg equivalente de ácido gálico/g de amostra) em massa seca.

A partir dos resultados obtidos e análise estatística, foram selecionados como extratos padrões aqueles que obtiveram as maiores concentrações de compostos fenólicos. Obtendo um Extrato Hidroalcolólico (EH) e um Extrato Aquoso (EA) para as demais análises.

2.3 Determinação de taninos condensados dos extratos padrões da casca de noz-pecã

Para a determinação do teor de taninos condensados procedeu-se de acordo com Price, Vanscoyoc e Butter (1978) com adaptação de Villarreal-Lozoya, Lombardini e Cisneros-Zevallos (2007). Foi utilizada uma concentração de 1 g/L dos extratos hidroalcolólico e aquoso e diluído em etanol absoluto, coletadas alíquotas de 1 mL das diluições dos extratos e colocadas em 2 tubos de ensaio separados (1 para a amostra e outro para o branco). Após foram adicionados 5 mL do reagente Vanilina (0,5 g de reagente e 200 mL de HCl 4 %/metanol) nas amostras, e HCl 4 %/metanol no branco. Os tubos de ensaio foram mantidos ao abrigo da luz por um período de 20 minutos e as medidas das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro (modelo Spectrophotometer SP 2000 UV, marca Bel Photonics®) a 500 nm. Os resultados foram expressos em mg CE/g (mg equivalente de catequina/g de amostra).

2.4 Determinação de atividade antioxidante in vitro

2.4.1 Método do sequestro do radical ABTS

O método ABTS [2,2'-azino-bis-(3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] foi realizado de acordo com Ré et al. (1999) com algumas modificações. Foram preparadas as soluções do radical ABTS (7 mM – 3,836 g/L do reativo ABTS dissolvido em água deionizada), e solução de persulfato potássico (2,45 mmol.L⁻¹ – 1,32 g/L dissolvido em água deionizada). Em seguida 10 mL de solução do radical ABTS e 10 mL da solução de persulfato de potássio foram homogeneizados e mantidos em frasco âmbar pelo mínimo de 16 horas, protegido da luz. Para o ensaio da amostra, foi pipetada uma alíquota de 200 µL do radical formado e diluído em 10 mL de etanol 96° P.A. Medidas de absorvância foram realizadas em cubetas de 10 mm e em espectrofotômetro (modelo Spectrophotometer SP 2000 UV, marca Bel Photonics®) a 754 nm para certificação da densidade óptica do radical em torno de 0,700 ± 0,05. Uma alíquota de 980 µL do radical ajustado foi pipetada e transferida para uma cubeta de 10 mm (1 mL) procedendo a medida da absorvância (A₇₅₄=A_i). Imediatamente em seguida foi adicionado 20 µL da amostra e homogeneizado por alguns segundos. Aguardou-se o tempo de reação de 6 minutos e procedeu-se novamente a leitura da absorvância em espectrofotômetro a 754 nm (A₇₅₄ = A_f). O cálculo da porcentagem de inibição do radical foi realizado pela equação 1:

$$\% \text{ de inibição do radical} = (1 - A_f/A_i) \times 100$$

(Equação 1)

Onde, “A_i” é a absorvância inicial e “A_f” é a absorvância final. Trolox foi utilizado como padrão (15 µM=0,13209 g / 500 mL) e os resultados foram expressos em µmol TEAC.g⁻¹ (capacidade antioxidante equivalente em Trolox).

2.4.2 Método do sequestro do radical DPPH

O método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi realizado de acordo com Mensor (2001) seguido de modificações conforme Prado et al. (2009). Após o preparo do radical (0,1 mmol.L⁻¹ – 1 g/L do reativo DPPH dissolvido em etanol absoluto), foi pipetada uma alíquota de 2,9 mL do mesmo e colocado para reagir em tubos de ensaio adicionados de 0,1 mL do extrato. Os tubos de ensaio foram mantidos ao abrigo da luz por 30 minutos e em seguida as medidas de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro (modelo Spectrophotometer SP 2000

UV, marca Bel Photonics®) a 515 nm. O trolox foi utilizado como padrão (150 mg/L). O cálculo da porcentagem de inibição do radical foi realizado pela equação 2:

$$\% \text{ de inibição do radical} = (1 - A_f/A_o) \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde, “A0” é a absorbância inicial e “Af” é a absorbância final. Os cálculos foram realizados para cada concentração de amostras analisadas de forma que ao obter os resultados se pode realizar uma curva dose-resposta. Os resultados foram expressos em mg TEAC.g⁻¹ (capacidade antioxidante equivalente em Trolox).

2.4.3 Determinação do potencial de inibição da peroxidação lipídica - TBARS

A inibição da peroxidação lipídica foi determinada por quantificação do produto de decomposição do peróxido lipídico malonaldeído (MDA) baseado na reação do ácido tiobarbitúrico utilizando gema de ovo como substrato oxidável (ZHANG; YU, 1997). Resumidamente, 0,8 mL de homogenato de ovo e 0,5 mL de solução da amostra a diferentes concentrações foram misturadas, em seguida, 0,4 mL de FeSO₄ 25 mmol/L foi adicionado para iniciar a peroxidação lipídica. Após incubação a 37°C durante 60 min. 1,0 mL de ácido tricloroacético a 20% e 1,0 mL de ácido tiobarbitúrico a 0,8% foram adicionados a fim de parar a reação, a mistura resultante foi agitada e aquecida a 100°C durante 15 min. e, em seguida, centrifugada a 6000 rpm durante 10 min. Em seguida, foi pipetado do sobrenadante alíquotas de 200 µL em microplaca de 96 poços e realizado leitura a 532 nm em leitora multifuncional de microplacas (TECAN). A inibição da peroxidação lipídica foi calculada pela equação 3:

$$\text{Efeito de inibição (\%)} = (1 - A_{\text{amostra}} / A_{\text{controle}}) * 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde Acontrole é a absorbância do controle sem as amostras testadas, e Aamostra é a absorbância de amostras testadas.

O valor EC50 (mg/ml) representa a concentração efetiva em que a peroxidação lipídica é inibida por 50%. BHT e ácido ascórbico foram usados para comparação.

2.3 Ensaios *in vivo*

2.3.1 Reagentes

Orlistat (Xenical[®]).

Lovastatina (Lovasterol[®]).

O Triton WR-1339.

Kits para análise de métodos enzimáticos: Colesterol Total (labtest), triglicerídeos (triglicérides liquiform).

2.3.2 Dieta

Os animais receberam as seguintes dietas:

1. Dieta Normal (DN): constituída de ração comercial (Bio Base Alimentação Animal) e água.
2. Dieta Hipercalórica (DH): dieta tipo cafeteria (LOUZADA, 2013), composta por alimentos frescos e industrializados, bebida com alto teor de açúcar, ração comercial e água.

As porções de cada alimento eram estabelecidas diariamente conforme o padrão de consumo, pelo do controle diário da ingestão. Quando no dia posterior à oferta não houvesse sobra de algum dos itens, este era aumentado no próximo dia. Dessa maneira, sempre foi ofertado uma quantidade superior ao consumido.

2.3.3 Animais

Camundongos Balb/C isogênicos, (fêmeas) pesando de 19 ± 2 g, foram alojados sob condições ambientais controladas (12 horas ciclo claro-escuro, 20 ± 2 °C e 60 % de umidade do ar). Os animais tiveram livre acesso à alimentação e água e foram submetidos ao período de adaptação às condições do experimento durante sete dias antes do início dos tratamentos.

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com requerimentos legais apropriados para a espécie e sob aprovação pelo comitê de ética com uso de animais (CEUA/UFSC) com protocolo PP00784.

2.3.4 Ensaios Agudos

2.3.4.1 Redução das concentrações plasmáticas de triglicerídeos

O ensaio da inibição da absorção aguda de lipídeos pancreáticos para determinação de triglicerídeos sanguíneos foi realizado conforme Ferreira (2010), com algumas modificações. Os animais foram mantidos em jejum de 12 horas com livre acesso apenas à água e divididos em 5 grupos (n: 6):

1. Controle (C): animais tratados com ração padrão e água.
2. Controle Negativo (CN): animais tratados com azeite de oliva (0,05 mL Via Oral (VO)).
3. Controle Positivo (CP): animais tratados com Orlistat (6 mg/kg de peso VO) e 30 minutos após receberam azeite de oliva (0,05 mL VO).
4. EA: animais tratados com extrato aquoso da casca de noz-pecã (10,0 mg/kg VO) e 30 minutos depois receberam azeite de oliva (0,05 mL VO).
5. EH: animais tratados com extrato hidroalcólico da casca de noz-pecã (10,0 mg/kg VO) e 30 minutos depois receberam azeite de oliva (0,05 mL VO).

Após 3, 6 e 9 horas da administração do azeite de oliva o sangue foi coletado para determinação dos níveis de triglicerídeos (TG) através de métodos enzimáticos.

2.3.4.2 Redução das concentrações plasmáticas de colesterol total

O ensaio foi realizado segundo Rocha (2009). Camundongos foram mantidos em jejum por 12 horas antes dos tratamentos e durante todo o período experimental (36 horas). Água foi fornecida *ad libitum*. Os animais foram divididos em 6 grupos (n: 6):

1. Controle Negativo (CN): azeite de oliva (10 mL/Kg VO) 30 minutos antes da salina (2,5 mL/Kg Intraperitoneal (IP)).
2. Controle Positivo (CP): azeite de oliva (10 mL/Kg VO) 30 minutos antes do Triton WR-1339 (400 mg/Kg , 2,5 mL/Kg IP).
3. EA + salina: extrato aquoso da casca de noz-pecã (10 mg/Kg; 10 mL/Kg VO) 30 minutos antes da salina (2,5 mL/Kg IP).
4. EH + salina: extrato hidroalcólico da casca de noz-pecã (10 mg/Kg; 10mL/Kg VO) 30 minutos antes da salina (2,5 mL/Kg IP).
5. EA + Triton WR-1339: extrato aquoso da casca de noz-pecã (10 mg/Kg; 10 mL/Kg VO) 30 minutos antes do Triton WR-1339 (400 mg/Kg; 2,5 mL/Kg IP);

6. EH + Triton WR-1339: recebeu extrato hidroalcoólico da casca de noz-pecã (10 mg/Kg; 10 mL/Kg VO), 30 minutos antes do Triton WR-1339 (400 mg/Kg; 2,5 mL/Kg IP).

Vinte e quatro horas após a administração de Triton WR-1339 e de salina, o sangue foi coletado para a determinação do Colesterol Total (CT) por métodos enzimáticos.

2.3.5 Ensaios Crônicos

2.3.5.1 Atividades hipolipidemiante e hipoglicêmica

O ensaio crônico, de submissão dos animais a obesidade, a hiperlipidemia e a hiperglicemia, foi realizado de acordo com Ferreira (2010) com algumas modificações. Camundongos foram divididos em 10 grupos (n: 6):

1. Dieta Normal (DN).
2. DN + EA da casca de noz-pecã.
3. DN + EH da casca de noz-pecã.
4. DN + Orlistat.
5. DN + Lovastatina.
6. Dieta Hipercalórica (DH),
7. DH + EA da casca de noz-pecã.
8. DH + EH da casca de noz-pecã.
9. DH + Orlistat.
10. DH + Lovastatina.

Os extratos da casca de noz-pecã, a lovastatina e o orlistat (10,0 mg/kg VO) foram administrados por 30 dias. Os animais dos grupos 1 e 6 (CN) receberam água via oral para serem submetidos ao mesmo nível de estresse dos animais tratados. Após esse período, o sangue foi coletado para determinação do perfil lipídico e perfil glicêmico através de métodos enzimáticos.

2.3.5.2 Atividade antiobesidade

Para determinação da atividade antiobesidade foram utilizadas as medidas antropométricas dos animais. O peso em gramas (g) e o comprimento naso-anal (CNA) em centímetros (cm) foram aferidos semanalmente para posterior determinação do índice de Lee, representado pela fórmula:

Índice de Lee= (razão da raiz cúbica da massa corporal (g) / CNA (cm) * 1000) (ARAÚJO et al., 2009).

