

**ADRIANA CORRÊA MENDONÇA**

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE POLIAMINAS E  
COMPARAÇÃO COM PRODUTOS NATURAIS E  
SINTÉTICOS**

**Faculdade de Farmácia da UFMG  
Belo Horizonte, MG  
2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**ADRIANA CORRÊA MENDONÇA**

# **ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE POLIAMINAS E COMPARAÇÃO COM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Beatriz Abreu Glória

**Faculdade de Farmácia da UFMG  
Belo Horizonte, MG  
2009**

Aos meus pais, Antônio Marcos e Rosânia.  
Aos meus irmãos, Maria Andréia e Marcos.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA) da Faculdade de Farmácia, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

À Professora Maria Beatriz de Abreu Glória, pela orientação, pelos ensinamentos transmitidos, incentivo, pela amizade, pelas oportunidades, pela confiança e pelo exemplo de amor à pesquisa.

Aos professores Marialice Pinto Coelho Silvestre, Paulo César Stringheta e Lúcia Peret de Almeida pelas contribuições ao meu crescimento profissional e sugestões neste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos e do PPGCA, Aline, Bruno Dala Paula, Bruno Botelho, Cecília, Guilherme, Juliana, Kátia, Letícia, Priscila, Raquel, Rita, Taíza, Tarliane, Vivian e Warley, pelas orientações, auxílio técnico, pela amizade e pelo agradável convívio no ambiente de trabalho.

Ao Gustavo, pela dedicação, pela compreensão, pelo amor e apoio, além de revisões e sugestões; e à sua família, pelo carinho, cuidado e incentivo.

Aos meus familiares, pelo carinho, pelo incentivo e pelas orações.

Aos meus pais Rosânia e Antônio Marcos, pelo amor incondicional, pelo incentivo, pela dedicação, pelo exemplo e pelos sábios conselhos, e meus irmãos Maria Andréia e Marcos, pelo carinho, pelo apoio e pela presença.

A Deus, pela vida, pelas oportunidades e por mais este objetivo alcançado.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE SIGLAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1. OXIDAÇÃO .....</b>	<b>14</b>
2.1.1. Definição.....	14
2.1.2. Oxidantes .....	14
2.1.3. Mecanismos de oxidação .....	17
2.1.3.1. Autooxidação .....	17
2.1.3.2. Fotoxidação.....	19
2.1.3.3. Oxidação enzimática.....	20
2.1.4. Fatores que afetam a oxidação .....	21
<b>2.2. ANTIOXIDANTES.....</b>	<b>22</b>
2.2.1. Definição.....	22
2.2.2. Atuação .....	23
2.2.3. Mecanismos de ação.....	24
2.2.4. Métodos para determinação da atividade antioxidante .....	25
2.2.4.1. Métodos para determinação do estado oxidativo .....	26
2.2.4.2. Métodos para determinação da estabilidade oxidativa .....	27
2.2.5. Ocorrência de antioxidantes nos alimentos .....	31
<b>2.3. POLIAMINAS .....</b>	<b>34</b>
2.3.1. Definição.....	34
2.3.2. Síntese .....	35
2.3.3. Ocorrência em alimentos.....	37
2.3.4. Funções.....	38
2.3.5. Ação como antioxidantes.....	41
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
<b>3.1. MATERIAL .....</b>	<b>46</b>
<b>3.2. EQUIPAMENTOS.....</b>	<b>47</b>

<b>3.3. MÉTODOS</b> .....	<b>48</b>
3.3.1. Avaliação das atividades antioxidantes das poliaminas .....	48
3.3.2. Comparação com antioxidantes tradicionais .....	49
3.3.3. Determinação dos teores de poliaminas nos óleos e nos extratos.....	50
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>52</b>
<b>4.1. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DAS POLIAMINAS</b> .....	<b>52</b>
4.1.1. Espermina .....	52
4.1.1.1. Predição da estabilidade oxidativa com adição de espermina .....	53
4.1.2. Espermidina.....	55
4.1.2.1. Predição da estabilidade oxidativa com adição de espermidina.....	57
4.1.3. Putrescina.....	58
4.1.4. Agmatina .....	60
4.1.5. Efeito sinergista .....	61
<b>4.2. COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ESPERMIDINA E ESPERMINA COM A DE ANTIOXIDANTES TRADICIONAIS</b> .....	<b>65</b>
4.2.1. Antioxidantes sintéticos .....	65
4.2.2. Tocoferol.....	67
4.2.3. Extratos .....	69
4.2.4. Comparação da atividade antioxidante de todos os compostos investigados .....	71
<b>4.3. DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE POLIAMINAS NO ÓLEO DE SOJA E NOS EXTRATOS</b> .....	<b>73</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>75</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>76</b>

## LISTA DE TABELAS

1. Oxigênio ativo e espécies radicais e não-radicais relacionadas.....	15
2. Níveis de espermina e espermidina utilizados no planejamento fatorial .....	49
3. Predição do período de armazenamento do óleo de soja a 20 °C adicionado de diferentes teores de espermina, com as equações e os respectivos coeficientes de correlação .....	54
4. Predição do período de armazenamento do óleo de soja a 20 °C estabilizado com diferentes teores de espermidina, com as equações e os respectivos coeficientes de correlação.....	58
5. Fatores de proteção obtidos para agmatina, espermidina e espermina em Rancimat® a 110°C .....	60
6. Ensaio realizados, valores codificados e originais das variáveis independentes e variável dependente para o delinamento composto central rotacional.....	61
7. Análise de variância para o fator de proteção ignorando os termos espermina e espermidina no modelo quadrático, bem como sua interação .....	63



## LISTA DE FIGURAS

1. Representação metabólica das Espécies Reativas de Oxigênio.....	16
2. Esquema da determinação da estabilidade oxidativa.....	27
3. Antioxidantes sintéticos solúveis em óleo mais comumente utilizados em alimentos.....	31
4. Estrutura molecular dos tocoferóis. ....	33
5. Estruturas químicas das poliaminas e de algumas precursoras.....	35
6. Via para a síntese de poliaminas.....	36
7. Efeito da concentração de espermina no fator de proteção para o óleo de soja a 110 °C no Rancimat® . ....	52
8. Logaritmo do Período de Indução (PI) em função da temperatura para o óleo de soja controle e três concentrações de espermina adicionadas.....	54
9. Efeito da concentração de espermidina no fator de proteção para o óleo de soja a 110 °C no Rancimat® . ....	56
10. Logaritmo do Período de Indução (PI) em função da temperatura para o óleo controle e três concentrações de espermidina adicionadas.....	57
11. Efeito da concentração de putrescina no fator de proteção do óleo de soja a 110 °C no Rancimat® . ....	59
12. Efeito da concentração de agmatina no fator de proteção do óleo de soja a 110 °C no Rancimat® . ....	60
13. Diagrama de Pareto com os efeitos estimados de espermina (EPM) e espermidina (EPD), bem como sua interação no fator de proteção em um modelo linear (L) e quadrático (Q). ....	62
14. Valores observados versus valores previstos do fator de proteção para o óleo de soja adicionado de espermina e espermidina. ....	63
15. Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para o fator de proteção em função da concentração de espermina (EPM) e de espermidina (EPD).....	64
16. Fatores de proteção para o óleo de soja a 110 °C no Rancimat® na presença de BHA, BHT e da mistura destes na proporção 1:1. ....	66

17. Fatores de proteção para o óleo de soja a 110 °C em Rancimat® na presença de BHA, BHT, EPM e suas misturas na proporção 1:1.....	67
18. Efeito da concentração de tocoferol no fator de proteção para o óleo de soja a 110 °C no Rancimat® . .....	68
19. Efeito do aumento da concentração dos extratos antioxidantes no fator de proteção para o óleo de soja a 110 °C no Rancimat® . .....	69
20. Efeito do extrato de chá verde e da catequina nos teores equivalentes aos contidos no extrato no fator de proteção para o óleo de soja a 110 °C no Rancimat® . .....	71
21. Comparação das médias dos fatores de proteção obtidos para espermina (EPM), espermidina (EPD), extrato de chá verde, extrato de alecrim, BHA, BHT e BHA:BHT (1:1) em concentrações de 0,01 a 0,06 g/100 g em óleo de soja no Rancimat® ..	72

## LISTA DE SIGLAS

AGM	Agmatina
AOCS	American Oil Chemists' Society
AOM	Método do oxigênio ativo
BHA	Butil hidroxi anisol
BHT	Butil hidroxi tolueno
CAD	Cadaverina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
EPD	Espermidina
EPM	Espermina
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FP	Fator de proteção
GP	Galato de propila
IDA	Ingestão Diária Aceitável
JECFA	Joint Expert Committee on Food Additives
MMQO	Método dos mínimos quadrados ordinários
ODC	Ornitina descarboxilase
OPA	<i>orto</i> -ftalaldeído
OSI	Índice de Estabilidade Oxidativa
PI	Período de indução
PUT	Putrescina
SAM	S-Adenosil metionina
SAMDC	S-Adenosilmetionina descarboxilase
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas com o TBA
TBHQ	Terc butil hidro quinona
TCA	Ácido tricloroacético
UVB	Ultravioleta do tipo B
UVC	Ultravioleta do tipo C

## RESUMO

A oxidação de lipídeos é uma das principais causas da redução da qualidade de alimentos, e, para retardá-la, antioxidantes sintéticos ou naturais podem ser adicionados aos alimentos. Devido aos seus possíveis efeitos adversos à saúde humana, o uso de antioxidantes sintéticos é limitado em vários países. Portanto, há um grande interesse na obtenção e utilização de antioxidantes naturais. Nesse contexto, as poliaminas possuem potencial como antioxidantes naturais alternativos, podendo ser incorporadas em fase orgânica, bem como em fase aquosa. O presente trabalho teve como objetivo investigar a atividade antioxidante das poliaminas e compará-la a outros antioxidantes naturais e sintéticos. Comparou-se a ação antioxidante das aminas espermidina e espermina às de BHA, BHT, tocoferol, extratos de alecrim e de chá verde em óleo de soja sem adição de antioxidantes utilizando o Rancimat® a 110 °C. As poliaminas espermina e espermidina aumentaram a estabilidade oxidativa na matriz avaliada. A espermina apresentou maior efetividade que a espermidina e as duas não mostraram efeito sinérgico como antioxidante. Essas aminas mostraram-se mais efetivas que BHA, BHT, tocoferol e extrato de alecrim em concentrações de 0,01 a 0,06 g/100 g, sendo mais efetivas que o extrato de chá verde em concentrações de 0,04 a 0,06 g/100 g. Conclui-se que as poliaminas são efetivos antioxidantes com potencial de uso em alimentos, especialmente no óleo de soja.

**Palavras-chave:** poliaminas, espermina, espermidina, antioxidantes, Rancimat.

## ABSTRACT

**ANTIOXIDANT ACTIVITY OF POLYAMINES IN SOYBEAN OIL.** Lipid oxidation is one of the main causes of food quality depreciation. In order to delay lipid oxidation, natural or synthetic antioxidants can be used. Otherwise, synthetic antioxidants can be dangerous to human health, so, their use is limited in several countries. On the other hand, there are efforts to find natural antioxidants to replace the artificial ones. Polyamines are natural antioxidants and in this sense, they constitute potential antioxidants for food use. In addition, polyamines can be solubilized in both, organic and aqueous phase. The aim of this study was to investigate the antioxidative activity of polyamines in soybean oil and to compare them with other natural extracts or synthetic antioxidants by means of Rancimat® at 110 °C. The antioxidative effect of the polyamines spermidine and spermine was compared those exerted by BHA, BHT, tocoferol, rosemary and green tea extracts. Spermidine and spermine increased the oxidative stability of the soybean oil, while spermine showed greater effectiveness compared to spermidine, however, they did not show synergistic effect when used simultaneously. These amines were more effective than BHA, BHT, tocopherol and rosemary extract at concentrations from 0.01 to 0.06 g/100 g. They were also more effective than the green tea extract from 0.04 to 0.06 g/100 g. In conclusion, the polyamines are effective antioxidants with potential for food application, especially soybean oil.

**Keywords:** polyamines, spermine, spermidine, antioxidants, Rancimat.

# 1. INTRODUÇÃO

As reações de oxidação de lipídeos estão entre as mais frequentes em alimentos, sendo uma das principais causas de sua deterioração. Embora se iniciem na fração lipídica, eventualmente outros componentes são afetados, alterando diversas propriedades como qualidade sensorial, valor nutricional, funcionalidade e toxidez (ARAÚJO, 2004).

A oxidação pode ser inibida de diferentes maneiras, incluindo a prevenção do acesso de oxigênio ou redução de sua pressão, uso de baixas temperaturas, inativação de enzimas que catalisam a reação de oxidação e utilização de embalagens adequadas. Outra forma de proteção é o uso de antioxidantes, aditivos específicos capazes de inibir a oxidação (RAMALHO & JORGE, 2006a).

O desenvolvimento de compostos indesejáveis oriundos da oxidação lipídica é um problema a ser resolvido para prolongar a vida útil de óleos, gorduras e alimentos ricos em lipídeos (GORDON, 2001). O óleo de soja, amplamente utilizado no Brasil por sua disponibilidade e preço, apresenta grande susceptibilidade à oxidação, uma vez que possui altos teores de ácidos graxos insaturados em sua composição (ABIOVE, 2009; ARAÚJO, 2004). Nesse contexto, torna-se uma matriz relevante para estudos com antioxidantes.

Muitos estudos avaliam o potencial antioxidante de compostos para conhecer a concentração a ser utilizada, a interação com sistema lipídico, estabilidade ao processamento e ao armazenamento. Além disso, existe também uma tendência de substituir os antioxidantes sintéticos pelos naturais, uma vez que o uso dos primeiros tem sido restringido em diversos países por seus possíveis riscos à saúde do consumidor (ANTOLOVICH et al., 2002; RAMALHO & JORGE, 2006a).

Como exemplos de antioxidantes naturalmente presentes em sistemas biológicos têm-se as di- e poliaminas alifáticas. Além de serem naturais, são solúveis em fase orgânica e aquosa, possibilitando sua aplicação em grande variedade de alimentos (LØVAAS, 1997). Muitos estudos têm relatado sua ação em tecidos e fluidos celulares, mas seu potencial antioxidante em alimentos ainda é pouco discutido.

Para avaliação da oxidação, e, conseqüentemente, dos antioxidantes em alimentos pode ser utilizado o teste acelerado de estabilidade oxidativa em Rancimat®. Este teste possui ampla aceitação devido à facilidade de uso, reprodutibilidade e baixo custo de operação sem utilização de reagentes químicos.

Tendo em vista a importância da oxidação na deterioração dos alimentos e o potencial das poliaminas como antioxidantes, este trabalho teve por objetivo geral investigar a atividade antioxidante de poliaminas em óleo de soja. Os objetivos específicos foram: (i) investigar a ação de espermina, espermidina, agmatina e putrescina como antioxidantes; (ii) investigar a possibilidade de sinergismo entre espermina e espermidina; (iii) comparar a ação antioxidante dessas quatro aminas; (iv) estudar o efeito de diferentes concentrações de poliaminas na estabilidade oxidativa do substrato; e (v) comparar a capacidade antioxidante das poliaminas com antioxidantes tradicionalmente utilizados em alimentos e com extratos naturais.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. OXIDAÇÃO**

#### **2.1.1. Definição**

A oxidação pode ser definida como o processo no qual o oxigênio é adicionado, ou o hidrogênio ou elétrons são removidos do componente oxidado por um oxidante (ARAÚJO, 2004). Esse tipo de reação é comum em alimentos, produzindo efeitos deletérios como alterações no sabor, no odor, na cor e na textura, podendo ainda gerar compostos tóxicos. A oxidação também pode acarretar perdas de ácidos graxos poliinsaturados, vitaminas A, D, E e K, carotenóides, fitoesteróis e de outros antioxidantes, além de danos aos aminoácidos e, conseqüentemente, às proteínas, com redução em sua solubilidade. No entanto, a oxidação de lipídeos em algumas situações pode ser benéfica ao alimento, como no clareamento de farinha de trigo, no efeito bactericida de radicais e na formação de aromas típicos de queijos e alimentos fritos (NAWAR, 1998; KOLAKOWSKA, 2003).

Por ser uma das principais causas da redução da vida de prateleira dos produtos alimentícios industrializados, bem como das matérias-primas, o conhecimento e a compreensão dos mecanismos de reação de oxidação e as formas de controle são de suma importância econômica para a indústria alimentícia (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004).

#### **2.1.2. Oxidantes**

O oxidante mais comum em alimentos é o oxigênio, mas outras substâncias químicas, endógenas ou adicionadas, podem ser também oxidantes (ARAÚJO, 2004).

O oxigênio e suas espécies reativas (Tabela 1), nos últimos anos, vêm recebendo destaque em investigações em sistemas biológicos e os resultados têm mostrado que reações com radicais são prejudiciais à saúde. Estão envolvidos no processo de envelhecimento, bem como na patogênese de várias doenças humanas, como aterosclerose, artrite reumatóide, doenças pulmonares, inflamações, pancreatite, diabetes, distrofia muscular, catarata, alguns distúrbios neurológicos, doenças auto-imunes e câncer (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; SIES, 1997; SANCHÉZ-MORENO & LARRAURI, 1998; GASTELL & ALEJO, 2000).



**Tabela 1.** Oxigênio ativo e espécies radicais e não radicais relacionadas.

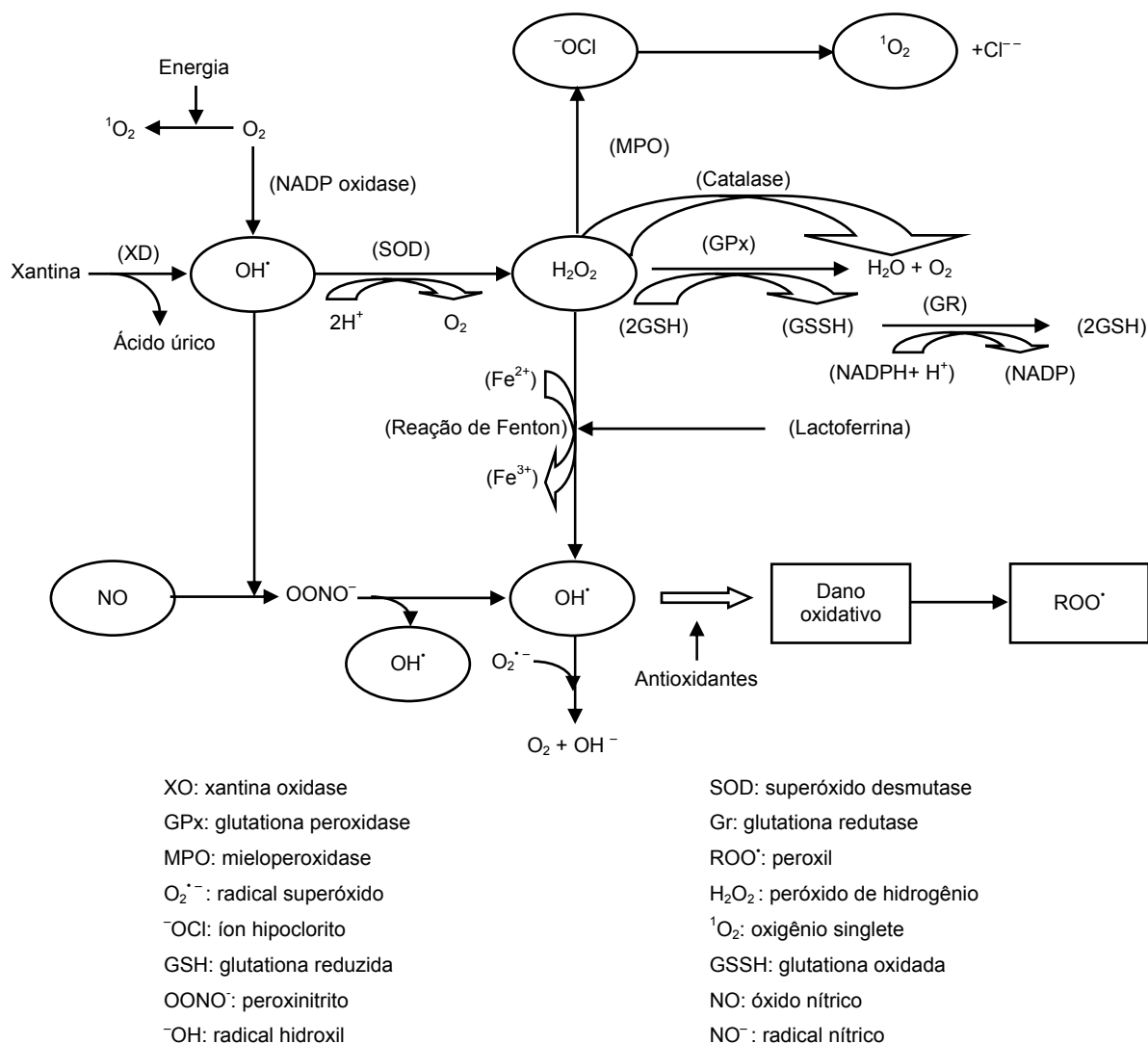
<b>Radicais</b>	<b>Não- radicais</b>
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> superóxido	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> peróxido de hidrogênio
OH <sup>·</sup> radical hidroxil	<sup>1</sup> O <sub>2</sub> oxigênio singlete
HO <sub>2</sub> <sup>·</sup> radical hidroperoxil	O <sub>3</sub> ozônio
L <sup>·</sup> radical lipídico	LOOH hidroperóxido lipídico
LO <sub>2</sub> <sup>·</sup> radical peroxil lipídico	Fe=O complexo metal-oxigênio
LO <sup>·</sup> radical alcóxil lipídico	HOCl hipoclorito
NO <sub>2</sub> <sup>·</sup> dióxido de nitrogênio	
NO <sup>·</sup> óxido nítrico	
RS <sup>·</sup> tio radical	
P <sup>·</sup> radical protéico	

Fonte: YANISHLIEVA-MASLAROVA (2001).

Os termos agente oxidante, radical livre, espécie radicalar, espécie ativada e espécie reativa são frequentemente utilizados para designar, de forma genérica as espécies reativas de oxigênio (ERO's) de importância biológica. Entretanto, nem sempre são usados adequadamente, uma vez que apresentam diferentes características químicas. Radical pode ser compreendido, sob o ponto de vista químico, como um grupo de átomos que se comporta como uma unidade (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984).

As ERO's ocorrem como parte normal do metabolismo celular ou por exposição a fatores ambientais, como mostrado na Figura 1. A redução do oxigênio a superóxido ocorre principalmente pela NADPH oxidase, durante a respiração. A reação subsequente gera o peróxido de hidrogênio pela enzima superóxido dismutase, que possui alta capacidade oxidante pela reação de Fenton, formando o radical hidroxil, o qual é muito reativo (GASTELL & ALEJO, 2000).

O oxigênio triplete (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>) é um di-radical com dois elétrons paralelos separados em orbitais e constitui 21% do ar. O <sup>3</sup>O<sub>2</sub> reage com elementos e íons, formando óxidos, mas não com compostos orgânicos. No entanto, reage facilmente com radicais livres (ARAÚJO, 2004).



**Figura 1.** Representação metabólica das Espécies Reativas de Oxigênio.  
 Fonte: GASTELL & ALEJO (2000).

O oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) é produzido principalmente pela fotoxidação na presença de iniciadores, na atmosfera ou no alimento. Não é um radical livre, mas uma espécie altamente eletrofílica, que reage prontamente com substâncias com alta densidade de elétrons, como as ligações insaturadas (ARAÚJO, 2004).

