



**JULIANA MESQUITA FREIRE**

**CARACTERIZAÇÃO E EFEITOS DOS  
EXTRATOS E FARINHAS DE GOIABAS SOBRE  
O ESTRESSE OXIDATIVO E NO PERFIL  
LIPÍDICO DE RATOS  
HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

**LAVRAS – MG**

**2011**

**JULIANA MESQUITA FREIRE**

**CARACTERIZAÇÃO E EFEITOS DOS EXTRATOS E FARINHAS DE  
GOIABAS SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E NO PERFIL  
LIPÍDICO DE RATOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Celeste Maria Patto de Abreu

Coorientadora

Stella Maris da Silveira Duarte

**LAVRAS – MG**

**2011**

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

Freire, Juliana Mesquita.

Caracterização e efeitos dos extratos e farinhas de goiabas sobre o estresse oxidativo e no perfil lipídico de ratos hipercolesterolêmicos / Juliana Mesquita Freire. – Lavras : UFLA, 2011.

141 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Celeste Maria Patto de Abreu

Bibliografia.

1. Psidium guajava. 2. Substâncias antioxidantes. 3. Atividade antioxidante. 4. Enzimas antioxidante. 5. Peroxidação lipídica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.804421

**JULIANA MESQUITA FREIRE**

**CARACTERIZAÇÃO E EFEITOS DOS EXTRATOS E FARINHAS DE  
GOIABAS SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E NO PERFIL  
LIPÍDICO DE RATOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 01 de julho de 2011.

|                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| Dra. Luciana de Matos Alves Pinto | UFLA   |
| Dra. Josefina Aparecida de Souza  | UFLA   |
| Dra. Fernanda Borges de Araújo    | UNIFAL |
| Dra. Maria Rita Rodrigues         | UNIFAL |

Dra. Celeste Maria Patto de Abreu  
Orientadora

Stella Maris da Silveira Duarte  
Coorientadora

**LAVRAS – MG**

**2011**

Ao meu pai, **Jander**, pelo exemplo de  
perseverança e luta em busca dos sonhos.  
Será eternamente a minha maior inspiração

**DEDICO**

À minha mãe, Daurene.  
Aos meus irmãos, Ana Cláudia e Eduardo.  
Aos meus sobrinhos, Luís Eduardo e Thiago.

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar energia, saúde, perseverança e força para a realização desse projeto.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Química e à Universidade Federal de Alfenas, ao Departamento de Análise Clínicas, pela oportunidade de conduzir este trabalho e agradável convivência.

À professora Celeste Maria Patto de Abreu, pela oportunidade e orientação. Sua compreensão, dedicação e amizade foram fundamentais. Obrigada por tudo!

Às professoras Stella Maris da Silveira Duarte e Fernanda Borges de Araújo Paula, pela coorientação, consideração, ensinamentos, atenção e amizade, sempre disponibilizando o Laboratório e materiais.

À professora Angelita Duarte Corrêa, pelos conselhos, atenção e amizade.

Ao professor Raimundo Vicente de Sousa, pela disponibilidade do Laboratório.

A todos os professores do Departamento de Química, pela dedicação, empenho e conhecimentos transmitidos.

À Maria Aparecida (Xulita), pela ajuda durante o experimento e pela grande amizade.

Ao Gabriel (Universidade Federal de Alfenas), pela ajuda e amizade nas análises de cromatografia.

Ao Alexandre (Universidade Federal de Alfenas), pelo auxílio no tratamento dos animais.

À amiga Adriene, pelo companheirismo e colaboração na condução do experimento *in vivo*.

À Eliane (Universidade Federal de Alfenas), pela ajuda e disponibilidade.

À Natália, pela ajuda nos testes *in vitro*.

À Gabriela, pela ajuda nas análises histopatológicas.

Aos meus colegas e amigos de Laboratório de Bioquímica, pela convivência, companheirismo e amizade.

Ao meu tio Jader, pelo apoio e carinho.

À Miriam e Shirley, secretárias da pós-graduação, pela boa vontade e amizade.

À Capes, pela bolsa de doutorado e à Fapemig por financiar o projeto.

Enfim, a todos que torceram por mim e me apoiaram nesta caminhada.

“Acredita no melhor.....tem um objetivo para o melhor,  
nunca fiques satisfeito com menos que o teu  
melhor, dá o teu melhor, e no longo prazo  
as coisas correrão pelo melhor”

**Henry Ford**

## RESUMO GERAL

As folhas e frutos da goiabeira são ricos em compostos antioxidantes, os quais podem inibir a oxidação das lipoproteínas, reduzindo os agravos do estresse oxidativo. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar substâncias antioxidantes e o potencial antioxidante das folhas e frutos de três cultivares de goiabeira (Paluma, Pedro Sato e Século XXI), bem como avaliar o efeito da cultivar Pedro Sato no controle da hipercolesterolemia e estresse oxidativo em ratos. Para preparar as amostras, foram coletados 60 frutos de cada cultivar na região de Lavras, levando-se em consideração o estágio de maturação, excluindo-se os frutos maduros e os muito verdes e, foram obtidas as farinhas dos frutos. As folhas foram coletadas no mesmo pomar dos frutos para a preparação das farinhas. Os extratos etanólicos/acetônicos das folhas e frutos foram preparados a partir da farinha dos mesmos mediante maceração por 48 horas e evaporação do solvente. Nas farinhas, foram analisados umidade, teor de minerais, fibra alimentar, vitamina C, beta-caroteno, compostos fenólicos e atividade antioxidante pelos métodos DPPH e beta-caroteno/ácido linoleico. Nos extratos etanólicos/acetônicos foram analisados apenas os compostos fenólicos e atividade antioxidante. As folhas apresentaram os maiores teores de fibra alimentar, beta-caroteno, compostos fenólicos e maior atividade antioxidante do que os frutos. Os extratos etanólicos/acetônicos apresentaram maior teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante que suas respectivas farinhas. Para a indução da hipercolesterolemia nos ratos, foi preparada uma dieta enriquecida de colesterol e ácido cólico. Os ratos receberam diariamente, por 42 dias, as farinhas e extratos etanólicos/acetônicos da cultivar Pedro Sato por gavagem, na dosagem de  $50 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de peso corpóreo. Após esse período, foram anestesiados com tiopental e o sangue retirado por punção cardíaca sendo submetidos às seguintes análises no sangue e no fígado: razão massa do fígado *versus* massa corpóreo, lipídeos hepáticos, colesterol total, HDL, colesterol não HDL, triglicerídeos, proteína C reativa, atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase e glutathione peroxidase) e do marcador de lipoperoxidação (dialdeído malônico). No fígado, foi realizada análise histopatológica para avaliação dos hepatócitos. Não houve diferença na razão da massa do fígado *versus* massa corpóreo e nos lipídeos hepáticos nos ratos hipercolesterolêmicos tratados com as farinhas e os extratos com o controle hipercolesterolêmico. Houve uma diminuição nos níveis de triglicerídeos e colesterol não HDL nos ratos hipercolesterolêmicos tratados com as farinhas e os extratos com o controle hipercolesterolêmico e um aumento no HDL. Para a fração colesterol total, apenas as farinhas das folhas e frutos foram efetivas. As farinhas e extratos diminuíram a atividade da GPx e os níveis de dialdeído malônico. Para a SOD, apenas as farinhas diminuíram de forma significativa a

sua atividade nas amostra de soro. Para as amostras de tecido hepático, não houve diferença na atividade da SOD; porém em relação à GPx, apenas a farinha dos frutos diminuíram a sua atividade. Houve uma diferença significativa nos níveis de dialdeído malônico dos animais hipercolesterolêmicos tratados com a farinha e extratos com os animais do grupo controle hipercolesterolêmicos.

Palavras-chave: *Psidium guajava*. Compostos antioxidantes. Estresse oxidativo.

## GENERAL ABSTRACT

The leaves and fruits of guava are rich in antioxidants compounds, which can inhibit the lipoproteins oxidation, reducing the aggravations of oxidative stress. The aim of this work was to evaluate antioxidant substances and the antioxidant potential of the leaves and fruits of three guava cultivars (Paluma, Pedro Sato and Século XXI), as well as evaluating the effect of Pedro Sato cultivar in the control of hypercholesterolemia and oxidative stress in rats. To prepare the samples, 60 fruits of each cultivar in the region of Lavras were collected, taking into consideration the maturity stage, excluding the mature fruits and the very green ones then the fruit flour was obtained. The leaves were collected in the same orchard of the fruits for the preparation of the flours. The ethanol and acetone extracts of the leaves and fruits were prepared from the flour of the same ones by steeping for 48 hours and solvent evaporation. In the flours, moisture, mineral content, dietary fiber, vitamin C, beta-carotene, phenolic compounds and antioxidant activity were analyzed by DPPH methods and beta-carotene/linoleic acid. In the ethanol/acetone extracts only the phenolic compounds and antioxidant activity were analyzed. The leaves showed the highest contents of dietary fiber, beta-carotene, phenolic compounds and higher antioxidant activity than the fruits. The ethanol and acetone extracts had higher content of phenolic compounds and antioxidant activity than in their respective flours. For the induction of hypercholesterolemia in the rats, a diet rich in cholesterol and colic acid was prepared. The rats daily received, for 42 days, the flours and ethanol/acetone extracts from Pedro Sato cultivar by gavage, at a dose  $50 \text{ mg.Kg}^{-1}$  of body weight. After this period, they were anesthetized with thiopental and blood withdrawn by cardiac puncture being submitted to the following blood and liver analyses: liver mass index *versus* body mass, hepatic lipids, total cholesterol, HDL, non HDL cholesterol, triglycerides, C-reactive protein, activities of the antioxidants enzymes (superoxide dismutase and glutathione peroxidase) and marker of lipoperoxidation (malonic dialdehyde). In the liver, histopathological analysis was realized for evaluation of the hepatocytes. There was no difference in the liver mass index *versus* body mass and in the hepatic lipids in the hipercholesterolemic rats treated with flours and the extracts with the hipercholesterolemic control. There was a decrease in the levels of triglycerides and non – HDL cholesterol in the hipercholesterolemic rats treated with the flours and the extracts with the hipercholesterolemic control and an increase in the HDL. For the fraction total cholesterol, only the flours of the leaves and fruits were effective. The flours and extracts decreased the GPx activity and the levels of malonic dialdehyde. For SOD, only the flours significantly decreased their activity in the serum sample. For the samples of hepatic tissue, there was no difference of SOD; however, in relation to GPx,

only the fruit flour decreased the activity. There was a significant activity in the levels of malonic dialdehyde of the hipercholesterolemic animals treated with flour and extracts with the animals of the hipercholesterolemic control group.

Keywords: *Psidium guajava*. Antioxidants compounds. Oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Redução do O <sub>2</sub> à H <sub>2</sub> O na cadeia de transporte de elétrons..... | 29 |
| Figura 2 | Esquema das principais reações ocorridas durante o processo de lipoperoxidação .....  | 32 |
| Figura 3 | Estrutura química dos aldeídos derivados da lipoperoxidação.....                      | 34 |
| Figura 4 | Estrutura básica dos derivados dos ácidos fenólicos.....                              | 37 |
| Figura 5 | Núcleo fundamental dos flavonoides.....   | 38 |
| Figura 6 | Ciclo oxidativo do ascorbato.....   | 41 |
| Figura 7 | Estrutura química do β-caroteno.....  | 42 |

### Capítulo 3

|          |   |     |
|----------|---|-----|
| Figura 1 | Administração das farinhas e extratos etanólico/acetonicos das folhas e frutos da goiabeira.....  | 97  |
| Figura 2 | Aspecto geral da caixa no experimento.....  | 98  |
| Figura 3 | Aspecto geral do fígado do rato pertencente ao controle hipercolesterolêmico.....   | 111 |
| Figura 4 | Aspecto geral do fígado do rato pertencente ao controle não hipercolesterolêmico.....   | 111 |
| Figura 5 | Fotomicrografia do fígado dos ratos.....  | 113 |
| Figura 6 | Cromatograma do padrão de dialdeído malônico na concentração .O pico à 6,317 minutos refere-se ao dialdeído malônico.....                               | 123 |
| Figura 7 | Cromatograma de dialdeído malônico no soro dos animais do grupo não hipercolesterolêmico. O pico à 7,074 minutos corresponde ao dialdeído malônico..... | 123 |
| Figura 8 | Cromatograma de dialdeído malônico no soro dos animais do grupo hipercolesterolêmico. O pico à 7,044 minutos corresponde ao dialdeído malônico.....     | 124 |

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| Figura 9  | Cromatograma de dialdeído malônico no fígado dos animais do grupo não hipercolesterolêmico. O pico à 6,366 minutos corresponde ao dialdeído malônico..... | 128 |
| Figura 10 | Cromatograma de dialdeído malônico no fígado dos animais do grupo hipercolesterolêmico. O pico à 6,377 minutos corresponde ao dialdeído malônico.....     | 128 |

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Tabela 1  | Teores médios de minerais ( $\text{g Kg}^{-1}$ ) nas farinhas das folhas e frutos de diferentes cultivares da goiabeira.....                                   | 70 |
| Tabela 2  | Teores médios de minerais ( $\text{mg Kg}^{-1}$ ) nas farinhas das folhas e frutos de diferentes cultivares da goiabeira .....                                 | 71 |
| Tabela 3  | Teores ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ ) de fibra alimentar insolúvel nas farinhas de folhas e frutos das três cultivares da goiabeira...          | 73 |
| Tabela 4  | Teores ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ ) de fibra alimentar solúvel nas farinhas de folhas e frutos das três cultivares da goiabeira.....          | 74 |
| Tabela 5  | Teores de vitamina C ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ ) nas farinhas das folhas e frutos de três cultivares da goiabeira.....                      | 75 |
| Tabela 6  | Teores de beta-caroteno ( $\text{mg } 100\text{g}^{-1} \text{ MS}$ ) nas farinhas das folhas e frutos de três cultivares da goiabeira.....                     | 76 |
| Tabela 7  | Teores de compostos fenólicos ( $\text{mg g}^{-1} \text{ MS}$ ) nas farinhas das folhas e frutos de três cultivares da goiabeira.....                          | 77 |
| Tabela 8  | Teores de compostos fenólicos ( $\text{mg g}^{-1} \text{ extrato}$ ) nos extratos etanólicos/acetônicos das folhas e frutos três cultivares da goiabeira.....  | 78 |
| Tabela 9  | Concentração ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) necessária de farinha de folhas e frutos da goiabeira para inibir 50% do radical DPPH formado.....                        | 80 |
| Tabela 10 | Concentração ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) necessária de extratos etanólicos/acetônicos de folhas e frutos da goiabeira para inibir 50% do radical DPPH formado..... | 80 |
| Tabela 11 | Porcentagem de inibição das farinhas das folhas e frutos de  |    |

|                   |  |     |
|-------------------|--|-----|
|                   | três cultivares da goiabeira na concentração de 0,16 mg mL <sup>-1</sup> .....   | 82  |
| Tabela 12         | Porcentagem de inibição dos extratos etanólicos/acetônicos das folhas e frutos das três cultivares da goiabeira na concentração de 0,024 mg mL <sup>-1</sup> ..... | 83  |
| <b>Capítulo 3</b> |  |     |
| Tabela 1          | Tratamentos aplicados nos animais experimentais.....   | 96  |
| Tabela 2          | Razão massa do fígado <i>versus</i> massa corpóreo.....  | 108 |
| Tabela 3          | Porcentagem (%) de lipídios hepáticos totais em amostras de fígado fresco.....   | 109 |
| Tabela 4          | Teores médios dos níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos, não colesterol e HDL.....  | 115 |
| Tabela 5          | Teores médios de proteína C reativa (mg.L <sup>-1</sup> ).....   | 118 |
| Tabela 6          | Expressão das enzimas antioxidantes nas amostras de soro.  | 120 |
| Tabela 7          | Teores médios de dialdeído malônico o no soro (μmol MDA/mg proteína).....  | 122 |
| Tabela 8          | Expressão das enzimas antioxidantes nas amostras de fígado.....  | 125 |
| Tabela 9          | Teores médios de dialdeído malônico no fígado (μmol MDA/mg proteína).....  | 127 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|       |  |
|-------|--|
| DPPH  | Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil   |
| BHT   | Butilhidroxitolueno  |
| IDR   | Ingestão diária recomendada  |
| MS    | Matéria seca   |
| MF    | Matéria fresca   |
| CN    | Controle não hipercolesterolêmico  |
| CH    | Controle hipercolesterolêmico  |
| FFON  | Animais não hipercolesterolemicos tratado com a farinha das folhas                   |
| FFRN  | Animais não hipercolesterolemicos tratado com a farinha dos frutos                   |
| FFOH  | Animais hipercolesterolêmicos tratado com a farinha das folhas                       |
| FFRH  | Animais hipercolesterolêmicos tratado com a farinha dos frutos                       |
| EFON  | Animais não hipercolesterolemicos tratado com extrato etanólico/acetônico das folhas |
| EFRN  | Animais não hipercolesterolemicos tratado com extrato etanólico/acetônico dos frutos |
| EFOH  | Animais hipercolesterolêmicos tratado com extrato etanólico/acetônico das folhas     |
| EFRH  | Animais hipercolesterolêmicos tratado com extrato etanólico/acetônico dos frutos     |
| HDL   | Lipoproteína de baixa densidade  |
| LDL   | Lipoproteína de alta densidade   |
| VLDL  | Lipoproteína de muito baixa densidade  |
| PCR   | Proteína C reativa   |
| SOD   | Superóxido dismutase   |
| GPx   | Glutathione peroxidase   |
| MDA   | Dialdeído malônico   |
| TBARS | Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico   |
| CLAE  | Cromatografia líquida de alta eficiência   |

## SUMÁRIO

|                |  |           |
|----------------|--|-----------|
|                | <b>CAPÍTULO 1: Introdução geral.....</b>   | <b>21</b> |
| <b>1</b>       | <b>INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>21</b> |
| <b>2</b>       | <b>OBJETIVO GERAL .....</b>  | <b>23</b> |
| <b>2.1</b>     | <b>Objetivos específicos.....</b>  | <b>23</b> |
| <b>3</b>       | <b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>  | <b>25</b> |
| <b>3.1</b>     | <b>Descrição e classificação botânica da goiabeira.....</b>  | <b>25</b> |
| <b>3.2</b>     | <b>Composição química dos frutos e folhas da goiabeira.....</b>  | <b>25</b> |
| <b>3.2.1</b>   | <b>Frutos.....</b>   | <b>26</b> |
| <b>3.2.2</b>   | <b>Folhas.....</b>   | <b>27</b> |
| <b>3.3</b>     | <b>Atividade biológica.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>3.4</b>     | <b>Espécies reativas e estresse oxidativo .....</b>  | <b>28</b> |
| <b>3.5</b>     | <b>Lipoperoxidação.....</b>  | <b>31</b> |
| <b>3.6</b>     | <b>Antioxidantes.....</b>  | <b>34</b> |
| <b>3.6.1</b>   | <b>Antioxidantes naturais.....</b>   | <b>35</b> |
| <b>3.6.1.1</b> | <b>Compostos fenólicos.....</b>  | <b>36</b> |
| <b>3.6.1.2</b> | <b>Vitamina C (ascorbato).....</b>   | <b>40</b> |
| <b>3.6.1.3</b> | <b>Carotenoides.....</b>   | <b>42</b> |
| <b>3.6.2</b>   | <b>Antioxidantes enzimáticos.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>3.6.2.1</b> | <b>Superóxido dismutase.....</b>   | <b>43</b> |
| <b>3.6.2.2</b> | <b>Sistema glutaciona peroxidase (GSHPx)/glutaciona<br/>redutase (GSHR).....</b>                                     | <b>44</b> |
| <b>3.7</b>     | <b>Fibra alimentar.....</b>  | <b>45</b> |
| <b>3.8</b>     | <b>Aterosclerose e hipercolesterolemia.....</b>  | <b>46</b> |
|                | <b>REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>49</b> |
|                | <b>CAPÍTULO 2: Substâncias antioxidantes e minerais das<br/>folhas e frutos de três cultivares da goiabeira.....</b> | <b>59</b> |
| <b>1</b>       | <b>INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>61</b> |
| <b>2</b>       | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>   | <b>63</b> |
| <b>2.1</b>     | <b>Material.....</b>   | <b>63</b> |
| <b>2.2</b>     | <b>Preparo das amostras.....</b>   | <b>63</b> |
| <b>2.3</b>     | <b>Análises.....</b>   | <b>63</b> |
| <b>2.3.1</b>   | <b>Umidade.....</b>  | <b>64</b> |
| <b>2.3.2</b>   | <b>Teor de minerais.....</b>   | <b>64</b> |
| <b>2.3.3</b>   | <b>Fibra alimentar.....</b>  | <b>64</b> |
| <b>2.3.4</b>   | <b>Vitamina C.....</b>   | <b>64</b> |
| <b>2.3.5</b>   | <b>Beta-caroteno.....</b>  | <b>65</b> |
| <b>2.3.6</b>   | <b>Determinação dos compostos fenólicos.....</b>   | <b>65</b> |
| <b>2.3.7</b>   | <b>Atividade antioxidante.....</b>   | <b>66</b> |
| <b>2.3.7.1</b> | <b>Método DPPH.....</b>  | <b>66</b> |

|          |   |     |
|----------|---|-----|
| 2.3.7.2  | Método beta-caroteno/ácido linoléico.....   | 67  |
| 2.4      | Análises estatísticas .....   | 68  |
| 3        | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>  | 69  |
| 3.1      | Umidade.....  | 69  |
| 3.2      | Teor de minerais.....   | 69  |
| 3.3      | Fibra alimentar.....  | 72  |
| 3.4      | Vitamina C.....   | 74  |
| 3.5      | Beta-caroteno.....  | 76  |
| 3.6      | Compostos fenólicos.....  | 77  |
| 3.7      | Atividade antioxidante.....   | 79  |
| 3.7.1    | Método DPPH.....  | 79  |
| 3.7.2    | Método beta caroteno/ácido linoléico .....  | 81  |
| 4        | <b>CONCLUSÃO.....</b>   | 84  |
|          | <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | 85  |
|          | <b>CAPÍTULO 3: controle da hipercolesterolemia e estresse oxidativo por folhas e frutos da goiabeira.....</b> | 90  |
| 1        | <b>INTRODUÇÃO.....</b>  | 93  |
| 2        | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>  | 95  |
| 2.1      | Amostras.....   | 95  |
| 2.2      | Ensaio biológico.....   | 95  |
| 2.3      | Preparo da dieta hipercolesterolêmica.....  | 98  |
| 2.4      | Preparo das amostras de fígado e sangue para análises.....  | 99  |
| 2.4.1    | Fígado.....   | 99  |
| 2.4.2    | Sangue.....   | 99  |
| 2.5      | Parâmetros analisados.....  | 100 |
| 2.5.1    | Razão massa do fígado <i>versus</i> massa corpóreo.....   | 100 |
| 2.5.2    | Determinação dos lipídeos hepáticos totais.....   | 100 |
| 2.5.3    | Determinação do colesterol sérico total.....  | 100 |
| 2.5.4    | Determinação dos níveis séricos de triglicérides.....   | 101 |
| 2.5.5    | Determinação dos níveis séricos de HDL.....   | 101 |
| 2.5.6    | Determinação dos níveis séricos de colesterol não HDL.....  | 102 |
| 2.5.7    | Determinação da proteína C reativa.....   | 102 |
| 2.5.8    | Determinação do teor de proteínas totais.....   | 103 |
| 2.5.8.1  | Soro.....   | 103 |
| 2.5.8.2  | Fígado.....   | 103 |
| 2.5.9    | Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD).....  | 104 |
| 2.5.10   | Determinação da atividade da glutathione peroxidase (GPx).....  | 104 |
| 2.5.11   | Determinação da peroxidação lipídica .....  | 105 |
| 2.5.11.1 | Preparo das amostras.....   | 105 |
| 2.5.11.2 | Análise cromatográfica.....   | 105 |

|        |  |     |
|--------|--|-----|
| 2.5.12 | Análise histopatológica.....   | 106 |
| 2.6    | Análise estatística.....   | 107 |
| 3      | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>   | 108 |
| 3.1    | Razão massa do fígado <i>versus</i> massa corpóreo.....                    | 108 |
| 3.2    | Lipídios totais hepáticos.....   | 109 |
| 3.3    | Análise histopatológica.....   | 112 |
| 3.4    | Colesterol total e frações.....  | 114 |
| 3.5    | Proteína C reativa.....  | 117 |
| 3.6    | Atividade das enzimas antioxidantes e avaliação da<br>lipoperoxidação..... | 118 |
| 3.6.1  | Soro.....  | 119 |
| 3.6.2  | Fígado.....  | 124 |
| 4      | <b>CONCLUSÃO.....</b>  | 129 |
|        | <b>REFERÊNCIAS.....</b>  | 130 |
|        | <b>ANEXO.....</b>  | 134 |

## **CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL**

### **1 INTRODUÇÃO**

A oxidação é um processo metabólico que provoca a produção de energia necessária para as atividades essenciais das células. Entretanto, o metabolismo do oxigênio nas células vivas também provoca a produção de espécies reativas de oxigênio, podendo conduzir ao estresse oxidativo, que tem sido associado ao desenvolvimento de muitas doenças crônicas não transmissíveis, incluindo o câncer, doenças cardíacas e doenças neurodegenerativas.

A modificação oxidativa das partículas de lipoproteínas de alta densidade pelos radicais livres é considerada um dos principais eventos na indução e progressão da aterosclerose. Dados da literatura indicam que a lipoperoxidação está associada às doenças cardiovasculares.

A aterosclerose tem sido a causa principal de doenças coronarianas. Pode ser causado pelo aumento das lipoproteínas no plasma e turbulências hemodinâmicas, o que provoca o acúmulo de macrófagos repletos de colesterol na parede arterial, proliferação de certos tipos celulares que gradualmente diminuem a luz vascular e impedem o fluxo sanguíneo. Além disso, aumentam a rigidez da parede vascular.

