

**ANTIOXIDANTES, CLOROFILA E PERFIL
DE ÁCIDOS GRAXOS EM FOLHAS DE
MANDIOCA**

ANDERSON ASSAID SIMÃO

2010

ANDERSON ASSAID SIMÃO

**ANTIOXIDANTES, CLOROFILA E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS EM
FOLHAS DE MANDIOCA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Agroquímica,
para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Profa. Dra. Angelita Duarte Corrêa

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Simão, Anderson Assaid.

Antioxidantes, clorofila e perfil de ácidos graxos em folhas de
mandioca / Anderson Assaid Simão. – Lavras : UFLA, 2010.

71 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Angelita Duarte Corrêa.

Bibliografia.

1. Farinha de folha de mandioca. 2. Idade da planta. 3.
Substâncias antioxidantes. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 641.33682

ANDERSON ASSAID SIMÃO

**ANTIOXIDANTES, CLOROFILA E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS EM
FOLHAS DE MANDIOCA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2010.

Profª. Dra Maria das Graças Cardoso

UFLA

Prof. Dra. Joelma Pereira

UFLA

Profª. Dra. Angelita Duarte Corrêa
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

À memória do meu amado pai, por tudo
que pode fazer por mim, por me mostrar
sempre o caminho certo.

Ao meu lindo e pequeno Cauã, por me
trazer tantas alegrias e motivação.

Aos meus irmãos, Andréia e Luis Fernando, pela
amizade e apoio.

À minha mãe, por sempre confiar e me amar.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de vida, por iluminar meu caminho.

À profa. Dra. Angelita Duarte Corrêa, que me recebeu com amizade, me orientou e me deu total apoio para realização deste curso.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Química, pela oportunidade concedida para a concretização deste curso.

Aos amigos do laboratório, Abel, Ana Paula, Annete, Chrystian e Luciana, Daniela, Estela, Ellen, Flávia, Gislaine, Juliana (s), José Renato, Lucas, Mariana, Maria Cristina, Pricila, Pollyanna, Rafaela, Stefânia e Tamara.

Aos colegas de república, Guilherme, Marco Aurélio, Roberson e Márcio, pelo companheirismo.

À minha grande amiga Xulita, técnica do laboratório, pela amizade e apoio.

À Aline, pela ajuda na análise dos ácidos graxos.

À profa. Dra Maria das Graças Cardoso, pela sua grande contribuição com reagentes e aparelhos.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho, pela amizade e boa convivência.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE SIGLAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Considerações gerais.....	4
2.2 Radicais livres e antioxidantes.....	6
2.2.1 Classificação e estratégias de defesa antioxidante.....	9
2.2.2 Substâncias antioxidantes.....	11
2.2.3 Métodos para determinação de antioxidantes.....	18
2.3 Ácidos graxos essenciais.....	19
2.3.1 Fontes.....	23
2.3.2 Benefícios à saúde.....	23
2.4 Clorofila.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Colheita, secagem das folhas de mandioca e preparo da farinha de folhas de mandioca.....	27
3.2 Determinação de umidade.....	27
3.3 Determinação de substâncias antioxidantes.....	28
3.3.1 Vitamina C.....	28
3.3.2 Polifenóis.....	28
3.3.3 β -caroteno.....	29
3.4 Avaliação da atividade antioxidante.....	29
3.4.1 Preparação dos extratos.....	29

3.4.2 Método ABTS.....	30
3.4.3 Método β -caroteno/ácido linoleico.....	31
3.5 Determinação de clorofila.....	32
3.6 Perfil de ácidos graxos.....	33
3.6.1 Extração de lipídeos.....	33
3.6.2 Esterificação.....	33
3.6.3 Caracterização dos ésteres dos ácidos graxos.....	34
3.7 Delineamento experimental.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 Substâncias antioxidantes.....	36
4.1.1 Vitamina C.....	36
4.1.2 Polifenóis.....	40
4.1.3 β -caroteno.....	42
4.2 Avaliação da atividade antioxidante.....	43
4.2.1 Método ABTS.....	45
4.2.2 Método β -caroteno/ácido linoleico.....	47
4.3 Clorofila.....	49
4.4 Correlação entre substâncias antioxidantes com a atividade antioxidante e com a clorofila.....	50
4.5 Perfil de ácidos graxos.....	53
5 CONCLUSÕES.....	60
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
ANEXO.....	70

LISTA DE SIGLAS

AA	Atividade antioxidante
ABTS	2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio
AG	Ácidos graxos
AGMI	Ácidos graxos monoinsaturados
AGS	Ácidos graxos saturados
AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxi-anisol
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
FFM	Farinha de folhas de mandioca
MS	Matéria seca
MF	Matéria fresca
TIP	Três idades da planta
TROLOX	Ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Teores médios de umidade das folhas e das farinhas de folhas de mandioca de quatro cultivares, em TIP.....	37
TABELA 2	Teores médios de vitamina C (mg 100 g ⁻¹ MS) por CLAE, das farinhas de folhas de mandioca de quatro cultivares , em TIP	39
TABELA 3	Teores médios de polifenóis (mg g ⁻¹ MS) das farinhas de folhas de mandioca de quatro cultivares, em TIP.....	41
TABELA 4	Teores médios de β-caroteno (mg 100 g ⁻¹ MS) das farinhas de folhas de mandioca de quatro de cultivares, em TIP.....	42
TABELA 5	Atividade antioxidante das farinhas de folhas de mandioca de quatro cultivares, em TIP, e de três padrões, pelo método ABTS.....	46
TABELA 6	Atividade antioxidante das farinhas de folhas de mandioca de quatro cultivares, em TIP, e de três padrões, pelo método β-caroteno/ácido linoleico.....	48
TABELA 7	Teores médios de clorofila (unidade SPAD) das farinhas de folhas de mandioca de quatro cultivares, em TIP.....	50
TABELA 8	Correlação entre as substâncias antioxidantes com a atividade antioxidante (AA) e com a clorofila das farinhas de folhas de mandioca, em TIP.....	51
TABELA 9	Composição de ácidos graxos (%) das farinhas de folhas de mandioca de quatro cultivares aos 10 meses de idade.....	57
TABELA 10	Composição de ácidos graxos (%) das farinhas de folhas de mandioca de quatro cultivares aos 12 meses de idade.....	58

TABELA 11	Composição de ácidos graxos (%) das farinhas de folhas de mandioca de quatro cultivares aos 14 meses de idade.....	59
-----------	--	----

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Ciclo oxidativo do ascorbato	12
FIGURA 2 Estruturas químicas de carotenoides.....	16
FIGURA 3 Esquema de inibição do radical peroxila pelos carotenoides....	17
FIGURA 4 Metabolismo dos ácidos graxos das famílias ω -6 e ω -3.....	21
FIGURA 5 Cromatograma do padrão de ácido ascórbico na concentração $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	38
FIGURA 6 Cromatograma de vitamina C da farinha de folha de mandioca da cultivar Mocotó, aos 14 meses de idade.....	38
FIGURA 7 Atividade antioxidante ($\mu\text{mol trolox L}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de MS) da farinha de folha de mandioca, cultivar Ufla, aos 12 meses de idade, submetida a diferentes extratores.....	43
FIGURA 8 Curva de descolorimento do β -caroteno na presença de BHT (200 mg L^{-1}), quercetina (200 mg L^{-1}), rutina (200 mg L^{-1}) e do controle.....	47
FIGURA 9 Cromatograma do padrão da mistura de 37 ésteres metílicos de ácidos graxos.....	55
FIGURA 10 Cromatograma de ácidos graxos da farinha de folha de mandioca da cultivar Mocotó, aos 10 meses de idade.....	56

RESUMO

SIMÃO, Anderson Assaid. **Antioxidantes, clorofila e perfil de ácidos graxos em folhas de mandioca**. 2010. 71 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.¹

Uma vez que o mundo está passando por um processo de explosão populacional e grandes mudanças nas condições climáticas, dois aspectos têm sido motivo de preocupação: a necessidade de um aumento constante na produção de alimentos e a conscientização da população para evitar o desperdício, principalmente de partes dos alimentos que tradicionalmente não são muito aproveitadas. Em mercados, feiras e distribuidoras de produtos vegetais, folhas e ramos da maioria dos alimentos são descartadas. Dentre essas folhas estão as de mandioca. Procurando por substâncias que pudessem atrair a atenção dos consumidores e das indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos, para dar um maior aproveitamento às folhas de mandioca, e causar valorização desse subproduto agrícola, objetivou-se, com a realização deste trabalho, quantificar as substâncias antioxidantes, a clorofila e a composição em ácidos graxos e medir a atividade antioxidante na farinha de folhas de mandioca (FFM) de diferentes cultivares, em várias idades da planta. Preparou-se a FFM secando as folhas, por 48 horas, em estufa com circulação de ar, a $\pm 35^{\circ}\text{C}$. Após secagem, foram moídas, sem o pecíolo e armazenadas em frascos hermeticamente fechados. Os teores das substâncias antioxidantes foram considerados elevados e aumentaram com a maturidade da planta. Os teores de clorofila diminuíram com a maturidade da planta e apresentaram correlação negativa com as substâncias antioxidantes, indicando que os maiores níveis de antioxidantes são encontrados quando a planta apresenta baixos níveis de clorofila. As FFM mostraram atividade antioxidante, tendo o potencial antioxidante sido considerado alto quando se utilizou o método de inibição da oxidação lipídica (β -caroteno/ácido linoleico) e moderado quando se utilizou o método de captura de radicais livres (ABTS). A principal contribuição para a atividade antioxidante das FFM parece ser dada pela vitamina C, que apresentou a melhor correlação com os testes ABTS. Vinte ácidos graxos foram identificados, sendo majoritários os ácidos alfa-linolênico e o palmitoleico. Praticamente não houve diferenças no percentual dos ácidos alfa-linolênico e palmitoleico nas três idades estudadas. As razões dos ácidos ω -6/ ω -3 e de poli-insaturados/saturados encontram-se dentro das faixas recomendadas na

¹Orientadora: Profa. Dra. Angelita Duarte Corrêa – DQI/UFLA.

literatura, sendo, portanto, as FFM consideradas boas fontes alimentares. Das idades estudadas neste trabalho, a de 14 meses apresenta os maiores teores de antioxidantes, tendo sido as cultivares Mocotó e Pão da China as que se destacaram.

ABSTRACT

SIMÃO, Anderson Assaid. **Antioxidants, chlorophyll and profile of fatty acids of cassava leaves**. 2010. 71 p. Dissertation (Master of Science in Agrochemistry) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.¹

Since the world is going through a population boom process and great changes in the climatic conditions, two aspects have been motives of concern: the need for a constant increase in food production and the awareness of the population to avoid the wastes mainly of parts of the foods which traditionally are not much utilized. On our markets, fairs and distributors of plant products; leaves and foliage of most of the foods are disposed. Out of those leaves are the ones of the cassava. Seeking for substances which could call the attention of the consumers and of the pharmaceutical, food and cosmetic industries to give increased use to the cassava leaves and to cause increase in value of the agricultural by-product, it was intended with the accomplishment of this study to quantify the antioxidant substances, chlorophyll and fatty acid composition and to measure the antioxidant activity in the cassava leaves flour (CLF) of different cultivars at several ages of the plant. The CLF was prepared by drying the leaves for 48 hours in air-circulation oven at ± 35 °C. After drying, they were ground, without the petiole and stored in tightly closed flasks. The contents of antioxidant substances were regarded as high and they increased as the plants becomes more mature. The chlorophyll contents decreased with the plant's maturity and presented a negative correlation with the antioxidant substances, pointing out that the highest levels of antioxidants are found when the plant presents low levels of chlorophyll. The CLF showed antioxidant activity, the antioxidant potential having been regarded as high when the lipid oxidation inhibition method (β -carotene/linoleic acid) and moderate when the free radical capture method (ABTS) was utilized. The main contribution to the antioxidant activity of the CLF seems to be given by the vitamin C, which presented the best correlation with the ABTS tests. Twenty fatty acids were identified, both acids alfa-linoleic and palmitoleic being majoritary. Practically, there were no differences in the percent of alfa-linoleic and palmitoleic acids at the three ages studied. The ratios of acids ω -6/ ω 3 and polyunsaturated/saturated acids are within ranges recommended in the literature, the FFM being, therefore, regarded as good food sources. Of the ages studied in this study, the one of 14 months presents the highest levels of antioxidants, cultivars Mocotó and Pão da China being the ones which stood out the most.

¹ Adviser: Professor Dr. Angelita Duarte Corrêa DQI/UFLA.

1 INTRODUÇÃO

Uma vez que o mundo está passando por um processo de explosão populacional e por grandes mudanças nas condições climáticas, dois aspectos têm sido motivos de preocupação: a necessidade de um aumento constante na produção de alimentos e a conscientização da população para evitar o desperdício, principalmente com partes dos alimentos que não são tradicionalmente muito aproveitadas.

Em mercados, feiras e distribuidoras de produtos vegetais, folhas e ramos da maioria dos alimentos são descartadas. Dentre essas folhas estão as de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz).

Essas folhas se apresentam como uma solução viável para a crescente demanda por alimentos, pois são ricas em proteínas, vitaminas e minerais a baixo custo, quando comparadas a hortaliças folhosas convencionais. Além disso, seu uso pode proporcionar renda extra a diversos produtores que vivem da cultura da mandioca.

A busca por substâncias naturais que possam trazer benefícios, principalmente a saúde, a agregação de valor a este subproduto agrícola, pode contribuir para um maior uso das folhas de mandioca na alimentação e nas mais diversas áreas.

Estudos experimentais e epidemiológicos têm demonstrado que pessoas que consomem alimentos ricos em antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados podem ter reduzido o risco de inúmeras doenças, como câncer, doenças cardiovasculares, doenças crônicas, envelhecimento entre outras.

Antioxidantes são substâncias que combatem os radicais livres, que são espécies extremamente reativas que causam a oxidação de várias biomoléculas presentes em nosso organismo, causando várias patologias, como câncer, desordens neurodegenerativas, doenças cardiovasculares e outras doenças

crônicas, podendo ser a causa ou o agravante do quadro geral destas. Além disso, com os problemas encontrados com os antioxidantes sintéticos, utilizados na conservação de alimentos e que, além de altos custos para suas produções, também tem sido demonstrado, por estudos toxicológicos, que podem provocar efeitos indesejáveis no organismo humano e animal, a busca por substâncias naturais que sejam fontes eficientes de antioxidantes, com menos custos que os antioxidantes sintéticos, tem sido alvo de diversos estudos.

Recentemente, pesquisas vêm sendo realizadas com grande interesse médico e nutricional sobre os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa das famílias ômega-3 e ômega-6. De acordo com vários estudos, várias doenças, como câncer, artrite e diabetes, estão relacionadas com a desproporção entre os ácidos ômega-6 e ômega-3. Durante muitas gerações, a razão entre esses ácidos graxos manteve-se em 1:1, devido ao consumo de vegetais (sementes, folhas e raízes) e de produtos marinhos, que apresentam adequadas concentrações de ômega-3. Porém, as mudanças nos hábitos alimentares, a emergência de alimentos processados e a hidrogenação de óleos vegetais reduziram as concentrações de ômega-3, aumentando o conteúdo de ômega-6 em nossas dietas, mudando a razão para 10:1 a 20:1, o que trouxe drásticas consequências à saúde. Consequentemente, se torna de fundamental importância a realização de estudos para a obtenção de novas fontes de ácidos graxos ômega-3 para restabelecer a razão entre o somatório dos ácidos ômega-6/ômega-3.

Estudos já realizados com folhas verdes demonstraram que elas apresentam quantidades consideráveis de vitaminas, carotenoides, compostos fenólicos, entre outros. Esses compostos constituem um dos principais mecanismos de defesa no combate aos radicais livres, se caracterizando como potentes antioxidantes. Desta forma, é importante avaliar a sua composição, tendo em vista que as folhas de mandioca, consideradas até então como subprodutos agrícolas, podem ser uma boa fonte dessas substâncias, o que

despertaria grande interesse das indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosméticos, acarretando valorização desse subproduto agrícola.

Em folhas de vegetais, a clorofila, pigmento fotossintético das plantas, relaciona-se diretamente com o estado nutricional destas. A quantidade desse pigmento vem sendo utilizada como índice de avaliação do estado nutricional de diversos tipos de culturas. Assim, variáveis, como os níveis de clorofila e antioxidantes, podem estar diretamente correlacionadas, sendo necessários estudos para a confirmação dessa correlação que, caso se confirme, poderá servir como parâmetro para a obtenção das substâncias antioxidantes em folhas de mandioca.

Portanto, este trabalho foi realizado com o objetivo de quantificar as substâncias antioxidantes, a clorofila e a composição em ácidos graxos e medir a atividade antioxidante na farinha de folhas de mandioca de diferentes cultivares, em várias idades da planta.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Considerações gerais

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta perene, arbustiva, pertencente à família das Euforbiáceas e ao gênero *Manihot* (Lorenzi, 2003). Mandioca, aipim e macaxeira são alguns de seus nomes comuns. Originária do continente americano, provavelmente do Brasil central, a mandioca já era amplamente cultivada pelos aborígenes, por ocasião da descoberta do Brasil. Eles foram os responsáveis pela sua disseminação por quase toda a América e os portugueses e os espanhóis, pela sua difusão por outros continentes, especialmente África e Ásia.