O oxigênio molecular pode ser reduzido à água, sendo os passos intermediários a formação de radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil (SIES, 1997). A adição de um elétron à molécula de  $O_2$  em seu estado fundamental ocorrerá em um de seus orbitais  $\pi$ , formando o radical superóxido, com apenas um elétron não pareado, representado por  $O_2^{\cdot-}$ . Sua importância reside na capacidade de gerar outras espécies de maior reatividade (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984).

O íon peróxido ( $O_2^{2-}$ ) é produto da redução do  $O_2$  com dois elétrons. Em sistemas biológicos ocorre como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que não apresenta

característica de radical, pois os elétrons estão pareados em seus orbitais (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984).

O radical hidroxila ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) pode ser gerado por mecanismos diversos a partir do peroxinitrito, peróxido de hidrogênio ou superóxido, na presença ou não da ação catalítica de metais de transição, podendo também ser gerado por radiação ionizante. Esse radical é o de maior reatividade entre as espécies de oxigênio, e reage rapidamente com inúmeras biomoléculas, danificando o alvo mais próximo do local onde foi gerado, formando outras espécies de reatividade variada (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984).

Os radicais de oxigênio também podem ocorrer como radicais alquil ou peroxil em lipídeos. Outro radical de interesse biológico é o óxido nítrico. Peroxinitrito, uma espécie reativa não radicalar, é formado a partir de óxido nítrico e radical superóxido (SIES, 1997).

As meias-vidas das ERO's são muito diferentes, necessitando de diferentes tipos de mecanismos de defesa. O organismo humano possui dois tipos de sistemas antioxidantes para proteção contra radicais livres. Um desses sistemas inclui antioxidantes endógenos, formados por enzimas, como a catalase, a peroxidase e a superóxido dismutase, mostradas na Figura 1. Também participam desse sistema a glutatona, a histidina, proteínas como a transferrina e a ferritina, melatonina, proteínas do plasma e outras substâncias. O outro sistema é exógeno com antioxidantes obtidos pela dieta (PIETTA, 2000).

### **2.1.3. Mecanismos de oxidação**

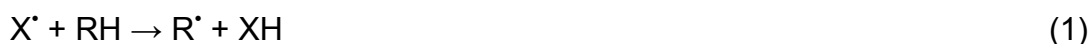
A oxidação dos ácidos graxos insaturados ocorre por diferentes vias em função do meio e dos catalisadores, por meio de mecanismos químicos, como a fotoxidação e a autoxidação, ou por mecanismo enzimático (SILVA et al., 1999).

#### **2.1.3.1. Autoxidação**

A autoxidação é uma reação de baixa energia de ativação, bastante complexa, que abrange um grande número de reações interrelacionadas, não sendo significativamente inibida pela diminuição da temperatura de armazenamento. A reação envolve a formação de radicais livres e pode ocorrer na ausência de luz (ARAÚJO, 2004).

Embora os ácidos graxos saturados possam reagir com o oxigênio, a susceptibilidade de lipídeos à oxidação é maior em ácidos graxos com insaturações. Ácidos graxos contendo um ou mais pentadienos não conjugados são especialmente sensíveis, pois o ataque do oxigênio ocorre principalmente nas posições adjacentes às duplas ligações (NAWAR, 1998).

A autooxidação ocorre em três etapas distintas: iniciação, propagação e término (GORDON, 2001). A iniciação, representada na reação (1) é caracterizada pela formação de radicais (R<sup>•</sup>) das moléculas de lipídeos (RH). A reação inicial ocorre pela remoção do átomo de hidrogênio do grupo metileno (-CH=CH- → -CH=C<sup>•</sup>-), a partir de iniciadores (X<sup>•</sup>), como os radicais alquil, alcoxil, hidroxil, peróxido, além de hidroperóxido e clivagens térmicas e fotoquímicas (KOLAKOWSKA, 2003; ARAÚJO, 2004).



A iniciação secundária mostrada nas reações (2) e (3), ocorre por clivagem de hidroperóxidos (ROOH) em radical hidroxil (OH<sup>•</sup>), alcoxil (RO<sup>•</sup>), hidroperóxido (ROO<sup>•</sup>) e água. É a principal reação de oxidação em óleos comestíveis, sendo comumente catalisada por íons metálicos (M<sup>n+</sup>), representado nas reações (4) e (5) (GORDON, 2001).



Os radicais alquil recém-formados reagem muito rapidamente com o oxigênio molecular para formar peróxidos (-CH=COO<sup>•-</sup>). Esses radicais são altamente reativos e capazes de remover átomos de hidrogênio de outros ácidos graxos insaturados, formando hidroperóxido e outro radical lipídico. Os novos radicais reagem com o oxigênio e a sequência de reações é repetida conforme indicado nas reações (6) e (7), propagando, portanto, a reação de oxidação (NAWAR, 1996; KOLAKOWSKA, 2003).



Devido à ressonância na estabilização de radicais, pode haver uma mudança na posição de duplas ligações resultando na formação de hidroperóxidos isômeros contendo dienos conjugados. Hidroperóxidos são produtos primários da autooxidação relativamente instáveis, que participam de numerosas reações de degradação e interação resultando em um grande número de compostos de diferentes pesos moleculares, limiares de percepção de *flavor* e importância biológica (NAWAR, 1996).

Os radicais alquil, alcoxil e peroxil podem se combinar para formar uma variedade de dímeros e polímeros com ligações cruzadas carbono-oxigênio-carbono ou carbono-oxigênio-oxigênio-carbono entre os ácidos graxos. Estes radicais também podem sofrer ciclização, podendo formar monômeros cíclicos que são tóxicos (NAWAR, 1998).

O término (reações 8, 9 e 10) ocorre quando os radicais reagem entre si formando um produto não radical. As reações também podem terminar quando um dos radicais reage com um antioxidante, removendo um hidrogênio e formando um radical inerte do antioxidante (GORDON, 2001).



#### 2.1.3.2. Fotoxidação

A fotoxidação é um mecanismo alternativo à formação de radicais livres. A presença de fotossensores nos tecidos animal e vegetal, como a mioglobina, hemoglobina, riboflavina e clorofila, na presença de luz e oxigênio, dá início ao processo de transferência de energia para a formação de peróxido (NAWAR, 1998; GORDON, 2001).

Os fotossensores absorvem luz na região visível e/ou próximo do ultravioleta (UV), tornando-se eletronicamente excitados, passando do estado singlete ( $^1\text{Sensores}$ ) para triplete ( $^3\text{Sensores}^*$ ), pela absorção da energia do fóton ( $\lambda\nu$ ). Nessa situação, transferem energia para o oxigênio triplete ( $^3\text{O}_2$ ), que resulta na excitação da molécula do oxigênio para o estado singlete ( $^1\text{O}_2^*$ ), conforme indicado nas reações (11) e (12). O oxigênio singlete reage com duplas ligações por adição formando o hidroperóxido, representado na reação (13) (ARAÚJO, 2004).



Diferente da autoxidação, a fotoxidação não envolve a formação de radicais livres, independe da pressão de oxigênio, e não apresenta período de indução. Os hidroperóxidos são diferentes dos formados na autoxidação e, por degradação, originam aldeídos, álcoois, e hidrocarbonetos (SILVA et al., 1999; ARAÚJO, 2004).

Segundo GORDON (2001), a fotoxidação pela excitação de lipídeos, na presença de riboflavina, é caracterizada pela transferência de um elétron por um átomo de hidrogênio entre um sensor triplete excitado e um substrato, produzindo radicais e continuando como na autoxidação. KOLAKOWSKA (2003) acrescenta ainda a possibilidade de formação de radical superóxido  $\text{O}_2^-$  na fotoxidação.

#### 2.1.3.3. Oxidação enzimática

Lipoxigenases são enzimas diversas que catalisam a oxidação de ácidos graxos insaturados em seus componentes hidroperóxidos conjugados insaturados, durante o armazenamento e processamento. Essas enzimas também podem formar radicais livres, os quais atacam outros constituintes (NAWAR, 1998).

A reação com lipoxigenases pode ser dividida em três etapas. Na primeira, ocorre a ativação da enzima nativa; na segunda, ocorre a remoção de um próton do grupo metileno ativado; na terceira etapa, o oxigênio é incorporado ao substrato com a formação de peróxido (ARAÚJO, 2004).

As lipoxigenases oxidam somente ácidos graxos *cis-cis*-1,4-pentadieno e catalisam a reação de formação de hidroperóxidos semelhantes aos de autoxidação. No entanto, são específicas para o substrato e para os hidroperóxidos estereoisômeros produzidos. As diferentes lipoxigenases variam em seus substratos e produtos específicos, bem como em seus parâmetros ótimos de atividade (NAWAR, 1998).

As moléculas de lipoxigenase contêm um átomo de metal,  $\text{Fe}^{2+}$ , em seu estado nativo, o qual é oxidado a  $\text{Fe}^{3+}$  pelos hidroperóxidos ou por peróxido de hidrogênio. Como consequência do requerimento do metal para a oxidação por enzima, um período *lag* é observado quando a enzima é usada com substratos puros de ácidos graxos (GORDON, 2001).

#### **2.1.4. Fatores que afetam a oxidação**

Os lipídeos dos alimentos contêm uma variedade de ácidos graxos que diferem pelas propriedades químicas e físicas e também na susceptibilidade à oxidação. Além disso, numerosos componentes não-lipídicos presentes podem co-oxidar ou interagir com os lipídeos ou seus produtos de oxidação (NAWAR, 1996).

A oxidação de óleos é influenciada pela composição de ácidos graxos, pelo processamento, energia térmica, tipo e concentração de oxigênio, presença de ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis, metais de transição, peróxidos, compostos oxidados termicamente, pigmentos e antioxidantes (CHOE & MIN, 2006).

Em emulsões, a taxa de oxidação depende de um número de fatores em conjunto, incluindo a concentração do emulsificante, tamanho das gotículas de lipídeo, área superficial da interface, viscosidade da fase aquosa, composição e porosidade da matriz aquosa e pH (NAWAR, 1996).

A variação do número, da posição e da geometria das duplas ligações afeta a taxa de oxidação, sendo mais rápida em ácidos graxos mais insaturados (NAWAR, 1996; CHOE & MIN, 2006). Já a presença de ácidos graxos livres acelera o processo de oxidação, uma vez que estes oxidam mais rapidamente que os acilgliceróis correspondentes. Além disso, quando presentes em grandes quantidades, podem facilitar a incorporação de traços de metais dos equipamentos ou dos tanques de estocagem (NAWAR, 1998).

Em geral, a taxa de oxidação aumenta com o aumento da temperatura. A temperatura também influencia a relação entre a quantidade e a pressão parcial de oxigênio (NAWAR, 1998).

O tipo e a concentração de oxigênio afetam a oxidação de óleos, que ocorre com maior frequência quando o óleo, oxigênio e catalisadores estão em contato. Esse parâmetro é afetado pela área superficial, que, quanto maior, permite maior contato com o ar. O efeito da concentração de oxigênio na oxidação é aumentado em altas temperaturas e na presença de luz ou metais, como o cobre e o ferro (NAWAR, 1996; CHOE & MIN, 2006).

A luz visível, ultravioleta, e a radiação gama são promotores efetivos da oxidação. Durante esse processo, os fotossensores absorvem energia luminosa e transferem o excesso de energia para o oxigênio tripleto convertendo-o a singleto (NAWAR, 1996).

O conteúdo de água também influencia a taxa de oxidação. Alimentos com baixa atividade de água ( $a_w$  menor que 0,1) oxidam-se rapidamente. Aumentos de  $a_w$  para cerca de 0,3 retardam a oxidação. Em  $a_w$  entre 0,55 e 0,85, ocorre um novo aumento na taxa das reações pela mobilização dos catalisadores presentes (NAWAR, 1998).

A presença de pró-oxidantes como enzimas, promove cataliticamente as reações de oxidação. Íons de metais de transição, em quantidades muito pequenas, também catalisam a reação. Por outro lado, a presença de antioxidantes reduz a taxa de oxidação, sendo que alguns desses em determinadas concentrações também podem agir como pró-oxidantes, por exemplo, o  $\alpha$ -tocoferol. Esses fatores possuem um efeito interativo na oxidação não sendo fácil isolar um efeito dos demais (FRANKEL et al., 1994; CHOE & MIN, 2006).

## **2.2. ANTIOXIDANTES**

### **2.2.1. Definição**

Antioxidantes são substâncias que, em concentrações menores que a do substrato oxidável, inibem significativamente a oxidação, adiando seu início ou reduzindo sua taxa (NAWAR, 1996; SIES, 1997; SILVA et al., 1999). Essas substâncias fazem parte do sistema de defesa dos organismos vivos, com ação intracelular e extracelular, em meio hidrofílico e hidrofóbico, sendo produzidos pelo organismo ou obtidos da dieta. Podem estar presentes no alimento, ou serem adicionados para aumentar a vida de prateleira (KOLAKOWSKA, 2003).

Segundo ARAÚJO (2004), o efeito do antioxidante consiste na inativação de radicais livres, na complexação de íons metálicos ou na redução de hidroperóxidos para produtos incapazes de formar radicais livres e produtos de decomposição rançosos.

A utilização do antioxidante de forma correta depende do conhecimento de sua estrutura, do seu modo de ação e da função no alimento. A estrutura influencia nas propriedades físicas, como volatilidade, solubilidade e estabilidade térmica. Além da relação estrutura-função, fatores como a natureza do lipídeo, estado físico do alimento,



condições de armazenamento e atividade de água, afetam sua eficiência (ARAÚJO, 2004).

### **2.2.2. Atuação**

Os antioxidantes podem atuar inibindo a autoxidação, a fotoxidação ou a oxidação enzimática. Na autoxidação podem funcionar como bloqueadores de reações em cadeia ou prevenindo as reações. Os bloqueadores de reação em cadeia são divididos em doadores e receptores de elétrons, sendo que os doadores de elétrons competem com o lipídeo pelo radical peroxil, resultando na diminuição da velocidade de reação. Os receptores competem com o oxigênio tripleto pelo radical livre, reduzindo a formação do radical peroxil (YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001; ARAÚJO, 2004).

Os antioxidantes que complexam com metais atuam de forma preventiva, uma vez que não ocorre a interação com radicais, e inibem a decomposição do peróxido (ARAÚJO, 2004).

Na fotoxidação, os carotenóides e tocoferóis atuam como supressores físicos. A transferência de energia de uma molécula primária excitada para o supressor resulta em dissipação de energia luminosa ou térmica. Na oxidação enzimática, flavonóides, ácidos fenólicos e galatos inibem a ação da lipoxigenase. Isso também pode ser feito por inativação térmica, entretanto, pode aumentar a oxidação não enzimática (YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001).

Os antioxidantes podem ser primários e sinérgicos. Os antioxidantes primários incluem os compostos fenólicos poliidroxilados (galatos) e os fenóis com impedimento estrutural (BHA, BHT, TBHQ e tocoferóis). Atuam bloqueando a ação dos radicais livres convertendo-os em produtos estáveis, além de atuarem nas reações com radicais lipídicos (NAWAR, 1996).

Os antioxidantes sinérgicos podem atuar como removedores de oxigênio, ou como agentes complexantes. Ácido ascórbico, palmitato de ascorbila, sulfito e eritorbatos reagem com o oxigênio livre removendo-o de sistemas fechados. Ácido cítrico, EDTA e derivados do ácido fosfórico imobilizam íons metálicos, aumentando significativamente a energia de ativação de reações de oxidação (ARAÚJO, 2004).

### 2.2.3. Mecanismos de ação

Um antioxidante (AH) funciona removendo radicais livres (ROO<sup>•</sup> e R<sup>•</sup>) assim que são formados, sendo eficiente somente quando a concentração desses radicais é baixa. Esse antioxidante reage preferencialmente com o radical ROO<sup>•</sup> e em comparação com R<sup>•</sup>, conforme representação nas reações (14) e (15).



Os radicais oriundos das moléculas de antioxidantes são relativamente estáveis e não possuem energia suficiente para reagir com o lipídeo. Mas pode ocorrer interação do radical fenoxil resultante com um segundo radical fenoxil, formando a peroxidienona (NAWAR, 1996; ARAÚJO, 2004).

Outro mecanismo de ação (reações 16 e 17) consiste na formação do complexo entre o radical peroxil e o antioxidante, sendo esse complexo capaz de reagir com outro radical:



A ação do antioxidante pode também ocorrer, conforme as reações (18) e (19), consecutivamente (LUNDBERG, 1962):



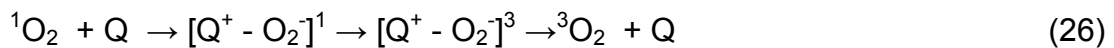
Segundo NAWAR (1996), para que o antioxidante seja efetivo, precisa, em baixas concentrações, competir com o lipídeo insaturado (RH), presente no alimento em altas concentrações, pelo radical lipídico (reações 20 e 21):



Um mecanismo para a ação do antioxidante sinérgico foi relatado por LUNDBERG (1962) e está representado nas reações (22), (23) e (24):



MIN & LEE (1996) sugeriram dois mecanismos para a inativação do oxigênio singlete. O primeiro foi uma inativação química, na qual o oxigênio singlete reage com supressores para a formação de supressores oxidados. Já o mecanismo físico converte o oxigênio singlete a triplete. A inativação física é explicada por transferência de energia (25) e/ou carga (26), envolvendo a formação do oxigênio e do inativador, ambos triplete.



#### 2.2.4. Métodos para determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante pode ser medida diretamente em sua capacidade de sequestrar radicais livres, ou indiretamente pelos efeitos do antioxidante no controle da oxidação. Alguns testes com antioxidantes em alimentos visam prever seu impacto quando consumidos e existem ainda alguns testes que são destinados a avaliar a atividade fisiológica de antioxidantes, *in vitro* e *in vivo*, avaliando produtos de oxidação, balanço entre as ERO's e mecanismos de defesa (ANTOLOVICH et al., 2002).

Dentre os testes que medem a capacidade de sequestrar radicais, existem diferenças quanto aos tipos de radicais livres gerados, indicadores de oxidação escolhidos e métodos usados para detecção e quantificação (SILVA et al., 1999; SÁNCHEZ-MORENO, 2002). Nesses testes, os resultados podem ser expressos como porcentagem de inibição, redução da concentração do radical livre em 50%, tempo para redução dessa concentração a 50%, trolox equivalente ou complexação com ferro (ANTOLOVICH et al., 2002).

Nas medidas indiretas são utilizados os testes que avaliam o estado de oxidação lipídica em amostras controle e adicionada do antioxidante, expressando os resultados como efeito inibidor, como extensão ou taxa de consumo de reagentes ou formação de produto. A atividade antioxidante também pode ser medida indiretamente pelo aumento da estabilidade oxidativa expresso como um índice antioxidante ou fator de proteção (JADHAV et al., 1996; SÁNCHEZ-MORENO & LARRAURI, 1998; ANTOLOVICH et al., 2002).

No intuito de avaliar os diferentes efeitos antioxidantes, são necessários métodos distintos, com diferentes substratos e componentes. Dentre os diversos métodos existentes, deve-se avaliar qual é o mais adequado para o estudo com base em suas vantagens e desvantagens em diferentes etapas do processo oxidativo (SILVA et al., 1999).

#### **2.2.4.1 Métodos para determinação do estado oxidativo**

A avaliação do estado oxidativo apresenta a dificuldade da escolha do momento mais adequado para efetuá-la. Portanto, a determinação não deve ser restrita a um momento, mas deve ser efetuada ao longo do tempo, de forma a ser representativa da vida de prateleira do produto (SILVA et al., 1999).

Na literatura são descritos diferentes métodos para a determinação do estado oxidativo utilizando análise sensorial, análise dos substratos e dos produtos primários e secundários de oxidação (GARCIA-MESA et al., 1993).

Um dos substratos da oxidação é o oxigênio, que pode ser analisado por diferentes métodos, como o cromatográfico, o teste de Sylvester, da prensagem, o ensaio com bomba de oxigênio ou a oxigrafia com sistema polarográfico. Também podem ser analisados ácidos graxos residuais e substratos não oxidados (SILVA et al., 1999).

Além dos métodos citados, a análise do peróxido, produto primário da oxidação, é realizada tradicionalmente por meio dos métodos iodométrico e colorimétrico. Outro produto primário da oxidação analisado é o dieno conjugado (ANTONIASSI, 2001).

Os compostos secundários analisados são os aldeídos, pelos testes do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), índice de *p*-anisidina (IpA) e teste de Kreis. Os ácidos oxidados podem ser determinados por cromatografia em camada fina ou por cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG/EM); e os compostos voláteis por CG de injeção direta ou *headspace*.

Não há, entretanto, um teste único que possa medir todos os eventos oxidativos de uma só vez, nem há um teste que possa ser usado igualmente em todos os estágios do processo oxidativo e nem que seja aplicável a todos os tipos de alimentos ou a todas as condições de processamento (NAWAR, 1996).

#### **2.2.4.2. Métodos para determinação da estabilidade oxidativa**

Os métodos de determinação da estabilidade oxidativa surgiram numa tentativa de prever a vida de prateleira de óleos e gorduras, pois o acompanhamento das alterações ocorridas nos produtos, nas condições de armazenamento, é lento e com consumo de grande quantidade de reagentes. Nesses testes, os produtos são submetidos à oxidação acelerada, sob condições padronizadas e um ponto final, no qual se observam sinais de deterioração oxidativa, é escolhido (ANTONIASSI, 2001).

De um modo geral, procura-se avaliar, em condições padronizadas e selecionando um determinado parâmetro indicador, o “período de indução” (PI) da reação, ou seja, o tempo necessário para se atingir um ponto crítico de oxidação (alteração de gosto, aceleração brusca da velocidade do processo oxidativo - Figura 2) (SILVA et al., 1999; SHIOTA & TATSUMI, 2002).

**Figura 2.** Esquema da determinação da estabilidade oxidativa.  
Adaptado de: SILVA et al. (1999).

O Método do Oxigênio Ativo (AOM), também referido como Swift teste, é um método baseado no princípio de que o estado de rancificação de lipídeos é acelerado por aeração de um tubo juntamente com elevação constante de temperatura. Nesse teste, o índice de peróxido é determinado em intervalos regulares de tempo e o período de indução é determinado utilizando-se um gráfico de índice de peróxidos em função do tempo (FEREIDOON & WANASUNDARA, 2002).

O teste de estufa de Schaal envolve o aquecimento da amostra (50-100 g) em estufa a 60-70 °C, até o aparecimento dos primeiros sinais de oxidação. As amostras são examinadas em intervalos de tempo regulares, avaliando-se o estado de oxidação do produto sensorialmente ou pela determinação do índice de peróxido. Procede-se, então, à determinação do período de indução de modo semelhante ao referido para o método AOM (SILVA et al., 1999).

Apesar de serem importantes para a determinação da estabilidade oxidativa, esses métodos vêm se tornando obsoletos por serem trabalhosos e consumirem muito tempo, além de utilizar reagentes químicos e solventes, apresentando o problema de descarte de resíduos (GORDON, 2001; ANWAR et al., 2003).

O Índice de Estabilidade Oxidativa do Óleo (OSI), método Cd 12b-92 (AOCS, 1992), constitui a versão automatizada do AOM e é determinado nos equipamentos Rancimat® (Metrohm) e Oxidative Stability Instrument (Omnium) (JADHAV et al., 1996; COPPIN & PIKE, 2001). Diferente do AOM, estes equipamentos medem mudanças na condutividade que são causadas por compostos voláteis orgânicos, iônicos, automaticamente e continuamente (HUDSON & GORDON, 1994; FEREIDOON & WANASUNDARA, 2002). Um fluxo de ar passa através do óleo mantido sob aquecimento em temperatura elevada. Sob estas condições de aceleração da oxidação, os processos oxidativos alcançam etapas finais e ácidos voláteis de cadeia curta são produzidos e conduzidos para borbulhar em água deionizada, solubilizando e, conseqüentemente, aumentando a condutividade elétrica da água, medida automaticamente ao longo do tempo (ANTONIASSI, 2001; SHIOTA & TATSUMI, 2002).