A busca por uma vida saudável vem se tornando a preocupação de muitas pessoas do mundo inteiro nos últimos anos. Nesse caminho, elas provavelmente deparar-se-ão com uma receita antiga e simples: o consumo regular de frutas e verduras. Estas, cada vez mais, mostram-se como grandes aliadas na prevenção de diversas doenças, em razão de suas propriedades antioxidantes atribuídas à presença de compostos fenólicos, vitamina C,

vitamina E e carotenoides principalmente. Entretanto, os teores desses fitoquímicos nos vegetais são influenciados por fatores genéticos e condições climáticas edáficas, entre outras. Por outro lado, sabe-se que algumas frutas e hortaliças podem potencialmente conter maior teor de compostos antioxidantes nos resíduos (pele, folhas, cascas e sementes) do que na polpa, ou ainda o perfil dos fitoquímicos ser diferenciado nessas partes do vegetal.

Levando em consideração o elevado custo dos medicamentos e seu uso prolongado, os pacientes têm recorrido ao uso desses vegetais como um tratamento alternativo; porém, esses tratamentos têm sido utilizados de forma empírica pela população, necessitando de estudo que permitam conclusões mais confiáveis.

A goiaba é uma fruta considerada muito importante dentro do contexto da fruticultura brasileira, encontrando-se em expansão. O aumento do consumo está associado à grande divulgação das qualidades nutricionais da fruta. Além da qualidade nutricional, possuem outras ações no organismo, o que estimula o seu consumo, entre eles pode-se citar a ação hipoglicemiante, atividade antioxidante e efeitos sobre a hemostasia e coagulação sanguínea.

## **2 OBJETIVO GERAL**

Neste trabalho objetivou-se avaliar a capacidade antioxidante de três cultivares de folhas e frutos da goiabeira, caracterizar as substâncias responsáveis por essa atividade e determinar os possíveis efeitos das farinhas das folhas e frutos da cultivar Pedro Sato e seus respectivos extratos etanólicos/acetônicos sobre a peroxidação lipídica, atividade de enzimas antioxidantes e perfil lipídico em ratos hipercolesterolêmicos.

### **2.1 Objetivos específicos**

- a) Avaliar a capacidade antioxidante das folhas e frutos e seus respectivos extratos etanólicos/acetônicos de três cultivares da goiabeira (Pedro Sato, Paluma e Século XXI), pelos métodos: DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil) e  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico;
- b) Quantificar o teor de compostos antioxidantes (compostos fenólicos, vitamina C e  $\beta$ -caroteno) presentes nas folhas e frutos e nos seus respectivos extratos etanólicos/acetônicos de três cultivares da goiabeira (Pedro Sato, Paluma e Século XXI);
- c) Quantificar o teor de fibra alimentar e minerais nas folhas e frutos de três cultivares da goiabeira (Pedro Sato, Paluma e Século XXI);
- d) Determinar a concentração de colesterol total e frações no soro de ratos hipercolesterolêmicos e não hipercolesterolêmicos que ingeriram as folhas e frutos e seus extratos etanólicos/acetônicos da cultivar Pedro Sato;
- e) Determinar a concentração do marcador da inflamação: proteína C reativa no soro de ratos hipercolesterolêmicos e não hipercolesterolêmicos, que ingeriram as folhas e frutos e seus extratos etanólicos/acetônicos da cultivar Pedro Sato;

- f) Avaliar o efeito das folhas e frutos e seus extratos etanólicos/acetônicos da cultivar Pedro Sato no teor de lipídios em fígados de ratos hipercolesterolêmicos e não hipercolesterolêmicos;
- g) Analisar os efeitos das folhas e frutos e seus extratos etanólicos/acetônicos da cultivar Pedro Sato nas lesões de fígados ratos hipercolesterolêmicos e não hipercolesterolêmicos;
- h) Avaliar a peroxidação de lipídios em fígado e soro de ratos hipercolesterolêmicos e não hipercolesterolêmicos que receberam as folhas e fruto e seus respectivos extratos etanólicos/acetônicos da cultivar Pedro Sato;
- i) Analisar o efeito das folhas e frutos e seus extratos etanólicos/acetônicos da cultivar Pedro Sato sobre a atividade de superóxido dismutase e glutathione peroxidase no fígado e soro de ratos hipercolesterolêmicos e não hipercolesterolêmicos;

### **3 REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **3.1 Descrição e classificação botânica da goiabeira**

A goiabeira pertence à família Myrtaceae e ao gênero *Psidium*. Na América Central e América do Sul, são encontradas cerca de 3020 espécies conhecidas (MANICA, 2002). No Brasil, é encontrada em todo o país, destacando-se os Estados de São Paulo, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul.

No sul de Minas Gerais, é cultivada por pequenos produtores, que conduzem os pomares como forma de subsistência, produzindo apenas uma vez ao ano. Porém, alguns produtores estão utilizando conhecimento tecnológico disponível para otimizar sua exploração e dar importância ao cultivo como um empreendimento comercial (HOJO et al., 2007).

A árvore apresenta um tamanho de aproximadamente 10 m, com uma casca fina, lisa e desigual. Os frutos são carnosos de coloração amarela quando, maduros com cerca de 5 cm de diâmetro; e seu mesocarpo é comestível de coloração rosa ou branca, contendo inúmeras sementes duras. Os tipos mais comuns são: a vermelha e a branca, sendo a vermelha mais saborosa e nutritiva. As folhas têm um comprimento de 5-10 cm, hipoestomáticas, com um grande número de tricomas e glândulas oleíferas (GUTIÉRREZ; MITCHELL; SOLIS, 2008; MANICA, 2002).

#### **3.2 Composição química dos frutos e folhas da goiabeira**

As folhas e frutos da goiabeira apresentam uma diversidade de compostos bioativos que estão apresentados abaixo.

### 3.2.1 Frutos

Além da expressividade econômica, a goiaba apresenta um grande valor nutricional; porém, apresenta variação na composição química dependendo da espécie, das condições ambientais do cultivo e estágio de maturação do fruto (SOARES et al., 2007), o que influencia a sua atividade biológica.

Os frutos são caracterizados pelo baixo conteúdo de carboidratos (13,2%), gorduras (0,53%) e proteínas (0,88%) e pelo elevado teor de água (84,9%) (MEDINA; PAGANO, 2003). Dados da literatura demonstram a presença de açúcares (glicose 4,14% e sacarose 1,62%), vitaminas A e B3, riboflavina (0,03-004 mg 100g<sup>-1</sup>), elementos minerais, como cálcio (9,1-17mg 100g<sup>-1</sup>), fósforo (17,8-30 mg 100g<sup>-1</sup>), potássio (MANICA, 2002), manganês, em combinação com os ácidos fosfórico, oxálico e málico (NADKARNI; NADKARNI, 1999), saponinas, fibra alimentar (48-49 g 100g<sup>-1</sup>) (JIMENEZ; RINCON; SAURA, 2001) e ácido ascórbico (50-100 mg 100g) com teores superiores aos da laranja (THAIPONG et al., 2005), limão Tahiti, pimentão-verde e maracujá (OLATUNJI-BELLO et al., 2007), o que faz da goiaba um dos frutos mais completos e equilibrados no que diz respeito ao valor nutritivo (MANICA, 2002).

Os compostos fenólicos também fazem parte da constituição química do fruto. Os compostos fenólicos presentes nos frutos de goiaba são: isoquercetina, quercetina (OLATUNJI-BELLO et al., 2007), miricetina, antocianinas, ácido caféico, ácido felúrico, quavina B (THAIPONG et al., 2005). Os frutos imaturos contêm elevados teores de taninos, tais como: o ácido elágico e gálico, que causam uma sensação adstringente, quando ingeridos.

### 3.2.2 Folhas

As folhas da goiabeira apresentam óleos essenciais, cujos principais componentes são o  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, limoneno, mentol, bisabolol, 1,8-cineol, álcool isopropil,  $\beta$ -cariofileno, nerolidol, selinenol e cariofileno (DOMINGOS et al., 2003; LI et al., 2003).

Além dos óleos essenciais, as folhas apresentam uma diversificada composição de compostos fenólicos. Os principais flavonoides relatados na literatura são a quercetina, canferol e miricitina, guavin B (ALMEIDA et al., 2006). Em folhas maduras, foram encontrados miricitina ( $208.44 \text{ mg kg}^{-1}$ ), luteolina ( $51.22 \text{ mg kg}^{-1}$ ), quercetina ( $2883.08 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e canferol ( $97.25 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (VARGAS et al., 2006). Os ácidos gálico ( $1000-1600 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ) e ferúlico ( $100-600 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ) foram detectados por Chen e Yen (2007).

Furlan e Salatino (2006) identificaram a presença de 14 picos de flavonoides em duas cultivares (Paluma e Pedro Sato), sendo a maioria derivadas da quercetina. Os mais abundantes foram quercetina-3-O-arabinose, quercetina-3-O-glucosila, quercetina-3-O-xilosila, quercetina-3-O-ramnosila e diglicosídeo de quercetina.

### 3.3 Atividade biológica

As folhas e frutos da goiabeira foram introduzidos na terapêutica popular para aliviar, curar e prevenir várias doenças. Têm sido usados para o controle do diabetes mellitus, hipertensão (YUSOF; SAID, 2004), distúrbios gastrointestinais (diarréia, dores de estômago, gastroenterite, indigestão e disenteria) (LOZOYA et al., 1999; ZHANG et al., 2003) e doenças cardiovasculares (YAMASHIRO et al., 2003).

Além disso, possui ações anti-inflamatória (MURUGANANDAN et al., 2001), antimicrobiana (CHAH et al., 2006; SATO et al., 2000), antioxidante (QIAN; NIHORIMBERE, 2004; THAIPONG et al., 2006), hepatoprotetora (ROY; KAMATH; ASAD, 2006), anticancerígena (CHEN; YEN, 2007) e anti-malária (NUNDKUMAR; OJEWOLE, 2002).

As atividades biológicas da goiabeira no organismo humano estão associadas principalmente com seus teores de compostos fenólicos, tais como ácido felúrico, quercetina, guavin B (THAIPONG et al., 2005), ácido gálico e ácido cafeico e aos elevados teores de ácido ascórbico (JIMENEZ; RINCON; SAURA, 2001).

### **3.4 Espécies reativas e estresse oxidativo**

Radicais livres são todas as espécies químicas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica conferindo um alto poder de reatividade, podendo causar danos ao organismo por reagir com praticamente qualquer molécula que entra em contato (HALLIWELL, 2006). São denominados de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) ou Nitrogênio (ERNs); sua produção ocorre de forma contínua pelas células como parte dos seus processos metabólicos (HALLIWELL, 2001).

Normalmente, as EROs são mantidas em baixas concentrações pelo sistema de defesa antioxidante, mas quando sua produção está aumentada, elas podem sobrecarregar a capacidade desse sistema, resultando num estado pró-oxidante chamado de estresse oxidativo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; HALLIWELL, 2001).

O estresse oxidativo favorece a ocorrência de ataques das EROs a componentes celulares, podendo resultar em lesões oxidativas em macromoléculas e diversas estruturas celulares que, se não forem reparadas, irão

alterar a funcionalidade de células, tecidos e órgãos. Estão presentes em uma grande variedade de condições patológicas e acredita-se que funcione como agente patogênico em muitas dessas condições (VICTOR et al., 2009).

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o  $O_2$  sofre redução tetravalente com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de  $H_2O$ . Durante esse processo, são formados intermediários reativos, como radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Figura 1). Outras espécies reativas formadas durante os processos metabólicos são o oxigênio singleto ( $^1O_2$ ), radical alquila ( $R^{\bullet}$ ), radical alcóxila ( $RO^{\bullet}$ ), hidroperóxido ( $ROOH$ ), óxido nítrico ( $NO$ ) e peroxinitrito ( $ONOO$ ). As EROs podem surgir também de outras fontes, como NADPH oxidase, xantina oxidase, óxido nítrico sintase, auto-oxidação de catecolaminas, aumento dos níveis de angiotensina II e aldosterona, e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Raios-X, ultra-som e luz ultravioleta são fatores físicos que também promovem a formação dessas moléculas reativas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; BERRY; HARE, 2004; CHATTERJEE, 2009).

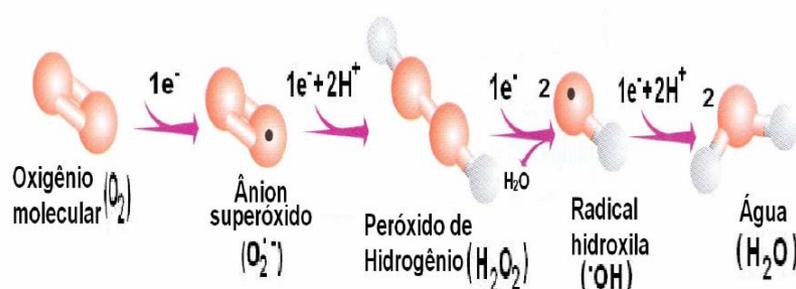


Figura 1 Redução do  $O_2$  a  $H_2O$  na cadeia de transporte de elétrons  
Fonte: Barreiros, David e David (2006)

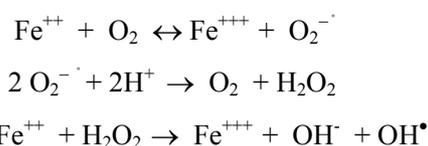
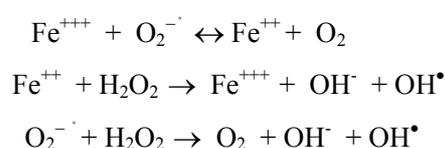
O radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), formado na redução do oxigênio e ativação dos neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos, não é reativo, mas ao reagir com o óxido nítrico (NO), forma o radical peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Além disso, o  $O_2^{\bullet-}$  é capaz de inativar enzimas que possuem um centro ferro-enxofre, causando a liberação do íon ferro (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; ZHAO; WHITEMAN, 1999).

O radical hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ) é uma das EROs mais tóxicas ao organismo; devido à sua meia-vida muito curta, dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. Atua no próprio local onde foi gerado sobre macromoléculas, levando a modificações celulares que poderão provocar a morte celular (GOUVÊA, 2004).

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é considerado como uma ERO pelas reações que pode desencadear e os radicais que pode gerar. Pode ser gerada pela dismutação do superóxido e por ação de algumas enzimas, como a xantina oxidase. O  $H_2O_2$  pode degradar algumas hemoproteínas, como a mioglobina e hemoglobina, liberando ferro (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERRIDGE, 2007).

O estudo sobre os mecanismos de lesão oxidativa tem confirmado a ação catalítica dos metais nas reações que levam a essas lesões. O papel dos metais na formação dos radicais livres é confirmado pelas reações de Fenton e de Haber-Weiss, conforme descrito abaixo (HALLIWELL; ZHAO; WHITEMAN, 1999). O ferro, sendo o metal mais abundante do nosso organismo, é o mais capacitado para catalisar as reações de oxidação.

Retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis é o papel dos antioxidantes, reduzindo, dessa forma, o dano celular. São importantes como forma de prevenção e tratamento de doenças nas quais o estresse oxidativo está envolvido.

Reação de Fenton:Reação de Haber-Weiss:**3.5 Lipoperoxidação**

A lipoperoxidação consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poliinsaturado, produzindo radicais lipoperóxido (alquila (L<sup>•</sup>), alcóxila (LO<sup>•</sup>) e peróxilas (LOO<sup>•</sup>)), hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e produtos da fragmentação, como dialdeído malônico (LIMA; ABDALLA, 2001). Ocorre em três etapas – iniciação, propagação e término (Figura 2).

Nessa etapa, o ácido graxo poliinsaturado sofre ataque de uma espécie reativa para abstrair um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno (-CH<sub>2</sub>-), formando um radical de carbono. Esse radical é estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado. Em meio aeróbico, o radical alquila formado se combina com o oxigênio, formando o radical peróxila, o qual pode abstrair um hidrogênio alílico de outro ácido graxo, gerando outro radical de carbono e promovendo a etapa de propagação. Nessa etapa, formam-se diversos peróxidos, que podem ser mensurados, servindo como índice de oxidação lipídica no organismo humano. A reação do radical peróxila com o átomo de hidrogênio abstraído gera um hidroperóxido lipídico (LOOH). A terceira e última etapa, a fase de terminação, ocorre pela aniquilação

dos radicais formados, originando produtos não radicalares (HALLIWEL; CHIRICO, 1993; LIMA; ABDALA, 2001).

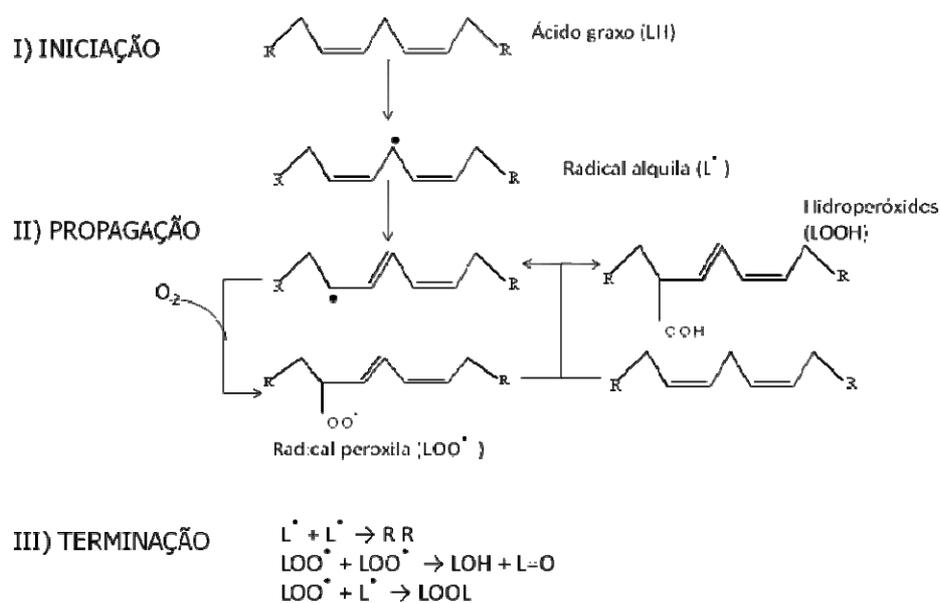


Figura 2 Esquema das principais reações ocorridas durante o processo de lipoperoxidação  
Fonte: Barreiros, David e David (2006)

Os mecanismos e a sequência de eventos pelos quais os radicais livres interferem nas funções celulares não estão completamente elucidados, mas um dos mais importantes eventos parece ser a lipoperoxidação, a qual resulta em dano da membrana celular, que pode eventualmente levar à morte celular. Esse processo promove grave alteração da membrana celular, causando perda da fluidez, alteração da função secretora e dos gradientes iônicos transmembrana, perda da seletividade na troca iônica, com liberação do conteúdo de organelas,

levando à formação de produtos citotóxicos, até a morte celular (VOLP et al., 2008).

As lipoproteínas do plasma são alvos de ataques dos EROs, promovendo sua oxidação com modificação da estrutura lipídica e proteica das apolipoproteínas, o que gera alterações nas suas propriedades físico-químicas. O conteúdo de antioxidantes da partícula de LDL é crucial para sua proteção. Seus principais antioxidantes são a vitamina E, carotenoides e o ubiquinol-10 (ESTERBAUER et al., 1992). Estudos *in vitro* mostraram que a oxidação de LDL somente se inicia após o estresse oxidativo haver depletado o conteúdo de antioxidante celular. *In vivo*, é provável que a magnitude do processo oxidativo e, mesmo, a ocorrência ou não de oxidação de LDL dependa do balanço entre a intensidade da agressão oxidativa e a capacidade das defesas antioxidantes.

O processo de modificação oxidativo da LDL ocorre em cascata, com a formação de radicais peroxila provenientes dos lipídios da camada externa da lipoproteína. A cadeia de reações oxidativas se propaga para o centro da lipoproteína, modificando os ácidos graxos e colesterol. Por fim, o dano oxidativo atinge as proteínas da molécula, resultando em uma completa modificação da estrutura inicial da lipoproteína (AVIRAM et al., 2000).

A LDL oxidada afeta a vasodilatação dependente do endotélio, mediante do decréscimo da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), propiciando o desenvolvimento da aterosclerose.

A avaliação da oxidação das lipoproteínas pode ser realizada pela mensuração: 1) dos produtos derivados da lipoperoxidação e da modificação oxidativa dos resíduos de aminoácidos das apolipoproteínas; 2) da oxidabilidade das lipoproteínas *in vitro*; 3) pela detecção direta das partículas de lipoproteínas modificadas (LIMA; ABDALLA, 2001).

Os produtos derivados da oxidação de ácidos graxos insaturados e do colesterol são: isoprostanos, hidroperóxidos lipídicos, aldeídos e fosfolípidos

oxidados, esses produtos podem ser determinados nos fluidos biológicos por meio de técnicas cromatográficas e colorimétricas (ABDALLA; SENA, 2008).

Os aldeídos são formados pela clivagem beta da cadeia dos ácidos graxos oxidados. Entre eles, têm-se o dialdeído malônico e o 4-hidroxinonenal (Figura 3), que se ligam aos resíduos de aminoácidos positivamente carregados das apolipoproteínas, produzindo alterações de cargas na superfície das lipoproteínas (MOORE; ROBERTS, 1998).



Figura 3 Estrutura química dos aldeídos derivados da lipoperoxidação  
 Fonte: Barreiros, David e David (2006)

A determinação da concentração do dialdeído malônico pela sua condensação com o ácido tiobarbitúrico em meio ácido à 90° C, formando o composto MDA:TBA (1:2), C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, que tem absorção máxima em 532 nm e é uma das técnicas mais utilizadas para determinar o grau de lipoperoxidação (LIMA et al., 2001).

### 3.6 Antioxidantes

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. De acordo com Halliwell e Chirico (1993), antioxidante é qualquer substância que, quando presente em

baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo. Portanto, são compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios das reações que levam à oxidação de macromoléculas ou de estruturas celulares (BRAMBILLA et al., 2008; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O mecanismo de defesa antioxidante do organismo inclui antioxidantes endógenos representados por enzimas como: superóxido dismutase, catalase e a glutathione peroxidase e fatores não enzimáticos: glutathione, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), coenzima Q e proteínas que se ligam a metais (ferritina, lactoferrina, albumina e ceruloplasmina) (DUTHIE; BROWN, 1994) e antioxidantes exógenos: ácido ascórbico, vitamina E, carotenoides e compostos fenólicos que são adquiridos a partir da dieta (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Os antioxidantes são classificados de acordo com o modo de ação, em primários e secundários. Podendo ser sequestrantes de radicais livres, de oxigênio e de íons metálicos capazes de catalisar a oxidação lipídica. Os antioxidantes primários reagem com radicais lipídicos de alta energia, para convertê-los a produtos mais estáveis. Já os secundários, conhecidos como preventivos, têm a função de retardar a iniciação da reação em cadeia por quebra dos hidroperóxidos. Esses últimos atuam como um suporte aos antioxidantes endógenos e são obtidos por meio da dieta (DUARTE et al., 2009).

### **3.6.1 Antioxidantes naturais**

Os antioxidantes naturais estão presentes nos vegetais e o seu consumo está associado à diminuição do risco de doenças cardiovasculares e câncer, o que é indicado por vários estudos epidemiológicos. Um dos principais aspectos relacionados ao efeito protetor desses vegetais tem sido atribuído à presença de

compostos fenólicos, vitamina C,  $\beta$ - caroteno e vitamina E (OLIVEIRA et al., 2009).

### **3.6.1.1 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos, produtos secundários do vegetal, constituem um amplo e complexo grupo de fitoquímicos, com mais de 8000 estruturas conhecidas. Têm sido destacados por apresentarem efeito benéfico na prevenção de doenças cardiovasculares, cânceres, inflamações e doenças degenerativas. São classificados como antioxidantes por serem agentes redutores que possuem a capacidade de proteger o organismo contra o estresse oxidativo. O organismo humano não produz essas substâncias químicas protetoras, cabendo ao homem obtê-las por meio da alimentação (OLIVEIRA et al., 2009).

O entendimento da sua estrutura química é importante para que se possam avaliar os efeitos biológicos como: disponibilidade, atividade antioxidante, interações específicas com receptores celulares e enzimas, entre outras (ENGLER; ENGLER, 2004).

Os compostos fenólicos são substâncias que possuem um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxilas, incluindo derivados funcionais (ésteres, ácidos, etc) (VOLP et al., 2008). Variam desde moléculas simples, como os ácidos fenólicos, até compostos altamente polimerizados, como os taninos. Nas plantas, apresentam-se em forma conjugada com um ou mais resíduos de açúcares unidos aos grupos hidroxilas (SIMÕES et al., 2004).

Os compostos fenólicos podem se agrupar em diferentes classes, dependendo da sua estrutura química básica, podendo ser classificados como: ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, estilbenos e lignanas (SIMÕES et al., 2004).

Os ácidos fenólicos podem ser subdivididos em dois grandes grupos: os ácidos hidroxibenzoicos (como exemplos: ácidos p-hidroxibenzoico, protocatequina, vanílico, serínico e gálico) e os ácidos hidroxicinâmicos (p-cumárico, cafeico e ferúlico) (Figura 4) (SIMÕES et al., 2004).



Figura 4 Estrutura básica dos derivados dos ácidos fenólicos  
Fonte: Simões et al. (2004)

Os flavonoides são os compostos fenólicos mais abundantes. São caracterizados por possuírem dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três átomos de carbono (Figura 5). São subclassificados em seis grupos principais, de acordo com o grau de oxidação do oxigênio heterocíclico: flavonas (como exemplo: luteolina), flavonóis (quercetina), catequinas ou flavanóis (epicatequina), flavanonas (naringenina), antocianinas (cianina) e isoflavonas (daidzeina) (SIMÕES et al., 2004; VOLP et al., 2008).

