



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

Bianca Helena Beal

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS
FENÓLICOS DO GENGIBRE (*Zingiber officinale* ROSCOE)**

Florianópolis

2006

Bianca Helena Beal

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS
FENÓLICOS DO GENGIBRE (*Zingiber officinale* ROSCOE)**

**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.**

Orientador: Dra. Roseane Fett

Florianópolis

2006

Aos meus pais, Lori e Jonas, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Roseane Fett, pela confiança, respeito e pela oportunidade concedida.

Às cooperativas Pé da Serra e Bioativas e ao produtor agrícola Sr. Nelson Confortin, pelo fornecimento das amostras.

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

Ao técnico Luciano Gonzaga, pelo auxílio no trabalho de laboratório e interpretação dos resultados das análises.

À Dra. Eugênia Marta Kuskoski, por tornar possível a realização das análises de atividade antioxidante.

À Melissa dos Santos Raymundo, pelas sugestões oferecidas durante a realização da pesquisa.

Ao Prof. Jorge Mancini Filho e Alessandro Lima, pela realização da análise cromatográfica.

Aos colegas de laboratório Gisele, Janaina, Érika, Márcia, Ciriele e Lucas, pelo auxílio prestado durante as análises.

A todos os professores do programa, por serem parte fundamental na aquisição de conhecimentos indispensáveis para a minha formação profissional.

Aos todos os colegas da Pós-Graduação, em especial à Janaina, Gisele, Tatiana, Michele, Roberta, Sabrina e Renata, pelo apoio e por tornarem ainda mais prazerosa a convivência no departamento.

Ao secretário da Pós-Graduação Sérgio, por ter sido um “porto seguro” quando entrei no mestrado.

Ao Renato Emydio da Silva Júnior, pelo auxílio na preparação do trabalho escrito, pelo carinho, companheirismo e pelas conversas que, indubitavelmente, enriqueceram minha percepção sobre o processo de pesquisa.

Aos meus pais, Lori e Jonas, pelo amor dedicado, por acreditarem no meu potencial, pelo ombro amigo nos momentos difíceis, pela compreensão e pela disposição em financiar meus estudos por um longo período. Por serem, enfim, o alicerce sustentador da edificação de minha vida.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Menor que meu sonho não posso ser

Lindolf Bell

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, [2006].

RESUMO

Os extratos etéreo, acetônico, alcoólico e aquoso de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) foram avaliados quanto ao conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, tendo como objetivo observar a influência de cada solvente extrator e da época de colheita sobre esses parâmetros. Para isto, as amostras de gengibre coletadas em dois períodos de colheita diferentes foram submetidas a análises com o método de Folin – Ciocalteu, o qual quantifica os fenólicos totais da amostra; ao método com o radical ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) e ao sistema de cooxidação β -caroteno/ácido linoléico, os quais medem a atividade antioxidante de cada extrato, sendo que o último foi também utilizado para avaliar o efeito sinérgico entre as amostras e o antioxidante sintético BHT (butil hidroxitolueno). Os resultados indicaram uma boa capacidade antioxidante dos extratos etéreo e aquoso, principalmente nos extratos das amostras coletadas próximas ao fim do período de colheita. Pode ser observada uma correlação linear entre o conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante ($r^2=0,9590$). Também foi demonstrado o sinergismo entre os extratos aquosos a 200 ppm e o BHT, apresentando aproximadamente 90% de inibição do processo oxidativo. As amostras de gengibre também foram fracionadas em: ácidos fenólicos livres, ésteres solúveis e insolúveis a fim de identificar os ácidos fenólicos presentes em cada fração. Essas frações foram submetidas à análise cromatográfica, além da avaliação quanto ao seu potencial antioxidante, através do método ABTS, e quanto ao conteúdo de fenólicos totais, de acordo com o método Folin-Ciocalteu. Observou-se uma boa quantidade de compostos fenólicos totais nas frações, variando de 846,37 a 1409,05 mg GAE (equivalentes em ácido gálico) por 100 g de amostra (peso seco). As frações foram submetidas à cromatografia gasosa e a quantificação foi baseada nos tempos de retenção dos padrões de ácidos fenólicos. Uma alta quantidade de ácido salicílico foi encontrada em todas as frações, com valores variando entre 75% e 98%. Outros ácidos, como o caféico, ferúlico, sináptico e gálico também foram encontrados nas frações, e sua presença pode ter influência sobre a atividade antioxidante total do gengibre, já que o ácido salicílico não possui atividade por si só. Os resultados indicam que o gengibre pode ser uma potencial fonte de antioxidantes naturais, possivelmente podendo ser utilizado como substituinte aos antioxidantes sintéticos amplamente utilizados pela indústria de alimentos, tendo em consideração a preocupação dos consumidores com a toxicidade desses aditivos.

Palavras-chave: gengibre, compostos fenólicos, atividade antioxidante.

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, [2006].

ABSTRACT

The etheric, acetonic, alcoholic and aqueous extracts of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) had their total phenolic content and antioxidant activity evaluated, aiming to observe the influence of the extraction solvent and the harvest time over these parameters. Thus, the ginger samples collected in two different harvest times were submitted to analysis with the Folin – Ciocalteu method, which quantifies the total phenolic content of the samples; to the ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) method and to the cooxidation system β -carotene/linoleic acid, which measures the antioxidant activity of each extract, considering that the last was also used to evaluate the synergism within the samples and the synthetic antioxidant BHT (butyl hydroxytoluene). The results indicated a high antioxidant capacity of the etheric and aqueous extracts, mainly in the extracts of the samples collected close to the end of the harvest time. A linear correlation could be observed within the total phenolic content and the antioxidant activity ($r^2=0,9590$). The synergism among the aqueous extracts and BHT could also be observed, showing approximately 90% of oxidation inhibition. The ginger samples were also fractionated to: free phenolic acids, esterified soluble bound and insoluble bound phenolic acids in order to identify the phenolic acids present in each fraction. These samples were submitted to chromatographic analysis, and also for the evaluation of their antioxidant potential, through ABTS method, and total phenolic content, according to Folin-Ciocalteu's method. A high quantity of total phenolics could be observed, varying from 846,37 to 1409,05 mg GAE (gallic acid equivalent) per 100 g of the sample (dry weight). The fractions were submitted to gas-chromatography and the quantification was based on the retention times of the phenolic acids standards. A high quantity of salicylic acid was found in all the fractions, which values varied from 75% to 98%. Some other acids, as caffeic, ferulic, synaptic and gallic were also found in the fractions, and their presence can influence the total antioxidant activity of ginger, considering that salicylic acid has no activity itself. The results indicate that ginger could be a potential source of natural antioxidants, possibly being utilized as a substitute for the synthetic antioxidants widely used by the food industry, considering the concerns on the toxicity of these additives.

Keywords: ginger, phenolic compounds, antioxidant activity.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	13
1.1 A necessidade de antioxidantes no organismo	14
1.2 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS)	15
1.3 Estresse oxidativo	19
1.4 Peroxidação lipídica	19
1.5 Os mecanismos de proteção por antioxidantes	21
1.6 Antioxidantes naturais	22
1.7 Compostos fenólicos	22
1.8 Métodos de avaliação da atividade antioxidante	28
<i>1.8.1 Métodos de análise e quantificação de compostos fenólicos</i>	<i>29</i>
1.8.1.1 Procedimentos de extração	30
<i>1.8.2 Método ABTS</i>	31
<i>1.8.3 Sistema β-caroteno/ácido linoléico</i>	32
1.10 As especiarias como antioxidantes	32
1.11 Gengibre	33
<i>1.11.1 Descrição botânica</i>	33
<i>1.11.2 Descrição geral</i>	34
<i>1.11.3 Cultivo</i>	35
<i>1.11.4 Beneficiamento</i>	36
<i>1.11.5 Aplicações</i>	37
1.12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
CAPÍTULO 2	48
CAPÍTULO 3	68
CONCLUSÕES	87

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Reação de Fenton	17
Figura 2. Reação de Haber-Weiss	18
Figura 3. Etapas da peroxidação lipídica.....	20
Figura 4: Estrutura química dos hidroxibenzoatos	23
Figura 5: Estrutura química dos hidroxicinamatos.....	23
Figura 6: Estrutura química do resveratrol.....	24
Figura 7. Estrutura química da catequina	25
Figura 8. Estruturas químicas da flavona e da isoflavona	25
Figura 9. Estruturas químicas dos ácidos (1) salicílico, (2) clorogênico, (3) ferúlico e (4) gálico	27
Figura 10. <i>Zingiber officinale</i> Roscoe: visão geral da planta e detalhes das flores.....	34
=====	
Figura 1 – Gráficos de atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ ácido linoléico (em % de inibição da oxidação) para as amostras coletadas em Águas Mornas, no primeiro e segundo tempos de colheita, respectivamente.	59
Figura 2 – Gráficos de atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ ácido linoléico (em % de inibição da oxidação) para as amostras coletadas em Santo Amaro da Imperatriz, no primeiro e segundo tempos de colheita, respectivamente.	60
Figura 3 – Gráficos de atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ ácido linoléico (em % de inibição da oxidação) para as amostras coletadas em Chapecó, no primeiro e segundo tempos de colheita, respectivamente.	61

Figura 4. Correlação linear entre a atividade antioxidante (TEAC) e o conteúdo de fenólicos totais (GAE) dos extratos de gengibre.....	62
=====	
Figura 1. Procedimento de extração e separação dos ácidos fenólicos livres, ésteres solúveis e ligantes insolúveis.	73
Figura 2. Correlação entre o conteúdo de fenólicos totais (GAE) e a atividade antioxidante das frações do gengibre.....	78
Figura 3. Cromatograma obtido a partir da fração ácidos fenólicos livres. (1) ácido salicílico; (2) ácido cinâmico; (3) ácido protocatequínico; (4) ácido ρ -cumárico; (5) ácido ferúlico; (6) ácido caféico; (7) ácido sináptico.	81
Figura 4. Cromatograma obtido a partir da fração ácidos fenólicos solúveis. (1) ácido salicílico; (2) ácido cinâmico; (3) ácido t-cinâmico; (4) ácido vanílico; (5) ácido gentísico; (6) ácido protocatequínico; (7) ácido ρ -cumárico; (8) ácido gálico; (9) ácido caféico; (10) ácido sináptico; (11) ácido elágico.	82
Figura 5. Cromatograma obtido a partir da fração ácidos fenólicos insolúveis. (1) ácido salicílico; (2) ácido cinâmico; (3) ácido t-cinâmico; (4) ácido vanílico; (5) ácido gentísico; (6) ácido o-cumárico; (7) ácido gálico; (8) ácido ferúlico; (9) ácido sináptico.	83

INTRODUÇÃO

O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) é uma especiaria cujo rizoma é amplamente comercializado em função de seu emprego alimentar e industrial, especialmente como matéria-prima para fabricação de bebidas, perfumes e produtos de confeitaria como pães, bolos, biscoitos e geléias (ELPO, 2004). A cultura do gengibre tornou-se efetivamente comercial no Brasil somente nas últimas décadas, após a introdução de variedade de rizomas gigantes por agricultores japoneses (TAVEIRA MAGALHÃES et al, 1997). Várias propriedades do gengibre foram comprovadas em experimentos científicos, citando-se as atividades antiinflamatória, antiemética e antináusea, antimutagênica, antiúlcera, hipoglicêmica, antibacteriana, entre outras (ZARATE, SUKRASNO e YEOMAN, 1992; HABSAH et al, 2000; DEDOV et al, 2002). Além de propriedades terapêuticas, o gengibre é de uso corrente na culinária, como condimento. O estudo de propriedades biológicas de espécies da família Zingiberaceae, à qual pertence o gengibre, ainda é muito escassa, principalmente no que se refere às suas propriedades antioxidantes.

Muitos processos indesejados de oxidação, incluindo a deterioração de alimentos, envolvem a presença de radicais livres. A peroxidação lipídica é um tipo de dano oxidativo que ocorre nas membranas celulares quando ácidos graxos insaturados reagem com níveis excessivos de ROS (espécies reativas de oxigênio) para formar radicais de ácidos graxos e hidroperóxidos lipídicos (LOOH). Esse processo desencadeia a autooxidação de ácidos graxos poliinsaturados, o que não somente diminui o valor nutricional dos alimentos, mas está também associado a danos na membrana celular, envelhecimento, doenças cardíacas e câncer (SPITELLER, 2001; SURH, 2002.). Além disso, a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) é um fator importante no desenvolvimento de doenças coronarianas e aterosclerose (FRANKE et al, 2005).

Há uma grande variedade de antioxidantes sintéticos utilizados pela indústria de alimentos, como o butilhidroxianisol (BHA) e o butilhidroxitolueno (BHT), como forma de aumentar a vida de prateleira e reduzir perdas nutricionais pela inibição da oxidação do substrato (SOARES, ANDREAZZA e SALVADOR, 2003). No entanto, há sérias preocupações quanto ao potencial tóxico e mutagênico (NAMIKI, 1990) dessas substâncias, o que evidencia o interesse em substituir aditivos alimentares sintéticos por alternativas

naturais. Por esse motivo, tem aumentado o interesse em métodos de extração, caracterização e utilização de antioxidantes naturais que possam servir como potenciais substituintes no retardo da oxidação lipídica em alimentos e no combate à carcinogênese e processos de envelhecimento.

Uma das fontes de antioxidantes naturais mais estudadas são os compostos fenólicos de plantas. Estes compostos se distribuem por todo o reino vegetal, estando presentes em várias partes da planta, como nos frutos, sementes, folhas e raízes (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1997). Estudos vêm demonstrando que o consumo de alimentos e bebidas ricos em compostos fenólicos está altamente relacionado com uma redução na incidência de doenças do coração (GORDON, 1996). Os fenólicos antioxidantes mais comuns em plantas incluem os compostos flavonóides (NIJVELDT, NOOD, HOORN, BOELEN, NORREN e LEEUWEN, 2001), tocoferóis, derivados do ácido cinâmico e ácidos orgânicos polifuncionais (MOREIRA e MANCINI-FILHO, 2004).

As especiarias vêm sendo utilizadas há muitos séculos para o enriquecimento do sabor e preservação dos alimentos (MOREIRA e MANCINI-FILHO, 2003). Alguns princípios ativos das especiarias, como a curcumina (cúrcuma), cuminaldeído (cominho), eugenol (cravo), piperina (pimenta preta), capsaicina (pimenta vermelha), e zingerona (gengibre) têm comprovada ação inibitória sobre a peroxidação lipídica (SHOBANA e NAIDU, 2000; SUHAJ, 2005).

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar o poder antioxidante de extratos de gengibre através de dois sistemas distintos [sistema β -caroteno/ácido linoléico e ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico)], bem como quantificar e identificar os compostos fenólicos presentes nas frações do gengibre: ácidos fenólicos livres, ésteres solúveis e insolúveis.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 A necessidade de antioxidantes no organismo

Os primeiros organismos a surgirem na terra viviam sob uma atmosfera pobre em O₂, isto é, eles eram essencialmente anaeróbios. Enquanto o conteúdo de O₂ na atmosfera crescia (devido à evolução de organismos com capacidade fotossintética), muitos organismos primitivos poderiam não ter sobrevivido. Presume-se que os organismos anaeróbios hoje presentes sejam os descendentes desses organismos primitivos que se defenderam dos altos níveis de O₂ atmosféricos restringindo-se a viver em ambientes onde o O₂ não poderia penetrar. No entanto, outros organismos deram início a um processo evolutivo envolvendo um sistema de defesa antioxidante para proteger-se da toxicidade do O₂. Os organismos que se adaptaram à presença de O₂ também o utilizaram nos processos metabólicos e para uma produção de energia eficiente, tendo o O₂ comoceptor final de elétrons numa cadeia transportadora de elétrons, como ocorre nas mitocôndrias (HALLIWELL, 1994).

Em 1954, Gerschman e colaboradores propuseram que o efeito tóxico do oxigênio poderia ser atribuído à formação de radicais de oxigênio, considerando que o ataque direto do O₂ parece não causar dano significativo nas células (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). Dessa hipótese originou-se a “teoria da toxicidade do superóxido”, ou seja, do oxigênio na sua forma reduzida. A descoberta da enzima superóxido dismutase (SOD) enfatizou o superóxido como o fator principal da toxicidade do O₂, sendo a atividade enzimática essencial para a proteção da célula contra o dano causado por esse radical de oxigênio (LÖLIGER et al, 1991).

Embora a exata função do oxigênio singlet (¹O₂) na toxicidade não esteja totalmente esclarecida, sabe-se que ele possui uma alta reatividade, sendo um poderoso agente oxidante. Existem duas formas de oxigênio singlet, sendo que em sistemas biológicos prevalece aquela com dois elétrons pareados em um mesmo orbital π , não sendo considerada, então, como radical livre (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). Efeitos deletérios, observados quando determinadas células são expostas à luz, têm sido atribuídos à produção de ¹O₂. A excessiva formação do ¹O₂ foi relacionada ao dano em células visuais expostas de forma prolongada à luz, e a sintomas na epiderme, como erupções e espessamento (SPATZ, 1992).

Em sistemas biológicos, tem sido identificada a presença do superóxido (produto da redução de um elétron do oxigênio) e de compostos derivados do oxigênio como agentes que participam de processos fisiológicos. No entanto, esses compostos podem estar implicados à etiologia e/ou ao desenvolvimento de vários distúrbios no organismo. Doenças autoimunes, aterosclerose, artrite reumatóide e câncer têm sido relacionados à presença dos compostos derivados de oxigênio no organismo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

Halliwell e colaboradores (1995) discutem sobre a influência desses agentes sugerindo que, para a maioria das doenças, a presença deles é uma consequência daquelas alterações orgânicas. Entretanto, tal fato não elimina a sua importância no desenvolvimento e nas implicações das doenças. Por outro lado, estudos epidemiológicos têm apresentado uma correlação inversa entre a incidência de várias doenças e altos níveis de antioxidantes plasmáticos, ou também a presença de antioxidantes na alimentação. Como consequência, o organismo necessitará destes antioxidantes para eliminar ou evitar a formação do superóxido e outros compostos reativos do oxigênio (ANDERSON e PHILLIPS, 1999). A preocupação com os efeitos deletérios das espécies derivadas de oxigênio é naturalmente seguida pelo interesse em compostos com atividade antioxidante.

1.2 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS)

Radical livre refere-se a qualquer espécie química capaz de existir independentemente de outras espécies (por isso o termo “livre”), e que possui um ou mais elétrons não pareados (HALLIWELL, 1994). Embora Halliwell et al. (1995) considerem que o termo “livre” diz respeito à existência independente das espécies atômicas ou moleculares, ressaltam que “radical livre” deve ser entendido como um átomo ou molécula contendo um ou mais elétrons não pareados, e que se locomove do local onde é gerado, diferentemente daquele radical retido no meio em que foi gerado (radical preso). Este conceito merece atenção nos estudos implicados com a ação de compostos antioxidantes.

“Espécies reativas de oxigênio” (ROS) é o termo coletivo utilizado para a inclusão, não só dos radicais contendo oxigênio (O_2^- e OH^\cdot), como também dos derivados de oxigênio não radicais (HALLIWELL, 1994), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ozônio (O_3).

A formação do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) em sistemas biológicos tem sido amplamente demonstrada e relacionada com processos celulares diversos tais como o mecanismo de defesa contra vírus e bactérias promovido por células fagocitárias. Os possíveis mecanismos de formação desta espécie em sistemas biológicos incluem reações de quimioexcitação (reações no escuro) catalisadas por peroxidases (mieloperoxidase) ou oxigenases (lipoxigenase ou ciclooxigenase); a reação de peróxido de hidrogênio com hipoclorito ou peroxinitrito; termod decomposição de dioxietanos, entre outras. O $^1\text{O}_2$ apresenta alta reatividade, oxidando facilmente muitos compostos orgânicos ricos em elétrons, como sulfetos, amins e fenóis. Sendo assim, são importantes alvos biológicos do $^1\text{O}_2$ moléculas fundamentais como ácidos graxos insaturados, proteínas e DNA (JAMIESON, 1989).

O oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$) pode reagir com outras moléculas para dar origem a ROS, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido (O_2^-) e radical hidroxila (OH^\cdot) (BORG, 1993; KANNER, GERMAN e KINSELLA, 1987).

O ânion superóxido é gerado pela redução tetravalente do oxigênio molecular a água. Este radical pode ser formado em células aeróbicas, durante o processo de respiração (na cadeia transportadora de elétrons) e é um importante fator que auxilia os fagócitos no processo de destruição de bactérias. Em seres vivos, o radical superóxido é removido por enzimas chamadas superóxido dismutase (SOD) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985; PACKER e GLAZER, 1990).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formado pela redução tetravalente do O_2 a H_2O e dismutação do O_2^- , não é um radical livre, mas um agente oxidante. Na presença do superóxido e íons metálicos de transição, o H_2O_2 pode gerar OH^\cdot pela reação de Fenton (Figura 1). O OH^\cdot , formado por esta reação e pela redução tetravalente do oxigênio molecular, é altamente reativo e causa danos ao DNA e dá início ao processo de peroxidação lipídica (PACKER e GLAZER, 1990).