A partir da curva de condutividade elétrica *versus* tempo constroem-se duas paralelas que interceptam num ponto que corresponde, na escala de tempo, ao período de indução ou índice de estabilidade oxidativa. Abaixo deste ponto, praticamente, não existe formação de compostos secundários de oxidação, enquanto que acima do mesmo ocorre rápido aumento da taxa de oxidação, do índice de peróxido, da absorção de oxigênio e de formação de voláteis (ANTONIASSI, 2001).

Devido à facilidade de uso e à sua reprodutibilidade, o OSI ganhou aceitação frente aos métodos de análise anteriores. Outra vantagem desse método é o baixo custo de operação, por não utilizar reagentes químicos (LÄUBLI & BRUTTEL, 1986; GARCIA-MESA et al., 1993; SHIOTA & TATSUMI, 2002). Por outro lado, SILVA et al. (1999) relataram como inconveniência do método, o fato dos resultados obtidos só serem mensuráveis para níveis de oxidação elevados, além do ponto correspondente ao aparecimento de *off flavors*, problema comum ao método AOM. Acrescenta-se o fato de que os produtos de decomposição que se formam nas condições de temperatura do ensaio não são da mesma natureza que os obtidos nas condições normais de armazenamento, igualmente ao que ocorre em todos os testes que recorrem a uma oxigenação intensiva a altas temperaturas. Além disso, as condições térmicas usadas tornam impossível a avaliação da capacidade antioxidante de compostos termolábeis, os quais podem decompor-se ao longo do ensaio.

Apesar dos pontos negativos, diversos estudos correlacionam o OSI a outros métodos e buscam assegurar a validade do seu emprego. Alguns deles serão discutidos a seguir.

Estudos de BOYD et al. (1998) mostraram que os voláteis gerados pelo método Rancimat® , analisados por cromatografia gasosa no modo *headspace* (HS-GC), são representativos de subprodutos típicos da oxidação lipídica do óleo de peixe, mostrando que o PI da oxidação pode ser monitorado com uso do Rancimat® .

COPPIN & PIKE (2001) avaliaram a utilidade do Rancimat® no teste de estabilidade oxidativa acelerado, correlacionando-o com a determinação sensorial do PI de amostras de óleo de soja catalisadas por metais e expostas a luz. Os PI's sensorial foram correlacionados com os obtidos pelo Rancimat®, resultando em um coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 0,920. A partir dos resultados, os autores concluíram que o Rancimat® constitui um método acelerado aceitável para medir a estabilidade oxidativa de amostras de óleo de soja expostas à luz e a várias concentrações do metal catalisador.

RUDNIK et al. (2001) realizaram um estudo da estabilidade oxidativa do óleo de linhaça, objetivando comparar os métodos AOM, Rancimat® e os métodos termoanalíticos Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Termogravimetria (TG). As amostras também foram acrescidas de dois tipos de antioxidantes, BHA e uma mistura contendo  $\alpha$ -tocoferol, palmitato de ascorbila, ácido cítrico e etileno glicol etoxilado. Os resultados obtidos pelo Rancimat® corresponderam aos baseados nos

métodos AOM, DSC e TG, tanto na avaliação da estabilidade oxidativa quanto da capacidade antioxidante.

ANWAR et al. (2003) avaliaram a relação entre os métodos AOM e Rancimat® na determinação da estabilidade oxidativa de óleos, gorduras e produtos com alto teor de lipídeos em temperaturas variadas. Os dados obtidos de PI pelo Rancimat® a 110, 120 e 130 °C foram 40-46, 20-25 e 9-13% dos valores de PI pelo método AOM. A partir desses dados, os autores mostraram a relação entre os dois métodos e consideraram o Rancimat® aceitável ao se determinar a estabilidade oxidativa, sendo esse quatro a cinco vezes mais rápido que o AOM.

REYNHOUT (1991) mostrou também que o Rancimat® é capaz de determinar períodos de indução entre 0,5 e 70 h. A metodologia oficial, AOCS Cd 12b-92 (AOCS, 1992) sugere que a temperatura de análise seja escolhida de forma que o índice de estabilidade oxidativa não seja inferior a 4 h, pois tempos menores resultam em ampla variação nas determinações. Porém, em tempos longos de determinação, as perdas de água por evaporação tornam-se consideráveis, uma vez que os ácidos orgânicos ficam mais concentrados afetando a condutividade (HILL & PERKINS, 1995).

HILL & PERKINS (1995) demonstraram ainda que existe uma maior variabilidade nos valores de OSI obtidos com 2,5 g em relação a 5 g de amostra. FARHOOSH (2007) relatou que deve haver um balanço entre o fluxo de ar e o tamanho da amostra para proporcionar uma condição de saturação. Em amostras de 12 g, o fluxo máximo de ar de 20 mL/min foi insuficiente para a saturação, enquanto nas amostras de 3 g, este mesmo fluxo gerou um estado turbulento e mais ar escapando que sendo utilizado para oxidação.

REYNHOUT (1991) mostrou em óleo de soja adicionado de antioxidantes (BHA, BHT, TBHQ,  $\alpha$ -tocoferol e extrato de alecrim), a relação linear entre o logaritmo do período de indução e a temperatura. Adicionalmente, HASENHUETTL & WAN (1992) mostraram essa mesma relação em diferentes óleos. Tal relação permitiu extrapolar a estabilidade oxidativa para outras temperaturas para predição da vida de prateleira.

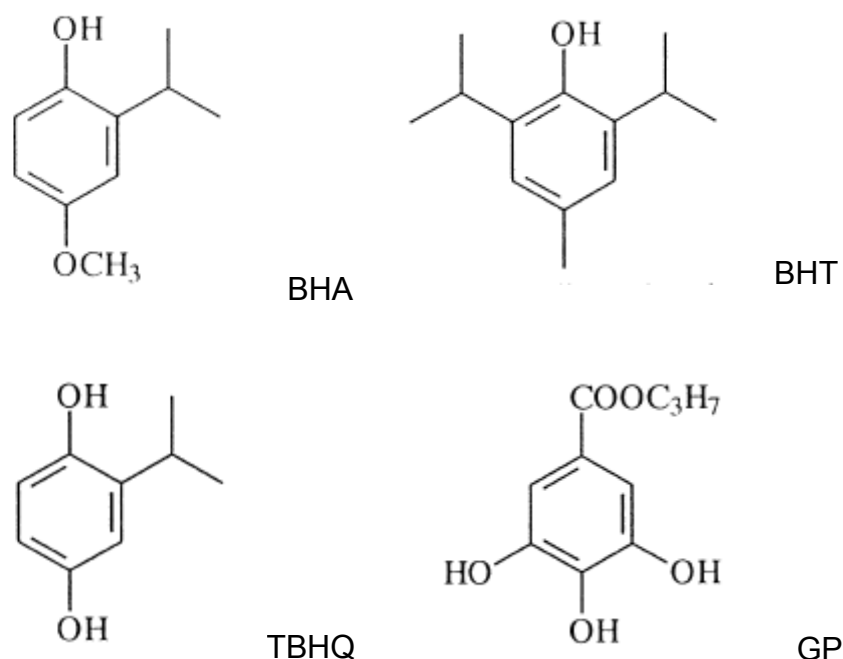
Em alguns casos, a extrapolação da estabilidade oxidativa para outras temperaturas pode superestimar, subestimar ou encontrar valores aceitáveis de vida de prateleira (KAYA et al., 1993; TORO-VAZQUEZ et al., 1993; PRESA-OWENS et al., 1995). FARHOOSH (2007) estudou o efeito dos parâmetros operacionais (tamanho da amostra, fluxo de ar e temperatura) no índice de estabilidade oxidativa e sugeriu que a escolha correta de valores para os parâmetros operacionais produz menores diferenças entre os tempos preditos e os reais de vida de prateleira.



### 2.2.5. Ocorrência de antioxidantes nos alimentos

A presença dos antioxidantes em alimentos é benéfica para sua preservação e no suprimento de antioxidantes *in vivo*. Esses podem estar presentes naturalmente nos alimentos ou serem adicionados (KOLAKOWSKA, 2003; SHI & NIKI, 2001).

Dentre os antioxidantes adicionados existem os sintéticos e os naturais. Os sintéticos, em geral, são estruturas fenólicas contendo graus variáveis de substitutos alquilas que aumentam a sua solubilidade em óleos e gorduras. Na figura 3, estão apresentadas as estruturas químicas de alguns antioxidantes sintéticos solúveis em óleos.



**Figura 3.** Antioxidantes sintéticos solúveis em óleo mais comumente utilizados em alimentos. BHA - Butil-hidroxi-ianisol; BHT - Butil-hidroxi-tolueno, TBHQ - Terc-butil-hidro-quinona, GP - Galato de propila.

Os antioxidantes BHA e BHT são mais eficientes em gorduras animais e agem sinergicamente. Possuem propriedades similares, mas o BHT é menos efetivo pela presença dos dois grupamentos butil que conferem maior impedimento estérico frente ao BHA. GP é eficiente em lipídeos de fontes animais e vegetais e apresenta sinergismo com o BHA. Porém, na presença de íon ferro, GP forma um complexo violeta, sendo usado sempre em combinações com um agente complexante. Já o TBHQ, mais eficiente em óleos vegetais, é mais estável que BHA e BHT em

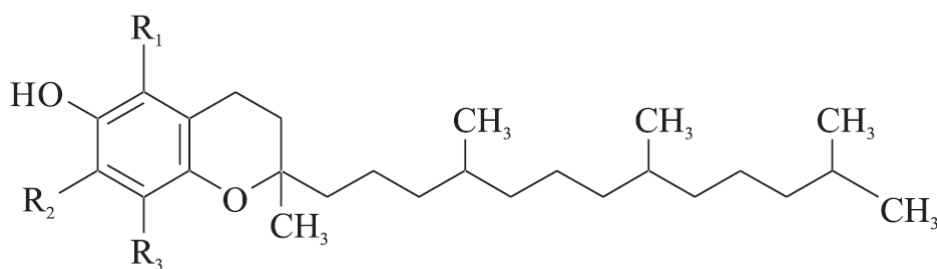
temperaturas elevadas, sendo considerado melhor antioxidante para óleos de fritura e produtos fritos (ARAÚJO, 2004).

Apesar dos benefícios na preservação de alimentos, o uso de antioxidantes sintéticos tem sido restringido por seus efeitos adversos em diferentes espécies de animais experimentais. Seus efeitos toxicológicos têm sido revisados pelo JECFA em seus encontros anuais. Dentre eles estão carcinomas no primeiro estômago de roedores após exposição ao BHA e efeitos adversos nos pulmões, fígado e sangue causado por BHT. As IDA's estabelecidas são de 0-0,5 e de 0-0,3 mg/kg de peso corporal para o BHA e o BHT, respectivamente (ITO et al., 1985; ITO et al., 1986; ITO & HIROSE, 1989; BANNWART & TOLEDO, 1999; JECFA, 2009). No Brasil, os limites máximos permitidos para adição destes antioxidantes, individualmente ou combinados, é de 0,02g/100g de óleos e gorduras (BRASIL, 2005).

Os flavonóides, incluindo flavonas, flavonóis e isoflavonas, constituem o grupo mais abundante de antioxidantes naturais, e inibem a oxidação por diversos mecanismos e diferentes espécies reativas de oxigênio. Eles atuam sequestrando radicais, formando complexos e desativando o oxigênio singlete. São pouco solúveis em fase orgânica, mas possuem atividade antioxidante em emulsões. Carotenóides e ácido ascórbico são antioxidantes sinérgicos, desativadores do oxigênio singlete e também reagem com radicais peroxil ou alquil (KOLAKOWSKA, 2003).

Os tocoferóis constituem antioxidantes naturalmente presentes em óleos vegetais e em pequenas quantidades provenientes da dieta na gordura animal. Compreendem a classe de substâncias químicas derivadas do deidrocomanol. Os tipos diferem entre si no grau de substituição do anel aromático, como mostrado na figura 4. Possuem a cadeia lateral isoprenóide saturada e, dependendo da posição dos grupos metil no anel, são denominados alfa, beta, gama e sigma (NAWAR, 1996; ARAÚJO, 2004).

Alternativamente aos antioxidantes sintéticos, a indústria de alimentos tem aumentado seu interesse em extratos de frutas, vegetais, ervas, cereais, e outros materiais vegetais, até mesmo resíduos industriais, os quais possuem habilidade de retardar a oxidação dos lipídeos. Os extratos naturais, suas misturas, isolados e concentrados têm sido bastante estudados e revisados (MADSEN & BERTELSEN, 1995; ALMEIDA-DORIA & REGITANO-D'ARCE, 2000; MOURE et al., 2001; SUHAJ, 2006; MOON & SHIBAMOTO, 2009).



$\alpha$  - tocoferol:  $R_1 = R_2 = R_3 = CH_3$

$\beta$  - tocoferol:  $R_1 = R_3 = CH_3$ ;  $R_2 = H$

$\gamma$  - tocoferol:  $R_1 = H$ ;  $R_2 = R_3 = CH_3$

$\delta$  - tocoferol:  $R_1 = R_2 = H$ ;  $R_3 = CH_3$

**Figura 4.** Estrutura molecular dos tocoferóis.

Muitas especiarias têm se mostrado boas fontes de antioxidantes, com destaque para sálvia (*Salvia officinalis* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), apresentando maior efetividade como antioxidantes (MADSEN & BERTELSEN, 1995). Diversos autores relataram a efetividade do alecrim como antioxidante, relacionando suas propriedades à presença de diterpenos fenólicos, como o carnosol e rosmanol (RICHEIMER et al., 1996; FRANKEL et al., 1996; BASAGA et al., 1997; RAMALHO & JORGE, 2006b; COIMBRA et al., 2007).

CHEN et al. (1998) compararam o efeito antioxidante do extrato de alecrim com o do extrato de catequinas do chá verde em gordura de porco, de galinha e óleo de canola. Os resultados mostraram maior efetividade do extrato de catequinas do chá verde frente ao extrato de alecrim em todos os substratos avaliados. Outros trabalhos têm relatado a atividade antioxidante dos extratos de chá verde e sua efetividade comparada com diferentes extratos e outros antioxidantes (CHEN & CHAN, 1996; FRANKEL et al., 1997; TOSCHI et al., 2000; MOON & SHIBAMOTO, 2009).

Os principais compostos ativos do chá verde são catequina, epicatequina, galato de epicatequina, epigalocatequina, galato de epigalocatequina, sendo que os extratos com maiores quantidades de epigalocatequina e de galato de epigalocatequina mostraram maiores efetividades (TOSCHI et al., 2000).

As poliaminas também atuam como antioxidantes em óleos, lipossomas, microssoma, culturas celulares; protegem de danos por radiação (raio- $\gamma$ , raio-X, radiação UV) e por oxigênio singlete em DNA e culturas celulares. Possuem boa solubilidade em fase orgânica e aquosa, podendo ser utilizadas em uma grande variedade de alimentos (LØVAAS, 1997).

Existem diversos métodos para a extração dos compostos antioxidantes em vegetais. Dentre esses, podem ser citados os métodos tradicionais de extração utilizando solventes orgânicos (como água, etanol, éter e metanol) e a extração supercrítica com o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Sob o ponto de vista químico não há como selecionar a metodologia mais eficiente para a extração desses compostos que podem sofrer a influência de diversos fatores, por exemplo a natureza do vegetal, o solvente empregado na extração, o tamanho das partículas, o tempo e a temperatura de extração (ANDREO & JORGE, 2006; SUHAJ, 2006).

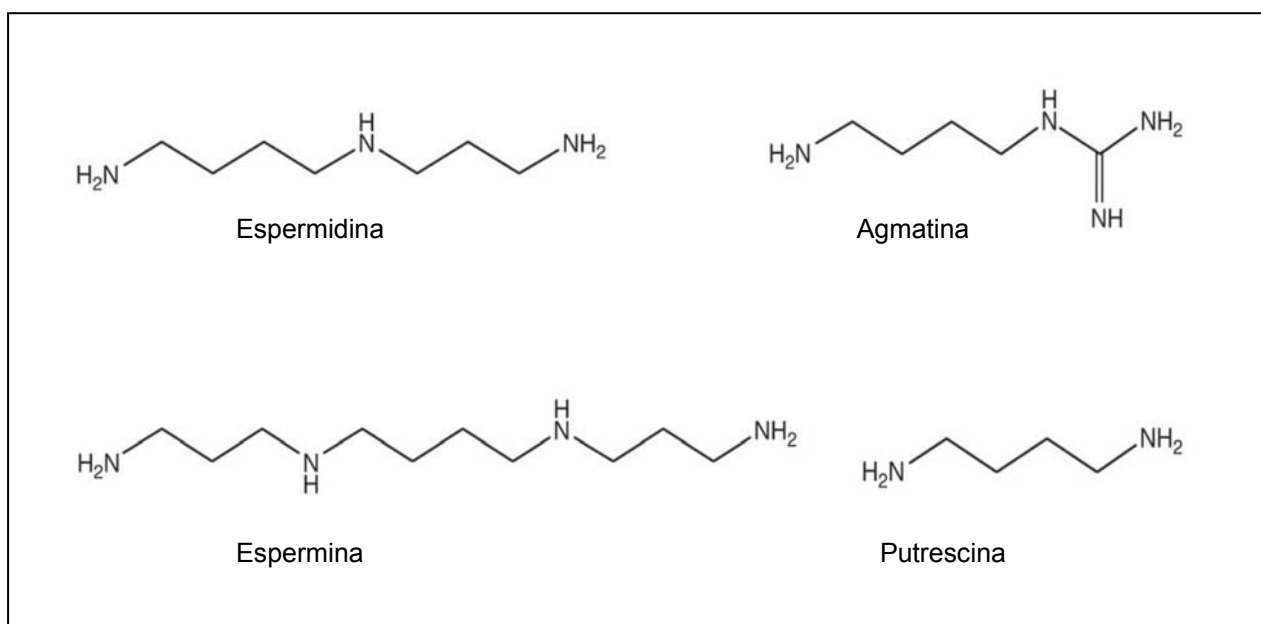
## 2.3. POLIAMINAS

### 2.3.1. Definição

Poliaminas são bases orgânicas alifáticas pertencentes às aminas bioativas ou biologicamente ativas que desempenham importantes funções metabólicas e fisiológicas em animais, vegetais e microorganismos. Dessa forma, estão naturalmente presentes em baixas concentrações em todos os organismos vivos e, conseqüentemente, nos alimentos (BRINK et al., 1990; BARDÓCZ, 1995; LIMA & GLÓRIA, 1999).

As mais importantes são a espermidina [*N*-(3-aminopropil)-1,4-butano diamina ou aminopropil-tetrametilenodiamina] e a espermina [*N,N'*-bis(3-aminopropil)-1,4-butano diamina ou diaminopropil-tetrametilenodiamina], sendo assim classificadas por possuírem mais de dois grupamentos amino. A diamina putrescina [1,4-butano diamina ou tetrametilenodiamina] e a agmatina (AGM) são precursoras destas poliaminas (KUMAR et al., 1997; MOINARD et al., 2005). Na figura 5 estão apresentadas as estruturas dessas aminas.

As poliaminas são policátions flexíveis e exibem 2, 3 ou 4 cargas positivas em condições fisiológicas. Podem girar em torno das ligações C-C ou C-N conferindo flexibilidade conformacional (BARDÓCZ et al., 1993; LØVAAS, 1997). Ao contrário de íons metálicos, os quais têm cargas localizadas, as poliaminas possuem cargas positivas distribuídas ao longo de suas cadeias carbônicas que podem interagir formando pontes com estruturas de cargas negativas (BARDÓCZ, 1995).



**Figura 5.** Estruturas químicas das poliaminas e de algumas precursoras.

Outra característica das poliaminas é a solubilidade em meio orgânico e em meio aquoso, o que permite sua utilização em uma grande variedade de produtos. Em meio lipofílico provavelmente existem como compostos neutros e, em meio aquoso, estão altamente solubilizadas em conformação estendida (LØVAAS, 1991; LØVAAS, 1997).

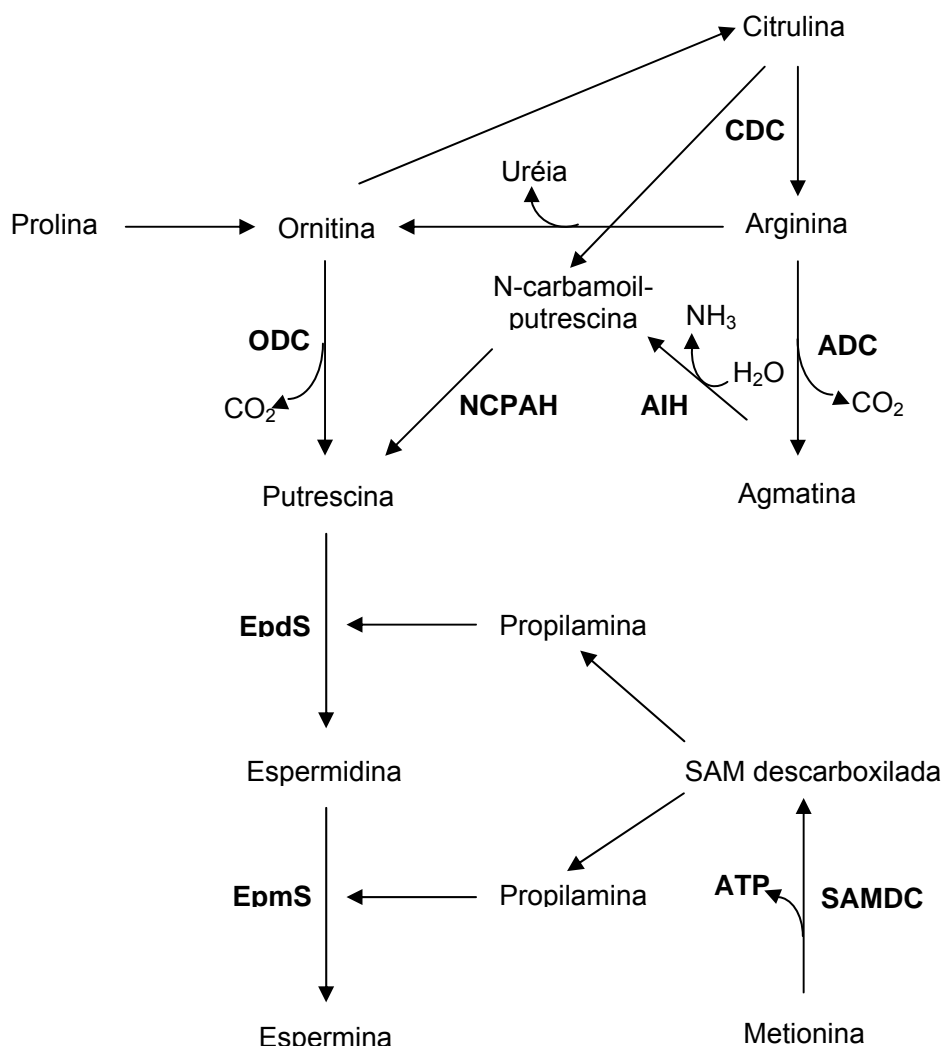
### 2.3.2. Síntese

As poliaminas são formadas a partir da descarboxilação de ornitina e da arginina pelas respectivas enzimas ornitina descarboxilase (ODC) e arginina descarboxilase (ADC) (MEDINA et al., 2003).