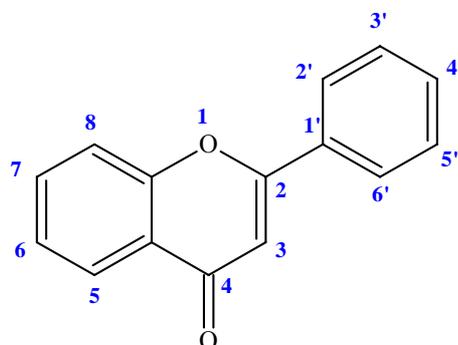


Figura 5 Núcleo fundamental dos flavonóides  
Fonte: Simões et al. (2004)

A atividade antioxidante se deve à capacidade de doar hidrogênio, que é dependente do número e da posição dos grupamentos hidroxilas e sua conjugação, assim como da presença de elétrons doadores no anel aromático da estrutura, devido à capacidade que o grupo aromático possui de suportar o desaparecimento de elétrons. A eficácia desses compostos diminuem com o aumento do número de hidroxilas substituídas por moléculas de açúcar (OLIVEIRA et al., 2009; VOLP et al., 2008).

Entre os antioxidantes naturais, os flavonoides estão entre os de maior caráter lipofílico, perdendo apenas para o  $\alpha$ -tocoferol; porém, Auger et al. (2004) e Teissedre et al. (1996) demonstraram que os flavonoides catequinas e procianidinas são mais potentes para inibir a oxidação das LDL do que o  $\alpha$ -tocoferol. Essa observação se deve à localização dos antioxidantes nas membranas lipídicas. Os  $\alpha$ -tocoferóis estão presentes dentro da bicamada dos fosfolípídeos, o que os tornam menos acessíveis, ao passo que os flavonoides se localizam na superfície polar da bicamada da membrana, aumentando a sua capacidade em capturar os radicais livres presentes no sangue.

Alguns compostos fenólicos têm ação hipocolesterolêmica mediada por redução na absorção de colesterol no intestino, aumento na excreção de ácidos biliares e inibição da ação de enzimas de substâncias de resposta inflamatória (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004).

Relatos da literatura mostram uma correlação entre o consumo de compostos fenólicos presentes nos vegetais e a inibição da oxidação de LDL, prevenindo o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (PERSON et al., 1999; SOUZA et al., 2008). Além da atividade como antioxidante de LDL, os flavonoides apresentam atividade antiplaquetária e anti-inflamatória (RIQUE; SOARES; MEIRELLES, 2002).

A estrutura química é um fator determinante da proporção e extensão da absorção dos compostos fenólicos. No momento da ingestão, não ocorre uma digestão, pois a saliva não tem o poder de realizar essa ação sobre os compostos fenólicos. Alguns compostos fenólicos sofrem à ação do suco gástrico, quebrando em moléculas menores. Nas células intestinais, ocorrem duas importantes ações: a deglicosilação dos compostos ligados e a glicuronação do composto fenólico na forma livre a uma molécula de albumina, ação que influencia a sua capacidade de difusão através das membranas biológicas. No fígado, ocorre a adição de um grupo sulfato ou metila com a função de diminuir a toxicidade do composto e aumentar seu tempo de circulação no organismo antes da sua eliminação (GERMANO et al., 2006; HOLST; WILLIAMSON, 2008). Os compostos fenólicos de elevado peso molecular e alto grau de polimerização não sofrem ação enzimática no trato gastrointestinal e não são absorvidos no intestino delgado, sendo eliminados pelas fezes. A eliminação de compostos de menor peso molecular é realizada pela urina ou pela bile, via pela qual os compostos ainda podem chegar ao duodeno e serem absorvidos (RODRIGUES et al., 2008).

A extração dos compostos fenólicos nos vegetais é influenciada por vários fatores, tais como: sua natureza química, o método de extração, o tamanho das partículas da amostra, o tempo e as condições de estocagem da amostra, bem como a presença de substâncias interferentes. Os extratos fenólicos são sempre uma mistura de diferentes classes de compostos fenólicos que são solúveis no solvente utilizado. Segundo Souza et al. (2008), o uso de soluções hidroalcoólicas oferece um resultado satisfatório na extração.

### **3.6.1.2 Vitamina C (ascorbato)**

O ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel encontrada nos compartimentos aquosos. Sua oxidação produz inicialmente o radical semidesidroascorbato, que é pouco reativo, podendo ser reconvertido em ascorbato ou duas moléculas dele podem sofrer desproporcionamento, originando uma molécula de desidroascorbato e regenerando uma molécula de ascorbato. O desidroascorbato pode ser, então, regenerado para ascorbato mediante um sistema enzimático, ou ser oxidado irreversivelmente, gerando oxalato e treonato (Figura 6) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

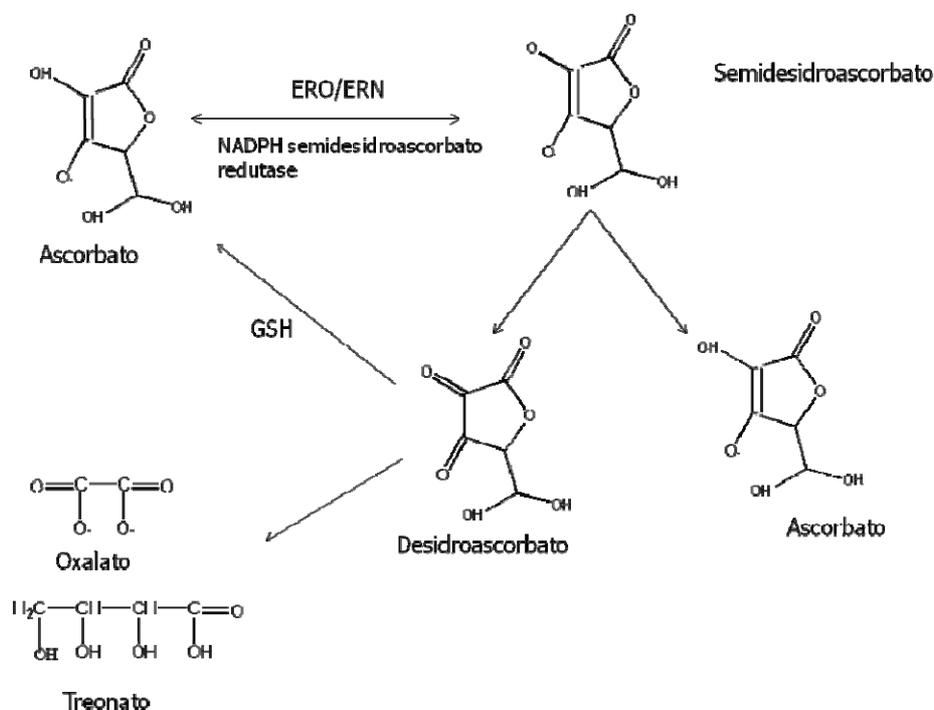


Figura 6 Ciclo oxidativo do ascorbato  
 Fonte: Barreiros, David e David (2006)

A vitamina C exerce um papel fundamental na inibição da lipoperoxidação, atuando de duas maneiras:

- no plasma sanguíneo, atua na prevenção pela reação com as EROs e ERNs presentes;
- na restauração, doando hidrogênio ao radical lipídico.

Nas membranas celulares, atua em parceria com o  $\alpha$ -tocoferol. O radical livre normalmente abstrai um próton do carbono metilênico alílico, e o radical alquila ( $L\cdot$ ) formado rapidamente adiciona oxigênio tripleto, gerando o radical peroxila ( $LOO\cdot$ ). Nessa etapa, o  $\alpha$ -tocoferol age, doando um hidrogênio para esse radical, formando o hidroperóxido ( $LOOH$ ) e o radical tocoferoxila. O

ascorbato na interface da membrana celular regenera o tocoferol, doando um hidrogênio e transformando-se em semidesidroascorbato (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

### 3.6.1.3 Carotenoides

Entre os carotenoides, o  $\beta$ -caroteno (Figura 7) é a mais importante fonte de vitamina A. Eles formam um tipo incomum de agentes redutores biológicos, pois reduzem melhor os produtos de oxidação a baixos níveis de oxigênio. Na maioria dos tecidos biológicos, o nível de oxigênio é baixo, de modo que os carotenoides adquirem importância como antioxidantes (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

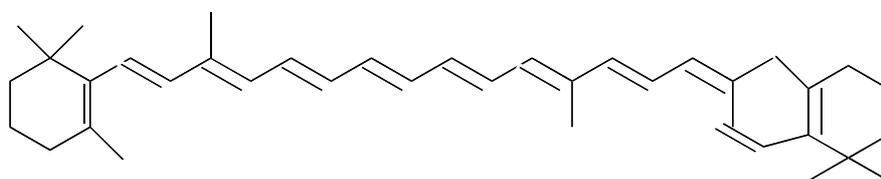


Figura 7 Estrutura química do  $\beta$ -caroteno  
Fonte: Barreiros, David e David (2006)

A principal atividade antioxidante dos carotenoides é a desativação do oxigênio singlete, sendo a velocidade para essa reação superior à dos tocoferóis. A desativação do oxigênio ocorre de duas formas: pela transferência física da energia de excitação do oxigênio para o carotenoide e pela reação química do carotenoide com o oxigênio. Outra atividade recentemente estudada é do sequestro de radicais peroxila (BURRI, 1997; PALACE et al., 1999).

O processo completo de oxidação dos carotenoides pode ser dividido em duas etapas. Na primeira, ocorre a formação de éteres cíclicos e compostos

carbonílicos. Na segunda etapa, os produtos primários são convertidos em compostos carbonílicos de cadeias menores, com liberação de CO<sub>2</sub> e ácidos carboxílicos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

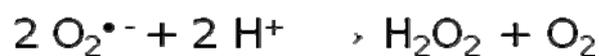
Outro aspecto da atividade dos carotenoides diz respeito à polaridade. Aqueles que possuem grupos polares nos anéis A e B são efetivos na prevenção da oxidação das membranas. Essa polaridade os localiza de maneira tal, que estão em contato mais próximo com a fase aquosa, reagindo com os radicais que penetram a membrana. Os apolares, tais como o licopeno e o β-caroteno são mais regeneradores que preventivos, combatendo os radicais formados com mais eficiência no interior da membrana (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; BURRI, 1997; PALACE et al., 1999).

### 3.6.2 Antioxidantes enzimáticos

A defesa enzimática envolve a ação conjunta de algumas enzimas antioxidantes: Superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e outras.

#### 3.6.2.1 Superóxido dismutase

A SOD pertence ao grupo das metalo enzimas e atua catalisando a dismutação do radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, segundo a equação abaixo (LESTER; JIFON; CROSBY, 2009).



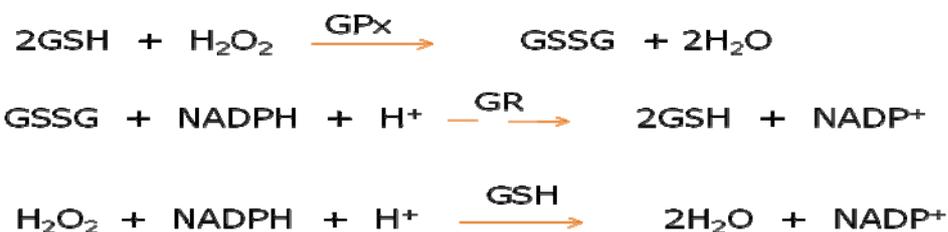
Existem três isoformas de SOD no organismo, dependendo de sua localização e do metal componente: SOD1, SOD2 e SOD3. A SOD1 e SOD3

contêm  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  como centros redox e ocorre no citossol, sendo que sua atividade não é afetada pelo estresse oxidativo (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002).

A SOD2 contém o  $\text{Mn}^{2+}$  como centro redox, ocorre na mitocôndria e sua atividade é aumentada com o estresse oxidativo (GALLAGHER et al., 2009). Em situações de hipercolesterolemia, ocorre a superexpressão da MnSOD, que atua bloqueando a adesão de monócitos, impedindo a inibição da atividade do óxido nítrico sintetase e a ativação e a agregação plaquetária (SCHWENKE et al., 2003; YAMAGISHI et al., 2001).

### 3.6.2.2 Sistema glutathiona peroxidase (GSHPx)/glutathiona redutase (GSHR)

Este sistema é composto pela glutathiona (GSH), em conjunto com duas enzimas: glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR). Ele catalisa a dismutação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ , e a glutathiona opera em ciclos entre sua forma oxidada e sua forma reduzida. A glutathiona (GSH) reduz o  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  em presença da glutathiona peroxidase, formando uma ponte dissulfeto e, em seguida, a glutathiona oxidada (GSSG) é regenerada à custa de NADPH, pela ação da glutathiona redutase, segundo a equação descrita abaixo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).



### 3.7 Fibra alimentar

A American Association of Cereal Chemists - AACC (1995) descreve fibra alimentar como sendo o remanescente da parte comestível de plantas e carboidratos análogos que são resistentes à digestão e à absorção no intestino delgado de humanos, com completa ou parcial fermentação no intestino grosso. Isso inclui polissacarídeos, oligossacarídeos, lignina e substâncias associadas, permitindo que possam ser incluídos na categoria de alimentos funcionais, pois a sua utilização dentro de uma dieta equilibrada ou balanceada pode reduzir o risco de certas doenças (dislipidemias, diabetes mellitus, doenças cardíacas e doenças relacionadas ao intestino) (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 1998; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, 1998).

As fibras podem ser classificadas de acordo com a estrutura como polissacarídeos, em relação à sua solubilidade em água e grau de fermentação (pela ação das bactérias anaeróbicas no intestino grosso) em solúveis e insolúveis, as quais exercem diferentes funções no organismo humano. A fração insolúvel é constituída por celulose, hemicelulose, lignina e amido resistente, e a fração solúvel, por hemicelulose solúvel, pectina, gomas e mucilagem (LIMA, 2009).

As fibras solúveis caracterizam-se por ser rapidamente degradadas no intestino grosso, possuem alto grau de fermentação e alta capacidade de fixar substâncias orgânicas e inorgânicas, sequestrando os sais biliares, o que acarreta um aumento de sua excreção e, conseqüentemente, uma redução na sua circulação enteropática. Com isso, o organismo tenta suprir o déficit de sais biliares, sintetizando-os a partir de suas reservas de colesterol. As fibras insolúveis, em geral, são pouco fermentadas e aceleram o tempo de trânsito intestinal devido à absorção de água (MÁRQUES, 2001). Como consequência,

os principais efeitos são o aumento da frequência da evacuação e diminuição do tempo de trânsito no cólon, proteção contra infecção bacteriana, melhorando ou prevenindo a constipação, diminuindo o risco de hemorroidas e diverticulite (MAFFEI, 2004).

As fibras são substratos para a fermentação bacteriana que resultam na formação de gases (hidrogênio, metano e dióxido de carbono) e ácidos graxos de cadeia curta (ácido acético, láctico, propiônico e butírico). Esses ácidos exercem papel importante na fisiologia do intestino, como principal fonte de energia, melhoram o fluxo sanguíneo, aumentam a absorção de água e sódio, diminuem o pH, fundamentais pelas propriedades ao trofismo intestinal e atuam no metabolismo da glicose e do colesterol (BEHALL; SCOLFIELD; HALLFRISCH, 2004; LI et al., 2003; LIMA, 2009).

A FDA (1998) determinou um valor diário de 25 g de fibras para uma dieta de 2000 calorias, sendo considerado satisfatório o consumo de 5 g de fibras em cada refeição.

### **3.8 Aterosclerose e hipercolesterolemia**

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial, que ocorre em resposta à agressões endoteliais, acometendo a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA - SBC, 2007). Ela se manifesta clinicamente por doenças cardiovasculares, que são as doenças cardíacas e as doenças cerebrovasculares.

A progressão desse processo inflamatório é mantida pela interação entre lipoproteínas modificadas, macrófagos derivados de monócitos, linfócitos T e constituintes celulares normais da parede arterial, com propriedades de reparação tecidual, ocorrendo espessamento e endurecimento das lesões arteriais

(ABDALLA; SENA, 2008; SIGNORI et al., 2007).

Há várias hipóteses sobre o início do progresso aterogênico. A que mais se destaca é a hipótese oxidativa que afirma que o início do processo aterosclerótico ocorre quando as partículas de LDL sofrem modificações oxidativas pelos radicais livres formados pelo estresse oxidativo, transformando em LDL oxidadas (LDL-ox), sendo esses os responsáveis pelos danos no endotélio vascular (STEINBERG et al., 1989). Embora as diferentes teorias direcionem mecanismos diversos para explicar a aterosclerose, existem pontos comuns, como, por exemplo, o envolvimento da inflamação e a LDL como partícula central no processo (STOCKER; KEANEY, 2004).

O processo de oxidação das LDL se dá em cascata, com a formação de radicais peróxilas provenientes dos lipídios da camada externa. A cadeia de reações oxidativas se propaga para o centro da lipoproteína, modificando os ácidos graxos poliinsaturados e colesterol (AVIRAM et al., 2000). Os radicais peróxilas formados interagem com os resíduos de aminoácidos das apolipoproteínas, modificando-as, o que resulta em uma menor afinidade pelos receptores de LDL não oxidadas e em um aumento da afinidade pelos receptores scavenger dos macrófagos (BROWN; GOLDSTEIN, 1983).

As partículas de LDL-ox estimulam o processo de surgimento de moléculas de adesão leucocitária pelas células endoteliais (SBC, 2007). As moléculas de adesão são responsáveis pela atração de monócitos e linfócitos para a parede arterial. Os monócitos migram para o espaço subendotelial, onde se diferenciam em macrófagos, que, por sua vez, captam as LDL-ox. Os macrófagos repletos de lipídios são chamados de células espumosas e são o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose (SANZ; FAYAD, 2008).

O acúmulo de lipídios na parede arterial induzirá a liberação de citocinas inflamatórias pelos macrófagos. Essas citocinas estimulam a migração e

proliferação das células musculares lisas da camada arterial para a íntima. Estas, ao migrarem para a íntima, passam a produzir citocinas, fatores de crescimento e matriz extracelular, que formará parte da capa fibrosa da placa aterosclerótica (SANZ; FAYAD, 2008). Os danos desenvolvidos pelas artérias podem sofrer complicações, de modo que calcificações e ulcerações na superfície do endotélio em contato com o sangue podem levar à ruptura da superfície da placa. Como consequência ocorrerá o desenvolvimento de hemorragia ou hematoma, terminado por causar microembolia e trombose, que podem fechar a artéria e, em casos severos a aterosclerose enfraquece de tal maneira os vasos que provoca dilatação arterial ou aneurisma (KATAR; GLASZ, 2001).

## REFERÊNCIAS

ABDALLA, D. S. P.; SENA, K. C. M. Biomarcadores de peroxidacao lipídica na aterosclerose. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 26, n. 6, p. 749-756, nov./dez. 2008.

ALMEIDA, K. C. et al. Efeito citotóxico do infuso aquoso de *Psidium guajva* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 2, p. 60-62, 2006.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Total dietary fiber in approved methods of the American Association of Cereal Chemists**. Saint Paul, 1995. 32 p.

AUGER, C. et al. Catechins and procyanidins in Mediterranean diets. **Food Research International**, Ottawa, v. 37, n. 3, p. 233-245, Apr. 2004.

AVIRAM, L. et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL and plaque aggregation: studies in human and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 71, n. 5, p. 1062-1076, Sept. 2000.

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, jan./fev. 2006.

BEHALL, K. M.; SCOLFIELD, D. J.; HALLFRISCH, J. Diets containing barley significantly reduce lipids in mildly hypercholesterolemic men and women. **American Journal Clinical Nutrition**, New York, v. 80, n. 5, p. 1185-1193, Sept. 2004.

BERRY, C. E.; HARE, J. M. Xanthine oxidoreductase in the cardiovascular system: molecular mechanisms and pathophysiologic implications. **The Journal of Physiology**, Cambridge, v. 55, p. 589-606, Mar. 2004.

BRAMBILLA, D. et al. The role of antioxidant supplement in immune system, neoplastic, and neurodegenerative disorders: a point of view for an assessment of the risk/benefit profile. **Nutrition**, London, v. 7, n. 29, p. 29-38, Sept. 2008.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol in atherosclerosis. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 52, p. 223-261, Sept. 1983.

BURRI, B. J. Beta-carotene and human health: a review of current research. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 17, n. 3, p. 547-580, Mar. 1997.

CHAH, K. F. et al. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 104, n. 8, p. 164-167, Oct. 2006.

CHATTERJEE, M. Augmented nitric oxide generation in neutrophils: oxidative and proinflammatory implications in hypertension. **Free Radical Research**, New York, v. 43, n. 12, p. 1195-1204, Dec. 2009.

CHEN, H. Y.; YEN, G. C. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guajava (*Psidium guajava*) leaves. **Food Chemistry**, London, v. 101, n. 2, p. 686-694, Apr. 2007.

DOMINGOS, J. S. et al. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 18, n. 3, p. 240-243, 2003.

DUARTE, S. M. S. et al. Efeito da bebida de café descascado sobre a atividade antioxidante, os parâmetros hematológicos e bioquímicos em ratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 703-708, dez. 2009.

DUTHIE, G. G.; BROWN, K. M. Reducing the risk of cardiovascular disease. In: GOLDBERG, I. (Ed.). **Functional foods**. New York: Chapman and Hall, 1994. p. 19-38.

ENGLER, M. B.; ENGLER, M. M. The vasculoprotective effects of flavonóide-rich cocoa and chocolate. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 24, n. 9, p. 695-706, Sept. 2004.

ESTERBAUER, H. et al. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. **Free Radical Biological Medical**, New York, v. 13, n. 4, p. 341-390, Dec. 1992.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Carlos do Pinhal, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. **Carbohydrates in human nutrition: report of joint FAO/WHO expert consultation**. Rome, 1998. 18 p. (Food and Nutrition Paper, 140).

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Nutrition: a good labeling guide: appendix C Health Claims**. New Hampshire, 1998. 701 p.

FURLAN, C.; SALATINO, A. Flavonóides de variedades comerciais de *Psidium guajava*. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE BOTANICA, 9., 2006, Santo Domingo. **Resumes...** Santo Domingo: SLAB, 2006. p. 547.

GALLAGHER, C. J. et al. Association between haplotypes of manganese superoxide dismutase (SOD2), smoking and lung cancer risk. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 46, n. 1, p. 20-24, Jan. 2009.

GERMANO, M. P. et al. Evaluation of the antioxidant properties and bioavailability of the free and bound phenolic acids from *Trichilia emética* Vahl. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 23, n. 3, p. 121-127, May 2006.

GOUVEA, C. M. C. P. Oxidações biológicas e atividade vegetal. In: CARVALHO, J. C. T. (Ed.). **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmed, 2004. p. 101-131.

GUTIÉRREZ, R. M. P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R. V. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 117, n. 1, p. 1-27, Apr. 2008.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants: redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, Washington, v. 141, n. 2, p. 312-322, Apr. 2006.

\_\_\_\_\_. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs & Aging**, Auckland, v. 18, n. 9, p. 685-716, 2001.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 57, n. 2, p. 715-725, May 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology & medicine**. Oxford: Clarendon; Oxford Science, 2007. 266 p.

HALLIWELL, B.; ZHAO, K.; WHITEMAN, M. Nitric oxide and peroxynitrite: the ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. **Free Radical Research**, New York, v. 31, n. 6, p. 651-669, Dec. 1999.

HOJO, R. H. et al. Produção e qualidade dos frutos da goiabeira “Pedro Sato” submetida a diferentes épocas de poda. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 3, p. 357-362, mar. 2007.

HOLST, B.; WILLIAMSON, G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 19, n. 2, p. 73-82, Dec. 2008.

JIMENEZ, E. A.; RINCON, M.; SAURA, C. F. Guava fruti (*Psidium guajava*) as new source of antioxidant dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 11, p. 5489-5493, Nov. 2001.

KATAR, A.; GLASZ, T. Development of atherosclerosis and plaque. **Cardiovascular Surgery**, Torino, v. 9, n. 2, p. 109-121, 2001.

LESTER, G. E.; JIFON, J. L.; CROSBY, K. M. Superoxide dismutase activity in Mesocarp tissue from divergent *Cucumis melo* L. genotypes. **Plant Foods Human Nutricional**, The Hague, v. 64, n. 3, p. 205-211, Sept. 2009.

LI, J. et al. Effects of barley intake on glucose tolerance, lipid metabolism and bowel function in women. **Nutrition**, London, v. 19, n. 11, p. 926-929, Nov. 2003.

LIMA, A. J. B. **Caracterização e atividade antioxidante da jabuticaba [Myrciaria cauliflora (Mart) O. Berg]**. 2009. 175 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

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, p. 293-303, maio/jun. 2001.

LOZOYA, X. et al. Spasmolytic effect of the methanolic extract of *Psidium guajava*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 56, n. 6, p. 686-689, 1999.

MAFFEI, H. V. L. Constipação crônica funcional: com que fibra suplementar? **Jornal de Pediatria**, São Paulo, v. 80, n. 3, p. 167-168, maio/jun. 2004.

MANICA, I. **Fruticultura tropical 6: goiaba**. São Paulo: Cinco Continentes, 2002. 374 p.

MÁRQUES, L. R. **A fibra terapêutica**. 2. ed. São Paulo: CRF, 2001. 175 p.

MEDINA, M. L.; PAGANO, F. G. Characterization of *Psidium guajava* pulp "criolla roja". **Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia**, Maracaibo, v. 20, n. 1, p. 72-76, 2003.