Diferentemente do índice de massa corporal, o Índice de Lee não tem um nível classificatório, sendo assim, quem tem maior valor revela maior propensão de apresentar maiores índices de adiposidade.

2.4 Análise estatística

Todos os parâmetros bioquímicos mencionados foram mensurados em duplicata e triplicata. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA e complementado pelo teste de comparação múltipla de TUKEY-KRAMER ou de BONFERRONI em nível de significância de 95 % ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1 Caracterização dos extratos da casca de *Carya illinoensis*

Os extratos de *Carya illinoensis* apresentaram teor elevado de compostos fenólicos e a mistura de etanol e água favoreceu a extração dos mesmos (Tabela 1.2).

Como a atividade antioxidante esta diretamente relacionada à presença dos compostos fenólicos, este resultado foi confirmado com a atividade antioxidante significativamente maior para o extrato hidroalcolico nos sistemas ABTS e DPPH.

A inibição da peroxidação lipídica foi dependente das concentrações testadas e atingiu para concentração de 1 mg/mL, 52,4 % e 59,3 % de inibição para os extratos aquoso e hidroalcolico, respectivamente. A diferença, no entanto, não foi estatisticamente significativa entre os extratos testados.

Tabela 1.2: Caracterização dos extratos da casca de *Carya illinoensis*

		Extrato Aquoso	Extrato Hidroalcólico
Fenólicos Totais	M ± DP (mg GAE/g)	465,0 ± 5,77	688,09 ± 4,71*
Taninos Condensados	M ± DP (mg CE/g)	2351,6 ± 4,95	2795,8 ± 1,0*
Atividade Antioxidante DPPH	M ± DP (µM TEAC/g)	1.085,9 ± 4,30	1.151,4 ± 3,73*
	% AA [125µg/mL]	80,7 ± 0,19	84,9 ± 0,18*
	IC50 % [µg/mL]	36,5 ± 0,01	30,4 ± 0,02*
Atividade Antioxidante ABTS	M ± DP (µM TEAC/g)	1.158,5 ± 2,04	1.275,37 ± 0,41*
	% AA [125µg/mL]	88,6 ± 0,08	96,7 ± 0,36*
	IC50 % [µg/mL]	9,61 ± 0,04	6,35 ± 0,03*
% Inibição da Peroxidação Lipídica TBARS	Concentração extrato [1,0 mg/mL]	52,40 ± 0,07	59,30 ± 0,05

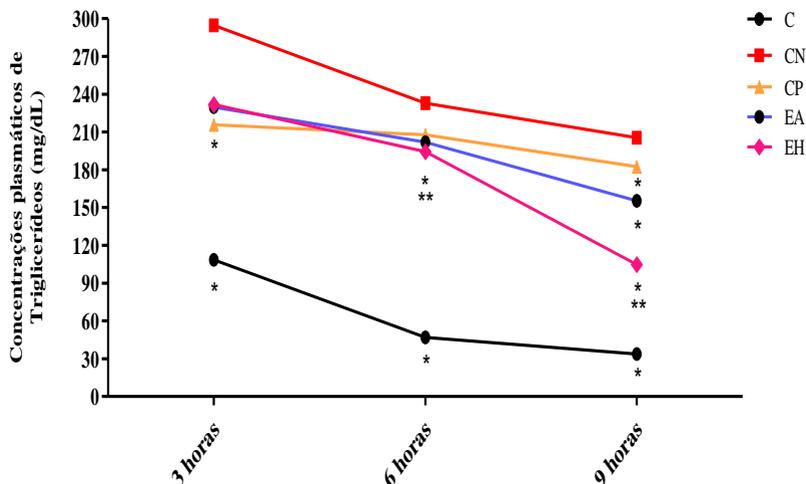
M-média; DP-desvio padrão; GAE-equivalente de ácido gálico/grama de amostra; CE-equivalente catequina/grama de amostra; TEAC-equivalente trolox/grama de amostra; AA-atividade antioxidante; IC50%-concentração inibitória de 50 %. * $P < 0,05$ entre as amostras avaliadas pelo teste Bonferroni.

3.2. Ensaios *in vivo*

3.2.1 Redução das concentrações plasmáticas de triglicerídeos

Os extratos da casca de *Carya illinoensis* e o fármaco Orlistat (controle positivo) reduziram as concentrações plasmáticas de triglicerídeos em todos os intervalos de tempo testados quando comparados ao controle negativo (azeite de oliva) (Figura 1.2). A capacidade de inibição dos extratos da casca de *Carya illinoensis* mostrou-se significativamente maior do que a inibição provocada pelo controle positivo após 6 e 9 horas do tratamento, sendo a maior redução das concentrações plasmáticas de triglicerídeos observada no grupo tratado com extrato hidroalcólico da casca de *Carya illinoensis*.

Figura 1.2: Efeito dos extratos da casca de *Carya illinoensis* (10mg/kg) sobre os níveis plasmáticos de triglicerídeos após 3, 6 e 9 horas de tratamento. C- controle; CN- controle negativo-azeite de oliva; CP- controle positivo-Orlistat; EA- extrato aquoso da casca de *Carya illinoensis*. * $P < 0,05$ C, CP, EA e EH vs CN; ** $P < 0,05$ EA vs EH pelo teste Bonferroni.

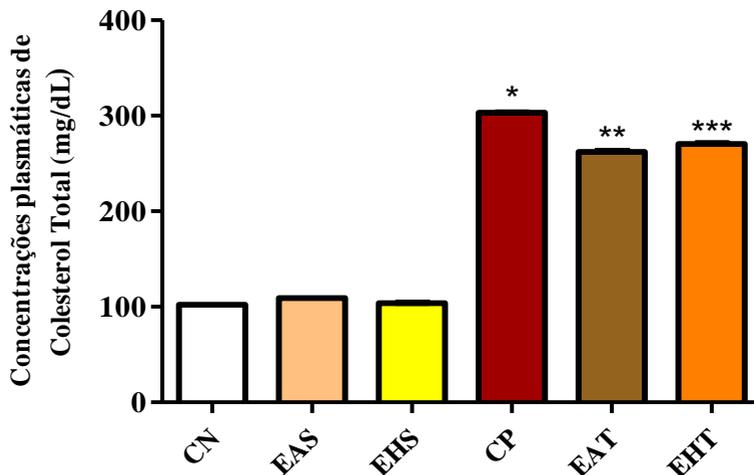


3.2.2 Redução das concentrações plasmáticas de colesterol total

Os extratos da casca de *Carya illinoensis* apresentaram um efeito maior na redução do colesterol total nos grupos induzidos à hipercolesterolemia por Triton WR-1339 quando comparados com o grupo sem tratamento (controle positivo – azeite de oliva + Triton WR-1339) (Figura 2.2). O efeito foi significativamente maior para o grupo tratado com extrato aquoso da casca de *Carya illinoensis*.

Figura 2.2: Efeito dos extratos da casca de *Carya illinoensis* (10mg/kg) sobre os níveis plasmáticos de colesterol total. CN-controle negativo (azeite de oliva); CP-controle positivo (azeite de oliva + Triton WR- 1339); EAS-extrato aquoso da casca de *Carya illinoensis* + salina; EAT-extrato aquoso da casca de *Carya illinoensis* + Triton WR- 1339; EHS- extrato hidroalcolólico da casca de *Carya illinoensis* + salina; EHT-extrato hidroalcolólico da casca de *Carya illinoensis* + Triton WR- 1339.

*, **, ***, $P < 0,05$ EAT, EHT vs CP avaliados pelo teste Bonferroni.

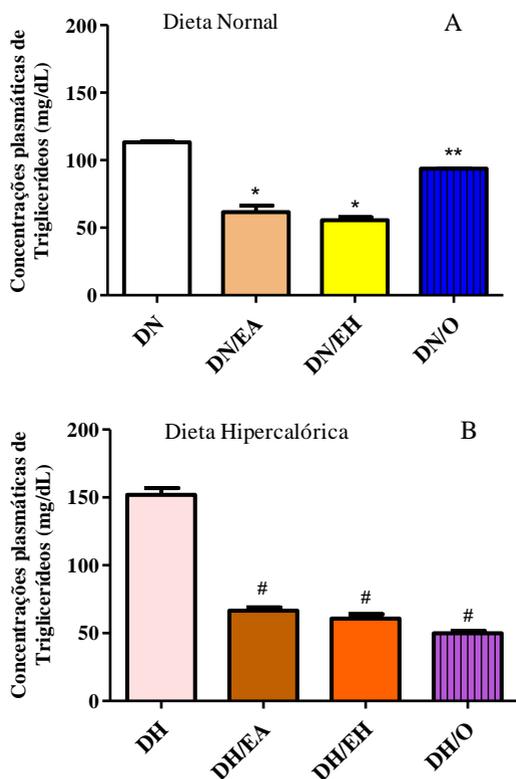


3.2.3 Redução das concentrações plasmáticas de triglicerídeos

Após 30 dias recebendo as dietas normal e hipercalórica, foi possível observar que os tratamentos com extratos da casca de *Carya illinoensis* e com o fármaco Orlistat diminuíram as concentrações plasmáticas de triglicerídeos. Nos grupos com dieta normal (Figura 3.2 A), as concentrações plasmáticas de triglicerídeos foram 46 % e 51 % menores nos grupos tratados com extrato aquoso e hidroalcolólico da casca de *Carya illinoensis*, respectivamente, quando comparadas ao grupo com dieta normal sem suplementação (controle negativo). Nos grupos tratados com extrato aquoso e hidroalcolólico da casca de *Carya illinoensis* e que receberam dieta hipercalórica (Figura 3.2 B) a redução dos níveis plasmáticos de triglicerídeos foi de 56 % e 60 %, respectivamente, em relação ao grupo com dieta hipercalórica sem suplementação (controle negativo).

Figura 3.2: Efeito dos extratos da casca de *Carya illinoensis* (10mg/kg) sobre os níveis plasmáticos de triglicérides após 30 dias de tratamento. 3 A: DN- dieta normal; DN/EA- dieta normal + extrato aquoso da casca de *Carya illinoensis*; DN/EH – dieta normal + extrato hidroalcóolico da casca de *Carya illinoensis*; DN/O- dieta normal + Orlistat; 3 B: DH-dieta hipercalórica; DH/EA- dieta hipercalórica + extrato aquoso da casca de *Carya illinoensis*; DH/EH- dieta hipercalórica + extrato hidroalcóolico da casca de *Carya illinoensis*; DH/O- dieta hipercalórica + Orlistat.

* $P < 0,05$ entre os tratamentos suplementados comparados com a dieta normal e # $P > 0,05$ entre os tratamentos suplementados comparados com a dieta hipercalórica pelo teste Bonferroni.



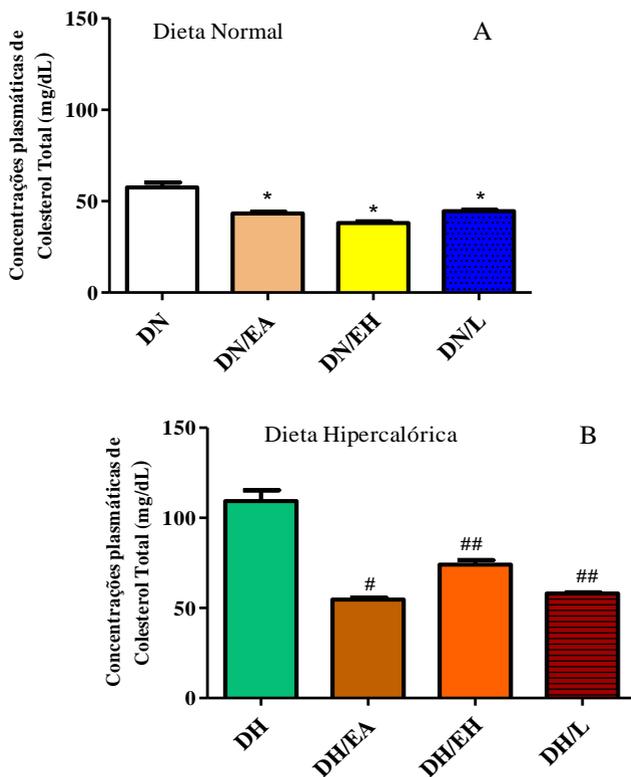
3.2.4 Redução das concentrações plasmáticas de colesterol total

Foi possível observar nos resultados que os tratamentos com extratos da casca de *Carya illinoensis* e com o fármaco Lovastatina

(controle positivo) reduziram as concentrações de colesterol total plasmáticos, tanto na dieta normal quanto na dieta hipercalórica quando comparado aos controles negativos. No entanto, nos grupos que receberam dieta hipercalórica a inibição da absorção de colesterol total plasmático foi mais expressiva, chegando a inibir 49,9 % e 32,2 % com os extratos aquoso e hidroalcolico da casca de *Carya illinoenses*, respectivamente e 46,9 % com o controle positivo Lovastatina (Figura 4.2).