Segundo HILLARY & PEGG (2003), a principal via de formação de putrescina (PUT) em animais é pela enzima ODC, promovendo a descarboxilação da ornitina e, conseqüentemente, formação da PUT. Já em plantas e microorganismos, a ADC é a principal enzima responsável por esse processo por promover a descarboxilação de arginina e conseqüente formação de AGM. Esta, em microorganismos e vegetais, é convertida em N-carbamoilputrescina e, posteriormente, em PUT, pela enzima agmatina urea-hidrolase (agmatinase).

Para que ocorra a conversão de PUT em EPD e esta em EPM, uma série de reações envolvendo transferases, descarboxilases e sintetases acontecem paralelamente, como mostrado na Figura 6. A metionina é convertida em S-adenosil metionina (SAM) e, pela S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC), forma a S-

adenosil metionina descarboxilada, fornecendo um grupo propilamina à PUT formando a EPD, pela espermidina sintase, e, o mesmo grupamento à EPD formando a EPM, pela espermina sintase (GLÓRIA, 2005).



**Figura 6.** Via para a síntese de poliaminas.  
Fonte: GLÓRIA (2005).

Acreditava-se que as poliaminas eram produzidas somente *in situ*, uma vez que todas as células são capazes de sintetizá-las (SMITH, 1985). Porém, HALÁSZ et al. (1994) observaram que, em alguns casos, a capacidade das células e órgãos de sintetizarem poliaminas é insuficiente para satisfazer os requerimentos totais. Os estudos mais recentes sugeriram que as poliaminas provenientes de fontes extracelulares são também de fundamental importância para os processos metabólicos (BARDÓCZ et al., 1993; MEDINA et al., 2003; KALAC & KRAUSOVÁ, 2005).

Assim, as três fontes formadoras de poliaminas estabelecidas são: biossíntese *in situ* a partir de aminoácidos, ingestão direta por meio da dieta, além da síntese e liberação por bactérias residentes no trato gastrointestinal (BARDÓCZ, 1995).

### 2.3.3. Ocorrência em alimentos

As poliaminas podem ocorrer naturalmente em alimentos, pois se encontram distribuídas em todos os materiais biológicos, incluindo animais, plantas e microorganismos (BARDÓCZ, 1995).

Apesar das informações referentes a estas quantidades ainda serem escassas na literatura, alguns estudos têm demonstrado variações entre determinados grupos de alimentos (BARDÓCZ, 1995; ELIASSEN et al., 2002; KALAC & KRAUSOVÁ, 2005).

Segundo LÖSER (2000), o leite humano, e de outros mamíferos contêm teores relativamente altos de poliaminas, entretanto, outros estudos reportaram baixas concentrações de EPM e EPD em leite de vaca integral, semi-desnatado e em pó, assim como em iogurte (BARDÓCZ, 1995; ELIASSEN et al., 2002; KALAC & KRAUSOVÁ, 2005).

Em tecidos animais, EPM é a poliamina predominante, sendo EPD predominante em vegetais (LIMA & GLÓRIA, 1999; SILVA & GLÓRIA, 2002). As carnes vermelhas e a carne de frango contêm maior quantidade de EPM. Ainda, com relação aos produtos de origem animal, dados da literatura apontaram baixos teores de poliaminas em ovos de galinha (BARDÓCZ, 1995; SILVA & GLÓRIA, 2002; KALAC & KRAUSOVÁ, 2005). Já os produtos de origem vegetal apresentam significativas concentrações de poliaminas, como também das precursoras PUT e AGM, sendo que EPD é predominante, seguida de PUT e pobres em EPM.

Os cereais são excelentes fontes de EPD, sendo também fontes de EPM (SMITH, 1985; LIMA & GLÓRIA, 1999), enquanto frutos e sucos têm sido descritos como ricos em PUT e os vegetais verdes apresentam altos teores de EPD (KALAC et al., 2005; MORET et al., 2005).

Os tipos e teores de poliaminas em vegetais variam com a espécie, tipo de tecido, condições de cultivo, estágio de amadurecimento e condições de armazenamento. Em plantas submetidas a condições de estresse (choque osmótico, pH baixo, salinidade e dessecação, variação na temperatura e altitude, deficiência de

potássio e magnésio) poderá ocorrer um acúmulo de PUT e AGM (LIMA & GLÓRIA, 1999).

Entre os alimentos fermentados, os molhos de soja são ricos em PUT e histamina, enquanto o saquê possui grande quantidade de AGM (OKAMOTO et al., 1997). Nos estudos de ELIASSEN et al. (2002), os alimentos processados e não processados foram comparados e não apresentaram diferença significativa quanto aos teores de poliaminas.

Em alimentos contaminados por bactérias é comum a presença de PUT e EPD, mas não de EPM. Em geral, tais alimentos apresentam redução no conteúdo de EPM, utilizada como fonte de nitrogênio (BARDÓCZ, 1995).

A avaliação do teor de poliaminas dos alimentos muitas vezes tem sido realizada de acordo com os hábitos alimentares de alguns países, com análise de duas ou três amostras de cada item alimentar. Além disso, não foram levadas em consideração diferentes variedades do alimento, condições de produção e armazenamento. Dessa forma, não existem ainda informações seguras sobre o assunto (KALAC & KRAUSOVÁ, 2005).

#### **2.3.4. Funções**

As poliaminas têm participação fundamental em processos fisiológicos em animais e vegetais. A EPM e a EPD são indispensáveis às células vivas por estarem diretamente envolvidas com o crescimento, renovação e metabolismo celular (LIMA & GLÓRIA, 1999).

Segundo SEILER & RAUL (2005), as poliaminas exercem suas funções fisiológicas nas células por meio de interações eletrostáticas, estabilizando DNA, RNA e conformações de proteínas, além de atuarem sobre os radicais e complexando cátions. Também se ligam covalentemente alterando funções de proteínas, ativando fatores de iniciação. Por outro lado, podem formar aldeídos tóxicos à célula e ERO's como produtos da desaminação oxidativa.

Por serem policátions, a EPM e a EPD têm afinidade por compostos aniônicos e se ligam fortemente aos ácidos nucléicos e às partículas que os contêm. Desta forma, a interação entre poliaminas e o DNA aumenta a estabilidade da dupla hélice frente à desnaturação térmica e às condições ácidas e alcalinas (SILLA-SANTOS, 1996; LÖSER, 2000).



As poliaminas aumentam a resistência do RNA à ação da ribonuclease por se ligarem aos grupamentos fosfatos adjacentes do polinucleotídeo, protegendo as ligações internucleotídicas. Por outro lado, em elevadas concentrações, EPM e EPD funcionam como inibidores da síntese de RNA, provavelmente devido à precipitação dos ribossomos (BARDÓCZ, 1995; MEDINA et al., 2003).

A estabilização, bem como a interação com o RNA<sub>t</sub> e os ribossomos são aspectos importantes da ação das poliaminas na síntese protéica *in vitro*. Embora, uma quantidade crítica de Mg<sup>++</sup> seja necessária para a manutenção da integridade estrutural e funcional dos ribossomos, grande parte da necessidade de cátions di ou polivalentes é preenchida pelas poliaminas *in vivo*. Outra semelhança entre as poliaminas e o Mg<sup>++</sup> é a facilidade com que ambos compartilham função comum, como ocorre na associação dos ribossomos com as membranas do retículo endoplasmático (BARDÓCZ, 1995).

A função das poliaminas de maior importância, segundo BARDÓCZ (1995), é a que elas exercem como mensageiras secundárias, mediando a ação de todos os hormônios conhecidos e dos fatores de crescimento. Os teores de poliaminas na célula afetam diretamente a ocorrência da expressão de genes em resposta à estimulação do crescimento e à inibição de agentes de crescimento. As poliaminas afetam a expressão em nível de transcrição e esse efeito é mais provável devido à interação da poliamina com o DNA e/ou fatores de transcrição das proteínas (LINDEMOSE et al., 2005).

De acordo com MOINARD et al. (2005), as poliaminas agem na proliferação celular interagindo com uma proteína nuclear, a qual tem papel essencial na regulação de vários genes envolvidos no crescimento e morte celular. Além disso, desempenham funções celulares exclusivas, como iniciação e controle da tradução, podendo ainda estimular a associação de subunidades de ribossomos, estabilizar a estrutura do RNA<sub>t</sub> e reduzir a taxa de degradação do RNA (BARDÓCZ, 1995).

As poliaminas também estão envolvidas na sinalização intracelular. Por suas características policatiônicas, as poliaminas interagem fortemente com fosfolipídeos de membranas, podendo então exercer importantes funções de regulação nas enzimas associadas (TADOLINI, 1988; MOINARD et al., 2005).

Em vegetais, além das funções anteriormente citadas, as poliaminas participam na floração, no desenvolvimento do fruto, na resposta ao estresse e inibem a produção de etileno e a senescência. Participam também da síntese de metabólitos secundários de interesse biológico, como a nicotina e alcalóides (LIMA & GLÓRIA, 1999).

Uma vez que a renovação celular no epitélio intestinal é maior que em outras partes do corpo, as poliaminas são de vital importância para a estrutura e função de todo o trato digestivo. As poliaminas são essenciais para a manutenção da alta atividade metabólica no funcionamento saudável do intestino, por estarem envolvidas no reparo de danos intestinais causados por componentes deletérios dos alimentos e microorganismos (BARDÓCZ et al., 1993; DELOYER et al., 2001).

As poliaminas presentes no leite materno desempenham função como fatores de crescimento no lúmen e promovem a maturação intestinal, além de reduzirem a permeabilidade da mucosa a macromoléculas e prevenirem alergias alimentares (LÖSER, 2000). Conforme revisado por DELOYER et al. (2001), as poliaminas provenientes dos alimentos, além do papel potencial no crescimento e desenvolvimento do sistema digestivo de mamíferos recém-nascidos, têm se mostrado necessárias para a manutenção do trato digestivo dos adultos.

Ratos modificados geneticamente para pancreatite causada por uma grande redução nas poliaminas EPM e EPD por catabolismo foram submetidos a hepactomia parcial, recebendo ou não dietas contendo um análogo de EPD. Os resultados indicaram que a EPD está envolvida na integridade pancreática e que *pools* hepáticos insuficientes de EPM e EPD não iniciaram o processo regenerativo após a hepactomia parcial, indicando o requerimento das poliaminas para sua regeneração (RÄSÄNEN et al., 2002).

Um aumento na absorção de poliaminas dietéticas parece ser bastante favorável na recuperação de pacientes no pós-operatório, na cicatrização de feridas e de queimaduras graves (FARRIOL et al., 2004; KALAC & KRAUSOVÁ, 2005).

Em experimentos com fêmeas de rato com 3, 10 e 26 semanas, foi verificado decréscimo significativo nos teores de EPD no timo, baço, ovários, fígado, estômago, pulmões, rins, coração e músculos durante os referidos períodos, sendo mantida no útero, cérebro e pâncreas. Esses resultados sugerem que a ingestão de alimentos ricos em poliaminas pode ser benéfica à saúde, especialmente em idades mais avançadas (NISHIMURA et al., 2006).

Segundo KALAC et al. (2005), as poliaminas são demandadas preferencialmente por tumores e tecidos com alta proliferação celular, como na cicatrização de feridas. Por outro lado, o acúmulo excessivo de poliaminas pode induzir a apoptose. Possivelmente, isso ocorre devido ao aumento do estresse oxidativo, associado ao acúmulo do peróxido de hidrogênio durante o catabolismo de poliaminas, pela poliamina oxidase (MOINARD et al., 2005; LARQUÉ et al., 2007).

Além disso, pode induzir a toxicidade e o crescimento anormal, incluindo a transformação celular, promoção e invasão tumoral, portanto, pacientes com câncer devem evitar os alimentos ricos em poliaminas (MITCHELL, 2004).

As poliaminas também atuam como antioxidantes em óleos, lipossomas, microsoma e culturas celulares evitando danos causados por radiação (raio- $\gamma$ , raio-X, radiação UV), por oxigênio singlete no DNA em culturas celulares, além do dano por ozônio e por estresse físico em plantas (LØVAAS, 1997).

### **2.3.5. Ação como antioxidantes**

Segundo LØVAAS (1997), a sugestão de que poliaminas atuam como importantes antioxidantes biológicos surgiu de abordagens experimentais de diferentes linhas de pesquisa, como processamento de alimentos, físico-química, pesquisa médica e biologia celular.

A ação antioxidante destas amins está correlacionada com a quantidade de aminogrupos, aumentando de PUT para EPM (DROLET et al., 1986; PAVLOVIC et al., 1992; SILLA-SANTOS, 1996). A estabilidade de complexos das poliaminas com íons metálicos correlaciona-se também com as posições dos aminogrupos, com a molécula e com o comprimento da cadeia da amina (LØVAAS, 1997).

LØVAAS (1991) propôs que o efeito antioxidante das poliaminas é devido à neutralização de ácidos, os quais são pró-oxidantes por estimular a decomposição de radicais peróxidos ou por promover um aumento na solubilidade de metais traços, estimulando a reação de Fenton.

A interação eletrostática das poliaminas com ânions orgânicos modula a estrutura terciária de proteínas, estabiliza membranas e protege o DNA da degradação alcalina. Já a formação de complexos com vários cátions metálicos previne eficientemente a geração de espécies reativas de oxigênio (LØVAAS, 1997; HA et al., 1998).

TADOLINI (1988), em um trabalho com vesículas contendo fosfolípídeos ácidos, sugeriu um possível mecanismo para proteção de lipídeos contra a peroxidação, em que as poliaminas fazem parte de um mecanismo de defesa contra o dano oxidativo causado por ferro, atuando na formação de um complexo entre o metal e o fosfolípídeo.

LØVAAS & CARLIN (1991) sugeriram que a EPM tem pelo menos dois mecanismos de ação como antioxidante. No primeiro, inibe o transporte de radicais

superóxido em granulócitos, e, no segundo inibe a reação de Haber-Weiss formando um quelato não reativo com o ferro, impedindo a geração de radicais hidroxil.

LØVAAS (1995) investigou a hipótese da EPM atuar como antioxidante na proteção da epiderme contra danos oxidativos provocados pela radiação UV. A hipótese foi substanciada pelo fato da ornitina descarboxilase (ODC), que controla a taxa de biossíntese da EPM ser induzida pela radiação ultravioleta do tipo B (UVB), pela presença desta amina em altos níveis na epiderme e seu efeito antioxidante. É sabido que a exposição crônica à radiação UV causa aumento na deposição de ferro na pele, então, o referido autor sugere que a EPM, com sua habilidade de quelar metais, protege a pele contra a radiação.

DEUTSCH et al. (2005) observaram *in vitro* o efeito da adição de estimuladores e bloqueadores da síntese de poliaminas na produção de peróxidos em células expostas à radiação ultravioleta do tipo C (UVC). Os resultados confirmaram o envolvimento das poliaminas na proteção contra danos oxidativos induzidos pela radiação.

KHAN et al. (1992) estudaram a função das poliaminas na proteção do DNA contra danos oxidativos. A partir de  $^1O_2$  gerado fotoquimicamente *in vitro*, a taxa de reação do  $^1O_2$  com o DNA foi menor que a taxa na qual  $^1O_2$  foi quelado por EPM ou EPD. Evidenciou-se que estas aminas atuam como quelantes físicos do oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) oferecendo proteção ao DNA, prevenindo a oxidação de bases, perda de atividade e mutagênese.

Muitos pesquisadores estudaram as poliaminas em sistemas biológicos e comprovaram sua capacidade antioxidante, utilizando diferentes métodos. DROLET et al. (1986) estudaram a propriedade da CAD, PUT, EPD e EPM transformarem um radical em espécies menos reativas. Esses autores verificaram que os teores de radicais superóxido formados a partir da xantina oxidase ou quimicamente pela riboflavina foram significativamente inibidos pela EPM, EPD e PUT a 10 e 50 mmol/L. Radicais mais reativos, como o hidroxil, gerados pela reação de Fenton, também foram efetivamente sequestrados e a produção de radicais superóxido por membranas microsossomais senescentes foi inibida pelas aminas estudadas.

PAVLOVIC et al. (1992) estudaram a ação das poliaminas EPM e EPD e a diamina PUT em suspensões lipossômicas de fosfolipídeos e homogenados de fígado adicionados de  $Fe^{2+}$ . Utilizando quimioluminescência e teste do TBA, comprovaram que essas aminas têm capacidade de sequestrar radicais de oxigênio e/ou radicais lipídicos (principalmente o radical peroxil).

SASAKI et al. (1996) avaliaram a atividade antioxidante das frações aquosas do tecido testicular de salmão em uma emulsão de triglicerídeos do óleo de sardinha, medida pela taxa de formação de TBARS e verificaram que a fração de baixo peso molecular contendo EPM e PUT inibiu a autoxidação e a oxidação catalisada pelo ferro. Esses resultados sugerem a utilização desse subproduto não utilizado da indústria de salmão como fonte de antioxidantes naturais solúveis em água para emprego em alimentos.

Quando folhas de aveia (*Avena sativa*) sem epiderme foram imersas em solução tampão com EPM e EPD, foi observada diminuição na produção de malonaldeído pela reação do TBA e inibição da atividade da lipoxigenase. Tais resultados sustentam a alegação de que a inibição da peroxidação lipídica pelas poliaminas é um dos mecanismos responsáveis pelos seus efeitos anti-senescência (BORREL et al., 1997).

EPM e EPD inibem, além da autoxidação, o ranço enzimático pela inibição da lipoxigenase 1, mas não da lipoxigenase 2, e essa inibição é não competitiva (MACCARRONE et al., 1998).

As aminas CAD, PUT, EPD e EPM são capazes de sequestrar radicais superóxido *in vitro* quando presentes em altas concentrações, mas não em concentrações fisiológicas (0,5; 1 e 2 mmol/L). No entanto, mesmo em baixas concentrações, são potentes sequestradoras do radical hidroxil. Além disso, EPM e EPD agem efetivamente como supressoras do oxigênio singlete (DAS & MISRA, 2004).

As poliaminas, em concentrações fisiológicas, inibiram a produção de ácido TBARS induzida por ácido quinolínico, nitroprussídeo de sódio, sistema  $Fe^{2+}/EDTA$  e  $Fe^{2+}$ , caracterizando o papel antioxidante de EPM e EPD no cérebro. O ácido quinolínico foi mais fortemente inibido que os demais compostos avaliados, o que sugere que o efeito antioxidante das poliaminas é dependente do agente que induz a oxidação (BELLÉ et al., 2004).

RIDER et al. (2007) investigaram o papel da EPD e EPM na proteção de fibroblastos de ratos expostos ao estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Células mutantes deficientes em EPM (Gy11) e normais (N6) foram submetidas a concentrações crescentes de  $H_2O_2$ . Os resultados mostraram que EPD e EPM, quando presentes em concentrações normais ou supra-fisiológicas, protegem as células das ERO's.

A atividade antioxidante de poliaminas conjugadas e ácidos hidroxicinâmicos relacionados foi comprovada por CHOI et al. (2007) por meio de três ensaios: do radical DPPH, do superóxido e do hidroxil. Os resultados sugeriram que os conjugados

poliamínicos são potentes sequestradores de radicais livres, capazes de controlar desordens patológicas mediadas por ERO's.

MATKOVICS et al. (1993) estudaram as propriedades antioxidantes de EPM, EPD e PUT em eritrócitos, e em tecidos cerebral e cardíaco submetidos a estresse com  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Foram realizados testes com a atividade de superóxido desmutase, medidas do conteúdo de glutathiona reduzida e o grau de oxidação lipídica pelo teste do TBA, provando os efeitos antioxidantes destas amins em concentrações variando de  $10^{-7}$  a  $10^{-2}$  M.

Durante o isolamento de protoplastos de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), EPM, EPD e PUT reduziram o acúmulo de radicais superóxido devido à inibição da enzima da membrana microssomal NADPH oxidase (PAPADAKIS & ROUBELAKIS-ANGELAKIS, 2005).

TANG & NEWTON (2005) pesquisaram o efeito das poliaminas na proteção de culturas de calo e plântulas do pinheiro Virginia (*Pinus virginiana* Mill.) contra danos oxidativos induzidos pelo estresse salino. Os autores verificaram mudanças no crescimento celular e aumento na atividade das enzimas antioxidantes, ascorbato peroxidase (APOX), glutathiona redutase (GR) e superóxido dismutase (SOD), pelas poliaminas nos tecidos durante a adaptação ao sal.

A aplicação de PUT e EPD exógenas em frutos de romã foi eficaz na manutenção da concentração de ácido ascórbico, antocianinas e fenólicos totais. Além disso, induziu efeitos benéficos em termos de aumento da atividade antioxidante total, medida pelo ensaio ABTS, durante o armazenamento pós-colheita. Foi sugerido que a alta atividade antioxidante pode ser atribuída à capacidade das poliaminas de atuarem como sequestradoras de radicais livres (MIRDEHGHAN et al., 2007).

FUJISAWA & KADOMA (2005) estudaram a capacidade das poliaminas em sequestrar radicais alquil e peroxil, analisando a cinética de polimerização de metil metil acrilato (MMA) induzida por 2,2-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN) e peróxido de benzoíla em condições anaeróbicas. Os dados obtidos confirmam que as poliaminas sequestram dos radicais estudados.

TAKLE & MOERKOERE patentearam em 2008 o uso de EPM como antioxidante em alimentos em concentrações variando de 1 a 2000 nmol/L. Foram feitas soluções aquosas de EPM bas quais amostras de pescados, aves e bovinos foram imersas. Foi verificado que além da efetividade como antioxidante, a EPM previne perdas de líquido durante o descongelamento, mantendo a textura e também evita alterações na coloração. Os autores ressaltaram que a quantidade de EPM adicionada deve ser

suficiente para preservar o alimento, sem que seja percebido sabor ou odor desagradável.

As capacidades antioxidantes de poliaminas foram comparadas às de outros compostos por LØVAAS (1991), em óleo de peixe e em concentrados de ácidos graxos poliinsaturados, sendo em ordem decrescente: EPM, EPD, PUT, etoxiquinina, palmitato de ascorbila, galato de octila, TBHQ, BHA e  $\alpha$ -tocoferol.

LØVAAS (1991) determinou o efeito antioxidante das poliaminas, EPM, EPD e PUT, por meio da quantificação de produtos primários e secundários da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados por cromatografia líquida, gasosa e espectrofotometria. Foi demonstrado que as poliaminas inibem a oxidação de ácidos graxos, do  $\alpha$ -tocoferol e de pigmentos carotenóides. Por outro lado, FUJISAWA & KADOMA (2005) observaram que o número de radicais livres sequestrados por mol de antioxidante ( $n$ ) foi maior para os antioxidantes BHA e BHT (próximos de 2), enquanto para as poliaminas variou de 0,1 a 0,7.

Conforme estudos relatados acima, as poliaminas, presentes naturalmente nos alimentos possuem grande potencial como antioxidante. Entretanto, mais estudos em matrizes diferentes, comparando-as com outros antioxidantes são necessários. Nesse contexto, o óleo de soja, amplamente utilizado e disponível no Brasil e em outras partes do mundo, com alta susceptibilidade à oxidação constitui uma matriz relevante para estudos com poliaminas.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. MATERIAL

Foram utilizados padrões das poliaminas espermidina (EPD, base livre), espermina (EPM, base livre) e agmatina (AGM, sal sulfato), da diamina putrescina (PUT, base livre), do  $\alpha$ -tocoferol, da catequina da Sigma® (St Louis, MO, EUA) e dos antioxidantes BHA e BHT da Synth (Diadema, SP, Brasil).

O óleo de soja foi gentilmente cedido pela Cargill Agrícola, unidade de Mairinque (SP, Brasil), isento de antioxidantes. Após o recebimento, as amostras foram armazenadas a 4 °C, em ausência de luz, até o momento da análise.