Os ácidos graxos são susceptíveis ao ataque por ROS; portanto, qualquer reação ou processo que origine ROS pode definitivamente estimular a peroxidação lipídica. O seqüestro de hidrogênio é mais fácil em ácidos graxos insaturados do que em seus semelhantes saturados, o que os torna mais susceptíveis ao ataque das ROS (PACKER e GLAZER, 1990; PACKER, 1994).

O papel dos metais na formação das ROS é confirmado pelas reações de Fenton e de Haber-Weiss (Figura 2). O ferro é o metal pesado mais abundante no organismo e está biologicamente mais capacitado para catalisar as reações de oxidação de biomoléculas, embora o cobre possa também catalisar a reação de Haber-Weiss (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1984; FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A produção de ROS é uma consequência normal de uma série de reações bioquímicas essenciais ao organismo e resulta em danos biológicos apenas quando essa produção torna-se anormalmente elevada e/ou quando as defesas antioxidantes estão diminuídas (GUTTERIDGE, 1993; HALLIWELL, 1994).

Essas reações envolvem quatro vias importantes como:

1. reações catalisadas por oxidoreduases;
2. autooxidação das biomoléculas;
3. ação das peroxidases;
4. ação catalítica dos íons metálicos, como nas reações de Fenton e de Haber-Weiss.

Todas elas levam à formação de espécies superóxido, peróxido de hidrogênio ou óxido nítrico, seja por processo acidental, seja por síntese deliberada.

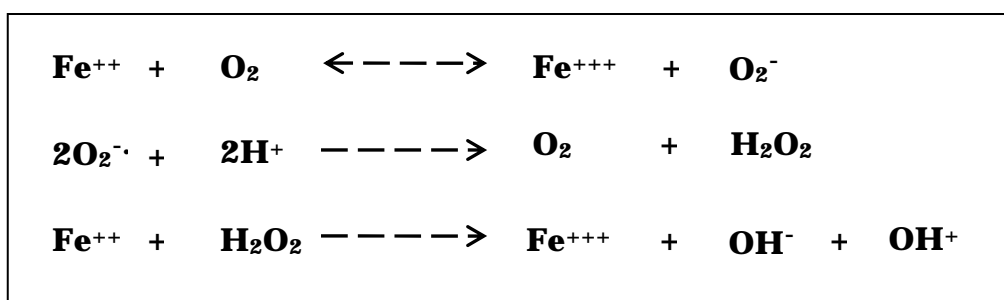


Figura 1. Reação de Fenton

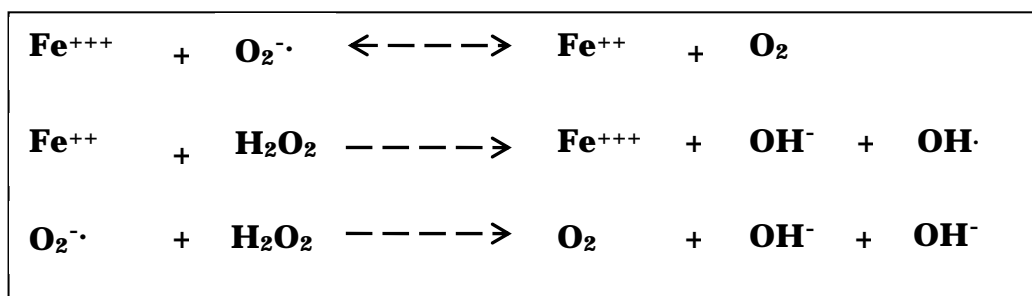


Figura 2. Reação de Haber-Weiss

A autoxidação de biomoléculas também pode ocorrer acidentalmente, levando à formação de ROS como, por exemplo, a autoxidação da adrenalina ou da hemoglobina. No citoplasma, a oxidação de ROS pode ocorrer via atividade das enzimas oxidases, as quais utilizam O₂ como aceptor de elétrons. Embora tenham sido identificadas várias fontes geradoras, a xantina oxidase é a enzima que tem recebido maior atenção em relação a um dano biológico causado por ROS (LÖLIGER et al., 1991). A formação de ROS pode ocorrer no processo de autoxidação devido a uma seqüência de reações químicas que serão desencadeadas quando o fornecimento de energia torna-se reduzido na célula, ou seja, sob condições de isquemia. O baixo fluxo sanguíneo e o menor fornecimento de O₂, com a conseqüente queda na produção de ATP, levam ao aumento do substrato oxidável, a hipoxantina e xantina, bem como à ativação da enzima xantina oxidase, que pode diretamente reduzir o O₂ e produzir O₂^{·-} e H₂O₂, quando ocorre a reoxigenação (LÖLIGER et al, 1991; HALLIWELL, 1994).

A ocorrência de ROS em alimentos é inevitável devido à própria natureza biológica dos alimentos. Kanner e colaboradores (1986) comprovaram que a peroxidação lipídica em músculos é iniciada por ROS e proteínas do soro. As ROS também iniciam a peroxidação lipídica em vegetais e gorduras e óleos animais (BRADLEY e MIN, 1992; RAWLS e VAN SANTEN, 1970). Em carnes, o H₂O₂ pode gerar OH[·] na presença de Fe⁺² via reação de Fenton, causando rápida deterioração dos lipídios presentes na carne (KANNER, HAREL e KINSELLA, 1987; KANNER, 1986; KANNER, 1994).

1.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo do organismo pode ser compreendido como a condição na qual a produção de ROS está aumentada ou quando as defesas antioxidantes normais estão diminuídas, levando a uma alteração no equilíbrio oxidantes/antioxidantes e, conseqüentemente, ao dano potencial da modificação oxidativa. Tal situação parece ser mais freqüente devido à síntese elevada das ROS (HALLIWELL, 1994), embora existam evidências demonstrando que as defesas antioxidantes não são estáticas, podendo ser induzidas em situação de estresse. A correlação entre o estresse oxidativo e vários distúrbios no organismo, como doenças autoimunes, doenças neurodegenerativas (ZANA, JANKA e KÁLMÁN, 2006) câncer e doenças cardiovasculares, tem sido proposta (FREI, 1999).

1.4 Peroxidação lipídica

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ROS, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Como conseqüência, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo das organelas (como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas) e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular. A peroxidação lipídica também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Os processos de lipoperoxidação nem sempre são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cadeia a partir do ácido araquidônico e, portanto, na resposta inflamatória. Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão representadas na Figura 3, onde L representa o lipídio. A iniciação ocorre quando um agente oxidante dá origem a um radical peroxila iniciador (LOO[•]) através de uma reação com um lipídio (LH) ou com um hidroperóxido

lipídico preexistente (LOOH). A propagação são ciclos de abstração dos átomos de hidrogênio de ácidos graxos poliinsaturados por LOO· para gerar novos LOO's (após adição de O₂), o que resulta numa rede de conversão de lipídios a LOOHs. A terminação da peroxidação lipídica envolve a reação de dois LOO's para formar produtos não-radicais ou a reação de um LOO· com outro radical terminador para gerar espécies radicais não-propagadoras (ARUOMA, 1994).

Esta reação pode ser catalisada por íons ferro ou por conversão de hidroperóxidos lipídicos em radicais altamente reativos que, por sua vez, iniciam nova cadeia de reações, denominada ramificação. Essas reações podem ser rápidas ou lentas, dependendo da valência do ferro (POKORNY, YANISHLIEVA, GORDON, 2001; TOMCHICK et al, 2001).

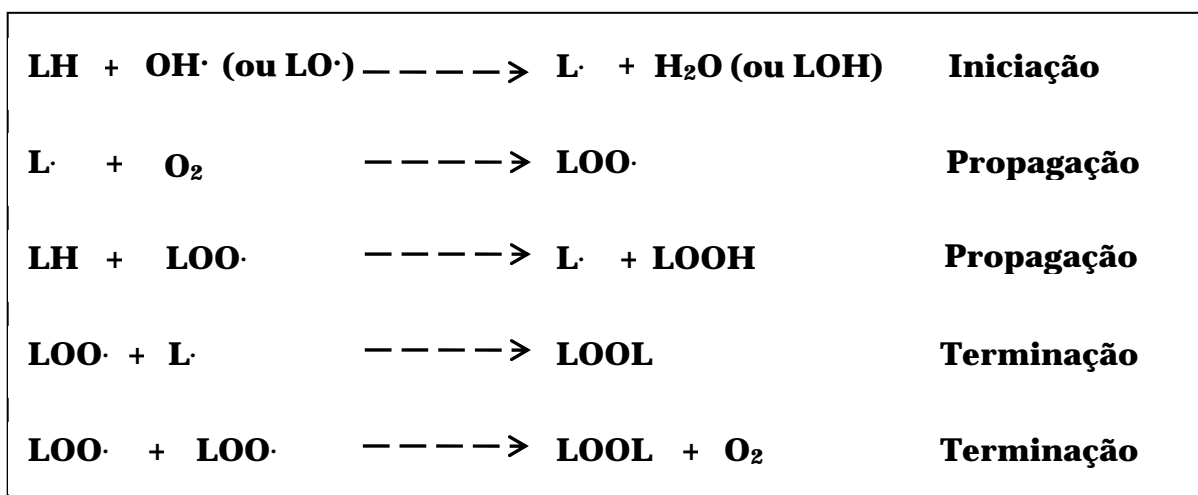


Figura 3. Etapas da peroxidação lipídica.

O radical hidroxila é freqüentemente reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante da lipoperoxidação. Entretanto, estudos indicam que o ferro também desempenha papel determinante na iniciação deste processo, sendo necessária uma relação equimolar Fe⁺³: Fe⁺² no meio, para que o ocorra a lipoperoxidação (HERSHKO, 1989; TADOLINI et al, 1997).

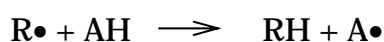
A peroxidação lipídica freqüentemente ocorre em resposta ao estresse oxidativo, e uma grande diversidade de aldeídos podem ser formados quando hidroperóxidos lipídicos são

quebrados em sistemas biológicos. Alguns desses aldeídos são altamente reativos e podem ser considerados como mensageiros secundários tóxicos, os quais se disseminam e aumentam os eventos iniciadores da produção de radicais livres (ESTERBAUER, SCHAUR e ZOLLNER, 1991).

1.5 Os mecanismos de proteção por antioxidantes

Os antioxidantes podem ser compreendidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações comparadas ao substrato oxidável, retardam ou inibem significativamente a oxidação daquele substrato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; HALLIWELL, 1990). Essa inibição ou diminuição na velocidade de reação ocorre por ação nas diferentes etapas do processo de oxidação, atuando sobre diversos substratos, desde uma molécula simples a polímeros e biosistemas complexos (HALLIWELL et al, 1995).

Os antioxidantes com efeito preventivo, classificados como primários, podem atuar evitando a iniciação pela captação de radicais iniciadores ($R\bullet$), agindo como doadores de H^+ ou de elétrons (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989):



Entre esses compostos incluem-se antioxidantes sintéticos, carotenóides, tocoferóis, compostos fenólicos e alguns aminoácidos (NAMIKI, SUNAGAWA e NOJI, 1990; ZHENG e WANG, 2001; SELLAPPAN, AROH e KREWER, 2002). Podem agir também como queladores de metais, ação proposta para alguns aminoácidos, ácido cítrico, EDTA e compostos fenólicos.

Os antioxidantes também podem agir na decomposição de peróxidos, convertendo-os à forma inativa por ação de agentes redutores, bloqueando a reação em cadeia, por meio da captação de intermediários reativos como radicais peroxila e alcoxila. Esses são os antioxidantes secundários. Os compostos fenólicos, antioxidantes sintéticos, vitaminas A e E, aminas, grupamentos tiol e dissulfetos são capazes de agir sobre peróxidos, evitando a

propagação da reação de oxidação (NAMIKI, SUNAGAWA e NOJI, 1990; LÖLIGER et al., 1991).

1.6 Antioxidantes naturais

A preocupação com a substituição de aditivos sintéticos pelos naturais evidenciou os estudos sobre compostos com potencial efeito antioxidante de fontes naturais.

Várias pesquisas têm sido realizadas na área de antioxidantes naturais, as quais têm como objetivos a identificação de novas fontes com propriedade antioxidante e também a identificação química de seus compostos. Entretanto, a utilização de antioxidantes naturais em alimentos ainda é muito restrita.

Entre as fontes de antioxidantes naturais estão incluídas grãos e sementes de oleaginosas (NAMIKI, SUNAGAWA e NOJI, 1990), de cereais, sementes de frutas cítricas, raízes, castanhas, nozes e microalgas (MARCO, 1968; LEONG e SHUI, 2002; SOTERO, 2002; RIVERO et al., 2003).

1.7 Compostos fenólicos

Entre as substâncias de origem vegetal capazes de agir como antioxidantes estão incluídos minerais, vitaminas, proteínas (especialmente da soja), pigmentos carotenóides e compostos fenólicos, entre outros. Os fenólicos estão largamente distribuídos nos alimentos, sendo a quantidade presente na alimentação humana bastante significativa (VAN ACKER et al., 1996; KÄHKÖNEN et al., 1999; SOARES, 2002). Classificados como compostos fenólicos estão os fenóis simples e ácidos fenólicos, derivados do ácido hidrocínâmico e flavonóides, os quais são substâncias bioativas de grande ocorrência em vegetais, sendo consideradas boas fontes de antioxidantes naturais.

Quimicamente, os fenólicos podem ser definidos como substâncias que possuem pelo menos um anel aromático e um ou mais grupamentos hidroxila, podendo apresentar também

outros grupos substituintes em sua estrutura, como glicosídios, ésteres ou metil ésteres. Os compostos fenólicos de fontes vegetais têm origem em uma das principais classes de metabólitos secundários de plantas e podem ser divididos em dois grupos: os flavonóides (derivados da fenilalanina e ácido acético) e os não flavonóides (derivados dos ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico). Os denominados de flavonóides são os que apresentam a estrutura química descrita como C₆-C₃-C₆. Já os denominados de não flavonóides são classificados como (BURNS et al, 2001):

- os derivados das estruturas químicas C₆-C₁ (Figura 4), específicas dos ácidos hidroxibenzóico, gálico e elágico;
- os derivados das estruturas químicas C₆-C₃ (Figura 5), específicas dos ácidos caféico, p-cumárico e hidroxicinamatos;
- os derivados das estruturas químicas C₆-C₂-C₆ (Figura 6), específicas dos trans-resveratrol, cis-resveratrol e trans-resveratrol-glicosídeo.

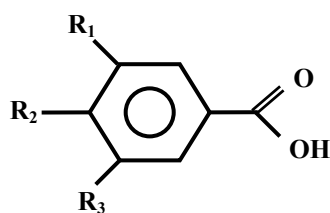


Figura 4: Estrutura química dos hidroxibenzoatos

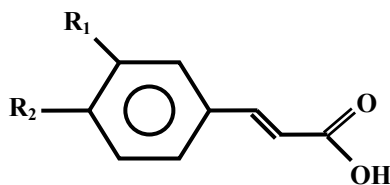


Figura 5: Estrutura química dos hidroxicinamatos

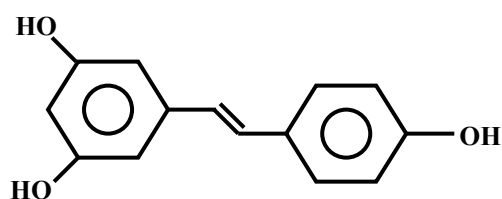


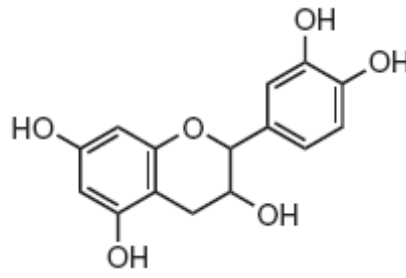
Figura 6: Estrutura química do resveratrol

Vegetais e alimentos contêm uma grande variedade de compostos fenólicos e seus derivados, incluindo fenóis simples, fenilpropanóides, derivados do ácido benzóico, flavonóides, taninos, entre outros. Essas substâncias são essenciais ao crescimento e reprodução das plantas, atuando também como agentes de defesa contra patógenos e predadores e possuindo importante papel na pigmentação dos vegetais (SHAHIDI e NACZK, 1995).

Fenóis simples são monofenóis e difenóis presentes, por exemplo, em frutas. O mais importante grupo dos fenólicos em alimentos são os flavonóides, que consistem principalmente nos seguintes compostos: 1) catequinas presentes em frutas e em folhas de chá (Figura 7); 2) flavonas/isoflavonas (Figura 8); 3) flavanóis e seus glicosídeos, como a quercetina, mircetina e rutina presentes em outros vegetais (HEIM, TAGLIAFERRO e BOBILYA, 2002; SOARES, 2002).

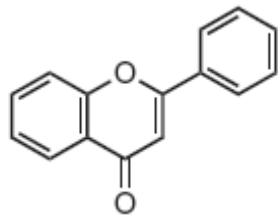
Além da capacidade antioxidante como bloqueadores dos radicais na reação em cadeia, os compostos fenólicos são capazes de eliminar o radical hidroxila, superóxido e oxigênio singlet (ARUOMA, 1997; ARNAO, 2000). A inativação de radicais de oxigênio por compostos fenólicos ocorre pela formação de espécies de menor reatividade ou pela ação como doador de hidrogênio (HEIM, TAGLIAFERRO, BOBILYA, 2002). A menor reatividade é devido ao deslocamento do elétron não pareado para a estrutura do anel aromático (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1989; NIKI, 2002). 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).

Muitas propriedades dos produtos vegetais estão associadas com a presença, tipo e conteúdo de seus compostos fenólicos. A adstringência dos alimentos, efeitos benéficos sobre a saúde e até mesmo suas propriedades antinutricionais - quando presentes em grandes quantidades - são importantes aos consumidores. Por esta razão, vários métodos de análise de diferentes classes de fenólicos e polifenóis têm sido recentemente realizados.

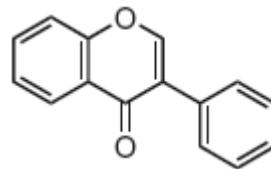


Catequina

Figura 7. Estrutura química da catequina



Flavona



Isoflavona

Figura 8. Estruturas químicas da flavona e da isoflavona

1.7.1 Ácidos fenólicos

Existem duas classes de ácidos fenólicos: os derivados do ácido benzóico e os derivados do ácido cinâmico. O conteúdo de ácidos hidroxibenzoicos em plantas comestíveis é geralmente muito baixo, com a exceção de algumas frutas, repolho roxo e cebolas, os quais podem conter algumas dezenas de miligramas por quilograma de peso fresco (SHAHIDI e NACZK, 1995). Chás são importantes fontes de ácido gálico (Figura 9): chás de folhas podem conter mais de 4,5g/kg em peso fresco (TOMAS-BARBERAN e CLIFFORD, 2000). Além disso, os ácidos hidroxibenzoicos são componentes de estruturas complexas como taninos hidrolisáveis (CLIFFORD e SCALBERT, 1999). Devido ao fato de que esses ácidos hidroxibenzoicos – tanto livres quanto esterificados – são encontrados apenas em poucas plantas consumidas pelo homem, eles não foram extensivamente estudados e não são considerados como sendo de grande interesse nutricional.

Os ácidos hidroxicinâmicos são mais comuns que os hidroxibenzoicos e seus representantes principais são os ácidos salicílico (Figura 9), *p*-cumárico, caféico, ferúlico (Figura 9) e sináptico. Estes ácidos são raramente encontrados na forma livre, exceto em alimentos processados, os quais já sofreram processos de congelamento, esterilização e fermentação. Os ligantes são derivados glicosilados de ésteres do ácido quínico, shiquímico e tartárico. Os ácidos caféico e quínico se combinam para formar o ácido clorogênico (Figura 9), o qual é encontrado em vários tipos de frutas e em grandes concentrações no café: uma única xícara pode conter entre 70-350 mg de ácido clorogênico (CLIFFORD, 1999; SHAHIDI, 2004).