Figura 4.2: Efeito dos extratos da casca de *Carya illinoensis* (10mg/kg) sobre os níveis plasmáticos de colesterol total após 30 dias de tratamento. 4.2 A: DN- dieta normal; DN/EA- dieta normal + extrato aquoso da casca de *Carya illinoensis*; DN/EH- dieta normal + extrato hidroalcoólico da casca de *Carya illinoensis*; DN/L- dieta normal + Lovastatina; 4.2 B: DH- dieta hipercalórica; DH/EA- dieta hipercalórica + extrato aquoso da casca de *Carya illinoensis*; DH/EH- dieta hipercalórica + extrato hidroalcoólico da casca de *Carya illinoensis*; DH/L- dieta hipercalórica + Lovastatina.

* $P < 0,05$ entre os tratamentos suplementados comparados com a dieta normal e # e ## $P > 0,05$ entre os tratamentos suplementados comparados com a dieta hipercalórica pelo teste Bonferroni



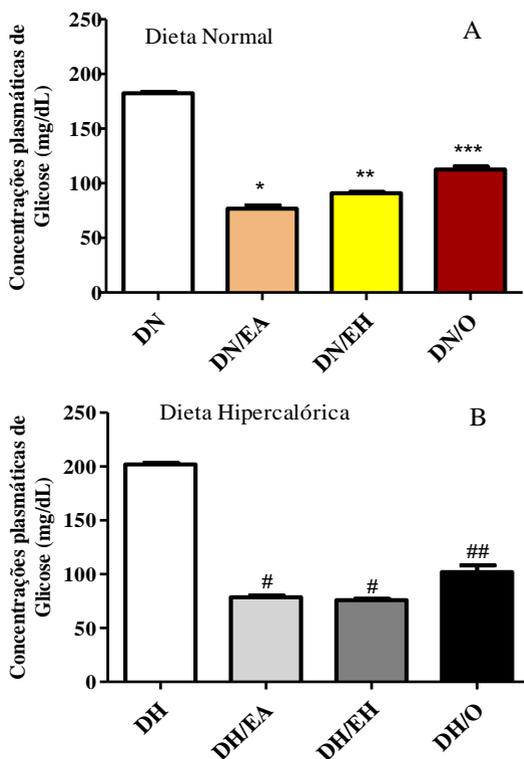
3.2.5 Redução das concentrações plasmáticas de glicose

Os níveis de glicose foram significativamente menores nos grupos tratados com extratos da casca de *Carya illinoensis* e com o fármaco Orlistat (controle positivo) em relação aos grupos dieta normal e dieta

hipercalórica. Observou-se que o efeito hipoglicêmico dos extratos da casca de *Carya illinoensis* foi significativamente maior quando comparado ao controle positivo tanto nos grupos que receberam dieta normal quanto nos grupos com dieta hipercalórica (Figura 5.2).

Figura 5.2: Efeito dos extratos da casca de *Carya illinoensis* (10 mg/kg) sobre os níveis plasmáticos de glicose após 30 dias de tratamento. 5.2 A: DN- dieta normal; DN/EA- dieta normal + extrato aquoso da casca de *Carya illinoensis*; DN/EH- dieta normal + extrato hidroalcolólico da casca de *Carya illinoensis*; DN/O- dieta normal + Orlistat; DN/L- dieta normal + Lovastatina; 5.2 B: DH- dieta hipercalórica; DH/EA- dieta hipercalórica + extrato aquoso da casca de *Carya illinoensis*; DH/EH- dieta hipercalórica + extrato hidroalcolólico da casca de *Carya illinoensis*; DH/O- dieta hipercalórica + Orlistat; DH/L- dieta hipercalórica + Lovastatina.

*, **, *** $P < 0,05$ entre os tratamentos suplementados comparados com a dieta normal e #, ## $P > 0,05$ entre os tratamentos suplementados comparados com a dieta hipercalórica pelo teste Bonferroni.

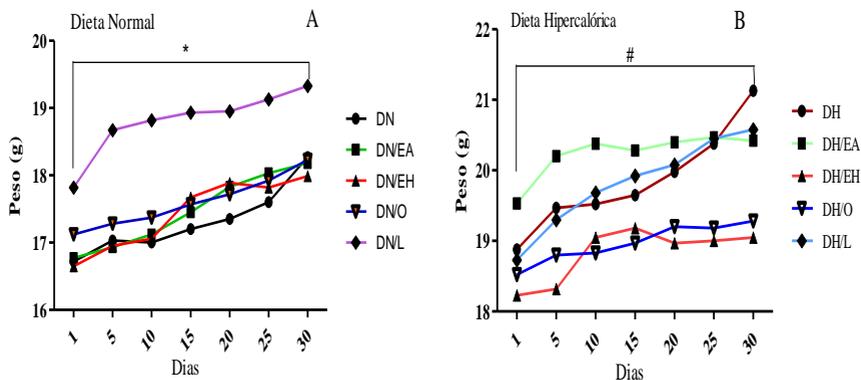


3.2.6 Determinação do Efeito Antiobesidade

Os animais apresentaram, no início do experimento, peso médio de 17 g e 18,7 g e ao final de 18,4 g e 20 g nos grupos que receberam dieta normal e hipercalórica respectivamente. Nos grupos com dieta normal o ganho de peso foi em média de 1,4 g e mostrou-se significativo para todos os tratamentos (Figura 6.2 A). Em contrapartida, nos grupos que receberam dieta hipercalórica o ganho de peso foi significativo somente para os animais dos grupos controle negativo e Lovastatina (2,25 g e 1,85 g respectivamente) (Figura 6.2 B), demonstrando que os extratos da casca de *Carya illinoensis* preveniram o ganho de peso induzido pela dieta hipercalórica.

Figura 6.2: Efeito antiobesidade dos extratos da casca de *Carya illinoensis* (10mg/kg) após 30 dias de tratamento. 6.2 A: DN- dieta normal; DN/EA- dieta normal + extrato aquoso da casca de *Carya illinoensis*; DN/EH- dieta normal + extrato hidroalcolólico da casca de *Carya illinoensis*; DN/O- dieta normal + Orlistat; DN/L- dieta normal + Lovastatina; 6.2 B: DH- dieta hipercalórica; DH/EA- dieta hipercalórica + extrato aquoso da casca de *Carya illinoensis*; DH/EH- dieta hipercalórica + extrato hidroalcolólico da casca de *Carya illinoensis*; DH/O- dieta hipercalórica + Orlistat; DH/L- dieta hipercalórica + Lovastatina.

* $P < 0,05$ entre o 1° e 30° dia de tratamento para todos os grupos da figura 6A; # $P < 0,05$ entre o 1° e 30° dia de tratamento para os grupos DH e Lovastatina® pelo teste Bonferroni.



4. Discussão

O uso da casca de *Carya illinoensis* para o preparo de infusões é comum principalmente entre a população do sul do Brasil que utiliza o chá para alívio da obstipação e até prevenção de doenças cardíacas e câncer (ORTIZ-QUEZADA et al., 2011; GARDEA; MARTÍNEZ-TÉLLEZ, 2011). Estas propriedades são atribuídas à presença de compostos fenólicos e taninos condensados na casca da noz. A concentração de compostos fenólicos totais determinada no presente estudo foi superior a estudos realizados por Prado et al. (2014), Prado et al. (2013) e Villareal-Lozoya et al. (2007). As diferenças encontradas podem ser explicadas pelos métodos de extração e solventes utilizados.

É bem postulado que os compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante em função da capacidade de óxido-redução, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres, quelando o oxigênio triplete e singleto ou decompondo peróxidos, além de modular as vias de sinalização celular e expressão de genes (SOBRATTEE et al., 2005). Assim, sugere-se o envolvimento dos compostos fenólicos da dieta nos processos bioquímicos e fisiológicos contra distúrbios mediados por estresse oxidativo e sua ação na prevenção de várias doenças degenerativas, tais como dislipidemias, resistência à insulina e obesidade.

Os triglicerídeos desempenham papel-chave na regulação e interações de lipoproteínas no metabolismo normal. O tratamento com os extratos da casca de *Carya illinoensis*, ricos em compostos fenólicos, foi capaz de inibir a absorção de triglicerídeos no ensaio agudo e no crônico. No ensaio agudo, a redução da concentração de triglicerídeos plasmáticos variou de 13 % a 24 % com extrato aquoso e de 16 % a 49 % com extrato hidroalcolólico da casca de *Carya illinoensis*. Já no experimento crônico, pode-se perceber uma inibição em cerca de 56 % e de 60 % nos tratamentos com extrato aquoso e hidroalcolólico da casca de *Carya illinoensis* respectivamente, entre os grupos que receberam dieta hipercalórica por 30 dias.

Os resultados hipotrigliceridêmicos observados no presente trabalho foram semelhantes aos reportados por Hsu et al. (2011), que utilizando extratos de *Camellia sinensis*, cuja composição fitoquímica é semelhante ao extrato de *Carya illinoensis*, obtiveram uma redução de 40 % nas concentrações plasmáticas de triglicerídeos. Os resultados obtidos indicam que os extratos da casca de *Carya illinoensis* podem ser capazes de restaurar o metabolismo catabólico dos triglicerídeos. Os

mecanismos de ação associados a este efeito podem ser um aumento da estimulação das atividades lipolíticas da lipoproteína lipase (LPL) e da lipase hepática (LH) (HARNAFIA et al., 2013).

As concentrações plasmáticas de colesterol total também sofreram influência pela suplementação com extratos da casca de *Carya illinoensis*. Os animais que receberam tratamento com extratos reduziram significativamente os níveis plasmáticos de colesterol total em ambos os ensaios realizados. No ensaio crônico, com dieta hipercalórica, o extrato aquoso da casca de *Carya illinoensis* apresentou efeito semelhante ao fármaco padrão utilizado no controle da hipercolesterolemia.

Associam-se os efeitos mais uma vez à grande quantidade de compostos fenólicos totais encontrados nos extratos. Os mecanismos para a redução do colesterol total podem ser uma diminuição na solubilidade micelar do colesterol no trato digestivo, um aumento do fluxo biliar, colesterol biliar e concentração de ácido biliar e um subsequente aumento da excreção fecal de esteroides, como descrito anteriormente em outros trabalhos (AFONSO et al., 2013; RAEDERSTORFF et al., 2003). Os resultados apresentados para os níveis de colesterol total plasmático também podem ser relacionados às baixas concentrações de triglicerídeos encontrados nos grupos tratados com os extratos de *Carya illinoensis*, uma vez que desempenham um papel-chave na regulação de interações entre lipoproteínas para manter o metabolismo lipídico normal (HARNAFI et al., 2009).

Sabe-se que estados insulinoresistentes, também são caracterizados por distúrbios no metabolismo de ácidos graxos livres e são acompanhados por acúmulo de triglicerídeos. Consequentemente, o acúmulo de ácidos graxos próximo da matriz mitocondrial, onde os processos oxidativos ocorrem, os tornam particularmente propensos a peroxidação lipídica, resultando em proteínas mitocondriais danificadas e capacidade oxidativa reduzida. Além disso, o aumento da gordura visceral produz citocinas inflamatórias, que podem induzir o aumento do estresse oxidativo e reduzir o estímulo de insulina (ROBERTS; SINDHU, 2009).