Também foi utilizado o extrato antioxidante de chá verde (*Camellia sinensis*) contendo 20% de catequina e o extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) comercialmente disponíveis.

Os reagentes necessários para as análises de poliaminas estão listados abaixo:

- Acetato de sódio PA Vetec (Brasil)
- Acetonitrila, J. T. Baker (México)
- Ácido acético glacial Vetec (Brasil)
- Ácido bórico PA Vetec (Brasil)
- Ácido tricloroacético, Vetec (Brasil)
- Brij 35, Merck (Darmstadt, Alemanha)
- Hidróxido de potássio, Vetec (Brasil)
- Metanol, J. T. Baker (México)
- *o*-Ftalaldeído 97%, Sigma (St Louis, MO, EUA)
- Octanossulfonato de sódio, Sigma (St Louis, MO, EUA)
- $\beta$ -Mercaptoetanol, Sigma (St. Louis, MO, EUA)
- Membrana filtrante em éster de celulose 0,45  $\mu$ m - Ø 13 mm (Millipore)
- Membrana filtrante HAWP 0,45  $\mu$ m (Millipore Corp., Milford, MA, EUA)
- Membrana filtrante HVWP 0,45  $\mu$ m (Millipore Corp., Milford, MA, EUA)
- HCl, Vetec (Brasil)

As soluções estoque das aminas foram preparadas por diluição do padrão de cada amina separadamente em ácido clorídrico 0,1 mol/L, obtendo-se soluções padrão contendo 1 mg/mL de cada amina. Em seguida, 1 mL de cada solução padrão foi transferido para um balão volumétrico, resultando numa solução das aminas juntas,



numa concentração final de 100 µg/mL. A partir desta solução, foram preparadas outras soluções nas concentrações desejadas para análise.

Todas as soluções foram acondicionadas em tubos hermeticamente fechados, identificadas e armazenadas sob refrigeração para a realização das análises.

### 3.2. EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados para o desenvolvimento do trabalho estão descritos abaixo:

- Rancimat® 743 Metrohm (Herisau, Suíça)
- Cromatógrafo Shimadzu (Kioto, Japão), composto por:
  - bombas modelo LC-10 AD e LC-10 ADvp, com conjunto de lavagem automática do pistão,
  - injetor automático modelo SIL-10 ADvp,
  - unidade de controle CBM-10 AD conectada a um microcomputador e a todos os módulos,
  - Coluna Nova-Pak C<sub>18</sub> de fase reversa (3,9 x 300 mm, 4 µm) e pré-coluna µBondapak (Waters, Milford, MA, EUA).
  - Sistema de derivação pós-coluna
  - detector espectrofluorimétrico modelo RF-10AXL, com comprimentos de onda de 350 e 450 nm de excitação e emissão, respectivamente
- Banho-maria termostático (Precision Scientific, Chicago, IL, EUA)
- Banho de ultrassom UltraSonic Cleaner (Unique, SP, Brasil)
- Potenciômetro (Digimed, Brasil)
- Centrífuga refrigerada Jouan CR31 (Saint-Herblain, França)
- Vórtex (Biomatic, Brasil)
- Balança analítica Shimadzu (Kioto, Japão)
- Balança semi-analítica Sartorius (Jundiaí, SP, Brasil)
- Sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore Corp., Milford, MA, EUA)

### 3.3. MÉTODOS

#### 3.3.1. Avaliação das atividades antioxidantes das poliaminas

Foram avaliadas as atividades antioxidantes de EPD, EPM, PUT e AGM para o óleo de soja utilizando o Rancimat® modelo 743, pelo método AOCS Cd 12b-92 (AOCS, 1992). A vidraria foi rigorosamente lavada com detergente alcalino entre as análises para evitar qualquer contaminação que pudesse interferir nos resultados.

Para a adição das aminas como antioxidantes, foram preparadas soluções estoque em altas concentrações no óleo, dissolvidas com auxílio de ultrassom. O Óleo controle foi colocado no ultrassom pelo mesmo tempo necessário para dissolução do antioxidante na solução estoque. As amostras analisadas foram preparadas pesando-se, em tubos de vidro apropriados, a solução estoque na quantidade necessária para obter a concentração avaliada em 5 g de solução. Em seguida, pesou-se óleo controle (do ultrassom) de forma que todas as amostras, incluindo o controle, tivessem a mesma quantidade de óleo levado ao ultrassom. A massa em cada tubo foi completada para 5 g. O controle, portanto, era uma mistura composta de óleo sem adição de antioxidante, submetido e não submetido ao ultrassom.

As amostras foram analisadas em duplicata, incluindo o controle em todos os dias, a fim de evitar que diferenças no estado de oxidação do óleo influenciassem nos períodos de indução. Os estudos foram realizados à temperatura de 110 °C, com fluxo de ar de 20 L/h, e 60 mL de água Milli-Q para recepção dos voláteis. Foram obtidas, automaticamente, curvas de condutividade versus tempo e os períodos de indução. Os resultados foram expressos como fator de proteção (FP), ou seja, a razão do período de indução da amostra com antioxidante e do controle, conforme boletim de aplicação número 232, disponibilizado pelo fabricante do equipamento (METROHM, 2008). Desta forma, o valor de  $FP > 1$  indica a inibição da oxidação lipídica e quanto maior o FP, melhor a atividade antioxidante.

Para predição da estabilidade de óleos adicionados de diferentes teores de EPD e EPM nas temperaturas de armazenamento, foram realizados testes nas temperaturas de 100, 110, e 120 °C. A partir de  $\text{Log}_{10}(\text{PI})$  e da temperatura foram obtidas equações relacionando a estabilidade oxidativa à temperatura. As inclinações das curvas forneceram os coeficientes de temperaturas (REYNHOUT, 1991; HASENHUETTL & WAN, 1992). Para o óleo de soja sem antioxidantes, foi calculado o valor de  $Q_{10}$ ,

dividindo-se o valor de OSI à determinada temperatura, pelo valor de OSI obtido 10 °C acima da mesma (FARHOOSH, 2007).

A possibilidade de sinergismo na ação antioxidante das aminas EPM e EPD foi investigada utilizando um planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup>, tendo como variáveis independentes EPM e EPD, e como variável dependente o fator de proteção. Para tanto, foi utilizado um delineamento composto central rotacional, sendo realizados oito (8) ensaios, com os níveis dispostos na tabela 2 e com três (3) repetições no ponto central. Os resultados foram analisados utilizando-se o programa STATISTICA 8.0 (STATSOFT, EUA), adotando-se o nível de significância de 5%.

**Tabela 2.** Níveis de espermina e espermidina utilizados no planejamento fatorial

Variáveis independentes (concentração)	Níveis				
	-1,41	-1	0*	+1	+1,41
Espermina (g/100 g)	0,0059	0,0100	0,0200	0,0300	0,0341
Espermidina (g/100 g)	0,0059	0,0100	0,0200	0,0300	0,0341

\* Ponto central.

### 3.3.2. Comparação com antioxidantes tradicionais

A capacidade antioxidante das aminas foi comparada à de antioxidantes tradicionalmente usados na indústria alimentícia, como BHA, BHT e  $\alpha$ -tocoferol nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05 e 0,06 g/100 g utilizando o Rancimat® (LØVAAS, 1991). Também foram avaliadas as atividades de BHA e BHT juntos na proporção 1:1, nas mesmas concentrações. Foram avaliadas, também, associações de EPM com BHA e BHT (1:1) nas concentrações 0,02; 0,04 e 0,06 g/100 g.

Além disso, a atividade antioxidante de EPM e EPD foi comparada àquela de dois extratos antioxidantes naturais, de chá verde e de alecrim nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05 e 0,06 g/100 g e também à catequina, principal componente antioxidante do extrato de chá verde. As concentrações da catequina, 0,004; 0,008; 0,012; 0,016; 0,020; 0,024 g/100 g, foram escolhidas para englobar a faixa contida no chá verde (20%) e atingir também níveis para comparação com os outros antioxidantes.

As médias dos fatores de proteção dos antioxidantes foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, após análise de variância, utilizando-se o programa STATISTICA 8.0 (STATSOFT, EUA).

### **3.3.3. Determinação dos teores de poliaminas nos óleos e nos extratos**

As amostras de óleos e dos extratos utilizados foram avaliadas quanto aos teores de poliaminas. Empregou-se Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) por pareamento de íons em coluna de fase reversa, com detector de fluorescência após derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído (VALE & GLÓRIA, 1997).

As amins foram extraídas dos óleos segundo BATISTA (2007), substituindo a mesa agitadora por vórtex na agitação, permitindo maior contato entre a solução de extração e a amostra de óleo. Foram utilizados 3 g de cada óleo para determinação das poliaminas. A essa amostra foram adicionados 20 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 5%. Em seguida, as amostras foram agitadas em vórtex por 2 min e colocadas em estufa BOD à 4 °C por 30 min. Adicionou-se a cada amostra 1 mL de solução de TCA 5% contendo NaCl 1% para auxiliar na quebra da emulsão formada possibilitando a filtração. A fase aquosa foi filtrada em papel de filtro qualitativo.

Após a extração, o volume recuperado foi medido e a amostra resultante foi filtrada imediatamente antes da injeção no cromatógrafo utilizando-se membrana HAWP de 13 mm de diâmetro e 45 µm de tamanho do poro.

Os extratos naturais de chá verde e de alecrim utilizados como antioxidantes foram avaliados quanto aos teores de amins livres e conjugadas. Para a avaliação das amins livres foi feita somente a diluição do extrato em HCl 0,1 mol/L, seguida de filtração em membrana HAWP e injeção no cromatógrafo. Para a análise de amins conjugadas foi feita hidrólise utilizando 2 mL do extrato diluído adicionado de 2 mL de HCl 9 mol/L, à 110 °C por 10 h (SILVEIRA, 2008). Os hidrolisados foram concentrados em fluxo de ar comprimido e ressuspensos em 1 mL de TCA 5%, filtrados em membrana HAWP e injetados no cromatógrafo.

Para a separação das amins por CLAE, foram empregadas duas fases móveis: fase móvel A, solução tampão contendo acetato de sódio 0,2 mol/L e octanossulfonato de sódio 15 mmol/L, pH ajustado para 4,9 com ácido acético glacial; e fase móvel B, acetonitrila. Estas soluções, de grau cromatográfico, foram filtradas preliminarmente em membranas com poro de 0,45 µm, do tipo HAWP para a fase A e HVWP para a B (VALE & GLÓRIA, 1997).

A derivação pós-coluna foi realizada por meio de uma câmara de mistura instalada após a saída da coluna e um tubo de teflon de 2 m de comprimento conectando a câmara ao detector de fluorescência. A solução derivante foi preparada diariamente e mantida sob abrigo da luz, e consistia de 0,2 g de *o*-ftalaldeído dissolvido em 3 mL de metanol, diluídos em solução de 25 g de ácido bórico e 22 g de hidróxido de potássio para 500 mL de água (pH 10,5 a 11,0). Adicionou-se a esta solução 1,5 mL de Brij 35 e 1,5 mL de mercaptoetanol.

As aminas foram identificadas por comparação entre os tempos de retenção dos picos encontrados nas amostras com os das aminas da solução padrão e pela adição da amina suspeita à amostra. Soluções padrão foram analisadas intercaladas às amostras.

A quantificação de aminas foi realizada por interpolação em curva padrão externa, e estes valores multiplicados pelo fator de correção correspondente a cada amina, gerados a partir das soluções padrão analisadas intercaladas às amostras.

A curva padrão externa foi construída para as concentrações de 0,2 a 2,5 µg/mL para quantificação de aminas nos extratos e de 3 a 18 µg/mL para avaliação de aminas nos óleos. Em cada curva foram analisados seis (6) concentrações em triplicata, empregando o método dos mínimos quadrados ordinários para calcular as estimativas dos parâmetros da regressão.

Os valores extremos foram tratados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, o qual foi aplicado sucessivamente até que novos valores não fossem detectados, ou até uma exclusão máxima de 22,2 % no número original de resultados (HORWITZ, 1995). Violações das premissas relacionadas à análise de regressão foram avaliadas: normalidade pelo teste de Ryan-Joiner, homoscedasticidade utilizando o teste de Brown-Forsythe (Levene modificado) e independência dos resíduos da regressão pelo teste de Durbin-Watson. Testes de F foram conduzidos para verificar o ajuste ao modelo linear por meio da avaliação das significâncias da regressão e do desvio da linearidade (SOUZA, 2007).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

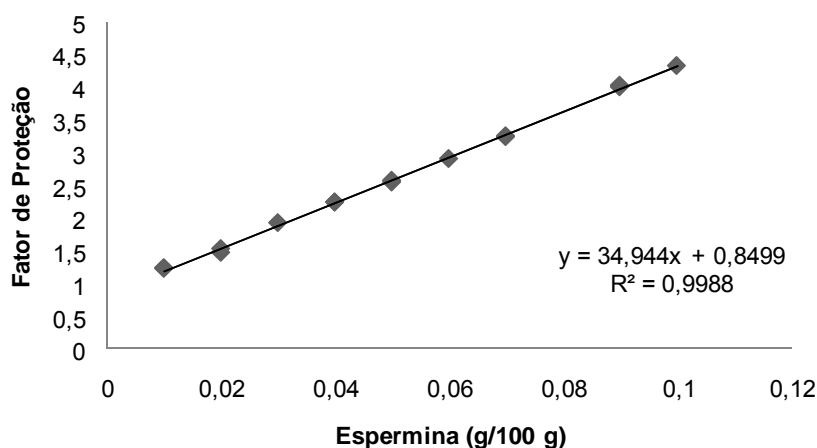
### 4.1. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DAS POLIAMINAS

#### 4.1.1. Espermina

Foi construída uma curva exploratória relacionando as diferentes concentrações de EPM aos fatores de proteção calculados. Após remoção de um nível, foi realizado o diagnóstico de valores extremos, retirando dados que claramente afetavam o ajuste ao modelo.

As premissas para utilização do MMQO foram atendidas. O coeficiente de correlação de Ryan-Joiner foi de 0,9860, demonstrando distribuição normal dos resíduos da regressão ( $p > 0,10$ ). A estatística t de Levene não significativa ( $p > 0,05$ ) confirmou a homoscedasticidade. A independência dos resíduos da regressão foi indicada pela estatística de Durbin-Watson ( $p > 0,10$ ). O desvio da linearidade não significativo ( $p > 0,05$ ) e a alta significância da regressão ( $p < 0,001$ ) foram observados, confirmando ajuste ao modelo linear na faixa estudada. A equação e o coeficiente de determinação estão demonstrados na figura 7.

Conforme pode ser visualizado, a EPM agiu como antioxidante gerando incrementos no fator de proteção no intervalo analisado. A partir da equação, observa-se que a adição de 0,01 g de EPM por 100 g de amostra gera incrementos de 0,349 no fator de proteção na faixa de concentração estudada.



**Figura 7.** Efeito da concentração de espermina no fator de proteção para o óleo de soja a 110 °C no Rancimat® .

LØVAAS (1991) estudou a influência da adição de 2 mmol/L (0,04 g/100 g) de EPM em óleo de peixe bruto, analisado a 100 °C no Rancimat® , obtendo um período de indução de 85,2 h que resultou em fator de proteção de 40,57. Para a mesma concentração da amina em óleo de soja à mesma temperatura no Rancimat® , o fator de proteção foi 2,05. EPM mostrou-se mais efetiva como antioxidante no óleo de peixe bruto do que no óleo de soja refinado.

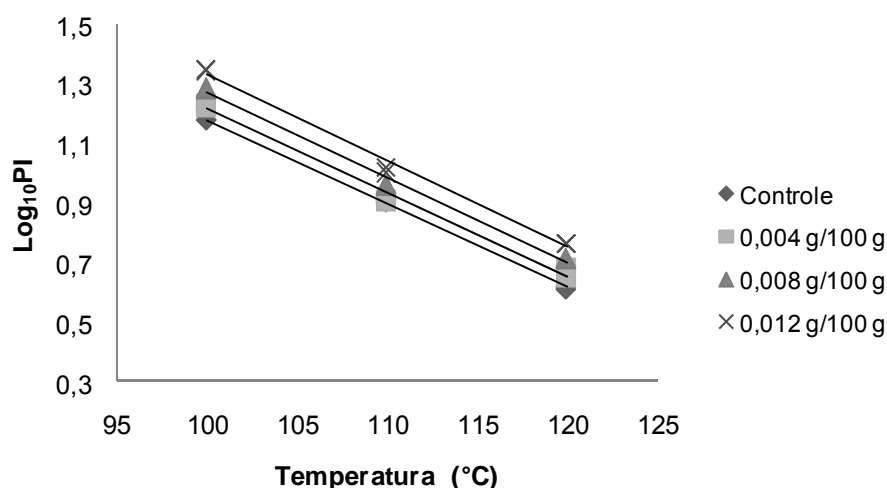
Esse dado mostra que existem diferenças na ação antioxidante da espermina em diferentes matrizes, o que pode ser devido a composição de ácidos graxos, bem como o processamento, os quais influenciam a oxidação. Além disso, os óleos contêm outros componentes menos expressivos, como metais, fosfolipídeos, clorofila e carotenóides, que podem acelerar a oxidação ou agir como antioxidantes (CHOE & MIN, 2006).

Estudos em outras temperaturas reafirmam essa diferença na ação antioxidante. Para o concentrado contendo 30% de ésteres metílicos do ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexaenóico, foi obtido o fator de proteção de 8,77 para EPM a 2 mmol/L a 70 °C (LØVAAS, 1991), fator intermediário aos obtidos para os óleos de soja e de peixe. Na patente de MARQUEZ & AKASHE (2002), foi observado que ao adicionar 3 mmoles de EPM em 5 mL de óleo de linhaça (aproximadamente 13 g/100 g) a 110 °C foram obtidos os fatores de proteção de 4,00 e 6,00 mostrando que a amina é menos efetiva nessa matriz em relação às anteriores.

Foi avaliado também o potencial antioxidante da EPM na forma de sal (tetracloroeto de espermina), que mostrou ser pró-oxidante. Tal efeito pode ter sido resultante da liberação de HCl para o óleo. LØVAAS (1991) relatou que o HCl em concentrações menores que 0,1 mmol/L agiu como pró-oxidante em óleo do peixe *Mallotus villosus* (capelin) analisado em Rancimat® a 100 °C.

#### 4.1.1.1. Predição da estabilidade oxidativa com adição de espermina

Ao avaliar o efeito da temperatura na atividade antioxidante da EPM em óleo de soja, observou-se que a elevação desta para as diferentes concentrações de EPM estudadas resultou em um decréscimo linear do logaritmo de PI (Figura 8).



**Figura 8.** Logaritmo do Período de Indução (PI) em função da temperatura para o óleo de soja controle e três concentrações de espermina adicionadas.

Foram obtidas equações que permitiram extrapolar os resultados do teste acelerado para temperaturas de armazenamento do óleo sem antioxidante e na presença de EPM conforme proposto por REYNHOUT (1991) e HASENHUETTL & WAN (1992). Na tabela 3 estão apresentadas as equações obtidas com os coeficientes de correlação e os valores preditos de estabilidade oxidativa a 20 °C.

**Tabela 3.** Predição do período de armazenamento do óleo de soja a 20 °C adicionado de diferentes teores de espermina, com as equações e os respectivos coeficientes de correlação

Espermina adicionada (g/100 g)	Equação	R <sup>2</sup>	Período de armazenamento a 20 °C (meses)
0*	$y = -0,0282 x + 3,999$	0,9994	3,8
0,004	$y = -0,0282 x + 4,038$	0,9918	4,2
0,008	$y = -0,0287 x + 4,136$	0,9938	5,2
0,012	$y = -0,0289 x + 4,225$	0,9917	6,4

\*Controle.

Observa-se que os períodos de armazenamento preditos do óleo adicionado de EPM em relação ao controle foram aproximadamente 10, 40 e 70 % maiores para concentrações de 0,004; 0,008 e 0,012 g/100 g, respectivamente.



O coeficiente de temperatura apresentou uma pequena variação de -0,0282 a -0,0289 /°C, sendo o aumento na inclinação resultante da adição do antioxidante. Esse valor está próximo do coeficiente de temperatura -0,0312 /°C obtido por FARHOOSH (2007) para óleo de soja sem antioxidantes. Também é condizente com valores obtidos para outros óleos vegetais (HASENHUETTL & WAN, 1992) variando de -0,0278 a -0,0315 /°C para óleo de açafrão e amendoim, respectivamente.

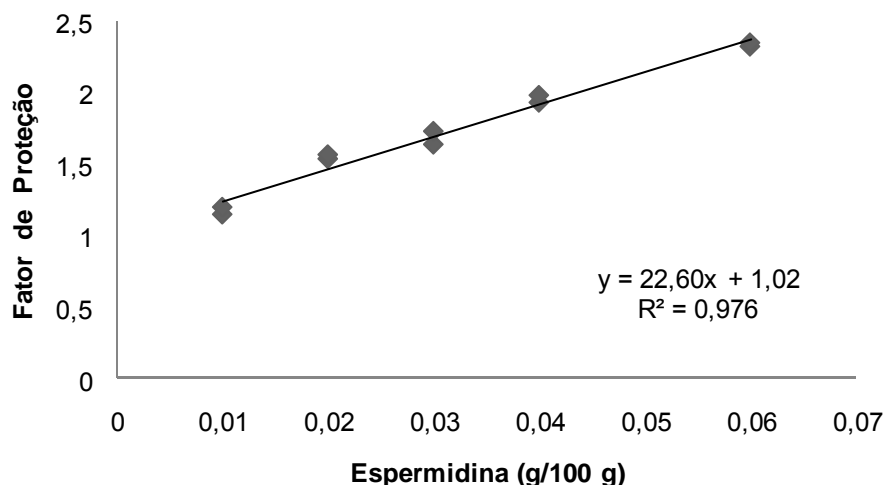
Foi observado também que, em temperaturas mais altas e, conseqüentemente, períodos de indução mais baixos, existe uma grande variabilidade nos resultados, com médias de coeficientes de variação mais altas, sendo de 1,04% a 110 °C e de 8,06% a 120 °C. Esta baixa reprodutibilidade também é relatada no método oficial (AOCS, 1992), com ampla variação em períodos de indução inferiores a 4 h.

Esses resultados mostram a atividade antioxidante da EPM em óleo de soja. Entretanto, recomenda-se que estudos sejam realizados na temperatura em que o produto será armazenado a fim de confirmar os resultados preditos pelo método acelerado.

#### **4.1.2. Espermidina**

Assim como se procedeu para EPM, foi construída uma curva exploratória relacionando as diferentes concentrações de EPD aos fatores de proteção calculados. Após remoção de um nível não foram encontrados valores extremos afetando o ajuste ao modelo.

O coeficiente de correlação de Ryan-Joiner foi de 0,9831, demonstrando uma distribuição normal dos resíduos da regressão ( $p > 0,10$ ). A homoscedasticidade foi indicada pela estatística t de Levene não significativa ( $p > 0,05$ ). A estatística de Durbin-Watson ( $p > 0,10$ ) evidenciou a independência dos resíduos, confirmando todas as premissas para a regressão. Um desvio da linearidade não significativo ( $p > 0,05$ ) e uma alta significância da regressão ( $p < 0,001$ ) foram observados, confirmando ajuste ao modelo linear na faixa estudada. Na figura 9 estão indicados a equação e o coeficiente de determinação para o modelo ajustado.