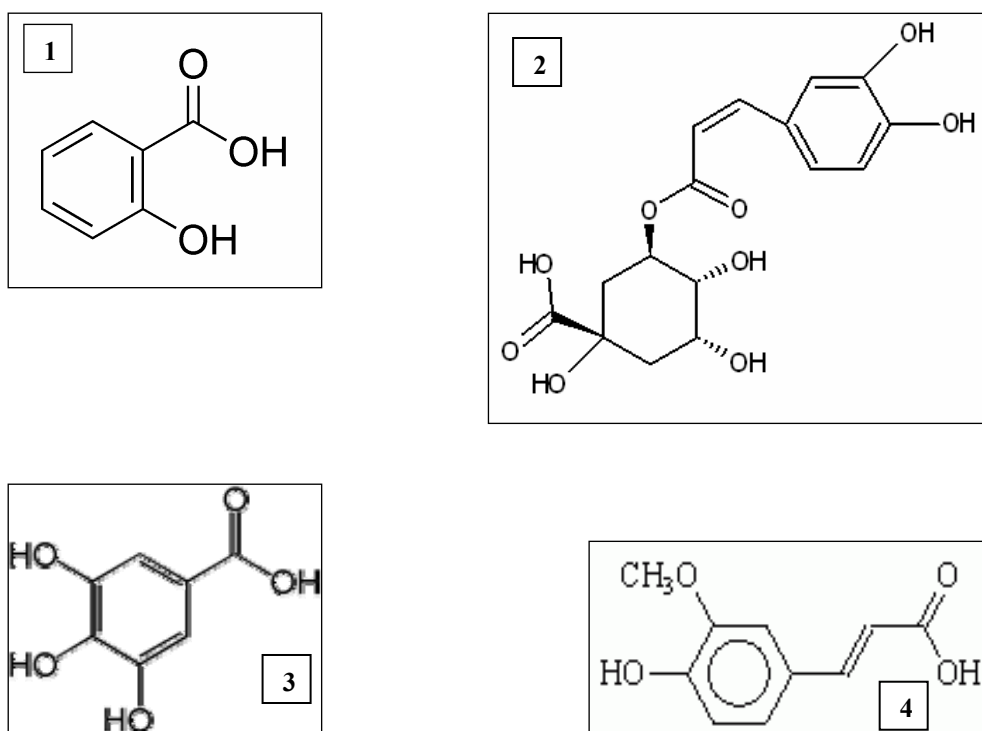


Figura 9. Estruturas químicas dos ácidos (1) salicílico, (2) clorogênico, (3) ferúlico e (4) gálico

1.7.1.1 Ácidos fenólicos como antioxidantes em alimentos

Vários estudos foram realizados com a intenção de verificar o potencial antioxidante dos ácidos fenólicos como possíveis substituintes dos antioxidantes sintéticos, amplamente utilizados na conservação de alimentos lipídicos por chegarem a aumentar a vida útil desses produtos entre 15% e 200% (DURAN e PADILLA, 1993).

Em estudos de ácidos fenólicos e dos ácidos cinâmicos presentes em grãos de soja e seus derivados, quatro apresentaram uma atividade antioxidante significativa. São eles: ácido clorogênico, ácido caféico, ácido p-cumárico e ferúlico (PRATT e BIRAC, 1979).

Medindo a eficiência de alguns ácidos fenólicos como antioxidantes em sistema lipídico, através de Rancimat[®], verificou-se uma boa atividade antioxidante dos ácidos protocatequínico, caféico, ferúlico e gálico. No entanto, esses compostos, assim como os demais ácidos fenólicos, possuem baixa solubilidade neste sistema, limitando sua utilização e

seu potencial antioxidante (DZIEDZIC e HUDSON, 1984). Porém, estas substâncias podem sofrer modificações, através de alquilação ou esterificação, com ácidos graxos de cadeia longa, tornando-se lipossolúveis. Na avaliação dos ácidos caféico, protocatequínico, *p*-hidroxibenzóico, ferúlico e *p*-cumárico em sistema lipídico, alguns deles, como o caféico e o protocatequínico, apresentaram atividade antioxidante superior ao α -tocoferol e ao BHT (VON GADOW et al, 1997).

Também foi testada a atividade antioxidante da fração polar contida em óleo de oliva refinado através do método de Shall (estufa a 60°C, no escuro), no próprio produto, determinando-se o índice de peróxidos como indicador do processo oxidativo (PAPADOPOULOS e BOSKOU, 1991). O extrato da fração polar é constituído principalmente por compostos fenólicos, particularmente por ácidos fenólicos. Os resultados mostraram que a ação antioxidante desta fração foi inferior à do BHT. A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos foi individualmente testada, utilizando a mesma metodologia. O ácido caféico apresentou atividade superior ao BHT, enquanto os ácidos protocatequínico e siríngico foram inferiores ao BHT. Já os ácidos *p*-cumárico, *p*-hidroxibenzóico, *o*-cumárico e vanílico demonstraram pouca ou nenhuma atividade.

1.8 Métodos de avaliação da atividade antioxidante

Os antioxidantes são utilizados em uma grande variedade de produtos alimentícios, e sua atividade pode variar dependendo da temperatura, composição e estrutura do alimento e disponibilidade de oxigênio. As temperaturas nas quais a atividade antioxidante pode ser necessária variam muito, desde 180–200°C em óleos para frituras, a aproximadamente 5°C para produtos como margarinas e maioneses, os quais são armazenados em geladeira. Além da temperatura de processamento e armazenamento às quais esses produtos são expostos, os constituintes agregados como água, proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais e outros constituintes alimentares variam, assim como a estrutura física do alimento. Isso pode causar mudanças significativas na atividade do antioxidante em diferentes sistemas alimentícios (POKORNY, YANISHLIEVA e GORDON, 2001). É comum observar que antioxidantes apolares, como o α -tocoferol, são relativamente ineficientes em óleos, mas altamente eficazes em uma emulsão água-óleo. Em contraste, um antioxidante polar como o ácido ascórbico ou

trolox (um análogo da vitamina E, solúvel em água) pode ter maior eficiência em óleos do que em emulsões. Este fato tem sido descrito como o “paradoxo polar”, ou seja, antioxidantes polares são mais ativos em lipídios puros enquanto os apolares são mais ativos em substratos polares (PORTER, 1993; FRANKEL et al, 1994). Normalmente, um método rápido para avaliar a atividade antioxidante é mais vantajoso do que seria desenvolver o produto, armazenar à temperatura ideal e, então, avaliar o estado oxidativo do alimento. Conseqüentemente, deve-se estudar qual o melhor método de avaliação da atividade antioxidante para cada caso, considerando todos os prós e contras de cada método.

1.8.1 Métodos de análise e quantificação de compostos fenólicos

Vários métodos para análise de compostos fenólicos já foram desenvolvidos e um grande número de revisões sobre a análise de polifenóis publicados (ANTOLOVICH et al., 2000; DESHPANDE, CHERYAN e ESALUNKHE, 1986; HAGERMAN et al., 1998; JACKMAN, YADA e TUNG, 1987; MAKKAR, 1989; MARKHAM, 1975; PORTER, 1989; SCALBERT, 1992; SCALBERT, MONTIES e JANIN, 1989; TEMPEL, 1982). Essas análises podem ser classificadas entre as que determinam o conteúdo de fenólicos totais e aquelas que quantificam um grupo específico ou classe de compostos fenólicos. Os métodos Folin-Denis e Folin-Ciocalteu são exemplos de métodos utilizados para a determinação de fenólicos totais (SALUNKHE, CHAVAN e KADAM, 1989). Várias técnicas cromatográficas já foram desenvolvidas para identificar e quantificar fenólicos específicos. No entanto, apenas polifenóis passíveis de extração sob condições específicas podem ser estudados através dos métodos descritos (ANTOLOVICH et al., 2000). Hillis and Swain (1959) observaram que, após extração exaustiva, alguns fenólicos adicionais puderam ser extraídos com a mudança do solvente.

As análises de compostos fenólicos são influenciadas pela sua estrutura química, método de extração empregado, tamanho das partículas da amostra e tempo e condições de armazenamento, bem como pelo método de análise, seleção de padrões e presença de substâncias interferentes, como gorduras, terpenos e clorofilas. Por essas razões, nenhum método de extração é totalmente eficiente na extração de todos os fenólicos ou de uma classe específica de compostos fenólicos em alimentos. A solubilidade dos polifenóis é determinada

pelo tipo de solvente (polaridade) utilizado, grau de polimerização dos fenólicos, interação de fenólicos com outros constituintes do alimento e formação de complexos insolúveis. Os solventes mais freqüentemente utilizados para a extração de compostos fenólicos incluem metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformamida e suas combinações (ANTOLOVICH et al., 2000).

1.8.1.1 Procedimentos de extração

Devido à natureza química dos compostos fenólicos, nenhum sistema de extração por solventes é adequado ao isolamento de todas as classes de fenólicos de alimentos ou mesmo de uma classe específica de fenólicos. Estas variam desde substâncias simples a complexos altamente polimerizados que incluem quantidades variáveis de ácidos fenólicos, fenilpropanóides, antocianinas e taninos, e possíveis interações de fenólicos com carboidratos, proteínas e outros compostos alimentares. Normalmente, são necessários procedimentos adicionais de extração a fim de purificar e remover fenólicos indesejáveis ou substâncias não fenólicas.

Krygier, Sosulski e Hogge (1982) extraíram ácidos fenólicos livres e esterificados de sementes oleaginosas utilizando uma mistura de metanol-acetona-água (7:7:6, v/v/v), à temperatura ambiente. Primeiramente, os fenólicos livres foram extraídos com éter etílico e então o extrato foi tratado com NaOH 4M sob atmosfera de nitrogênio. O hidrolisado foi acidificado e os ácidos fenólicos liberados foram extraídos com éter etílico. Após exaustiva extração com uma mistura de metanol-acetona-água, a amostra foi tratada novamente com NaOH 4M sob atmosfera de nitrogênio para liberar os ácidos fenólicos de ligantes insolúveis.

Por outro lado, Kozłowska et al. (1983) extraíram ácidos fenólicos com metanol 80 %. Outros solventes, como etanol e acetona, já foram utilizados na extração de fenólicos, freqüentemente adicionados de água em diferentes proporções (ANTOLOVICH et al., 2000; SHAHIDI e NACZK, 1992).

Dabrowski e Sosulski (1984) extraíram ácidos fenólicos livres de farinhas de canola com tetrahydrofurano, acetona-tetrahydrofurano (1:1), e acetona-metanol (1:1), bem como em

metanol-acetona-água (7:7:6) para os ácidos fenólicos livres e esterificados. Uma solução de éter etílico-acetato de etila-tetrahidrofurano foi utilizada para transferir os ácidos fenólicos hidrolisados da fase aquosa para a análise dos esterificados e ligantes insolúveis.

1.8.2 Método ABTS

O método ABTS é um dos mais utilizados entre os testes indiretos de avaliação da atividade antioxidante. Foi primeiramente sugerido por Rice-Evans, Davies, Gopinathan e Milner (1993) para avaliar amostras biológicas e então foi amplamente aplicado no estudo de alimentos e fenólicos naturais solúveis em água. O princípio do método consiste em monitorar o decaimento do radical ABTS produzido pela oxidação do 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), causada pela adição de uma amostra contendo fenólicos. O ABTS absorve na faixa de 600 – 750 nm e pode ser facilmente determinado por espectrofotometria. Na ausência de fenólicos, o ABTS é estável, mas ele reage energeticamente com um doador de H, como os fenólicos, sendo então convertido em uma forma incolor de ABTS. Os autores determinaram que a quantidade de ABTS consumida está relacionada à reação com os fenólicos presentes na amostra, a qual é expressa em equivalentes Trolox (unidades de concentração). Este valor foi designado TEAC, sigla em inglês para “capacidade antioxidante equivalente ao Trolox”. Como o TEAC para o Trolox foi definido como sendo 1, o valor TEAC para um antioxidante individual é o número de radicais ABTS consumidos para cada molécula de antioxidante (CAMPOS e LISSI, 1997).

A vantagem do ensaio ABTS é sua simplicidade, o que permite a aplicação em análises de rotina em qualquer laboratório. Sua principal limitação é geral a todos os métodos indiretos de avaliação da atividade antioxidante: o valor TEAC caracteriza a capacidade da amostra estudada em reagir com o ABTS, mais do que sua capacidade de inibir o processo oxidativo. A reação com o ABTS ocorre de forma lenta com vários fenólicos e amostras de produtos naturais (CAMPOS, ESCOBAR e LISSI, 1996). Além disso, o resultado da determinação do TEAC depende do tempo de incubação, assim como a razão entre a quantidade de amostra e a concentração do radical. A pequena seletividade do ABTS na reação com doadores de H é mais uma limitação do método (ARTS et al, 2004).

1.8.3 Sistema β -caroteno/ácido linoléico

Este ensaio baseia-se na perda de cor do β -caroteno durante sua cooxidação com o ácido linoléico em uma emulsão aquosa, monitorada como o decaimento da absorvância na região visível (MILLER, 1971). A adição de uma amostra contendo antioxidantes, antioxidantes individuais (VON GADOV, JOUBERT e HANSMANN, 1997), ou extratos naturais (MOURE et al, 2000) resulta no retardo da perda de cor do β -caroteno. O ensaio quantifica a atividade antioxidante como porcentagem de inibição. Em princípio, o ensaio poderia ser mais quantitativo e reproduzível se o regime de cooxidação fosse transformado em um regime de controle da reação em cadeia.

1.10 As especiarias como antioxidantes

Fontes de compostos fenólicos são especiarias, que há muitos séculos têm sido utilizadas para o enriquecimento do sabor e preservação de alimentos (MOREIRA e MANCINI-FILHO, 2003).

O termo “especiaria” significa qualquer substância vegetal aromática, integral, cortada ou na forma triturada, a qual tem como função principal conferir sabor aos alimentos, segundo o código de regulamentação federal sobre rotulagem de alimentos do FDA (Food and Drug Administration).

Esses temperos possuem uma posição especial em relação a outras fontes naturais de antioxidantes, pois são usados tradicionalmente como ingredientes, o que permite que sejam facilmente e diretamente utilizados, exercendo de forma eficiente sua atividade antioxidante nos alimentos (MAHAN e ARLIN, 1994; MOREIRA e MANCINI-FILHO, 2003). As propriedades antioxidantes de várias ervas e especiarias estão correlacionadas com a sua ação junto ao processo de peroxidação lipídica em alimentos (MILOS e JERKOVIC, 2000). Dentro desta abordagem, há estudos que relacionam a atividade antioxidante destes vegetais (KRAMER, 1985) com o seu conteúdo em compostos fenólicos (SHAHIDI e WANASUNDARA, 1992).

1.11 Gengibre

1.11.1 Descrição botânica

Zingiber officinale (Figura 10) foi inicialmente descrito, em 1807, pelo botânico William Roscoe. Pertence à família Zingiberaceae, a qual se distribui amplamente na região sudoeste da Ásia e do Arquipélago Malaio, incluindo mais de 1200 espécies distribuídas em 53 gêneros. O gênero *Zingiber* inclui aproximadamente 85 espécies. Botanicamente, o gengibre está assim categorizado (ELPO, 2004):

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Classe: Liliopsida

Ordem: Zingiberales

Família: Zingiberaceae Lindl, 1835.

Gênero: *Zingiber* P. Moller, 1754.

Espécie: *Zingiber officinale* Roscoe, 1807.



Figura 10. *Zingiber officinale* Roscoe: visão geral da planta e detalhes das flores.

1.11.2 Descrição geral

O gengibre possui um rizoma articulado, septante, carnoso, revestido de epiderme rugosa e de cor pardacenta. Na parte superior, possui pequenos tubérculos anelados, resultantes da base de antigos caules aéreos. Na parte inferior, possui muitas raízes adventícias, cilíndricas, carnosas e de cor brancacentas. Os caules são eretos, formados por muitas folhas dísticas, sendo as basilares simples com bainhas glabras e estriadas no sentido

longitudinal. As inflorescências com espigas ovóides ou elipsóides formam-se no ápice dos pedúnculos que saem do rizoma. As flores apresentam-se zigomorfas, hermafroditas, com coloração amarelo-esverdeada. As brácteas florais possuem cálice e corola denteados que envolvem uma só flor. O fruto é uma cápsula que se abre em três lóculos e abriga sementes azuladas com albúmen carnoso (DAHLGREN, CLIFFORD, YEO, 1985).

O rizoma do gengibre apresenta corpo alongado, um pouco achatado, com ramos fragmentados irregularmente, de 3 a 16 cm de comprimento, 3 a 4 cm de largura e 2 cm de espessura. Externamente, sua coloração varia do amarelo ouro a marrom brilhante, com estrias longitudinais (ELPO, 2004); algumas vezes fibroso, com terminações conhecidas como “dedos”, as quais surgem obliquamente. Internamente, de cor marrom-amarelada, apresentando uma endoderme amarela, com numerosos feixes fibrovasculares e abundantes células oleaginosas contendo oleoresina e 1% a 4% de óleo essencial (ZANCAN et al., 2002). Pode apresentar odor agradável e aromático; sabor fortemente pungente; cor amarela suave a creme (VAN BEEK et al, 1987). A composição dos óleos essenciais varia conforme a origem geográfica, secagem, época de colheita, tipo de adubação, mas os principais constituintes responsáveis pelo aroma parecem permanecer constantes (ELPO, 2004). Estes compostos incluem: zingibereno, curcumeno, sesquifelandreno e bisaboleno. Aldeídos monoterpênicos e álcoois também estão presentes (VAN BEEK et al, 1987).

1.11.3 Cultivo

O gengibre é uma erva rizomática perene, cujo cultivo tem grande importância nos países asiáticos, não somente para o consumo local, como também para a exportação, destinada a países ocidentais que o consomem em grandes quantidades, especialmente como matéria-prima para fabricação de bebidas, perfumes e produtos de confeitaria, como pães, biscoitos e geléias (DAHLGREN, CLIFFORD, YEO, 1985).

O cultivo do gengibre foi introduzido no Brasil logo após o início da colonização européia. No entanto, somente nas últimas décadas - após a introdução de variedades de rizomas gigantes por agricultores japoneses - a cultura do gengibre tornou-se efetivamente comercial no Brasil, especialmente nos litorais de Santa Catarina, São Paulo e do Paraná. Este

desponta como o maior produtor nacional de rizomas, totalizando 3.945 toneladas/ano. Incluído no grupo “especiarias”, o gengibre representa hoje o terceiro lugar entre as plantas medicinais, aromáticas e condimentares produzidas no estado do Paraná (ELPO, 2004). Embora o Brasil seja considerado um dos grandes fornecedores mundiais de gengibre, sua produção é pequena comparada à de outros países, envolvendo um conjunto relativamente pequeno de agricultores. A produtividade média brasileira tem sido registrada em torno de 20t/ha, cifra bastante inferior à obtida nos principais produtores mundiais, como Índia, China e Nigéria.

O gengibre brasileiro é geralmente comercializado “in natura” e se destina principalmente à exportação. A quantidade de rizomas destinada à exportação representa 70% a 80% da colheita brasileira, havendo, portanto, uma quebra entre 20% - 30% por ocasião do beneficiamento (ELPO, 2004).

1.11.4 Beneficiamento

O beneficiamento ocorre na propriedade do agricultor e consiste em lavagem, limpeza, secagem, classificação, acondicionamento (embalagem) e transporte, descritos a seguir:

- Lavagem – remoção do solo, matéria orgânica e restos vegetais com jatos de água pressurizada.
- Limpeza ou Toalete – processo manual de remoção das partes com defeito e partes da planta-mãe.
- Pós-colheita – tratamento para desinfecção superficial, feito com solução de hipoclorito de sódio a 2% e benomil, a fim de prevenir o ataque de fungos.
- Secagem – remoção da umidade resultante da lavagem e tratamento pós-colheita, feita naturalmente, com duração de dois a três dias.
- Classificação – separação dos rizomas seguindo os padrões de qualidade de acordo com o mercado a que serão destinados (interno ou externo).
- Embalagem – acondicionamento dos rizomas em bandejas de poliestireno expandido cobertas com filme de PVC (mercado interno) ou em caixas de madeira (mercado externo); permanência em local fresco e ventilado.

- Armazenamento – realizado em câmara fria até a expedição do produto.
- Expedição – a carga é montada em pallets cuja dimensão ou número de caixas irá depender do meio de transporte a ser utilizado, de acordo com o destino final do produto. Para a exportação, o transporte é marítimo e são usados containeres frigoríficos.

1.11.5 Aplicações

Como planta medicinal, o gengibre é uma das mais antigas e populares do mundo. Suas propriedades terapêuticas são resultado da ação de várias substâncias, especialmente do óleo essencial que contém canfeno, felandreno, zingibereno e zingerona (ZARATE, SUKRASNO e YEOMAN, 1992).

Popularmente, o chá de gengibre, feito com pedaços do rizoma fresco fervido em água, é usado no tratamento contra gripes, tosse e resfriado. Banhos e compressas quentes de gengibre são indicados para aliviar os sintomas de gota, artrite, dores de cabeça e na coluna, além de diminuir a congestão nasal.

Várias propriedades do gengibre foram comprovadas em experimentos científicos, citando-se as atividades antiinflamatória, antiemética e antináusea, antimutagênica, antiúlcera, hipoglicêmica, antibacteriana, entre outras (ZARATE, SUKRASNO e YEOMAN, 1992; HABSAH et al, 2000; DEDOV et al, 2002). Além de propriedades terapêuticas, o gengibre é de uso corrente na culinária, como condimento ou no preparo de bebidas, como o ginger ale, ginger beer e, principalmente, de chás.

As plantas da família Zingiberaceae, em geral, apresentam ingredientes pungentes. O gengibre apresenta compostos como 6-gingerol e 6-paradol, os quais possuem efeito antitumoral (ZARATE, SUKRASNO, YEOMAN, 1992). Segundo Lee, Kim e Ashmore (1985), o gengibre demonstrou propriedade antioxidante, conferindo aumento de vida de prateleira de produtos alimentícios. Cai e colaboradores (2004) citaram o efeito antioxidativo de 112 ervas chinesas, dentre elas o gengibre, evidenciando a potencial aplicação desta especiaria como fonte de antioxidantes naturais.

As aplicações do gengibre são ainda incipientes, mas com a vulgarização de seus usos poderá vir a ser empregada em larga escala, conquistando novos mercados.

1.12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, D.; PHILLIPS B.J. Comparative *in vitro* and *in vivo* effects of antioxidants. **Food and chemical toxicology**, v. 37, p. 1015-1025, 1999.