Os resultados que demonstram que a concentração de glicose reduziu em cerca de 60 % nos grupos tratados com os extratos da casca de *Carya illinoensis*, indicam a íntima relação entre os resultados positivos encontrados nas análises de lipídeos e a ação dos extratos como antioxidantes. Estudos com resultados semelhantes aos encontrados, ainda atribuem a redução dos níveis de glicose plasmática, pelo uso de antioxidantes, à proteção da função das células β , à

modulação do transporte de glicose, a eliminação de glicose ou ainda a uma melhor secreção de insulina (SHIVANNA et al., 2013; KANETO et al., 1999).

Por fim, os resultados que demonstraram que o ganho de peso foi maior nos animais que receberam dieta hipercalórica e significativamente menor em relação aos grupos tratados com os extratos da casca de *Carya illinoensis*, suportam a hipótese de que os extratos apresentam efeito antiobesidade. Estes resultados podem ser atribuídos à presença de flavonoides do tipo catequinas nos extratos.

Komes et al. (2010), reportaram que estas substâncias foram capazes de reduzir a ingestão de alimentos, o peso corporal, os níveis de testosterona, estradiol, leptina, insulina, fator de crescimento semelhante à insulina, glicose, colesterol e de triglicerídeos no sangue. O efeito antiobesidade das catequinas possivelmente está associado a sua capacidade de inibir a proliferação e diferenciação dos adipócitos, reduzir a absorção de gordura, inibir no tecido adiposo a enzima COMT (catecol-O-metil-transferase), resultando em um aumento do efeito da norepinefrina, potencializando a oxidação de gorduras pela ativação da termogênese (THIELECKE; BOSCHMANN, 2009).

5. Conclusão

Os extratos aquoso e hidroalcolólico da casca de *Carya illinoensis* foram capazes de reduzir as concentrações plasmáticas de triglicerídeos, colesterol e glicose bem como o ganho de peso de animais induzidos por dieta hipercalórica. Estes resultados foram associados à elevada concentração de compostos fenólicos nos extratos que foi relacionada à atividade antioxidante dos mesmos. Portanto, sugere-se que as atribuições populares do uso do chá da casca de *Carya illinoensis* na prevenção do desenvolvimento de hiperlipidemia, hiperglicemia e obesidade são válidas. Desta forma, o extrato da casca de *Carya illinoensis* pode configurar-se como alternativa na atenção dessas patologias.

6. Agradecimentos

À empresa Divinut Ind. de Nozes Ltda, localizada na cidade de Cachoeira do Sul – RS, pelo fornecimento da matéria prima e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

7. Referências

- AFONSO, M.S., SILVA, A.M.O., CARVALHO, E.B.T., RIVELLI, D.P., BARROS, S.B.M., ROGERO, M.M., LOTTENBERG, A.M., TORRES, R.P., MANCINI-FILHO, J. Phenolic compounds from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) attenuate oxidative stress and reduce blood cholesterol concentrations in diet-induced hypercholesterolemic rats. **Nutrition & Metabolism**, 10:19, 2013.
- ANDERSON, K.M., CASTELLI, W.P., LEVY, D. Cholesterol and mortality. 30 years of follow-up from the Framingham study. **JAMA** 257, 2176–2180, 1987
- BUDINI, R., TONELLI, D., GIROTTI, S. Analysis of total phenols using the Prussian blue method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, 1236-1238, 1980.
- FERREIRA, E.A., GRIS, E.F., REBELLO, J.M., CORREA, J.F.G., OLIVEIRA, L.F.S., WILHELM FILHO, D., PEDROSA, R.C. The 2',4',6'-Trihydroxyacetophenone Isolated from *Myrcia multiflora* Has Antiobesity and Mixed Hypolipidemic Effects with the Reduction of Lipid Intestinal Absorption. **Planta Medica**, v. 77, p. 1569-1574, 2011.
- GARDEA, A.A., MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M.A. Chapter 8 – Pecan (*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch.): Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits. **Woodhead Publishing**, 143–165, 2011.
- HARNAFI, H., RAMCHOUNB, M., TITS, M., WAUTERS, J., FREDERICHC, M., ANGENOT, L., AZIZ, M., ALEMD, C., AMRANI, S. Phenolic acid-rich extract of sweet basil restores cholesterol and triglycerides metabolism in high fat diet-fed mice: A comparison with fenofibrate **Biomedicine & Preventive Nutrition**, 3, 393–397, 2013.
- HARNAFI, H., AZIZ, M., AMRANI, S. Sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) improves lipid metabolism in hypercholesterolemic rats. **European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism**, 4, 181–186, 2009.
- HOLTERMAN, M.J., HOLTERMAN, A.L., BROWNE, A.F. Pediatric Obesity. **Surgical Clinics of North America**, 92, 3, 559-582, 2012.
- HSU, Y., TSAI, C., CHEN, W., HUANG, C., YEN, C. A subacute toxicity evaluation of green tea (*Camellia sinensis*) extract in mice. **Food and Chemical Toxicology**, 49, 2624–2630, 2011
- KANETO, H., KAJIMOTO, Y., MIYAGAWA, J., MATSUOKA, T., FUJITANI, Y., UYAHARA, Y., HANAFUSA, T., MATSUZAWA, Y., YAMASAKI, Y. HORI, M. Beneficial effects of

- antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. **Diabetes**, 48, 2398–2406, 1999.
- KOMES, D., HORZ, D., BELSCAK, A., GANIC, K.K., VULIC, I. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. **Food Research International**, 43, 167–176, 2010.
- MATSUDAA, M., SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and câncer: Review. **Obesity Research & Clinical Practice**, 7, 330–341, 2013.
- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; 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. **Phytotherapy Research**, v.15, 127-130, 2001.
- MIRI, R., SAADATI, H., ARDI, P., FIRUZI, O. Alterations in oxidative stress biomarkers associated with mild hyperlipidemia and smoking. **Food and Chemical Toxicology**, 50, 920–926, 2012.
- MÜLLER, L. G.; PASE, C. S.; RECKZIEGEL, P.; BARCELOS, R. C. S.; BOUFLEUR, N.; PRADO, A. C. P.; FETT, R.; BLOCK, J. M.; PAVANATO, M. A.; BAUERMANN, L. F.; ROCHA, J. B. T.; BURGER, M. E. Hepatoprotective effects of pecan nut shells on ethanol-induced liver damage. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, p. 165–171, 2013.
- NIELSEN, F., MIKKELSEN, B.B., NIELSEN, J.B., ANDERSEN, H.R., GRANDJEAN, P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. **Clin Chem**. 43,1209–14, 1997.
- ORTIZ-QUEZADA, A.G., LOMBARDINI, L., CISNEROS-ZEVALLOS, L. Chapter 104 – Antioxidants in Pecan Nut Cultivars [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch]: Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention. **Elsevier Inc**. 881–889, 2011.
- PORTO, L.C.S., SILVA, J., FERRAZ, A.B.F., CORRÊA, D.S., SANTOS, M.S., PORTO, C.D.L., PICADA, J.N. Evaluation of acute and subacute toxicity and mutagenic activity of the aqueous extract of pecan shells [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch]. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p.579–585, 2013.
- PRADO, A.C.P., SILVA, H.S., SILVEIRA, S.M., BARRETO, P.L.M., VIEIRA, C.R.W., MARASCHIN, M., FERREIRA, S.R.S., BLOCK, J.M. Effect of the extraction process on the phenolic compounds profile and the antioxidante and antimicrobial activity of extracts of pecan nut [*Carya ilinoensis* (Wangenh) C. Koch] shell. **Industrial Crops and Products**. v. 52, p. 552-561, 2014.

- PRADO, A. C. P.; MANIOMB, B. A.; SEETHARAMANB, K.; DESCHAMPSC, F. C.; ARELLANOD, D. B.; BLOCK, J. M. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of the oil and the shell of pecan nuts [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]. **Industrial Crops and Products**, v.45, p. 64– 73, 2013.
- Prado, A.C.P.; Aragão, A.M.; Fett, R; Block, J.M. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]. **Braz. J. Food Technol**; v. 12, n. 4, p. 323-332, 2009.
- PRICE, M.L.; VAN SCOYOC, S.; BUTLER, L.G.A. Critical evaluation of the vanillin reaction as na assay for tannin in sorghun. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 26, 1214-1218, 1978.
- RAEDERSTORFF, D.G., SCHLACHTER, M.F., ELSTE, V., WEBER, P. Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats. **J Nutr Biochem** 2003, 14:326–332.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biol. Med.** V.26, p.1231-1237, 1999.
- RECKZIEGEL, P.; BOUFLEUR, N.; BARCELOS, R. C. S.; BENVENÚ, D. M.; PASE, C. S.; MULLER, L. G.; TEIXEIRA, A. M.; ZANELLA, R.; PRADO, A. C. P.; FETT, R.; BLOCK, J. M. e Burger, M. E. . Oxidative stress and anxiety-like symptoms related to withdrawal of passive cigarette smoke in mice: Beneficial effects of pecan nut shells extract, a by-product of the nut industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p. 1770–1778, 2011.
- RIZZO, M., KOTUR-STEVLJEVIC, J., BERNEIS, K., SPINAS, G., RINI, G.B., JELIC-IVANOVIC, Z., Spasojevic-Kalimanovska, V., Vekic, J. Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress: a new look. **Translational Research**, 153, 5, 217–223, 2009.
- ROBERST, C.K., SINDHU, K.K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sciences**, 84, 705–712, 2009.
- ROCHA, J.T., SPERANÇA, A., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G. Hypolipidaemic activity of orally administered diphenyl diselenide in Triton WR-1339-induced hyperlipidaemia in mice. **Journal Pharm Pharmacol.** 61, 12, 1673-1679, 2009.
- RODRIGUES, S.; PINTO, G.A.S., FERNANDES, F.A.N. Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, 15, 95–100, 2008.

- ROTHWELL, N. J.; STOCK, M. J. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. **Nature** 281:31-35; 1979.
- SIKARIS, K. The clinical biochemistry of obesity. **Clin Biochem Rev**, 25, 2004.
- SHIVANNA, N., NAIKA, M., KHANUM, F., KAUL, V.K. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. **Journal of Diabetes and Its Complications**, 27, 103–113, 2013.
- SOBRATTEE, M.A., NEERGHEEN, V.S., LUXIMON-RAMMAA, A., ARUOMAB, O.I., BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research**, 579, 200–213, 2005.
- THIELECKE, F., BOSCHMANN, M. The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome – A review. **Phytochemistry**, 70, 11–24, 2009.
- TREVIZOL, F.; BENVIGNO, D.M.; BARCELOS, R.C.S.; PASE, C.S.; SEGAT, H.J.; DIAS, V.T.; DOLCII, G.S.; BOUFLEUR, N.; RECKZIEGEL, P.; BURGER, M.E. Comparative study between two animal models of extrapyramidal movement disorders: Prevention and reversion by pecan nut shell aqueous extract. **Behavioural Brain Research**, v. 221, p. 13–18, 2011.
- VILLARREAL-LOZOYA, J.E.; LOMBARDINI, L.; CISNEROS-ZEVALLOS. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. **Food Chemistry**, v.102, p. 1241-1249, 2007.
- WORLEY, R.E. Pecan physiology and composition. In C. R. Santerre (Ed.), **Pecan technology**. New York: Chapman & Hall, p. 39 – 45, 1994.
- ZHANG, Y., FISCHER, K.E., SOTO, V., LIU, Y., SOSNOWSKA, D., RICHARDSON, A., SALMON, A.B. Obesity-induced oxidative stress, accelerated functional decline with age and increased mortality in mice: In press. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2015.