MOORE, K.; ROBERTS, L. J. Measurement of lipid peroxidation. **Free Radical Research**, New York, v. 28, n. 6, p. 659-671, Dec. 1998.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 411-424, jul./ago. 2004.

MURUGANANDAN, S. et al. Anti-inflammatory and analgesic activities of some medicinal plants. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, New Jersey, v. 22/23, n. 4A/1A, p. 56-58, 2001.

NADKARNI, K. M.; NADKARNI, A. K. **Indian materia medica with Ayurvedic, Unani-Tibbi, Siddha, allopathic, homeopathic, naturopathic and home remedies**. Bombay: Popular Prakashan Private, 1999. v. 1, 149 p.

NUNDKUMAR, N.; OJEWOLE, J. A. Studies on the antiplasmodial properties of some South African medicinal plants used as antimalarial remedies in Zulu folk medicine. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, Barcelona, v. 24, n. 7, p. 397-401, Sept. 2002.

OLATUNJI-BELLO, I. I. et al. Contractile effect of the aqueous extract of *Psidium guajava* leaves on aortic ring in rat. **Fitoterapia**, Milano, n. 78, n. 3, p. 241-243, Apr. 2007.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689-7002, maio/jun. 2009.

PALACE, V. P. et al. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, n. 5/6, p. 746-761, Dec. 1999.

PEARSON, D. A. et al. Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation. **Life Science**, Elmsford, v. 64, n. 21, p. 1913-1920, 1999.

QIAN, H.; NIHORIMBERE, V. Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. **Journal of Science**, Storlien, v. 5, n. 6, p. 676-683, 2004.

RIQUE, A. B. R.; SOARES, E. A.; MEIRELLES, C. M. Nutrição e exercício a prevenção e controle das doenças cardiovasculares. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 8, n. 6, p. 244-254, nov./dez. 2002.

RODRIGUEZ, H. et al. Metabolismo of food phenolic acids by lactobacillus plantarum CECT 748. **Food Chemistry**, London, v. 107, n. 4, p. 1393-1398, Apr. 2008.

ROY, C. K.; KAMATH, J. V.; ASAD, M. Hepatoprotective activity of *Psidium guajava* Linn. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 44, n. 4, p. 305-311, Apr. 2006.

SANZ, J.; FAYAD, Z. A. Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. **Nature**, London, v. 451, n. 21, p. 953-957, May 2008.

SATO, J. et al. Antifungal activity of plant extracts against *Arthrinium sacchari* and *Chaetomium funicola*. **Journal of Biochemical Engineering and Sciences**, Palo Alto, v. 90, n. 4, p. 442-446, 2000.

SCHWENKE, D. C. et al. Differences in LDL oxidizability by glycemic status: three insulin resistance atherosclerosis study. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 26, n. 5, p. 1449-1455, May 2003.

SIGNORI, L. U. et al. O papel da lipemi pós-prandial na gênese da aterosclerose: particularidades do diabetes mellitus. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, São Paulo, v. 51, n. 2, p. 222-231, mar./abr. 2007.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFSC, 2004. 1102 p.

SOARES, F. D. et al. Volatile and non-volatile chemical composition of the white guava fruit (*Psidium guajava*) at different stages of maturity. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 1, p. 15-21, Jan. 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose, IV. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, São Paulo, v. 88, n. 1, p. 2-19, 2007.

SOUZA, J. M. S. et al. Antioxidant capacity polyphenol-rich Amazonian plant extracts: a correlation study using chemical and biological *in vitro* assays. **Food Chemistry**, London, v. 106, n. 1, p. 331-339, Jan. 2008.

STEINBERG, D. et al. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. **The New England Journal of Medicine**, London, v. 320, n. 14, p. 915-924, Apr. 1989.

STOCKER, R.; KEANEY, J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 84, n. 4, p. 1381-478, 2004.

TEISSEDRE, P. L. et al. Inhibition of *in vitro* human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 70, n. 1, p. 55-61, Jan. 1996.

THAIPONG, K. et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 6/7, p. 669-675, Sept./Nov. 2006.

\_\_\_\_\_. Hydrophilic and lipophilic antioxidant activities of guava fruits. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health**, Bangkok, v. 36, n. 4, p. 254-257, 2005.

VARGAS, A. D. et al. Kinetics of accumulation and distribution of flavonoids in guava (*Psidium guajava*). **Agrociência**, Montevideo, v. 40, n. 1, p. 109-115, 2006.

VICTOR, V. M. et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in atherosclerosis: mitochondria-targeted antioxidants as potential therapy. **Current Medicinal Chemistry**, Netherlands, v. 9, n. 35, p. 376-389, Dec. 2009.

VOLP, A. C. P. et al. Flavonóides anthocyanins: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira de Nutrição e Saúde**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 141-149, dez. 2008.

YAMAGISHI, S. I. et al. Hyperglycemia potentiates collagen induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. **Diabetes**, New York, v. 50, n. 6, p. 1491-1494, Jan. 2001.

YAMASHIRO, S. et al. Cardioprotective effects of extracts from *Psidium guajava* L. and *Limonium wrightii*, Okinawan medicinal plants, against ischemia-reperfusion injury in perfused rat hearts. **Pharmacology**, Basel, v. 67, n. 3, p. 128-135, Mar. 2003.

YUSOF, R. M.; SAID, M. Effect of high fibre fruit (*Guava-Psidium guajava* L.) on the serum glucose level in induced diabetic mice. **Asia Pacific Journal Clinical Nutrition**, Southampton, v. 13, p. 135, 2004.

ZELKO, I. N.; MARIANI, J. T.; FOLZ, J. R. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 33, n. 3, p. 337-349, Aug. 2002.

ZHANG, W. J. et al. Mechanism of quercetin as an antidiarrheal agent. **Di Yi Jun Yi Xue Xue Bao**, Beijing, v. 23, n. 10, p. 1029-1031, Aug. 2003.

## CAPÍTULO 2

### SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES E MINERAIS DAS FOLHAS E FRUTOS DE TRÊS CULTIVARES DA GOIABEIRA

#### RESUMO

A goiabeira (*Psidium guajava*) é uma planta nativa brasileira e pouco estudada quanto à composição de suas substâncias antioxidantes e atividade antioxidante dos seus frutos e principalmente de suas folhas. Objetivou-se com este trabalho determinar essas substâncias e a atividade antioxidante das farinhas e extratos etanólicos/acetônicos das folhas e frutos das cultivares Pedro Sato, Paluma e Século XXI. Foram selecionados 60 frutos de cada, cultivar levando-se em consideração o grau de maturação. Os frutos foram lavados, picados, congelados em nitrogênio líquido e liofilizados. As folhas foram lavadas e colocadas em estufa a 37 °C, durante cinco dias. Ambas as partes foram trituradas em moinho para a obtenção das farinhas. Os extratos etanólicos/acetônicos foram preparados por meio da maceração em etanol/acetona (70/30), na proporção de 1:50 (p/v), por 24 horas e, em seguida, filtrados. O sobrenadante foi recolhido e armazenado e o resíduo foi reutilizado nas mesmas condições. Os dois sobrenadantes foram reunidos, submetidos à evaporação e, posteriormente, liofilizados para a obtenção dos extratos secos. Os teores de fibra alimentar foram maiores para as folhas, não variando entre as cultivares. As folhas não apresentaram diferenças no teor de vitamina C, e a cultivar Século XXI apresentou maior teor de vitamina C nos frutos. O teor de beta-caroteno foi maior para as folhas, tendo a cultivar Paluma maior teor; já em relação aos frutos, não houve diferença. Os compostos fenólicos nas farinhas e extratos das folhas foi maior, principalmente na Século XXI; já em relação aos frutos, não houve diferença. As farinhas e extratos das folhas apresentaram maior atividade antioxidante que os frutos por ambos os métodos.

Palavras-chave: Goiaba. Cultivares. Vitamina C.  $\beta$ -caroteno.

## ABSTRACT

Guava (*Psidium guajava*) is a native Brazilian plant and very little studied in relation to the composition of its antioxidant substances and antioxidant activity of its fruits, and mainly of its leaves. The objective of this work was to determine these substances and antioxidant activity of the flours and ethanol/acetone extracts of the leaves and fruits of Pedro Sato, Paluma and Século XXI cultivars. 60 fruits of each cultivar were chosen considering the level of maturation. The fruits were washed, chopped, frozen in liquid nitrogen and lyophilized. The leaves were washed and placed in a greenhouse at 37 °C, for 5 days. Both parts were ground using a mill for obtaining the flours. Ethanol/acetone extracts were prepared by steeping in ethanol/acetone (70/30), in the proportion of 1:50 (p/v), for 24 hours and, right after that, they were filtered. The supernatant was collected and stored, and the residue was reused in the same conditions. The two supernatants were reunited, submitted to evaporation, and after that, they were lyophilized for obtaining dried extracts. The contents of dietary fiber were higher for the leaves, not varying among the cultivars. The leaves did not show differences in the content of vitamin C, and Século XXI cultivar showed higher content of vitamin C in the fruits. The content of beta-carotene was higher for the leaves, having Paluma cultivar higher content; however, the fruits had no difference. The phenolic compounds in the flours and extracts of the leaves were higher mainly in Século XXI; nevertheless, the fruits had no difference. The flours and extracts of the leaves showed higher antioxidant activity than the fruits for both methods.

Keywords: Guava. Cultivars. Vitamin C.  $\beta$ -carotene.

## 1 INTRODUÇÃO

Desde a Antiguidade, o homem procurou conhecer os vegetais e suas propriedades medicinais, baseando-se em descobertas casuais e que estão sendo comprovadas pela ciência. Cerca de 25% dos fármacos utilizados são de origem vegetal, 75 % são sintéticos sendo que 50% estão relacionados aos princípios isolados de plantas medicinais (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002).

Em toda parte do vegetal podem ser encontradas substâncias ativas dos mais variados tipos de estruturas moleculares, sintetizadas a partir do metabolismo primário, denominadas de metabólitos secundários. Essas substâncias participam diretamente das interações bioquímicas de convivência e comunicação entre os vegetais e os vários organismos vivos no sistema ambiental.

A goiabeira é uma árvore frutífera pertencente à família Myrtaceae, de ocorrência espontânea em grande parte do Brasil, destacando-se nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul. Seus frutos são carnosos, de coloração amarela quando maduro com cerca de 5 cm de diâmetro, seu mesocarpo de coloração rosa contém inúmeras sementes duras e brancas. As folhas têm um comprimento de 5-10 cm, hipostomáticas, com um grande número de tricomas e glândulas oleíferas. Há várias cultivares da goiabeira; as mais cultivadas para a comercialização e preparo de doces e geléias são Pedro Sato, Século XXI e Paluma.

Os frutos podem ser consumidos ao natural ou na forma de sucos, geleias, doces e compotas. As folhas apresentam-se como uma alternativa no consumo de vitaminas, minerais e compostos fenólicos a baixo custo na forma de cápsulas ou preparações de chás.

Poucos estudos são encontrados na literatura relacionados aos constituintes químicos da goiaba, sobretudo os compostos bioativos,

principalmente em relação às folhas da goiabeira. Além disso, a busca por alimentos funcionais e fontes naturais de substâncias antioxidantes motivam grandes investimentos por parte das indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética e desperta o interesse de pesquisadores.

Neste trabalho, objetivou-se determinar a composição dos minerais, quantificar as substâncias antioxidantes e avaliar a atividade antioxidante das farinhas e dos extratos etanólicos/acetônicos das folhas e frutos da goiaba das cultivares Pedro Sato, Paluma e Século XXI.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material**

As folhas e frutos da goiabeira das cultivares Pedro Sato, Paluma e Século XXI foram colhidos pela manhã em um pomar comercial da cidade de Lavras-MG, sendo, em seguida levadas ao Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Lavras, para a montagem do experimento.

### **2.2 Preparo das amostras**

As folhas foram lavadas e colocadas em estufa a 37°C, durante cinco dias. Após esse período, foram maceradas e trituradas em moinho para a obtenção da farinha de folhas da goiabeira.

Foram selecionados 60 frutos de cada cultivar, levando-se em consideração o grau de maturação, excluindo-se os frutos maduros e os muito verdes. Os frutos foram lavados, picados, congelados em nitrogênio líquido, liofilizados e, posteriormente, triturados em moinho para a obtenção das farinhas dos frutos.

As farinhas dos frutos e das folhas foram armazenadas ao abrigo da luz e da umidade, até a realização das análises.

### **2.3 Análises**

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Lavras

### **2.3.1 Umidade**

O teor de umidade dos frutos foi realizado por liofilização, até atingir peso constante. As folhas foram secas em estufa a 37° C, até atingir peso constante. Em ambos os casos, o teor de umidade foi realizado diariamente.

### **2.3.2 Teor de minerais**

As amostras foram analisadas em extratos obtidos mediante a digestão nitroperclórica e leitura em espectrofotômetro de absorção atômica, conforme método descrito por Malavolta (1997).

### **2.3.3 Fibra alimentar**

Os teores de fibra alimentar total, fibra alimentar solúvel e fibra alimentar insolúvel foram determinados nas folhas e nos frutos, utilizando-se o kit *dietary fiber total*, marca Sigma, seguindo as técnicas propostas pela Association of Official Agricultural Chemists - AOAC (2000). Esse método se baseia na porção não hidrolisada do alimento que resiste à digestão enzimática sequencial com  $\alpha$ -amilase, protease e amiloglicosidase e é insolúvel em etanol entre 78% e 98%. Os resultados foram expressos em g 100g<sup>-1</sup> de amostra.

### **2.3.4 Vitamina C**

O teor de vitamina C foi determinado pelo método colorimétrico descrito por Strohecker e Henning (1967). A vitamina C foi extraída com ácido oxálico sob agitação e, após filtração, foi dosada no extrato, empregando-se o 2,4-dinitrofenilhidrazina e usando-se o ácido ascórbico como padrão.

### 2.3.5 Beta-caroteno

As amostras foram homogeneizadas com uma mistura de acetona e hexano (4:6). Os extratos obtidos foram usados para a leitura de absorbância em espectrofotômetro a quatro comprimentos de onda: 435; 505; 645 e 663 nm (NAGATA; YAMASHITA, 1992).

Os cálculos das concentrações de  $\beta$ -caroteno foram realizados utilizando-se a seguinte equação 1:

$$\beta\text{-caroteno (mg } 100 \text{ mL}^{-1}) = 0,216 A_{663} - 1,22 A_{645} - 0,304 A_{505} + 0,452 A_{435}$$

(equação 1)

### 2.3.6 Determinação dos compostos fenólicos

A determinação dos compostos fenólicos foi realizada nas farinhas das folhas e frutos e nos seus respectivos extratos etanólicos/acetônicos.

Para a obtenção dos extratos etanólicos/acetônicos, as farinhas das folhas e frutos foram mantidas sob maceração em etanol/acetona (70/30) na proporção de 1:50 (p/v), por 24 horas e, em seguida, filtrados. O sobrenadante foi recolhido e armazenado para posterior evaporação e o resíduo foi reextraído nas mesmas condições. Os dois sobrenadantes foram reunidos, submetidos à evaporação e, posteriormente, liofilizados para a obtenção dos extratos secos (RUFINO et al., 2007), os quais foram dissolvidos em água destilada para a determinação do teor de compostos fenólicos.

Para a determinação dos compostos fenólicos nas farinhas das folhas e frutos, foi realizada uma extração das farinhas com metanol 50%, em refluxo, por três vezes consecutivos, a 80°C, e os extratos reunidos, evaporados até 25 mL (GOLDSTEIN; SWAIN, 1963).

Os compostos fenólicos foram dosados 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<sup>-1</sup> MS.

### **2.3.7 Atividade antioxidante**

Dois métodos foram utilizados para a determinação da atividade antioxidante.

#### **2.3.7.1 Método DPPH**

A capacidade de sequestrar o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) foi realizada segundo método descrito por Thaipong et al. (2006), com modificações. As amostras foram obtidas conforme descrito no item 4.3.6 e diluídas em quatro concentrações.

Alíquotas de 0,1 mL de cada concentração das quatro amostras preparadas foram colocadas em diferentes tubos de ensaio. Em sequência, 3,9 mL da solução de DPPH em metanol (0,06 mM) foram adicionados e, após agitação em vortex, os tubos foram deixados em repouso ao abrigo da luz. Ao final de 30 minutos, a absorbância foi medida a 515 nm e a capacidade de sequestrar o radical, expressa em percentual, calculada em relação ao controle (sem antioxidante), segundo a equação 2 :

$$\% \text{ sequestro} = \frac{\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do controle}} \times 100$$

(equação 2)

Pela equação da reta de cada amostra, foram calculadas as concentrações necessárias para inibir 50% do radical DPPH'. O antioxidante

sintético butilhidroxitolueno (BHT) foi utilizado como padrão, o qual foi submetido às mesmas condições das amostras.

### **2.3.7.2 Método beta-caroteno/ácido linoleico**

A metodologia utilizada foi a desenvolvida por Marco (1968), modificada por Rufino et al. (2007). As amostras foram obtidas conforme descrito no item 4.3.6.

Para o preparo da solução sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, utilizaram-se 50  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -caroteno diluído em clorofórmio ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), aos quais adicionaram-se 40  $\mu\text{L}$  de ácido linoleico, 530  $\mu\text{L}$  de tween 20 (emulsificante) e, para solubilizar, 1 mL de clorofórmio. Em balão recoberto com alumínio para proteção contra luz, o clorofórmio foi evaporado em rota-evaporador e 100 mL 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 mL dessa solução sistema foram adicionados a 0,4 mL de amostras de farinha e extrato das folhas e frutos nas concentrações de  $0,16 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $0,024 \text{ mg mL}^{-1}$ , respectivamente. Foram feitos tubos controle contendo 5 mL da solução sistema com 0,4 mL de BHT, rutina e quercetina, juntamente com as amostras. Após homogeneização, foram feitas leituras em espectrofotômetro a 470 nm, utilizando-se água destilada para calibração do espectrofotômetro, sendo essa a leitura do tempo zero (inicial). Os tubos foram colocados em banho-maria, a  $40^\circ\text{C}$  e leituras realizadas após 2 horas.

Foi avaliada a porcentagem de inibição da oxidação, em que a redução da absorbância do sistema sem antioxidante (Equação 3) é considerada como 100 % de oxidação.

$$\text{Redução da absorbância} = \text{Abs inicial} - \text{Abs final} \quad (\text{Equação 3})$$

Correlacionou-se a queda da leitura de absorbância das amostras com o sistema e estabeleceu-se a porcentagem de oxidação (Equação 4). A porcentagem de proteção contra a oxidação lipídica é dada, subtraindo-se a porcentagem de oxidação de cada amostra de 100 (Equação 5).

$$\% \text{ Oxidação} = \frac{[(\text{Redução Abs})_{\text{amostra}} \times 100]}{(\text{Redução Abs})_{\text{sistema}}} \quad (\text{Equação 4})$$

$$\% \text{ Proteção} = 100 - (\% \text{ de Oxidação}) \quad (\text{Equação 5})$$

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

#### **2.4 Análises estatísticas**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Para as análises do teor de minerais, fibra alimentar, vitamina C e beta-caroteno, utilizou-se esquema fatorial 2 x 3, sendo duas frações da goiabeira, três cultivares da goiabeira, com quatro repetições. Para análise dos compostos fenólicos e atividade antioxidante, o esquema fatorial foi de 2 x 2 x 3, sendo duas frações da goiabeira, duas formas de preparo dos extratos, três cultivares da goiabeira, com quatro repetições. A análise estatística foi feita, empregando-se o programa Sisvar (FERREIRA, 2000), sendo as médias comparadas pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Não foi aplicada análise estatística para o mineral cálcio por não ter sido detectado nos frutos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Umidade

Os teores de umidade ( $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) nas farinhas das folhas e dos frutos foram de:  $71,90 \pm 1,34$  e  $84,74 \pm 2,74$  respectivamente para a cultivar Paluma, de  $72,15 \pm 2,59$  e  $84,34 \pm 1,92$  respectivamente para a cultivar Pedro Sato e de  $72,05 \pm 1,71$  e  $80,12 \pm 2,1$  respectivamente para a cultivar Século XXI. O teor de umidade encontrado para os frutos estão de acordo com encontrados por Freire et al. (2009) e Reis et al. (2007) que variou entre 84,98 a 93,36  $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ . Normalmente, o teor de umidade em folhas é em torno de 63,85 a 75,45  $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  (SIMÃO, 2010).

#### 3.2 Teor de minerais

Os teores de minerais nas farinhas das folhas e frutos da goiabeira encontram-se nas Tabelas 1 e 2.

As folhas da cultivar Pedro Sato se destacaram em cálcio e magnésio ( $16,00\text{ g Kg}^{-1}$  e  $3,00\text{ g Kg}^{-1}$ , respectivamente). Seus frutos apresentaram os maiores teores de potássio e magnésio ( $14,53\text{ g Kg}^{-1}$  e  $0,70\text{ g Kg}^{-1}$ , respectivamente).

A cultivar Paluma se destacou apenas para o mineral potássio nas folhas ( $16,03\text{ g Kg}^{-1}$ ) e os seus frutos se destacaram para os minerais cobre, zinco e ferro ( $34,87\text{ mg Kg}^{-1}$ ,  $19,30\text{ mg Kg}^{-1}$  e  $21,25\text{ mg Kg}^{-1}$ , respectivamente).

As folhas da cultivar Século XXI se destacaram entre os minerais cobre, manganês, zinco e ferro ( $37,93\text{ mg Kg}^{-1}$ ,  $122,30\text{ mg Kg}^{-1}$ ,  $32,28\text{ mg Kg}^{-1}$  e  $111,07\text{ mg Kg}^{-1}$ , respectivamente), porém em relação aos seus frutos apenas se destacou com manganês ( $5,13\text{ mg Kg}^{-1}$ ).

Os teores de cálcio não foram encontrados nas três cultivares dos frutos de goiaba pela metodologia empregada.

Tabela 1 Teores médios de minerais ( $\text{g Kg}^{-1}$ ) nas farinhas das folhas e frutos de diferentes cultivares da goiabeira.

| Frações    |                      |          |                                 |
|------------|----------------------|----------|---------------------------------|
| Cultivar   | Folha                | Fruto    | Minerais                        |
| Paluma     | 8,00 ( $\pm 0,22$ )  | ND       | Cálcio ( $\text{g Kg}^{-1}$ )   |
| Pedro Sato | 16,00 ( $\pm 0,52$ ) | ND       |                                 |
| Século XXI | 10,40 ( $\pm 0,29$ ) | ND       |                                 |
| Paluma     | 16,03 Aa             | 14,05 Ba | Potássio ( $\text{g Kg}^{-1}$ ) |
| Pedro Sato | 8,73 Bc              | 14,53 Aa |                                 |
| Século XXI | 13,80 Ab             | 13,13 Aa |                                 |
| Paluma     | 2,38 Ab              | 0,68 Ba  | Magnésio ( $\text{g Kg}^{-1}$ ) |
| Pedro Sato | 3,00 Aa              | 0,70 Ba  |                                 |
| Século XXI | 2,28 Ac              | 0,55 Bb  |                                 |

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

ND: não determinado

Tabela 2 Teores médios de minerais ( $\text{mg Kg}^{-1}$ ) nas farinhas das folhas e frutos de diferentes cultivares da goiabeira.

| Cultivar   | Frações   |          | Mineral                                |
|------------|-----------|----------|--|
|            | Folha     | Fruto    |  |
| Paluma     | 16,50 Bc  | 34,87 Aa | Cobre ( $\text{mg Kg}^{-1}$ )          |
| Pedro Sato | 28,45 Ab  | 30,87 Aa |  |
| Século XXI | 37,93 Aa  | 32,69 Ba |  |
| Paluma     | 23,48 Ac  | 2,58 Ba  | Mangânes ( $\text{mg Kg}^{-1}$ )<br>1) |
| Pedro Sato | 85,40 Ab  | 3,35 Ba  |  |
| Século XXI | 122,30 Aa | 5,13 Ba  |  |
| Paluma     | 28,80 Aa  | 19,30 Ba | Zinco ( $\text{mg Kg}^{-1}$ )          |
| Pedro Sato | 30,88 Aa  | 14,60 Ba |  |
| Século XXI | 32,28 Aa  | 16,10 Ba |  |
| Paluma     | 66,18 Ac  | 21,25 Ba | Ferro ( $\text{mg Kg}^{-1}$ )          |
| Pedro Sato | 95,50 Ab  | 15,70 Ba |  |
| Século XXI | 111,07 Aa | 13,05 Ba |  |

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Os valores de IDR (Ingestão Diária Recomendada) para o potássio, magnésio, ferro, zinco, manganês, cobre e cálcio são 4,6g/dia, 260 mg/dia, 14 mg/dia, 7 mg/dia, 2,3 mg/dia, 900  $\mu\text{g}/\text{dia}$  e 1,3 g/dia, respectivamente, para indivíduos adultos. Dessa forma, a ingestão de 100 g de frutos da goiaba por dia

estará fornecendo aproximadamente 0,52 %, 0,42 %, 0,2 %, 0,4%, 0,27% e 6,22 % dos minerais: potássio, magnésio, ferro, zinco, manganês e cobre, respectivamente. Para o consumo de 100 g de folhas por dia que pode ser na forma de chá ou cápsulas, estará fornecendo 0,78%, 1,81%, 1,21%, 2,69%, 9,13%, 8,55 % e 1,46 % dos IDR dos respectivos minerais: potássio, ferro, zinco, magnésio, manganês, cobre e cálcio teores superiores aos fornecidos pelos frutos.