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

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

ARTS, M. J. T. J.; HAENEN, G. R. M. M.; VOSS, H.; BAST, A. Antioxidant capacity of reaction products limit the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 45 – 49, 2004.

ARUOMA, O.I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 32, p. 671- 683, 1994.

_____. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75 (2), p. 199-212, 1997.

BORG, D.C. Oxygen free radicals and tissue injury. In: Tarr, M and Sanson, F. Editors, 1993. **Oxygen free radicals in tissue damage**. Birkhauser, Boston, MA, p. 12-55.

BRADLEY, D.G.; MIN, D.B. Singlet oxygen oxidation of foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 31, p. 211 – 236, 1992.

BURNS, J.; GARDNER, P.T.; MATTHEWS, D.; DUTHIE, G.G.; LEAN, M.E.J.; CROZIER, A. Extraction of Phenolics and Changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5797 – 5898, 2001.

CAI, Y., LUO, Q., SUN, M., CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, p. 2157-2184, 2004.

CAMPOS, A. M.; ESCOBAR, J.; LISSI, E. A. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant activity (TAR) of *Ilex paraguayensis* extracts and red wine. **Journal of the Brazilian Chemists's Society**, v. 7, p. 43 - 49, 1996.

CAMPOS, A. M.; LISSI, E. A. Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) derived radical cations and phenols. **International Journal of Chemical Kinetics**, v. 29, p. 219 - 224, 1997.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1118 – 1125, 2000.

CLIFFORD, M.N.; SCALBERT, A. Ellagitannins: occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 362 – 372, 1999.

DABROWSKI, K.J.; SOSULSKI, F. Quantification of free and hydrolysable phenolic acids in seeds by capillary gás-liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.32, p. 123-127, 1984.

DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F.; The families of the monocotyledons: structure, evolution and taxonomy. **Phytochemistry**, v. 24 (11), p. 2782 – 2783, 1985.

DEDOV, V.N., TRAN, V.H., DUKE, C.C., CONNOR, M., CHRISTIE, M.J., MANDADI, S., ROUFOGALIS, B. Gingerols: a novel class of vanilloid receptor (VR1) agonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 137, p. 793-798, 2002.

DESHPANDE, S. S.; CHERYAN, M.; SALUNKHE, D.K. Tannin analysis of food products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 24 (4), p. 401 – 449, 1986.

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

DZIEDZIC, S. Z.; HUDSON, B.J.F. Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. **Food Chemistry**, v. 14, p. 45-51, 1984.

ELPO, E. R. S. **Cadeia produtiva do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) no Estado do Paraná: análise e recomendações para melhoria da qualidade**. 2004. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, [2004].

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, J. S.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 11, p. 81 – 128, 1991.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43 (1), p. 61-8, 1997.

FRANKEL, E. N.; HUANG, S. W.; KANNER, J.; GERMAN, J. B. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils versus emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 1054–1059, 1994.

FREI, B. Molecular and biological mechanism of antioxidant action. **The Faseb Journal**, v. 13, p. 963 – 964, 1999.

GERSCHMAN, R.; GILBERT, D.L.; NYE, S.W.; NADIG, P.W.; FENN, W.O. Role of adrenalectomy and adrenal-cortical hormones in oxygen poisoning. **American Journal of Physiology**, v. 178, p. 346-350, 1954.

GORDON, M.H. Dietary antioxidants in disease prevention. **Natural product reports**, v. 13, p. 265-273, 1996.

GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in disease process: a compilation of cause and consequence. **Free Radical Research Communications**, v. 19, p. 141-158, 1993.

HABSAH, M.; AMRAN, M.; MACKEEN, M. M.; LAJIS, N. H.; KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N.; RAHMAN, A. A.; GHAFAR; ALI, A. M. Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 403 – 410, 2000.

HAGERMAN, A. E.; RIEDL, K. M.; JONES, G. A.; SOVIK, K. N.; RITCHARD, N. T.; HARTZFELD, P. W.; RIECHEL, T. L. High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46 (5), p. 1887 – 1882, 1998.

HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. **Free Radical research Communications**, v. 9 (1), p. 1-32, 1990.

_____. Free radical and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 52 (8), p. 253-261, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical Journal**, v. 219 (1), p. 1-14, 1984.

_____. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, Oxford, UK, 1985.

_____. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 15, (4), p.129-135, 1989.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33 (7), p. 601-617, 1995.

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

HILLIS, W.E.; SWAIN, T.J. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. II. The analysis of tissues of the victoria plum tree. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, p. 135–144, 1959.

JACKMAN, R.L.; YADA, R.Y.; TUNG, M.A. A review: Separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. **Journal of Food Biochemistry**, v. 11, p. 279-308, 1987.

JAMIESON, D. Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 7 (1), p. 87-108, 1989.

KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; RAUHA J.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T. S.; HEINONEN, M. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47 (10), p. 3954-3962, 1999.

KANNER, J. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. **Meat Science**, v. 36, p. 169 – 189, 1994.

KANNER, J.; GERMAN, J.B.; KINSELLA, J.E. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.25, p. 317-364, 1987.

KANNER, J.; HAREL, S.; HAZAN, B. Muscle membranal lipid peroxidation by an “iron redox cycle” system. Initiation by oxygen-radicals and site specific mechanisms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, p. 506 – 510, 1986.

KOZLOWSKA, H.; ROTKIEWICZ, D.A.; ZADERNOWSKI, R.; SOSULSKI, F.W. Phenolic acids in rapeseed and mustard. **Journal of the American Oil Chemists’ Society**, v. 60, p. 1119 – 1123, 1983.

KRAMER, R. E. Antioxidants in clove. **Journal of the American Oil Chemists’ Society**, v. 62, p. 111–113, 1985.

LEE, Y.B.; KIM, Y.S.; ASHMORE, C.R. Antioxidant property in ginger rhizome and its application to meat products. **Journal of Food Science**, v. 51 (1), p. 20-23, 1986.

LEONG, L.P.; SHUI, G. An Investigation of Antioxidant Capacity of Fruits in Singapore Markets. **Food Chemistry**, v. 76, p. 69 - 75, 2002.

LÖLIGER, J.; SAUCY, F.; DUCRET, F.; LAMBELET, F. The fate of antioxidant radicals during lipid autoxidation: The influence of oxygen supply on lipid autoxidation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 55 (2), p. 215 – 221, 1991.

MAHAN, L. K.; ARLIN, M. T. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 8.ed. Roca, São Paulo, p.40-51, 1994.

MAKKAR, H. P. S. Protein precipitation methods for quantitation of tannins: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p. 1197-1202, 1989.

MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 45, p. 594-598, 1968.

MARKHAM, K.R. Isolation Techniques for Flavonoids. In: Harborne J.B., Mabry T.J., Mabry H.. **The Flavonoids**. Chapman and Hall Ltd Inc., London, 1975.

MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 48, p. 91, 1971.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V., MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84 (4), p. 407 – 412, 1993.

MILOS, M.; JERKOVIC, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. hirtum). **Food Control**, v.71, p. 79-83, 2000.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI FILHO, J. Atividade Antioxidante das Especiarias Mostarda, Canela e Erva-doce em sistemas aquoso e lipídico. **Nutrire – Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition**, v.25, p. 31-46, 2003.

_____. Influence of spices phenolic compounds on lipoperoxidation and lipid profile of rat tissues. **Revista de Nutrição**, v.17 (4), p. 411-424, 2004.

MOURE, A.; FRANCO, D.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; LEMA, J. M. Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48 (9), p. 3890 – 3897, 2000.

NAMIKI, M. Antioxidants /antimutagens in food. **Journal of Nutrition**, v. 29 (4), p. 273-300, 1990.

NIJVELDT, R.J.; NOOD, E.; HOORN, D.E.; BOELENS, P.G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P.A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418-425, 2001.

NIKI, E. Antioxidant activity: are we measuring it correctly? **Nutrition**, v. 18 (6), p. 524-525, 2002.

PACKER, L. 1994 **Methods in enzymology: oxygen radicals in biological systems**. (vol 233, Part C). Academic Press, San Diego, CA.

PACKER L.; GLAZER, A.N., 1990. **Methods in enzymology: oxygen radicals and antioxidants** (v. 186, Part B). Academic Press, San Diego, CA.

PAPADOPOULOS, G.; BOSKOU, D. Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 68, p. 669-671, 1991.

POKORNY, J; YANISHLIEVA, N; GORDON, M. **Antioxidants in food**. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, 2001.

PORTER, W.L. Paradoxical behaviour of antioxidants in food and biological systems. **Toxicology & Industrial Health**, v. 9, p. 93 - 122, 1993.

PORTER, L. Tannins, p. 389-419, In Dey, P. M. and Harborne, J. B. **Methods in Plant Biochemistry**, v. 1. Academic Press, San Diego, CA, 1989.

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

RAWLS. H.R.; Van SANTEN, J.P. A possible role for sinlet oxidation in the initiation of fatty acid autoxidation. **Journal of the American oil Chemists's Society**, v. 25, p. 317 – 364, 1970.

RICE-EVANS, C., MILLER, N.J., PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

_____. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in plant science**, v. 2 (4), p. 152-159. 1997.

RIVERO, F.; FALLARERO, A.; CASTAÑEDA, O.; DAJAS, F.; MANTA, E.; ARECES, F.; MANCINI FILHO, J.; VIDAL, A. Antioxidant activity in vivo and in vitro of *Halimeda incrassata* aqueous extracts. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23 (2), p. 256 - 263, 2003.

SALUNKHE, O.K.; CHAVAN, J.K.; KADAM, S.S. **Dietary Tannins: Consequences and Remedies**, CRC Press, Boca Raton, FL, 1989.

SCALBERT, A.; MONTIES, B.; JANIN, G. Tannins in woods: comparison of different estimation methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p. 1324 – 1329, 1989.

SCALBERT, A. Quantitative methods for estimation of tannins in plant tissues, p. 259–280, In Hemingway, R.W. and Laks, P.S. **Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance**, Plenum Press, New York, 1992.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C. C.; KREWER, G.; Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2432 – 2438, 2002.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. An overview of the phenolics of canola and rapessed: chemical, sensory and nutritional significance. **Journal of the American Oil Chemists's Society**, v. 69, p. 917 – 924, 1992.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications**. Lancaster PA: Technomic Publishing Co Inc, 1995.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2004.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P.K. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32 (1), p. 67- 103, 1992.

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

SOARES, D.G., ANDREAZZA, A.C., SALVADOR, M. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol and vitamins C and E against ABTS, DPPH and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51 (10), p. 1077 – 1080, 2003.

SOTERO, D. E. G. **Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante de frutos da Amazônia: chope (*Gustavia augusta* L.), sacha mangua (*Grias neuberthii***

Macbr.) e macambo (*Theobroma bicolor*). 2002. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Universidade de São Paulo, São Paulo, [2002].

SPITELLER, G. Peroxidation of linoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases. **Mechanisms of ageing and development**, v. 122, p. 617-657, 2001.

SUHR, Y-J. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1091-1097, 2002.

TADOLINI, B.; CABRINI, L.; MENNA, C.; PINNA, G. G.; HAKIM, G. Iron III stimulation of lipid hydroxyperoxide-dependent lipid peroxidation. **Free Radical Research**, v. 27, p. 563-576, 1997.

TAVEIRA MAGALHÃES, M. Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) brasileiro: aspectos gerais, óleo essencial e oleoresina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.17, (1), p. 64-69, 1997.

TEMPEL, A.S. Tannin-measuring techniques: a review. **Journal of Chemical Ecology**, v. 8, p. 1289 – 1298, 1982.

TOMAS-BARBERAN F.A.; CLIFFORD, M.N. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives and their possible role in health protection. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1024 – 1032, 2000.

TOMCHICK, D.R.; PHAM PHUC, M.; CYMBOROWSKI, M.; MINOR, W.; HOLMAN, T.R. Structural and functional characterization of second coordination sphere mutants of soybean lipoxygenase. **Biochemistry**, v. 40 (25), p. 7509 – 7515, 2001.

VAN ACKER, S. A. B. E.; VAN DEN BERG, D.; TROMP, N. J. L.; GRIFFIOEN, D. H.; VAN BENNEKOM, W. P.; VAN DER VIJGH, W. J. F.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20 (3), p. 331-342, 1996.

VAN BEEK, T. A.; POSTHUMUS, M.A.; LELYVELD, H.V.P.; YEN, B.T. Investigation of the essential oil of Vietnamese ginger. **Phytochemistry**, v. 26 (11), p. 3005 – 3010, 1987.

VON GADOW, A.; JOUBERT, E.; HANSMANN, C.F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalanthus linearis*), α -tocopherol, BHT and BHA, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 632-638, 1997.

ZANA, M.; JANKA, Z.; KÁLMÁN, J. Oxidative stress: A bridge between Down's syndrome and Alzheimer's disease, **Neurobiology of Aging**, in press, 2006.

ZANCAN, K.C.; MARQUES, M.O.M.; PETENATE, A.J.; MEIRELES, M.A.A. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 24, p. 57-76, 2002.

ZARATE, R.; SUKRASNO; YEOMAN, M. M. Application of two rapid techniques of column chromatography to separate the pungent principles of ginger, *Zingiber officinale* Roscoe. **Journal of Chromatography**, v. 609, p. 407 – 413, 1992.

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

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E FENÓLICOS TOTAIS DE EXTRATOS DE GENGIBRE (*Zingiber officinale* Roscoe)

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E FENÓLICOS TOTAIS DE EXTRATOS DE GENGIBRE (*Zingiber officinale* Roscoe)

Resumo

Três amostras de gengibre de diferentes localidades e diferentes tempos de colheita, foram avaliadas quanto ao seu potencial antioxidante. A atividade antioxidante dos seus respectivos extratos foi avaliada através do método ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e também pelo método do β -caroteno/ácido linoléico. A concentração de compostos fenólicos foi expressa em equivalente ácido gálico (GAE), de acordo com o método Folin-Ciocalteu. Os extratos, etéreo, acetônico, alcoólico e aquoso de gengibre foram obtidos por extração seqüencial. Uma alta correlação entre o conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante pôde ser observada. As amostras que foram coletadas próximas ao fim da colheita apresentaram capacidade antioxidante e conteúdo de fenólicos totais mais elevados. Além disso, o éter etílico mostrou-se mais eficiente na extração de fenólicos totais. Os resultados indicam que o gengibre pode ser uma potencial fonte de antioxidantes naturais.

Palavras-chave: gengibre, compostos fenólicos, atividade antioxidante, capacidade de seqüestro de radicais livres.

1. Introdução

Radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS) são continuamente geradas no organismo através de processos fisiológicos normais, acentuadamente em condições patológicas. As ROS e seus intermediários são formas parcialmente reduzidas de oxigênio atmosférico e incluem quatro principais espécies radicais: ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila altamente reativo ($-OH$), e radicais peroxila (ROO^-) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1984; HALLIWELL, 1994; HALLIWELL et al, 1995). Em humanos e organismos aeróbios, os efeitos deletérios das ROS são inibidos por enzimas endógenas (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; ANDERSON e PHILLIPS, 1999), como a catalase, superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase e por antioxidantes oriundos da dieta, os quais se acumulam entre as células (e.g., ácido ascóric, tocoferóis, isoflavonas).

A peroxidação lipídica é uma forma de dano oxidativo que ocorre nas membranas celulares quando ácidos graxos insaturados reagem com níveis excessivos de ROS para formar radicais de ácidos graxos e hidroperóxidos lipídicos (LOOH). Este processo desencadeia a autoxidação de ácidos graxos poliinsaturados, o que não somente diminui o valor nutricional e comercial dos alimentos, mas está também associado a danos na membrana, envelhecimento, doenças coronárias e câncer (SURH, 2002) em organismos vivos (SPITELLER, 2001). O dano oxidativo no corpo humano tem um papel importante como causador da iniciação e progressão de doenças (LOPACZYNSKI e ZEISEL, 2001), principalmente relacionados a algumas disfunções neurodegenerativas (GUTTERIDGE, 1993) e cânceres (SPITELLER, 2003). Além disso, a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) é o fator principal na promoção de doenças coronárias e aterosclerose (FRANKE et al, 2005).

Existe uma variedade de antioxidantes sintéticos amplamente utilizados pela indústria de alimentos, como o butilhidroxianisol (BHA) e butilhidroxitolueno (BHT), como meio de aumentar a vida de prateleira e reduzir perdas nutricionais através da inibição e diminuição da oxidação (SOARES, ANDREAZZA e SALVADOR, 2003). No entanto, há sérias preocupações sobre o potencial tóxico e mutagênico dessas substâncias (NAMIKI, 1990), o que torna evidente o interesse geral em substituir aditivos alimentares sintéticos por alternativas naturais. Por este motivo, têm aumentado os interesses e estudos acerca dos métodos de extração, caracterização e utilização de antioxidantes naturais que podem servir como materiais potenciais no retardo da oxidação lipídica em produtos alimentares de base lipídica e, adicionalmente, no combate da carcinogênese e processos de envelhecimento.

As fontes de antioxidantes naturais mais estudadas são os compostos fenólicos. Estes compostos podem ocorrer em todas as partes da planta, como frutos, castanhas, sementes, folhas e raízes (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1997). Existe uma grande variedade de compostos fenólicos e, de acordo com a sua estrutura, podem agir como agentes redutores (terminadores de radicais livres), queladores de metais ou eliminadores do oxigênio singlete (RICE-EVANS et al, 1997; MOREIRA e MANCINI-FILHO, 2004; MATHEW e ABRAHAM, 2006). Estudos têm demonstrado que o consumo de alimentos e bebidas ricas em compostos fenólicos está altamente relacionado com a reduzida incidência de doenças coronárias (GORDON, 1996). Antioxidantes fenólicos comuns em plantas incluem

compostos flavonóides, (NIJVELDT et al, 2001), derivados do ácido cinâmico e ácidos orgânicos polifuncionais (MOREIRA e MANCINI-FILHO, 2004).

Alguns métodos são utilizados para estimar a atividade antioxidante de materiais biológicos. Os mais comumente usados devido à sua rapidez de aplicação e sensibilidade envolvem compostos cromógenos de natureza radical. A presença de antioxidantes leva à perda de cor desses radicais cromógenos. Um dos mais utilizados é o radical ABTS⁺- [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)], o qual deve ser gerado por reações enzimáticas ou químicas (LABRINEA e GEORGIU, 2004; PINTO et al, 2005). Um outro método é baseado na cooxidação do β -caroteno/ácido linoléico, no qual o composto antioxidante é avaliado comparativamente de acordo com a sua habilidade em prevenir a oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico, monitorado pela perda de cor do β -caroteno (NASCIMENTO et al, 2005).

Especiarias são aditivos alimentares que conferem sabor, aroma e pungência aos alimentos. Especiarias ou produtos vegetais aromáticos são utilizados em alimentos cozidos ou semi-cozidos, molhos, sopas e alguns podem ser consumidos crus. Alguns princípios ativos de especiarias, como curcumina (cúrcuma), capsaicina (pimenta vermelha), eugenol (cravo-da-índia), piperina (pimenta preta), zingerona (gengibre) e cuminaldeído (cominho) são relatados como inibidores da peroxidação lipídica (RABABAH et al, 2004; SHOBANA e NAIDU, 2000; SUHAJ, 2005).

O gengibre (*Zingiber officinale*) é uma planta que pertence à família Zingiberacea. O rizoma do gengibre tem sido cultivado principalmente em áreas tropicais e tem sido extensivamente usado como tempero e no tratamento de condições como náusea, dores de cabeça e resfriados, também possuindo atividade antiinflamatória (DEDOV et al, 2002). Produtos de gengibre, como óleo essencial e oleoresina, são comercializados para usos em alimentos e processos farmacêuticos. (ZANCAN et al, 2002).

Este trabalho estudou a atividade antioxidante de extratos de gengibre e sua relação entre a atividade antioxidante e a concentração de fenólicos totais dos extratos.

2. Experimento

2.1. Material vegetal

Os rizomas de gengibre (*Zingiber officinale*) foram coletados no estado de Santa Catarina, na região da grande Florianópolis (Águas Mornas, Santo Amaro da Imperatriz) e no oeste do estado (Chapecó), Brasil. Dois lotes foram coletados de cada cidade, no ano de 2005, sendo uma amostra no mês de junho e a outra no mês de agosto. Ambas correspondem ao início e término do período de colheita, respectivamente.

2.2. Preparo dos extratos

O material vegetal fresco foi lavado, triturado em processador de alimentos, seco em estufa com circulação de ar (40°C) por 24 horas, transformado em pó com auxílio de moinho (IKA, A11 Basic) e finalmente peneirado (60 mesh). Os pós das amostras foram submetidos a extração seqüencial, de acordo com o método descrito por Moreira e Mancini-Filho (2003), com algumas modificações. Inicialmente, 2,5 g de cada amostra foram adicionadas a 50 mL de éter etílico e permaneceram sob agitação por 1 hora, a temperatura ambiente (24°C ± 2°C). A solução foi filtrada sob vácuo e o volume completado para 50 mL com éter etílico. Os resíduos foram recuperados, secos em estufa a 40°C, e as perdas foram pesadas e calculadas para a obtenção dos demais extratos com acetona, álcool etílico e água destilada deionizada, seguindo o mesmo procedimento utilizado para o extrato etéreo. Todos os extratos foram obtidos em triplicata.