**Figura 9.** Efeito da concentração de espermidina no fator de proteção para o óleo de soja a 110 °C no Rancimat®.

Verificou-se que a EPD também apresentou capacidade antioxidante, com incrementos de 0,226 no fator de proteção a cada 0,01 g adicionado a 100 g de óleo. Esse incremento é menor que o relatado para a EPM, confirmando que a atividade antioxidante das poliaminas está diretamente relacionada ao número de grupamentos amino existentes na molécula (DROLET et al., 1986; LØVAAS, 1991; PAVLOVIC et al., 1992; SILLA-SANTOS, 1996; BELLÉ et al., 2004).

LØVAAS (1991) estudou a influência da adição de 2 mmol/L (0,029 g/100 g) de EPD em óleo de peixe bruto, analisado a 100 °C, obtendo o fator de proteção de 30,23, equivalente a 74,5 % do fator calculado para EPM nas mesmas condições. Pela equação, a mesma concentração da amina em óleo de soja a 110 °C, resulta em fator de proteção de 1,675, mostrando que existe diferença na ação antioxidante em diferentes matrizes, assim como ocorreu com a EPM.

Para 2 mmol/L (0,04 g/100 g) de EPM a 110 °C, o fator de proteção calculado a partir da equação apresentada na figura 10 foi de 2,248. A proporção entre os fatores de proteção nessa concentração e temperatura foi de 74,5 %, valor idêntico ao obtido por LØVAAS (1991), mesmo em matrizes e temperaturas de análise diferentes.

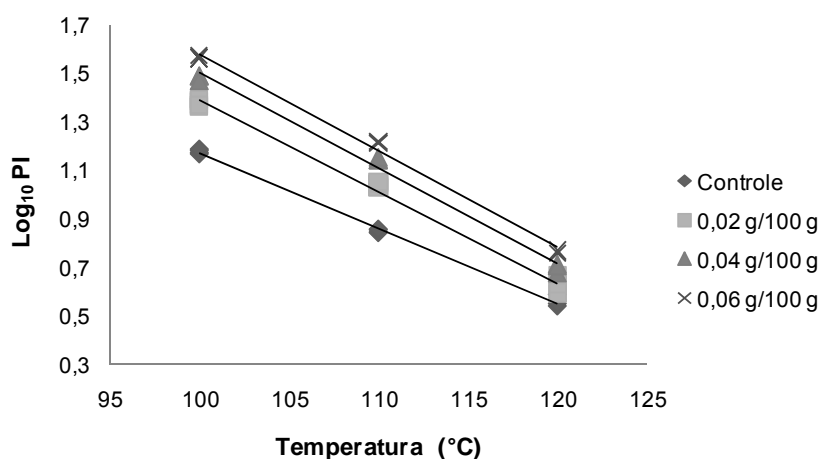
Por outro lado, MARQUEZ & AKASHE (2002) observaram que ao adicionar 3 mmoles de EPD em 5 mL de óleo de linhaça (aproximadamente 9,4 g/100 g) a 110 °C, foram obtidos os fatores de proteção de 4,11 e 2,90. Quando esses valores são comparados aos anteriormente citados para EPM, geram as proporções na ação antioxidante de EPD em relação a EPM de 68,5% e 72,5%, respectivamente. A

atividade antioxidante relativa EPM:EPD mais distante das citadas anteriormente foi obtida por LØVAAS (1991) a 70 °C em concentrado com 30% de ésteres metílicos dos ácidos eicosapentaenóico e docosahexaenóico, sendo esta de 61%.

Ao avaliar o potencial antioxidante da EPD, no Rancimat® a 110 °C, foi observado que as mangueiras que conduziam os voláteis para o recipiente de medição da condutividade ficaram amareladas.

#### 4.1.2.1. Predição da estabilidade oxidativa com adição de espermidina

A partir dos dados obtidos nas temperaturas de 100, 110 e 120 °C, para diferentes concentrações de EPD, foram construídas as curvas relacionando o logaritmo de PI com a temperatura (Figura 10).



**Figura 10.** Logaritmo do Período de Indução (PI) em função da temperatura para o óleo controle e três concentrações de espermidina adicionadas.

As equações que permitem extrapolar os resultados do teste acelerado para temperaturas de armazenamento do óleo sem antioxidante e na presença de EPD estão apresentadas na tabela 4 com os respectivos coeficientes de correlação e valores preditos para armazenamento a temperatura de 20 °C.

**Tabela 4.** Predição do período de armazenamento do óleo de soja a 20 °C estabilizado com diferentes teores de espermidina, com as equações e os respectivos coeficientes de correlação

Espermidina adicionada (g/100 g)	Equação	R <sup>2</sup>	Período de armazenamento a 20 °C (meses)
0*	$y = -0,0310x + 4,267$	0,996	6,2
0,02	$y = -0,0379x + 5,175$	0,993	36,3
0,04	$y = -0,0393x + 5,438$	0,991	62,3
0,06	$y = -0,0400x + 5,577$	0,995	83,2

\*Controle.

Ao observar as equações apresentadas na tabela, 4 é possível visualizar os coeficientes de temperatura sendo de  $-0,0310/^{\circ}\text{C}$  para o controle e variando com a concentração de EPD, sendo  $0,0379$ ;  $0,0393$  e  $0,0400/^{\circ}\text{C}$  para  $0,02$ ;  $0,04$  e  $0,06$  g/100 g, respectivamente. Nota-se que a variação para EPD ocorreu na terceira casa decimal e para a EPM somente na quarta casa, possivelmente pelas pequenas quantidades de EPM adicionadas ( $0,004$ ;  $0,008$ ; e  $0,012$  g/100 g).

Pelos valores preditos, o óleo adicionado de EPD a  $0,02$  g/100 g obteve uma vida de prateleira 5,9 vezes maior que a do controle; quando adicionado de  $0,04$  g/100 g, estabilidade esta de 10,1 vezes a do controle; e com  $0,06$  /100 g, de 13,5 vezes.

Verificou-se que o controle apresentou um coeficiente de temperatura diferente do relatado anteriormente no experimento com a EPM, que está mais próximo do obtido por FARHOOSH (2007). Como foi utilizado óleo de soja em momentos diferentes, esta alteração pode ser resultante do estado oxidativo do óleo, o que foi indicado pela menor estabilidade a  $20^{\circ}\text{C}$  de 3,8 meses na tabela 3 em relação à mostrada na tabela 4, de 6,2 meses.

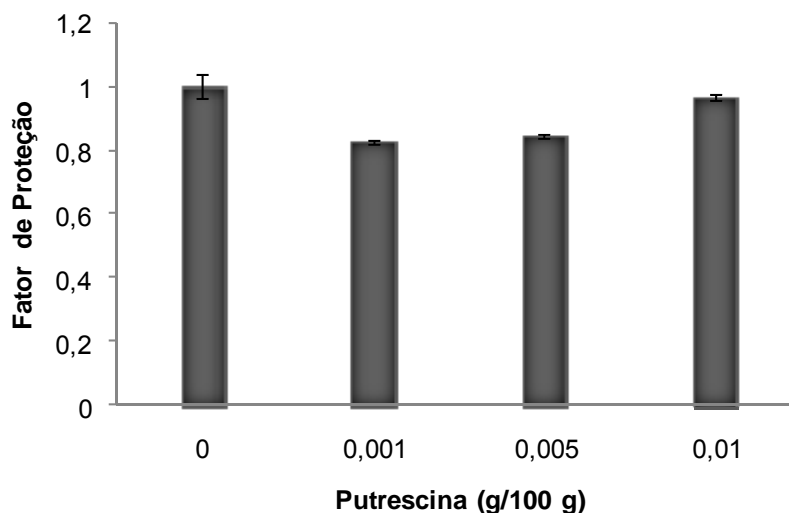
O valor  $Q_{10}$  para o óleo de soja, calculado a partir dos controles de todos os experimentos a  $100$ ,  $110$  e  $120^{\circ}\text{C}$ , foi de  $2,12 \pm 0,15$ , que está de acordo com o valor de 2,05 apresentado por FARHOOSH (2007).

#### 4.1.3. Putrescina

Ao analisar a PUT a  $100^{\circ}\text{C}$  as mangueiras de silicone que conduziam os voláteis ao recipiente no qual a condutividade é medida ficaram marrons proporcionalmente a quantidade de amina adicionada. Não foram encontrados relatos

na literatura sobre essa formação de cor bem como da degradação da amina com formação de composto colorido.

A análise foi realizada até o final, obtendo-se os períodos de indução para as amostras. Os fatores de proteção calculados para os três níveis adicionados de PUT e para o controle estão mostrados na figura 11.



**Figura 11.** Efeito da concentração de putrescina no fator de proteção do óleo de soja a 110 °C no Rancimat® .

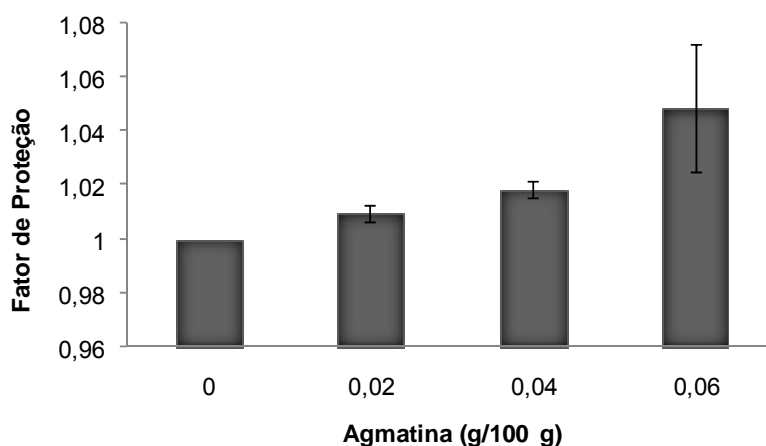
Conforme pode ser visualizado na figura 11, os fatores de proteção foram menores que um (1), mostrando que nessas condições, PUT atua como um pró-oxidante. Observa-se também que, com o acréscimo da amina, houve um aumento do fator de proteção, sugerindo que, em concentrações maiores, a PUT poderá atuar como antioxidante. De fato, MARQUEZ & AKASHE (2002), obtiveram fatores de proteção de 2,14 e 2,33 ao adicionar 5,7 g de PUT em 100 g óleo de linhaça a 110 °C.

Diferente do que foi relatado para o óleo de soja, LØVAAS (1991) mostrou, para a faixa de concentração de 0,001 a 0,01 g/100 g a 70 °C, o efeito antioxidante da PUT em concentrado contendo 30% de ésteres metílicos de ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexaenóico. Essa divergência de resultados pode estar relacionada à diferença entre as matrizes, além da possibilidade de degradação com a temperatura de 100 °C. No entanto, o efeito das matrizes na sua ação antioxidante não pôde ser avaliado, pois, em temperaturas mais baixas, as análises do óleo de soja resultariam

em períodos de indução muito longos, o que resultaria em baixa precisão (REYNHOUT, 1991; AOCS, 1992).

#### 4.1.4. Agmatina

Os fatores de proteção calculados para os três níveis adicionados de agmatina e para o controle estão apresentados na figura 12.



**Figura 12.** Efeito da concentração de agmatina no fator de proteção do óleo de soja a 110 °C no Rancimat® .

A AGM mostrou ação antioxidante bastante baixa em relação a EPD e EPD, conforme mostrado na tabela 5.

**Tabela 5.** Fatores de proteção obtidos para agmatina, espermidina e espermina em Rancimat® a 110°C

Concentração (g/100 g)	Fator de Proteção		
	Agmatina	Espermidina	Espermina
0,02	1,009	1,547	1,510
0,04	1,018	1,976	2,254
0,06	1,049	2,354	2,920

Uma vez que a capacidade antioxidante das aminas está relacionada ao número de grupamentos amino (DROLET et al., 1986; BELLÉ et al., 2004), esperava-se que a AGM, por possuir quatro (4) grupamentos, apresentasse um melhor desempenho como

antioxidante, como a EPM, que possui o mesmo número. Essa semelhança na capacidade antioxidante foi observada em concentrações de 0,01 a 1 mmol/L na redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerado por hiperglicemia em cultura de células mesangiais, que compõem a parede dos capilares glomerulares (LEE et al., 2003). No entanto, o resultado mostrado na tabela 5 é condizente com a capacidade das aminas em sequestrar radicais hidroxil, em que EPM>EPD>PUT>AGM (GLÓD & GRIEB, 2002).

A menor capacidade de AGM como antioxidante nas condições do presente trabalho não pode ser afirmada, uma vez que só foi encontrado no mercado o sal sulfato, diferente das outras aminas, que foram utilizadas como base livre. Então, sugere-se que seja avaliada a influência da disposição dos grupamentos amino das moléculas na capacidade antioxidante com as aminas em base livre.

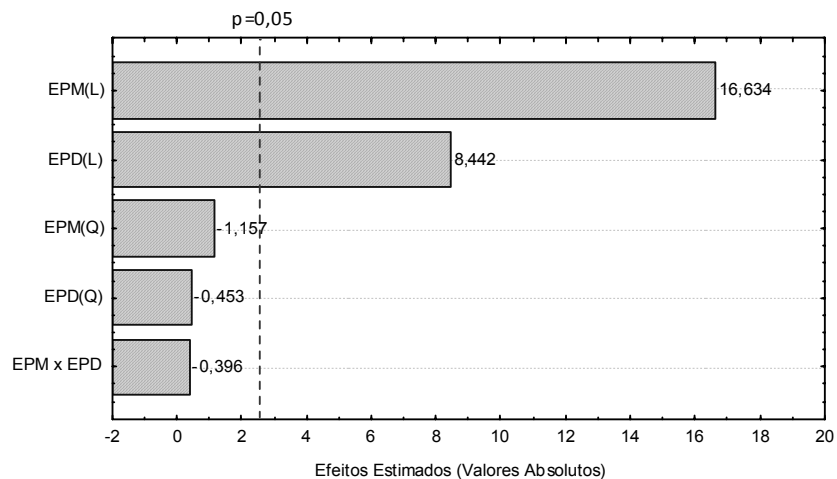
#### 4.1.5. Efeito sinergista

Na tabela 6 está apresentada a matriz do delineamento, com os valores de EPM e EPD utilizados e os resultados obtidos. Os fatores de proteção obtidos variaram de 1,64 a 2,58, quando os dois fatores foram empregados no nível mais baixo e mais alto, respectivamente.

**Tabela 6.** Ensaio realizados, valores codificados e originais das variáveis independentes e variável dependente para o delineamento composto central rotacional

Ensaio	Espermina	Espermidina	Espermina (g/100 g)	Espermidina (g/100 g)	Fator de Proteção
1	-1	-1	0,0100	0,0100	1,64
2	-1	1	0,0300	0,0100	1,97
3	1	-1	0,0100	0,0300	2,29
4	1	1	0,0300	0,0300	2,58
5	0	0	0,0200	0,0200	2,20
6	0	0	0,0200	0,0200	2,15
7	0	0	0,0200	0,0200	2,07
8	-1,41	0	0,0059	0,0200	1,68
9	1,41	0	0,0341	0,0200	2,47
10	0	-1,41	0,0200	0,0059	1,90
11	0	1,41	0,0200	0,0341	2,31

A partir desses resultados foram determinados os efeitos das variáveis e de sua interação sobre o fator de proteção, conforme apresentado no gráfico de Pareto (Figura 13). Os efeitos padronizados (valores de  $t_{\text{calc}}$ ) são as alturas das barras e o valor de  $t_{\text{tab}} = t_{(5,5\%/2)} = 2,57$  completou o diagrama, fornecendo o valor a partir do qual os efeitos são significativos.



**Figura 13.** Diagrama de Pareto com os efeitos estimados de espermina (EPM) e espermidina (EPD), bem como sua interação no fator de proteção em um modelo linear (L) e quadrático (Q).

Conforme pode ser visualizado no diagrama de Pareto, as amins EPM e EPD no modelo linear (L) influenciaram significativamente o fator de proteção ao nível de 5% de probabilidade, o que não ocorreu para os parâmetros quadráticos (Q). Esses efeitos mostram que a variação no fator de proteção em função da adição das amins analisadas em óleo de soja se ajusta ao modelo linear proposto.

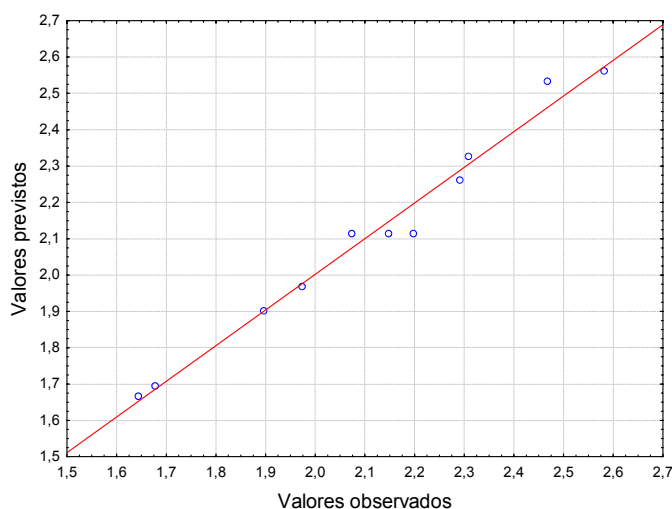
Na figura 14, observa-se que há uma distribuição aleatória entre os resíduos dos ensaios sugerindo resíduos independentes e que não há evidências de ausência de normalidade dos resíduos, satisfazendo às premissas do modelo.

A interação entre as amins EPM e EPD também não foi significativa. Esse dado mostra que não há efeito sinérgico na adição das duas amins na matriz avaliada, o óleo de soja.

Analisando as variáveis independentes significativas, nota-se que estas influenciaram positivamente a variável de resposta, confirmando a ação antioxidante desses compostos. É possível visualizar também que EPM possui o maior efeito observado, sendo este quase o dobro do efeito observado para EPD. Esses resultados confirmam ainda que a atividade antioxidante está relacionada com o número de



grupamentos amino (DROLET et al., 1986; PAVLOVIC et al., 1992; SILLA-SANTOS, 1996; LØVAAS, 1997; BELLÉ et al., 2004).



**Figura 14.** Valores observados versus valores previstos do fator de proteção para o óleo de soja adicionado de espermina e espermidina.

Os parâmetros estatisticamente não significativos a 5% de probabilidade foram eliminados do modelo e adicionados à falta de ajuste, conforme análise de variância mostrada na tabela 7.

**Tabela 7.** Análise de variância para o fator de proteção ignorando os termos espermina e espermidina no modelo quadrático, bem como sua interação

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F <sub>calculado</sub>
Regressão	2	0,8862	0,4431	213,8571
Resíduos	8	0,0166	0,0021	-
Falta de ajuste	6	0,0088	0,0015	-
Erro puro	2	0,0078	0,0039	-
TOTAL	10	0,9028	-	-

Resíduos = falta de ajuste + erro puro.  
 $F(2;8;0,05)=4,46$ .  
 $R^2=98,16$ .

O coeficiente de determinação fornece uma informação auxiliar para verificar se o modelo proposto é adequado ou não para descrever o fenômeno, relacionando-se à significância da falta de ajuste na análise de variância (RODRIGUES & IEMMA, 2005). O coeficiente obtido para a equação anterior foi de 98,59% que, após a retirada dos

termos não significativos, reduziu para 98,16%. Isto significa que 98,16% da variação na resposta são explicadas pelo aumento de EPM e EPD. Além disso, o  $F_{\text{calculado}}$  apresentou um valor 47,95 vezes maior que o valor tabelado, mostrando que a regressão foi significativa, comprovando que o modelo ajustado é adequado.

Após essas alterações, o modelo ajustado, que descreve as curvas de contorno e superfícies de resposta mostradas na figura 15 foi:

$$FP = 2,11 + 0,59*EPM + 0,30*EPD$$

sendo,

FP = Fator de proteção, EPM = Espermina e EPD = espermidina.

**Figura 15.** Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para o fator de proteção em função da concentração de espermina (EPM) e de espermidina (EPD).

Este modelo ajustado pode ser utilizado para predição do fator de proteção de EPM e EPD em óleo de soja, a 110 °C, no intervalo de 0,0059 a 0,0341 g/100 g. Para a faixa estudada não houve efeito sinérgico mas, como pode ser observado no modelo, a presença das duas aminas possui um efeito aditivo no óleo de soja.

Os resultados do presente estudo diferem dos relatados na patente de MARQUEZ & AKASHE (2002), para o óleo de linhaça, a 110 °C, com adição de um total de 3 mmoles em 5 mL de diferentes combinações de EPM, EPD e PUT, duas a duas. Essa diferença sugere que o efeito das aminas como antioxidante possui diferença para as diferentes matrizes, não podendo ser extrapolado para diferentes faixas e matrizes sem avaliação prévia.

Sugere-se que sejam feitas avaliações da possibilidade de efeito sinérgico entre as aminas em outras matrizes e também com outros antioxidantes para maior compreensão e discussão das diferenças entre os relatos.

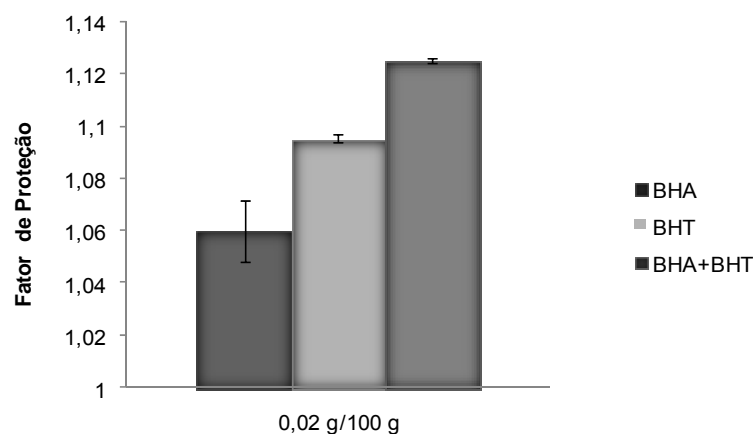
## **4.2. COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ESPERMIDINA E ESPERMINA COM A DE ANTIOXIDANTES TRADICIONAIS**

### **4.2.1. Antioxidantes sintéticos**

Foram calculados os fatores de proteção para o BHA e para o BHT, isoladamente e em conjunto na proporção de 1:1, nas concentrações de 0,01 a 0,06 g/100 g de óleo de soja.

Incrementos de 0,01 g/100 g dos antioxidantes nesse intervalo resultaram em variações médias nos fatores de proteção de 0,044 para a mistura de BHA e BHT, de 0,041 para o BHT e de 0,032 para o BHA, reafirmando o efeito sinérgico de BHA e BHT.

Na figura 16 estão apresentados os fatores de proteção e os desvios-padrão obtidos no limite máximo de BHA e BHT previsto em óleos e gorduras pela Resolução RDC nº 23, de 15 de fevereiro de 2005 (BRASIL, 2005).

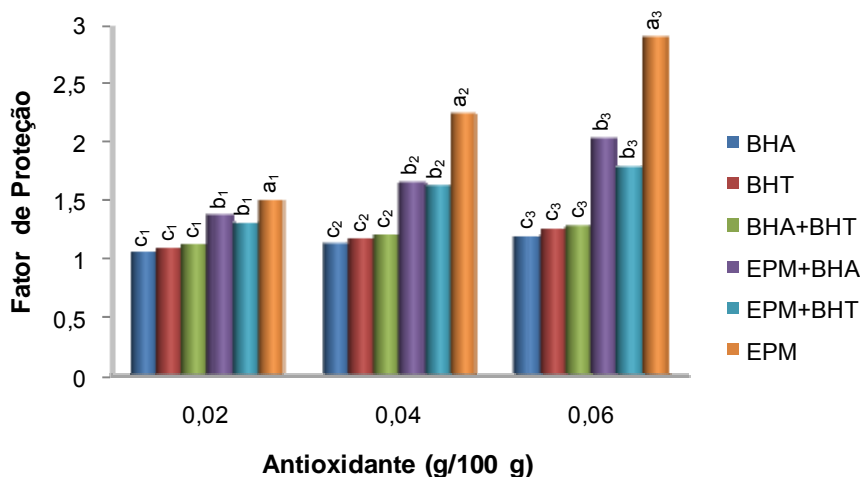


**Figura 16.** Fatores de proteção para o óleo de soja a 110 °C no Rancimat® na presença de BHA, BHT e da mistura destes na proporção 1:1.