Soares et al. (2004), analisando os teores de minerais em diversas marcas de sucos de goiaba concentrados encontrou um teor de  $0,036 \text{ g Kg}^{-1}$  de cálcio, o que não foi determinado nesse estudo. Para os minerais potássio, magnésio, ferro, manganês e cobre os teores encontrados foram de  $1,4 \text{ g Kg}^{-1}$ ,  $0,049 \text{ g Kg}^{-1}$ ,  $6,8 \text{ mg Kg}^{-1}$ ,  $0,9 \text{ mg Kg}^{-1}$  e  $0,37 \text{ mg Kg}^{-1}$ , respectivamente. Com exceção do cobre todos os minerais apresentaram teores superiores aos encontrados nesse estudo. O teor de minerais em relação à matéria fresca  $0,24 \text{ g Kg}^{-1}$ ,  $0,011 \text{ g Kg}^{-1}$ ,  $0,28 \text{ mg Kg}^{-1}$ ,  $0,063 \text{ mg Kg}^{-1}$  e  $0,56 \text{ mg Kg}^{-1}$ , para o potássio, magnésio, ferro, manganês e cobre, respectivamente.

### **3.3 Fibra alimentar**

Observa-se pela Tabela 3 que o teor de fibra alimentar insolúvel nas farinhas das folhas é superior aos dos frutos, sendo essa diferença significativa, variando entre 42,23 a 57,84  $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  para as folhas e 10,43 a 11,27  $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  para os frutos. As folhas das cultivares Paluma e Pedro Sato apresentaram os maiores teores de fibra alimentar insolúvel. Em relação às farinhas dos frutos observa-se que não houve diferença significativa entre as cultivares. Dados da literatura indicam que o teor de fibra alimentar insolúvel nos frutos da goiabeira está entre 9,96 a 12,18  $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  MS (GUERRA et al., 2004; SALGADO; GUERRA; MELO-FILHO, 1999), o que está de acordo com o presente trabalho.

As fibras insolúveis são de grande importância para a saúde por aumentar o volume do bolo fecal, reduzir o tempo de trânsito no intestino grosso e tornar a eliminação fecal mais fácil e rápida (FIGUEIREDO et al., 2009).

Tabela 3 Teores ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  MS) de fibra alimentar insolúvel nas farinhas de folhas e frutos das três cultivares da goiabeira.

| Cultivar   | Folha    | Fruto    |
|------------|----------|----------|
| Paluma     | 57,10 Aa | 10,43 Ba |
| Pedro Sato | 57,84 Aa | 11,27 Ba |
| Século XXI | 42,23 Ab | 11,09 Ba |

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5 % de probabilidade.

Os teores de fibra alimentar solúvel estão apresentados na Tabela 4. Observa-se diferença significativa entre as folhas e frutos das três cultivares da goiabeira, sendo que as folhas apresentam teores maiores que os frutos. Entre as folhas as cultivares Pedro Sato e Século XXI apresentaram os maiores teores 4,10 e 4,34  $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ , respectivamente. Em relação aos frutos, não houve diferença significativa entre as cultivares. Os teores de fibra alimentar solúvel variaram entre 1,48 a 1,58  $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ , o que está de acordo com os trabalhos de Guerra et al. (2004) que encontrou um teor de 1,54  $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  MS nos frutos da goiabeira. Esse tipo de fibra atua em benefício do organismo aumentando a viscosidade do conteúdo intestinal e reduzindo o colesterol plasmático (FIGUEIREDO et al., 2009).

Tabela 4 Teores ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  MS) de fibra alimentar solúvel nas farinhas de folhas e frutos das três cultivares da goiabeira.

| Cultivar   | Folha   | Fruto    |
|------------|---------|----------|
| Paluma     | 2,67 Ab | 1,48 Ba  |
| Pedro Sato | 4,10 Aa | 1,57 Ba  |
| Século XXI | 4,34 Aa | 1,58) Ba |

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5 % de probabilidade .

A FDA recomenda o consumo de 25 g fibra alimentar total por dia em uma dieta de 2000 calorias. Dessa forma, o consumo de 100 g de fruto “in natura” fornece entre 7,27 a 10,08 % da ingestão recomendada. Para as folhas, 100 g de matéria seca estará fornecendo mais que o necessário por dia.

### 3.4 Vitamina C

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, observa-se que entre as folhas das três cultivares não houve diferença significativa, porém em relação aos frutos a cultivar Século XXI apresentou um maior teor de vitamina C e a cultivar Paluma o menor teor, 564,24 e 101,68  $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$  MS (matéria seca), respectivamente.

Dados da literatura mostraram que o teor de vitamina C para a cultivar Pedro Sato varia de 48,8 a 49,1  $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$  MF (matéria fresca) (AZZOLINI; JACOMINO; BRON, 2004; QUEIROZ et al., 2008) valores superiores ao encontrado neste estudo (41,08  $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$  MF). Para a cultivar Paluma o teor encontrado segundo Brunini, Oliveira e Varanda (2003) foi de 67,86  $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$  MF superior ao fruto em estudo de 15,51  $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$  MF. Pereira et al. (2003) encontraram 84,90  $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$  MF de vitamina C em frutos da cultivar Século

XXI valor inferior ao teor de vitamina C nos frutos deste estudo que foi de 112,17 mg 100g<sup>-1</sup> MF. Essas variações podem ocorrer devido a diferenças em tratos culturais, solo, condições ambientais e outros utilizados em cada pomar.

Quando se compara as folhas com outros alimentos não convencionais, observa-se teores médios de vitamina C superiores aos encontrados em folha de cenoura (203,70 mg 100g<sup>-1</sup> MS) (PEREIRA; CARVALHO; NACHTIGAL, 2003) e de beterraba (72,42 mg 100g<sup>-1</sup> MS) (SARTORELLI, 1998).

Em relação a outros frutos, os teores de vitamina C são superiores aos encontrados em polpa de jaboticaba (163,38 mg 100 g<sup>-1</sup> MS) (LIMA, 2009) e em 100 g de matéria fresca (MF) da laranja (66 mg) e mamão (149 mg). Contudo, são inferiores ao de frutos considerados ricos em vitamina C, como a acerola, que contém 1.500 mg 100 g<sup>-1</sup> de MF (HERNANDEZ; LOBO; GONZÁLEZ, 2006).

Tabela 5 Teores de vitamina C (mg 100g<sup>-1</sup> MS) nas farinhas das folhas e frutos de três cultivares da goiabeira.

| Cultivar   | Folha     | Fruto     |
|------------|-----------|-----------|
| Paluma     | 246,31 Aa | 101,68 Bc |
| Pedro Sato | 200,29 Aa | 262,32 Ab |
| Século XXI | 227,64 Ba | 564,24 Aa |

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5 % de probabilidade.

### 3.5 Beta-caroteno

Os teores de beta-caroteno para as três cultivares de folhas e frutos da goiabeira estão apresentados na Tabela 6. Observa-se que os teores de beta-caroteno para as folhas foram significativamente maiores que os dos frutos. Entre as folhas a cultivar Paluma apresentou maior teor que as demais cultivares, já para os frutos não houve diferença significativa entre as cultivares.

A média dos valores de beta-caroteno ( $0,49 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ ) encontrada para os frutos das três cultivares estão de acordo com os determinados nos trabalhos de Escobar e Sylos (2006) e Porcú e Rodriguez-Amaya (2004) que encontraram valores variando de  $0,21$  a  $0,84 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ .

Os valores de beta-caroteno para as folhas são superiores aos encontrados nas folhas de cenoura ( $8,70 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}\text{MS}$ ) (PEREIRA et al., 2003) não-convencionalmente usadas, porém inferiores ao da batata-doce ( $40$  a  $120 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}\text{MS}$ ) (ALMAZAN; BEGUM; JOHSON, 1997).

Tabela 6 Teores de beta-caroteno ( $\text{mg } 100\text{g}^{-1} \text{ MS}$ ) nas farinhas das folhas e frutos de três cultivares da goiabeira.

| Cultivar   | Folha    | Fruto   |
|------------|----------|---------|
| Paluma     | 16,38 Aa | 2,81 Ba |
| Pedro Sato | 12,80 Ab | 2,75 Ba |
| Século XXI | 14,31 Ab | 3,11 Ba |

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5 % de probabilidade.

### 3.6 Compostos fenólicos

Na Tabela 7 estão apresentados os teores médios dos compostos fenólicos presentes nas farinhas das folhas e frutos das cultivares de goiabeira. Verifica-se que as folhas das três cultivares apresentou teores de compostos fenólicos superiores aos dos frutos. As folhas da cultivar Século XXI apresentaram teores significativamente maiores e as folhas da cultivar Pedro Sato os menores teores. Em relação aos frutos não houve diferença significativa.

Quando se analisa os teores de compostos fenólicos presentes nos extratos apresentados na Tabela 8, observa-se a mesma relação que a das folhas e frutos (Tabela 7), sugerindo que os extratos são eficiente para extração dos compostos fenólicos.

Tabela 7 Teores de compostos fenólicos ( $\text{mg g}^{-1}$  MS ) nas farinhas das folhas e frutos de três cultivares da goiabeira.

| Cultivar   | Folha     | Fruto    |
|------------|-----------|----------|
| Paluma     | 174,78 Ab | 8,84 Ba  |
| Pedro Sato | 130,05 Ac | 7,45 Ba  |
| Século XXI | 192,61 Aa | 10,51 Ba |

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5 % de probabilidade .

Tabela 8 Teores de compostos fenólicos ( $\text{mg g}^{-1}$  extrato) nos extratos etanólicos/acetônicos das folhas e frutos de três cultivares da goiabeira.

| Cultivar   | Folha     | Fruto    |
|------------|-----------|----------|
| Paluma     | 444,72 Ab | 31,48 Ba |
| Pedro Sato | 369,89 Ac | 14,66 Ba |
| Século XXI | 477,71 Aa | 28,28 Ba |

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Kott à 5 % de probabilidade .

Dados da literatura indicam que os teores de compostos fenólicos nos frutos variam entre 124,00 a 186,68  $\text{mg 100 g}^{-1}$  MF (HASSIMOTO; GENOVESE; LAJOLO, 2005; MELO et al., 2006). A média dos teores de compostos fenólicos das três cultivares foram de 150,47  $\text{mg 100 g}^{-1}$  MF, estando de acordo com os dados da literatura. Quando se compara os frutos da goiabeira com outros frutos consumidos diariamente tais como o abacaxi (85,1  $\text{mg 100 g}^{-1}$  MF), banana (51,5  $\text{mg 100 g}^{-1}$  MF) laranja (31,00  $\text{mg 100 g}^{-1}$  MF), mamão (75,4  $\text{mg 100 g}^{-1}$  MF) e manga (72,30  $\text{mg 100 g}^{-1}$  MF) observa-se que ela possui teor de compostos fenólicos superiores (BRAT et al., 2006; FALLER; FIALHO, 2009; MELO et al., 2006).

Asolini, Tedesco e Carpes (2006), analisando o conteúdo de compostos fenólicos de folhas utilizadas na preparação de chás, encontraram teores entre 15 (erva-mate) e 56 (capim-limão)  $\text{mg g}^{-1}$  MS, valores inferiores aos encontrados para as folhas de goiabeira. Simão (2010) estudando a atividade antioxidante da farinha das folhas de mandioca encontrou teores de compostos fenólicos inferiores aos das folhas da goiabeira, variando de 16,46 a 56,21  $\text{mg g}^{-1}$  MS

### **3.7 Atividade antioxidante**

Os resultados da atividade antioxidante estão apresentados nos itens que seguem abaixo.

#### **3.7.1 Método DPPH**

No que se refere à capacidade de seqüestrar o radical DPPH, evidencia-se que o(s) composto(s) ativo(s) presente(s) nas amostras atua(m) como doador de hidrogênio ao radical e dessa forma o estabiliza, entretanto esta ação é diferenciada entre as folhas e frutos e suas cultivares. Uma amostra que apresenta alto potencial em seqüestrar radicais livres possui baixo valor de IC<sub>50%</sub>. Para efeito de comparação, utilizou-se o antioxidante sintético BHT (Butilhidroxitolueno) e o flavonóide quercetina, que apresentaram uma atividade antioxidante de  $0,015 \pm 0,00$  e  $0,00198 \pm 0,00002$  mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Pelos dados apresentados na Tabela 9, observa-se que as farinhas das folhas das três cultivares da goiabeira apresentaram maior atividade antioxidante que seus respectivos frutos. A cultivar Século XXI apresentou maior atividade antioxidante tanto para as folhas quanto para os frutos e a cultivar Pedro Sato a menor capacidade antioxidante.

Os frutos das goiabeiras apresentaram menor atividade antioxidante que os antioxidantes BHT e quercetina, já as folhas das cultivares Paluma e Século XXI apresentaram maior atividade antioxidante que o BHT. Isso se deve por terem as folhas maiores teores de compostos antioxidantes que os frutos (Tabelas 6, 7 e 8).

Tabela 9 Concentração ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) necessária de farinha de folhas e frutos da goiabeira para inibir 50% do radical DPPH formado.

| Cultivar   | Folha     | Fruto    |
|------------|-----------|----------|
| Paluma     | 0,013 Bb  | 0,374 Ab |
| Pedro Sato | 0,023 Ba  | 0,438 Aa |
| Século XXI | 0,0047 Bc | 0,369 Ac |

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5 % de probabilidade.

Observa-se pela Tabela 10 que os extratos das folhas apresentaram maior atividade antioxidante que os frutos, sendo essa diferença significativa. Entre as cultivares das folhas não houve diferença significativa, já entre os frutos a cultivar Século XXI apresentou maior capacidade antioxidante e Pedro Sato a menor atividade antioxidante.

Em relação ao antioxidante sintético, BHT, observa-se que os extratos das folhas das três cultivares apresentaram atividade antioxidante superior, o que não foi observado para os extratos dos frutos. Para o antioxidante quercetina, apenas os extratos das folhas da cultivar Século XXI apresentou maior atividade antioxidante

Tabela 10 Concentração ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) necessária de extratos de folhas e frutos da goiabeira para inibir 50% do radical DPPH formado.

| Cultivar   | Folha     | Fruto     |
|------------|-----------|-----------|
| Paluma     | 0,0021 Ba | 0,0502 Ab |
| Pedro Sato | 0,0029 Ba | 0,106 Aa  |
| Século XXI | 0,0016 Ba | 0,0329 Ac |

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5 % de probabilidade .

### 3.7.2 Método beta caroteno/ácido linoléico

Na Tabela 11 constam os resultados da porcentagem de inibição da oxidação lipídica, pelo método  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, das farinhas das folhas e frutos das três cultivares da goiabeira utilizadas na concentração de  $0,16 \text{ mg mL}^{-1}$ . Observa-se que as farinhas das folhas apresentaram maior porcentagem de inibição da oxidação que as farinhas dos frutos. Quando se compara a porcentagem de inibição entre as folhas notas-e que as cultivares Paluma e Pedro Sato apresentaram maior inibição que a cultivar Século XXI, já entre as farinhas dos frutos não foi observado diferença significativa.

Foram testados a porcentagem de inibição dos padrões de BHT, quercetina e rutina nas concentrações de  $0,16 \text{ mg mL}^{-1}$ . O padrão BHT foi escolhido por sua ampla utilização na indústria de alimentos, e os antioxidantes quercetina e rutina por estarem presentes em vegetais (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). A porcentagem de inibição da oxidação para o BHT, quercetina e rutina foram de  $74,88 \% (\pm 0,45)$ ,  $60,96 \% (\pm 0,92)$  e  $15,37\% (\pm 0,70)$ , respectivamente. Os resultados mostram que o padrão BHT apresenta maior porcentagem de inibição da oxidação que os antioxidantes naturais.

As farinhas das folhas das três cultivares apresentaram porcentagem de inibição da oxidação maior que os padrões testados. Para os frutos, as três cultivares analisadas apresentaram porcentagem de inibição da oxidação menores que os antioxidantes BHT e quercetina, porém maiores que o antioxidante rutina.

Tabela 11 Porcentagem de inibição da oxidação lipídica das farinhas das folhas e frutos das três cultivares da goiabeira na concentração de 0,16 mg.mL<sup>-1</sup>.

| Cultivar   | Folha    | Fruto    |
|------------|----------|----------|
| Paluma     | 85,94 Aa | 51,40 Ba |
| Pedro Sato | 82,93 Aa | 39,65 Ba |
| Século XXI | 77,20 Ab | 50,72 Ba |

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5 % de probabilidade .

Pela Tabela 12, observa-se a porcentagem de inibição da oxidação dos extratos das folhas e frutos das três cultivares da goiabeira na concentração de 0,024 mg mL<sup>-1</sup>. Nota-se que os extratos das folhas apresentaram porcentagem de inibição de oxidação superior aos dos frutos, variando entre 78,79 % a 93,77%. E entre as cultivares a Século XXI apresentou a maior atividade antioxidante, o que foi diferente para as farinhas das folhas (Tabela 11) cuja atividade antioxidante foi significativamente menor. Os extratos dos frutos das cultivares Paluma e Século XXI apresentaram atividade antioxidante significativamente maior que a cultivar Pedro Sato.

Para efeito de comparação dos extratos das folhas e frutos com os padrões, o BHT, quercetina e rutina foram testados na mesma concentração que os extratos, ou seja, 0,024 mg mL<sup>-1</sup>. A porcentagem de inibição da oxidação foram 11,23% ( $\pm$  0,06), 9,14 % ( $\pm$  0,14) e 2,31 % ( $\pm$ 0,11) para o BHT, quercetina e rutina, respectivamente.

Os extratos das folhas apresentaram porcentagem de inibição da oxidação superior aos dos padrões analisados. Para os extratos dos frutos apenas as cultivares Paluma e Século XXI foram mais efetivas na proteção da oxidação do beta-caroteno. Apesar de ter apresentado porcentagem de inibição inferior às

demais cultivares, a cultivar Pedro Sato apresentou atividade antioxidante maior que o padrão rutina.

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

Tabela 12 Porcentagem de inibição da oxidação lipídica dos extratos etanólicos/acetonícos das folhas e frutos das três cultivares da goiabeira na concentração de 0,024 mg mL<sup>-1</sup>.

| Cultivar   | Folha    | Fruto    |
|------------|----------|----------|
| Paluma     | 78,79 Ab | 24,37 Ba |
| Pedro Sato | 82,81 Ab | 5,67 Bb  |
| Século XXI | 93,77 Aa | 19,00 Ba |

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5 % de probabilidade.

#### **4 CONCLUSÃO**

As farinhas e extratos etanólico/acetônicos das folhas apresentaram os maiores teores de substâncias antioxidantes e, conseqüentemente, maior atividade antioxidante, quando comparadas aos dos frutos. O mesmo é observado para os teores de fibra alimentar.

As folhas da cultivar Século XXI destacaram-se em todos os parâmetros estudados.

Portanto, o conhecimento dos constituintes químicos e a atividade antioxidante dos frutos e folhas de goiabeira contribui para um melhor aproveitamento dos mesmos, seja na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética, promovendo a sua valorização comercial

## REFERÊNCIAS

ALMAZAN, A. M.; BEGUM, F.; JOHSON, C. Nutritional quality of sweetpotato greens from greenhouse plants. **Journal of Food Composition and Analysis**, Orlando, v. 10, n. 3, p. 246-253, Sept. 1997.

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, 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. Mayland, 2000. 1012 p.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. Mayland, 2005. 1094 p.

AZZOLINI, M.; JACOMINO, A. P.; BRON, I. U. Índices para avaliar qualidade pós-colheita de goiaba em diferentes estádios de maturação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 2, p. 139-145, fev. 2004.

BRAT, P. et al. Dially polyphenol intake in France from fruit and vegetables. **Journal Nutrition**, Philadelphia, v. 136, n. 9, p. 2368-2373, Sept. 2006.

BRUNINI, M. A.; OLIVEIRA, A. L.; VARANDA, D. B. Avaliação da qualidade de polpa de goiaba Paluma armazenada a – 20° C. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 394-396, maio/jun. 2003.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. 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, mar./abr. 2006.

ESCOBAR, A. P.; SYLOS, C. M. **Efeito do processo de obtenção de polpa de goiaba e goiabada sobre os teores de licopeno e de beta-caroteno.** 2006. 65 p. Dissertação (Mestrado em Análise de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

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, mar./abr. 2009.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para o Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FIGUEIREDO, S. M. et al. Fibras alimentares: combinações de alimentos para atingir meta de consumo de fibras solúvel por dia. **E-Scientia**, Belo Horizonte, v. 2, n. 1, p. 1-18, dez. 2009.

FREIRE, M. T. A. et al. Avaliação física, química e sensorial de doce cremoso de goiaba acondicionado em bisnaga plástica. **Brazilian Journal of Food technology**, Campinas, v. 12, n. 3, p. 172-180, 2009.

GOLDSTEIN, J. L.; SWAIN, T. Changes in tannins in ripening fruits. **Phytochemistry**, Oxford, v. 2, p. 371-383, 1963.

GUERRA, N. B. et al. Modificação do método gravimétrico não enzimático para determinar fibra alimentar solúvel e insolúvel em frutos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 45-52, jan./mar. 2004.

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

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.

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

MALAVOLTA, E. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. 2. ed. Piracicaba: POTAFÓS, 1997. 319 p.

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

MELO, E. A. et al. Polyphenol, ascorbic acid and total carotenoid contents in common fruits and vegetables. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 9, n. 2, p. 89-94, 2006.

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

PEREIRA, F. M.; CARVALHO, C. A.; NACHTIGAL, J. C. Século XXI: nova cultivar de goiabeira de dupla finalidade. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 498-500, maio/jun. 2003.

PEREIRA, G. I. S. et al. 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.

PORCÚ, O. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Fatores que influenciam na composição de carotenóides em goiaba, acerola, pitanga e seus produtos processados**. 2004. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

QUEIROZ, V. A. V. et al. Qualidade nutricional de goiabas submetidas aos processos de desidratação por imersão-impregnação e secagem complementar por convecção. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 329-340, mar./abr. 2008.

REIS, K. C. et al. Avaliação físico-química de goiabas desidratadas osmoticamente em diferentes soluções. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 781-785, maio/jun. 2007.

RUFINO, M. S. M. et al. **Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método beta-caroteno/ácido linolêico**. Fortaleza: EMBRAPA, 2007. 4 p.

SALGADO, S. M.; GUERRA, N. B.; MELO-FILHO, A. B. Polpa de fruta congelada: efeito do processamento sobre o conteúdo de fibra alimentar. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 3, p. 303-308, set./dez. 1999.

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, 1998.

SILVA, K. L.; CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero Bauhinia: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 449-454, maio/jun. 2002.

SIMÃO, A. A. **Antioxidante, clorofila e perfil de ácidos graxos em folhas de mandioca**. 2010. 86 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

SOARES, L. M. V. et al. Composição mineral de sucos concentrados de frutas brasileiras. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 202-206, abr./jun. 2004.

STROHECKER, R.; HENNING, H. M. **Análises de vitaminas: métodos comprobados**. Madrid: Paz Montolvo, 1967. 428 p.

THAIPONG, K. et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 6/7, p. 669-675, Sept./Nov. 2006.

### CAPÍTULO 3

## CONTROLE DA HIPERCOLESTEROLEMIA E ESTRESSE OXIDATIVO POR FOLHAS E FRUTOS DA GOIABEIRA

### RESUMO

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e a capacidade de ação dos antioxidantes, o que causa injúria celular, desencadeando e agravando algumas patologias. Dessa forma, pesquisas buscam alternativas para amenizar os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo, melhorando a capacidade antioxidante do organismo, prevenindo as enfermidades e suas complicações. As folhas e frutos da goiabeira são ricos em compostos antioxidantes, os quais podem inibir a oxidação das lipoproteínas, reduzindo os agravos do estresse oxidativo. Dessa forma, objetivou-se estudar o efeito das farinhas e extratos etanólico/acetônico das folhas e frutos da goiabeira sobre a oxidação lipídica, em ratos submetidos à dieta hipercolesterolêmica. Foram utilizados 50 ratos Wistar, divididos em dez grupos de cinco animais: controle não hipercolesterolêmico, controle hipercolesterolêmico e tratados com as farinhas e extratos etanólico/acetônico das folhas e frutos da goiabeira hipercolesterolêmicos e não hipercolesterolêmicos. A dose utilizada foi de 50 mg/Kg de peso corporal diariamente. Após 42 dias, foi avaliado o colesterol total e frações, proteína C reativa, lipídeos hepáticos totais, razão massa do fígado *versus* massa corpórea, análise histopatológica, o marcador do estresse oxidativo através das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) no fígado e no soro dos animais. Não houve diferença significativa na razão massa do fígado *versus* massa corpórea e nos níveis de lipídeos hepáticos totais nos animais que receberam a dieta hipercolesterolêmica tratados com as farinhas e os extratos dos animais do grupo controle hipercolesterolêmico. As farinhas e os extratos diminuíram os níveis de triglicerídeos e colesterol não HDL e aumentaram o de HDL. Para os níveis de colesterol total apenas as farinhas das folhas e frutos foram efetivas. As farinhas e extratos diminuíram a atividade da GPx, para a SOD apenas as farinhas diminuíram de forma significativa a sua atividade nas amostras de soro. Os níveis de MDA nas amostras de soro diminuíram de forma significativa quando comparadas aos do controle hipercolesterolêmicos. Para as amostras de tecido hepático, não houve diferença na atividade da SOD, porém em relação à GPx

apenas a farinha dos frutos diminuiu a sua atividade. Houve uma diferença significativa nos níveis de dialdeído malônico dos animais hipercolesterolêmicos tratados com a farinha e extratos com os animais do grupo controle hipercolesterolêmicos.

Palavras-chave: Dialdeído malônico. Superóxido dismutase. Glutathione peroxidase.