2.3. Reagentes

2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), β-caroteno, ácido linoléico, BHT (butilhidroxitolueno), Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemanha). Reagente de Folin-Ciocalteu's foi obtido da Fluka Chemie AG (Buchs, Suíça). Ácido gálico, carbonato de sódio e persulfato de potássio foram adquiridos da Vetec (São Paulo, Brasil). Todos os reagentes utilizados são de qualidade analítica, e água destilada deionizada foi utilizada em todo o processo.

2.4. Avaliação da atividade antioxidante total

2.4.1. Ensaio de descoloração do radical cátion ABTS

O ensaio de atividade antioxidante total foi realizado de acordo com o método descrito por Re et al. (1999), modificado por Kuskoski et al (2004). O radical $ABTS^{+}$ foi gerado através da reação de 7,4 mM ABTS com 2.45 mM de persulfato de potássio após 16 horas no escuro, à temperatura ambiente. A solução de $ABTS^{+}$ foi diluída com etanol até que atingisse uma absorbância de 0.700 ± 0.05 a 754 nm. Quando necessário, a amostra foi diluída com o mesmo solvente da extração para que permanecesse na faixa de 20-80% inibição. A solução de $ABTS^{+}$ (980 μ L) foi adicionada a 20 μ L da amostra e agitada vigorosamente. A mistura permaneceu em temperatura ambiente por 6 min, e a absorbância foi imediatamente verificada a 734 nm utilizando o espectrofotômetro Hewlett-Packard 8425^A. Trolox, o análogo da vitamina E solúvel em água, foi utilizado como padrão de referência. Uma curva padrão foi construída através da redução da absorbância do ABTS com soluções com diferentes concentrações de Trolox por um tempo de 6 min. A absorbância da solução oxidada resultante foi plotada contra a curva padrão de Trolox. Os resultados foram expressos em termos de atividade antioxidante equivalente ao Trolox [TEAC, μ mol de equivalentes trolox /g de peso seco (PS) do pó de gengibre].

2.4.2. Sistema β -caroteno/ácido linoléico

A atividade antioxidante de extratos de gengibre baseada na cooxidação do β -caroteno/ ácido linoléico foi avaliada de acordo com o método descrito por Marco (1968), modificado por Miller (1971). β -caroteno foi dissolvido em clorofórmio (20 mg/ mL). Uma alíquota de 20 μ L desta solução foi colocada em um frasco Erlenmeyer com 40 μ L de ácido linoléico, 1 mL de clorofórmio e 500 mg de Tween 40. O clorofórmio foi completamente evaporado com vapor de nitrogênio. Em seguida, 150 mL de água deionizada saturada com oxigênio (30 min) foi adicionada à emulsão de β -caroteno e a mistura foi agitada. Diferentes concentrações dos extratos (50, 100 e 200 ppm) foram comparadas ao controle (sem antioxidantes) e ao BHT (2,6-di-tert-butil-4-metil fenol), utilizado como antioxidante padrão. Além disso, o efeito sinergista foi avaliado utilizando misturas das amostras com BHT nas mesmas concentrações do extrato puro. Uma leitura inicial da absorbância (470 nm) foi feita imediatamente após a adição das amostras e do padrão ao sistema, e a absorbância foi monitorada a cada 15 min, durante um período de 2 h. As cubetas foram mantidas em banho-

maria a 50°C durante as leituras. A atividade antioxidante (AA) foi calculada em termos de percentual de inibição, relativo ao controle, utilizando a equação:

$$AA = \frac{As - Ac}{Ao - Ac} \times 100$$

Onde As e Ac são, respectivamente, as absorvâncias da amostra e do controle ao final da análise; Ao é a absorvância da amostra (470 nm) no início da análise.

2.5. Determinação do conteúdo de fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos totais foi estimado utilizando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu com algumas modificações (BUDINI, TONELLI, GIROTTI, 1980). Resumidamente, diluições apropriadas dos extratos (100 µL) foram oxidadas com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu, e a reação foi neutralizada com carbonato de sódio saturado (75g/L; 1,5 mL). A mistura foi completada até 10 mL através da adição de água deionizada. Após incubação por 2 h a temperatura ambiente, a absorvância da solução azul resultante foi medida a 764 nm. A quantificação foi feita com base em uma curva padrão de ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes ácido gálico (GAE)/100 g de peso seco (PS).

2.6. Análise estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata, e todos os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Análise de variância (ANOVA) e comparações múltiplas de Tukey foram feitas a fim de verificar quaisquer diferenças significativas entre as amostras, utilizando o software *Statistica*[®] 6.0. Diferenças entre as médias no nível de 5% ($P < 0.05$) foram consideradas significativas.

3. Resultados e discussão

3.1. Ensaio de descoloração do radical cátion ABTS

A atividade antioxidante dos extratos de gengibre foi medida em termos de poder de seqüestro de radicais, de acordo com o método ABTS. Este método mede a habilidade da amostra em seqüestrar o radical $ABTS^{+}$, comparada com uma quantidade padrão de Trolox, e é uma excelente ferramenta para determinar a atividade antioxidante de antioxidantes doadores de hidrogênio e de antioxidantes terminadores de cadeias (RE et al, 1999). Este método não se apresentou somente como sendo rápido e confiável, mas também como tendo a vantagem de ser um método aplicável a ambos sistemas hidrofílico e lipofílico.

Todas as amostras apresentaram boa capacidade em seqüestrar radicais, especialmente aquelas coletadas no final da colheita (Tabela I). Isto pode ser devido à formação dos óleos essenciais no gengibre, os quais são produzidos durante o crescimento da planta e são ricos em compostos voláteis, como o zingibereno, shogaol, entre outros (DEDOV et al, 2002). Estes compostos têm um importante papel na defesa da planta contra patógenos e oxidação (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1997). Os extratos etéreos apresentaram as maiores capacidades antioxidantes (317,30 – 251,29 $\mu\text{M/g}$ TEAC) quando comparados aos outros, seguidos pelos extratos aquosos (161,44 – 115,30 $\mu\text{M/g}$ TEAC). Os extratos alcoólico e acetônico apresentaram capacidade antioxidante muito inferior aos outros (78,94 – 34,87 $\mu\text{M/g}$ TEAC e 60,77 – 32,34 $\mu\text{M/g}$ TEAC, respectivamente). Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas nos valores TEAC dos extratos analisados.

Em estudo recente, Hinneburg, Dorman e Hiltunen (2005) avaliaram a capacidade antioxidante de algumas especiarias, entre elas o gengibre. O método DPPH foi utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de extratos hidrodestilados de gengibre, e os resultados foram apresentados como IC_{50} (quantidade necessária para atingir 50% de inibição do DPPH). O gengibre apresentou um valor de IC_{50} (10mg/mL) muito alto, indicando um fraco poder de seqüestro de radicais livres. Estes resultados mostram a importância da escolha da metodologia de extração escolhida para a análise. A extração seqüencial aplicada neste estudo apresentou-se como uma metodologia mais eficiente neste caso.

Tabela I. Atividade antioxidante (TEAC) de extratos de gengibre

Atividade antioxidante (TEAC¹)				
Amostras²	Éter	Acetona	Álcool	Água
SA1	287,78 ± 2,3 ^a	35,99 ± 2,85 ^e	40,70 ± 1,96 ^e	161,44 ± 3,13 ^b
SA2	317,30 ± 3,88 ^a	35,07 ± 2,79 ^e	48,71 ± 2,88 ^e	148,89 ± 2,53 ^c
AM1	289,95 ± 1,30 ^a	60,77 ± 1,73 ^e	78,94 ± 1,98 ^d	122,15 ± 1,82 ^c
AM2	304,65 ± 4,13 ^a	32,34 ± 0,79 ^e	35,65 ± 1,88 ^e	115,50 ± 2,54 ^c
CH1	251,29 ± 3,18 ^a	58,15 ± 1,07 ^e	34,87 ± 1,52 ^e	124,30 ± 0,77 ^c
CH2	298,78 ± 1,76 ^a	41,26 ± 1,56 ^e	59,47 ± 2,76 ^e	133,36 ± 2,32 ^c

²SA: Santo Amaro da Imperatriz; AM: Águas Mornas; CH: Chapecó; 1: início do período de colheita; 2: fim do período de colheita

¹TEAC: Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox em µM por g (peso seco).

Letras diferentes na mesma coluna implicam diferença significativa (P < 0,05) entre as amostras pelo teste de Tukey.

3.2. Conteúdo de fenólicos totais

Os polifenóis possuem estrutura química ideal para seqüestro de radicais livres, e têm se mostrado mais eficientes como antioxidantes *in vitro* do que as vitaminas E e C, em base molar (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1997). Como os fenólicos de plantas constituem um dos maiores grupos de compostos que age como antioxidantes primários ou eliminadores de radicais, foi adequado determinar seu conteúdo total nos extratos de gengibre.

O conteúdo de fenólicos totais dos extratos (Tabela II) apresentou diferenças significativas, variando de 525,42 – 476,72 mg/100g GAE nos extratos etéreos, e 190,84 – 134,72 mg/100g GAE nos extratos alcoólicos. Já que o gengibre é tradicionalmente preparado para consumo de chás ou mesmo de sopas, a inclusão da água no processo de extração fez-se necessária. Estes extratos também apresentaram uma boa quantidade de fenólicos (365,07 – 279,95 mg/100g GAE). Entretanto, a eficiência de extração da acetona não foi tão evidente quanto nos outros extratos, apresentando uma quantidade de fenólicos que variou entre 176,33 – 130,99 mg/100g GAE.

Os rizomas que foram coletados no final do período de colheita apresentaram uma maior quantidade de fenólicos, o que acontece também com sua atividade antioxidante.

Durante o crescimento da planta, alguns processos enzimáticos têm início, especialmente aqueles envolvidos com a defesa da planta, considerando-se que alguns fenólicos são tóxicos a agentes patogênicos. Os rizomas mais amadurecidos podem ter apresentado maior quantidade de fenólicos devido a esses mecanismos enzimáticos (CAMPOS et al, 2004), ou mesmo a alguns compostos fenólicos voláteis, como os gingeóis e shogaóis, os quais conferem sabor e aroma ao gengibre, e são metabolizados durante o crescimento/amadurecimento da planta (DEDOV et al, 2002).

Obviamente o conteúdo de fenólicos totais medido pelo método Folin-Ciocalteu não oferece um panorama quantitativo completo, nem qualitativo, a respeito dos constituintes fenólicos do gengibre. Além disso, podem haver interferentes oriundos de outros compostos químicos nos extratos, como açúcares, proteínas ou vitaminas (KÄHKÖNEN, et al, 1999).

Tabela II. Conteúdo de fenólicos totais dos extratos de gengibre

Fenólicos totais (GAE¹)				
Amostras²	Éter	Acetona	Álcool	Água
SA1	508,83 ± 2,94 ^a	146,91 ± 1,86 ^f	183,35 ± 1,80 ^e	290,32 ± 1,91 ^d
SA2	525,42 ± 3,24 ^a	145,47 ± 3,35 ^f	190,85 ± 1,08 ^e	365,07 ± 1,75 ^c
AM1	493,73 ± 0,62 ^b	176,34 ± 2,54 ^e	190,82 ± 1,43 ^e	327,52 ± 2,63 ^c
AM2	517,67 ± 1,33 ^a	131,00 ± 2,01 ^f	144,91 ± 2,27 ^f	279,95 ± 0,34 ^d
CH1	476,72 ± 3,46 ^b	171,50 ± 2,24 ^e	134,72 ± 0,81 ^f	285,79 ± 1,46 ^d
CH2	505,38 ± 2,97 ^a	154,53 ± 3,08 ^f	169,01 ± 1,31 ^e	290,16 ± 1,30 ^d

¹GAE: Equivalentes ácido gálico em mg por 100 mg (peso seco).

²SA: Santo Amaro da Imperatriz; AM: Águas Mornas; CH: Chapecó; 1: início do período de colheita; 2: fim do período de colheita

Letras diferentes na mesma coluna implicam diferença significativa (P < 0,05) entre as amostras pelo teste de Tukey.

Letras diferentes na mesma linha implicam diferença significativa (P < 0,05) entre as amostras pelo teste de Tukey

3.3. Sistema β -caroteno/ácido linoléico

As Figuras 1 - 3 apresentam as porcentagens de inibição da oxidação dos extratos de gengibre através da cooxidação do β -caroteno e do ácido linoléico; os gráficos de porcentagens de inibição encontram-se no Anexo A. Os extratos etéreos apresentaram maiores atividades antioxidantes que os outros extratos, com 86,38% de inibição para amostra AM1, seguida por 84,95% de inibição para o extrato aquoso da amostra CH2, ambos a 200 ppm. No entanto, não existem diferenças significativas entre as porcentagens de inibição do processo de oxidação entre os extratos etéreo e aquoso.

Os extratos acetônico e alcoólico apresentaram menor proteção contra o processo oxidativo quando comparados aos valores encontrados para os extratos etéreos e aquosos, como ocorrido para a avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS.

Efeitos sinérgicos com BHT foram mais evidentes nos extratos aquosos. A mistura de antioxidante sintético e do extrato aumentou de 73,42% para 88,24% no extrato aquoso SA1 a 200ppm. Para a maioria dos extratos analisados, a atividade antioxidante aumentou gradualmente com o aumento da concentração dos extratos.

O período de colheita pode ter influenciado a atividade antioxidante total das amostras. Em geral, as amostras coletadas no fim do período de colheita apresentaram maior proteção contra o processo oxidativo do β -caroteno e do ácido linoléico. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados para as análises de fenólicos totais e TEAC. Possivelmente, a inibição da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico tenha sido aumentada devido ao alto conteúdo de compostos fenólicos totais das amostras.

É provável que os componentes antioxidantes nos extratos de gengibre possam reduzir a perda de cor do β -caroteno pela neutralização do radical livre linoleato e outros radicais livres formados no sistema (CHEUNG, CHEUNG e OOI, 2003).

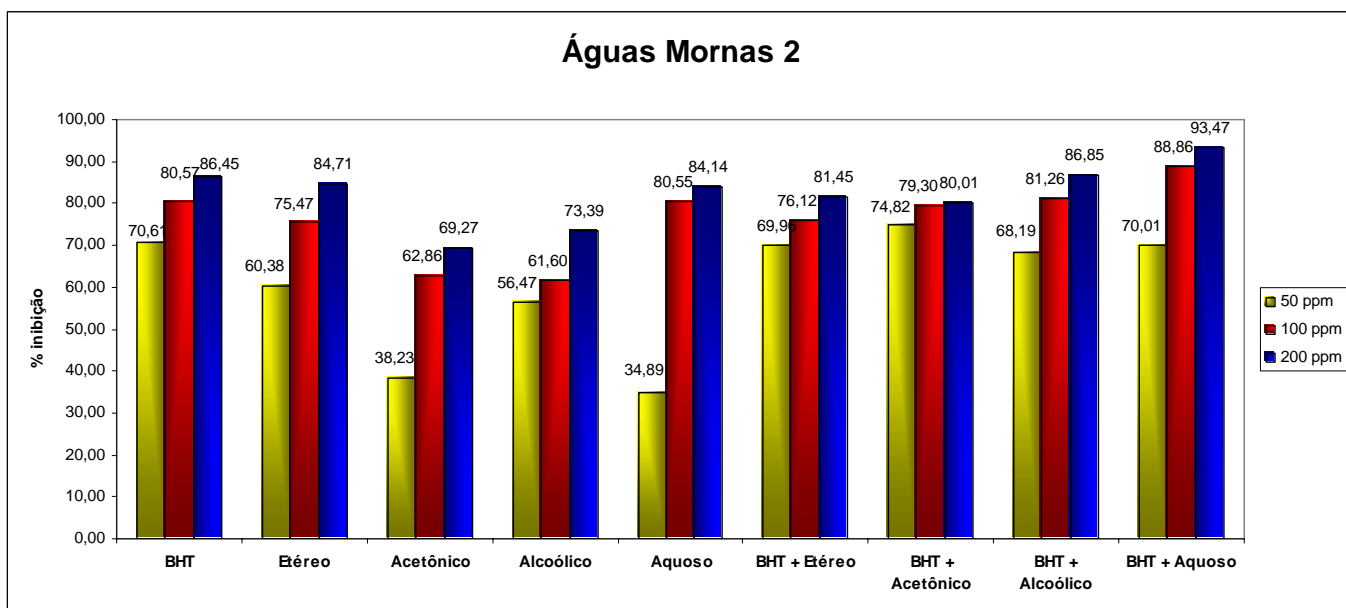
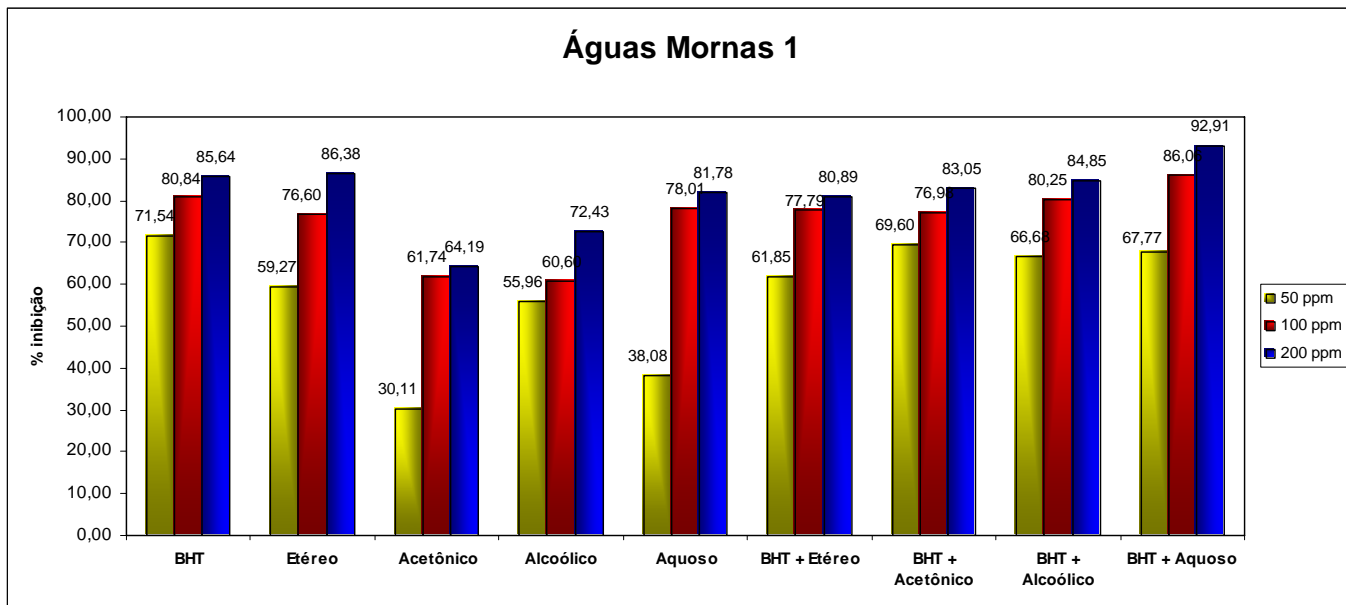


Figura 1 – Gráficos de atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ ácido linoléico (em % de inibição da oxidação) para as amostras coletadas em Águas Mornas, no primeiro e segundo tempos de colheita, respectivamente.