CAPÍTULO 3

**O PAPEL DE EXTRATOS DE CASCA DE NOZ-PECÃ
[*CARYA ILLINOINENSIS* (WANGENH) C. KOCH] SOBRE O
ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR DIETA
HIPERCALÓRICA EM CAMUNDONGOS BALB-C
ISOGÊNICOS**

Resumo

O estresse oxidativo apresenta efeitos prejudiciais tanto em membranas quanto em tecidos, por diferentes substratos, sendo mediado pelo sistema de defesa antioxidante do organismo, podendo requerer antioxidantes exógenos provenientes da dieta. Dentre os antioxidantes da dieta os compostos fenólicos exercem excelente atividade antioxidante devido sua estrutura considerada ideal para o sequestro de radicais. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi demonstrar a capacidade antioxidante de extratos de casca de noz-pecã em animais submetidos a estresse oxidativo crônico via dieta hipercalórica. Assim, os animais foram submetidos diferentes dietas (normal e hipercalórica) e receberam como tratamento extratos da casca de noz-pecã. Os extratos demonstraram capacidade antioxidante sobre as condições de estresse e foram capazes de modular o sistema de defesa antioxidante endógeno.

Palavras chaves: Espécies reativas, compostos fenólicos, defesas antioxidantes.

1. Introdução

Os radicais livres são produzidos no organismo naturalmente ou por alguma disfunção biológica e a maioria é encontrada na forma de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou do nitrogênio (ERN). No organismo estes radicais estão envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (HUSAIN; CILLARD; CILLARD, 1987; PIETTA, 2000; VISIOLI; KEANEY; HALLIWELL, 2000).

Uma vez produzidas, as ERO são majoritariamente removidas pelas defesas antioxidantes da célula, sendo a manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo (VALKO et al., 2007). O desequilíbrio nesse sistema é chamado estresse oxidativo e apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membranas e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA.

Para mediar esse desequilíbrio ocorro os sistemas de defesas antioxidantes produzidos pelo corpo ou provenientes da dieta. Entre os sistemas enzimáticos estão a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathiona peroxidase (GPx), a glutathiona redutase (GR), entre

outras. Entre os compostos antioxidantes não enzimáticos estão a glutathiona (GSH) e, entre os antioxidantes provenientes da dieta estão os tocoferóis (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), o ácido lipóico, os carotenoides (β -caroteno), compostos azotados (derivados da clorofila) e compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides e taninos), entre outros (HALL, 1997; VALKO et al., 2007).

Nesse sentido, há relatos de altos teores de compostos fenólicos e atividades antioxidantes provenientes da infusão de casca de noz-pecã em solventes, como o etanol ou acetona (PRADO et al., 2009, ROSA et al., 2011).

As cascas de noz-pecã são ricas em compostos fenólicos e são utilizadas no sul do Brasil para o preparo de chá e o uso popular atribui vários efeitos benéficos ao seu uso como o controle da hipercolesterolemia, diabetes e doenças crônicas de caráter inflamatório (VILLARREAL-LOZOYA; LOMBARDINI; CISNEROS-ZEVALLOS, 2007). Recentemente, foi sugerido que as cascas de nozes podem ser utilizadas para tratar doenças no fígado provocadas pelo abuso do álcool (MÜLLER et al., 2013). Além disso, de acordo com Abdallah et al. (2011) os ácidos elágico e gálico isolados de cascas noz-pecã mostraram atividades hipoglicêmica e antioxidante significativas em ratos que tiveram diabetes induzida por streptozotocina.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante frente aos marcadores de estresse oxidativo crônico e as defesas antioxidantes em camundongos induzidos por dieta de hipercalórica.

2. Material e Métodos

2.1 Obtenção do pó e dos extratos da casca de *Carya illinoensis*

Para obtenção dos extratos, as cascas de *Carya illinoensis* foram previamente trituradas e tostadas a 100 °C por 1 hora (PRADO et al., 2009; RODRIGUES et al., 2008). O pó obtido foi dissolvido (10 g/L) em água destilada a 98 °C para obtenção do extrato aquoso e em uma mistura de água destilada:etanol absoluto (20:80 v.v.) para obter o extrato hidroalcolico. A mistura foi colocada no equipamento ultrassom (Enge Solutions® - EGS-5HD) por 60 minutos com temperatura ajustada em 60 °C. Em seguida os extratos foram filtrados a vácuo e secos em spray dryer (Buchi® B-290).

2.2 Determinação de compostos fenólicos totais dos extratos da casca de *Carya illinoensis*

Foi utilizado o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu proposto por Budini, Tonelli e Girotti (1980), com algumas modificações. Aliquotas de 100 µL das amostras na concentração de 0,83 g/L foram oxidadas com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu em balões volumétricos (10 mL). A reação foi neutralizada com 1,5 mL de carbonato de sódio saturado (75 g/L) e os volumes completados com água deionizada. As amostras foram incubadas por 2 horas ao abrigo da luz e a absorbância foi medida a 764 nm (Bel Photonics®-Spectrophotometer SP 2000 UV). A quantificação foi realizada com base em uma curva padrão de ácido gálico e os resultados expressos em mg GAE/g (mg equivalente de ácido gálico/g de amostra) em massa seca.

A partir dos resultados obtidos e análise estatística, foram selecionados como extratos padrões aqueles que obtiveram as maiores concentrações de compostos fenólicos. Obtendo um Extrato Hidroalcolico (EH) e um Extrato Aquoso (EA) para as demais análises.

2.3 Ensaio *in vivo*

2.3.1 Animais

Camundongos Balb/C isogênicos, (fêmeas) pesando 19 ± 2 g, foram mantidos em ambiente controlado (12 horas ciclo claro-escuro, 20 ± 2 °C e 60 % de umidade do ar). Os animais tiveram livre acesso a alimentação e água e foram submetidos a um período de adaptação às condições do experimento durante sete dias antes do início dos tratamentos. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com requerimentos legais para a espécie (Princípios orientadores para o cuidado e uso de animais em laboratório, publicação NHI #85,23, revisado em 1985) e sob aprovação pelo comitê de ética com uso de animais (CEUA/UFSC - protocolo PP00784).

2.3.2 Dietas:

1. Dieta normal (DN): constituída de ração comercial (Bio Base Alimentação Animal[®]) e água.

2. Dieta hipercalórica (DH): dieta tipo cafeteria (Rothwell; Stock, 1979), composta por alimentos frescos e industrializados, bebida com alto teor de açúcar, ração comercial e água.

As dietas eram oferecidas sempre de forma *ad libitum*.

2.3.3 Submissão dos animais ao estresse oxidativo crônico

O ensaio crônico, de submissão dos animais ao estresse oxidativo pela dieta hipercalórica, foi realizado de acordo com Ferreira (2010) com algumas modificações. Camundongos foram divididos em 6 grupos (n: 6):

1. Dieta Normal (DN).
2. DN + EA da casca de noz-pecã.
3. DN + EH da casca de noz-pecã.
4. Dieta Hipercalórica (DH).
5. DH + EA da casca de noz-pecã.
6. DH + EH da casca de noz-pecã

Os extratos da casca de noz-pecã (10,0 mg/kg VO) foram administrados por 30 dias. Os animais dos grupos controle para as dietas normal e hipercalórica (grupos 1 e 4) receberam água por gavagem (VO) para serem submetidos ao mesmo nível de estresse dos animais tratados. Após esse período, amostras de tecido (fígado) foram coletadas para determinação do estresse oxidativo por análise dos marcadores de defesas antioxidantes.

2.3.4 Preparo dos homogenatos de fígado

Após remoção do fígado (coletado 24h após o último tratamento) foi realizada a lavagem com solução salina (0,9 % de cloreto de sódio - NaCl), 3 vezes para remover excesso de sangue, e a secagem com papel filtro. Após essa etapa o tecido foi rapidamente cortado, pesado e colocado em tampão, na proporção de 1:20 (1 mg de tecido/19 µL de tampão).

As amostras foram preparadas da seguinte forma: para as análises de peroxidação lipídica e enzimáticas (CAT, SOD, GST, GPx e GR) o tecido foi homogeneizado com um homogeneizador para tecidos (1:20 p/v) em tampão (pH 7,4) contendo fosfato de sódio (100 mmol.L⁻¹), NaCl (150 mmol.L⁻¹) e Triton X-100 (0.1 %); e para a análise da GSH foi utilizado ácido tricloroacético (TCA 12 %, 1:20 p/v). Após a homogeneização foram centrifugados (5.000 rpm/5 min) e o sobrenadante foi separado para as análises. O total de proteína foi

determinado usando a metodologia de Lowry et al. (1951) para normatizar os valores de acordo com o conteúdo proteico. Os comprimentos de onda de cada ensaio foram determinados no leitor de placas (TECAN Infinity M200, Áustria).

2.3.5 Análise dos marcadores de estresse e defesas antioxidantes

2.3.5.1 Avaliação da lipoperoxidação

A avaliação da peroxidação lipídica endógena foi realizada em triplicata conforme o método Bird e Draper (1984). As amostras (0,1 mL) foram precipitadas com 1 mL de TCA 12 % e misturadas com 0,9 mL de tampão (60 mmol.L^{-1} de Tris-HCl e $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$), de ácido dietilenotriaminopenta acético -DPTA, pH 7,4) e 0,1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,73 %) e foram incubadas a 100°C por 60 minutos. Após a incubação foram mantidas em banho de gelo por 10 minutos e centrifugadas (5.000 rpm/5 min). O sobrenadante das amostras foi avaliado espectrofotometricamente usando o comprimento de onda de 535 nm. Os valores foram expressos em $\text{nmol MDA.mg proteína}^{-1}$.

2.3.5.2 Determinação do conteúdo de glutatona reduzida (GSH)

O conteúdo de glutatona reduzida (GSH) foi analisado pela determinação dos tiols não proteicos, em triplicata. O experimento foi realizado usando 10 μL do sobrenadante das amostras precipitadas em TCA 12 %, usando 190 μL de tampão fosfato de sódio ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 8,0) e 20 μL de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB; $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$). Para o branco a amostra foi substituída por TCA 1 % em água destilada (3:2, v/v). O ânion tiolato (TNB), de cor amarela, foi determinado espectrofotometricamente a 412 nm (BEUTLER et al., 1963) e o valores foram expressos em $\mu\text{mol.mg proteína}^{-1}$.

2.3.5.3 Avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com o método proposto por Misra e Fridovich (1972) e modificado por Boveris et al. (1983). Foi realizada a curva padrão de amostra em tampão glicina (50 mmol.L^{-1} , pH 10,2), com o volume final de 200 μL . As leituras foram realizadas a 480 nm no branco (amostra + tampão) e após a adição de 5 μL de uma solução constituída por adrenalina (60 mmol.L^{-1} , água e HCl (PA) em todas as amostras. O monitoramento das absorbâncias foi feito em um intervalo de 15 em 15 segundos durante 10 minutos. A unidade de SOD foi

definida como o conteúdo de enzima capaz de inibir a velocidade de oxidação da adrenalina em 50 % e os resultados foram expressos como unidade de superóxido dismutase por miligrama g de proteína (USOD/mg proteína⁻¹).

2.3.5.4 Avaliação da atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase (CAT) foi avaliada pela velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂; 10 mmoL.L⁻¹) dissolvido em tampão fosfato (50 mmoL.L⁻¹, pH 7,0) a 240 nm (AEBI, 1984). Brevemente, 5 µL de amostra foi colocada em 200 µL de tampão fosfato contendo H₂O₂. Essa atividade foi medida pela variação da densidade ótica em cada 30 segundos durante 3 min. Os resultados foram expressos como mmol. min.mg proteína⁻¹.

2.3.5.5 Avaliação da atividade da Glutaciona peroxidase (GPx)

A determinação da atividade da glutaciona peroxidase (GPx) foi baseada na redução do terc-butilhidroperóxido (t-BuOOH) pela oxidação de GSH e formação de GSSG que é catalisada por essa enzima (FLOHÉ; GUNZLER, 1984). Utilizando 25 mL de tampão fosfato (0,1 mmoL.L⁻¹, pH 7,0); 8,6 mg de NADPH; 10 mL de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA, 5 mmoL.L⁻¹, pH 7,0); 15 mL de água destilada; 24 mg de GSH e 3,8 µL de GR 5U, sob refrigeração, no momento do ensaio. Posteriormente, em temperatura ambiente, foram adicionados 5 µL de amostra e 200 µL do meio de reação e antes da leitura foi adicionado 10 µL de t-BuOOH, essa reação foi monitorada em ciclos de 18s durante 3 min. Os valores foram expressos em µmol. Min.mg proteína⁻¹.