## ABSTRACT

The oxidative stress is a disequilibrium among the reactive oxygen species and the capacity for action of the antioxidants, which causes cellular injury, provoking and aggravating some diseases. Thus, researchers seek alternatives to soften the harmful effects of the oxidative stress, improving the oxidant capacity of the organism, preventing from diseases and complications. The leaves and fruits of guava are rich in antioxidant compounds, which can inhibit the lipoproteins oxidation, reducing the aggravations of oxidative stress. Thus, the aim of this work was to study the effect of the flours and ethanol/acetone extracts of the leaves and fruits of guava on the lipid oxidation, in rats submitted to a hipercholesterolemic diet. 50 Wistar rats were used and divided into ten groups of five animals: non- hipercholesterolemic control, hipercholesterolemic control and the ones treated with flours and ethanol/acetone extracts of hipercholesterolemic and non - hipercholesterolemic guava leaves and fruits. The dose used was 50 mg/Kg of the body weight, daily. After 42 days, total cholesterol and fractions, C reactive protein, total hepatic lipids, liver mass index *versus* body index, histopathological analysis, marker of oxidative stress through the substances that react to the thiobarbituric acid (TBARS) and the activity of antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) in the liver and in the serum of the animals. There was no significant difference in the index liver mass *versus* body mass and in the levels of total hepatic lipids of the animals that received a hipercholesterolemic diet treated with the flours and the animals' extracts of the hipercholesterolemic group. The flours and extracts decreased the levels of triglycerides and non HDL cholesterol and increased the HDL. For the levels of total cholesterol, only the flour of the leaves and fruits were effective. The flours and extracts decreased GPx activity, for SOD, only the flours significantly decreased the activity in the serum samples. The levels of MDA in the serum samples decreased significantly when compared with hipercholesterolemic control. For the samples of hepatic tissue, there was no difference in the activity of SOD; however, in relation to GPx only the fruit flour decreased its activity. There was a significant difference in the levels of malonic dialdehyde of the hipercholesterolemic animals treated with flour and extracts with the animals of the hipercholesterolemic control group.

Keywords: Malonic dialdehyde. Superoxide dismutase. Glutathione peroxidase.

## 1 INTRODUÇÃO

A hipercolesterolemia é uma condição que se caracteriza pela presença de taxas elevadas de colesterol no sangue, o que afeta um quinto da população brasileira, especialmente pessoas com mais de 45 anos, segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia. Muitos estudos têm demonstrado que a hipercolesterolemia é um dos maiores fatores de risco de doença arterial coronariana (DAC) no mundo (BHATT et al., 2006). A DAC está associada com sinais de inflamação sistêmica e da parede arterial. Além disso, o processo inflamatório induzido pela hipercolesterolemia está associado com eventos trombogênicos e com o estresse oxidativo (LIBBY, 2000).

Muitos agentes terapêuticos estão disponíveis para o tratamento de pacientes hipercolesterolêmicos e muitos estudos têm demonstrado que o uso de drogas hipolipemiantes pode reduzir o número de eventos cardiovasculares e a mortalidade de doenças coronárias. Além disso, uma dieta restrita em alimentos ricos em colesterol e exercícios físicos regulares são propostas que também devem fazer parte do tratamento destes pacientes, dessa forma muitos indivíduos têm procurado os tratamentos alternativos (ARONOW, 2008). Muitos destes tratamentos têm sido usados empiricamente, carecendo de estudos científicos que permitam conclusões mais confiáveis (DICKEL; RATES; RITTER, 2007).

Os vegetais contêm substâncias biologicamente ativas que desencadeiam processos metabólicos ou fisiológicos favoráveis ao organismo, resultando em redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis e na manutenção da saúde (ANJO, 2004). Os componentes com propriedades antioxidantes podem agir diretamente na neutralização da ação das espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, contribuindo para manter a integridade celular (BELING; PUJOL; ANDRADE, 2007).

Os frutos da goiabeira são considerados muito importantes dentro do contexto da fruticultura brasileira, encontrando-se em expansão. O aumento do consumo está associado à grande divulgação das qualidades nutricionais da fruta. Além dos frutos, as folhas da goiabeira também possuem vários compostos fitoquímicos e minerais, que podem exercer ações no organismo, estimulando assim o seu consumo. Entre estas destacam-se a ação hipoglicemiante, a atividade antioxidante *in vitro* e controversos afeitos sobre a hemostasia e coagulação sangüínea.

Com isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito hipolipemiante e a atividade antioxidante das farinhas e extratos etanólico/acetônico das folhas e frutos da goiabeira em ratos hiperlipidêmicos.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Amostras**

Foram utilizadas as farinhas e extratos etanólicos/acetônicos das folhas e frutos da goiabeira da cultivar Pedro Sato. Essa cultivar foi selecionada por ser destinada ao consumo “in natura”, e as cultivares Paluma e Século XXI ao processamento.

### **2.2 Ensaio biológico**

Foram utilizados 50 ratos adultos jovens, machos (*Rattus norvegicus*), em fase de crescimento e com peso médio inicial de  $400 \pm 50$  g da linhagem Wistar, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Alfenas. Os ensaios realizados tiveram aprovação prévia do comitê de ética em pesquisas com animais da Universidade Federal de Alfenas.

Os animais foram divididos, aleatoriamente, em dez grupos com 5 animais em cada grupo (Tabela 1).

Tabela 1 Tratamentos realizados nos animais experimentais.

| <b>Grupos</b> | <b>Tratamentos</b>   |
|---------------|--|
| CN            | Controle não hipercolesterolêmico  |
| CH            | Controle hipercolesterolêmico  |
| FFON          | Animais não hipercolesterolêmicos tratado com a farinha das folhas                   |
| FFRN          | Animais não hipercolesterolêmicos tratado com a farinha dos frutos                   |
| FFOH          | Animais hipercolesterolêmicos tratado com a farinha das folhas                       |
| FFRH          | Animais hipercolesterolêmicos tratado com a farinha dos frutos                       |
| EFON          | Animais não hipercolesterolêmicos tratado com extrato etanólico/acetônico das folhas |
| EFRN          | Animais não hipercolesterolêmicos tratado com extrato etanólico/acetônico dos frutos |
| EFOH          | Animais hipercolesterolêmicos tratado com extrato etanólico/acetônico das folhas     |
| EFRH          | Animais hipercolesterolêmicos tratado com extrato etanólico/acetônico dos frutos     |

O grupo CN recebeu dieta comercial, o grupo CH recebeu dieta comercial enriquecida com colesterol e ácido cólico os demais grupos receberam a dieta não hipercolesterolêmica ou a hipercolesterolêmica e as farinhas e os extratos etanólico/acetônico das folhas e frutos da goiabeira na concentração de 50 mg/Kg de peso corpóreo em apenas uma dose por gavagem (Figura 1), durante 42 dias.

Os animais de cada grupo foram mantidos em caixa (Figura 2), em sala com temperatura de  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$  (ciclo claro/escuro de 12 horas) e com acesso à ração para roedores e água *ad libitum*, por 42 dias.



Figura 1 Administração das farinhas e extratos etanólico/acetônicos das folhas e frutos da goiabeira



Figura 2 Aspecto geral da caixa utilizada no experimento

Ao término do experimento, os animais permaneceram em jejum de 12 horas e, posteriormente foram anestesiados com Tiopental (35 mg/Kg) e o sangue retirado pela técnica de punção cardíaca (exsanguinação). Em seguida, o fígado foi retirado dos animais.

### **2.3 Preparo da dieta hipercolesterolêmica**

A hipercolesterolemia foi induzida com ração suplementada, preparada a partir da ração comercial e enriquecida com colesterol e ácido cólico. A ração comercial utilizada para ratos foi triturada em um liquidificador industrial, até uma granulometria pequena. Em seguida, acrescentou-se, a cada 100 g de ração, 0,5g de colesterol e 0,25 g de ácido cólico e a mesma foi umedecida com água, modelada e levada a uma estufa ventilada, a 35°C, por dois dias, tempo

suficiente para que a ração secasse (ROCHA, 2009). Os animais do grupo controle não hipercolesterolêmicos receberam a mesma dieta comercial, porém, sem adição de colesterol e ácido cólico.

## **2.4 Preparo das amostras de fígado e sangue para análises**

As amostras utilizadas para as análises foram o fígado e o sangue dos animais.

### **2.4.1 Fígado**

Os fígados dos animais foram retirados, imediatamente pesados e separados em três frações. Uma fração foi colocada em uma solução de formalina, para serem fixados para as análises histológicas. A outra fração foi colocada em tampão fosfato no volume de quatro vezes o peso do fígado e homogeneizados para as análises de proteínas totais, atividade da superóxido dismutase e glutathione peroxidase e avaliação da peroxidação lipídica. A outra fração foi congelada, liofilizada por dois dias até peso constante, triturada e armazenada em um dessecador para análise de lipídeos hepáticos.

### **2.4.2 Sangue**

O sangue foi dividido em duas alíquotas. A primeira alíquota foi colhida em tubo, contendo EDTA sendo submetido à centrifugação, para a separação de plasma que foi utilizado para a determinação da peroxidação lipídica. A segunda alíquota foi colhida em tubo siliconizado sem aditivo e centrifugada para a obtenção do soro. Este foi utilizado para as análises de colesterol total, triacilglicerol, colesterol HDL, proteínas totais, proteína C reativa e

determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx).

## **2.5 Parâmetros analisados**

Todos os parâmetros analisados seguem abaixo.

### **2.5.1 Razão massa do fígado *versus* massa corpóreo**

A razão massa do fígado *versus* massa corpóreo foi determinada dividindo o peso do fígado inteiro com o peso corpóreo do animal no dia em que ocorreu o sacrifício. Pesagem realizada em balança digital.

### **2.5.2 Determinação dos lipídeos hepáticos totais**

Para determinar a porcentagem de lipídeos totais foi utilizada a metodologia proposta pela Association of Official Analytical Chemistry - AOAC (2000). Os fígados, homogeneizados e triturados foram desengordurados em cartucho de celulose (cerca de 2 gramas da amostra), durante duas horas, em aparelho de Soxhlet, utilizando-se éter de petróleo como solvente. Os cálculos foram feitos com base na matéria fresca.

### **2.5.3 Determinação do colesterol sérico total**

Na determinação do colesterol total do soro sanguíneo dos animais, foi utilizado o kit enzimático-colorimétrico, marca Labtest®.

Os ésteres de colesterol foram hidrolisados pela *la* colesterol esterase a colesterol livre e oxidado pela *la* colesterol oxidase a *la* colest-4-em-ona e peróxido

de hidrogênio. Na presença de peroxidase, e fenol, a 4-aminoantipirina é oxidada formando a antipirilquinonimina que tem absorvidade máxima em 500 nm. A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra. A leitura de absorvância foi realizada em um espectrofotômetro, em comprimento de onda de 500 nm.

#### **2.5.4 Determinação dos níveis séricos de triglicérides**

A determinação dos triglicérides no soro dos animais foi realizada utilizando-se o kit enzimático-colorimétrico, marca Labtest®.

A lipoproteína lipase promove a hidrolise dos triglicérides liberando glicerol, que é convertido, pela ação da glicerolquinase, em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. Em seguida, ocorre uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina que tem máximo de absorvância em 505 nm. A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração dos triglicérides na amostra. A leitura de absorvância foi realizada em um espectrofotômetro, em comprimento de onda de 505 nm.

#### **2.5.5 Determinação dos níveis séricos de HDL**

A determinação do colesterol-HDL no soro dos animais foi realizada utilizando-se o kit enzimático-colorimétrico, marca Labtest®.

A seletividade do método está baseada nas tecnologias de aceleração da reação da colesterol oxidase (CO) com o colesterol livre das lipoproteínas não HDL e solubilização seletiva das partículas HDL por ação de um detergente específico.

Na primeira fase da reação, o colesterol livre das partículas não HDL é submetido a uma reação enzimática catalisada pela colesterol oxidase (CO) na presença de acelerador. O peróxido de hidrogênio produzido é consumido por uma reação da peroxidase com disulfobutilmetatoluidina sódica (DSBmT) formando um produto incolor.

A segunda reação utiliza um detergente capaz de solubilizar especificamente o colesterol HDL. Com a ação das enzimas colesterol esterase (CE) e colesterol oxidase e acoplamento com 4-aminoantipirina e o cromogenio DSBmT, em reação catalisada pela peroxidase, ocorre o desenvolvimento de coloração proporcional à concentração de colesterol HDL na amostra. A leitura de absorbância foi realizada em um espectrofotômetro, em comprimento de onda de 600 nm.

#### **2.5.6 Determinação dos níveis séricos de colesterol não HDL**

O valor de colesterol não HDL foi calculado pela diferença entre o valor do colesterol total e o valor do colesterol HDL.

#### **2.5.7 Determinação da proteína C reativa**

A determinação da proteína C reativa no soro dos animais foi realizada por método turbidimétrico utilizando-se o kit da marca Human®.

O teste é baseado na reação imunológica entre a proteína C reativa de amostras de soro e seu anticorpo monoespecíficos anti-PCR correspondente ligados a partículas de látex de poliestireno. A intensidade da aglutinação, medida em absorbância, é proporcional à quantidade de PCR. A leitura de absorbância foi realizada em um espectrofotômetro, em comprimento de onda de 570 nm.

### **2.5.8 Determinação do teor de proteínas totais**

O teor de proteínas totais foram analisados nas amostras de fígado e sangue.

#### **2.5.8.1 Soro**

A determinação das proteínas totais no soro dos animais foi realizada utilizando-se o kit colorimétrico, marca Bioclin®, baseado na metodologia do Biureto.

As ligações peptídicas das proteínas (-CONH-) reagem com os íons cúpricos, em meio alcalino, formando um complexo de coloração violeta que é proporcional ao teor das proteínas do meio. A leitura de absorvância foi realizada em um espectrofotômetro, em comprimento de onda de 545 nm.

#### **2.5.8.2 Fígado**

A determinação das proteínas nos homogeneizados de fígado dos animais foi realizada utilizando-se a metodologia de Bradford.

Este método é baseado na interação entre o corante “Coomassie brilliant blue”BG-250 e os resíduos de aminoácidos carregados positivamente nas proteínas, decorrentes da adição de ácido fosfórico 85%. No pH de reação a interação provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm.

O reagente de Bradford foi preparado dissolvendo 100 mg do corante “Coomassie brilliant blue”BG-250 em 50 mL de uma mistura equimolar de metanol 99,8% e etanol 95%, posteriormente a solução foi aquecida sob agitação à 50 °C até a dissolução. Foi adicionado 100 mL de ácido fosfórico 85% e o

volume completado para 1000 mL com água destilada. A solução foi estocada a 4°C por 24 horas em frasco âmbar, posteriormente foi filtrada em papel Whatman nº1, protegido da luz. A leitura de absorbância foi realizada em um espectrofotômetro, em comprimento de onda de 595 nm.

Foi utilizado albumina sérica bovina como padrão.

### **2.5.9 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)**

A atividade da superóxido dismutase foi determinada segundo Oyanagui (1984). Alíquotas do plasma e homogeneizado de fígado foram incubados com hidroxilamina 0,1M, hipoxantina 0,01M e xantina oxidase  $4 \times 10^{-6}$  U/mL a 37°C, durante trinta minutos, na ausência de luz. Após a incubação foi adicionado ácido sulfanílico,  $\alpha$ -naftilenodiamino e ácido glacial permanecendo incubados à temperatura ambiente por vinte minutos. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 550 nm. A atividade da enzima foi calculada, considerando-se que 1 unidade da enzima é capaz de produzir uma inibição de 50 % na reação. Os resultados foram expressos em relação à concentração de proteína.

### **2.5.10 Determinação da atividade da glutathiona peroxidase (GPx)**

A atividade da glutathiona peroxidase foi determinada segundo Sinet et al. (1975). Alíquotas do plasma e homogeneizado de fígado foram incubados com glutathiona reduzida 6mM, tampão fosfato 50 mM pH 7,0, NADPH 0,001 mM e glutathiona redutase 1 UI por três minutos à 37° C e sua absorbância foi monitorada em espectrofotômetro à 340 nm. Após três minutos de incubação, foi adicionado t-butil-hidroperóxido (0,07 g/mL) para que a reação fosse iniciada. A absorbância foi monitorada à 340 nm por cinco minutos. A cinética de oxidação

do NADPH foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar para o mesmo, a 340 nm. Os resultados foram expressos em relação à concentração de proteína.

### **2.5.11 Determinação da peroxidação lipídica**

A determinação do grau de peroxidação lipídica foi determinada por meio da reação da substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

#### **2.5.11.1 Preparo das amostras**

Para a avaliação da peroxidação lipídica foram estimados os níveis de dialdeído malônico nas amostras de soro e homogeneizado de fígado, através da determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo metodologia descrita por Purchard e Kelly (1996).

A reação do dialdeído malônico com o ácido tiobarbitúrico foi feita com 50 µL de amostra ou de padrão em 250 µL de ácido fosfórico, 450 µL de água milli-Q e 250 µL de ácido tiobarbitúrico, em banho-maria à 95° C por 1 hora. Posteriormente, a solução foi resfriada à 4° C e transferido 200 µL dessa solução à 360 µL de metanol e 40 µL de hidróxido de sódio. Essa nova solução foi filtrada em membrana Millipore de 0,45 µm, antes de serem levados ao cromatógrafo.

#### **2.5.11.2 Análise cromatográfica**

A determinação do dialdeído malônico foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna C-18 (4,6 mm x 25 cm) em método

de fase reversa com detector de fluorescência com excitação em comprimento de onda de 532 nm e emissão de 553 nm. A eluição foi isocrática, em fluxo de 0,8 mL/minuto, sendo a fase móvel metanol/tampão fosfato 25 mM, pH 6,5, na proporção 50:50 v/v. A quantificação foi feita por calibração com o padrão 1,1',3,3'- tetrametoxipropano, por análise da integral das respectivas áreas (PURCHARD; KELLY, 1996).

Todos os reagentes utilizados foram de grau HPLC e água utilizada purificada por sistema Milli-Q.

#### **2.5.12 Análise histopatológica**

Após a fixação dos fígados em formalina 10%, os órgãos foram seccionados em cortes finos, desidratados e clarificados em uma sequência de solução onde permaneceram por 30 minutos em cada. As soluções foram: Álcool 70%, Álcool 90%, Álcool<sup>1</sup> 100%, Álcool<sup>2</sup> 100%, Álcool<sup>3</sup> 100%, Xilol<sup>1</sup>, Xilol<sup>2</sup>, Xilol<sup>3</sup>. Para o preparo do material, foram realizadas uma sequência de 3 banhos com parafina também de 30 minutos cada. O material permaneceu em blocos de parafina e então foi cortado por um micrótomo na espessura de 4 a 6 micrômetros. Os cortes foram transferidos para lâminas de vidro devidamente identificadas. Antes da coloração as lâminas foram banhadas em xilol para remoção da parafina e posteriormente banhadas em uma sequência decrescente de álcool etílico. A coloração foi feita com hematoxilina e eosina, sendo que, primeiro foi imerso em hematoxilina lavado com água para retirar o excesso e depois imerso em eosina também lavado com água para retirada do excesso. Por meio dessa técnica, pode-se diferenciar porções basófilas e acidófilas do tecido estudado. A hematoxilina é acidófila, ou seja, tem afinidade por substâncias ácidas, podendo corar os núcleos. A eosina é basófila, tendo afinidade pelo

citoplasma, fibras colágenas e outras substâncias básicas das células (ATLAS..., 2011).

As lâminas foram observadas em um microscópio óptico com objetiva de aumento de 40x.

As alterações histológicas observadas no presente estudo receberam as seguintes classificações: sem alterações (-); alterações leves (+); moderadas (++); e acentuadas (+++).

## **2.6 Análise estatística**

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial  $2 \times 2 \times 2 + 2$ , sendo duas frações da goiabeira (folha e fruto), duas formas de preparo dos extratos (farinhas e extratos etanólico/acetônico) e dois tipos de dieta (hipercolesterolêmica e não hipercolesterolêmica) com dois tratamentos adicionais (controle hipercolesterolêmico e controle não hipercolesterolêmico), totalizando dez tratamentos com cinco repetições.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico Statistical Analysis System Institute - SAS Institute (1999). E quando significativo utilizou-se o teste de Scott-Knott para comparação das médias entre os tratamentos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Razão massa do fígado *versus* massa corpóreo

Os resultados da razão da massa do fígado *versus* massa corpóreo estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Razão da massa do fígado *versus* massa corpóreo.

| <b>Tratamentos</b> | <b>Razão</b> |
|--------------------|--------------|
| FFON               | 0,0250 b     |
| FFRN               | 0,0241 b     |
| EFON               | 0,0267 b     |
| EFRN               | 0,0238 b     |
| FFOH               | 0,0301 a     |
| FFRH               | 0,0289 a     |
| EFOH               | 0,0315 a     |
| EFRH               | 0,0279 a     |
| CN                 | 0,0235 b     |
| CH                 | 0,0300 a     |

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (5% de probabilidade).

A razão da massa do fígado *versus* massa corpóreo dos animais que receberam a dieta hipercolesterolêmica foi superior ao dos animais que não receberam a dieta hipercolesterolêmica (Tabela 2). Resultados similares foram observados por Lima (2008) e Machado et al. (2003).

Ao analisar os animais que receberam a dieta hipercolesterolêmica tratados com as farinhas e extratos da folhas e frutos da goiabeira com o controle hipercolesterolêmico, não foi observada diferença significativa, o que indica que as farinhas e extratos não foram eficientes para prevenir o acúmulo de colesterol hepático. Melo et al. (2007) estudando o efeito das folhas de mandioca que apresentam teores de compostos fenólicos e fibra alimentar semelhantes aos das folhas da goiabeira não constataram diferença significativa entre os tratamentos.

### 3.2 Lipídios totais hepáticos

Os resultados dos valores médios dos lipídios totais hepáticos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 Porcentagem de lipídios hepáticos totais em amostras de fígado fresco.

| <b>Tratamentos</b> | <b>Porcentagem (%)</b> |
|--------------------|------------------------|
| FFON               | 3,59 b                 |
| FFRN               | 2,95 b                 |
| EFON               | 2,83 b                 |
| EFRN               | 3,31 b                 |
| FFOH               | 13,35 a                |
| FFRH               | 11,23 a                |
| EFOH               | 12,46 a                |
| EFRH               | 11,45 a                |
| CN                 | 3,56 b                 |
| CH                 | 13,32 a                |

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (5% de probabilidade).

De acordo com a Tabela 3, observa-se um menor teor de lipídios hepáticos nos animais que não receberam a dieta hipercolesterolêmica em relação aqueles animais que receberam a dieta. Observa-se pela Figura 3 que os fígados dos animais que receberam a dieta hipercolesterolêmica apresentaram um aspecto amarelado, decorrente do acúmulo de lipídeos nesse órgão, com aspecto semelhante ao observado na esteatose hepática. A Figura 4 mostra os fígados dos animais que foram tratados com a dieta não hipercolesterolêmica, dessa forma, nota-se a coloração avermelhada típica de animais normais.

Sabe-se que além de aumentar a absorção do colesterol da dieta, o ácido cólico pode também inibir a sua conversão a sais biliares e favorecer o acúmulo de lipídicos no fígado (MACHADO et al., 2003). Esta situação pode conduzir à sobrecarga hepática e hipertrofia celular, decorrente de uma maior solicitação fisiológica. Sendo assim, os resultados observados no presente estudo corroboram com os dados da literatura (LIMA, 2008; ROCHA, 2009), demonstrando um acúmulo de lipídios hepático decorrente do tratamento dos animais com ração enriquecida com colesterol e ácido cólico.

Não houve diferença significativa entre os animais tratados com as farinhas e extratos das folhas e frutos que receberam a dieta hipercolesterolêmica quando comparados ao controle hipercolesterolêmico.

O polvilho dos frutos da lobeira apresentam teores de fibra alimentar solúvel semelhantes aos das farinhas e extratos das folhas e frutos da goiabeira e trabalhos de Rocha (2009) também não observou diferença significativa entre os animais que receberam a dieta hipercolesterolêmica tratados com o polvilho dos frutos da lobeira com o controle hipercolesterolêmico.

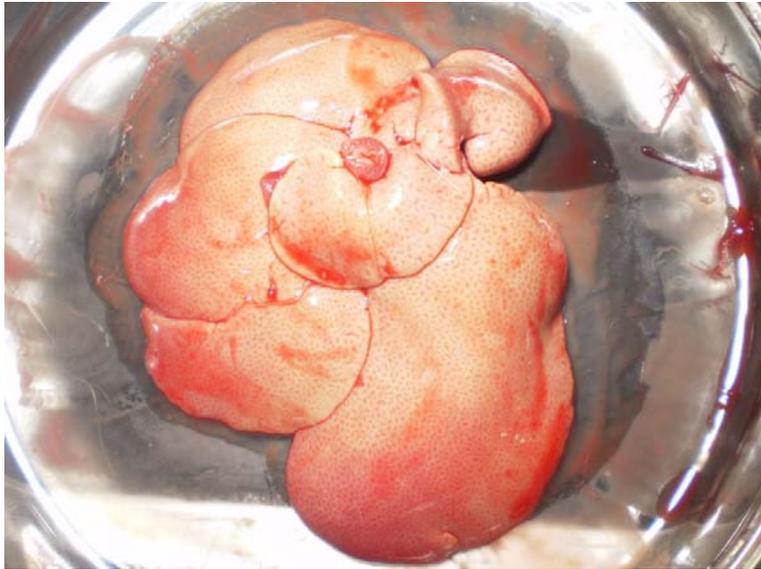


Figura 3 Aspecto geral do figado do rato pertencente ao controle hipercolesterolêmico

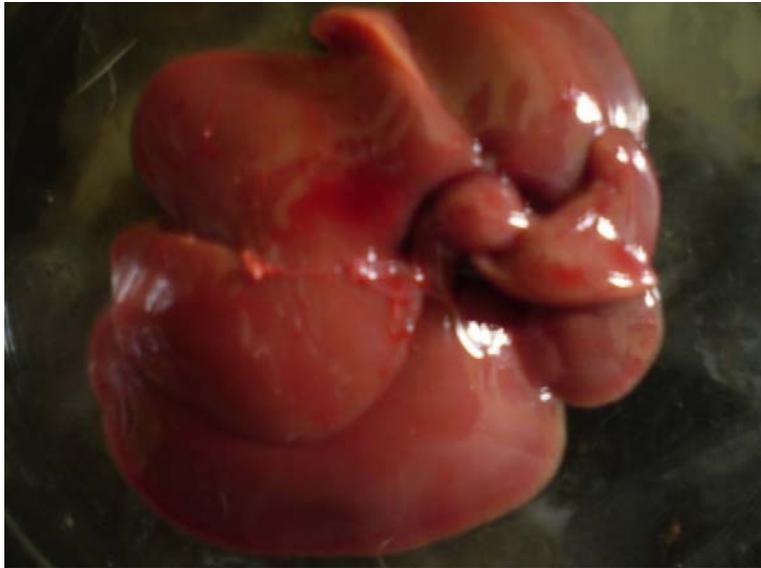


Figura 4 Aspecto geral do figado do rato pertencente ao controle não hipercolesterolêmico

### 3.3 Análise histopatológica

As alterações histológicas observadas no presente estudo receberam as seguintes classificações (Figuras 5 A a D): sem alterações (-); alterações leves (+); moderadas (++); e acentuadas (+++).