A mandioca é um tipo de cultura de climas áridos, possui habilidade de crescer em solos pobres e relativa resistência às ervas daninhas e aos insetos; resiste bem à seca e tem ampla adaptação às mais variadas condições de clima e solo, características que fazem com que ela seja cultivada em todo o mundo, principalmente em regiões pobres (Lorezi & Dias, 1993).

Com uma produção de raízes, em 2009, de 26,2 milhões de toneladas e estimativa semelhante para 2010, o Brasil se caracteriza como o maior produtor mundial de mandioca. Os estados do Pará, Bahia, Paraná, Maranhão e Rio Grande do Sul se destacam como os maiores produtores, sendo responsáveis por 60,5% da produção brasileira (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2010). No mundo, a mandioca também constitui uma das principais explorações agrícolas, tendo elevada importância social, como principal fonte de carboidratos para mais de 500 milhões de pessoas, essencialmente em países em desenvolvimento (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, 2010).

Cultivada em todas as regiões do país, a mandioca tem papel importante na geração de empregos e de renda, principalmente para pequenos e médios

produtores, que a utilizam na alimentação animal e humana. A parte mais importante da planta são as raízes tuberosas, ricas em amido, que têm como principal destino o consumo humano. É utilizada para a preparação de inúmeros derivados, como raspa, farinha de raspa, amido, beiju, sagu, tapioca, farinha de mesa, etc. Tem também aplicações na indústria de alimentos ou como matéria-prima em outras indústrias (Otsubo, 2004).

Nos últimos anos, tem-se dado destaque para a parte aérea da planta, que até então é tratada como subproduto agrícola, mas que, nutricionalmente, apresenta grande potencial para o consumo humano e animal (Lorenzi, 2003). Do ponto de vista nutricional, da parte aérea, aproveita-se apenas o terço superior, que é representado pelas folhas (Carvalho & Kato, 1987).

Segundo Cereda (2001), por tonelada de raiz são produzidas 2,5 t ha⁻¹ de folhas de mandioca. Como a produção brasileira de mandioca em 2009 foi de 26,2 milhões de toneladas, foram desperdiçados, aproximadamente, 65,50 milhões de toneladas de folhas de mandioca, somente nesse ano.

Em algumas regiões brasileiras, como, por exemplo, o nordeste e o norte de Minas Gerais, onde há falta de alimentos para a população, as folhas de mandioca vêm sendo utilizadas para o consumo humano, no combate à fome e à desnutrição proteica. A folha vem sendo utilizada como um dos constituintes da chamada multimistura, incrementando a merenda escolar e fornecida às famílias carentes, juntamente com as cestas básicas.

No continente africano, as folhas de mandiocas são consumidas como vegetal, fazendo parte da dieta regular (Gidamis et al., 1993).

O uso da folha de mandioca na alimentação humana e animal é justificado, pois a mesma é rica em proteínas, com teores variando entre 20,77 a 35,9 g 100 g⁻¹ MS (Ortega-Flores et al., 2003; Corrêa et al., 2004; Wobeto et al., 2006); em vitaminas, com teores variando entre 14,09 a 257,64 mg 100 g⁻¹ MS (Corrêa et al., 2004; Wobeto et al., 2006) e minerais, especialmente Mg, Fe, Zn

e Mn (Wobeto et al., 2006) a baixo custo, quando comparado a hortaliças folhosas convencionais.

Apesar de as folhas de mandioca serem nutritivas, elas apresentam também algumas substâncias consideradas antinutritivas e ou tóxicas que podem comprometer o seu uso, como cianeto, polifenóis (taninos), nitrato, ácido oxálico, hemaglutinina, saponinas e inibidores de tripsina. Todavia, algumas dessas substâncias, dependendo da quantidade consumida ou da circunstância, podem trazer benefícios à saúde (Melo et al., 2007; Wobeto et al., 2007).

Como uma das metas deste trabalho é a agregação de valor às folhas de mandioca, a seguir serão relatadas as substâncias que atualmente têm sido motivo de diversos estudos, por fornecerem vários benefícios à saúde, que são as substâncias antioxidantes e os ácidos graxos essenciais ômega-3 e ômega-6.

2.2 Radicais livres e antioxidantes

Radicais livres são espécies químicas capazes de existência independente, que contenham um ou mais elétrons desemparelhados, com meia vida curtíssima. Dessa forma, eles são altamente reativos, sendo capazes de atacar qualquer biomolécula, se caracterizando como moléculas destrutivas (Halliwell, 1994; Bianchi & Antunes, 1999).

Os radicais mais importantes presentes nos organismos vivos são radicais hidroxila (HO^\bullet), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^\bullet), alcóxila (RO^\bullet) e óxido nítrico ($^\bullet\text{NO}$). Existem outras ERO nos organismos que não são radicais livres, mas podem induzir reações radicalares, a exemplo do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl) (Lima & Abdalla, 2001; Yildirim et al., 2001).

Na verdade, radical livre não é o termo ideal para designar esses agentes reativos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. Como, em sua maioria, são derivados do metabolismo do

oxigênio, costuma-se utilizar o termo “espécies reativas do metabolismo do oxigênio” (ERO) para se referir a eles. Quando essas espécies reativas apresentam um elétron desemparelhado no átomo de nitrogênio são denominadas “espécies reativas de nitrogênio” (ERN) (Barreiros et al., 2006).

Esses radicais podem ser gerados por fontes endógenas ou exógenas. Por fontes endógenas, originam-se de processos biológicos que normalmente ocorrem no organismo, tais como redução de flavinas e tióis; resultado da atividade de oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases; presença de metais de transição no interior da célula e de sistemas de transporte de elétrons. Essa geração de radicais livres envolve várias organelas celulares, como mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos, núcleo, retículo endoplasmático e membranas. As fontes exógenas geradoras de radicais livres incluem tabagismo, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (Yildirim et al., 2001; Soares, 2002).

Geralmente, o metabolismo equilibra sua presença no corpo, mas o problema é que, quando se formam em excesso, sob certas condições anormais, cria-se uma situação que se denomina estresse oxidativo (Tavares et al., 2000; Barreiros et al., 2006). Atualmente, sabe-se que o estresse oxidativo está associado a vários processos de toxicidade celular, tais como danos na estrutura de proteínas, peroxidação lipídica nas membranas, alteração do DNA e inativação de enzimas (Bianchi & Antunes, 1999).

Dessa maneira, estão envolvidos com várias patologias, como doenças do trato gastrointestinal, como a úlcera gástrica e intestinal; doenças relacionadas ao sistema nervoso, como a síndrome de Down e o mal de Alzheimer; doenças cardiovasculares, como a aterosclerose e câncer. O conjunto de danos causados ao organismo pode causar envelhecimento precoce, podendo ser a causa ou o agravante dessas doenças (Halliwell et al., 1992).

Com a descoberta dos efeitos deletérios causados pelos radicais livres no organismo humano e nos alimentos surgiu um grande interesse pelo estudo de substâncias conhecidas como antioxidantes. Nos alimentos eles afetam a qualidade nutricional, além da cor, aroma, sabor e textura, e também são responsáveis pela formação de compostos potencialmente tóxicos e antinutricionais para o organismo.

Antioxidantes são substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis e têm como principal função proteger os constituintes celulares e manter o estado redox celular (Halliwell, 2001). Eles previnem os efeitos deletérios da oxidação, inibindo o início da lipoperoxidação, sequestrando radicais livres e/ou quelando íons metálicos; protegem organismos aeróbicos do estresse oxidativo, definido como elevação na formação de espécies reativas de oxigênio (Rodrigues et al., 2003). Apesar de os antioxidantes doarem elétrons para determinados substratos, eles não se tornam radicais livres, pois eles são estáveis em ambas as formas.

Em pesquisas realizadas nos últimos anos há relatos de que muitos vegetais apresentam, em sua constituição, compostos com ação antioxidante, dentre os quais se destacam a vitaminas C, compostos fenólicos, carotenoides e alguns minerais (Machlin & Bendich, 1987).

Segundo Halliwell (1996), a vitamina C e os compostos fenólicos agem como antioxidantes hidrofílicos, enquanto os carotenoides agem como antioxidantes lipofílicos.

Recentemente, o interesse pelos antioxidantes naturais, para serem utilizados na medicina e nos alimentos, aumentou consideravelmente, pois muitos estudos comprovaram os efeitos deletérios dos radicais livres no organismo humano e restringiram o uso dos antioxidantes sintéticos, tais como o butil-hidroxi-tolueno (BHT) e o butil-hidroxi-anisol (BHA), por apresentarem

efeitos mutagênicos e carcinogênicos, bem como pela comprovação de diversos outros males (Yildirim et al., 2001; Zheng & Wang, 2001).

Os frutos, as hortaliças e os vegetais em geral (incluindo as folhas) são considerados boas fontes de antioxidantes, os quais podem ser mais eficientes e menos custosos que os suplementos sintéticos para proteger o corpo de danos oxidativos sob diferentes condições. Os oxidantes dos vegetais variam amplamente em seus conteúdos e seus perfis entre os diversos tipos de vegetais (Leong & Shui, 2002).

De forma a proteger a célula e os órgãos do corpo contra os radicais livres, os sistemas biológicos desenvolveram um sistema antioxidante altamente complexo e sofisticado, envolvendo uma variedade de componentes enzimáticos, moléculas pequenas e o sistema de quelação de metais, os quais são relatados a seguir.

2.2.1 Classificação e estratégias de defesa antioxidante

Devido à contínua produção de radicais livres durante os processos metabólicos no organismo humano, surgiram muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos (Sies, 1993).

Os antioxidantes que representam a defesa do organismo contra as espécies reativas podem ser classificados como enzimáticos (endógenos) e não enzimáticos (exógenos), conforme a estrutura do agente oxidante. O sistema enzimático é composto de diversas enzimas, destacando-se a superóxido-dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPx); sendo o primeiro a agir, ele evita que o peróxido de hidrogênio e radicais como o superóxido se acumule.

A SOD tem papel fundamental na defesa do organismo contra as espécies reativas de oxigênio, pois atua na remoção do radical superóxido. Ela

catalisa a destruição do radical ânion superóxido, convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A SOD se encontra no organismo sob duas formas. A primeira contém cobre e zinco e ocorre no citosol, e a segunda contém manganês e está localizada na mitocôndria (Barreiros et al., 2006).

Outro antioxidante enzimático é a CAT, hemeproteína citoplasmática que decompõe o peróxido de hidrogênio em excesso, um produto tóxico do organismo, em água e oxigênio molecular (Bianchi & Antunes, 1999). Está localizada nos peroxissomos, tendo, por isso, ação diminuta em órgãos como o coração e o cérebro, pois eles possuem, relativamente, poucos peroxissomos. O peróxido de hidrogênio, quando em excesso, pode causar, além de estresse oxidativo, oxidação da hemoglobina, o que pode levar à diminuição das concentrações de oxigênio e acarretar infecções e úlceras, dentre outras doenças (Barreiros et al., 2006).

Quanto à enzima GPx, esta se caracteriza como antioxidante enzimático por decompor o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, porém, ela atua nessa reação somente quando o peróxido de hidrogênio está presente em baixas concentrações. É uma enzima localizada no citosol e na matriz mitocondrial e seus principais locais de ação são o fígado e os eritrócitos, podendo ocorrer no coração, no pulmão e no músculo. A GPx apresenta um resíduo de cisteína contendo selênio covalentemente ligado ao resto da enzima, sendo a presença desse mineral fundamental para um bom desenvolvimento dessa enzima (Rover Júnior et al., 2001).

Mesmo apresentando alta capacidade de defesa do organismo, as defesas antioxidantes endógenas não são infalíveis, não protegendo totalmente os componentes celulares. Dessa forma, é bem estabelecido que antioxidantes obtidos na dieta são indispensáveis para a defesa apropriada contra os radicais livres e, assim, apresentam importante papel na manutenção da saúde. Nos alimentos, as principais substâncias que se destacam contra os efeitos causados

pelos radicais livres são a vitaminas C, os compostos fenólicos e os carotenoides.

2.2.2 Substâncias antioxidantes

Vitamina C

A vitamina C, ou, simplesmente, ácido ascórbico, é uma vitamina hidrossolúvel e termolábil. Por ser muito solúvel em água, está localizada nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos (Barreiros et al., 2006). As plantas e vários mamíferos são capazes de sintetizá-la a partir de glicose e de galactose. Os seres humanos, os porquinhos-da-índia e outros primatas são os únicos mamíferos incapazes de sintetizar o ácido ascórbico, portanto, ele é considerado essencial na dieta. Neles, a deficiência genética da gulonolactona oxidase impede a síntese do ácido L-ascórbico a partir da glicose (Lehninger, 2006).

A vitamina C encontra-se na natureza sob duas formas: reduzida ou oxidada. Ambas são igualmente ativas, porém, a forma oxidada está muito menos difundida nas substâncias naturais. Tem as seguintes funções: previne o escorbuto; é importante na defesa do organismo contra infecções e fundamental na integridade das paredes dos vasos sanguíneos; é essencial para a formação das fibras colágenas existentes em praticamente todos os tecidos do corpo humano (derme, cartilagem e ossos); tem papel importante na reciclagem da vitamina E e, pela sua habilidade de se interconverter entre as formas reduzida e oxidada, participa de reações de oxidação-redução.

Sua atuação como antioxidante (Figura 1) ocorre pelo fato que o ascorbato (1) pode doar átomos de hidrogênio para reduzir algum outro composto (por exemplo, ERO ou ERN). Sua oxidação produz, inicialmente, o radical semidesidroascorbato (2), que é pouco reativo. Esse radical pode ser

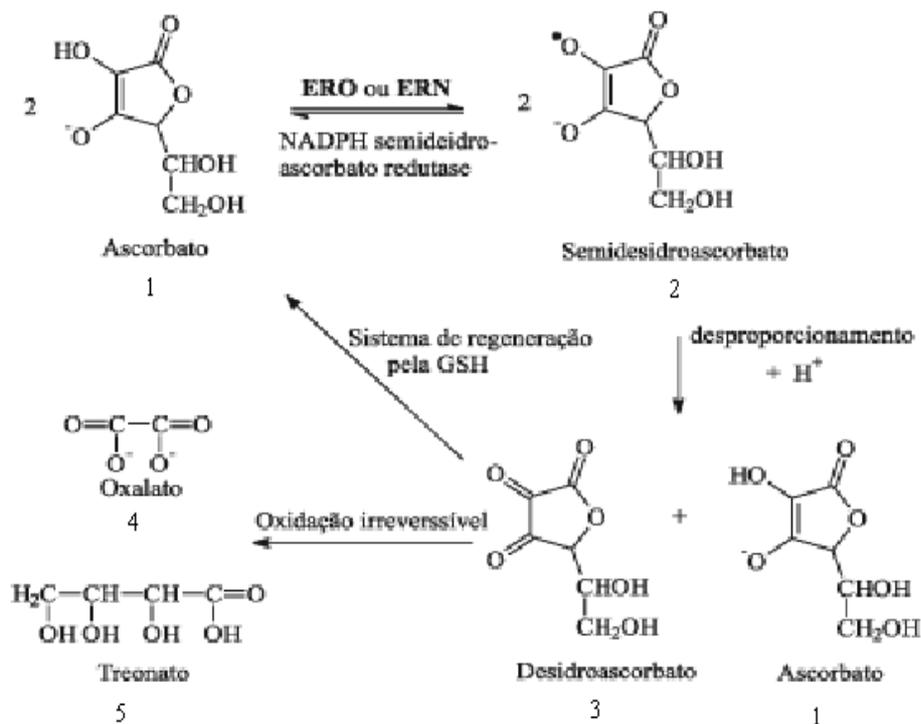


FIGURA 1 Ciclo oxidativo do ascorbato.
 Fonte: Barreiros et al. (2006).

reconvertido em ascorbato, ou duas moléculas dele podem sofrer desproporcionamento, originando uma molécula de desidroascorbato (3) e regenerando uma molécula de ascorbato. O desidroascorbato pode ser, então, regenerado para ascorbato, por meio de um sistema enzimático, ou ser oxidado irreversivelmente, gerando oxalato (4) e treonato (5) (Halliwell & Gutteridge, 1999; Barreiros et al., 2006).

Uma vez que o ascorbato converte as ERO e ERN em espécies inofensivas e que os derivados do ascorbato são pouco reativos, esse age como antioxidante in vivo. A vitamina C atua na fase aquosa como excelente

antioxidante sobre os radicais livres, mas não é capaz de agir nos compartimentos lipofílicos para inibir a peroxidação dos lipídios. Devido à sua propriedade antioxidante, muitos autores sugerem a ingestão diária de doses maiores de ascorbato, para proteção contra o desenvolvimento de doenças crônicas, cardiovasculares e de alguns tipos de câncer.

Em estudos realizados com folhas de mandioca há relatos de teores de de 42,83 a 257,64 mg 100g⁻¹ MS vitamina C (Carvalho et al., 1989; Corrêa et al., 2004; Wobeto et al., 2006; Melo et al., 2007).