2.3.5.6 Avaliação da atividade da Glutaciona redutase (GR)

A atividade da GR foi determinada pelo método de Calberg e Mannervick (1985), em meio contendo 25 mL de tampão fosfato (0,1 mmoL.L⁻¹, pH 7,0); 8,6 mg de NADPH; 30,6 mg de glutaciona oxidada (GSSG) e DPTA (5 mmoL.L⁻¹, pH 7,0), sob refrigeração. Em seguida, em temperatura ambiente, foi adicionado 5 µL de amostra e 200 µL do meio de reação e deu início à reação que foi monitorada em ciclos de 18 s durante 3 min, gerando uma curva decrescente. Os valores da atividade desta enzima foram expressos em µmol. min.mg proteína⁻¹.

2.3.5.7 Avaliação da atividade da Glutathiona S-transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada espectrofotometricamente de acordo com Habig et al. (1974). A amostra (5 μL) foi misturada com 250 μL de tampão fosfato (0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,0) e antes da leitura foi adicionados 5 μL de uma solução contendo 1 mL de tampão fosfato e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB, 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), e 5 μL de uma solução 1 mL de água destilada e GSH (0,1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), nessa ordem. Esta reação foi monitorada durante 3 minutos e os valores foram expressos em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$.

2.4 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média \pm E.P.M. (erro padrão da média) e analisados pelo teste ANOVA e complementado pelo teste de comparação múltipla Bonferroni. Foram considerados estatisticamente significativos os valores com $p < 0,05$ (nível de significância de 95 %).

3. Resultados

3.1 Determinação de compostos fenólicos totais

Foram selecionadas as amostras com base nas maiores médias e menores gastos de solvente e energia, sendo que ambas as amostras foram submetidas às condições de extração (60 $^{\circ}\text{C}$ /60 min).

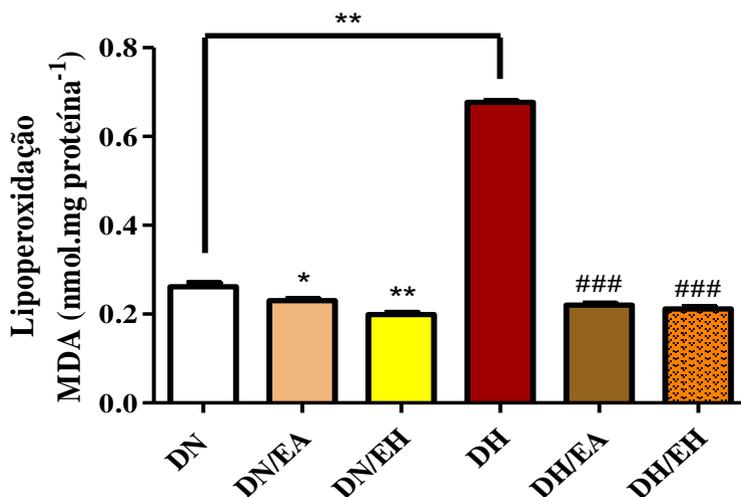
Os extratos aquoso e hidroalcoólico apresentaram teor de fenólicos totais de 465,0 mg GAE/g e 688,1 mg GAE/g, respectivamente.

3.2 Análises dos marcadores de estresse e defesas antioxidantes

3.2.1 Avaliação da lipoperoxidação

De acordo com os resultados obtidos foi observada uma inibição da peroxidação lipídica nos animais tratados com os extratos da casca de *Carya illinoensis* tanto para aqueles que receberam a dieta normal quanto para os que receberam a dieta hipercalórica. Para os animais que receberam a dieta normal associada ao extrato hidroalcoólico a inibição foi significativamente maior do que para os animais que receberam o extrato aquoso (Figura 1.3).

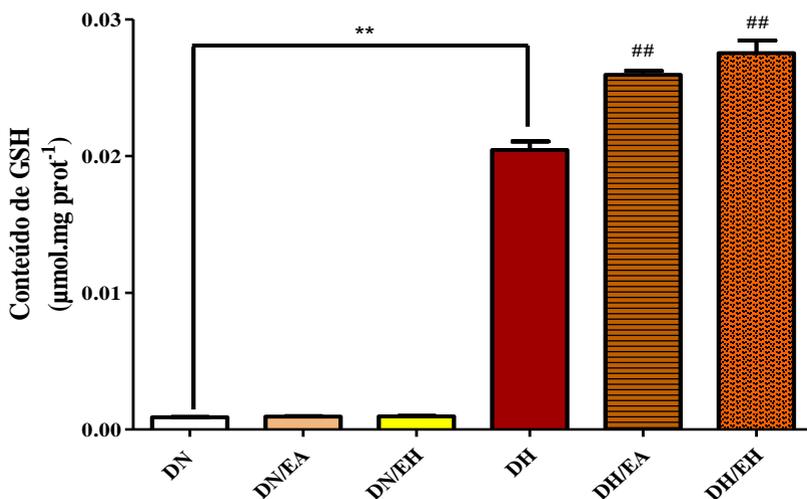
Figura 1.3: Inibição da peroxidação lipídica nos animais tratados com os extratos de casca de *Carya illinoensis*. Dados expressos como média \pm E.P.M. Significante em * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ em relação ao controle negativo da dieta normal; e em ### $p < 0,001$ em relação ao controle negativo da dieta hipercalórica. MDA: Malonaldeído; nmol.mg proteína⁻¹: concentração em nano molar por miligrama de proteína; DN: Controle negativo da dieta normal; DN/EA: dieta normal + Extrato Aquoso; DN/EH: dieta normal + Extrato Hidroalcóólico; DH: Controle negativo da dieta hipercalórica; DH/EA: dieta hipercalórica + Extrato Aquoso; DH/EH: dieta hipercalórica + Extrato Hidroalcóólico.



3.2.2 Determinação do conteúdo de glutathiona reduzida (GSH)

Os resultados da avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (tiol não-proteico), são apresentados na Figura 2.3. Tais resultados mostram que em condições de estresse oxidativo, que foram observados na dieta hipercalórica, os animais tratados com os extratos são capazes de elevar significativamente essa defesa antioxidante.

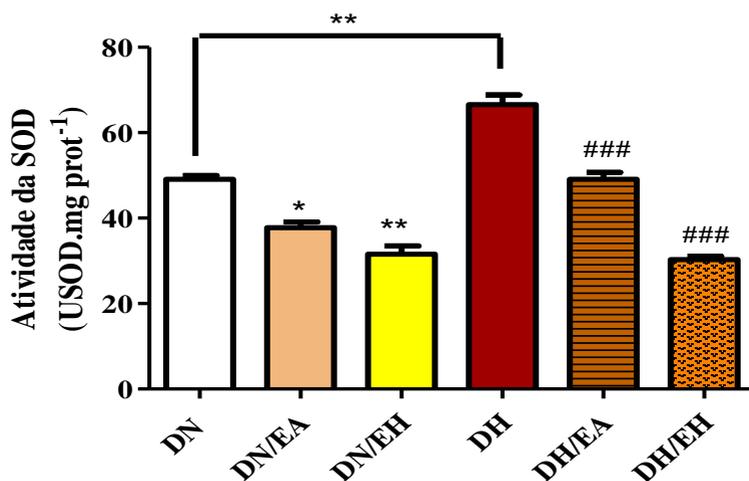
Figura 2.3: Determinação do conteúdo de glutathiona reduzida nos animais tratados com os extratos de cascas de *Carya illinoensis*. Dados expressos como média \pm E.P.M. Significante em * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ em relação ao controle negativo da dieta normal; e em ### $p < 0,001$ em relação ao controle negativo da dieta hipercalórica. GSH: Glutathiona reduzida $\mu\text{mol.mg prot}^{-1}$: concentração em micro molar de GSH por miligrama de proteína; DN: Controle negativo da dieta normal; DN/EA: dieta normal + Extrato Aquoso; DN/EH: dieta normal + Extrato Hidroalcólico; DH: Controle negativo da dieta hipercalórica; DH/EA: dieta hipercalórica + Extrato Aquoso; DH/EH: dieta hipercalórica + Extrato Hidroalcólico.



3.2.3 Avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

Os resultados obtidos para a atividade da SOD indicaram uma redução da atividade da enzima em ambas às dietas, indicando a presença de menos espécies reativas de oxigênio, já que essa enzima tem função de catalisar a desmutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Para ambas as dietas (normal e hipercalórica) o extrato hidroalcólico demonstrou maior redução da atividade da enzima SOD (Figura 3.3).

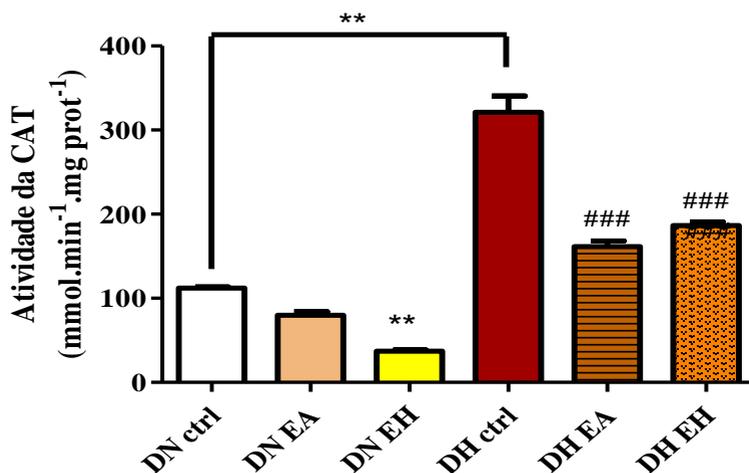
Figura 3.3: Perfil da atividade da enzima SOD nos animais tratados com os extratos da casca de *Carya illinoensis*. Dados expressos como média \pm E.P.M. Significante em * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ em relação ao controle negativo da dieta normal; e em ### $p < 0,001$ em relação ao controle negativo da dieta hipercalórica. SOD: Superóxido dismutase USOD.mg prot⁻¹: concentração em unidade de SOD por miligrama de proteína; DN: Controle negativo da dieta normal; DN/EA: dieta normal + Extrato Aquoso; DN/EH: dieta normal + Extrato Hidroalcolico; DH: Controle negativo da dieta hipercalórica; DH/EA: dieta hipercalórica + Extrato Aquoso; DH/EH: dieta hipercalórica + Extrato Hidroalcolico.



3.2.4 Avaliação da atividade da catalase (CAT)

Os resultados para a atividade da CAT mostraram que os animais tratados com os extratos apresentaram redução na atividade para esta enzima, como pode ser observado na Figura 4.3. Os níveis atenuados da atividade da enzima catalase, responsável por decompor o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, indicam um ambiente intracelular com menos espécies reativas de oxigênio, provavelmente em função da atividade antioxidante dos compostos fenólicos presentes no mesmos. Na dieta hipercalórica, ambos os extratos reduziram significativamente a atividade dessa enzima, enquanto que na dieta normal, somente o extrato hidroalcolico apresentou diferença significativa em relação ao controle.

Figura 4.3: Perfil da atividade da enzima CAT nos animais tratados com os extratos da casca de *Carya illinoensis*. Dados expressos como média \pm E.P.M. Significante em * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ em relação ao controle negativo da dieta normal; e em ### $p < 0,001$ em relação ao controle negativo da dieta hipercalórica. CAT: Catalase; $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$: concentração em mili molar de CAT por minuto por miligrama de proteína; DN: Controle negativo da dieta normal; DN/EA: dieta normal + Extrato Aquoso; DN/EH: dieta normal + Extrato Hidroalcoólico; DH: Controle negativo da dieta hipercalórica; DH/EA: dieta hipercalórica + Extrato Aquoso; DH/EH: dieta hipercalórica + Extrato Hidroalcoólico.