Nos fígados cuja dieta foi hipercolesterolêmica e sem nenhum tipo de tratamento os hepatócitos apresentaram um acentuado grau de esteatose hepática, caracterizada por um grande número de vacúolos citoplasmáticos, ocupando parte do citoplasma na região periportal e mediozonal, enquanto que a região centrolobular apresentou-se pouco afetada (Figura 5, D). Os fígados dos animais que receberam a dieta não hipercolesterolêmica apresentaram normais, ou seja, sem nenhuma alteração (Figura 5, A). Resultados semelhantes foram relatados por Rocha (2009) e Souza (2009), que observaram um acentuado aumento no número de vacúolos citoplasmáticos nos hepatócitos dos animais hipercolesterolêmicos.

O aumento do número de vacúolos ou degeneração dos hepatócitos (esteatose hepática) ocorre todas as vezes que um agente interfere no metabolismo dos ácidos graxos da célula, aumentando sua síntese ou dificultando sua utilização, transporte ou excreção (BRASILEIRO FILHO, 2004).

Não foi observada nenhuma alteração (Figura 5, A) nos fígados dos animais que receberam a dieta não hipercolesterolêmica tratados com as farinhas e extratos das folhas e frutos da goiabeira, ou seja, apresentaram aspectos semelhantes aos do controle não hipercolesterolêmicos.

Nos animais hipercolesterolêmicos que receberam os extratos das folhas e frutos, os fígados apresentaram esteatose com distribuição semelhante, porém em grau moderado (Figura 5, C). Já no grupo de animais hipercolesterolêmicos tratados com a farinha das folhas e frutos o resultado foi semelhante ao do

controle hipercolesterolêmico, ou seja, lesão considerada acentuada (Figura 3, D).

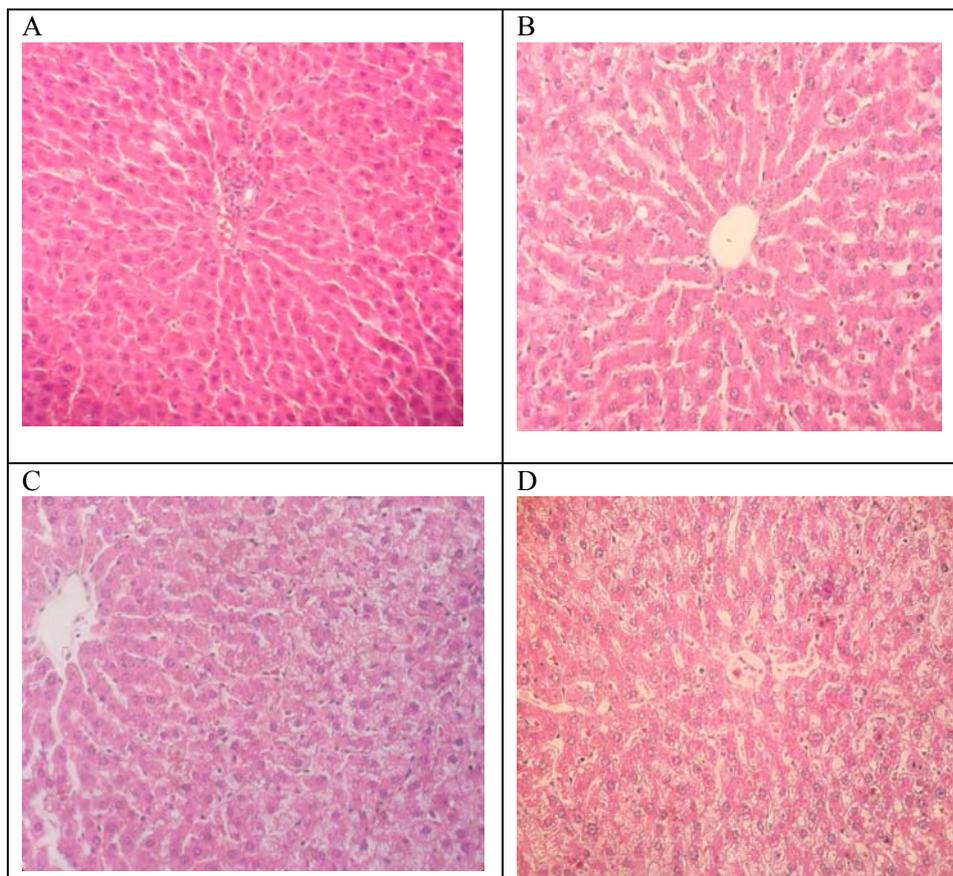


Figura 5 Fotomicrografia do fígado dos ratos. A: normal; B: Lesão considerada leve (+); C: Lesão considerada moderada (++); D: Lesão considerada acentuada (+++). Coloração: HE, objetiva 40

### 3.4 Colesterol total e frações

Pelos dados da Tabela 4, observa-se que os animais pertencentes ao grupo controle não hipercolesterolêmico apresentaram níveis séricos de colesterol total de 46,23 mg.dL<sup>-1</sup>, enquanto que os animais do controle hipercolesterolêmico apresentaram um aumento de 109% nos níveis séricos de colesterol total, sendo essa diferença significativa, indicando hipercolesterolemia. Esses valores são próximos aos encontrados por Machado et al. (2003) e Rocha (2009).

Observa-se que os animais submetidos à dieta hipercolesterolêmica tratados com a farinha das folhas e frutos da goiabeira apresentaram níveis séricos de colesterol total menores que o controle hipercolesterolêmico conduzindo a uma redução de 29,93 % e 35,18 % nos níveis de colesterol total. O mesmo não foi observado para os extratos das folhas e frutos que não apresentaram diferença significativa em relação ao controle hipercolesterolemico. Martinella (2006), estudando o efeito hipocolesterolêmico do extrato hidroalcoólico de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) observou uma redução de 50,12 % nos níveis de colesterol total, esse fruto apresenta teores de fibra alimentar semelhantes aos encontrados para as farinhas das folhas e frutos da goiabeira.

Rocha (2009), analisando o efeito do polvilho da fruta-do-lobo na redução da hipercolesterolemia não encontrou efeito hipocolesterolêmico, apesar de ambas as amostras apresentarem teores de fibra alimentar solúvel semelhantes.

Tabela 4 Concentrações médias dos níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos, colesterol não HDL e colesterol HDL.

| Tratamentos | Colesterol<br>(mg.dL <sup>-1</sup> ) | Triglicerídeos<br>(mg.dL <sup>-1</sup> ) | Colesterol<br>não HDL<br>(mg.dL <sup>-1</sup> ) | HDL<br>(mg.dL <sup>-1</sup> ) |
|-------------|--------------------------------------|--|---|-------------------------------|
| FFON        | 49,22 b                              | 35,44 b                                  | 31,42 c   | 17,80 a                       |
| FFRN        | 46,12 b                              | 37,55 b                                  | 26,92 c   | 20,00 a                       |
| EFON        | 50,40 b                              | 29,04 b                                  | 30,48 c   | 19,20 a                       |
| EFRN        | 47,26 b                              | 30,10 b                                  | 28,86 c   | 18,40 a                       |
| FFOH        | 67,76 b                              | 40,19 b                                  | 52,26 b   | 15,50 a                       |
| FFRH        | 62,68 b                              | 42,00 b                                  | 47,88 c   | 14,80 a                       |
| EFOH        | 86,02 a                              | 42,32 b                                  | 71,42 a   | 14,60 a                       |
| EFRH        | 77,20 a                              | 49,79 b                                  | 58,00 b   | 19,20 a                       |
| CN          | 46,23 b                              | 37,02 b                                  | 30,43 c   | 15,80 a                       |
| CH          | 96,70 a                              | 68,00 a                                  | 88,50 a   | 8,20 b                        |

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (5% de probabilidade).

Na Tabela 4 estão apresentados os níveis de triglicerídeos dos animais tratados. Todos os tratamentos exerceram efeito positivo nos níveis de triglicerídeos. Houve uma redução entre 59,10 % a 73,22% nos níveis de triglicerídeos nos animais tratados com as farinhas e extratos.

Martinella (2006) observou uma redução de 39,23 % nos níveis de triglicerídeos em animais que receberam dieta hipercolesterolêmica e extrato hidroalcoólico de tamarindo (*Tamarindus indica* L.), valor inferior ao encontrado para as folhas e frutos da goiabeira.

Os teores médios de colesterol não HDL foram calculados através da diferença dos teores de colesterol total com os teores de colesterol HDL. Estes valores representam uma estimativa da concentração de colesterol nas

lipoproteínas aterogênicas, ou seja, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL). Observa-se pela Tabela 4 que o grupo controle hipercolesterolêmico e extrato das folhas apresentaram os maiores teores de colesterol não HDL iguais a 88,50 e 71,42 mg.dL<sup>-1</sup>, respectivamente, não havendo diferença significativa entre eles. Os animais que receberam a dieta hipercolesterolêmica e foram tratados com a farinha das folhas e extrato etanólico/acetônico dos frutos de goiaba apresentaram uma redução significativa dos níveis de colesterol não HDL em relação ao controle hipercolesterolêmico, porém estes foram superiores aos do controle não hipercolesterolêmico. A maior redução dos níveis de colesterol não HDL foi para os animais hipercolesterolêmicos tratados com a farinha dos frutos com uma redução de 45,90 %.

A concentração de colesterol HDL se refere ao conteúdo de colesterol nas lipoproteínas de alta densidade (HDL) e fornece uma estimativa da concentração destas lipoproteínas na corrente sanguínea. Esta lipoproteína é responsável pela inibição da deposição de colesterol mediada pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) nas paredes das artérias e pelo transporte reverso de colesterol, promovendo a retirada do colesterol das células do corpo para o fígado, para reutilizá-lo ou convertê-lo em ácidos biliares. Dessa forma, quanto maiores são os seus níveis no organismo menor são os riscos de que ocorram doenças cardiovasculares (DUARTE, 1996). Pela Tabela 4, observa-se que houve diferença significativa entre o controle hipercolesterolêmico (8,20 mg.dL<sup>-1</sup>) e o controle não hipercolesterolêmico (15,80 mg.dL<sup>-1</sup>). Independente da dieta administrada, todos os animais tratados com as amostras apresentaram concentrações de colesterol HDL significativamente maiores aos dos animais pertencentes ao controle hipercolesterolêmico.

Estes resultados podem ser atribuídos ao aumento na concentração sérica de triglicerídeos e conseqüentemente de VLDL em decorrência do

tratamento dos animais com a dieta hipercolesterolêmica (Tabela 4), conforme esperado. Sabe-se que níveis séricos aumentados de triglicerídeos levam ao aumento na concentração, que são lipoproteínas precursoras das LDL. Além disso, na circulação, as HDL recebem partículas de triglicerídeos presentes principalmente nas VLDL em troca de ésteres de colesterol. Este processo transforma as HDL em partículas mais densas, que são menos eficientes nos seus mecanismos anti-aterogênicos, aumentando o *clearance* do colesterol HDL e a velocidade em que são degradadas estas lipoproteínas, reduzindo seus níveis na corrente sanguínea (MARQUES-LOPES et al., 2004). Sendo assim, os resultados observados no presente estudo demonstraram um efeito benéfico da farinha e dos extratos de folhas e de frutos de goiaba sobre o perfil lipídico no soro de animais hipercolesterolêmicos.

### **3.5 Proteína C reativa**

A proteína C reativa (PC-r) é uma proteína sintetizada pelo fígado em resposta as citocinas, que reflete inflamação ativa sistêmica, ou seja, é um biomarcador de inflamação (LIMA et al., 2007).

Pelos dados da Tabela 5, observa-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos e os controles, sugerindo que os animais que foram tratados com a dieta hipercolesterolêmica ainda não desenvolveram a resposta inflamatória sistêmica capaz de desencadear a aterosclerose. Desta forma, não foi possível avaliar se as farinhas e os extratos das folhas e frutos da goiabeira são capazes de evitar o processo inflamatório sistêmico, entretanto no controle hipercolesterolêmico houve uma tendência de maior níveis dessa proteína.

Tabela 5 Teores médios de proteína C reativa (mg.L<sup>-1</sup>).

| <b>Tratamentos</b> | <b>Proteína C reativa (mg.L<sup>-1</sup>)</b> |
|--------------------|---|
| FFON               | 1,18  |
| FFRN               | 1,12  |
| EFON               | 0,50  |
| EFRN               | 0,60  |
| FFOH               | 1,52  |
| FFRH               | 1,16  |
| EFOH               | 1,16  |
| EFRH               | 1,20  |
| CN                 | 0,50  |
| CH                 | 1,92  |

Muitos estudos relatam que uma dieta hipercolesterômica aumenta os níveis de PC-r. Duarte et al. (2009), avaliando o efeito de uma dieta hipercolesterolêmica sobre o sistema antioxidante endógeno e o biomarcador de inflamação (PC-r), observaram uma relação positiva, ou seja, a dieta hipercolesterolêmica aumentou de forma significativa o teor de PC-r quando comparado com a dieta não hipercolesterolêmica. Resultados diferentes aos encontrados neste estudo.

### **3.6 Atividade das enzimas antioxidantes e avaliação da lipoperoxidação**

Considerando que o aumento na concentração sérica de colesterol pode favorecer o estresse oxidativo *in vivo*, e que esta tem sido relacionada como fator de risco para doenças cardiovasculares (MARTINELLA, 2006), os níveis de MDA no soro e no fígado dos animais foram avaliadas. Os resultados da

concentração dos marcadores de estresse oxidativo avaliados nesse estudo estão apresentadas nas Tabelas 6, 7, 8 e 9.

### **3.6.1 Soro**

De acordo com a Tabela 6, a indução da hipercolesterolemia aumentou significativamente a atividade das enzimas SOD e GPx quando comparada ao controle não hipercolesterolêmico. Resultados semelhantes foram observado no trabalho de Chenni et al. (2007).

Pela Tabela 6, observa-se que a atividade da SOD nos animais que receberam a dieta hipercolesterolêmica tratados com as farinhas das folhas e frutos não diferiu significativamente dos animais pertencentes ao grupo controle não hipercolesterolêmico. Da mesma forma o teor de colesterol apresentado na Tabela 4 para esses animais não diferiu dos animais do controle não hipercolesterolêmico. Os animais que receberam a dieta hipercolesterolêmica tratados com os extratos das folhas e frutos apresentaram atividade enzimática semelhante ao controle hipercolesterolêmico, sugerindo que esses extratos não foram eficientes em controlar as espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas no soro de animais hipercolesterolêmicos.

Tabela 6 Atividade das enzimas antioxidantes nas amostras de soro.

| <b>Tratamentos</b> | <b>SOD<br/>(U/mg de proteína)</b> | <b>GPx<br/>(<math>\mu\text{mol de NADPH/mg}</math><br/>proteína)</b> |
|--------------------|-----------------------------------|--|
| FFON               | 5,256 b                           | $1,86 \times 10^{-13}$ c   |
| FFRN               | 5,064 b                           | $1,49 \times 10^{-13}$ c   |
| EFON               | 5,038 b                           | $2,12 \times 10^{-13}$ c   |
| EFRN               | 5,140 b                           | $1,57 \times 10^{-13}$ c   |
| FFOH               | 5,348 b                           | $1,56 \times 10^{-13}$ c   |
| FFRH               | 5,164 b                           | $3,29 \times 10^{-13}$ b   |
| EFOH               | 5,560 a                           | $2,81 \times 10^{-13}$ b   |
| EFRH               | 5,720 a                           | $2,56 \times 10^{-13}$ b   |
| CN                 | 4,998 b                           | $1,86 \times 10^{-13}$ c   |
| CH                 | 6,184 a                           | $4,58 \times 10^{-13}$ a   |

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (5% de probabilidade).

Em relação à atividade da GPx, observa-se pela Tabela 6 que entre os animais que receberam a dieta hipercolesterolêmica, apenas os tratados com a farinha das folhas apresentaram atividade enzimática estatisticamente semelhante aos animais do controle não hipercolesterolêmicos. Os animais tratados com os extratos das folhas e frutos apresentaram atividade enzimática inferior aos animais do controle hipercolesterolêmico e superiores ao do controle não hipercolesterolêmico, significando que nestes grupos também houve uma estabilização das ERO geradas.

A ação das enzimas antioxidantes (SOD e GPx) é inativar EROs evitando, dessa forma, a lipoperoxidação.

Quando se compara o nível de dialdeído malônico (Tabela 7) com a atividade enzimática da SOD e GPx (Tabela 6) no soro dos animais pertencentes aos grupos controle não hipercolesterolêmico e hipercolesterolêmico, observa-se que houve aumento da atividade enzimática no grupo controle hipercolesterolêmico enquanto que o teor de dialdeído malônico foi estatisticamente semelhante entre os diferentes grupos analisados. Estes resultados podem ser atribuídos a um possível aumento na geração de ERO no soro dos animais hipercolesterolêmicos.

Sabe-se que os organismos aeróbicos são capazes de responder ao aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), induzindo mecanismos de reparo e proteção, através do sistema de defesa antioxidante (SAMPAIO; MORAES, 2010). Foi demonstrado neste estudo um aumento significativo na atividade das enzimas SOD e GPx no soro dos animais tratados com a dieta hipercolesterolêmica quando comparados ao grupo normocolesterolêmico. A atividade destas enzimas representa a proteção do organismo contra o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, e hidroperóxidos lipídicos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; PURCAHRD; KELLY, 1996). Apesar da existência de outros antioxidantes não analisados neste trabalho, tais como catalase, tioredoxina, glutathione, vitamina E, entre outros, que poderiam contribuir para a proteção contra o estresse oxidativo (RATNAM et al., 2006), os resultados obtidos sugerem que o sistema de defesa antioxidante foi ativado de maneira proporcional à necessidade gerada pelos eventos pró-oxidantes, impedindo assim o aumento da concentração de dialdeído malônico no plasma dos animais hipercolesterolêmicos. O mesmo foi observado nos trabalhos de Chenni et al. (2007) e Mantha, Kalra e Prasad (1996).

O tratamento dos animais hipercolesterolêmicos com os extratos e farinhas de folhas e frutos de goiaba foi capaz de reduzir a atividade das enzimas SOD e GPx no soro dos animais hipercolesterolêmicos. Estes resultados

poderiam ser atribuídos à presença de compostos antioxidantes presentes nas folhas e frutos da goiaba, tais como compostos fenólicos, vitamina C e beta-caroteno conforme observado no capítulo 2, que poderiam atuar impedindo o aumento ou seqüestrando ERO com conseqüente redução dos eventos pró-oxidantes no compartimento plasmático. Desta forma, a resposta do organismo em relação à indução da atividade sérica de SOD e GPx seria menor do que aquela observada nos animais hipercolesterolêmicos não tratados com as farinhas ou com os extratos utilizados neste estudo.

Sendo assim, nossos resultados sugerem que as farinhas das folhas e frutos da goiabeira podem ser eficientes no controle do estresse oxidativo no soro de animais hipercolesterolêmicos.

Tabela 7 Teores médios de dialdeído malônico o no soro ( $\mu\text{mol MDA}/\text{mg}$  proteína).

| <b>Tratamentos</b> | <b>MDA (<math>\mu\text{mol MDA}/\text{mg}</math> proteína)</b> |
|--------------------|--|
| FFON               | $2,04 \times 10^{-3}$  |
| FFRN               | $1,59 \times 10^{-3}$  |
| EFON               | $2,13 \times 10^{-3}$  |
| EFRN               | $1,99 \times 10^{-3}$  |
| FFOH               | $1,45 \times 10^{-3}$  |
| FFRH               | $1,49 \times 10^{-3}$  |
| EFOH               | $1,97 \times 10^{-3}$  |
| EFRH               | $1,43 \times 10^{-3}$  |
| CN                 | $2,18 \times 10^{-3}$  |
| CH                 | $2,30 \times 10^{-3}$  |

Nas Figuras 6, 7 e 8 são mostrados os cromatogramas e o respectivo tempo de retenção do padrão de dialdeído malônico e de amostras de soro dos animais dos grupos CN e CH. Observa-se que o pico de retenção das amostras foi praticamente o mesmo do padrão.

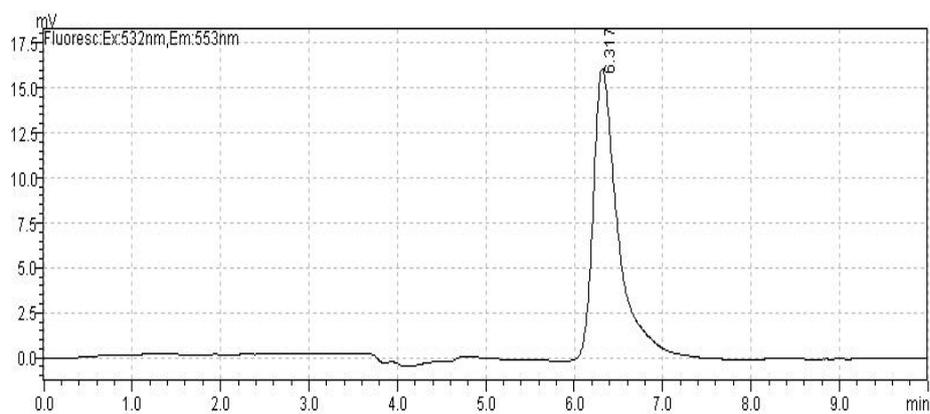


Figura 6 Cromatograma do padrão de dialdeído malônico na concentração 1,2  $\mu\text{m}$ . O pico à 6,317 minutos refere-se ao dialdeído malônico

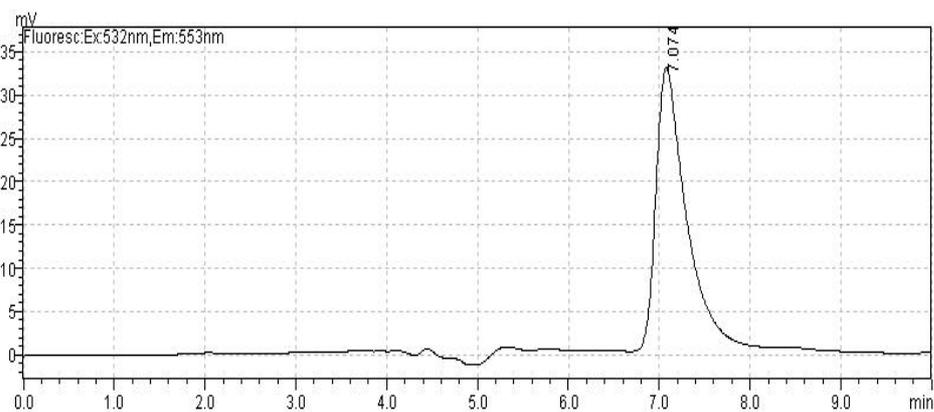


Figura 7 Cromatograma de dialdeído malônico no soro dos animais do grupo não hipercolesterolêmico. O pico à 7,074 minutos corresponde ao ácido malônico

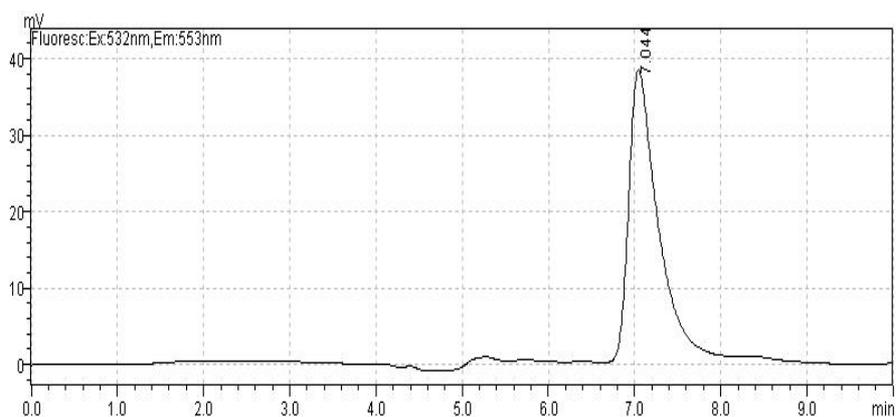


Figura 8 Cromatograma de dialdeído malônico no soro dos animais do grupo hipercolesterolêmico. O pico à 7,044 minutos corresponde ao dialdeído malônico

### 3.6.2 Fígado

Pelos dados da Tabela 8, observa-se que ao contrário dos resultados obtidos no soro, não houve diferença significativa na atividade da atividade da SOD hepática entre os diferentes grupos analisados. Porém, ao analisar a atividade enzimática da GPx observa-se que os animais pertencentes ao grupo controle hipercolesterolêmico apresentaram uma atividade superior aos animais do grupo controle não hipercolesterolêmico. Entre os diferentes tratamentos avaliados neste estudo, observa-se que apenas o tratamento com a farinha de frutos de goiaba foi capaz reduzir significativamente a atividade de GPx em homogeneizados de fígado de animais hipercolesterolêmicos, a níveis semelhantes ao do controle não hipercolesterolêmico.