Wobeto et al. (2006) verificaram que os teores de vitamina C das folhas de mandioca aumentam com a maturidade da planta, em estudo com plantas na idade de 12, 15 e 17 meses. Carvalho et al. (1989) pesquisaram a influência da cultivar ('Guaxupé', 'Engana Ladrão' e 'Iracema') e das idades da planta (11 a 18 meses) nos teores de vitamina C das folhas de mandioca. Os maiores teores de vitamina C foram encontrados aos 11 meses (60,10 a 60,43 mg 100 g⁻¹) e os menores, aos 18 meses (42,83 a 49,66 g 100 g⁻¹), tendo sido observado declínio a partir do 14º meses após o plantio.

Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são uma das maiores classes de metabólicos secundários de plantas, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Quimicamente, podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxilas. Os compostos fenólicos presentes nos alimentos abrangem ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e cumarinas (Ribeiro & Seravalli, 2004; Moraes & Colla, 2006).

Os flavonoides constituem o mais importante grupo dos compostos fenólicos e se dividem nos seguintes subgrupos: antocianinas, flavononas, flavonóis, flavanas e os isoflavonoides. A grande diversidade estrutural desses compostos é explicada pelas modificações que esses compostos sofrem, como

hidroxilação, metilação e acilação entre outras. Nas plantas, esses compostos são essenciais para a pigmentação, o crescimento, a reprodução e a resistência a patógenos, também se caracterizando como potentes antioxidantes. Os compostos fenólicos se formam em condições de estresse, como infecções, ferimentos e radiações UV, dentre outros (Moraes & Colla, 2006).

Os compostos fenólicos vêm sendo reportados por possuírem atividade antioxidante contra os radicais livres, a qual está associada às propriedades redox dos grupos hidroxil e a sua relação com diferentes partes da estrutura química (Benavente-Garcia et al., 1999). Os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipo-oxigenase in vitro (Soares, 2002).

De modo geral, os compostos fenólicos e, em particular, os flavonoides possuem estruturas ideais para o sequestro dos radicais livres, sendo considerados antioxidantes mais eficazes que as vitaminas E e C. A atividade antioxidante dos flavonoides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de H e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas (Barreiros et al., 2006). Estes compostos podem agir tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo e os produtos intermediários formados por sua ação são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático que apresentam (Soares, 2002; Ramalho & Jorge, 2006).

Devido às suas propriedades antioxidantes, os compostos fenólicos têm significativa contribuição na prevenção de diversas enfermidades, tais como enfermidades cardiovasculares, cancerígenas e doenças neurológicas (Sánchez-Moreno, 2002; Soares et al., 2008).

Em estudos realizados com folhas de mandioca há relatos de teores de compostos fenólicos de 43,37 mg g⁻¹ a 106,43 mg g⁻¹ (Corrêa et al., 2004; Wobeto et al., 2007). Wobeto et al. (2007), estudando plantas na idade de 12, 15 e 17 meses, verificaram que os níveis de polifenóis das folhas de mandioca aumentam com a maturidade da planta. A temperatura de secagem das folhas para a produção da farinha de folha de mandioca é outro fator que afeta os níveis de polifenóis, tendo sido observado que temperaturas superiores acarretam menores teores (Padmaja, 1989; Corrêa, 2000).

Carotenoides

Os carotenoides são substâncias coloridas, amplamente distribuídas na natureza, principalmente em plantas, as quais se encontram nos cloroplastos, sempre acompanhando as clorofilas (Ribeiro & Seravalli, 2004). Na maioria dos vegetais, os carotenoides encontram-se mascarados pela clorofila que se encontra em maior quantidade. Contudo, com o amadurecimento ou o envelhecimento dos vegetais, ocorre uma mudança de cor, causada pelo desaparecimento da clorofila e, durante esse período, os carotenoides aparecem com maior evidência.

Os carotenoides se dividem em carotenos e xantofilas. Os carotenos são constituídos por carbono e hidrogênio e as xantofilas, por hidrocarbonetos que têm grupos funcionais oxigenados. O β -caroteno e o licopeno são exemplos de carotenos, enquanto a luteína e a zeaxantina são xantofilas (Moraes & Colla, 2006).

Quimicamente, os carotenoides são substâncias lipossolúveis, poli-insaturadas, tetraterpênicas, formadas por oito unidades de isopreno. Na Figura 2 é mostrada a estrutura química dos carotenoides mais comuns.

Esses compostos são corantes naturais de frutas, verduras, raízes, aves, certos peixes, crustáceos e de alguns microrganismos. Esses pigmentos, que vão

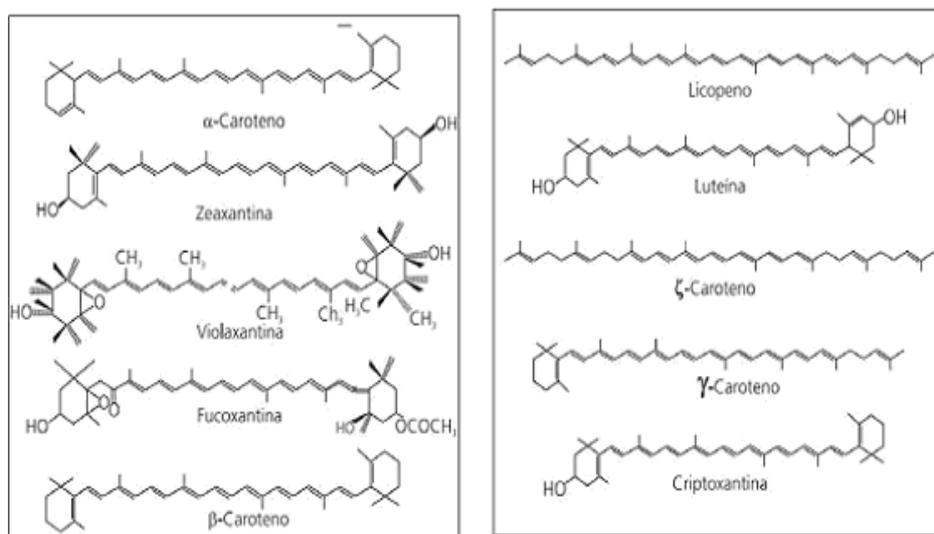


FIGURA 2 Estruturas químicas de carotenoides.
 Fonte: Ambrósio et al. (2006).

do amarelo ao vermelho, têm despertado a curiosidade dos cientistas desde o aparecimento da química orgânica, devido às suas relevantes funções e ações (Silva & Mercadante, 2002). Apenas plantas, bactérias, fungos e algas são capazes de sintetizar carotenoides, porém, muitos animais os incorporam por meio da dieta.

Efeitos benéficos de carotenoides contra cânceres, doenças do coração e degeneração macular foram reconhecidos e estimularam intensas investigações sobre o papel desses compostos como antioxidantes (Uenojo et al., 2007).

Os carotenoides agem *in vivo* no combate aos radicais livres, atuam como desativadores do oxigênio singlete e tripleto ou como sequestradores dos radicais peroxila. Eles são capazes de interromper as reações radicais livres que podem oxidar lipídios insaturados e proteger o DNA contra ataques de radicais livres. Com isso, eles têm a capacidade de reduzir o risco de doenças cardiovasculares e cânceres. A capacidade de exterminar radicais livres dos

2.2.3 Métodos para determinação de antioxidantes

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir a rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes na prevenção de doenças (Duarte-Almeida et al., 2006). Entretanto, não há um método padrão para a determinação da atividade antioxidante desses compostos naturalmente presentes em alimentos, pois, devido à complexidade da composição de cada tipo de alimento, tendo em vista que os antioxidantes não atuam separadamente, a possível interação entre eles pode fazer com que a determinação da atividade antioxidante individualmente seja menos efetiva do que o estado antioxidante total. Logo, são numerosas as metodologias para a determinação da capacidade antioxidante e elas podem estar sujeitas a interferências, sendo necessário o emprego de duas ou mais técnicas, pois nenhum método sozinho poderia refletir exatamente a capacidade antioxidante total de uma amostra (Huang et al., 2005).

Algumas dessas técnicas determinam a habilidade dos antioxidantes para sequestrar radicais livres gerados no meio; outras avaliam a eficiência dos antioxidantes em inibir a peroxidação lipídica por meio da quantificação dos produtos da reação, ou medindo a inibição da oxidação.

Dentre os métodos mais utilizados, podem-se citar aqueles que medem a habilidade de um antioxidante de reduzir um radical livre por doação de hidrogênio ou elétron, tais como o ensaio com ABTS (2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato, sal de diamônio). Esse método baseia-se na habilidade do antioxidante de sequestrar o radical ABTS e impedir a reação do radical com o substrato (Campos et al., 2008). O método utiliza, para testar a atividade antioxidante, o ensaio da capacidade antioxidante equivalente ao trolox (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano), um análogo da vitamina E, solúvel em água. É um método bastante utilizado para avaliar a capacidade sequestradora de radicais livres de muitos produtos naturais e se

caracteriza como um ensaio de descoloração aplicável a antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos, abrangendo os carotenoides e os flavonoides, dentre outras substâncias antioxidantes (Re et al., 1999).

Quanto à medida da capacidade de inibir a oxidação lipídica, o método da oxidação acoplada do β -caroteno/ácido linoleico é bastante empregado. O ensaio baseia-se na descoloração (oxidação) do β -caroteno, induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico. A perda da coloração alaranjada característica do sistema é monitorada espectrofotometricamente, de modo a quantificar o grau de inibição da oxidação pelo antioxidante (Huang et al., 2005). A presença de uma substância antioxidante na mistura protege o ácido linoleico da autooxidação, impedindo tal descoloração (Santos et al., 2003).

Devido à variedade de mecanismos e locais de atuação, é difícil definir qual o melhor método a ser empregado. Isso tem dificultado a comparação de resultados entre estudos, que só será legítima se levar em consideração o solvente utilizado para a extração dos compostos, a concentração do extrato e as condições do método analítico escolhido.

2.3 Ácidos graxos essenciais

Por definição, ácidos graxos são ácidos carboxílicos alifáticos obtidos da hidrólise das gorduras e óleos naturais. São, geralmente, formados por cadeias de hidrocarbonetos variando de 4 a 36 átomos de carbonos. Em alguns ácidos graxos, essa cadeia é não ramificada e completamente saturada; em outros, a cadeia contém uma ou mais ligações duplas, sendo denominados de monoinsaturados e poli-insaturados, respectivamente (Lehninger, 2006).

Diferenças de tamanho, grau e posição da insaturação em suas moléculas conferem aos ácidos graxos e aos compostos que os contêm diferentes propriedades físicas, químicas e nutricionais (Belitz & Grosch, 1997).

A composição em ácidos graxos dos alimentos é de grande importância, principalmente os poli-insaturados das famílias ômega-3 (ω -3), em que se destacam os ácidos graxos alfa-linolênico (C18:3), eicosapentanoico (C20:5), docosa-hexanoico (C22:6), e os ômega-6 (ω -6), linoleico (C18:2) e o ácido araquidônico (C20:4). Estes são necessários para manter sob condições normais as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. Eles também participam da transferência de oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, da síntese da hemoglobina e da divisão celular.

Os ácidos graxos das famílias ω -3 e ω -6 são denominados ácidos graxos essenciais, pelo fato de não serem sintetizados pelo organismo animal e humano, mas apenas pelas plantas, devendo, assim, serem consumidos na dieta.

As famílias ω -3 e ω -6 derivam dos ácidos alfa-linolênico e linoleico, respectivamente. A partir desses ácidos graxos essenciais, outros ácidos graxos de cadeias longas (cadeia superior a 18 carbonos) e ou acrescidos de insaturação podem ser sintetizados pelos homens e animais. O alongamento é feito pela enzima alongase e a dessaturação é feita pela enzima dessaturase, como mostrado na Figura 4.

Os ácidos graxos mostrados na Figura 4 não podem ser interconvertidos e, dessa forma, pertencem a duas famílias distintas (ω -3 e ω -6). Além disso, o seu metabolismo requer as mesmas enzimas, resultando em competição entre as duas famílias. Como resultado, o excesso de componentes de uma família de ácidos graxos pode interferir no metabolismo dos ácidos graxos da outra família, o que reduz a incorporação destes no tecido lipídico e altera seu efeito biológico.

A razão ω -6/ ω -3 na dieta das pessoas que viveram no período que antecedeu à industrialização era de 1:1 a 2:1, devido ao consumo abundante de vegetais e de alimentos de origem marinha, ricos em ácido graxos ω -3.

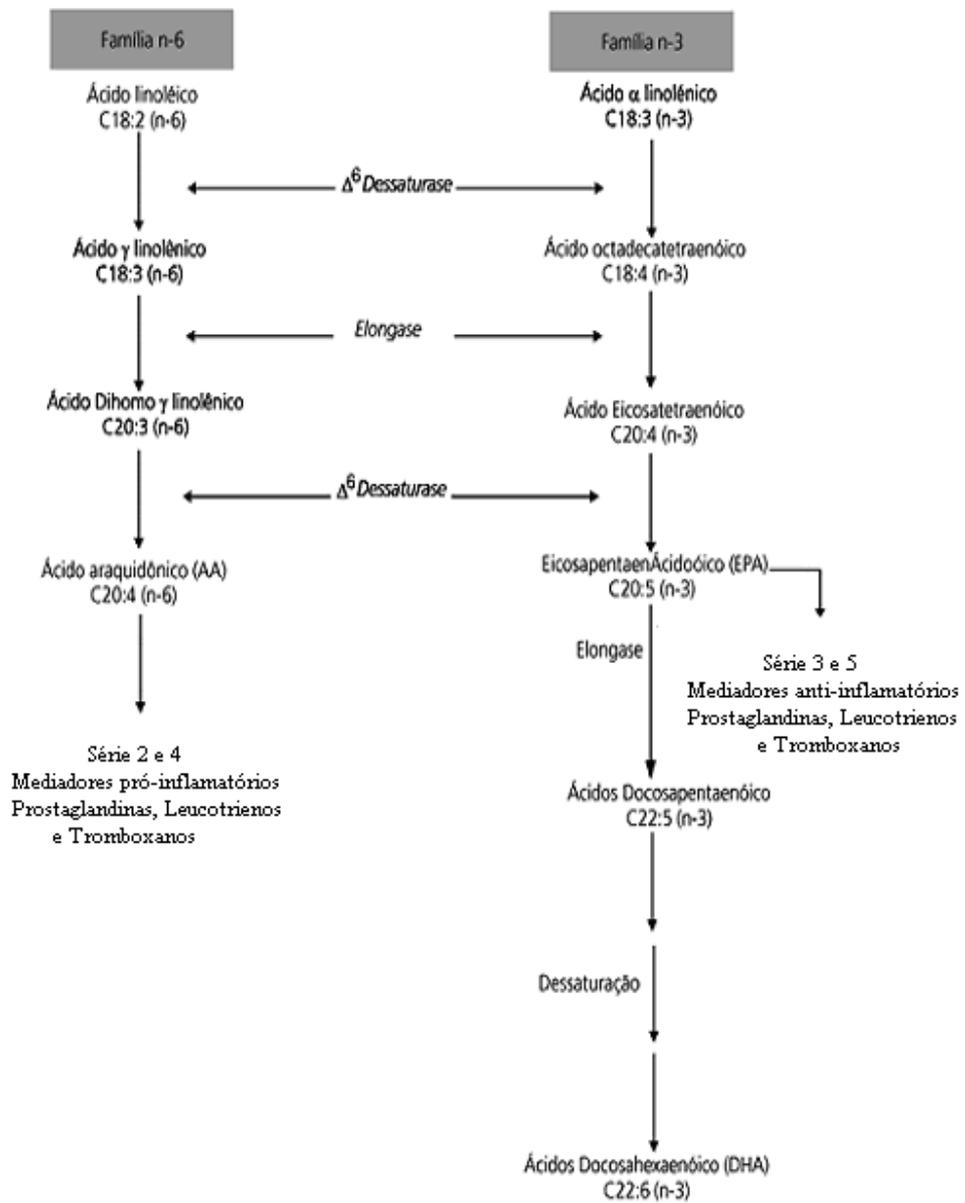


FIGURA 4 Metabolismo dos ácidos graxos das famílias ω -6 e ω -3.
Fonte: Iniss (2003).

Com a chegada da industrialização, essa razão foi fortemente atingida, passando para 10:1 a 20:1, devido, principalmente, à produção de óleos refinados oriundos de espécies oleaginosas com alto teor de ω -6 e à diminuição do consumo de frutas e verduras, o que resultou em dietas com quantidades inadequadas de ω -3.

A maior ingestão de ω -6 é considerada um problema, pois ele é convertido a ácido araquidônico, que é o precursor da síntese de substâncias conhecidas como eicosanoides, denominadas da série par, as quais abrangem prostaglandinas², leucotrienos⁴ e tromboxanos A, cujas ações, como importantes mediadores bioquímicos envolvidos na infecção, inflamação, lesão tecidual, modulação do sistema imune e agregação plaquetária, estão diretamente ligadas ao desenvolvimento, ao crescimento e a metástases tumorais (Wynder et al., 1997).

Já os ácidos graxos ω -3 são convertidos em ácidos eicosapentanoico e docosahexanoico, que são precursores dos mediadores químicos da série ímpar, denominados prostaglandinas³, leucotrienos⁵ e tromboxanos A (Wynder et al., 1997).

Os ácidos eicosapentanoico e docosa-hexanoico bloqueiam a reação da desaturase, o primeiro passo para a conversão dos ácidos graxos ω -6 a eicosanoides da série par, pois competem com estes, impedindo sua incorporação na membrana fosfolipídica, exercendo importante papel como inibidor da proliferação celular, dentre outros danos (Johanning, 1996).