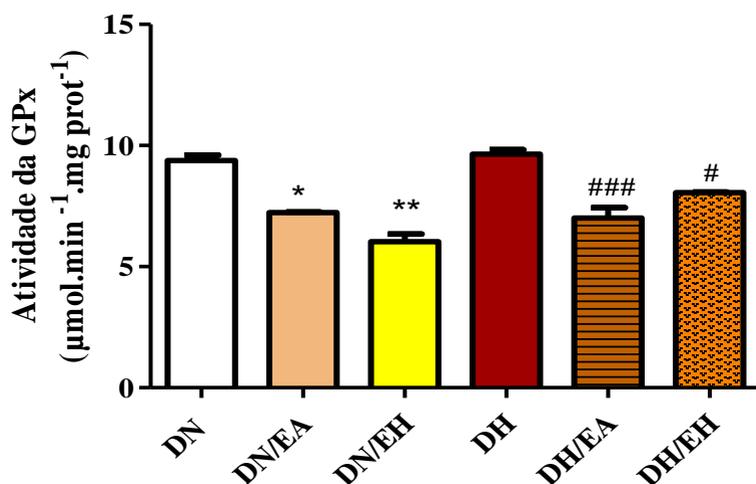


3.2.5 Avaliação da atividade da Glutathiona peroxidase (GPx)

Os resultados ilustrados na Figura 5.3 indicam que os animais tratados com os extratos apresentaram redução significativa da atividade da enzima GPx em relação ao controle, em ambas as dietas. Tal enzima é responsável pela detoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos e tem como cofator a GSH.

Os resultados observados para as dietas normal e hipercalórica revelam que os extratos reduziram significativamente a atividade da GPx, demonstrando assim efeito antioxidante dos compostos fenólicos sobre a enzima.

Figura 5.3: Perfil da atividade da enzima GPx nos animais tratados com os extratos da casca de *Carya illinoensis*. Dados expressos como média \pm E.P.M. Significante em * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ em relação ao controle negativo da dieta normal; e em ### $p < 0,001$ em relação ao controle negativo da dieta hipercalórica. GPx: Glutaciona peroxidase $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$: concentração em micromol de GPx por minuto por miligrama de proteína; DN: Controle negativo da dieta normal; DN/EA: dieta normal + Extrato Aquoso; DN/EH: dieta normal + Extrato Hidroalcolico; DH: Controle negativo da dieta hipercalórica; DH/EA: dieta hipercalórica + Extrato Aquoso; DH/EH: dieta hipercalórica + Extrato Hidroalcolico.



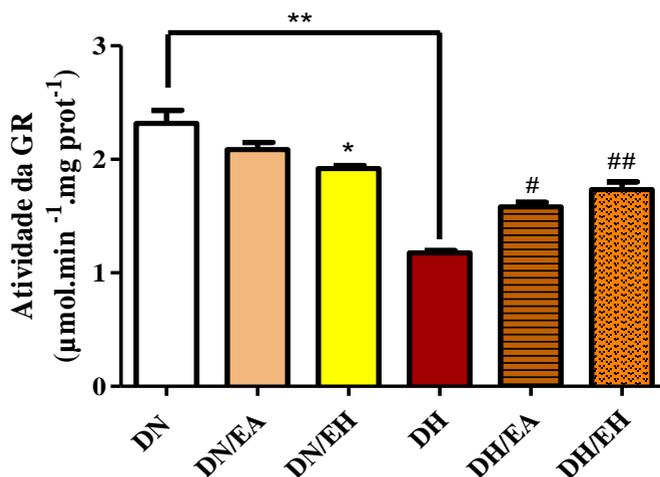
3.2.6 Avaliação da atividade da Glutaciona redutase (GR)

A Figura 6.3 ilustra o perfil da GR nos animais controle e tratados com os extratos da casca de *Carya illinoensis* nas dietas normal e hipercalórica.

Na dieta normal, os animais tratados com os extratos demonstraram um perfil de redução da atividade da GR, que foi significativo em relação ao controle apenas no extrato hidroalcolico. Porém, na dieta hipercalórica, houve elevação do estresse oxidativo nos animais, e foi observado que os animais tratados com os extratos foram capazes de elevar os níveis da atividade dessa enzima, que tem como papel reduzir a forma oxidada da glutaciona (GSSG) para a sua forma sulfidril (GSH - glutaciona reduzida) que apresenta atividade

antioxidante. Novamente, o extrato hidroalcolico evidenciou-se mais eficiente, pois na dieta hipercalórica foi capaz de promover um aumento na atividade da enzima GR, sendo este aumento significativo.

Figura 6.3: Perfil da atividade da enzima GR nos animais tratados com os extratos da casca de *Carya illinoensis*. Dados expressos como média \pm E.P.M. Significante em * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ em relação ao controle negativo da dieta normal; e em ### $p < 0,001$ em relação ao controle negativo da dieta hipercalórica. GR: Glutaciona redutase $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$; concentração em micro molar de GR por minuto por miligrama de proteína; DN: Controle negativo da dieta normal; DN/EA: dieta normal + Extrato Aquoso; DN/EH: dieta normal + Extrato Hidroalcolico; DH: Controle negativo da dieta hipercalórica; DH/EA: dieta hipercalórica + Extrato Aquoso; DH/EH: dieta hipercalórica + Extrato Hidroalcolico.



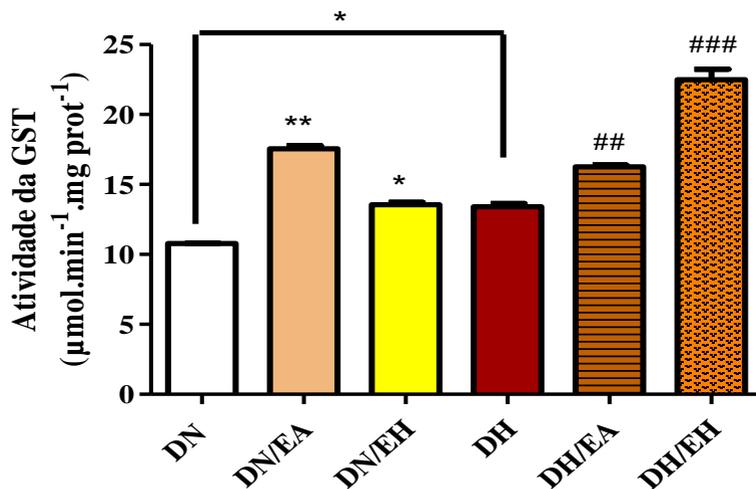
3.2.7 Avaliação da atividade da Glutaciona S-transferase (GST)

Na Figura 7.3 pode ser observado o perfil enzimático da GST dos animais controle e tratados com os extratos da casca de *Carya illinoensis*, nas dietas normal e hipercalórica. Uma função dessa enzima é detoxificar compostos endógenos (como lipídeos peroxidados e xenobióticos) pela sua conjugação a GSH.

Os níveis elevados de GST nos animais tratados com os extratos de casca de *Carya illinoensis* revelam a eficiência da atividade antioxidante desses extratos. Na dieta normal o extrato aquoso

apresentou um aumento da atividade enzimática significativa. Uma atividade maior para o extrato hidroalcoólico, quando comparado ao extrato aquoso foi observado para a dieta hipercalórica.

Figura 7.3: Perfil da atividade da enzima GST nos animais tratados com os extratos da casca de *Carya illinoensis*. Dados expressos como média \pm E.P.M. Significante em * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ em relação ao controle negativo da dieta normal; e em ### $p < 0,001$ em relação ao controle negativo da dieta hipercalórica. GST: Glutathione S-transferase, $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$: concentração em micro molar de GST por minuto por miligrama de proteína; DN: Controle negativo da dieta normal; DN/EA: dieta normal + Extrato Aquoso; DN/EH: dieta normal + Extrato Hidroalcoólico; DH: Controle negativo da dieta hipercalórica; DH/EA: dieta hipercalórica + Extrato Aquoso; DH/EH: dieta hipercalórica + Extrato Hidroalcoólico.



4. Discussão

O aumento da peroxidação lipídica tem sido correlacionado com o desenvolvimento de dislipidemias e consequente obesidade (NIGRIS et al., 2003; YOKOYAMA, 2004). Sendo assim, a partir da decomposição dos hidroperóxidos lipídicos ocorre à formação de malonaldeído (MDA) e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos. O consumo de alimentos ricos em antioxidantes com atividade endógena

pode inibir a peroxidação lipídica, evitando ou amenizando os danos causados no organismo (BONNES; GUÉRIN, 1992; BARREIROS; DAVID, 2006).

Os antioxidantes endógenos interrompem a cadeia de peroxidação lipídica reagindo com os radicais peroxila ou alcóxila gerando um hidropéroxido e um radical livre a partir do antioxidante (FANG et al., 2002; FREDSTROM, 2002; VALKO et al., 2007). Desta forma o consumo desses compostos tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (DROGE, 2002).

A redução do estresse oxidativo induzido pelos extratos de casca de *Carya illinoensis* nos animais que receberam a dieta hipercalórica indica que estes extratos apresentam atividade antioxidante endógena. Os resultados foram significativamente maiores quanto comparados com a dieta normal indicando que dietas que apresentam alto teor de gordura interferem na susceptibilidade do organismo a danos provenientes do estresse oxidativo (FRANCO, 2007).

A inibição da peroxidação lipídica indica que os compostos fenólicos contidos nos extratos foram capazes de atuar como antioxidantes endógenos, inibindo a geração de radicais livres. Este tipo de ação pode prevenir patologias ligadas ao estresse oxidativo (GERMAN; DILLARD, 2000).

Esses efeitos antioxidantes benéficos são de extrema importância Jordão Jr et al. (1998) descrevem que quando existe maior ocorrência de eventos oxidativos o sistema tende a ser pró-oxidativo, o que pode afetar os níveis de antioxidantes, tendo, como resultado final, o dano oxidativo em lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Assim, a suplementação com os extratos testados pode contribuir para a diminuição da peroxidação lipídica, diminuindo a instalação e progressão de lesões celulares e teciduais.

Desse modo, a glutatona (GSH) é um parâmetro utilizado para avaliar o sistema de defesa antioxidante dos animais e a manutenção dos seus níveis pode fornecer importantes informações bioquímicas do balanço oxidante-antioxidante no organismo (LEAF et al., 1997). Nesta investigação observou-se que ambos os extratos testados foram eficientes em elevar os níveis da GSH como defesa antioxidante, sendo que o extrato hidroalcolólico foi mais eficiente para elevar os níveis de da GSH nos animais estudados.

Sugere-se que os compostos fenólicos dos extratos exercem a função de elevar os níveis da GSH favorecendo a resposta antioxidante. Pesquisa que indica que os polifenóis podem exercer efeitos biológicos

tais como, a inibição ou redução de diferentes enzimas, entre as quais a ciclooxigenase, a lipoxigenase, interagindo com os receptores celulares (ANGELO; JORGE, 2007; TAPIERO et al., 2002).

Pryor (1982) relatou que a concentração tissular de GSH pode ser regulada pela dieta e pelo estado nutricional. Além disso, a GSH é reconhecida como substrato para GST e GPx enzimas que catalisam as reações de detoxificação de compostos xenobióticos e da antioxição de ERO e radicais livres (HALLIWEL; GUTTERDGE, 1989, VANNUCCHI et. al., 1997).

Considerando as defesas antioxidantes enzimáticas avaliou-se a atividade da enzima SOD, (Figura 3.3), e a da enzima CAT (Figura 4.3). A diminuição nos níveis das enzimas SOD e CAT (Figuras 3.3 e 4.3) nos animais suplementados com os extratos testados em ambas as dietas, sugere a presença mecanismos adaptativos de defesas antioxidantes. Isso pode ser consequência da presença de antioxidantes da dieta, resultando em concentrações elevadas de antioxidantes exógenos no sistema circulatório e reduzindo a necessidade de ação das enzimas antioxidantes endógenas (BREINHOLT; LAURIDSEN; DRAGSTED, 1999; ALÍA et al., 2003).

Estes resultados estão de acordo com a investigação feita por Bramorski (2011), que observou que animais que receberam dietas suplementadas com o suco de *G. brasiliensis* (camarinha), rico em compostos fenólicos, apresentaram redução significativa das enzimas SOD e CAT, sugerindo atividade antioxidante exógena proveniente dos compostos fenólicos ingeridos pela suplementação.