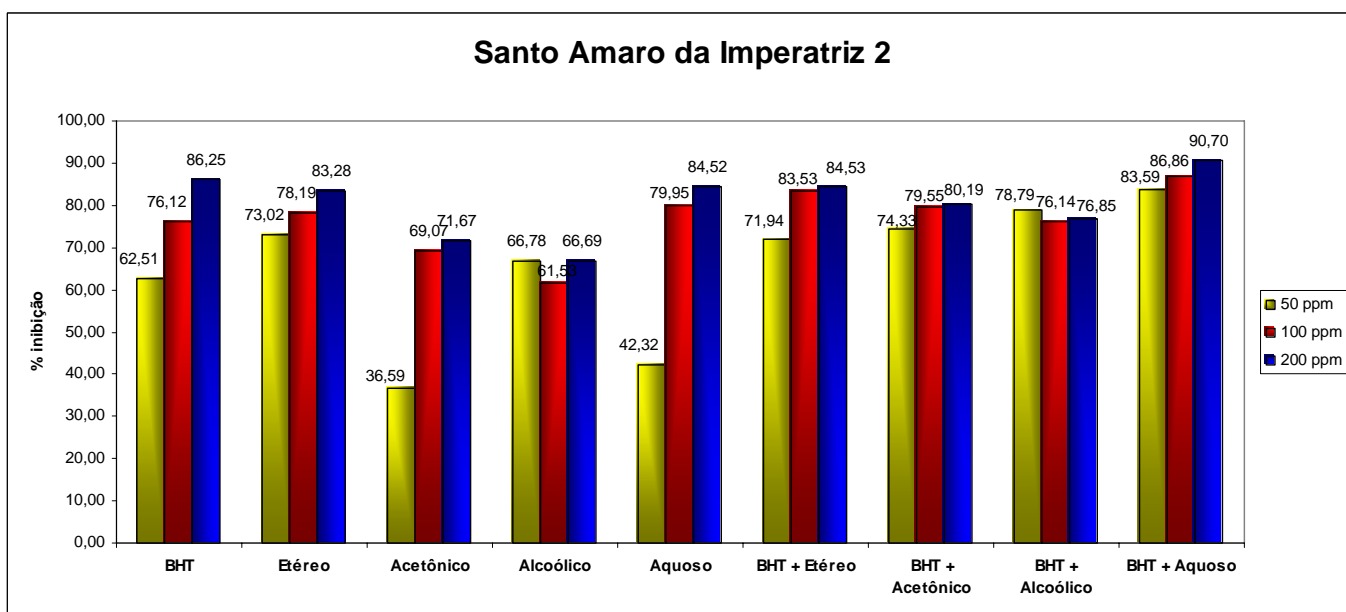
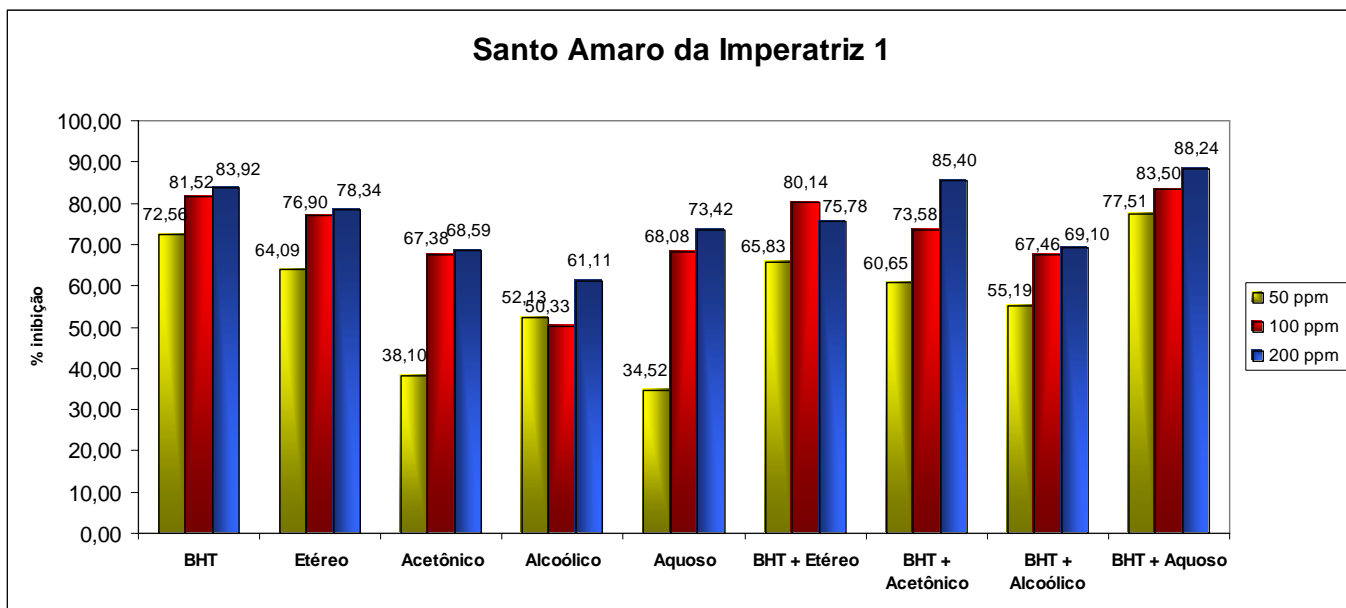


Figura 2 – Gráficos de atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ ácido linoléico (em % de inibição da oxidação) para as amostras coletadas em Santo Amaro da Imperatriz, no primeiro e segundo tempos de colheita, respectivamente.

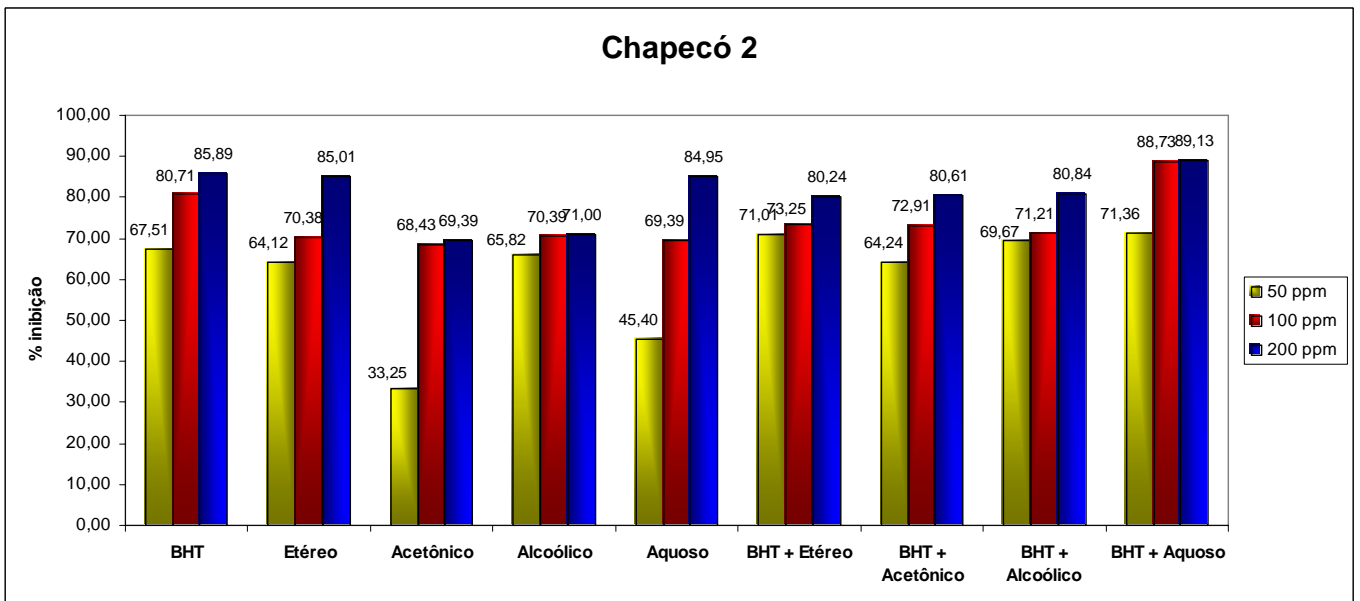
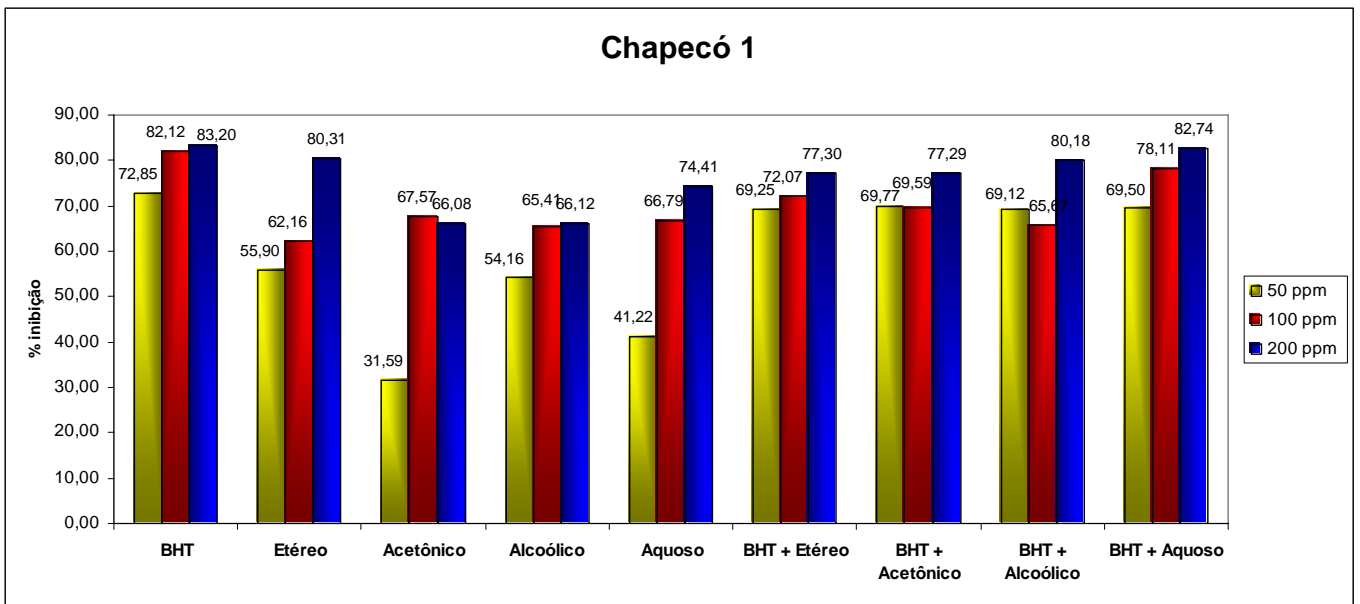


Figura 3 – Gráficos de atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ ácido linoléico (em % de inibição da oxidação) para as amostras coletadas em Chapecó, no primeiro e segundo tempos de colheita, respectivamente.

3.4. Relação entre atividade antioxidante (TEAC) e conteúdo de fenólicos totais

A correlação entre atividade antioxidante e o conteúdo de fenólicos totais dos extratos de gengibre foi calculada (Figura 4). O número de amostras testadas e a escala de valores de parâmetros normalmente influenciam a cálculo dos coeficientes de correlação (r^2). Mais amostras e uma escala apropriada de valores de parâmetros podem originar valores de r^2 razoáveis e correlação representativa (CAI et al, 2004). A relação entre o teste TEAC e o conteúdo de fenólicos totais para os extratos analisados foi uma correlação linear positiva e altamente significativa ($r^2=0,9590$). Ao conteúdo de compostos fenólicos dos extratos pode-se atribuir elevada atividade antioxidante. Estes resultados sugerem que os compostos fenólicos contribuem significativamente para a alta capacidade antioxidante dos extratos de gengibre.

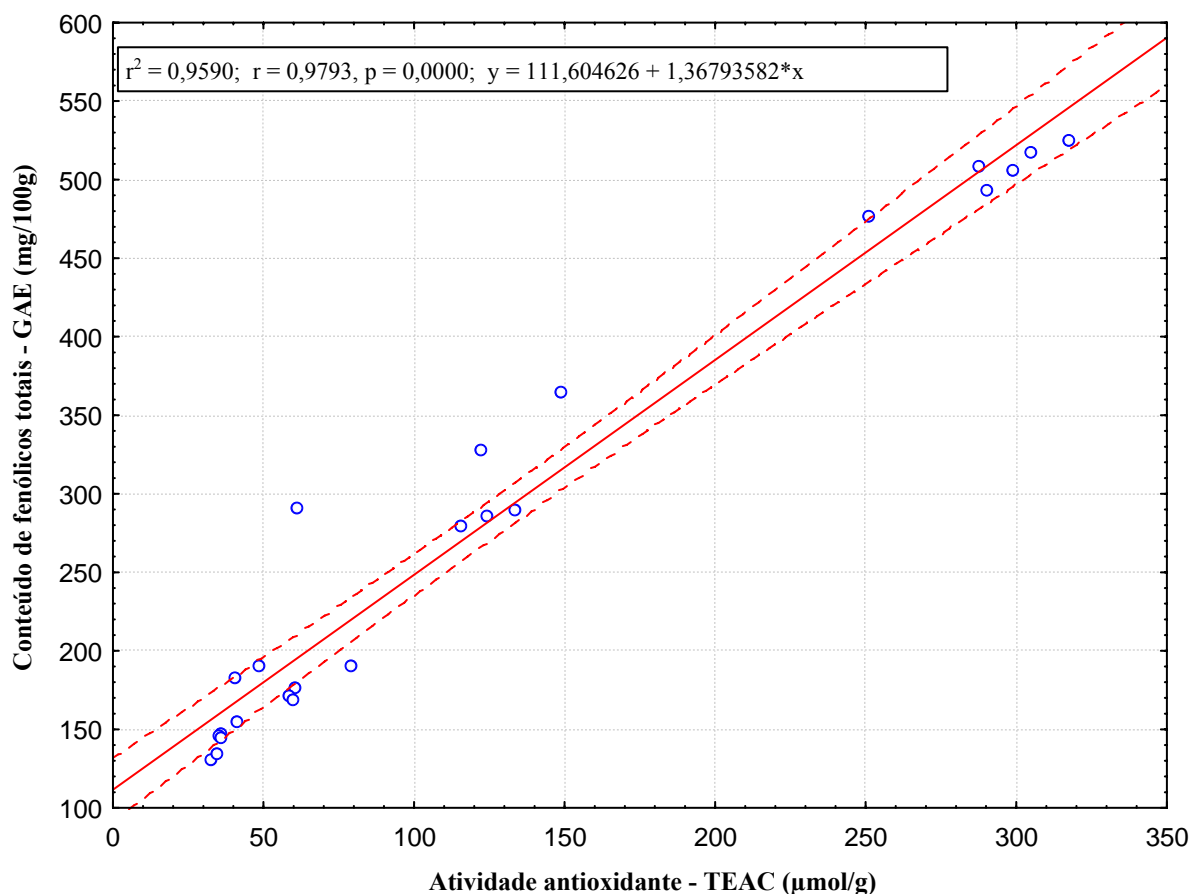


Figura 4. Correlação linear entre a atividade antioxidante (TEAC) e o conteúdo de fenólicos totais (GAE) dos extratos de gengibre.

4. CONCLUSÃO

Podemos dizer que nossos resultados suportam a afirmativa de que o gengibre pode ser uma fonte promissora de compostos antioxidantes. Também pudemos verificar algumas mudanças no conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos de acordo com a maturação da amostra. As amostras cujo estado de maturação estava mais adiantado apresentaram maior conteúdo de fenólicos totais e também maior atividade antioxidante. Diferenças significativas entre as capacidades antioxidantes dos extratos puderam ser verificadas, e os solventes mais efetivos para a extração de compostos fenólicos foram o éter etílico e a água. Deve ser lembrado que as atividades *in vitro* são simples indicadoras da potencial atividade biológica, refletindo apenas sua biodisponibilidade teórica. Mais pesquisas são necessárias para identificar e quantificar compostos fenólicos do gengibre, para testar sua atividade antioxidante em sistemas biológicos e para testar a contribuição individual de cada composto à sua atividade antioxidante total.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, D.; PHILLIPS B.J. Comparative *in vitro* and *in vivo* effects of antioxidants. **Food and chemical toxicology**, v. 37, p. 1015-1025, 1999.

BUDINI, R., TONELLI, D.; GIROTTI, S. Analysis of total phenols using the Prussian blue method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, p. 1236-1238, 1980.

CAI, Y., LUO, Q., SUN, M., CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, p. 2157-2184, 2004.

CAMPOS, A.D., FERREIRA, A.G., HAMPE, M.M.V., ANTUNES, I.F., BRANCÃO, N., DA SILVEIRA, E.P., OSÓRIO, V.A., AGUSTÍN, E. Peroxidase and polyphenol oxidase activity in bean anthracnose resistance. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39 (7), p. 637-643, 2004.

CHEUNG, L. M., CHEUNG, P. C. K., OOI, V. E. C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry**, v. 81, p. 249-255, 2003.

DEDOV, V.N., TRAN, V.H., DUKE, C.C., CONNOR, M., CHRISTIE, M.J., MANDADI, S.; ROUFOGALIS, B. Gingerols: a novel class of vanilloid receptor (VR1) agonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 137, p. 793-798, 2002.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43 (1), p. 61-8, 1997.

FRANKE, A.A., COONEY, R. V., HENNING, S.M; CUSTER, L. J. Bioavailability and antioxidant effects of orange juice components in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5170-5178, 2005.

GORDON, M.H. Dietary antioxidants in disease prevention. **Natural product reports**, v. 13, p. 265-273, 1996.

GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in disease process: a compilation of cause and consequence. **Free Radical Research Communications**, v. 19, p. 141-158, 1993.

HALIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 52 (8), p. 253-265, 1994.

HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LÖLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33 (7), p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemistry Journal**, v. 219, p. 1-14, 1984.

HINNEBURG, I., DORMAN, H.J.D.; HILTUNEN, R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. **Food chemistry**, v. 97 (1), p. 122-129, 2006.

KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; RAUHA J.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T. S.; HEINONEN, M. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47 (10), p. 3954-3962, 1999.

LABRINEA, E.P.; GEORGIU, C.A. Stopped-flow method for assessment of pH and timing effect on the ABTS total antioxidant capacity assay. **Analytica Chimica Acta**, v. 526, p. 63-68, 2004.

LOPACZYNSKI, W.; ZEISEL, S.H. Antioxidants, programmed cell death and cancer. **Nutrition research**, v. 21, p. 295-397, 2001.

MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 45, p. 594-598, 1968.

MATHEW, S.; ABRAHAM, T.E. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various *in vitro* models. **Food Chemistry**, v. 94, p. 520-528, 2006.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 48, p. 91, 1971.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI FILHO, J. Atividade Antioxidante das Especiarias Mostarda, Canela e Erva-doce em sistemas aquoso e lipídico. **Nutrire – Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition**, v. 25, p. 31-46, 2003.

MOREIRA, A.V.B.; MANCINI FILHO, J. Influence of spices phenolic compounds on lipoperoxidation and lipid profile of rat tissues. **Revista de Nutrição**, v. 17 (4), p. 411-424, 2004.

NAMIKI, M. Antioxidants, antimutagens in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 29, p. 273-300, 1990.

NASCIMENTO, M.A., SILVA, A.K., FRANÇA, L.C. B, QUIGNARD, E.L.J., LÓPEZ, J.A.; ALMEIDA, M.G. (2005). *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae): Preliminary study of its antioxidant activity. **Bioresource Technology**, in press

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

PINTO, P.C.A.G, SARAIVA, M.L.M.F.S., REIS, S.; LIMA, J.L.F.C. Automatic sequential determination of the hydrogen peroxide scavenging activity and evaluation of the antioxidant potential by the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation assay in wines by sequential injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 531, p. 25-32, 2005.

RABABAH, T.M., HETTIARACHCHY, N.S.; HORAX, R. Total phenolics and antioxidant activity of fenugreek, green tea, black tea, grape seed, ginger, rosemary, gotu kola and ginkgo extracts, vitamin E and *tert*-butylhydroquinone. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, p. 5183-5186, 2004.

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

RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in plant science**, v. 2 (4), p. 152-159, 1997.

SHOBANA, S.; NAIDU, A. Antioxidant activity of selected Indian spices. **Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids**, v. 62 (2), p. 107-110, 2000.

SOARES, D.G., ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR, M. Sequestering Ability of Butylated Hydroxytoluene, Propyl Gallate, Resveratrol, and Vitamins C and E against ABTS, DPPH, and Hydroxyl Free Radicals in Chemical and Biological Systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1077-1088, 2003.

SPITELLER, G. Peroxidation of linoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases. **Mechanisms of ageing and development**, v. 122, p. 617-657, 2001.

SPITELLER, G. Are lipid peroxidation processes induced by changes in the cell wall structure and how are these processes connected with diseases? **Medical hypotheses**, v. 60 (1), p. 69-83, 2003.

SUHAJ, M. (2005). Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. **Journal of Food Composition and Analysis**, in press.

SUHR, Y-J. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1091-1097, 2002.

ZANCAN, K.C., MARQUES, M.O.M., PETENATE, A.J.; MEIRELES, M.A.A. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 24, p. 57-76, 2002.

CAPÍTULO 3

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS ÁCIDOS FENÓLICOS LIVRES,
ESTERIFICADOS E INSOLÚVEIS DO GENGIBRE (*Zingiber officinale*
Roscoe)**

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS ÁCIDOS FENÓLICOS LIVRES, ESTERIFICADOS E INSOLÚVEIS DO GENGIBRE (*Zingiber officinale* Roscoe)

Resumo

Os ácidos fenólicos do gengibre foram fracionados em: ácidos fenólicos livres, ésteres solúveis e insolúveis. As frações foram avaliadas quanto ao seu potencial antioxidante, através do método ABTS, e quanto ao conteúdo de fenólicos totais, de acordo com o método Folin-Ciocalteu. A concentração de compostos fenólicos foi expressa em equivalente ácido gálico (GAE) e a atividade antioxidante expressa em equivalente ao Trolox (TEAC). Uma alta correlação entre o conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante das frações pôde ser observada. Tanto o valor TEAC quanto GAE foram elevados, indicando uma boa eficiência do processo de extração. Uma alta quantidade de ácido salicílico foi encontrada em todas as frações, seguida pelos ácidos caféico, ferúlico, sináptico e gálico. Os resultados indicam que o gengibre pode ser uma potencial fonte de antioxidantes naturais.

Palavras-chave: gengibre, compostos fenólicos, atividade antioxidante.

1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos de alimentos têm origem em uma das maiores classes de metabólitos secundários de plantas derivados da fenilalanina e, em uma menor escala em algumas plantas, também da tirosina (SHAHIDI, 2000). Quimicamente, os fenólicos podem ser definidos como sendo substâncias que possuem um anel aromático e uma ou mais hidroxilas, incluindo seus derivados funcionais.