Simopoulos (2002) descreve que o equilíbrio entre a ingestão balanceada da razão ω -6/ ω -3 de 1 a 5:1 é essencial, sendo essa razão considerada, atualmente, um índice do valor nutritivo dos alimentos.

Portanto, a busca de fontes alternativas e complementares de ácidos graxos poli-insaturados ω -3 tornou-se uma necessidade, a fim de estabelecer a razão entre o somatório ω -6/ ω -3 ingeridos.

2.3.1 Fontes

Devido ao fato de a disponibilidade dos ácidos graxos ω -3 e ω -6 depender do fornecimento alimentar, é importante conhecer, dentre os alimentos, aqueles que podem ser fonte, mais ou menos valiosa, desses ácidos graxos essenciais.

Os ácidos linoleico e alfa-linolênico são encontrados tanto em espécies vegetais como animais empregadas na alimentação humana. Nas hortaliças, o ácido alfa-linolênico é encontrado em maior quantidade em espécies com folhas de coloração verde-escura, por ser um importante componente da fração dos lipídios polares contidos nos cloroplastos (Simopoulos, 2002).

Fontes usuais de ácido graxo ω -3 consistem de sementes de linhaça, óleos de origem vegetais, como os de linhaça, canola, gérmen de trigo e soja. Já o ω -6 é encontrado em açafrão, milho, soja, óleo de girassol e gordura animal.

Os ácidos graxos ω -3 constituem mais de 80% dos ácidos graxos existentes nas plantas de folhas verdes. Por essa razão, diversos estudos têm sido realizados para a determinação do conteúdo de ω -3 nas plantas. Não há, na literatura, informações sobre a composição de ácidos graxos das folhas de mandioca.

2.3.2 Benefícios à saúde

A ingestão de ácidos graxos ω -3 provoca alterações estruturais e funcionais na membrana fosfolipídica. Com isso, tem-se um aumento da fluidez da membrana celular, o que permite maior mobilidade das proteínas e favorece maior troca de sinais de tradução, interação hormônio-receptor e transporte de substratos entre os meios intra e extracelular.

Há evidências a favor de que os ácidos graxos ω -3 e ω -6 sejam protetores contra o envelhecimento. São os precursores de um conjunto de substâncias com atividades fisiológicas e farmacológicas denominadas

eicosanoides, que abrangem as tromboxanas, prostaglandinas (que possuem efeitos hipotensores), prostaciclina (inibe a agregação plaquetária e aumenta o HDL) e leucotrienos. O equilíbrio entre a produção de prostaglandinas e tromboxanas inibe o aparecimento de doenças cardiovasculares (Turatti et al., 2002).

O ω -3 é essencial para o funcionamento de dois órgãos importantíssimos: o cérebro e o coração. No coração, ele diminui o risco de ataques cardíacos, pois evita que as gorduras ruins (hidrogenadas e as saturadas) se fixem nos vasos sanguíneos, fazendo, assim, com que eles se entupam, causando os ataques cardiovasculares. Já o cérebro é constituído de 20% de gordura e, então, é importante o consumo de ω -3 para deixá-lo ativo. Em sua deficiência, o cérebro funciona lentamente, causando a falta de memória.

Estudos experimentais têm demonstrado que um aumento no consumo dos ácidos graxos ω -3 em uma dieta reduz os níveis de triacilgliceróis no sangue, as doenças cardíacas, o diabetes e inibem a formação de cânceres (Maillard et al., 2002; Simopoulos, 2002). Estudos também comprovam que o consumo desses ácidos graxos reduz fatores bioquímicos associados à artrite, atuam diretamente no desenvolvimento humano e possuem ações antitrombóticas e anti-inflamatórias exercidas por meio do metabolismo dos eicosanoides (Simopoulos, 2002; Moraes & Colla, 2006).

2.4 Clorofila

A clorofila é a designação de um grupo de pigmentos fotossintéticos presente nos cloroplastos das plantas (em sentido geral, incluindo também as algas, cianofíceas e diversos protistas anteriormente considerados "algas" ou "plantas", como as algas vermelhas ou castanhas).

A intensa cor verde da clorofila se deve às suas fortes absorções das regiões azuis e vermelhas do espectro eletromagnético e, por causa dessas

absorções, a luz que ela reflete e transmite parece verde. Esse pigmento é capaz de canalizar a energia da luz solar em energia química, por meio do processo de fotossíntese. Neste processo, a energia absorvida pela clorofila transforma dióxido de carbono e água em carboidratos e oxigênio.

Devido à sua tendência de mascarar a presença das cores de outras substâncias, como, por exemplo, os carotenoides (pigmento vermelho ou amarelo encontrado em plantas e animais), a cor predominante nas plantas é o verde.

A clorofila relaciona-se diretamente com a atividade fotossintética nas plantas. Dessa maneira, o estado nutricional das plantas está relacionado com a qualidade e a quantidade da clorofila. Várias variáveis, como conteúdo de proteínas, macronutrientes e micronutrientes presentes nas folhas, podem estar relacionadas com o conteúdo de clorofila presente no tecido foliar.

Na literatura, tem-se que a concentração de nitrogênio presente em plantas de milhos e a concentração de clorofila estão positivamente correlacionadas (Castelli et al., 1996; Argenta et al., 2001). Em folhas de vegetais, os níveis de clorofila e os de antioxidantes podem estar diretamente correlacionados, sendo necessários estudos para a confirmação dessa correlação.

Para a avaliação dos níveis de clorofila em plantas, tem sido utilizado o medidor Minolta SPAD-502, que tem sido investigado como instrumento para rápido diagnóstico do estado nutricional de diversas culturas em relação ao conteúdo de N, agregando vantagens como simplicidade no uso, além de possibilitar uma avaliação não-destrutiva do tecido foliar (Argenta et al., 2001).

Os métodos tradicionais utilizados para determinar a quantidade de clorofila na folha requerem destruição de amostras de tecido e muito trabalho nos processos de extração e quantificação. O desenvolvimento do medidor portátil de clorofila, que permite medições instantâneas do valor correspondente

ao seu teor na folha sem destruí-la, constitui uma alternativa para estimar o teor relativo desse pigmento (Dwyer et al., 1991; Argenta et al., 2001).

As leituras efetuadas pelo medidor portátil de clorofila correspondem ao teor relativo de clorofila presente na folha da planta. Os valores são calculados pelo equipamento com base na quantidade de luz transmitida pela folha, em dois comprimentos de ondas, com diferentes absorbâncias da clorofila (Minolta, 1989). As regiões de picos de absorbância da clorofila são o azul e o vermelho. As de baixa absorbância situam-se na região do verde e as de absorbância extremamente baixa, na região do infravermelho (Hendry, 1993). Em função disso, os comprimentos de ondas escolhidos para medição do teor de clorofila, ou do índice de esverdeamento da folha, situam-se na faixa do vermelho em que a absorbância pela clorofila é alta e não é afetada pelos carotenoides, e na do infravermelho, em que a absorbância é extremamente baixa.

O medidor de clorofila é descrito possuindo dois diodos que emitem luz a 650 nm (vermelho) e a 940 nm (infravermelho). A luz em 650 nm situa-se próxima dos dois comprimentos primários de ondas associados à atividade da clorofila (645 e 663 nm). O comprimento de onda de 940 nm serve como referência interna para compensar diferenças na espessura ou no conteúdo de água da folha ou que sejam devido a outros fatores (Waskom et al., 1996). A luz que passa através da amostra da folha atinge um receptor (fotodiodo de silicone) que converte a luz transmitida em sinais elétricos analógicos. Por meio do conversor A/D, esses sinais analógicos são amplificados e convertidos em sinais digitais, sendo usados por um microprocessador para calcular os valores SPAD ("soil plant analysis development"), que são mostrados num visor. Os valores obtidos são proporcionais ao teor de clorofila presente na folha (Minolta, 1989).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Departamento de Química (Dq) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.1 Colheita, secagem das folhas e preparo da farinha de folhas de mandioca

Folhas maduras de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), de quatro cultivares, ‘Mocotó’, ‘Ufla’, ‘Pão da China’ e ‘Ouro do Vale’, obtidas no Departamento de Agricultura da UFLA, foram colhidas pela manhã, em três idades da planta (TIP), nos meses de dezembro (10 meses), fevereiro (12 meses) e abril (14 meses), em três repetições, e transportadas para o Laboratório de Bioquímica, no DQI/UFLA. Foram selecionadas folhas intactas, livres de doenças e pragas, lavadas em água corrente e água destilada e, em seguida, colocadas em estufas com circulação de ar para secagem, por 48 horas, à temperatura de 30°C a 35°C. Após secagem, foram moídas (sem os pecíolos) em moinho tipo Willy e as farinhas de folhas de mandioca (FFM) foram armazenadas em frascos hermeticamente fechados, em geladeira, até as análises.

3.2 Determinação de umidade

A dosagem de umidade foi feita em triplicata, nas folhas frescas e na FFM, segundo metodologia da Association of Official Analytical Chemists - AOAC (2005), que consiste na perda de água por desidratação, em temperaturas de 100° a 105°C.

3.3 Determinação de substâncias antioxidantes

3.3.1 Vitamina C

a) Preparação das amostras

A extração para análise cromatográfica da vitamina C foi feita com 0,5 g de amostra em 50 mL de ácido oxálico e 0,1 g de terra de infusórios, sob agitação, por 15 minutos, em agitador horizontal e, posteriormente, filtrada em papel Whatman nº 40 (Strohecker & Henningg, 1967). Os extratos foram filtrados em membrana Millipore de 0,22 µm, antes de serem levados ao cromatógrafo.

b) Análise cromatográfica

Foi utilizado um cromatógrafo líquido da marca Shimadzu LC 200 A, detector UV-VIS, sendo os cromatogramas a 254 nm, bomba quaternária, desgaseificador e injeção automática. Foram utilizadas coluna C₁₈ Nucleosil (250 x 4,6 mm x 5 µm) e pré-coluna C₁₈ (15 x 3,2 mm x 7,5 µm). Como fase móvel, foi utilizado um tampão de pH 6,7, contendo acetato de sódio 0,04 mol L⁻¹, EDTA 0,05 mol L⁻¹, fosfato de tributilamônio de modo isocrático, com fluxo de 0,6 mL min⁻¹, com tempo de corrida de 15 minutos para cada amostra (Silva et al., 2009). Foi feita uma curva analítica com 12 pontos, em triplicata, com ácido ascórbico (8x10⁻⁶ a 3x10⁻³ mol L⁻¹), para comparação dos tempos de retenção e quantificação da vitamina C, nos extratos das FFM das quatro cultivares.

Todos os reagentes utilizados foram de grau HPLC e água Milli-Q.

3.3.2 Polifenóis

A extração dos compostos fenólicos da FFM foi realizada com metanol 50%, em refluxo por três vezes consecutivas, a 80°C e os extratos reunidos, evaporados até 25 mL e submetidos à dosagem de compostos fenólicos,

utilizando-se o reagente de Folin-Denis, o qual é reduzido, pelos fenóis, a um complexo de coloração azul em solução alcalina, que é medido a 760 nm (AOAC, 2005). Os resultados foram expressos em mg de ácido tânico g⁻¹ MS.

3.3.3 β-caroteno

Para a determinação do β-caroteno, as FFM foram homogeneizadas com uma mistura de acetona e hexano (2:3) e levadas para leitura de absorbância em espectrofotômetro em quatro comprimentos de onda: (453, 505, 645 e 663 nm). Para os cálculos das concentrações de β-caroteno, utilizou-se a seguinte equação:

$$\beta\text{-caroteno (mg 100 mL}^{-1}\text{)} = 0,216 A_{663} - 1,22 A_{645} - 0,304 A_{505} + 0,452 A_{453}.$$

Os resultados foram expressos em mg 100 g⁻¹ de MS (Nagata & Yamashita, 1992).

3.4 Avaliação da atividade antioxidante

3.4.1 Preparação dos extratos

Diferentes solventes foram testados, a fim de escolher aquele que proporcionasse maior atividade antioxidante (AA). Para os testes, foram utilizados os extratos das FFM da cultivar Ufla, na idade de 12 meses. Todas as extrações foram realizadas em triplicata, ao abrigo da luz e, em seguida, submetidas ao processo de detecção da atividade antioxidante, pelo método ABTS.

As FFM foram mantidas sob maceração em diferentes solventes na proporção 1:40 (p/v), por 30 minutos e, em seguida, centrifugadas a 2.500 g, durante 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e o precipitado foi novamente submetido ao processo de extração descrito acima e os sobrenadantes reunidos. Foram testados nove solventes extratores: 1) etanol 50% (1^a extração)/acetona70% (reextração), 2) metanol 50% (1^a extração)/acetona70%

(reextração), 3) acetona:hexano 3:2 (1^a extração)/etanol70% (reextração), 4) metanol 50%, 5) etanol 50%, 6) metanol p.a., 7) etanol p.a., 8) acetato de etila e 9) acetona.

Escolhido o solvente de extração que acarretou maior AA (subitem 4.2, Resultados e Discussão), a AA foi avaliada pelos métodos descritos a seguir, nas três idades da planta.

3.4.2 Método ABTS

A metodologia utilizada foi a desenvolvida por Re et al. (1999), com modificações feitas por Rufino et al. (2007). Os extratos das FFM foram obtidos de acordo com a metodologia descrita no subitem 3.4.1, utilizando etanol 50%/acetona 70% como solvente extrator. Nos extratos obtidos, foram feitas quatro diluições diferentes para os ensaios e posterior construção de curva analítica.

O radical ABTS[•] forma-se pela adição de 5 mL de solução estoque de ABTS 7 mmol L⁻¹ com 88 µL de solução de persulfato de potássio 140 mmol L⁻¹ e mantidos no escuro por 16 horas. O radical formado é diluído em etanol até obter uma absorbância de 0,70±0,05, devendo ser utilizada apenas no dia da análise. De tempo em tempos, a absorbância do radical diluído deve ser medida para correção, a qual cai rapidamente, evitando-se, assim, erro na determinação da AA.

Em ambiente escuro, 3,0 mL do radical ABTS[•] foram colocados em um tubo de ensaio com uma alíquota de 30 µL de cada diluição dos extratos, homogeneizados em agitador e a leitura (734 nm) feita após 6 minutos de reação, utilizando-se etanol na calibração do espectrofotômetro.

Foram feitas curvas analíticas de seis pontos com trolox (100 a 2.000 µmol L⁻¹) e com ácido ascórbico (10 a 200 mg mL⁻¹), além de teste para comparação com BHT, antioxidante sintético e com rutina e quercetina, que são

flavonoides com atividade antioxidante comprovada. Os cálculos foram feitos a partir das absorvâncias obtidas das diferentes diluições (quatro concentrações) dos extratos, plotando um gráfico para cada amostra, com absorvância no eixo Y e a concentração correspondente a cada diluição (mg L^{-1}) no eixo do X, determinando-se a equação da reta. Substitui-se, então, nessa equação, a absorvância correspondente a $1.000 \mu\text{mol L}^{-1}$ do padrão trolox e a 1.000mg g^{-1} do padrão de ácido ascórbico, encontrando-se assim (x) a concentração da amostra (mg L^{-1}) equivalente a $1.000 \mu\text{mol de trolox L}^{-1}$ e a 1000mg g^{-1} de ácido ascórbico. O resultado final foi calculado pela divisão de $1.000 (\mu\text{mol L}^{-1})$ pelo valor de x (g) e multiplicado por 1 g, que foi expresso em $\mu\text{mol L}^{-1} \text{g}^{-1}$.

3.4.3 Método β -caroteno/ácido linoleico

A metodologia utilizada foi a desenvolvida por Marco (1968), modificada por Rufino et al. (2007). Os extratos das FFM foram obtidos como já descrito no método ABTS.

Para o preparo da solução sistema β -caroteno/ácido linoleico, utilizaram-se $50 \mu\text{L}$ de β -caroteno diluído em clorofórmio (20g L^{-1}), aos quais adicionaram-se $40 \mu\text{L}$ de ácido linoleico, $530 \mu\text{L}$ de tween 20 (emulsificante) e, para solubilizar, 1mL de clorofórmio. Em balão recoberto com alumínio para proteção contra luz, o clorofórmio foi evaporado em rota-evaporador e 100mL de água saturada de oxigênio (água destilada tratada com oxigênio por 30 minutos) foram acrescentados e agitados até que a solução sistema apresentasse coloração amarelo-alaranjada. Em tubos de ensaio, $5,0 \text{mL}$ dessa solução sistema foram adicionados a $0,4 \text{mL}$ de cada diluição da amostra empregada para o teste. Foram feitos tubos controle contendo 5mL da solução sistema com $0,4 \text{mL}$ de BHT, rutina e quercetina, juntamente com as amostras. Após homogeneização, foram feitas leituras em espectrofotômetro a 470nm , utilizando-se água para calibração do espectrofotômetro, sendo essa a leitura do

tempo zero (inicial). Os tubos foram colocados em banho-maria, a 40°C e leituras sequenciais foram feitas a cada 30 minutos, por um período total de 2 horas.