A enzima glutathiona peroxidase (GPx) realiza a detoxicação do peróxido de hidrogênio. Havendo baixas concentrações deste metabolito não há necessidade de níveis elevados da atividade desta enzima, isto foi observado em ambas as dietas nos animais tratados com os extratos. Também foi demonstrado que o extrato hidroalcolólico exerceu redução significativa da GPx na dieta normal, já na dieta hipercalórica o níveis de atividade da GPx foram significativamente menores nos animais que receberam o extrato aquoso sugerindo assim efeito antioxidante dos fenólicos. Pesquisa recente mostrou efeitos antioxidantes dos compostos fenólicos sobre a atividade da GPx em tecidos como fígado, coração e rins de animais submetidos a dieta hipercolesterolêmica (CHENNI et al., 2007).

Outra enzima que age conjuntamente com a GPx é a enzima glutathiona redutase (GR). Esta enzima não age diretamente na remoção de espécies radicalares, porém é responsável pela regeneração da glutathiona à sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida

adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), com o objetivo de impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutatona (MEISTER; ANDERSON, 1983). Após exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG. A recuperação da GSH é feita pela enzima GR, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular (HEBBEL, 1986, GILBERT; Mc LEAN, 1990).

Neste estudo a atividade da GR nos animais que receberam uma dieta normal e os extratos testados, foi reduzida em função da baixa concentração de GSH, não havendo grande requerimento desta enzima. Já na dieta hipercalórica houve elevação dos níveis da GR, principalmente nos animais tratados com o extrato hidroalcolico, de acordo com a necessidade de reciclagem da GSH.

O papel da enzima glutatona S-transferase (GST) é detoxificar aldeídos reativos gerados na peroxidação lipídica (CARLETTI et al. 2008; HUBER; ALMEIDA, 2008). Esta isoenzima demonstrou sua atividade elevada em ambas as dietas nos tratamentos com os extratos. Estes resultados indicam um papel modulatório dos compostos fenólicos contra o estresse oxidativo endógeno, em adição ao efeito protetor destas enzimas antioxidantes.

5. Conclusões

Os resultados sugerem que os extratos de casca de noz-pecã, ricos em compostos fenólicos, protegem contra o estresse oxidativo induzido por dieta hipercalórica. Isto foi evidenciado pelo aumento da atividade antioxidante, que possibilitou a redução da concentração de ERO e/ou ânion superóxido no tecido hepático dos animais e consequente redução na quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Essa série de acontecimentos resulta na modulação das atividades do sistema de defesa antioxidante, tanto requerendo a ação de defesa quanto reduzindo a atividade de determinadas enzimas.

Análises futuras envolvendo a biodisponibilidade de compostos fenólicos e seu papel na modulação das vias de sinalização de doenças relacionadas com o estresse oxidativo pode ajudar a esclarecer o papel destes compostos.

6. Agradecimentos

À empresa Divinut Ind. de Nozes Ltda, localizada na cidade de Cachoeira do Sul – RS, pelo fornecimento da matéria-prima e à

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

7. Referências

ABDALLAH, H.M.; SALAMA, M.S.; ABDELRAHMAN, E.H.; EL-MARAGHY, S.A. Antidiabetic activity of phenolic compounds from Pecan bark in streptozotocin- induced diabetic rats. **Phytochem. Lett.** 4, 337–341, 2011.

AEBI, H. "Catalase in Vitro." **Methods in Enzymology.** 105, 121-6, 1984.

ALÍA, M.; HORCAJO, C.; BRAVO, L.; GOYA, L. Effect of grape dietary fiber on the total antioxidante capacity and the activity of liver antioxidante enzymes in rats. **Nutrition Research**, v. 23, p. 1251-1267, 2003.

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

BABIOR, B.M. Superoxide: a two-edged sword. **Braz J Med Biol Res** 30(2) 1997.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 1, 113-123, 2006.

BEAL, B.H. **Atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos do gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*)**. 2006, 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, [2006].

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. "Improved Method for the Determination of Blood Glutathione." **J Lab Clin Med.** 61, 882-8, 1963.

BRAMORSKI, A. ***Gaylussacia brasiliensis* (Spreng) Meisn. (Ericaceae): Caracterização química e atividade biológica do fruto *in vitro* e *in vivo***. 2011. Tese de doutorado em Ciência dos Alimentos na Universidade Federal de Santa Catarina. [2011].

BREINHOLT, V.; LAURIDSEN, S.T.; DRAGSTED, L.O. Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat. **Xenobiotica**, v. 29, p.1227–40, 1999.

BIRD, R.P.; DRAPER, H.H. "Comparative Studies on Different Methods of Malonaldehyde Determination." **Methods Enzymol.** 105, 299-305, 1984.

- BONNES, T.; GUÉRIN, T. Is malonaldehyde a valuable of peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, n. 5, p. 985-988, 1992.
- BOVERIS, A.; FRAGA, C.G.; VARSAVSKY, A.; KOCH, O. Arch. Biochem. Biophys. 227: 534-541, 1983.
- BUDINI, R.; TONELLI, D.; GIROTTI, S. Analysis of total phenols using the Prussian blue method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, 1236-1238, 1980.
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. "Glutathione Reductase." **Methods Enzymol.** 113, 484-90, 1985.
- CARLETTI, E.; SULPIZIO, M.; BOCCIARELLI, T.; BOCCIO, P.D.; FEDERICI, L.; DIILIO, C. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: Identification, cloning and functional characterization. **Aquatic Toxicology** 90:48-57, 2008.
- CHENNI, A.; YAHIA, D.A.; BOUKORTT, F.O.; PROST, J.; LACAILLE-DUBOIS, M.A.; BOUCHENAK, M. Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.207-213, 2007.
- DROGE, W. Free radicals in the physiological control cell function. **Physiological Reviews**, [S.l.], v. 82, p. 47-95, 2002.
- FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v. 18, p. 872-879, 2002.
- FERREIRA, E.A. **Efeito hipolipemiante e hepatoprotetor da 2'4'6-trihidroacetofenona isolada de *Myrcia Multiflora***. 2010, [Tese] (doutorado em farmácia). Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Santa Catarina [2010].
- FLOHÉ, L.; GUNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.** 105:114-121, 1984.
- FRANCO, L.D.P. Dieta hiperlipídica e exercício físico: Consequências sobre o metabolismo e a peroxidação lipídica - Estudo Em Modelo Animal. Dissertação de Mestrado. Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2007.
- FREDSTROM, S. Nitric oxide, oxidative stress, and dietary antioxidants. **Nutrition**, v. 18, p. 537-539, 2002.
- GERMAN, B.; DILLARD, C.J. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [S.l.], v. 80, p. 1744-1756, 2000.

- GILBERT, H.F.; Mc LEAN, V.M. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**; 63: 69-172, 1990.
- HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JACOBY, W.B. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mescapturic acid formation. **J. Biol. Chem.** 249:7130-7139, 1974.
- HALL, C.A.; CUPPETT, S.L. Structure-activities of natural antioxidants. In: Aruoma OI, Cuppett SL, editors. Antioxidant Methodology In Vivo and In Vitro Concepts. **AOCS Press**; 1997. 2-29.
- HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annu Rev Nutr**; 16:33-50, 1996.
- HALLIWEL, B.; GUTTERDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 2th ed. Oxford, Clarenton Press, 1989.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. **Lancet**; 2:1095, 1984.
- HEBBEL, R.P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **J Lab Clin Med**; 107: 401-4, 1986.
- HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, 31:1170-1179, 2008.
- HUSAIN, S.R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**. 26:2489-2497, 1987.
- JOHANSEN, J.S.; HARRIS, A.K.; RYCHLY, D.J.; ERGUL, A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovasc Diabetol**; 4:5, 2005.
- JORDÃO, A.A. JR.; CHIARELLO, P.G.; BERNARDES, M.S.M. VANUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathione reduzida e da vitamina E. **Medicina**, Ribeirão Preto; 31: 434-49, 1998.
- LEAF, D.A.; KLEINMAN, M.T.; HAMILTON, M.; BARSTOW, T.J. The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. **Med Sci Sports Exerc.** 29(8):1036-9, 1997.
- LOUZADA, S.M.; GUILHERME, C.; MACHADO, F.S.; ARAÚJO, A.S.; SANVITTO, G.L.; FUNCHAL, C. **Efeito da obesidade induzida pela dieta de cafeteria sobre os parâmetros oxidativos no ovário de ratas**. RESBCAL, São Paulo, v.2 n.2, pg. 92-102, 2013.
- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. "Protein measurement with the Folin Phenol Reagent", **J Biol Chem** 193, pp. 265-275, 1951.

- MANCINI-FILHO, J. Importância química e nutricional dos antioxidantes naturalmente presentes nos alimentos. In: MERCADANTE, A. Z. et al. (Ed.). *Ciência de alimentos: avanços e perspectivas*. **Campinas: FEA/UNICAMP**, v. 2, p. 174-176, 2001.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Ann. Rev. Biochem**, 52, 711, 1983.
- MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. "The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase." **J Biol Chem**. 247, no. 10, 3170-5, 1972.
- MÜLLER, L.G.; PASE, C.S.; RECZIEGEL, P.; BARCELOS, R.C.S.; BOUFLUER, N.; PRADO, A.C.P.; FETT, R.; BLOCK, J.M.; PAVANATO, M.A.; BAUERMANN, L.F.; ROCHA, J.B.T.; BERGER, M.E. Hepatoprotective effects of pecan nutshells on ethanol-induced liver damage. **Exp. Toxicol. Pathol**. 65 (1-2), 165-171, 2013.
- NIGRIS, F.; LERMAN, A.; IGNARRO, L.J.; WILLIAMS-IGNARRO, S.; SICA, V.; BAKER, A.H.; LERMAN, L.O.; GENG, Y.J.; NAPOLI, C. Oxidation-sensitive mechanisms, vascular apoptosis and atherosclerosis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, p. 351-359, 2003.
- PASTORE, A.; FEDERICI, G.; BERTINI, E.; PIEMONTE, F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clin Chim Acta**; 333:19-39, 2003.
- PRADO, A.C.P.; MANION, B.A.; SEETHARAMAN, K.; DESCHAMPS, F.C.; ARELLANO, D.B.; BLOCK, J.M. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of the oil and the shell of pecan nuts [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]. **Ind. Crop. Prod**. 45, 64-73, 2013.
- PRADO, A.C.P.; ARAGÃO, A.M.; FETT, R.; BLOCK, J.M. Phenolic compounds and antioxidant activity of pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] shell extracts. **Braz. J. Food Technol**. 12, 323-332, 2009.
- PRADO, A.C.P.; ARAGÃO, A.M.; FETT, R.; BLOCK, J.M. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]. **Braz. J. Food Technol**; v. 12, n. 4, p. 323-332, 2009^a.
- PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J Nat Prod** 63: 1035-1042, 2000.
- PRYOR, W. Free radical biology: Xenobiotics, cancer and aging. **Ann. N. Y. Acad Sci** 393: 11-23, 1982.
- ROSA, A.D.L.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of kernels and shells of mexican pecan (*Carya illinoensis*). **J. Agr. Food Chem**. 59, 152-162, 2011.

- RODRIGUES, S.; PINTO, G.A.S. Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell poder. **Journal of Food Engineering** 80, 869–872, 2007.
- TAPIERO, H.; TEW, K.D.; NGUYEN, G.B.; MATHÉ, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, p. 200-207, 2002.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCO, L. J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**; 39:44-84, 2007.
- VANNUCCHI, H.; JORDÃO, A.A. Jr.; IGLESIAS, A.C.G.; MORANDI, M.V.; CHIARELLO, P.G. Effect of different dietary levels of vitamin E on lipid peroxidation in rats. **Arch Latinoam Nutr** 47, 34-37, 1997.
- VISIOLI, F.; KEANEY, J.F.; HALLIWELL, B. JR. Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep? **Cardiovasc Res**, 47:409, 2000.
- YOKOYAMA, M. Oxidant stress and atherosclerosis. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, p. 110-115, 2004.