Plantas e alimentos contêm uma grande variedade de derivados fenólicos incluindo alguns fenóis, fenilpropanóides, derivados do ácido benzóico, flavonóides, taninos, lignanas e ligninas. Estas variadas substâncias são essenciais ao crescimento e reprodução das plantas e também atuam na dispersão de predadores e patógenos. A contribuição dos fenólicos para a pigmentação dos alimentos vegetais também é reconhecida. Os fenólicos também atuam

como antibióticos, pesticidas naturais, atraem polinizadores, protegem contra a radiação ultravioleta (UV), impermeabilizam as paredes celulares contra gases e água e também atuam como compostos estruturais (HARBORNE, 1980).

Muitas propriedades de produtos vegetais estão associadas à presença, tipo e conteúdo de seus compostos fenólicos. A adstringência de alimentos, os efeitos benéficos à saúde de certos fenólicos ou as suas potenciais propriedades antinutricionais quando presentes em grandes quantidades são significativas aos produtores e consumidores de alimentos (POKORNÝ, 1991). Vários aditivos são adicionados aos alimentos como agentes antioxidantes ou antimicrobianos. Compostos fenólicos são conhecidos por possuírem essas duas propriedades (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1997; ATROSHI et al, 2003).

As atividades químicas dos polifenóis em termos de suas propriedades redutoras como doadores de hidrogênio ou de elétrons predizem seu potencial de ação como seqüestradores de radicais livres (antioxidantes). Os polifenóis possuem estrutura química ideal para atividades de seqüestro de radicais livres, e têm se mostrado antioxidantes mais eficientes do que as vitaminas C e E em base molar (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1997).

A eficiência dos compostos fenólicos como antioxidantes depende da sua estrutura química. O fenol por si só é inativo como antioxidante; no entanto, os compostos *orto* e *para*-difenólicos possuem atividade antioxidante, a qual aumenta com a substituição de um de seus átomos de hidrogênio por grupamentos *etil* or *n-butil* (SÁNCHEZ-MORENO, 2002). A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e de seus ésteres depende do número de grupamentos hidroxila na molécula. A capacidade dos grupamentos hidroxila no ácido benzóico em capturar elétrons tem uma influência negativa na capacidade dos hidroxibenzoatos em doar átomos H. Ácidos cinâmicos xidroxilados são mais efetivos que seus homólogos ácidos benzóicos. Desta forma, Rice-Evans et al (1996) demonstraram que o ácido *o*-cumárico é mais eficiente que seu homólogo ácido salicílico no seqüestro do radical livre ABTS; o ácido caféico é mais potente do que o ácido protocatequínico e o ácido ferúlico é mais eficiente que o seu homólogo 4-hidróxi-3-metóxi-ácido benzóico.

O gengibre (*Zingiber officinale*) é uma planta que pertence à família Zingiberacea. O rizoma do gengibre tem sido cultivado principalmente em áreas tropicais e tem sido extensivamente usado como tempero e no tratamento de condições como náusea, dores de

cabeça e resfriados, também possuindo atividade antiinflamatória (DEDOV et al, 2002). Produtos de gengibre, como óleo essencial e oleoresina, são comercializados para usos em alimentos e processos farmacêuticos. (ZANCAN et al, 2002).

Os objetivos deste estudo foram identificar os ácidos fenólicos livres, esterificados e ligantes insolúveis do gengibre e determinar o conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante de cada fração.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

Os rizomas de gengibre (*Zingiber officinale*) foram coletados das regiões rurais de três cidades do estado de Santa Catarina, Brasil, sendo dois lotes de cada cidade.

2.2. Preparo das amostras

O material vegetal fresco foi lavado, triturado em processador de alimentos (FAET MC-5), seco em estufa com circulação de ar (40°C) por 24 horas, transformado em pó com moinho (IKA, A11 Basic) e finalmente peneirado (60 mesh). Os pós das amostras foram mantidos em freezer a (-18°C) em sacos plásticos com fecho hermético, sob atmosfera de nitrogênio.

2.3. Fracionamento

As frações de ácidos fenólicos foram obtidas de acordo com o método (Figura 1) descrito por Krygier, Sosulski e Hogge (1982), com algumas modificações (SOTERO, 2002).

2.3.1. Fração de ácidos fenólicos livres (AFL)

Um grama de pó de gengibre desengordurado foi extraído seis vezes com 20 mL tetrahidrofurano e homogeneizado por cinco minutos em um agitador de tubos. O sobrenadante resultante das extrações foi filtrado e desidratado com sulfato de sódio anidro. A

fração foi evaporada em evaporador rotatório (Fisatom 202), sob vácuo, a 40°C, e diluída com 5 mL de tetrahidrofurano.

2.3.2. Fração ácidos fenólicos de ésteres solúveis (AFES)

O resíduo resultante das extrações de ácidos fenólicos livres foi utilizado para novos procedimentos de extração. Os fenólicos solúveis da amostra foram extraídos seis vezes com 20 mL de metanol:acetona:água (7:7:6). A amostra foi agitada por cinco minutos e centrifugada. Ao final, o sobrenadante foi evaporado sob vácuo a 40°C, até que restasse somente a fase aquosa. A fim de liberar os ésteres solúveis, os quais estão esterificados com proteínas e polipeptídeos, um volume igual de NaOH 4N foi adicionado ao sobrenadante. Após três horas de hidrólise, à temperatura ambiente (24°C ± 2°C) e no escuro, o hidrolisado foi acidificado até pH 2, com HCl 6N, seguido de centrifugação a 10.000 rpm por dez minutos. O sobrenadante foi transferido para um funil de separação e extraído com hexano para eliminar os ácidos graxos e outros contaminantes e também para extrair os ácidos fenólicos da fase aquosa com auxílio de uma mistura de éter etílico: acetato de etila: tetrahidrofurano (1:1:1), por seis vezes, com agitação. A fração foi filtrada e desidratada com sulfato de sódio anidro, evaporada com evaporador rotatório a 40°C e ressuspensionado com 5 mL de tetrahidrofurano.

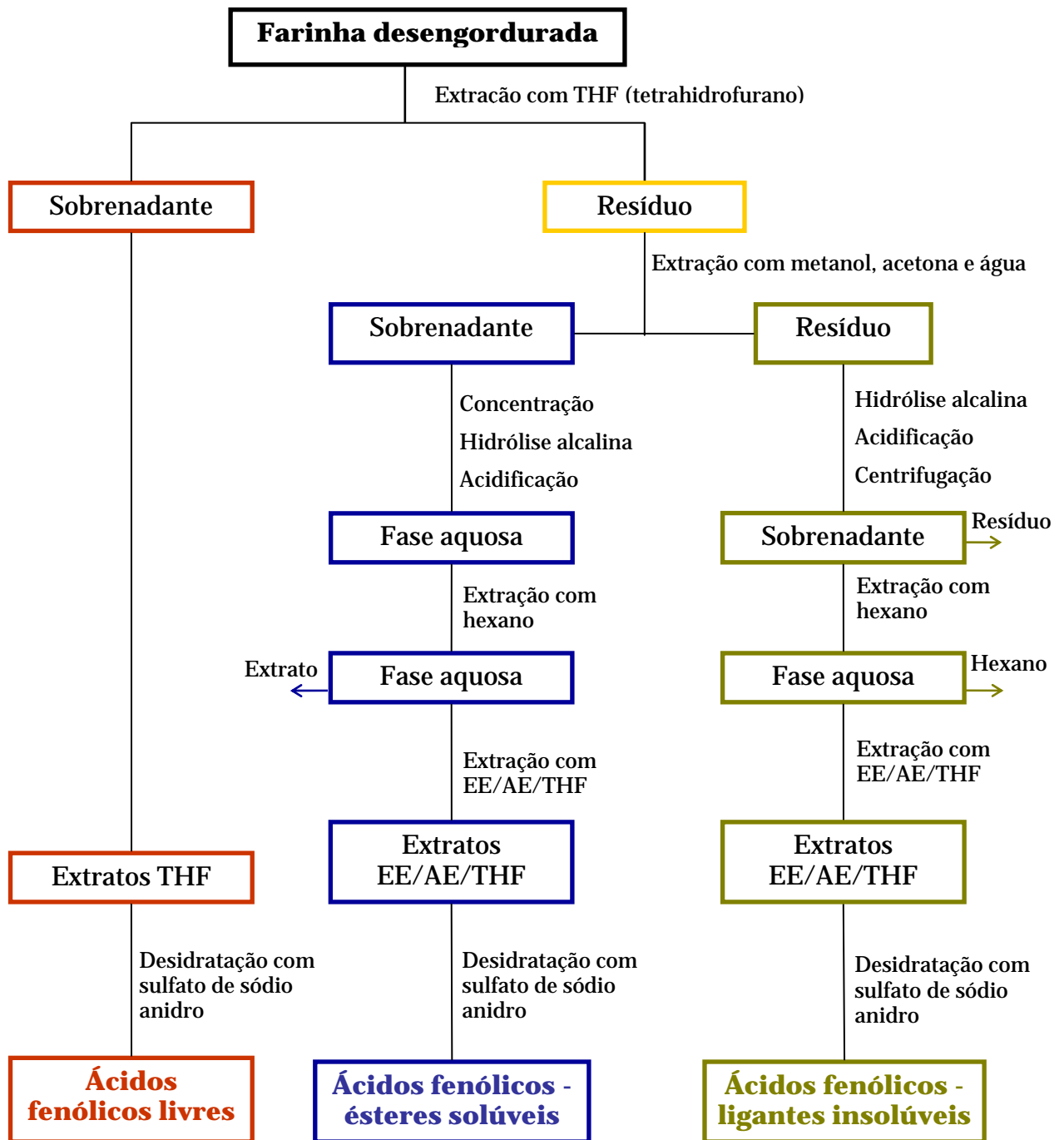


Figura 1. Procedimento de extração e separação dos ácidos fenólicos livres, ésteres solúveis e ligantes insolúveis. Adaptado de SOTERO, 2002.

2.3.3. Fração ácidos fenólicos de ligantes insolúveis (AFEI)

O resíduo da extração dos fenólicos livres foi hidrolisado com 25 mL NaOH 4 N, por três horas, à temperatura ambiente ($24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e no escuro. Os extrato de ácidos fenólicos de ligantes insolúveis foi acidificado até pH 2 HCl 6 N, seguido de centrifugação a 10.000 rpm por dez minutos. A partir deste ponto, o procedimento foi o mesmo aplicado para o filtrado de ésteres solúveis de gengibre.

2.4. Identificação dos ácidos fenólicos por cromatografia gasosa

A identificação dos ácidos fenólicos foi baseada nos tempos de retenção dos ácidos padrões e realizada em cromatógrafo Shimadzu, modelo GC 17^a, equipado com detector de ionização de chama. As condições cromatográficas seguiram os procedimentos descritos por Dabrowski e Sosulski (1984), com modificações propostas por Moreira e Mancini Filho (2003).

Foi utilizada uma coluna semipolar DB5 (J & W[®]), medindo 30m x 0,25 mm; as condições de operação foram as seguintes: temperatura inicial da coluna a 150°C , isotérmica por três minutos; de 150°C para 300°C , aumentando $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$; isotérmica a 300°C por três minutos. A temperatura da câmara de injeção foi de 250°C e a do detector foi de 300°C .

Uma solução padrão foi preparada diluindo-se os 18 ácidos fenólicos em metanol, e uma alíquota desta solução foi adicionada ao padrão interno (ácido metil éster heptadecanóico) antes da injeção no cromatógrafo.

2.3. Reagentes

2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico) e padrões, incluindo os ácidos metil éster heptadecanóico, salicílico, protocatequínico, clorogênico, elágico, cinâmico, vanílico, *o*-cumárico, gentísico, quínico, *p*-cumárico, gálico, ferúlico, caféico e sináptico foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Germany). O reagente de Folin-Ciocalteu foi adquirido da Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland). Todos os reagentes utilizados são de qualidade analítica.

2.4. Avaliação da atividade antioxidante total

2.4.1. Ensaio de descoloração do radical cátion ABTS

O ensaio de atividade antioxidante total foi realizado de acordo com o método descrito por Re e colaboradores (1999). O radical ABTS^{•+} foi gerado através da reação de 7,4 mM ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio após 16 horas no escuro, à temperatura ambiente. A solução de ABTS^{•+} foi diluída com etanol até que atingisse uma absorbância de $0,700 \pm 0,05$ a 754 nm. Quando necessário, a amostra foi diluída com o mesmo solvente da extração para que permanecesse na faixa de 20-80% inibição. A solução de ABTS^{•+} (980 µL) foi adicionada a 20 µL da amostra e agitada vigorosamente. A mistura permaneceu em temperatura ambiente por 6 min, e a absorbância foi imediatamente verificada a 734 nm utilizando o espectrofotômetro Hewlett-Packard 8425^A. Trolox, o análogo da vitamina E solúvel em água, foi utilizado como padrão de referência. Uma curva padrão foi construída através da redução da absorbância do ABTS com soluções com diferentes concentrações de Trolox por um tempo de 6 min. A absorbância da solução oxidada resultante foi plotada contra a curva padrão de Trolox. Os resultados foram expressos em termos de atividade antioxidante equivalente ao Trolox [TEAC, µmol de equivalentes trolox /g de peso seco (PS) do pó de gengibre].

2.5. Determinação do conteúdo de fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos totais foi estimado utilizando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu com algumas modificações (BUDINI, TONELLI e GIROTTI, 1980). Resumidamente, diluições apropriadas dos extratos (100 µL) foram oxidadas com 500 µL do reagente de Folin- Ciocalteu, e a reação foi neutralizada com carbonato de sódio saturado (75g/L; 1,5 mL). A mistura foi completada até 10 mL através da adição de água deionizada. Após incubação por 2 h a temperatura ambiente, a absorbância da solução azul resultante foi medida a 764 nm. A quantificação foi feita com base em uma curva padrão de ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes ácido gálico (GAE)/100 g de OS.

2.6. Análise estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata, e todos os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Análise de variância (ANOVA) e comparações múltiplas de Tukey foram feitas a fim de verificar quaisquer diferenças significativas entre as amostras, utilizando o software *Statistica*[®] 6.0. Diferenças entre as médias em nível de 5% ($P < 0,05$) foram consideradas significativas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Conteúdo de fenólicos totais

A Tabela I mostra que o conteúdo de fenólicos totais das frações de gengibre, determinado pelo método de Folin Ciocalteau, foi alto variando de 846,37 a 1409,05 mg/100g GAE. Estes valores são maiores que os encontrados por Zheng e Wang para alguns extratos de especiarias, como o coentro vietnamita (309 mg/100g GAE) e alecrim (219 mg/100g GAE). Chanwitheesuk, Teerawutgulrag e Rakariyatham (2005) também investigaram o conteúdo de fenólicos totais de extratos metanólicos de gengibre. De acordo com seus resultados, os extratos apresentaram 60,1 mg/100g GAE, muito inferiores aos valores que encontramos em nossas análises (1409 mg/100g GAE na fração AFL). A fração ácidos fenólicos livres foi a que apresentou os maiores valores GAE; mesmo assim, os valores não diferem estatisticamente dos valores GAE das outras frações.

Os altos índices de fenólicos encontrados podem ser devido à metodologia de extração escolhida para o estudo, considerando que foi desenvolvida para otimizar a extração de ácidos fenólicos da amostra. A metodologia de fracionamento proposta por Krygier, Sosulski e Hogge (1982) mostrou alta eficiência na extração de compostos fenólicos do gengibre, mesmo que nenhum solvente por si só seja conhecido por extrair especificamente compostos fenólicos.

Tabela I. Atividade antioxidante (TEAC) e conteúdo de fenólicos totais (GAE) das frações de gengibre.

Fenólicos totais (GAE) ¹		ABTS (TEAC) ²	
AFL ^x	1409,05 ± 4,39 ^a	AFL ^x	744,97 ± 6,35 ^a
AFES ^y	887,44 ± 5,66 ^a	AFES ^y	489,37 ± 4,20 ^a
AFEI ^z	846,37 ± 3,98 ^a	AFEI ^z	457,09 ± 5,47 ^a

¹GAE: Equivalentes ácido gálico em mg por 100 mg (peso seco).

²TEAC: Atividade antioxidante equivalente ao Trolox em µM por g (peso seco).

^{x,y,z} Ácidos fenólicos livres, ésteres solúveis e ligantes insolúveis, respectivamente.

Letras diferentes na mesma coluna implicam diferença significativa (P<0,05) pelo teste de Tukey entre as amostras.

3.2. Ensaio de descoloração do radical cátion ABTS

O método TEAC é um dos mais frequentemente utilizados para a determinação da capacidade antioxidante. Ele baseia-se na neutralização do radical cátion formado pela oxidação do cromóforo ABTS sintético a um radical fortemente absorvente ABTS+ (700-750 nm). O radical reage rapidamente com doadores de elétrons/hidrogênio para formar ABTS sem cor. A reação é independente de pH. Um decréscimo na concentração do ABTS+ é linearmente dependente da concentração do antioxidante (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1996). A atividade antioxidante das frações está apresentada na Tabela I. Atividades antioxidantes altas foram encontradas nas três frações e nenhuma diferença significativa nos valores foi encontrada. Novamente, o procedimento de extração mostrou eficiência em extrair compostos com expressiva atividade.

A atividade antioxidante total está bem correlacionada com propriedades redox dos fenólicos ($r^2=0,9995$, $P<0,05$) (Figura 2). Isto significa que a atividade antioxidante das frações é principalmente determinada pelo seu conteúdo de fenólicos totais.

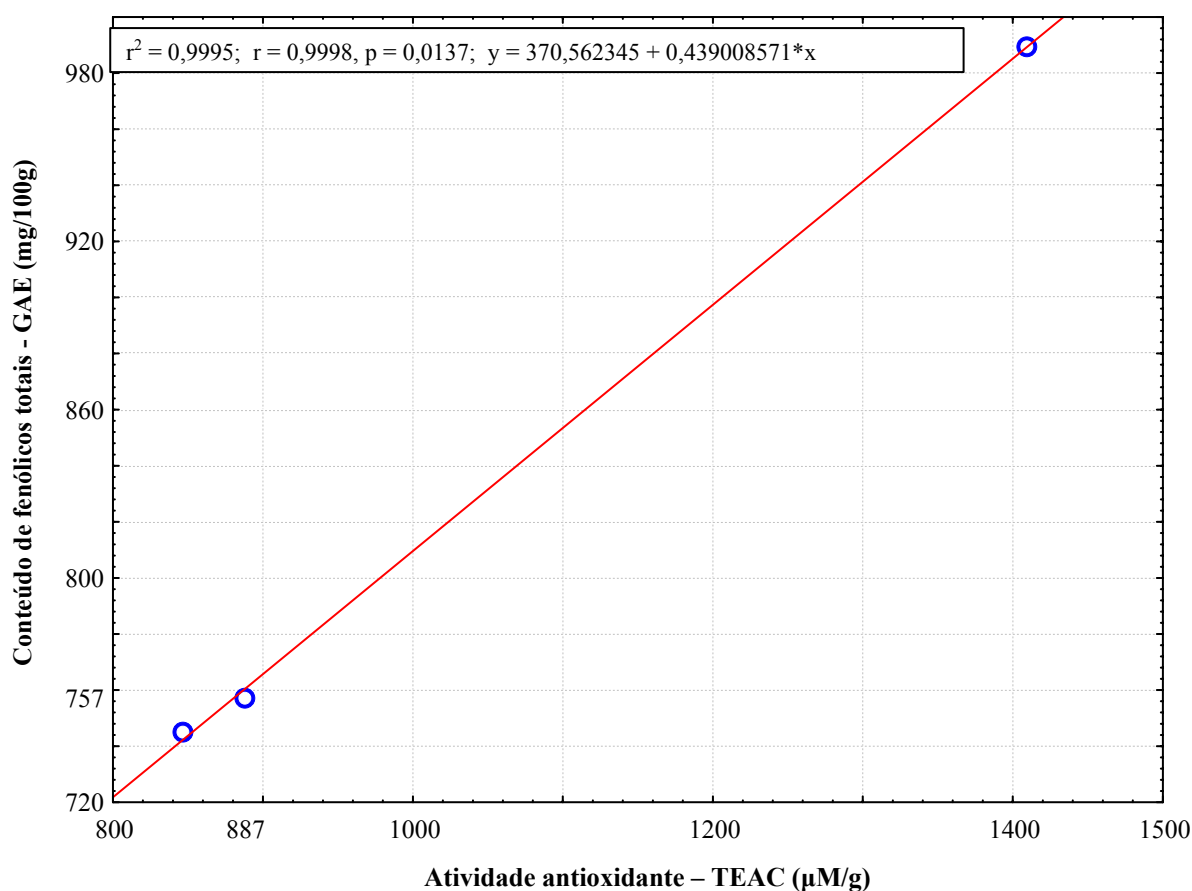


Figura 2. Correlação entre o conteúdo de fenólicos totais (GAE) e a atividade antioxidante (TEAC) das frações do gengibre.