Tabela 8 Expressão das enzimas antioxidantes nas amostras de fígado

| <b>Tratamentos</b> | <b>SOD<br/>(U/mg de proteína)</b> | <b>GPx<br/>(<math>\mu\text{mol de NADPH/mg}</math><br/>proteína)</b> |
|--------------------|-----------------------------------|--|
| FFON               | 323,21                            | $2,16 \times 10^{-14}$ b   |
| FFRN               | 328,20                            | $3,10 \times 10^{-14}$ b   |
| EFON               | 341,97                            | $2,99 \times 10^{-14}$ b   |
| EFRN               | 345,73                            | $3,73 \times 10^{-14}$ b   |
| FFOH               | 389,09                            | $5,00 \times 10^{-14}$ a   |
| FFRH               | 356,02                            | $3,68 \times 10^{-14}$ b   |
| EFOH               | 427,63                            | $4,80 \times 10^{-14}$ a   |
| EFRH               | 395,25                            | $4,54 \times 10^{-14}$ a   |
| CN                 | 371,56                            | $2,97 \times 10^{-14}$ b   |
| CH                 | 457,32                            | $5,60 \times 10^{-14}$ a   |

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Nott (5% de probabilidade).

Chenni et al. (2007), estudando o efeito da erva-moscada (*Ajuga iva*), uma planta usado como vasodilatadora e antioxidante, no fígado de ratos hipercolesterolemicos observaram um aumento na atividade da GPx e da SOD quando comparado com o controle não hipercolesterolêmico.

Uma das principais funções hepáticas é a desintoxicação e este órgão possui muitas enzimas antioxidantes ativas (LIU et al., 2000; MARTINEU; CHADAN; PARKHOUSE, 1995). Entretanto as isoformas de SOD e GPx encontradas no meio intracelular são diferentes daquelas encontradas nos líquidos extracelulares, podendo portanto, apresentar uma variação na afinidade pelos seus respectivos substratos entre os diferentes compartimentos do

organismo. Além disso, a proporção entre o conteúdo de substâncias antioxidantes e pró-oxidantes é altamente variável entre os diferentes órgãos e compartimentos do organismo. Desta forma a resposta do sistema de defesa antioxidante ao aumento de ERO, pode variar não somente em relação à concentração como também em função do tipo de espécies oxidantes produzidas e do conteúdo de antioxidantes presentes no tecido analisado.

De acordo com a Tabela 9, os animais do grupo controle hipercolesterolêmico apresentaram o teor de dialdeído malônico superior ao controle não hipercolesterolêmico, sugerindo que apesar do aumento na atividade da GPx, este não foi suficiente para conter a peroxidação lipídica no fígado destes animais.

Estes resultados corroboram com dados da literatura que também demonstraram que uma dieta hipercolesterolêmica não foi capaz de induzir diferença significativa na atividade da SOD, mas aumentou a atividade da GPx e o teor de MDA em amostras de fígado de ratos (GOKKUSU; MASTAFAZADE, 2003).

Nesta situação torna-se evidente a importância da intervenção terapêutica a fim de evitar os danos ocasionados pela produção excessiva de ERO. Sendo assim, foi comparado também o efeito da ingestão dos extratos e farinhas de folhas e de frutos de goiaba sobre os níveis de MDA no fígado dos animais pertencentes aos diferentes grupos. Foi observado que todos os animais hipercolesterolêmicos tratados com os extratos e com as farinhas apresentaram uma redução significativa no teor de MDA hepático em relação ao controle hipercolesterolêmico. Além disso, a farinha dos frutos de goiaba foi mais efetiva na redução das concentrações de MDA no fígado levando a concentrações semelhantes àquelas observadas nos animais normolipidêmicos, o que poderia justificar os resultados observados em relação à atividade de GPx no fígado de dos animais hipercolesterolêmicos tratados com esta farinha.

De acordo com os resultados apresentados no capítulo 2, a farinha dos frutos apresentaram os menores teores de compostos fenólicos e menor atividade antioxidante, sugerindo que os compostos fenólicos presentes nas outras amostras podem ter tido a sua absorção limitada em virtude da sua composição química.

Tabela 9 Teores médios de dialdeído malônico no fígado ( $\mu\text{mol MDA/mg}$  proteína).

| <b>Tratamentos</b> | <b>MDA (<math>\mu\text{mol MDA/mg}</math> proteína)</b> |
|--------------------|---|
| FFON               | $2,68 \times 10^{-2}$ c                                 |
| FFRN               | $3,17 \times 10^{-2}$ c                                 |
| EFON               | $4,56 \times 10^{-2}$ b                                 |
| EFRN               | $3,12 \times 10^{-2}$ c                                 |
| FFOH               | $4,74 \times 10^{-2}$ b                                 |
| FFRH               | $3,07 \times 10^{-2}$ c                                 |
| EFOH               | $4,45 \times 10^{-2}$ b                                 |
| EFRH               | $5,27 \times 10^{-2}$ b                                 |
| CN                 | $2,91 \times 10^{-2}$ c                                 |
| CH                 | $7,97 \times 10^{-2}$ a                                 |

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (5% de probabilidade).

Nas Figuras 9 e 10 são mostrados os cromatogramas e o respectivo tempo de retenção de amostras de fígado dos animais dos grupos CN e CH. Observa-se que o pico de retenção das amostras foi praticamente o mesmo do padrão (Figura 6).

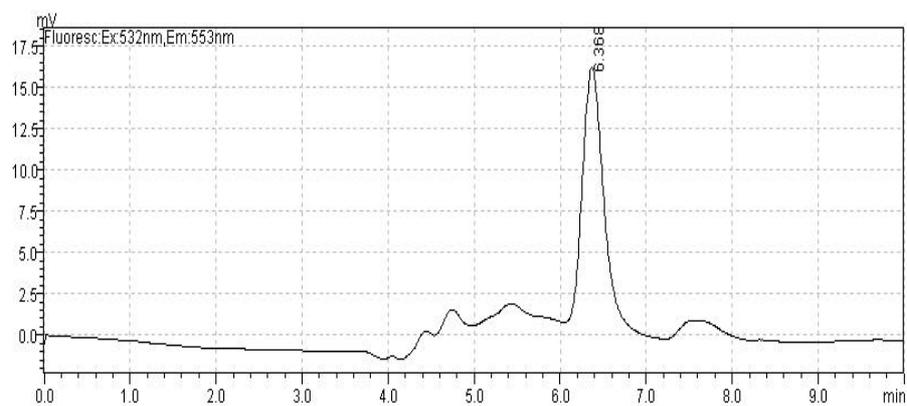


Figura 9 Cromatograma de dialdeído malônico no fígado dos animais do grupo não hipercolesterolêmico. O pico à 6,366 minutos corresponde ao dialdeído malônico

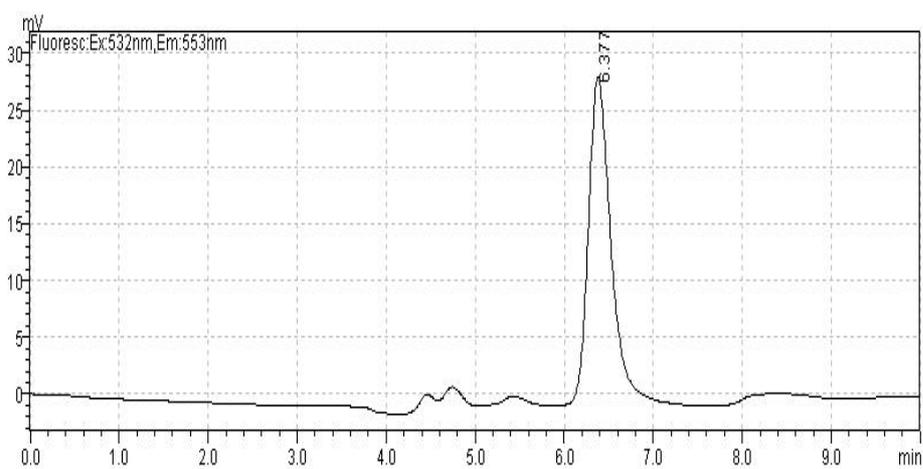


Figura 10 Cromatograma de dialdeído malônico no fígado dos animais do grupo hipercolesterolêmico. O pico à 6,377 minutos corresponde ao dialdeído malônico

#### **4 CONCLUSÃO**

As farinhas e extratos etanólico/acetônico das folhas e frutos da goiabeira exerceram efeito hipocolesterolêmico e preveniram o estresse oxidativo induzido pela hipercolesterolemia no fígado e plasma de ratos.

Dessa forma, as folhas e frutos da cultivar Pedro Sato podem ser utilizadas como alimentos funcionais e matéria-prima para o desenvolvimento de fitoterápicos.

## REFERÊNCIAS

ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, São Paulo, v. 3, n. 2, p. 145-154, abr. 2004.

ARONOW, W. S. Treatment of high-risk older persons with lipid-lowering drug therapy. **American Journal of Therapeutics**, Philadelphia, v. 15, n. 2, p. 102-107, Mar./Apr. 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of Analysis of the Association of Official Chemistry**. Washington, 2000. 1015 p.

ATLAS eletrônico de histologia: preparação de lâminas histológicas. Disponível em: <[http://www.danielbranco.com.br/atlas/txt\\_prep.html](http://www.danielbranco.com.br/atlas/txt_prep.html)>. Acesso em: 20 jan. 2011.

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, jan./fev. 2006.

BELING, D.; PUJOL, A. P.; ANDRADE, V. O. de. Antioxidantes para a prevenção do envelhecimento cutâneo: uma revisão. **Nutrição em Pauta**, São Paulo, v. 15, n. 85, p. 40-46, 2007.

BHATT, D. L. et al. International prevalence, recognition and treatment of cardiovascular risk factors in outpatients with atherombosis. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 295, n. 2, p. 180-189, Jan. 2006.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo patologia geral**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 379 p.

CHENNI, A. et al. Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 109, n. 2, p. 207-213, July 2007.

DICKEL, M. L.; RATES, S. M.; RITTER, M. R. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 109, n. 1, p. 60-71, Feb. 2007.

DUARTE, H. S. **Elaboração e formulação de um alimento formulado em pó, rico em fibra, no controle da hipercolesterolemia**. Viçosa, MG: UFV, 1996. 137 p.

DUARTE, M. M. M. F. et al. Association between ischemia-modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia. **Clinical Biochemistry**, London, v. 42, n. 7/8, p. 666-671, May 2009.

GOKKUSU, C.; MASTAFAZADE, T. Changes of oxidative stress in various tissues by long-term administration of vitamin E in hypercholesterolemic rats. **Chinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 328, n. 1/2, p. 155-161, Feb. 2003.

LIBBY, P. Changing conational cholesterol education programs of atherogenesis. **Journal of International Medical Research**, Worthing, v. 247, p. 349-358, 2000.

LIMA, H. M. **Farinha da casca do maracujá associada ao exercício físico no controle da lipídemia em ratas**. 2008. 87 p. Tese (Doutorado em Ciência dos alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

LIMA, L. M. et al. Proteína C reativa ultra-sensível em pacientes com diagnóstico de doença arterial coronariana estabelecido por angiografia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 2, p. 83-86, abr. 2007.

LIU, J. L. et al. Chronic exercise reduces sympathetic nerve activity in rabbits with pacing-induced heart failure: a role for angiotensin II. **Circulation**, London, v. 102, n. 15, p. 1854-1862, July 2000.

MACHADO, D. F. et al. Efeito de probiótico na modulação dos níveis de colesterol sérico e no peso do fígado de ratos alimentados com dieta rica em colesterol e ácido fólico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 270-275, maio/ago. 2003.

MANTHA, S. V.; KALRA, J.; PRASAD, K. Effects of probucol on hypercholesterolemia-induced changes in antioxidant enzymes. **Life Science**, Elmsford, v. 58, n. 6, p. 503-509, Dec. 1996.

MARQUES-LOPES, I. et al. Aspectos genéticos da obesidade. **Revista Brasileira de Nutrição**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 327-338, jul./set. 2004.

MARTINELLA, F. **Avaliação da atividade biológica do extrato hidroalcoólico de Tamarindus indica L. sobre o metabolismo lipídico e na carcinogênese coloteral em hamster**. 2006. 148 p. Tese (Doutorado em Biociências Aplicada à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2006.

MARTINEU, L. C.; CHADAN, S. G.; PARKHOUSE, W. S. Resistance of the aged myocardium to exercise-induced chronic changes in glucose transport related protein content. **Mechanisms of Aging and Development**, Chicago, v. 110, n. 1/2, p. 109-118, Oct. 1999.

MELO, D. S. et al. 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.

OYANAGUI, Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. **Analytical Biochemistry**, London, v. 142, n. 2, p. 290-296, Nov. 1984.

PUNCHARD, N. A.; KELLY, F. J. **Free radicals: a practical approach**. New York: Oxford University, 1996. 309 p.

RATNAM, D. et al. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. **Journal Control Release**, New York, v. 113, n. 2, p. 189-207, June 2006.

ROCHA, D. A. **Avaliação do efeito hipoglicemiante e hipocolesterolêmico do polvilho da fruta-de-lobo (*solanum lycocarpum* st. Hil.)**. 2009. 109 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SAMPAIO, R. C.; MORAES, C. Estresse oxidativo e envelhecimento: papel do exercício físico. **Revista de Educação Física**, Rio Claro, v. 16, n. 2, p. 506-515, abr./jun. 2010.

SINET, P. M. et al. Increase in glutathione peroxidase activity in erythrocytes from trisomy 21 subjects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 67, p. 910-915, 1975.

SOUZA, S. P. **Ação inibitória de extratos de plantas sobre lipase pancreática com ênfase em *Baccharis trimera* (Less) DC**. 2009. 109 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **Users guide: statistics**. Version 6. Cary, 1999. v. 2, 1686 p.

**ANEXO****ANEXO A**

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| Tabela 1A | Resumo da análise de variância para potássio, magnésio e cobre de três cultivares das folhas e frutos da goiabeira.   | 135 |
| Tabela 2A | Resumo da análise de variância para manganês, zinco e ferro de três cultivares das folhas e frutos da goiabeira..   | 135 |
| Tabela 3A | Resumo da análise de variância para fibras alimentares solúveis e insolúveis de três cultivares das folhas e frutos da goiabeira.....   | 135 |
| Tabela 4A | A Resumo da análise de variância para vitamina C e $\beta$ -caroteno de três cultivares das folhas e frutos da goiabeira  | 136 |
| Tabela 5A | Resumo da análise de variância para compostos fenólicos nas farinhas e extratos de três cultivares das folhas e frutos da goiabeira .....   | 136 |
| Tabela 6A | Resumo da análise de variância para a atividade antioxidante pelo método DPPH nas farinhas e extratos de três cultivares das folhas e frutos da goiabeira.....                          | 136 |
| Tabela 7A | Resumo da análise de variância para a atividade antioxidante pelo método beta caroteno/ácido linolêico nas farinhas e extratos de três cultivares das folhas e frutos da goiabeira..... | 137 |

Tabela 1A Resumo da análise de variância para potássio, magnésio e cobre de três cultivares das folhas e frutos da goiabeira.

| FV           | GL | Quadrado médio |            |             |
|--------------|----|----------------|------------|-------------|
|              |    | Potássio       | Magnésio   | Cobre       |
| Cultivar (C) | 2  | 23,336250*     | 0,412917*  | 193,905704* |
| Partes (P)   | 1  | 6,615000*      | 21,850417* | 153,419267* |
| C x P        | 2  | 34,688750*     | 0,230417*  | 280,670929* |
| Erro         | 18 | 0,631111       | 0,004028   | 9,778614    |
| CV (%)       |    | 5,94           | 3,98       | 10,37       |

\* Teste de Scott-Knott, significativo, a 5 % de probabilidade

Tabela 2A Resumo da análise de variância para manganês, zinco e ferro de três cultivares das folhas e frutos da goiabeira.

| FV           | GL | Quadrado médio |              |               |
|--------------|----|----------------|--------------|---------------|
|              |    | Manganês       | Zinco        | Ferro         |
| Cultivar (C) | 2  | 5234,645417*   | 6,087917     | 692,817329*   |
| Partes (P)   | 1  | 32303,343750*  | 1187,226667* | 33076,147537* |
| C x P        | 2  | 4747,321250*   | 31,342917    | 1455,652162*  |
| Erro         | 18 | 13,964028      | 34,353611    | 58,463010     |
| CV (%)       |    | 9,26           | 24,82        | 14,21         |

\* Teste de Scott-Knott, significativo, a 5 % de probabilidade

Tabela 3A Resumo da análise de variância para fibras alimentares solúveis e insolúveis de três cultivares das folhas e frutos da goiabeira.

| FV           | GL | Quadrado médio          |                           |
|--------------|----|-------------------------|---------------------------|
|              |    | Fibra alimentar solúvel | Fibra alimentar insolúvel |
| Cultivar (C) | 2  | 1,497050*               | 151,206117*               |
| Partes (P)   | 1  | 28,058438*              | 10311,516704*             |
| C x P        | 2  | 1,775150*               | 159,861817*               |
| Erro         | 18 | 0,132268                | 2,770468                  |
| CV (%)       |    | 13,87                   | 5,26                      |

\* Teste de Scott-Knott, significativo, a 5 % de probabilidade

Tabela 4A Resumo da análise de variância para vitamina C e  $\beta$ -caroteno de três cultivares das folhas e frutos da goiabeira.

| FV           | GL | Quadrado médio |                   |
|--------------|----|----------------|-------------------|
|              |    | Vitamina C     | $\beta$ -caroteno |
| Cultivar (C) | 2  | 90988,625000*  | 6,626304*         |
| Partes (P)   | 1  | 32560,666667*  | 808,288267*       |
| C x P        | 2  | 10995,291667*  | 6,484654*         |
| Erro         | 18 | 3922,305556    | 1,015744          |
| CV (%)       |    | 23,68          | 11,59             |

\* Teste de Scott-Knott, significativo, a 5 % de probabilidade

Tabela 5A Resumo da análise de variância para compostos fenólicos nas farinhas e extratos de três cultivares das folhas e frutos da goiabeira.

| FV           | GL | Quadrado médio |                |
|--------------|----|----------------|----------------|
|              |    | Farinhas       | Extratos       |
| Cultivar (C) | 2  | 2270,573254*   | 8011,865454*   |
| Partes (P)   | 1  | 147666,437604* | 988845,487350* |
| C x P        | 2  | 1893,205104*   | 4514,867413*   |
| Erro         | 18 | 14,191215      | 189,447739     |
| CV (%)       |    | 4,31           | 6,04           |

\* Teste de Scott-Knott, significativo, a 5 % de probabilidade

Tabela 6A Resumo da análise de variância para a atividade antioxidante pelo método DPPH nas farinhas e extratos de três cultivares das folhas e frutos da goiabeira.

| FV           | GL | Quadrado médio |           |
|--------------|----|----------------|-----------|
|              |    | Farinhas       | Extratos  |
| Cultivar (C) | 2  | 0,004475*      | 0,003015* |
| Partes (P)   | 1  | 0,867122*      | 0,022190* |
| C x P        | 2  | 0,001838*      | 0,002816* |
| Erro         | 18 | 0,000012       | 0,000018  |
| CV (%)       |    | 1,65           | 12,85     |

\* Teste de Scott-Knott, significativo, a 5 % de probabilidade

Tabela 7A Resumo da análise de variância para a atividade antioxidante pelo método beta caroteno/ácido linolêico nas farinhas e extratos de três cultivares das folhas e frutos da goiabeira.

| FV           | GL | Quadrado médio |               |
|--------------|----|----------------|---------------|
|              |    | Farinhas       | Extratos      |
| Cultivar (C) | 2  | 111,336904*    | 296,694867*   |
| Partes (P)   | 1  | 7265,892004*   | 28356,625067* |
| C x P        | 2  | 139,504004*    | 310,479267*   |
| Erro         | 18 | 15,874415      | 20,002300     |
| CV (%)       |    | 6,16           | 8,81          |

\* Teste de Scott-Knott, significativo, a 5 % de probabilidade

**ANEXO B**

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| Tabela 1B | Resumo da análise de variância para colesterol, triglicerídeos e LDL + VLDL.....                     | 139 |
| Tabela 2B | Resumo da análise de variância para HDL, lipídeos hepáticos e razão peso fígado X peso corpóreo..... | 139 |
| Tabela 3B | Resumo da análise de variância para PCR, SOD soro e SOD fígado.....                                  | 140 |
| Tabela 4B | Resumo da análise de variância para GPx soro e GPx fígado.....                                       | 140 |
| Tabela 5B | Resumo da análise de variância para MDA soro e MDA fígado .....                                      | 141 |

Tabela 1B Resumo da análise de variância para colesterol, triglicerídeos e LDL + VLDL.

| FV             | GL | Quadrado Médio |                |            |
|----------------|----|----------------|----------------|------------|
|                |    | Colesterol     | Triglicerídeos | LDL + VLDL |
| Fatorial (Fa)  | 7  | 1141,33*       | 228,83*        | 1350,05*   |
| Dieta (D)      | 1  | 6332,27*       | 1095,69*       | 7822,65*   |
| Frações (F)    | 1  | 253,41         | 92,26          | 357,48     |
| Extratores (E) | 1  | 769,83*        | 45,05          | 572,90*    |
| D x F x E      | 1  | 8,54           | 71,16          | 88,74      |
| Adicionais (A) | 1  | 6368,05*       | 2399,40*       | 8430,31*   |
| A x Fa         | 1  | 904,49*        | 1623,08*       | 2063,52*   |
| Erro           | 40 | 50,37          | 47,53          | 54,29      |
| CV             |    | 12,51%         | 11,27%         | 15,79%     |

\* Teste de Scott-Knott, significativo, a 5 % de probabilidade

Tabela 2B Resumo da análise de variância para HDL, lipídeos hepáticos e razão peso fígado X peso corpóreo.

| FV             | GL | Quadrado Médio |                    |       |
|----------------|----|----------------|--------------------|-------|
|                |    | HDL            | Lipídeos hepáticos | Razão |
| Fatorial (Fa)  | 7  | 23,28*         | 116,89*            | 0,53* |
| Dieta (D)      | 1  | 79,81*         | 802,01*            | 3,23* |
| Frações (F)    | 1  | 8,56           | 6,73*              | 0,12* |
| Extratores (E) | 1  | 15,01*         | 0,74               | 0,16* |
| D x F x E      | 1  | 43,06*         | 0,01               | 0,02  |
| Adicionais (A) | 1  | 144,40*        | 237,95*            | 1,06* |
| A x Fa         | 1  | 236,53*        | 5,07*              | 0,01  |
| Erro           | 40 | 4,10           | 1,36               | 0,02  |
| CV             |    | 12,38%         | 14,94%             | 5,24% |

\* Teste de Scott-Knott, significativo, a 5 % de probabilidade

Tabela 3B Resumo da análise de variância para PCR, SOD soro e SOD fígado.

| FV             | GL | Quadrado Médio |          |            |
|----------------|----|----------------|----------|------------|
|                |    | PCR            | SOD soro | SOD fígado |
| Fatorial (Fa)  | 7  | 1,08*          | 0,30*    | 6771,92*   |
| Dieta (D)      | 1  | 1,68*          | 1,05*    | 32744,15*  |
| Frações (F)    | 1  | 0,05           | 0,01     | 2008,03    |
| Extratores (E) | 1  | 1,44*          | 0,24*    | 8131,91*   |
| D x F x E      | 1  | 0,04           | 0,01     | 2,34       |
| Adicionais (A) | 1  | 5,48*          | 3,52*    | 18386,09*  |
| A x Fa         | 1  | 0,27           | 0,74*    | 20849,02*  |
| Erro           | 40 | 0,22           | 0,06     | 1532,35    |
| CV             |    | 43,19%         | 4,58%    | 12,69%     |

\* Teste de Scott-Knott, significativo, a 5 % de probabilidade

Tabela 4B Resumo da análise de variância para GPx soro e GPx fígado.

| FV             | GL | Quadrado Médio |            |
|----------------|----|----------------|------------|
|                |    | GPx soro       | GPx fígado |
| Fatorial (Fa)  | 7  | 2,27*          | 4,86*      |
| Dieta (D)      | 1  | 0,25           | 22,71*     |
| Frações (F)    | 1  | 6,75*          | 0,01       |
| Extratores (E) | 1  | 1,51*          | 2,82*      |
| D x F x E      | 1  | 0,39           | 1,00       |
| Adicionais (A) | 1  | 16,48*         | 17,26*     |
| A x Fa         | 1  | 5,89*          | 2,28*      |
| Erro           | 40 | 0,27           | 0,43       |
| CV             |    | 21,92%         | 17,00%     |

\* Teste de Scott-Knott, significativo, a 5 % de probabilidade

Tabela 5B Resumo da análise de variância para MDA soro e MDA fígado.

| FV             | GL | Quadrado Médio |            |
|----------------|----|----------------|------------|
|                |    | MDA soro       | MDA fígado |
| Fatorial (Fa)  | 7  | 0,28*          | 4,75*      |
| Dieta (D)      | 1  | 0,22*          | 10,05*     |
| Frações (F)    | 1  | 0,81*          | 2,04*      |
| Extratores (E) | 1  | 0,29*          | 8,79*      |
| D x F x E      | 1  | 0,35*          | 12,18*     |
| Adicionais (A) | 1  | 8,12*          | 64,16*     |
| A x Fa         | 1  | 6,86*          | 19,43*     |
| Erro           | 40 | 0,03           | 0,34       |
| CV             |    | 9,26%          | 13,92%     |

\* Teste de Scott-Knott, significativo, a 5 % de probabilidade