Conforme foi visualizado, a capacidade antioxidante de BHT+BHA > BHT > BHA na concentração de 0,02 g/100 g em óleo de soja com os fatores de proteção bastante próximos (1,00; 0,97; e 0,94, respectivamente). A maior capacidade antioxidante de BHT em relação ao BHA também foi relatada por HOSEIN & ZINAB (2007) a 90 e 120 °C em Rancimat®; por TSAKNIS et al. (2002) em óleos submetidos a aquecimento intermitente, analisados em Rancimat® a 120 °C; e por ANWAR et al. (2006) por inibição da peroxidação de ácido linoléico. O contrário foi relatado por BERGER (1985), utilizando banha em Rancimat® a 120 °C; por SUN & HO (2005) em gordura suína no Rancimat® a 80 °C e em sistema de co-oxidação do beta-caroteno a 50 °C e por RODRIGUEZ et al. (1993) em Rancimat® no óleo de fígado de merluza.

BHA apresentou maior variabilidade nos resultados, indicada no gráfico pelo maior desvio padrão. Tal fato pode estar relacionado a uma menor estabilidade deste composto à temperatura, em relação ao BHT (HAMAMA & NAWAR, 1991). SANHUEZA et al. (2000) mostraram que, após 1 e 2 h de exposição a temperatura de 100 °C, houve, respectivamente, 22 e 33 % de inativação do BHA e de 11 e 15% do BHT. CRUZ et al. (2007) acrescentaram ainda que produtos de decomposição remanescentes (não voláteis) possuem atividade antioxidante mais baixa que os compostos iniciais. Conseqüentemente, a uma temperatura mais elevada (110 °C) e em tempos maiores (7,37 a 8,74 h), os diferentes níveis de degradação afetaram as respostas obtidas.

Os fatores de proteção obtidos para as concentrações de 0,02; 0,04 e 0,06 g/100 g das misturas de EPM, BHA e BHT (1:1), bem como para os antioxidantes individualmente estão mostrados na figura 17.



**Figura 17.** Fatores de proteção para o óleo de soja a 110 °C em Rancimat® na presença de BHA, BHT, EPM e suas misturas na proporção 1:1. Médias seguidas por letras distintas e mesmo número, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

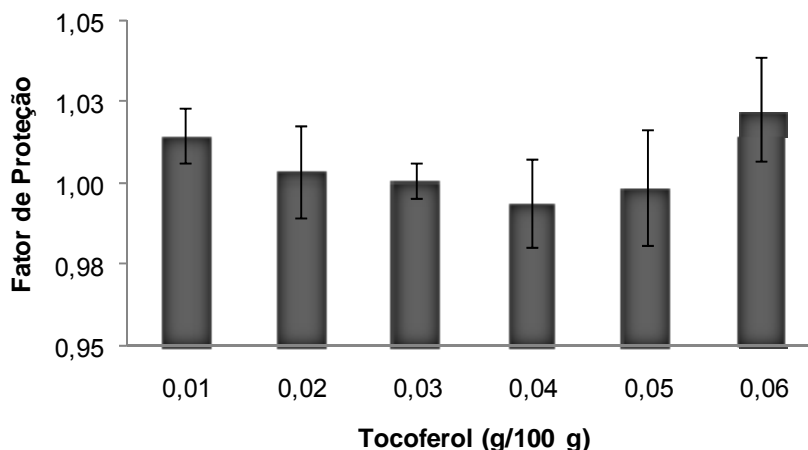
O efeito antioxidante da espermina foi significativamente maior que o de sua combinação com o BHA e com o BHT e esses maiores que BHA e BHT, juntos ou individualmente, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

O melhor desempenho da EPM, comparado a BHA, também foi verificado em Rancimat® a 100 °C por LØVAAS (1991), sendo que 2 mmol/L de BHA possui somente 3,6% da atividade antioxidante da mesma concentração molar da amina.

Por outro lado, FUJISAWA & KADOMA (2005) observaram que o número de radicais livres sequestrados por mol de antioxidante (*n*) foi maior para os antioxidantes BHA e BHT (próximos de 2), enquanto para as poliaminas variou de 0,1 a 0,7. P. SANTIAGO-SILVA. (comunicação pessoal, UFV, 2009) utilizaram a metodologia de sequestro de radicais livres DPPH• e também mostraram maior capacidade de BHA e BHT em sequestrar radicais em relação a EPM e EPD.

#### 4.2.2. Tocoferol

A partir das médias dos fatores de proteção calculados para tocoferol nas concentrações de 0,01 a 0,06 g/100 g foi construído o gráfico mostrado na figura 18.



**Figura 18.** Efeito da concentração de tocoferol no fator de proteção para o óleo de soja a 110 °C no Rancimat®.

Conforme pode ser visualizado graficamente, para este antioxidante, o Rancimat® a 110 °C gerou resultados com baixa reprodutibilidade. Pode ser observado que acima da concentração de 0,01 g/100 g houve redução da atividade antioxidante do tocoferol até 0,04 g/100 g. Tal fato é condizente com estudos de EVANS et al. (2002) que determinaram a concentração ótima para  $\alpha$ -tocoferol como antioxidante em óleo de soja sendo esta de 0,01 g/100 g, com redução da atividade antioxidante acima deste valor. Para a obtenção deste resultado, foram quantificados os dienos conjugados a 40, 50 e 60 °C, sendo o resultado mais notável com o aumento da temperatura.

RAMALHO & JORGE (2006b) adicionaram  $\alpha$ -tocoferol a óleo de soja previamente submetido à purificação com alumina para retirada de interferentes. Para as concentrações de 0,01 a 0,06 g/100 g a 100 °C, os referidos autores obtiveram fatores de proteção entre 5,52 e 16,04. Estes valores são maiores que os apresentados na figura 18, possivelmente, devido a diferenças entre os extratos e as matrizes, quanto à eliminação de interferentes; além do risco de degradações térmicas dos componentes antioxidantes uma vez que a análise foi realizada em temperatura mais elevada.

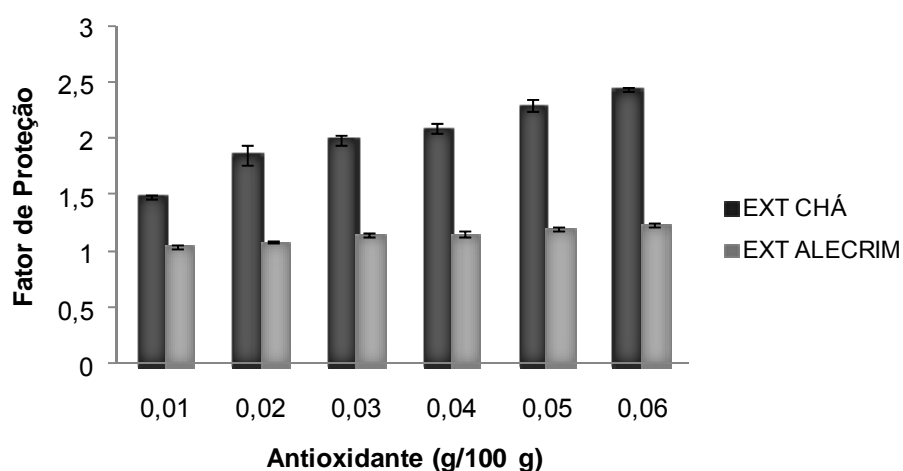
O  $\alpha$ -tocoferol e outros antioxidantes foram avaliados por CARELLI et al. (2005) a 98 °C em Rancimat® e em estufa a 30, 68 e 130 °C. Em estufa, o tocoferol mostrou-se mais efetivo, o oposto do que ocorreu no Rancimat®. Esse dado mostra que a efetividade de cada antioxidante é dependente da temperatura e do método de ensaio.

Em Rancimat® a 110 °C foi obtido o fator de proteção de  $5,35 \pm 0,13$  para  $\alpha$ -tocoferol a 0,01 g/100 g de triglicerídeos de óleo de colza, purificados em coluna cromatográfica, reforçando a possibilidade de ocorrência de interferentes e não a de degradação térmica. Porém, nada pode ser confirmado, pois se tratam de matrizes diferentes (NOGALA-KALUCKA et al., 2005).

A fim de confirmar essas possibilidades e entender melhor a ação desse antioxidante nesta matriz, são necessárias análises do tocoferol a mesma temperatura no óleo purificado e não purificado.

### 4.2.3. Extratos

A partir das médias dos fatores de proteção calculados para os extratos de chá verde e de alecrim nas concentrações de 0,01 a 0,06 g/100 g foi obtido o gráfico mostrado na figura 19.



**Figura 19.** Efeito do aumento da concentração dos extratos antioxidantes no fator de proteção para o óleo de soja a 110 °C no Rancimat®.

O extrato de chá verde foi mais efetivo como antioxidante no óleo de soja do que o extrato de alecrim. Foram observados, em média, incrementos de 0,185 no fator de proteção a cada incremento de 0,01 g de extrato de chá em 100 g de óleo de soja. Já o extrato de alecrim gerou incrementos de 0,039 em média para a mesma variação na concentração. Maior efetividade do extrato de chá verde frente ao de alecrim também

foi observada por CHEN et al. (1998) a 0,01 g/100 g de óleo de canola, banha de porco e gordura de galinha por meio de medidas do consumo de oxigênio.

Para a concentração de 0,06 g/100 g foi obtido o fator de proteção de  $1,24 \pm 0,02$ , próximo de 1,18, valor obtido por COIMBRA et al. (2007) para extrato de alecrim comercial na mesma matriz e concentração a 100 °C.

Em óleo de soja a 100 °C, previamente purificado com alumina, adicionado de extrato de alecrim nas concentrações de 0,01; 0,03 e 0,05 g/100 g foram observados fatores de proteção de 1,40; 3,52 e 6,17, respectivamente (RAMALHO & JORGE, 2006b). Estes valores são maiores que os indicados na figura 19, indicando a possível interferência de outros compostos na ação antioxidante do extrato. Porém, deve-se considerar também a possibilidade de degradação dos componentes antioxidantes do extrato, uma vez que a análise ocorreu a 110 °C.

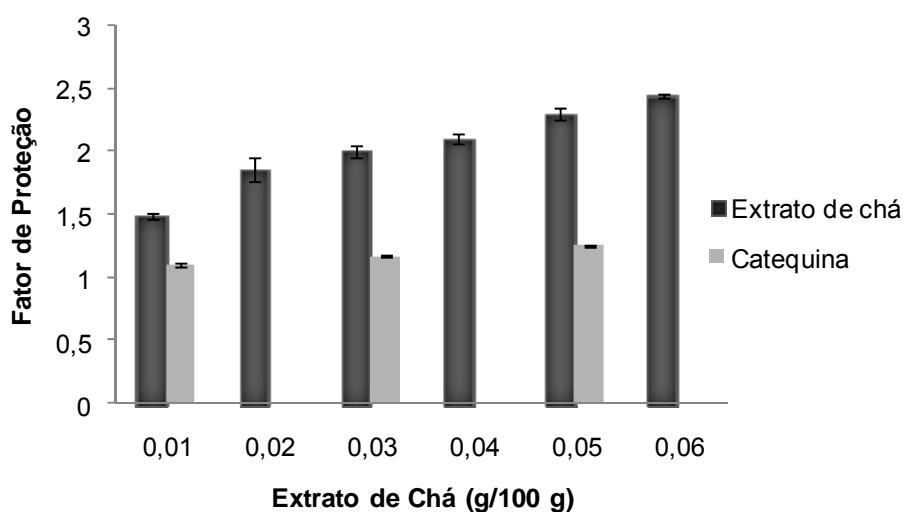
ALMEIDA-DORIA & REGITANO-D'ARCE (2000) avaliaram a ação antioxidante de extrato de alecrim em óleo de soja submetido a testes de oxidação acelerada em estufa a  $63 \pm 1^\circ\text{C}$ , comparando-o com a mistura de BHA e BHT. Verificou-se que o extrato etanólico de alecrim retardou a oxidação do óleo, sendo tão efetivo à 0,05 g/100 g quanto a mistura BHA + BHT (1 + 1) a 0,02 g/100 g. Já o extrato comercial de alecrim utilizado no presente estudo foi tão efetivo 0,03 g/100 g, quanto a mistura BHA + BHT (1 + 1) na concentração de 0,02 g/100 g.

Triglicerídeos de óleo de colza foram analisados em Rancimat® e por oxidografia a 110 °C com adição de extrato de alecrim, previamente seco e triturado a 0,05 g/100 g. Os fatores de proteção obtidos foram  $9,06 \pm 0,53$  e  $9,07 \pm 0,90$  para os dois métodos, respectivamente, sendo superiores aos obtidos no presente estudo para a mesma concentração no óleo de soja a 110 °C em Rancimat ® (NOGALA-KALUCKA et al., 2005).

Para melhor visualização da ação da catequina individualmente e no extrato, foi gerado o gráfico abaixo (Figura 20) com os dados obtidos para o chá verde e os de catequina referentes às mesmas concentrações contidas no extrato.

Para um aumento de 0,01 g de extrato de chá em 100 g de óleo de soja, foram observados, em média, incrementos de 0,185 no fator de proteção, frente a incrementos de 0,038 para a catequina em concentrações equivalentes às presentes no extrato.





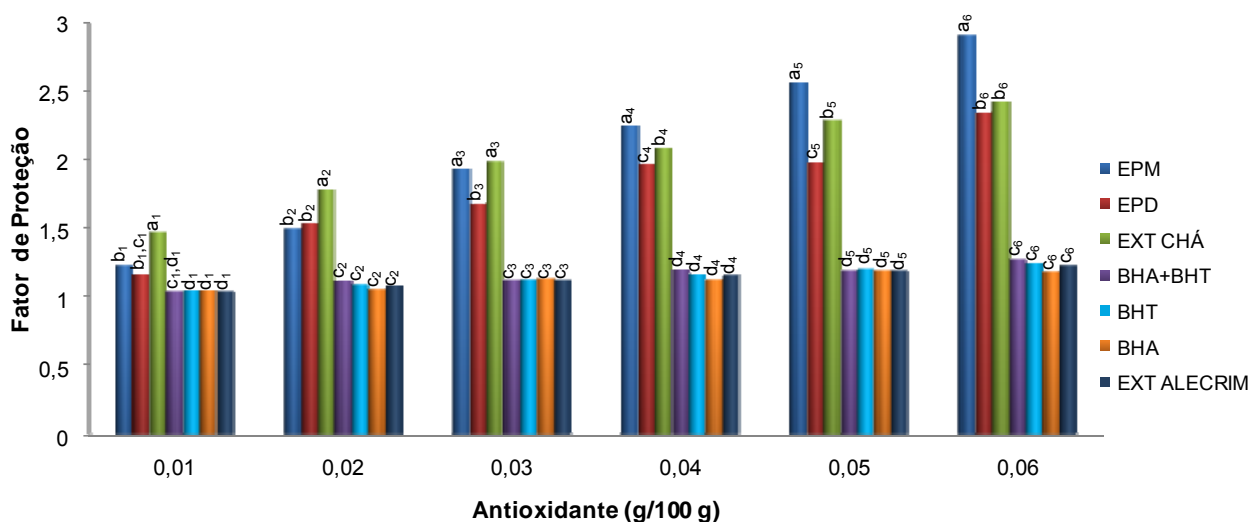
**Figura 20.** Efeito do extrato de chá verde e da catequina nos teores equivalentes aos contidos no extrato no fator de proteção para o óleo de soja a 110 °C no Rancimat® .

Fica claro nesse gráfico, que nem toda ação antioxidante do extrato é devido a catequina. Ou seja, é possível que existam outros componentes antioxidantes atuando de forma aditiva ou sinérgica com a mesma.

#### 4.2.4. Comparação da atividade antioxidante de todos os compostos investigados

Para melhor visualização da comparação de antioxidantes, os resultados foram dispostos na figura 21, agrupados pelas concentrações utilizadas. Observa-se que o extrato de chá verde mostrou-se mais efetivo nas concentrações de 0,01 e 0,02 g/100 g , seguido de EPM e EPD, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Quando se utilizou a concentração 0,03 g/100 g, o extrato manteve-se o mais efetivo, juntamente com a EPM, seguidos da EPD. A amina EPM foi o antioxidante mais efetivo a 0,04; 0,05 e 0,06 g/100 g. O extrato de alecrim e os antioxidantes BHA e BHT, juntos ou individualmente, mostraram menor efeito antioxidante em todas as concentrações avaliadas, não diferindo significativamente entre si.

Porém, em todo o intervalo estudado verificou-se que acréscimos iguais dos antioxidantes produzem incrementos maiores na resposta de EPM.



**Figura 21.** Comparação das médias dos fatores de proteção obtidos para espermina (EPM), espermidina (EPD), extrato de chá verde, extrato de alecrim, BHA, BHT e BHA:BHT (1:1) em concentrações de 0,01 a 0,06 g/100 g em óleo de soja no Rancimat®. Médias seguidas por letras distintas e mesmo número, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Um melhor desempenho de EPM frente a outros antioxidantes também foi relatado por LØVAAS (1991), em análises a 100 °C em óleo de peixe bruto, com 20% de insaturados, quando comparada a BHA,  $\alpha$ -tocoferol, palmitato de ascorbila, e etoxiquinina. EPM, em óleo de peixe a 100 °C, foi 30 vezes mais eficiente que  $\alpha$ -tocoferol, e 3,6 vezes mais eficiente que etoxiquinina.

P. SANTIAGO-SILVA (comunicação pessoal, UFV, 2009) compararam a atividade das aminas EPM e EPD com BHA, BHT, galato de propila, tocoferol, extratos de chá verde e de alecrim utilizando o teste do radical N,N-dimetil-p-fenilenediamina, ou DPD, em extratos e filmes de base celulósica. Neste método foi medida a capacidade dos compostos antioxidantes transferirem um átomo de hidrogênio para o cátion radical DPD•+, causando uma descoloração da solução proporcional à sua concentração (SÁNCHEZ-MORENO, 2002). Foi observado que EPD e EPM atuaram sequestrando radicais livres, sendo mais efetivas que os demais antioxidantes testados nos filmes, mas não para os extratos. Ocorreu, portanto, uma melhor transferência das poliaminas do filme para a solução que é eletrolisada em relação aos outros compostos avaliados, o que as torna potenciais antioxidantes em filmes.

Conclui-se que as poliaminas aqui avaliadas são efetivos antioxidantes, demonstrando maior atividade em relação a diversos compostos avaliados. Uma vez que são solúveis em fase orgânica e aquosa (LØVAAS, 1997), estudos com emulsões

são necessários para possibilitar discussão de sua ação em uma maior variedade de alimentos.

### **4.3. DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE POLIAMINAS NO ÓLEO DE SOJA E NOS EXTRATOS**

Não foi verificada a presença de aminas nas amostras de óleo de soja do presente estudo, bem como relatado por BATISTA (2007), assegurando que inicialmente o óleo não continha as aminas a serem avaliadas.

No extrato de alecrim as aminas não foram detectadas, e somente A EPD foi encontrada no extrato de chá verde. Para a avaliação do seu teor nesse extrato construiu-se a curva analítica na faixa de 0,2 a 2,5 µg/mL.

Para obter a equação relacionando as áreas obtidas por CLAE com a concentração de EPD, os dados foram submetidos inicialmente ao teste de resíduos padronizados. O diagnóstico de valores extremos permitiu tratar pontos que afetavam claramente o ajuste ao modelo.

O coeficiente de correlação de Ryan Joiner foi de 0,9844, demonstrando distribuição normal dos resíduos da regressão ( $p > 0,10$ ). A estatística t de Levene, não significativa ( $p > 0,05$ ), confirmou a homoscedasticidade. A independência dos resíduos da regressão foi indicada pela estatística de Durbin Watson ( $p > 0,10$ ). Alta significância da regressão ( $p < 0,001$ ) e desvio da linearidade não significativo ( $p > 0,05$ ) foram observados para a curva, confirmando ajuste ao modelo linear na faixa estudada. A equação obtida concentrações de 0,2 a 2,5 µg/mL foi  $y = 1689656 x + 3811$ , com coeficiente de determinação de 0,9937.

Foi observado o teor de EPD de  $1,08 \pm 0,07$  µg/g de extrato de chá verde. Logo, quando se adiciona o extrato na concentração de 0,01 g/100 g de óleo, nível mais baixo analisado, tem-se um teor de EPD de 0,0108 µg/100 g de óleo, equivalente a 0,75 nmol/L. Este valor é bastante baixo em relação ao teor 0,02 g/100 g permitido de antioxidantes tradicionais, como o BHA e o BHT (BRASIL, 2005), mas não está distante da faixa de concentrações de EPM como antioxidante patenteada por TAKLE & MOERKOERE (2008), variando de 1 a 2000 nmol/L, preferencialmente entre 10 e 1000 nmol/L.

Conforme visualizado na figura 20 (item 4.2.3), a atividade antioxidante do extrato não foi somente devido à presença dos 20% de catequina, podendo ser investigado efeito sinérgico entre catequina e EPD.

Outro fato a ser estudado é a possibilidade de preservar as poliaminas durante as etapas de produção do extrato, uma vez que estão presentes nas folhas de *C. sinensis*. A EPM, que apresentou maior capacidade antioxidante no presente estudo, é a poliamina predominante nas folhas de chá verde. Nos estudos de PALAVAN-UNSAL et al. (2007), inicialmente o teor de EPM era de cerca de 115 nmol/g de peso fresco em folhas (23 µg/g) e cerca de 35 nmol de EPD (5 µg/g). A EPD aumentou para cerca de 75 nmol/g (11 µg/g) nas folhas após o rolamento e reduziu para cerca de 10 nmol/g (1,5 µg/g) no chá seco.

## 5. CONCLUSÕES

- As poliaminas espermidina, espermina e agmatina foram capazes de aumentar a estabilidade oxidativa do óleo de soja nas diferentes concentrações avaliadas. Já a putrescina mostrou-se prooxidante nas condições em que foi estudada.
- A espermina apresentou maior atividade antioxidante que a espermidina, em Rancimat®. Estas duas aminas, quando associadas, não mostraram efeito sinérgico como antioxidantes.
- A espermina e a espermidina mostraram-se mais efetivas que BHA, BHT, BHA+BHT, tocoferol e extrato de alecrim em concentrações entre 0,01 e 0,06 g/100 g, sendo mais efetivas que o extrato de chá verde nas concentrações de 0,04 a 0,06 g/100 g.
- As poliaminas mostraram-se efetivos antioxidantes com potencial de uso em alimentos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIOVE - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS. Disponível em:< <http://www.abiove.com.br>>. Acesso em: 02 de abr. 2009.
- ALMEIDA-DORIA, R.F.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 20, p. 1-14, 2000.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *Boletim CEPPA*, v. 24, p. 319-336, 2006.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, v. 127, p. 183-198, 2002.
- ANTONIASSI, R. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. *Boletim CEPPA*, v. 19, p. 353-380, 2001.
- ANWAR, F.; BHANGER, M.I.; KAZI, T.G. Relationship between Rancimat and Active Oxygen Method values at varying temperatures for several oils and fats. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 80, p. 151-155, 2003.
- ANWAR, F.; JAMIL, A.; IQBAL, S.; SHEIKH, M.A. Antioxidant activity of various plant extracts under ambient and accelerated storage of sunflower oil. *Grasas y Aceites*, v. 57, p. 189-197, 2006.
- AOCS (American Oil Chemists' Society). Method Cd 12b-92. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society, 5<sup>th</sup> edition. Champaign, IL: AOCS, 1992.
- ARAÚJO, J.M.A. *Química de Alimentos: teoria e prática*. 3. Ed. Viçosa: UFV, 2004. 478 p.
- BANNWART, G. C. M. de C.; TOLEDO, M. C. de F. Aspectos toxicológicos dos antioxidantes BHA, BHT eTBHQ. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 33, p.245-255, 1999.
- BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends in Food Science and Technology*, v. 6, p. 341-346, 1995.
- BARDÓCZ, S.; GRANT, G.; BROWN, D.S.; RALPH, A.; PUSZTAL, A. Polyamines in food – implications for growth and health. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 4, p. 66-71, 1993.
- BASAGA, H.; TEKKAYA, C.; ACIKEL, F. Antioxidative and free radical scavenging properties of rosemary extract. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, v. 30, p. 105-108, 1997.