Foi avaliada a percentagem de inibição da oxidação, em que a redução da absorbância do sistema sem antioxidante (Equação 1) é considerada como 100 % de oxidação.

$$\text{Redução da absorbância} = \text{Abs inicial} - \text{Abs final} \quad (\text{Equação 1})$$

Correlacionou-se a queda da leitura de absorbância das amostras com o sistema e estabeleceu-se a percentagem de oxidação (Equação 2). A percentagem de proteção contra a oxidação lipídica é dada subtraindo-se a percentagem de oxidação de cada amostra de 100 (Equação 3).

$$\% \text{ Oxidação} = \frac{[(\text{Redução Abs})_{\text{amostra}} \times 100]}{(\text{Redução Abs})_{\text{sistema}}} \quad (\text{Equação 2})$$

$$\% \text{ Proteção} = 100 - (\% \text{ de Oxidação}) \quad (\text{Equação 3})$$

A ação antioxidante de cada amostra foi verificada, comparando-se com a AA das substâncias utilizadas como controle.

3.5 Determinação de clorofila

A determinação de clorofila foi realizada com o equipamento Minolta SPAD-502, diretamente na folha ainda na planta, momentos antes de fazer a coleta de acordo com metodologia descrita por Argenta et al. (2001). Cada leitura do SPAD equivale ao resultado obtido da medida feita em seis folhas, sendo realizadas cinco medidas em cada folha, que foram realizadas em pontos

situados na metade a dois terços do comprimento da folha amostrada. Os resultados foram expressos em unidade SPAD, que equivale à média de trinta leituras.

3.6 Perfil de ácidos graxos

3.6.1 Extração de lipídios

Os lipídeos foram extraídos de acordo com a metodologia de Blig & Dyer (1959). A extração foi feita com 0,5 g de FFM em 1,5 mL de clorofórmio, 2,0 mL de metanol e 1,2 mL de água destilada. A solução resultante foi agitada e, posteriormente, mantida sob aquecimento por 15 minutos. Após esse procedimento, a solução foi centrifugada a 2.500 g, por 15 minutos. As fases foram separadas e a parte metanólica foi descartada e a clorofórmica acondicionada para evaporação do solvente, utilizando nitrogênio gasoso.

3.6.2 Esterificação

Após a evaporação do solvente, foi realizada a esterificação da amostra, utilizando-se a metodologia de Joseph & Ackman (1992).

Foram adicionados 2 mL de NaOH 0,5 mol L⁻¹ em metanol no resíduo obtido após evaporação. O mesmo foi levado a banho em ebulição por 5 minutos e adicionados 2,5 mL de reagente esterificante. Foi novamente levado a banho fervente por 5 minutos e, depois, resfriado. Após resfriado, adicionaram-se 2,0 mL de solução de NaCl saturada e 2,5 mL de hexano. Depois de agitada, a amostra foi levada à centrifugação, a 2.500 g, por 10 minutos. As fases foram separadas, sendo a parte inferior descartada e a superior acondicionada para evaporação do solvente, utilizando nitrogênio gasoso. Os resíduos obtidos foram acondicionados sob refrigeração até a realização das análises.

3.6.3 Caracterização dos ésteres de ácidos graxos

A composição dos ácidos graxos foi determinada por cromatografia em fase gasosa, sendo utilizado o cromatógrafo GC-2010 (Shimadzu), equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida com 100 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, contendo polietilenoglicol como fase estacionária líquida. O padrão utilizado foi uma mistura de 37 ésteres metílicos (SupelcoTM 37 Component FAME Mix), de C:4 a C22:6, com pureza de 99,9%.

Foram utilizados os seguintes parâmetros operacionais: modo de injeção “split”, com razão de divisão de 1:100; volume injetado de 1 µL; temperatura do detector de 260 °C; temperatura do injetor de 260 °C; programa de temperatura: 4 °C/minuto até atingir 140°C, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos, mantendo a rampa de aquecimento de 4°C/minuto até atingir 240°C, permanecendo por 30 minutos nesta temperatura.

Para a realização da cromatografia em fase gasosa, foi necessário redissolver as amostras em 0,50 mL de hexano.

A identificação dos picos foi realizada por método comparativo com os tempos de retenção do padrão de ésteres de ácidos graxos e os resultados foram feitos por integração das áreas dos picos e expressos em porcentagem de área.

3.7 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 3, sendo quatro cultivares de mandioca, três idades da planta, com três repetições. Para análise da escolha do solvente, o experimento foi conduzido em esquema com nove solventes, com três repetições. A análise estatística foi feita empregando-se o programa Sisvar (Ferreira, 2003), sendo as médias comparadas pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Entre as substâncias antioxidantes, testes antioxidantes e clorofila, foi realizada análise de correlação de Pearson, empregando-se o programa Statistical Analysis System - SAS (1999), utilizando como variáveis as quatro cultivares e as TIP em três repetições, e sua precisão avaliada pelo coeficiente de correlação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância, para todos os parâmetros analisados (Tabelas 1, 2 e 3, Anexo) nas farinhas de folhas de mandioca (FFM), apresentou diferenças significativas, a 1% ou a 5% de probabilidade, pelo teste de F, exceto para a variável umidade da folha e da farinha que, na interação cultivar x idade para ambas, e na fonte de variação cultivar para umidade da farinha, não foram estatisticamente diferentes. Diante desse resultado, fez-se o desdobramento da cultivar dentro de cada idade, e em seguida foi feito o desdobramento da idade dentro de cada cultivar.

Os teores médios de umidade (em g 100 g⁻¹) para as folhas e para as FFM, de quatro cultivares, em TIP, estão apresentados na Tabela 1. As variações dos teores em g 100 g⁻¹ da umidade das folhas e FFM foram de 63,85 a 75,45 e 5,33 a 9,67, respectivamente. Observou-se um alto teor de umidade para as folhas de mandioca. Como ocorreram diferenças significativas entre as cultivares e idades da planta, foram realizadas conversões para matéria seca, nos demais parâmetros analisados, a fim de compará-los nos tratamentos utilizados.

4.1 Substâncias antioxidantes

4.1.1 Vitamina C

Nas Figuras 5 e 6 são mostrados os cromatogramas e o respectivo tempo de retenção do padrão de ácido ascórbico e de uma amostra da FFM da cultivar Mocotó. Observa-se que o pico de retenção da amostra foi praticamente o mesmo do padrão.

Na Tabela 2 constam os resultados da análise cromatográfica para quantificação de vitamina C das FFM de quatro cultivares, em TIP. Observa-se que os teores de vitamina C aumentaram com a maturidade do vegetal, para

TABELA 1 Teores médios de umidade das folhas e das farinhas de folhas de mandioca de quatro cultivares, em TIP¹.

Cultivar	Folhas (g 100g ⁻¹)			FFM (g 100g ⁻¹)		
	10 meses	12 meses	14 meses	10 meses	12 meses	14 meses
Mocotó	75,45 ± 1,07 a A	72,08 ± 1,31 a A	69,48 ± 2,17 a B	9,67 ± 0,35 a A	8,75 ± 3,76 a B	5,95 ± 0,22 a C
Ufla	71,51 ± 0,48 b A	70,97 ± 2,83 b A	63,85 ± 0,42 b B	8,63 ± 0,52 a A	6,66 ± 0,60 a B	5,94 ± 0,16 a C
Pão da China	71,75 ± 0,53 a A	72,04 ± 0,75 a A	69,07 ± 2,56 a B	8,99 ± 0,40 a A	6,84 ± 0,41 a B	5,33 ± 0,09 a C
Ouro do Vale	74,18 ± 0,83 a A	73,22 ± 2,67 a A	68,86 ± 0,66 a B	8,53 ± 0,51 a A	6,60 ± 0,51 a B	5,52 ± 0,47 a C

Os dados são a média de três repetições±desvio padrão. Letras minúsculas nas colunas comparam entre as cultivares e maiúsculas nas linhas comparam entre as idades. Letras iguais não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade; ¹TIP = três idades da planta.

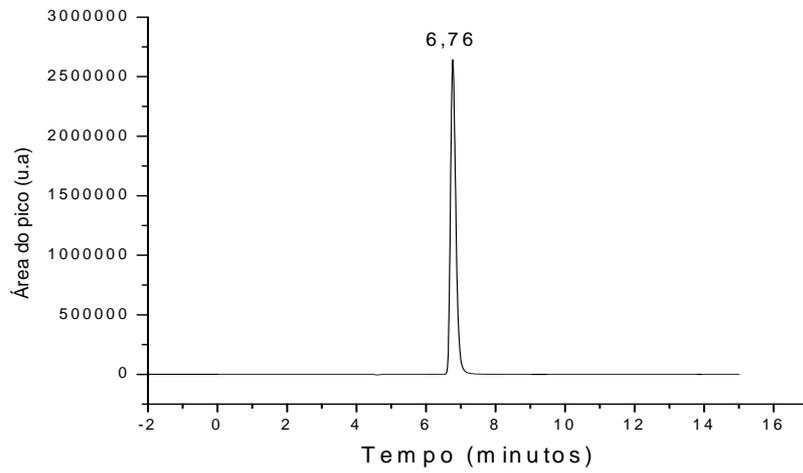


FIGURA 5 Cromatograma do padrão de ácido ascórbico na concentração $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. O pico a 6,76 minutos refere-se ao ácido ascórbico.

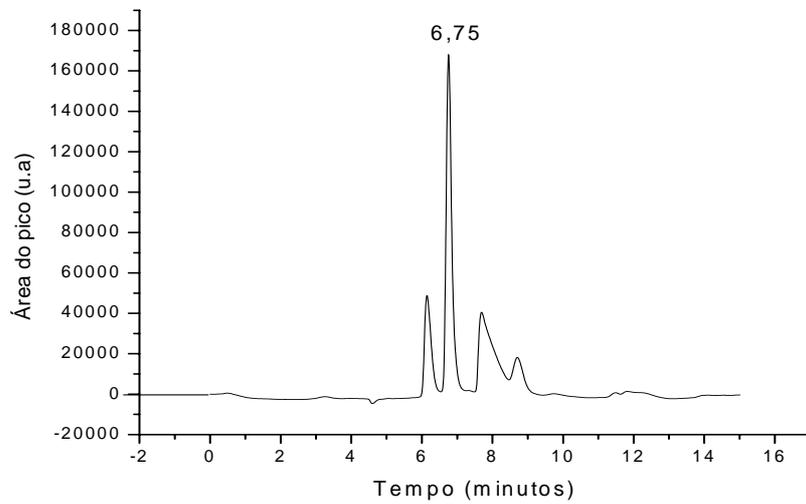


FIGURA 6 Cromatograma de vitamina C da farinha de folha de mandioca da cultivar Mocotó, aos 14 meses de idade. O pico a 6,75 minutos corresponde à vitamina C.

TABELA 2 Teores médios de vitamina C (mg 100 g⁻¹ MS) por CLAE¹, das farinhas de folhas de mandioca de quatro cultivares, em TIP².

Cultivar	10 meses	12 meses	14 meses
Mocotó	281,53 ± 14,84 a B	294,77 ± 5,47 a B	521,19 ± 31,60 b A
Ufla	149,29 ± 3,84 d C	249,68 ± 1,32 c B	474,05 ± 30,07 c A
Pão da China	244,74 ± 8,58 b C	276,97 ± 11,50 b B	568,64 ± 7,71 a A
Ouro do Vale	171,44 ± 2,58 c C	310,88 ± 26,16 a B	463,69 ± 2,40 c A

Os dados são a média de três repetições±desvio padrão. Letras minúsculas nas colunas comparam entre as cultivares e maiúsculas nas linhas comparam entre as idades. Letras iguais não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade; ¹CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência; ²TIP = três idades da planta.

todas as cultivares. Entre as cultivares, a ‘Pão da China’ (14 meses) apresentou os maiores teores de vitamina C.

Carvalho et al. (1989) encontraram, em folhas de mandioca secas em estufa a 45°C, aumento nos teores de vitamina C até os 14 meses de idade. Estes autores também constataram que há um declínio nos teores de vitamina C entre 14 e 18 meses de idade (fase de acúmulo de amido). Já Wobeto et al. (2006), analisando cinco cultivares de mandioca, em TIP, também observaram um aumento nos teores de vitamina C com a maturidade do vegetal. Porém, seus resultados foram contraditórios aos de Carvalho et al. (1989), pois os teores de vitamina C continuaram aumentando entre 14 a 17 meses de idade.

Maiores teores de vitamina C foram encontrados neste trabalho, quando comparados aos de Wobeto et al. (2006) que, analisando as cultivares Mocotó e Ouro do Vale aos 12 meses de idade, constataram níveis de 55,72 e 64,12 mg 100 g⁻¹ para Mocotó e Ouro do Vale, respectivamente. Já no presente trabalho, encontraram-se, na mesma idade, teores de 294,77 e 310,88 mg 100 g⁻¹, para Mocotó e Ouro do Vale, respectivamente. Essas diferenças podem ter ocorrido em decorrência do método de análise empregado que, neste trabalho, foi o

método cromatográfico. Já Wobeto et al. (2006) utilizaram o método colorimétrico ou outros fatores, como adubação e condições climáticas, entre outros.

Quando comparadas a outros alimentos não convencionais, as FFM aos 14 meses apresentaram teores médios de vitamina C superiores aos encontrados em, 100 g MS, de folhas de cenoura (203,70 mg) (Pereira et al., 2003), de beterraba (72,42 mg) e de amendoim (293,33 mg) (Sartorelli, 1998), e em casca de jabuticaba (246,28 mg) (Lima, 2009).

Já em relação às frutas, esses teores também são superiores aos encontrados em polpa de jabuticaba (163,38 mg 100 g⁻¹ MS) (Lima, 2009) e em 100 g de matéria fresca (MF) da laranja (66 mg) e mamão (149 mg) (Hernandez et al., 2006). Contudo, são inferiores ao de frutos considerados ricos em vitamina C, como a acerola, que contém 1.500 mg 100 g⁻¹ de MF.

A ingestão diária recomendada de vitamina C é de 60 mg. A ingestão de 100 g de FFM de qualquer cultivar em qualquer idade da planta representa mais de 100% das necessidades diárias, porcentagem bastante satisfatória. As cultivares mostram-se, assim, boas fontes de vitamina C com potencial para uso, podendo ser empregadas para o enriquecimento de alimentos e cosméticos, e contribuir para o potencial antioxidante das FFM.

4.1.2 Polifenóis

Na Tabela 3 estão apresentados os teores médios dos polifenóis, das FFM de quatro cultivares, em TIP. Verifica-se que, em geral, os teores de polifenóis aumentaram com a maturidade do vegetal. As cultivares Pão da China e Mocotó, aos 14 meses de idade, não diferiram significativamente entre si e apresentaram os maiores teores de polifenóis. Já a cultivar Ouro do Vale, nas três idades analisadas, foi a que apresentou teores significativamente mais baixos de polifenóis.

TABELA 3 Teores médios de polifenóis (mg g⁻¹ MS) das farinhas de folhas de mandioca de quatro cultivares, em TIP¹.

Cultivar	10 meses	12 meses	14 meses
Mocotó	29,48 ± 0,56 a C	52,12 ± 1,13 b B	55,06 ± 0,30 a A
Ufla	29,14 ± 0,19 a C	54,53 ± 1,58 a A	50,14 ± 0,66 b B
Pão da China	29,18 ± 0,30 a B	55,57 ± 1,54 a A	56,21 ± 1,39 a A
Ouro do Vale	16,46 ± 0,16 b C	31,73 ± 0,86 c B	36,26 ± 0,67 c A

Os dados são a média de três repetições±desvio padrão. Letras minúsculas nas colunas comparam entre as cultivares e maiúsculas nas linhas comparam entre as idades. Letras iguais não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade; ¹TIP = três idades da planta.

Wobeto et al. (2007), estudando a FFM de cinco cultivares, em TIP, também observaram um aumento nos teores de polifenóis com a maturidade da planta. Analisando diferentes formas de secagem de folhas de mandioca (secas ao sol, à sombra e em estufa a 30°C e a 4°C), Corrêa (2000) observou que, para a cultivar Baiana, os maiores teores de polifenóis foram obtidos quando se utilizou o processo em que as folhas foram secas em bancadas de laboratório e, em seguida, colocadas ao sol. Consequentemente, os diferentes teores desta substância podem ser atribuídos, provavelmente, à idade da planta, às cultivares e, também, à forma de secagem das folhas.

Os teores de polifenóis encontrados neste trabalho, independente da idade e da cultivar, são maiores que os encontrados em mg 100 g⁻¹ de MF de algumas hortaliças, como brócolis (68,0), cebola (113,12) e repolho (66,9) e de algumas frutas, como abacaxi (85,1), banana (215,7), laranja (114,6), mamão (15,6) e manga (110,5) (Faller & Fialho, 2009). São superiores aos de Melo et al. (2008a), que constataram, em polpas de doze frutas congeladas, teores de polifenóis entre 0,06 (maracujá) a 7,9 (acerola) mg g⁻¹ MF. Encontra-se dentro da faixa dos relatados por Asolini et al. (2006) que, analisando o conteúdo

fenólico de plantas usadas como chás, encontraram teores entre 15 (erva-mate) a 56 (capim-limão) mg g⁻¹ MS.

O consumo de antioxidantes naturais, como os polifenóis presentes na maioria das plantas, tem sido associado a uma menor incidência de doenças causadas pelos radicais livres. Conseqüentemente, os teores desta substância encontrados nestas FFM podem contribuir para a capacidade antioxidante desta.