3.2 Identificação dos ácidos fenólicos por cromatografia gasosa

Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos: os derivados do ácido cinâmico e os derivados do ácido hidroxibenzoico. Os derivados do ácido cinâmico são compostos fenólicos de ocorrência natural que possuem um anel aromático com uma cadeia carbônica, constituída por três carbonos ligados ao anel. Os ácidos ferúlico, *p*-cumárico, caféico e sináptico são os hidroxicinamatos mais abundantes na natureza. Estes ácidos existem nas plantas, normalmente na forma esterificada, como ácido clorogênico, um éster do ácido quínico, cuja molécula é constituída pelo ácido quínico esterificado com o ácido caféico. Eles também podem ser encontrados na forma glicosilada ou ligados a proteínas ou outros polímeros da parede celular como ácidos livres (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004). Os isômeros

dos ácidos clorogênico e caféico são descritos como antioxidantes (DURÁN e PADILLA, 1993).

No grupo dos ácidos hidroxibenzoicos – compostos que possuem um grupo carboxila ligado ao anel aromático – podem ser encontrados os ácidos protocatequínico, vanílico, siríngico, gentísico, salicílico, elágico e gálico. Esses dois grupos de fenólicos apresentam propriedades antioxidantes (HARBOURNE, 1980). Mesmo que algumas outras características possam contribuir para a capacidade antioxidante dos ácidos fenólicos e seus esters, esta é determinada, principalmente, pelo número de hidroxilas presentes na molécula (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1997; SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Os ácidos sináptico, ferúlico e *p*-cumárico são antioxidantes mais eficientes que os derivados do ácido benzoico, como os ácidos protocatequínico, siríngico e vanílico. Isto é devido à dupla ligação presente nos derivados do ácido cinâmico (WANASUNDARA, AMAROWICK e SHAHIDI, 1994).

A Tabela II mostra os ácidos fenólicos encontrados nas frações de gengibre, comparados aos tempos de retenção dos padrões. Todas as frações apresentaram uma alta quantidade de ácido salicílico (Figuras 3, 4 e 5), do qual não se espera uma alta capacidade antioxidante, considerando que possui apenas uma hidroxila ativa na sua molécula. No entanto, o ácido salicílico modula a expressão de diversas enzimas que participam dos processos de defesa antioxidante (como a glutationala peroxidase) reduzindo, portanto, os efeitos da condição de “estresse oxidativo”. O ácido salicílico pode desenvolver sua capacidade antioxidante juntamente com os outros ácidos fenólicos encontrados no gengibre, ou seja, ele pode ter um efeito sinérgico com outro ácido fenólico. Alguns ácidos fenólicos conhecidos por possuírem alta capacidade antioxidante foram encontrados nas amostras, como os ácidos ferúlico (14,323%), gálico (2,218%), caféico (5,973%) e sináptico (4,51%), e suas presenças podem ter tido grande influência na atividade antioxidante total das frações.

Tabela II. Composição dos ácidos fenólicos (%) das frações do gengibre

Ácidos Fenólicos	AFL¹	AFES²	AFEI³
Salicílico	98,59 ± 1,08 ^a	95,00 ± 2,7 ^a	75,48 ± 1,02 ^b
Gentísico	0,02 ± 0,05 ^a	0,25 ± 0,02 ^a	0,18 ± 0,08 ^a
<i>t</i> -cinâmico	—	0,247 ± 0,02 ^a	0,04 ± 0,00 ^a
Elágico	0,070 ± 0,00 ^a	0,110 ± 0,02 ^a	0,819 ± 0,01 ^b
Cinâmico	0,132 ± 0,00 ^a	0,426 ± 0,03 ^b	0,054 ± 0,01 ^a
Vanílico	0,009 ± 0,00 ^a	0,312 ± 0,03 ^b	0,082 ± 0,03 ^a
<i>o</i> -cumárico	0,007 ± 0,00 ^a	—	0,178 ± 0,01 ^a
Protocatequínico	0,188 ± 0,01 ^a	0,058 ± 0,03 ^a	—
Quínico	0,006 ± 0,00 ^a	0,086 ± 0,01 ^a	—
<i>p</i> -cumárico	0,071 ± 0,05 ^a	0,237 ± 0,02 ^b	0,320 ± 0,07 ^b
Gálico	0,143 ± 0,02 ^a	0,672 ± 0,04 ^b	1,403 ± 0,89 ^c
Ferúlico	0,347 ± 0,03 ^a	0,876 ± 0,08 ^b	13,100 ± 0,04 ^c
Caféico	0,268 ± 0,02 ^a	0,882 ± 0,06 ^b	4,823 ± 0,50 ^c
Sináptico	0,144 ± 0,01 ^a	0,841 ± 0,03 ^b	3,525 ± 0,01 ^c

^{1,2,3} Ácidos fenólicos livres, ésteres solúveis e ligantes insolúveis, respectivamente

Valores são médias ± desvio padrão de determinações em triplicata

Letras diferentes na mesma linha implicam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey entre as amostras.

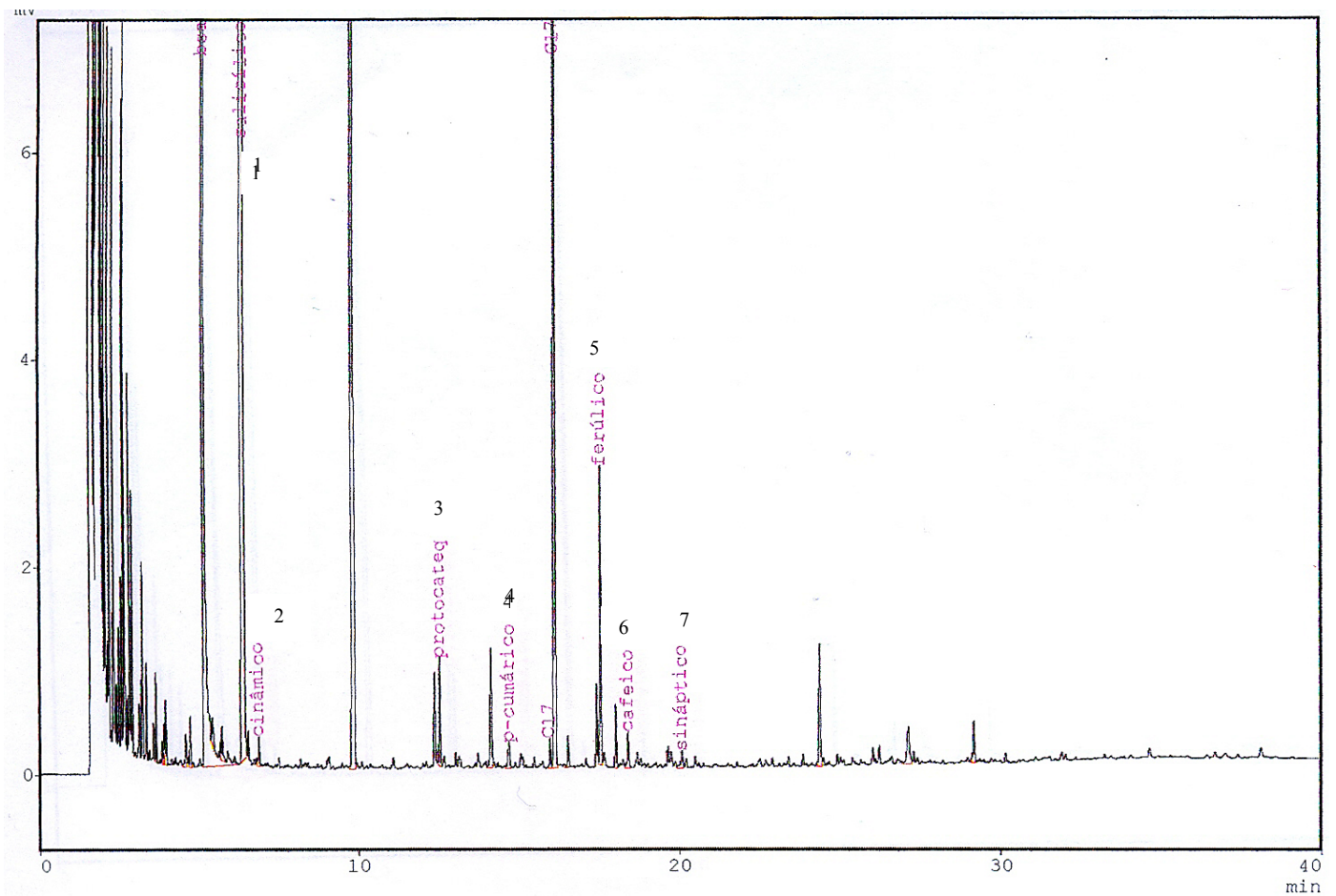


Figura 3. Cromatograma obtido a partir da fração ácidos fenólicos livres. (1) Ácido salicílico; (2) ácido cinâmico; (3) ácido protocatequínico; (4) ácido *p*-cumárico; (5) ácido ferúlico; (6) ácido caféico; (7) ácido sináptico.

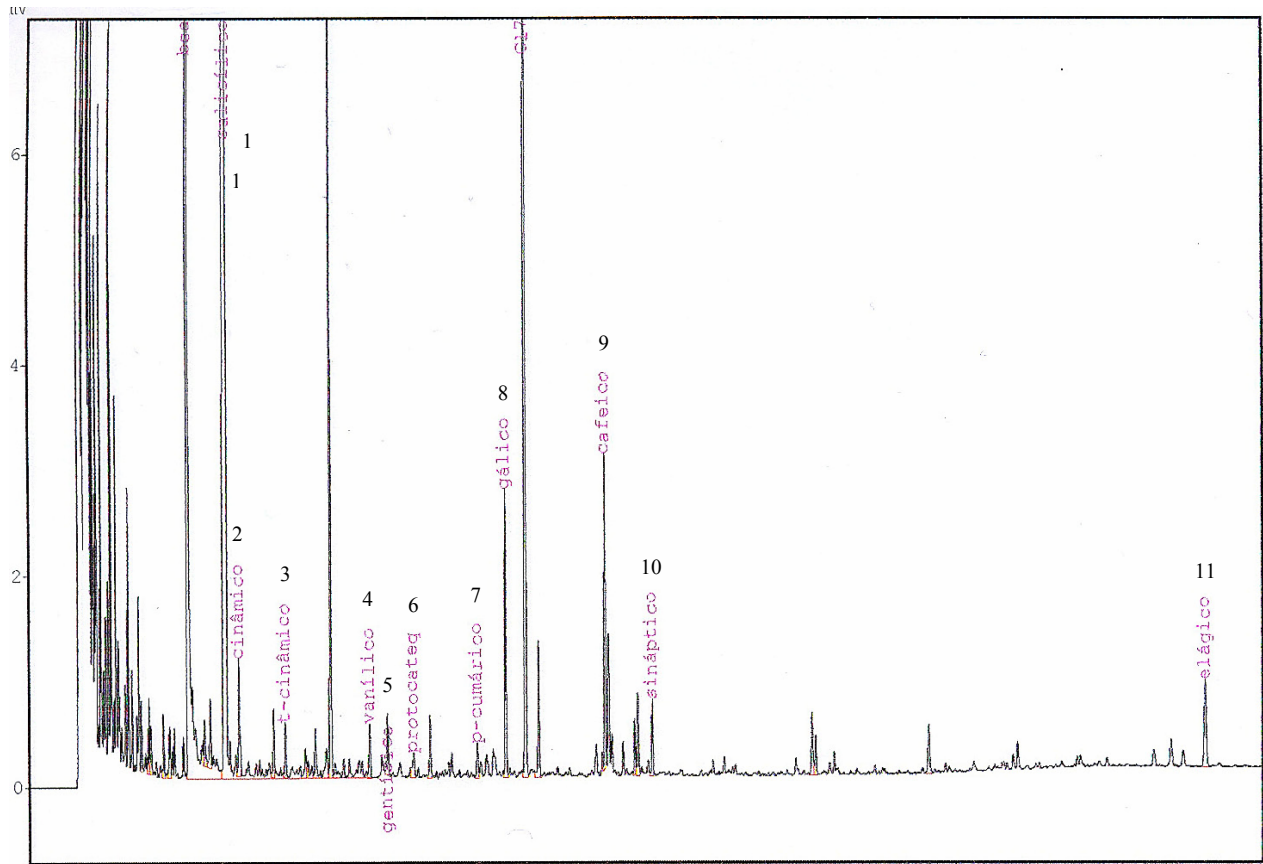


Figura 4. Cromatograma obtido a partir da fração ácidos fenólicos solúveis. (1) Ácido salicílico; (2) ácido cinâmico; (3) ácido t-cinâmico; (4) ácido vanílico; (5) ácido gentísico; (6) ácido protocatequínico; (7) ácido p-cumárico; (8) ácido gálico; (9) ácido caféico; (10) ácido sináptico; (11) ácido elágico.

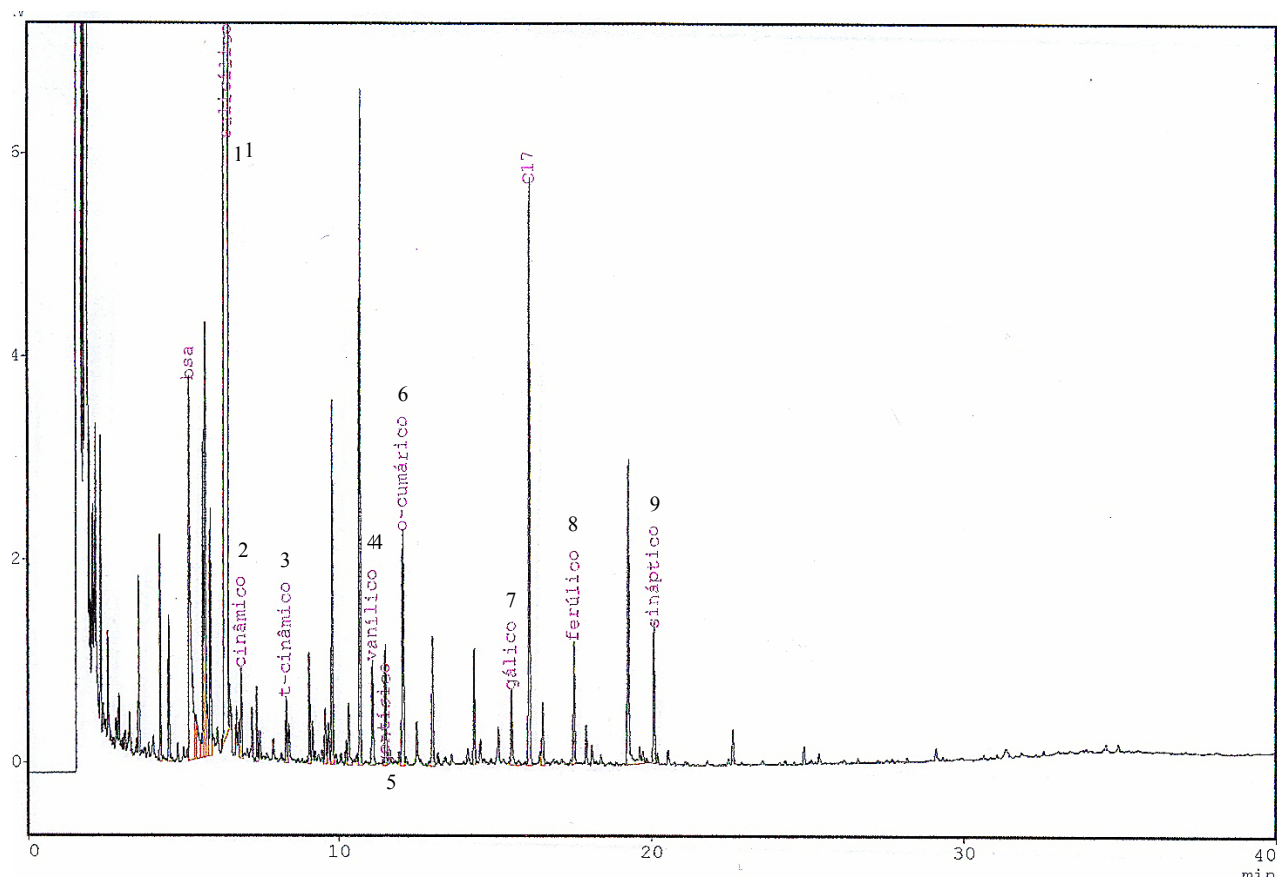


Figura 5. Cromatograma obtido a partir da fração ácidos fenólicos insolúveis. (1) Ácido salicílico; (2) ácido cinâmico; (3) ácido t-cinâmico; (4) ácido vanílico; (5) ácido gentísico; (6) ácido o-cumárico; (7) ácido gálico; (8) ácido ferúlico; (9) ácido sináptico.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que as frações de ácidos fenólicos do gengibre apresentaram considerável atividade antioxidante e significativo conteúdo de fenólicos totais, e uma alta correlação entre estes dois índices também pôde ser observada. Entre os ácidos fenólicos identificados nas frações, o ácido salicílico foi predominante, mas sua contribuição para a capacidade antioxidante total das frações pode ser dependente da presença de outros ácidos fenólicos da amostra. Além disso, o estudo *in vivo* das ações desses ácidos fenólicos é de igual importância, para que seja avaliada a sua disponibilidade no sistema biológico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATROSHI, F., RIZZO, A., WATERMARCK, T., ALI-VEHMAS, T. Antioxidant nutrients and mycotoxins. **Toxicology**, v. 180, p. 151–167, 2003.

BUDINI, R., TONELLI, D., GIROTTI, S. Analysis of total phenols using the Prussian blue method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, p. 1236-1238, 1980.

CHANWITHEESUK, A., TEERAWUTGULRAG, A., RAKARIYATHAM, N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. **Food Chemistry**, v. 92, p. 491-497, 2005.

DABROWSKI, K.J., SOSULSKI, F. Quantification of free and hydrolyzable phenolic acids in seeds by capillary gas-liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, p. 123-127, 1984.

DEDOV, V.N., TRAN, V.H., DUKE, C.C., CONNOR, M., CHRISTIE, M.J., MANDADI, S. & ROUFOGALIS, B. Gingerols: a novel class of vanilloid receptor (VR1) agonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 137, p. 793-798, 2002.

DEGÁSPARI, C.H., WASZCZYNSKYJ, N. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Visão Acadêmica**, v. 5 (1), p. 33-40, 2004.

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

HARBORNE, J. B. 1980. **Phytochemical Methods**. Chapman and Hall, London.

KRYGIER, K., SOSULSKI, F., HOGGE, L. Free, esterified and insoluble-bound phenolic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, p. 334-336, 1982.

MOREIRA, A.V.B., MANCINI FILHO, J. Atividade antioxidante das especiarias mostarda canela e erva-doce em sistemas aquoso e lipídico. **Nutrire**, v. 25, p. 31-46, 2003.

POKORNÝ, J. Natural antioxidants for food use. **Trends in Food Science and Technology**, v. 2, p. 223-227, 1991.

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

RICE-EVANS, C., MILLER, N.J., PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J. & PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in plant science**, v. 2 (4), p. 152-159, 1997.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. Actividad antioxidante. **Alimentaria**, v. 329, p. 29-40, 2002.

SHAHIDI, F. Antioxidants in food and food antioxidants. **Nahrung**, v. 44 (3), p. 158–163, 2000.

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

SOTERO, D. E. G. **Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante de frutos da Amazônia: chope (*Gustavia augusta* L.), sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) e macambo (*Theobroma bicolor*)**. 2002. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Universidade de São Paulo, São Paulo, [2002].

WANASUNDARA, U., AMAROWICZ, R., SHAHIDI, F. Isolation and identification of an antioxidative component in canola meal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49 (6), p. 1285-1290, 1994.

CONCLUSÕES

Tomando-se os resultados apresentados ao longo deste estudo, pode-se concluir que os extratos etéreo e aquoso do gengibre apresentaram elevada atividade antioxidante, proveniente da sua alta quantidade de compostos fenólicos; este resultado tem como base a correlação linear encontrada entre esses parâmetros. O gengibre coletado próximo do final do período de colheita apresentou maiores quantidades de polifenóis e atividade antioxidante, o que pode ser devido à mobilização de novos compostos produzidos como metabólitos secundários durante o amadurecimento da planta. Esta característica poderá implicar na determinação da melhor época de colheita a fim de obter uma maior quantidade de compostos bioativos.

Foi observado um efeito sinergista dos extratos aquosos do gengibre com o BHT, principalmente na concentração de 200 ppm. Concernente a este fato, a substituição dos antioxidantes sintéticos pode ser interessante, no que diz respeito às implicações na saúde e na funcionalidade dos sistemas alimentícios promovidas pelos compostos naturais.

Através da identificação dos ácidos fenólicos presentes no gengibre, verificou-se a predominância do ácido salicílico, em valores superiores a 90%, nas frações ácidos fenólicos livres e ésteres solúveis, e de 75% nas frações insolúveis. A elevada atividade antioxidante das frações pode ser proveniente da interação (sinergismo) deste ácido com os outros ácidos fenólicos identificados nas frações, como o ferúlico, caféico e gálico, conhecidos por possuírem elevada atividade antioxidante *in vitro*.

Tendo em consideração que o cultivo e o consumo de gengibre no Brasil vem crescendo nas últimas décadas, esta especiaria pode ser uma importante fonte de compostos fenólicos e antioxidantes naturais. No entanto, ainda são necessários mais estudos para avaliar a contribuição de cada ácido fenólico para a atividade antioxidante total do gengibre, bem como para testar sua atividade antioxidante em sistemas biológicos.