- BATISTA, C.K.B. Caracterização de pacientes e de dietas enterais artesanais de centros de alta complexidade em oncologia quanto aos teores de poliaminas. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia, UFMG. 2007. 100p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- BELLÉ, N.A.; DALMOLIN, G.D.; FONINI, G.; RUBIN, M.A.; ROCHA, J.B.T. Polyamines reduce lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. *Brain Research*, v. 1008, p. 245-251, 2004.
- BERGER, K.G. Additives for quality maintenance. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 62, p. 434-437, 1985.
- BORREL, A.; CARBONELL, L.; FARRÀS, R.; PUIG-PARELLADA, P.; TIBURCIO, A.F. Polyamines inhibit lipid peroxidation in senescing oat leaves. *Physiologia Plantarum*, v. 99, p. 385-390, 1997.
- BOYD, L.C.; NWOSU, V.C.; YOUNG, C.L.; MACMILLIAN, L. Monitoring lipid oxidation and antioxidant effects of phospholipids by headspace gas chromatographic analyses of Rancimat trapped volatiles. *Journal of Food Lipids*, v. 5, p. 269-282, 1998.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N° 23, de 15 de fevereiro de 2005. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 15 de fevereiro de 2005. Aprova o “regulamento técnico do uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos óleos e gorduras – subcategoria creme vegetal e margarinas”.
- BRINK, B.T.; DAMINK, C.; JOOSTEN H.M.L.J.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 11, p. 73-84, 1990.
- CARELLI, A.A.; FRANCO, I.C.; CRAPISTE, G.H. Effectiveness of added natural antioxidants in sunflower oil. *Grasas y Aceites*, v. 56, p. 303-310, 2005.
- CHEN, Z.; WANG, L.; CHAN, P.T.; ZHANG, Z.; CHUNG, H.Y.; LIANG, C. Antioxidative activity of green tea catechin extract compared with that of rosemary extract. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 75, p. 1141-1145, 1998.
- CHEN, Z.Y.; CHAN, P.T. Antioxidative activity of green tea catechins in canola oil. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 82, p. 163-172, 1996.
- CHOE, E.; MIN, D.B. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 5, p. 169-186, 2006.
- CHOI, S.W.; LEE, S.K.; KIM, E.O.; OH, J.H.; YOON, K.S.; PARRIS, N.; HICKS, K.B.; MOREAU, R.A. Antioxidant and antimelanogenic activities of polyamine conjugates

- from corn bran and related hydroxycinnamic acids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 55, p. 3920-3925, 2007.
- COIMBRA, M.C.; BRUNO, F.; GALLO, F.; CARRETA, R.; COSTA, R.B.; DEL RÉ, P.V.; JORGE, N. Aplicação de extrato de alecrim em óleo de soja e sua relação com o perfil lipídico *in vivo*. *Alimentos e Nutrição*, v. 18, p. 309-314, 2007.
- COPPIN, E.A.; PIKE, O.A. Oil stability index correlated with sensory determination of oxidative stability in light-exposed soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 78, n. 1, p. 13-18, 2001.
- CRUZ, J.M.; CONDE, E.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J.C. Thermal stability of antioxidants obtained from wood and industrial wastes. *Food Chemistry*, v. 100, p. 1059-1064, 2007.
- DAS, K.C.; MISRA, H.P. Hydroxyl radical scavenging and singlet oxygen quenching properties of polyamines. *Molecular and Cellular Biochemistry*. v. 262, p. 127-133, 2004.
- DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica*, v. 5, p. 33-40, 2004.
- DELOYER, P.; PEULEN, O.; DANDRIFOSSE, G. Dietary polyamines and no neoplastic growth and disease. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 13, p. 1027-1032, 2001.
- DEUTSCH, A.W.; MITCHELL, C.D.; WILLIAMS, C.E.; DUTT, K.; SILVESTROV, N.A.; KLEMENT, B.J.; ABUKHALAF, I.K.; DEUTSCH, D.A. Polyamines protect against radiation-induced oxidative stress. *Gravitational and Space Biology*, v. 18, n. 2, p. 109-110, 2005.
- DROLET, G.; DUMBROFF, E.B.; LEGGE, R.L.; THOMPSON, J.E. Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry*, v. 25, n. 2, p. 367-371, 1986.
- ELIASSEN, K.A.; REISTAD, R.; RISØEN, U.; RØNNING, H.F. Dietary polyamines. *Food Chemistry*, v. 78, p. 273-280, 2002.
- EVANS, J.C.; KODALI, D.R.; ADDIS, P.B. Optimal tocopherol concentrations to inhibit soybean oil oxidation. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 79, p. 47-51, 2002.
- FARHOOSH, R. The effect of operational parameters of the Rancimat method on the determination of the oxidative stability measures and shelf-life prediction of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 84, p. 205-209, 2007.



- FARRIOL, M.; VENEREO, Y.; ORTA, X.; COMPANY, C.; GÓMEZ, P.; DELGADO, G.; RODRÍGUEZ, R. Ingesta de antioxidantes y poliaminas en pacientes con quemaduras graves. *Nutrición Hospitalaria*, v. 19, p. 300-304, 2004.
- FEREIDOOON, S.; WANASUNDARA, U.N. Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B. *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biochemistry*. Boca Raton: CRC Press, 2002. 1005p.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, p. 61-68, 1997.
- FRANKEL, E.N.; HUANG, S.; AESCHBACH, R. Antioxidant activity of green teas in different lipid systems. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 74, p. 1309-1315, 1997.
- FRANKEL, E.N.; HUANG, S.W.; AESCHBACH, R.; PRIOR, E. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol and rosmarinic acid in bulk oil and oil-in-water emulsion. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 44, p. 131-135, 1996.
- FRANKEL, E.N.; HUANG, S.W.; KANNER, J.; GERMAN, J.B. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 42, p. 1054-1059, 1994.
- FUJISAWA, S.; KADOMA, Y. Kinetic evaluation of polyamines as radical scavengers. *Anticancer Research*, v. 25, p. 965-970, 2005.
- GARCIA-MESA, J.A.; CASTRO, M.D.L.; VALCARCEL, M. Factors affecting the gravimetric determination of the oxidative stability of oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 70, p. 245-247, 1993.
- GASTELL, P.L.P.; ALEJO, J.L.P. Métodos para medir el dano oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*, v. 29, p. 192-198, 2000.
- GLÓD, B.K; GRIEB, P. Modified analytical method for hydroxyl radicals using spin trapping and ion exclusion chromatography. *Chemical Analysis (Warsaw)*, v. 47, p. 399-407, 2002.
- GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines. In: HUI, H; NOLLET, L.L. *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*. Marcel Dekker, v. 4, p. 1-38, 2005.
- GORDON, M.H. The development of oxidative rancidity in foods. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA-MASLAROVA, N.V.; GORDON, M.H. *Antioxidants in food – practical applications*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2001. 380 p. (Versão digital em: [www.woodhead-publishing.com](http://www.woodhead-publishing.com)).

- HA, H.C.; SIRISOMA, N.S.; KUPPUSAMY, P.; ZWEIER, J.L.; WOSTER, P.M.; CASERO Jr, R.A. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, p. 11140-11145, 1998.
- HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*, v. 5, p. 42-49, 1994.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, v. 219, p. 1-14, 1984.
- HAMAMA, A.A.; NAWAR, W.W. Thermal decomposition of some phenolic antioxidants. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 39, p. 1063-1069, 1991.
- HASENHUETTL, G.; WAN, P.J. Temperature effects on the determination of oxidative stability with Methrom Rancimat . *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 69, p. 525-527, 1992.
- HILL, S.E.; PERKINS, E.G. Determination of oxidation stability of soybean oil with the Oxidative Stability Instrument: operation parameter effects. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 72, p. 741-743, 1995.
- HILLARY, R.A.; PEGG, A.E. Descarboxylases involved in polyamine biosynthesis and their inactivation by nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Acta*, v. 1647, p. 161-166, 2003.
- HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. *Pure Applied Chemistry*, v. 67, p. 331-343, 1995.
- HOSEIN, K.H.M.; ZINAB, D. Phenolic compounds and antioxidant activity of henna leaves extracts (*Lawsonia inermis*). *World Journal of Dairy & Food Sciences*, v. 2, p. 38-41, 2007.
- HUDSON, B.J.F.; GORDON, M.H. Evaluation of oxidative rancidity techniques. In: ALLEN, J.; HAMILTON, R.J. *Rancidity in Foods*. Springer: London, 1994. 290p.
- ITO, N.; FUKUSHIMA, S.; TSUDA, H. Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT, and other antioxidants. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 15, p. 109-150, 1985.
- ITO, N.; HIRISO, M.; FUKUSHIMA, S.; TSUDA, H.; SHIRAI, T.; TATEMATSU, M. Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food Chemistry and Toxicology*, v. 24, p. 1071-1082, 1986.
- ITO, N.; HIROSE, M. Antioxidants - carcinogenic and chemopreventive properties. *Advances in Cancer Research*, v. 23, p. 247-302, 1989.

- JADHAV, S.J.; NIMBALKAR, S.S.; KULKARNI, A.D.; MADHAVI, D.L.; RAJALAKSHMI, D.; NARASIMHAN, S. In: MADHAVI D.L.; DESHPANDE, S.S.; SALUNKHE, D.K. Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives. Marcel Dekker Inc.: New York, 1996, 490 p.
- JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Disponível em <http://www.codexalimentarius.net/jecfa.stm>. Acesso em 05 fev. 2009.
- KALAC, P.; KRÍZEK, M.; PELICANOVÁ, T.; LANGOVÁ, M.; VESKRNA, O. Contents of polyamines in selected foods. Food Chemistry, v. 90, p. 561-564, 2005.
- KALAC, P.; KRAUSOVÁ, P.A. A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in foods. Food Chemistry, v. 90, p. 219-230, 2005.
- KAYA, A.; TEKIN, A.R.; ÖNER, M.D. Oxidative stability of sunflower oil and olive oils: comparison between a modified oxygen method and long term storage. Lebensmittel Wissenschaft Technologie, v. 26, p. 464-468, 1993.
- KHAN, A.U.; MEI, Y.; WILSON, T. A proposed function for spermine and spermidine: protection of replicating DNA against damage by singlet oxygen. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 89, p. 11426-11427, 1992.
- KOLAKOWSKA, A. Lipid Oxidation in Food Systems. In: SIKORSKI, Z.E.; KOLAKOWSKA, A. Chemical and Functional Properties of Food Lipids. Boca Raton: CRC PRESS, 2003. (Versão digital em: [www.crcpress.com](http://www.crcpress.com)).
- KUMAR, A.; ALTABELLA, T.; TAYLOR, M.A.; TIBURCIO, A.F. Recent advances in polyamine research. Trends in Plant Science, v. 2, p. 124-130, 1997.
- LARQUÉ, E.; SABATER-MOLINA, M.; ZAMORA, S. Biological significance of dietary polyamines. Nutrition, v. 23, p. 87-95, 2007.
- LÄUBLI, M.W.; BRUTTEL, P.A. Determination of the oxidative stability of fats and oils: comparison between the Active Oxygen Method (AOCS Cd12-57) and the Rancimat method. Journal of the American Oil Chemist's Society, v. 63, p. 792-795, 1986.
- LEE, G.T.; HA, H.; LEE, H.C.; CHO, Y.D. Agmatine reduces hydrogen peroxide in mesangial cells under high glucose conditions. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, v. 36, p. 251-257, 2003.
- LIMA, A.S.; GLÓRIA, M.B.A. Aminas bioativas em alimentos. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 33, p. 70-79, 1999.
- LINDEMOSE, S.; NIESEN, P.E.; MOLLEGARD, N.E. Polyamines preferentially interact with bent adenine tracts in double-stranded DNA. Nucleic Acids Research, v. 33, p. 1790-1803, 2005.

- LÖSER, C. Polyamines in human and animal milk. *British Journal of Nutrition*, v. 84, p. S55-S58, 2000.
- LØVAAS, E. Antioxidative and metal chelating effects of polyamines. *Advances in Pharmacology*, v. 38, p. 119-149, 1997.
- LØVAAS, E. Antioxidative effects of polyamines. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 68, p. 353-358, 1991.
- LØVAAS, E. Hypothesis: spermine may be an important epidermal antioxidant. *Medical Hypotheses*, v. 5, p. 59-67, 1995.
- LØVAAS, E.; CARLIN, G. Spermine: an anti-oxidant and anti-inflammatory agent. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 11, p. 455-461, 1991.
- LUNDBERG, W.O. Mechanisms. In: SCHULTZ, H.W.; DAY, E.A.; SINNHUBER, R.O. *Lipids and their oxidation – Symposium on foods*. Connecticut: AVI, 1962. 442p.
- MACCARRONE, M.; BARONI, A.; FINAZZI-AGRO, A. Natural polyamines inhibit soybean (*Glycine max*) lipoxygenase-1, but not the lipoxygenase-2 isozyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 356, p. 35-40, 1998.
- MADSEN, H.L.; BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*, v. 6, p. 271-277, 1995.
- MARQUEZ, M.; AKASHE, A. Method for inhibiting oxidation of polyunsaturated lipids. United States Patent 6428461. 06 ago. 2002. 9p.
- MATKOVICS, B.; KECSKEMETI, V.; VARGA, S.Z.I.; NOVAK, Z.; KERTESZ, Z.S. Antioxidant properties of di- and polyamines. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 104, p. 475-479, 1993.
- MEDINA, M.A.; URDIALES, C.R.; RORÍGUEZ-CASO, C.; RAMIREZ, F.J.; SANCHÉZ-JIMÉNEZ, F. Biogenic amines and polyamines: similar biochemistry for different physiological missions and biochemical applications. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 38. p. 23-59, 2003.
- METROHM. Application Bulletin AB-232. Determination of the antioxidant activity by the Racimat method. Disponível em [www.products.metrohm.com/applications](http://www.products.metrohm.com/applications). Acesso em 01 out. 2008.
- MIN, D.B.; LEE, H. Chemistry of lipid oxidation. In: McDONALD, R.E.; MIN, D.B. *Food lipids and health*. New York: Marcel Dekker, 1996. 473p.
- MIRDEHGHAN, S.H.; RAHEMI, M.; SERRANO, M.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ-ROMERO, D.; VALERO, D. The application of polyamines by pressure or immersion as a tool to maintain functional properties in stored pomegranate arils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 55, p. 755-760, 2007.

- MITCHELL, J.L.A. Regulation of polyamine metabolism. In: WALLACE, H.M.; HUGHE, A. (Ed.) COST action 922 – Health implications of dietary amines. Louxembourg: European Communities, v.1, p. 89-100, 2004.
- MOINARD, C.; CYNOBER, L.; BANDT, J.P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition*, v. 24, p. 184-197, 2005.
- MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 1655-1666, 2009.
- MORET, S.; SMELA, D.; POPULIN, T.; CONTE, L.S. A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. *Food Chemistry*, v. 89, p. 355-361, 2005.
- MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.J.; DOMÍNGUEZ, M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M.J.; PARAJÓ, J.C. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, v. 72, p. 145-171, 2001.
- NAWAR, W.W. Biochemical processes: lipid instability. In: TAUB, I.A.; SINGH, R.P. *Food Storage Stability*. Washington: CRC Press, 1998. 539p.
- NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O.R. *Food Chemistry*. 3 ed. New York: Marcel Dekker, 1996. 1069p.
- NISHIMURA, K.; SHIINA, R.; KASHIWAGI, K.; IGARASHIY, K. Decrease in polyamines with aging and their ingestion from food and drink. *Journal of Biochemistry*, v. 139, p. 81-90, 2006.
- NOGALA-KALUCKA, M.; KORCZAK, J.; DRATWIA, M.; LAMPART-SZCZAPA, E.; SIGER, A.; BUCHOWSKI, M. Changes in antioxidant activity and free radical scavenging potential of rosemary extract and tocopherols in isolated rapeseed oil triacylglycerols during accelerated tests. *Food Chemistry*, v. 93, p. 227-235, 2005.
- OKAMOTO, A.; SUGI, E.; KOIZUMI, Y.; YANAGIDA, F.; UDAKA, S. Polyamine content of ordinary foodstuffs and various fermented foods. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 61, p. 1582-1584, 1997.
- PALAVAN-UNSAL, N.; ARISAN, E.D.; TERZIOGLU, S. Polyamines in tea processing. *International Journal of Food Science and Nutrition*, v. 58, p. 304-311, 2007.
- PAPADAKIS, A.K.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. Polyamines inhibit NADPH oxidase-mediated superoxide generation and putrescine prevents programmed cell death induced by polyamine oxidase-generated hydrogen peroxide. *Planta*, v. 220, p. 826-837, 2005.
- PAVLOVIC, D.D.; UZUNOVA, P.; GALABOVA, T.; PENEVA, V.; SOKOLOVA, Z.; BJELAKOVIC, G.; RIBAROV, S. Polyamines as modulators of lipoperoxidation. *General Physiology and Biophysics*, v. 11, p. 203-211, 1992.

- PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 1035-1042, 2000.
- PRESA-OWENS, S.; LOPEZ-SABATER, M.C.; RIVERO-URGELL, M. Shelf-life prediction of an infant formula using an accelerated stability test (Rancimat). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 43, p. 2879-2882, 1995.
- RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, v. 29, p. 755-760, 2006a.
- RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Atividade antioxidante do  $\alpha$ -tocoferol e do extrato de alecrim em óleo de soja purificado. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 65, p. 15-20, 2006b.
- RÄSÄNEN, T.L.; ALHONEN, L.; SINERVITA R.; KEINÄNEN, T.; HERZIG, K.H.; SUPPOLA, S.; KHOMUTOV, A.R.; VEPSÄLÄINEN, J.; JÄNE, J. A polyamine analogue prevents acute pancreatitis and restores early liver regeneration in transgenic rats with activated polyamines catabolism. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 39867-39872, 2002.
- REYNHOUT, G. The effect of temperature on the induction time of a stabilized oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 68, p. 983-984, 1991.
- RICHEIMER, S.L.; BERNART, M.W.; KING, G.A.; KENT, M.C.; BAILEY, D.T. Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 73, p. 507-514, 1996.
- RIDER, J.E.; HACKER, A.; MACKINTOSH, C.A.; PEGG, A.E.; WOSTER, P.M.; CASERO Jr, R.A. Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *Amino Acids*, v. 33, p. 231-240, 2007.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1 ed., Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.
- RODRIGUEZ, A.; BARRERA-ARELLANO, D.; GROMPONE, M.A. Oxidative stability of hake liver oil. *Grasas & Aceites*, v. 44, p. 270-273, 1993.
- RUDNIK, E.; SZEZUCINSKA, A.; GWARDIAK, H.; SZULC, A.; WINIARSKA, A. Comparative studies of oxidative stability of linseed oil. *Thermochimica Acta*, v. 370, p. 135-140, 2001.
- SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, v. 8, p. 121-137, 2002.

- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A. Principales métodos para la determinación de la oxidación lipídica. *Food Science and Technology Internacional*, v. 4, p. 391-399, 1998.
- SANHUEZA, J.; NIETO, S.; VALENZUELA, A. Thermal stability of some commercial synthetic antioxidants. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 77, p. 933-936, 2000.
- SASAKI, S.; OHTA, T.; DECKER, E.A. Antioxidant activity of water-soluble fractions of salmon spermary tissue. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 44, p. 1682-1686, 1996.
- SEILER, N.; RAUL, F. Polyamines and apoptosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 9, p. 623-642, 2005.
- SHI, H.; NIKI, E. Introducing natural antioxidants. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA-MASLAROVA, N.V.; GORDON, M.H. *Antioxidants in food – Practical applications*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2001. 380p. (Versão digital em: [www.woodhead-publishing.com](http://www.woodhead-publishing.com)).
- SHIOTA, M.; TATSUMI, K. Effect of sucrose ester of fatty acid on the antioxidant activity of milk products on fish oil oxidation. *Journal of Food Science*, v. 67, p. 547-552, 2002.
- SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, v. 82, p. 291-295, 1997.
- SILLA-SANTOS, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 29, p.213-231, 1996.
- SILVA, C.G.M.; GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at  $4 \pm 1$  °C and in chicken based meat products. *Food Chemistry*, v. 78, p. 241-248, 2002.
- SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, v. 22, p. 94-103, 1999.
- SILVEIRA, T.M.L. Aminas bioativas livres e conjugadas no café solúvel: metodologia de análise e influência do processamento. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia, UFMG. 2008. 179 p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).
- SMITH, T.A. Polyamines. *Annual Review of Plant Physiology*, v. 36, p. 117-143, 1985.
- SOUZA, S.V.C. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2007. 296 p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).

- SUHAJ, M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, p. 531-537, 2006.
- SUN, T.; HO, C. Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry*, v. 90, p. 743-749, 2005.
- TADOLINI, B. Polyamine inhibition of lipoperoxidation: the influence of polyamines on iron oxidation in the presence of compounds mimicking phospholipid polar heads. *Biochemical Journal*, v. 249, p. 33-36, 1988.
- TAKLE, H.W.; MOERKOERE, T. Spermine enhancement of food shelf life. WO 147214. 04 dez. 2008. 20p.
- TANG, W.; NEWTON, R.J. Polyamines reduce salt-induced oxidative damage by increasing the activities of antioxidant enzymes and decreasing lipid peroxidation in Virginia pine. *Plant Growth Regulation*, v. 46, p. 31-43, 2005.
- TOSCHI, T.G.; BORDONI, A.; HRELIA, S.; BENDINI, A.; LERCKER, G.; BIAGI, P.L. The protective role of different green tea extracts after oxidative damage is related to their catechin composition. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 48, p.3973–3978, 2000.
- TORO-VAZQUEZ, J.F.; CASTILLO, A.A.; HERNANDEZ, C.R. A multiple-variable approach to study corn oil oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 70, p. 261-267, 1993.
- TSAKNIS, J.; LALAS, S.; PROTOPAPA, E. Effectiveness of the antioxidants BHA and BHT in selected vegetable oils during intermittent heating. *Grasas y Aceites*, v. 53, p. 199-205, 2002.
- VALE, S.R.; GLÓRIA, M.B.A. Determination of biogenic amines in cheese. *Journal of AOAC International*, v. 80, p. 1006-1012, 1997.
- YANISHLIEVA-MASLAROVA, N.V. Inhibiting oxidation. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA-MASLAROVA, N.V.; GORDON, M.H. *Antioxidants in food – Practical applications*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2001. 380p. (Versão digital em: [www.woodhead-publishing.com](http://www.woodhead-publishing.com)).

**136 referências**



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)