4.1.3 β -caroteno

Na Tabela 4 constam os teores médios de β -caroteno, das FFM de quatro cultivares, em TIP. Nota-se que há um aumento nos teores de β -caroteno até a idade de 12 meses e que esses teores não diferiram significativamente dos de 14 meses, exceto para as cultivares Ouro do Vale e Pão da China, que apresentaram redução nos teores de β -caroteno entre as idades 12 e 14 meses.

TABELA 4 Teores médios de β -caroteno (mg 100 g⁻¹ MS) das farinhas de folhas mandioca de quatro cultivares, em TIP¹.

Cultivar	10 meses	12 meses	14 meses
Mocotó	50,20 ± 1,60 b B	70,31 ± 0,24 a A	65,92 ± 2,08 a A
Ufla	53,08 ± 3,21 b B	70,07 ± 3,59 a A	65,60 ± 1,39 a A
Pão da China	65,90 ± 0,83 a B	72,72 ± 1,09 a A	61,63 ± 1,38 a B
Ouro do Vale	51,82 ± 4,59 b B	68,79 ± 4,74 a A	51,44 ± 6,67 b B

Os dados são a média de três repetições ± desvio padrão. Letras minúsculas nas colunas comparam entre as cultivares e maiúsculas nas linhas comparam entre as idades. Letras iguais não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade;¹TIP = três idades da planta.

Wobeto et al. (2006), analisando cinco cultivares de mandioca, em TIP, também encontraram, na idade de 12 meses, maiores teores de β -caroteno. Porém, estes autores constataram declínio nestes teores com a maturidade da planta. Corrêa (2000), analisando diferentes formas de secagem de folhas de

mandioca (secas ao sol, à sombra e em estufa a 30°C e 40°C), observou que estas formas de secagem acarretam diferenças significativas nos teores, em mg 100 g⁻¹ MS, de β-caroteno na FFM da cultivar Baiana. Os maiores teores são encontrados pelo processo de secagem em estufa a 30°C (84,83) e os menores secando as folhas à sombra (64,88). Conseqüentemente, os diferentes teores desta substância podem ser atribuídos, provavelmente, à idade da planta, às cultivares e também à forma de secagem das folhas.

Os teores médios de β-caroteno nas FFM estudadas, independente da cultivar e idade da planta, variaram de 50,00 a 72.72 mg 100 g⁻¹ MS e, quando comparados aos encontrados em 100 g MS de outras folhas verdes não-convencionalmente usadas, são comparáveis aos da batata doce (40-120 mg) (Almazan et al., 1997), superiores ao da cenoura (8,70 mg) (Pereira et al., 2003) e menores que os das folhas de amendoim (100-140 mg) (Almazan & Begum 1996). Já em relação aos teores em 100 g MF de hortaliças, estes são maiores que os da alface (1,37 mg), agrião (5,26 mg), cebolinha (2,31 mg) e salsa (3,82 mg) (Campos et al., 2003).

Como o β-caroteno é o precursor da vitamina A, essas FFM podem ser consideradas fonte dessa vitamina, além de que esses teores de β-caroteno podem contribuir também para o potencial antioxidante dessas farinhas.

4.2 Avaliação da atividade antioxidante

Os resultados da atividade antioxidante (AA) usando vários solventes como extratores, empregando a cultivar Ufla, aos 12 meses de idade, encontram-se na Figura 7. Pode-se observar que as misturas de solventes etanol/acetona (50:70) e metanol/acetona (50:70) não diferiram significativamente entre si, quanto à AA e que ambos foram superiores a todos os outros solventes testados.

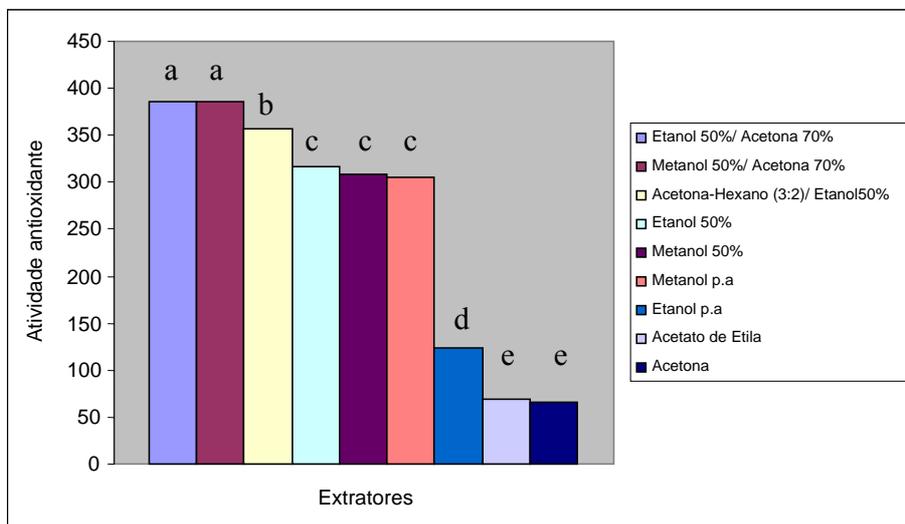


FIGURA 7 Atividade antioxidante ($\mu\text{mol trolox L}^{-1} \text{g}^{-1}$ de MS) da FFM, cultivar Ufla, aos 12 meses de idade, submetida a diferentes extratores. Letras iguais indicam não haver diferenças pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Como não houve diferenças significativas da AA entre o uso do solvente etanol/acetona (50:70) e metanol/acetona (50:70), o etanol foi o escolhido para medir a AA das FFM nas TIP, uma vez que ele é menos tóxico e mais barato que o metanol.

A seleção do solvente etanol/acetona (50:70) vem comprovar que o uso de solventes polares e apolares é mais eficiente na remoção de antioxidantes, pelo fato de extraírem tanto os compostos com características polares (vitamina C e compostos fenólicos) como os apolares (carotenoides). Provavelmente, interações entre antioxidantes podem apresentar efeitos que não seriam observados quando esses compostos são testados isoladamente.

4.2.1 Método ABTS

Os resultados da atividade antioxidante pelo método ABTS, calculados pela curva analítica de trolox aos 6 minutos de reação e pela curva padrão de ácido ascórbico, das FFM, de quatro cultivares, em TIP, estão apresentados na Tabela 5. Observa-se que a AA pelo método ABTS aumenta com a maturidade do vegetal para todas as cultivares, tanto em equivalente de trolox, quanto de ácido ascórbico. A maior AA foi observada aos 14 meses para a cultivar Pão da China, tanto em equivalente de trolox ($680,62 \mu\text{mol L}^{-1} \text{g}^{-1}$), quanto de ácido ascórbico ($102,42 \text{ mg g}^{-1}$). O resultado encontrado indica que 1 g de FFM desta cultivar apresenta a capacidade antioxidante de $680,62 \mu\text{mol trolox L}^{-1}$ e o equivalente ao poder antioxidante de $102,42 \text{ mg}$ de vitamina C. Já a cultivar Ouro do Vale apresentou a menor AA, tanto em equivalente de trolox quanto de ácido ascórbico, nas TIP.

Os resultados apresentados pelos padrões rutina e quercetina demonstram a sensibilidade do método frente a pequenas alterações na estrutura da molécula, pois a rutina tem estrutura semelhante à da quercetina, mas com uma substituição glicosídica em uma das hidroxilas e, com isso, possui menor AA (Duarte-Almeida et al., 2006).

Avaliando a eficácia antioxidante das FFM, independente da idade da planta e da cultivar, obtêm-se os valores médios equivalente de trolox entre 155,90 a $680,62 \mu\text{mol L}^{-1} \text{g}^{-1}$ e equivalente a vitamina C entre 24,51 a $102,42 \text{ mg g}^{-1}$.

Nota-se que, quando comparado aos padrões BHT e rutina, o potencial antioxidante, tanto em equivalente de trolox quanto de ácido ascórbico das cultivares analisadas, é considerado um potencial moderado, pois alcançou, em média, aos 14 meses, quase 50% do potencial desses padrões, exceto para a cultivar Ouro do Vale. Já em relação à quercetina, o potencial das cultivares em qualquer idade foi muito inferior ao potencial antioxidante deste padrão.

TABELA 5 Atividade antioxidante das farinhas de folhas de mandioca de quatro cultivares, em TIP¹, e de três padrões, pelo método ABTS.

Cultivar	$\mu\text{mol trolox L}^{-1} \text{g}^{-1}$			mg de vitamina C g^{-1}		
	10 meses	12 meses	14 meses	10 meses	12 meses	14 meses
Mocotó	238,62 ± 1,05 bC	320,25 ± 1,02 cB	636,12 ± 1,41 cA	38,54 ± 0,04 bC	49,11 ± 0,10 cB	100,83 ± 0,25 cA
Ufla	359,85 ± 0,86 aC	444,65 ± 0,59 aB	658,71 ± 1,84 bA	50,11 ± 0,12 aC	52,07 ± 0,20 aB	101,20 ± 0,03 bA
Pão da China	240,25 ± 0,68 bC	338,15 ± 0,67 bB	680,62 ± 0,30 aA	38,79 ± 0,03 bC	50,45 ± 0,11 bB	102,42 ± 0,58 aA
Ouro do Vale	155,90 ± 2,39 cC	266,83 ± 0,64 dB	327,27 ± 0,08 dA	24,51 ± 0,09 cC	44,60 ± 0,13 dB	50,85 ± 0,18 dA
BHT	1.418,81 ± 97,98			259,55 ± 3,27		
Quercetina	7.491,59 ± 119,04			942,96 ± 1,89		
Rutina	1.055,50 ± 13,39			161,29 ± 0,30		

Os dados são a média de três repetições ± desvio padrão. Letras minúsculas nas colunas comparam entre as cultivares e maiúsculas nas linhas comparam entre as idades. Letras iguais não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade; ¹TIP = três idades da planta.

Entretanto, como essas substâncias não se encontram de forma isolada como os padrões, pode-se considerar o potencial médio de aproximadamente 50% obtido pelas farinhas, aos 14 meses, como um bom potencial antioxidante. Além disso, a AA depende, ainda, do efeito sinérgico entre esses compostos.

A AA nas FFM supera a encontrada por Kuskoski et al. (2005), em polpas de frutas congeladas, em $\mu\text{mol trolox L}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$: acerola (66,5), manga (11,8), uva (8,5), goiaba (7,2) e maracujá (1,02); as de duas casca de uvas em MS: ‘Isabel’ (89,22) e ‘Niágara’ (157,31) (Soares et al., 2008) e as de resíduos agroindustriais de vinho: (98,9) (Cataneo et al., 2008). Porém, foi inferior à encontrada na casca de duas variedades de jabuticaba: Sabará (2.060) e Paulista (1.560) (Lima, 2009).

4.2.2 Método β -caroteno/ácido linoleico

Inicialmente foram testados os potenciais de inibição da oxidação dos padrões de BHT, quercetina e rutina. O padrão BHT (antioxidante sintético) foi escolhido por sua ampla utilização na indústria de alimentos, e os antioxidantes naturais, quercetina e rutina, por estarem presentes em frutas e vegetais (Duarte-Almeida et al., 2006). Os resultados (Figura 8) mostram que o padrão BHT apresenta maior potencial de inibição da oxidação que a quercetina que, por sua vez, apresenta maior potencial que a rutina.

Na Tabela 6 constam os resultados da inibição da oxidação lipídica, pelo método β -caroteno/ácido linoleico, das FFM, de quatro cultivares, em TIP. Observa-se que a maturidade do vegetal pouco influenciou a AA das FFM. Entre as cultivares, a ‘Mocotó’ foi a que apresentou o maior potencial de inibição da oxidação, nas TIP.

Nota-se que quando comparada ao padrão BHT, a cultivar Mocotó, nas TIP, apresentou AA semelhante a este padrão. Já as outras cultivares apresentaram AA menores em relação ao BHT, porém, não foram tão menores

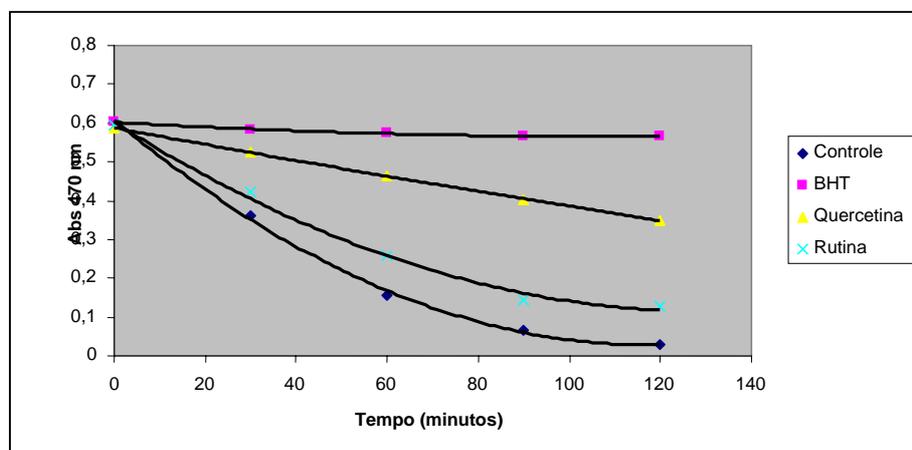


FIGURA 8 Curva de descoloração do β -caroteno na presença de BHT (200 mg L⁻¹), quercetina (200 mg L⁻¹), rutina (200 mg L⁻¹) e do controle.

TABELA 6 Atividade antioxidante das farinhas de folhas de mandioca de quatro cultivares, em TIP¹, e de três padrões, pelo método β -caroteno/ácido linoleico.

Cultivar	% de inibição		
	10 meses	12 meses	14 meses
Mocotó	93,04 ± 3,14 a A	94,05 ± 0,20 a A	89,81 ± 0,19 a B
Ufla	85,17 ± 0,96 b A	86,47 ± 0,33 b A	84,61 ± 0,66 b A
Pão da China	81,47 ± 1,27 c B	85,51 ± 0,63 b A	79,79 ± 1,28 c B
Ouro do Vale	82,79 ± 0,35 c B	85,69 ± 0,80 b A	78,87 ± 2,25 c C
BHT	93,60 ± 0,56		
Quercetina	76,20 ± 1,15		
Rutina	19,21 ± 0,88		

Os dados são a média de três repetições ± desvio padrão. Letras minúsculas nas colunas comparam entre as cultivares e maiúsculas nas linhas comparam entre as idades. Letras iguais não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade; ¹TIP = três idades da planta.

quanto à do método ABTS. Em relação aos padrões quercetina e rutina, as cultivares, nas TIP, apresentaram AA maiores que a desses padrões. Em relação à rutina, a AA das cultivares, nas TIP, foram muito maiores. Muitos autores relatam o potencial antioxidante acima de 70% como ótimo para a inibição da oxidação lipídica. Todas as cultivares, nas TIP, alcançaram AA acima de 70% e, com isso apresentam alto potencial de inibição da oxidação da lipídica.

Fatores como o método analítico de extração, condições climáticas, origem geográfica e constituintes químicos são os principais responsáveis pelos mais diferentes resultados encontrados na literatura, quanto à AA dos alimentos, e devem ser levados em consideração como comparação de resultados, para que sejam válidos.

Percebe-se que os resultados da AA das FFM foram moderados quando se utilizou o método de captura de radicais livres (ABTS) e altos quando se utilizou o método de inibição da oxidação lipídica (β -caroteno/ácido linoleico), enfatizando a importância do emprego de mais de uma técnica para refletir a capacidade antioxidante de uma amostra.

4.3 Clorofila

O uso do equipamento SPAD-502, como medidor dos teores de clorofila, é justificado pelos resultados obtidos por Argenta et al. (2001) e Zotarelli et al. (2003) que, analisando a correlação entre as leituras do clorofilômetro e os teores de clorofila extraídos em folhas de milho, obtiveram correlações positivas em seus resultados. Neves et al. (2005) também encontraram correlação positiva entre essa relação em folhas de algodoeiro herbáceo. Portanto, as leituras realizadas com este equipamento podem substituir, com boa precisão, as determinações tradicionais do teor de clorofila em vegetais, se caracterizando com uma técnica rápida, barata e não destrutiva.

Os resultados das leituras de clorofila das FFM, em TIP, utilizando o medidor portátil SPAD-502, encontram-se na Tabela 7.

TABELA 7 Teores médios de clorofila (unidade SPAD) das farinhas de folhas de mandioca de quatro cultivares, em TIP¹.

Cultivar	10 meses	12 meses	14 meses
Mocotó	565,60±3,05 d A	479,80±9,07 d B	429,60±8,68 d C
Ufla	719,80±7,63 b A	631,20±5,72 b C	677,00±11,51 b B
Pão da China	589,40±10,43 c A	491,60±1,52 c B	468,40±13,67 c C
Ouro do Vale	771,00±5,20 a A	743,20±4,38 a C	758,40±0,63 a B

Os dados são a média de três repetições±desvio padrão. Letras minúsculas nas colunas comparam entre as cultivares e maiúsculas nas linhas comparam entre as idades. Letras iguais não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade;¹TIP = três idades da planta.

Constatou-se que os maiores teores de clorofila foram encontrados aos 10 meses de idade e que houve uma tendência da redução desses teores com a maturidade do vegetal. A cultivar Ouro do Vale, nas TIP, foi a que apresentou os maiores teores de clorofila, encontrados aos 10 meses de idade e houve uma tendência da redução desses teores com a maturidade do vegetal. A cultivar Ouro do Vale, nas TIP, foi a que apresentou os maiores teores de clorofila. Já a cultivar Mocotó, nas TIP, foi a que apresentou teores significativamente mais baixos de clorofila.

A tendência na redução dos teores de clorofila com a maturidade do vegetal pode ser atribuída, provavelmente, à senescência foliar que ocorre na maioria dos vegetais, levando à perda da coloração verde e, conseqüentemente, à redução nos níveis de clorofila.

4.4 Correlação entre substâncias antioxidantes com a AA e com a clorofila

Os resultados das correlações entre as substâncias antioxidantes (Tabelas 2, 3 e 4) com a AA (Tabelas 5 e 6) e com a clorofila (Tabela 7) das FFM, em TIP, estão apresentados na Tabela 8.

TABELA 8 Correlação (R) entre as substâncias antioxidantes com a atividade antioxidante (AA) e com a clorofila das farinhas de folhas de mandioca, em TIP¹.

AA/Clorofila	R		
	Vitamina C	Polifenóis	β -caroteno
ABTS (trolox)	0,78*	0,75*	0,28 ^{ns}
ABTS (vit C)	0,84*	0,70*	0,25 ^{ns}
β -caroteno/ ácido linoleico	-0,20 ^{ns}	0,18 ^{ns}	0,20 ^{ns}
Clorofila	-0,40*	-0,71*	-0,45*

* Significativo, a 5% de probabilidade; ns = não significativo; ¹TIP = três idades da planta.

Observa-se que os testes antioxidantes ABTS (equivalente a trolox e à vitamina C) apresentaram alta correlação positiva com a vitamina C e com os polifenóis, mas não houve correlação com o β -caroteno. Esses resultados indicam que a vitamina C e os polifenóis são as substâncias antioxidantes que mais contribuíram para o aumento da AA das FFM, sendo a vitamina C a que se destacou, pois apresentou os maiores coeficientes de correlação, 0,78 e 0,84, para equivalente de trolox e de vitamina C, respectivamente.

O teste β -caroteno/ácido linoleico não apresentou correlação com as substâncias antioxidantes. As substâncias antioxidantes apresentaram correlação

negativa com a clorofila, ou seja, quando os teores das substâncias antioxidantes aumentaram, os teores de clorofila diminuíram na planta. Para o β -caroteno, isso é facilmente explicado, pois, com o aumento da maturidade, a clorofila começa a desaparecer e os carotenoides se sobressaem.

Lima (2009) encontrou correlação positiva entre vitamina C e polifenóis com os testes ABTS, tanto em equivalente de trolox quanto de vitamina C, em estudos realizados com jabuticabas. Porém, a maior contribuição para a AA foi dada pelos polifenóis. Cataneo et al. (2008) e Soares et al. (2008) também observaram correlação positiva entre os teores de fenóis totais com a AA pelo teste ABTS, equivalente ao trolox, em estudos realizados com resíduos agroindustriais de vinho e com a casca de uvas de duas variedades, respectivamente.

Lima (2009) não encontrou correlação entre o teste β -caroteno/ácido linoleico com a vitamina C e com os polifenóis, em estudo realizado com a fruta jabuticaba. Kubola & Siriamornpun (2008) e Melo et al. (2008b) também não encontraram correlação entre esse teste e os teores de polifenóis em frutas. Já Kaur & Kapoor (2002) encontraram correlação moderada e positiva entre os teores de polifenóis e o teste β -caroteno/ácido linoleico, em estudo realizado com hortaliças.

Duarte-Almeida et al. (2006) verificaram que a acerola, rica em vitamina C, apresentou baixa AA pelo teste β -caroteno/ácido linoleico, enquanto, pelo teste DPPH (método de sequestro de radicais livres), apresentou elevada AA, o que demonstra que a vitamina C pouco contribui para a AA do teste β -caroteno/ácido linoleico.

A presença de outras substâncias antioxidantes, como a vitamina E nos extratos testados, pode estar contribuindo de forma sinérgica para a AA das FFM, e estar influenciando os resultados das correlações, principalmente em

relação à vitamina C, pois esta atua de forma cooperativa com a vitamina E na interface da membrana celular no combate aos radicais livres.

Além da presença de outros fitoquímicos nos extratos, a estrutura química do componente ativo tem influência sobre a eficácia do antioxidante natural, uma vez que a posição e o número de hidroxilas presente nas moléculas dos polifenóis são considerados fatores relevante para a AA, podendo fazer com que essa contribuição seja maior para um teste do que para outro.

4.5 Perfil de ácidos graxos

Nas Figuras 9 e 10 são mostrados, respectivamente, os cromatogramas do padrão da mistura de 37 ésteres metílicos de ácidos graxos e de uma amostra da FFM da cultivar Mocotó, aos 10 meses de idade da planta. As identificações dos ácidos graxos das FFM foram feitas por comparação com os tempos de retenção dos padrões.

Nas Tabelas 9, 10 e 11 estão apresentados os principais ácidos graxos (AG) presentes nas FFM de quatro cultivares, em TIP. Foram detectados 20 AG nas FFM das quatro cultivares, nas TIP, sendo os ácidos majoritários o alfa-linolênico (C18:3n3) e o palmitoleico (C16:1), representando, em média, 33,51% e 19,30%, respectivamente, do percentual total dos AG. Praticamente não houve diferenças no percentual dos ácidos alfa-linolênico e palmitoleico nas três idades estudadas. Observou-se também que, para outros AG das FFM, ocorreram mudanças com a maturidade da planta, com o surgimento de novos ácidos, enquanto outros deixaram de ser detectados, como, por exemplo, o ácido tridecanoico (C13:0) e o láurico (C12:0).

A quantidade total de AG das FFM, independente da idade e da cultivar, foi, em média, de 3,02% para saturados, 20,03% para monoinsaturados e 33,99% para os poli-insaturados. Já a razão de (AGPI/AGS) foi, em média, de

11,25 e, para ω -6/ ω -3, de 0,04. Observou-se um maior percentual de AG insaturados em relação aos saturados nas FFM, nas TIP.

Dietas que apresentam razão AGPI/AGS superior a 0,45 (DHSS, 1984) e razão ω -6/ ω -3 inferior a 5 (Simopoulos, 2002) são consideradas saudáveis, do ponto de vista nutricional para humanos. Considerando que a composição de AG das FFM, nas TIP, apresentou-se dentro das recomendações, estas FFM podem ser consideradas boas fontes alimentares.

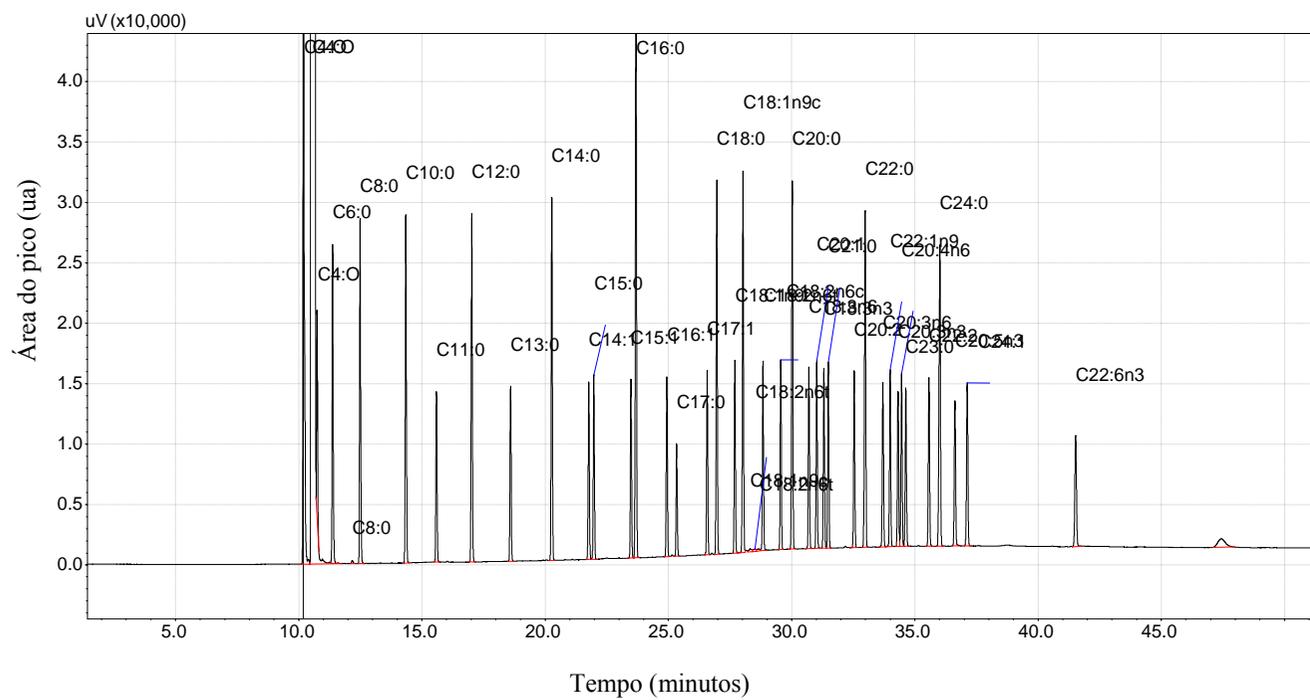


FIGURA 9 Cromatograma do padrão da mistura de 37 ésteres metílicos de ácidos graxos.

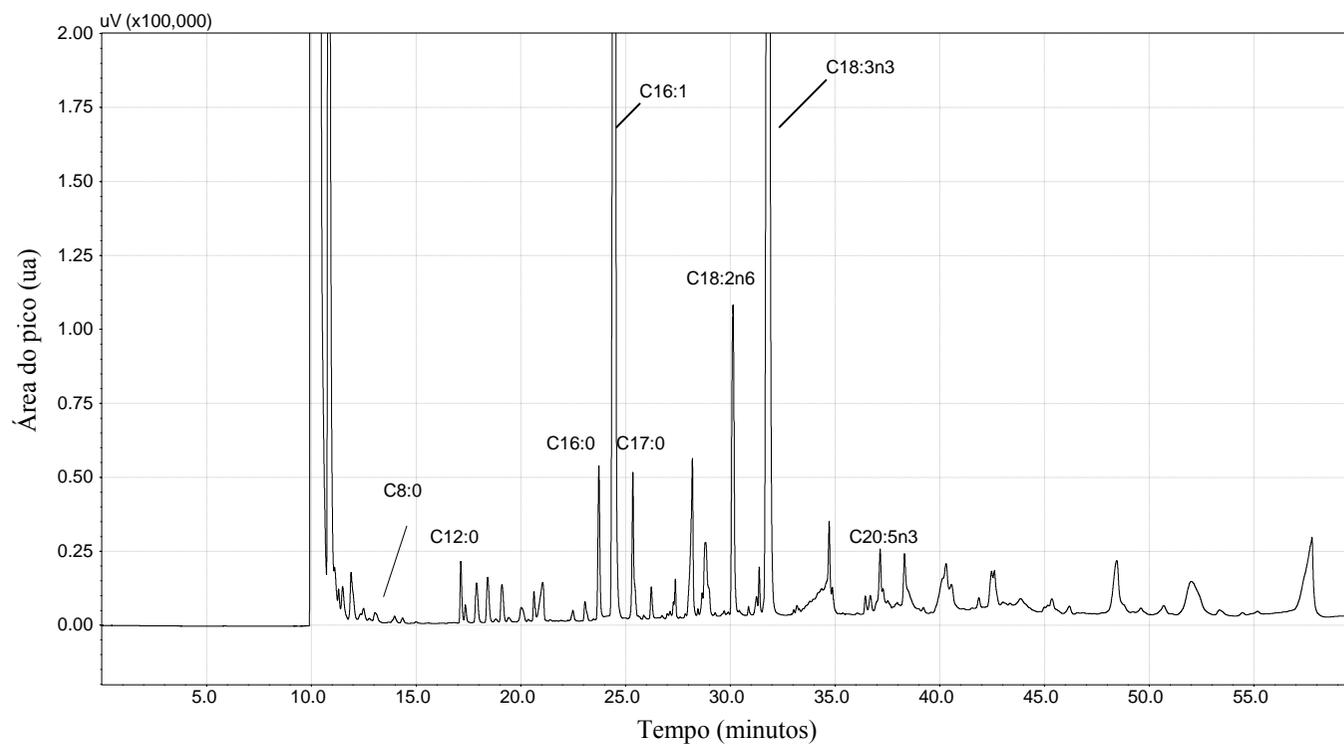


FIGURA 10 Cromatograma de ácidos graxos da farinha de folha de mandioca da cultivar Mocotó, aos 10 meses de idade.

TABELA 9 Composição de ácidos graxos (%) das farinhas de folhas de mandioca de quatro cultivares, aos 10 meses de idade.

Ácidos graxos	Cultivares			
	Mocotó	Ufla	Pão da china	Ouro do vale
C8:0	0,45±0,21	0,24±0,16	0,42±0,35	0,15±0,01
C12:0	0,48±0,11	0,62±0,37	0,41±0,07	0,35±0,10
C13:0	nd	nd	nd	nd
C14:0	nd	nd	nd	nd
C15:1	nd	nd	nd	nd
C16:0	1,45±0,16	1,40±0,15	1,26±0,02	1,26±0,14
C16:1	22,34±z,07	18,83±0,61	20,18±0,39	19,58±0,29
C17:0	1,65±0,15	1,64±0,25	1,71±0,06	1,81±0,06
C18:0	nd	nd	0,11±0,01	nd
C18:1n9t	nd	nd	nd	nd
C18:2n6t	1,78±0,28	1,95±0,52	nd	1,69±0,28
C18:2n6c	nd	nd	nd	nd
C20:0	nd	nd	nd	nd
C18:3n6	nd	nd	nd	nd
C18:3n3	37,40±1,96	30,01±7,40	32,67±1,09	36,64±1,59
C20:3n3	nd	0,40±0,12	nd	nd
C24:0	nd	nd	0,25±0,11	nd
C20:5n3	0,31±0,06	0,18±0,04	0,49±0,29	0,15±0,05
C24:1	nd	nd	nd	nd
C22:6n3	nd	nd	nd	nd
∑ AGS	4,03	3,90	4,16	3,57
∑AGMI	22,34	18,83	20,18	19,58
∑AGPI	35,45	32,54	33,16	36,29
AGPI/AGS	8,88	8,34	7,97	10,16
ω-6 /ω-3	0,04	0,06	0,01	0,05

Os dados são a média de três repetições±desvio padrão; nd = não detectado; ∑ AGS = somatório de ácidos graxos saturados; ∑AGMI = somatório de ácidos graxos monoinsaturados; ∑AGPI = somatório de ácidos graxos poli-insaturados; AGPI/AGS = razão entre os somatórios de ácidos poli-insaturados e saturados; ω-6 /ω-3 = razão entre os somatórios de ômega-6 e ômega-3.

TABELA 10 Composição de ácidos graxos (%) das farinhas de folhas de mandioca de quatro cultivares, aos 12 meses de idade.

Ácidos graxos	Cultivares			
	Mocotó	Ufla	Pão da china	Ouro do vale
C8:0	0,21±0,09	0,16±0,06	0,28±0,07	0,19±0,08
C12:0	nd	0,31±0,14	nd	0,23±0,03
C13:0	0,49±0,08	0,69±0,04	0,53±0,08	0,59±0,15
C14:0	nd	0,29±0,12	nd	0,21±0,02
C15:1	nd	nd	nd	nd
C16:0	1,28±0,14	nd	nd	nd
C16:1	20,07±3,01	16,85±1,28	19,66±2,74	19,48±2,79
C17:0	1,92±0,04	1,76±0,25	1,68±0,25	1,81±0,14
C18:0	nd	0,16±0,00	0,12±0,01	0,18±0,09
C18:1n9t	nd	0,31±0,08	nd	0,21±0,08
C18:2n6t	2,08±0,13	2,38±0,00	nd	nd
C18:2n6c	nd	nd	nd	nd
C20:0	nd	nd	nd	0,18±0,03
C18:3n6	nd	0,35±0,01	nd	0,24±0,06
C18:3n3	35,84±0,54	30,76±6,93	28,94±5,71	33,42±0,42
C20:3n3	nd	0,15±0,07	nd	nd
C24:0	nd	nd	0,33±0,08	nd
C20:5n3	0,20±0,01	nd	0,77±0,08	0,13±0,02
C24:1	nd	0,31±0,07	nd	0,17±0,02
C22:6n3	nd	nd	nd	nd
∑ AGS	3,90	3,37	2,94	3,39
∑AGMI	20,07	17,47	19,66	19,86
∑AGPI	38,12	33,64	30,04	33,79
AGPI/AGS	9,77	9,98	10,22	9,97
ω-6 /ω-3	0,06	0,09	0,01	0,01

Os dados são a média de três repetições±desvio padrão; nd = não detectado; ∑ AGS = somatório de ácidos graxos saturados; ∑AGMI = somatório de ácidos graxos monoinsaturados; ∑AGPI = somatório de ácidos graxos poli-insaturados; AGPI/AGS = razão entre os somatórios de ácidos poli-insaturados e saturados; ω-6 /ω-3 = razão entre os somatórios de ômega-6 e ômega-3.

TABELA 11 Composição de ácidos graxos (%) das farinhas de folhas de mandioca de quatro cultivares, aos 14 meses de idade.

Ácidos graxos	Cultivares			
	Mocotó	Ufla	Pão da china	Ouro do vale
C8:0	0,31 ± 0,03	0,27 ± 0,06	0,22 ± 0,02	0,22 ± 0,01
C12:0	nd	nd	0,12 ± 0,04	nd
C13:0	0,45 ± 0,03	0,47 ± 0,08	0,54 ± 0,06	nd
C14:0	0,14 ± 0,07	0,11 ± 0,00	0,15 ± 0,00	nd
C15:1	nd	0,38 ± 0,08	0,77 ± 0,02	0,52 ± 0,09
C16:0	nd	nd	nd	nd
C16:1	21,42 ± 1,87	18,61 ± 0,47	18,15 ± 0,78	22,39 ± 1,40
C17:0	nd	1,47 ± 0,69	nd	nd
C18:0	nd	0,29 ± 0,02	nd	nd
C18:1n9t	0,22 ± 0,01	0,13 ± 0,00	nd	nd
C18:2n6t	0,23 ± 0,01	0,40 ± 0,08	0,25 ± 0,04	nd
C18:2n6c	0,12 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,25 ± 0,05	nd
C20:0	0,25 ± 0,04	0,53 ± 0,06	0,45 ± 0,08	0,22 ± 0,15
C18:3n6	0,22 ± 0,07	0,50 ± 0,02	0,38 ± 0,02	0,16 ± 0,01
C18:3n3	32,30 ± 3,65	32,82 ± 1,06	28,67 ± 1,61	35,15 ± 0,54
C20:3n3	nd	nd	nd	nd
C24:0	0,18 ± 0,07	0,30 ± 0,04	nd	0,53 ± 0,04
C20:5n3	nd	nd	nd	nd
C24:1	nd	nd	nd	nd
C22:6n3	1,58 ± 0,49	1,47 ± 0,25	nd	nd
∑ AGS	1,08	3,44	1,48	0,97
∑AGMI	21,64	19,12	18,92	22,91
∑AGPI	34,45	35,58	29,55	35,31
AGPI/AGS	31,90	10,34	19,96	36,46
ω-6 /ω-3	0,02	0,04	0,03	0,01

Os dados são a média de três repetições±desvio padrão; nd = não detectado; ∑ AGS = somatório de ácidos graxos saturados; ∑AGMI = somatório de ácidos graxos monoinsaturados; ∑AGPI = somatório de ácidos graxos poli-insaturados; AGPI/AGS = razão entre os somatórios de ácidos poli-insaturados e saturados; ω-6 /ω-3 = razão entre os somatórios de ômega-6 e ômega-3.

5 CONCLUSÕES

As folhas de mandioca com 14 meses apresentam os maiores teores de antioxidantes, tendo as cultivares Mocotó e Pão da China sido as que se destacaram.

As FFM são ricas em substâncias antioxidantes e mostram elevada capacidade antioxidante na proteção da peroxidação lipídica, porém, apresentam moderada capacidade na captura de radicais livres.

Os maiores teores de antioxidantes são encontrados quando a folha de mandioca apresenta baixos teores de clorofila.

As FFM apresentam os ácidos alfa-linolênico e palmitoleico como os majoritários, representando mais de 50% do total de ácidos graxos. As razões de ácidos ω -6/ ω -3 e de poli-insaturados/saturados encontram-se dentro das recomendações adequadas para o consumo humano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMAZAN, A. M.; BEGUM, F.; JOHSON, C. Nutritional quality of sweetpotato greens from greenhouse plants. **Journal of Food Composition and Analysis**, Orlando, v. 10, p. 246-253, 1997.

ALMAZAN, A. M.; BEGUM, F. Nutrients and antinutrient in peanut greens. **Journal of Food Composition and Analysis**, Orlando, v. 9, p. 375-383, 1996.

AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2006.

ARGENTA, G.; SILVA, P. R. F. da; FORSTHOFER, E. L.; STRIEDER, M. L. Relação da leitura do clorôfilometro com os teores de clorofila extraível e nitrogênio na folha de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 2, p. 158-167, 2001.

ASOLINI, F. C.; TEDESCO, A. M.; CARPES, S. T. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 209-215, jul./set. 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods os analysis of the association of the analytical chemists**. 17. ed. Washington, 2005.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BELITZ, H. D.; GROSH, W. **Química de los alimentos**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1997.

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; LORENTE, J.; ORTUÑO, A.; RIO, J. A. del. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. **Food Chemistry**, London, v. 68, p. 457-462, 1999.

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

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry**, Ottawa, v. 37, p. 911-917, 1959.

CAMPOS, F. M.; MARTINO, H. F.; SABARENSE, C. M.; Estabilidade de compostos antioxidantes em hortaliças processadas: uma revisão. **Alimentos e Nutrição**, Marília, v. 19, n. 4, p. 481-490, 2008.

CAMPOS, F. M.; SANTANA, H. M.; STRINGHETA, P. C.; CHAVES, J. B. P. Teores de beta-caroteno em vegetais folhosos preparados em restaurantes comerciais de Viçosa-MG. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 163-169, jul./dez. 2003.

CARVALHO, V. D.; CHAGAS, S. J. R.; MORAIS, A. R.; PAULA, M. B. Efeito da época de colheita na produtividade e teores de vitamina C e β -caroteno da parte aérea de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v. 8, n. 1, p. 25-35, 1989.

CARVALHO, V. D.; KATO, M. S. A. Potencial de utilização da parte aérea da mandioca. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n. 145, p. 23-28, jan. 1987.

CASTELLI, F.; CONTILLO, R.; MICELI, F. Non-destructive determination of leaf chlorophyll content in four crop species. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Berlin, v. 177, p. 275-283, 1996.

CATANEO, C. B.; CALIARI, V.; GONZAGA, L.; KUSKOSKI, L. M.; FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 93-102, jan./mar. 2008.

CEREDA, M. P. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. 320 p. (Cultura de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, v. 4).

CORRÊA, A. D. **Farinha de folhas de mandioca-efeitos do processamento sobre alguns nutrientes e antinutrientes**. 2000. 108 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CORRÊA, A. D.; SANTOS, S. R.; ABREU, C. M. P.; JOKL, L.; SANTOS, C. D. Remoção de polifenóis da farinha de folhas de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 159-164, abr./jun. 2004.

DEPARTMENT OF HEALTH AND SOCIAL SECURITY. **Report on health and social subjects**: n. 28: diet and cardiovascular disease. London, 1984.

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

DWYER, L. M.; TOLLENAAR, M.; HOUWING, L. A non destructive method to monitor leaf greenness in corn. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 71, p. 505-509, 1991.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Disponível em: <http://sistemasdeprodução.cnptia.embrapa.br/FONTESHTML/Mandioca/Mandioca_centrosul/importância.htm>. Acesso em: 15 jan. 2010.

FALLER, A. L. K.; FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 211-218, 2009.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**: verão 4.6 (build 61) software. Lavras: UFLA, 2003. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/danielff/dff02.htm>>. Acesso em: 15 jan. 2010.

GIDAMIS, A. B.; BRIEN, G. M.; POULTER, N. H. Cassava detoxification of traditional Tanzanian cassava foods. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 28, n. 2, p. 211-218, Apr. 1993.

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

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

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: **ENCYCLOPEDIA of life sciences**. Coimbra: Nature Publishing Group, 2001. p. 1-7.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now ? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 119, p. 598, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. New York: Oxford Science Publications, 1999. 936 p.

HENDRY, G. A. Plant pigments. In: LEA, P. J.; LEEGOOD, R. C. (Ed.). **Plant biochemistry and molecular biology**. Great Britain: Bookcraft, 1993. p. 181-196.

HERNÁNDEZ, Y.; LOBO, M. G.; GONZÁLEZ, M. Determination of vitamin C in tropical fruits: a comparative evaluation of methods. **Food Chemistry**, London, v. 96, n. 4, p. 654-664, Aug. 2006.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, London, v. 53, p. 1851-1856, 2005.

INNIS, S. H. Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 143, p. 1-8, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.sectec.gov.br/links/institutos/ibge.htm>>. Acesso em: 15 jan. 2010.

JOHANNING, G. L. Modulation of breast cancer cell adhesion by unsaturated fatty acids. **Nutrition**, Alabama, v. 12, p. 810-866, 1996.

JOSEPH, J. D.; ACKMAN, R. G. Capillary column gas chromatography method for analysis of encapsulated fish oil and fish oil ethyl esters: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 75, p. 488-506, 1992.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 37, p. 153-161, 2002.

KUBOLA, J.; SIRIAMORNPU, S. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter melon (*Momordica Charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. **Food Chemistry**, London, v. 1110, n. 4, p. 881-890, Oct. 2008.

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

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.

LEONG, L. P.; SHUI, G. An Investigation of antioxidant capacity fruits in Singapore markets. **Food Chemistry**, Washington, v. 76, p. 69-75, 2002.

LIMA, A. J. B. **Caracterização e atividade antioxidante da jabuticaba**. 2009. 159 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37, n. 3, set./dez. 2001.

LORENZI, J. A. **Mandioca**. Campinas: CATI, 2003. (Boletim técnico).

LOREZI, J. O.; DIAS, C. A. C. **Cultura da mandioca**. Campina: CATI, 1993. 41 p. (Boletim técnico CATI, n. 211).

MACHLIN, L. J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 1, n. 2, p. 441-445, 1987.

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

MAILLARD, V.; BOUGNOUX, P.; FERRARI, P.; JOURDAN, M.; PINAULT, M.; LAVILLONNIÈRE, F. N-3 and n-6 fatty acids in breast cancer adipose tissue and relative risk of breast cancer in a case-control study in Tours, France. **International Journal of Cancer**, New York, v. 98, p. 78-83, 2002.

MELO, D. S. de; CORRÊA, A. D.; MARCOS, F. C. A.; SOUSA, R. V. de; ABREU, C. M. P. de; SANTOS, C. D. dos. Efeitos da farinha de folhas de mandioca sobre a peroxidação lipídica, o perfil lipídico sanguíneo e o peso do fígado de ratos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 420-428, mar./abr. 2007.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; ARAUJO, C. R. Teores de fenóis totais e capacidade antioxidante polpas congeladas de frutas. **Alimentos e Nutrição**, Marília, v. 19, n. 1, p. 67-72, jan./mar. 2008a.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 2, abr./jun. 2008b.

MINOLTA CAMERA. **Manual for chlorophyll meter SPAD 502**. Osaka: Minolta, Radiometric Instruments Divisions, 1989. 22 p.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 2, p. 109-122, 2006.

NAGATA, M.; YAMASHITA, I. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomatoes fruit. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, Tokyo, v. 39, n. 10, p. 925-928, 1992.

NEVES, O. S. C.; CARVALHO, J. C.; MARTINS, F. A. D.; PÁDUA, T. R. P.; PINHO, P. J. Uso do SPAD-502 na avaliação dos teores foliares de clorofila, nitrogênio, enxofre, ferro e manganês do algodoeiro herbáceo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 5, p. 75-78, maio 2005.

ORTEGA-FLORES, C. I.; COSTA, M. I.; CEREDA, M. P.; PENTEADO, M. V. C. Avaliação da qualidade protéica da folha desidratada de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Nutrire**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 47-59, jun. 2003.

OTSUBO, A. A. **Cultivo da mandioca na região Centro-Sul do Brasil**. Dourados: EMBRAPA Agropecuária Oeste, 2004.

PADJMA, G. Evaluation of techniques to reduce assayable tannin and cyanide in cassava leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, London, v. 37, p. 712-716, 1989.

PEREIRA, G. I. S.; PEREIRA, R. G. F. A.; BARCELOS, M. F. P.; MORAIS, A. R. Avaliação química da folha de cenoura visando ao seu aproveitamento na alimentação humana. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 4, p. 852-857, jul./ago. 2003.

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

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

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. São Paulo: E. Blücher, 2004. 157 p.

RODRIGUES, H. G.; DINIZ, Y. S.; FAINE, L. A.; ALMEIDA, J. A.; FERNANDES, A. A. H.; NOVELLI, E. L. B. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL, **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 16, n. 3, jul./set. 2003.

ROVER JÚNIOR, L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. S.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M. **Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS⁺**. Fortaleza: EMBRAPA, 2007.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos: actividad antioxidante. **Alimentaria**, Lisboa, v. 1, p. 29-40, 2002.

SANTOS, L. C.; PIACENTE, S.; MONTORO, P.; PIZZA, C. Atividade antioxidante de xantonas isoladas de espécies de *Leiothrix*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 13, n. 2, p. 64-67, 2003.

SARTORELLI, C. S. do C. **Caracterização química da parte aérea da cenoura e da beterraba, visando ao aproveitamento na alimentação humana**. 1998. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

SILVA, P. A.; QUEIROZ, E. R.; ABREU, C. M. P.; SACZK, A. A. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de vitamina C em morango por HPLC. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32., 2009, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: [s.n.], 2009. 1 CD-ROM.

SILVA, S. R.; MERCADANTE, A. Z. Composição de carotenóides de maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*) In *Natura. Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 2, p. 254-258, set./dez. 2002.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids in wild plants, nuts and seeds. *Journal of Clinical Nutrition*, Philadelphia, v. 11, n. 6, p. 163-73, 2002.

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v. 30, n. 1, p. 59-64, mar. 2008.

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

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. *Users guide: statistics* : versão 6. 4. ed. Cary, 1999. v. 2, 1686 p.

STROHECKER, R.; HENNING, H. M. *Analisis de vitaminas: metodos comprobados*. Madrid: Paz Montalvo, 1967. 428 p.

TAVARES, J. T. Q.; SILVA, C. L.; CARVALHO, L. A.; SILVA, M. A.; SANTOS, C. M. G. Estabilidade do ácido ascórbico em suco de laranja submetido a diferentes tratamentos. *Magistra*, Cruz das Almas, v. 12, n. 1/2, 2000. Não paginado.

TURATTI, J. M.; GOMES, R. A. R.; ATHIÉ, I. *Lipídeos: aspectos funcionais e novas tendências*. Campinas: ITAL, 2002. 78 p.

UENOJO, M.; JUNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Carotenóides: Propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. *Química Nova*, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 616-622, 2007.

WASKOM, R. M.; WESTFALL, D. G.; SPELLMAN, D. E.; SOLTANPOUR, P. N. Monitoring nitrogen status of corn with a portable chlorophyll meter. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, New York, v. 27, p. 545-560, 1996.

WOBETO, C.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P. de; SANTOS, C. D.; ABREU, J. R. Nutrients in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaf powder at three ages of the plant. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 26, n. 4, p. 865-869, out./dez. 2006.

WOBETO, C.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P. de; SANTOS, C. D.; PEREIRA, H. V. Antinutrients in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaf powder at three ages of the plant. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 108-112, jan./mar. 2007.

WYNDER, E. L.; COHEN, L.; MUSCAT, J. E.; WINTERS, B.; DWYER, J. T.; BLACKBURN, G. Breast cancer: weighing the evidence for a promoting role of dietary fat. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 89, p. 766-775, 1997.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v. 49, p. 4083-4089, 2001.

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

ZOTARELLI, L.; CARDOSO, E. G.; PICCINI, J. L.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; TORRES, E.; ALVES, B. J. R. Calibração do medidor de clorofila Minolta SPAD-502 para avaliação do conteúdo de nitrogênio do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, p. 1-5, 2003.

ANEXO

	Página
TABELA 1 Resumo da análise de variância da umidade das folhas e das FFM de quatro cultivares e de clorofila, em TIP.....	71
TABELA 2 Resumo da análise de variância dos testes dos solventes.....	71
TABELA 3 Resumo da análise de variância das substâncias antioxidantes e dos testes antioxidantes das FFM de quatro cultivares, em TIP.....	71

TABELA 1 Resumo da análise de variância da umidade das folhas e das FFM de quatro cultivares e de clorofila, em TIP.

FV	QM			
	GL	Umidade das folhas	Umidade FFM	Clorofila
C	3	24,16**	2,88 ^{ns}	244363,26**
I	2	97,28**	32,21**	39114,07**
C x I	6	5,42 ^{ns}	0,69 ^{ns}	5313,04**
Resíduo	24	2,63	1,33	67,76
CV (%)		2,28	15,82	1,35

NS/** Teste de F não significativo, significativo a 1% de probabilidade, respectivamente.

TABELA 2 Resumo da análise de variância dos testes dos solventes.

FV	GL	QM
Solvente	8	52712,87**
Resíduo	18	57,72
CV (%)	2,96	

** Teste F significativo a 1% de probabilidade.

TABELA 3 Resumo da análise de variância das substâncias antioxidantes e dos testes antioxidantes das FFM de quatro cultivares, em TIP.

FV	QM					
	GL	Vitamina-C	Polifenóis	β -caroteno	ABTS	β -caroteno/ ácido linoleico
Cultivar (C)	3	11375,06**	491,94**	73,16**	89798,76**	197,98**
Idade (I)	2	258135,56**	1484,25**	217,77**	340843,39**	65,15**
C x I	6	2593,88**	21,75**	282,28**	15355,57**	4,47**
Resíduo	24	208,04	0,71	6,85	1,24	1,73
CV (%)		4,90	2,30	4,68	0,29	1,54

** Teste F significativo a 1% de probabilidade.