

MICHELE CORRÊA BERTOLDI

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro* DA FRAÇÃO FENÓLICA, DAS
OLEORRESINAS E DO ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA ROSA
(*Schinus terebinthifolius Raddi*)

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2006

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

B546a
2006

Bertoldi, Michele Corrêa, 1980-

Atividade antioxidante *in vitro* da fração fenólica,
das oleorresinas e do óleo essencial de pimenta rosa
(*Schinus Terebinthifolius* Raddi) / Michele Corrêa
Bertoldi. – Viçosa : UFV, 2006.

xviii, 96f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Paulo Cesar Stringheta.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 84-92.

1. Pimenta-rosa - Análise. 2. Antioxidantes. 3. Fenóis -
Extração. 4. Essências e óleos essenciais - Extração.
5. Oleorresinas - Extração. 6. *Schinus Terebinthifolius*.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 664.53

MICHELE CORRÊA BERTOLDI

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro* DA FRAÇÃO FENÓLICA, DAS
OLEORRESINAS E DO ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA ROSA
(*Schinus terebinthifolius Raddi*)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 3 de maio de 2006.

Prof. José Carlos Gomes
(Conselheiro)

Prof^a. Valéria Paula Rodriguez Minim
(Conselheira)

Prof. Afonso Ramos Mota

Prof^a. Cleide Maria Ferreira Pinto

Prof. Paulo Cesar Stringheta
(Orientador)

A DEUS,

AGRADEÇO.

Aos meus amados pais Dirceu José D. Bertoldi e Helena Corrêa Calháu Bertoldi, pela dedicação e apoio, e à minha irmã Liliane Corrêa Bertoldi, pela amizade,

OFEREÇO.

Ao meu marido, companheiro eterno, Hernani Ciro Santana, e ao meu filho, amor incondicional, Vítor Bertoldi Santana.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por tudo que me oferece, luz e proteção.

Ao orientador Paulo César Stringheta, pela orientação, profissionalismo, suporte técnico, apoio, motivação, ensinamentos e amizade.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela oportunidade e concessão de bolsa de estudos.

À Empresa Agrorosa-Ltda, fornecedora da matéria-prima pimenta rosa utilizada neste trabalho, pela colaboração e apoio à pesquisa, e principalmente ao amigo Giordano, que atendeu prontamente às nossas solicitações.

Aos funcionários Lígia Santana e Valério Poletto e amigos do laboratório de Pigmentos naturais e Secagem, por proporcionarem um ambiente de trabalho harmonioso, alegre e organizado.

À grande receptividade e colaboração dos amigos Leo, Poliana, Aline, Priscila, Laura, Milton, Luiggi, Frederico, Luciana, Ísis, Juliane, Taíla, Bárbara, Kássia e Warda, e principalmente, à grande colaboração das estudantes Juliane, Luciana e Ísis na execução do trabalho de tese.

Aos professores José Carlos Gomes, Valéria Paula Rodrigues Minim, Afonso Mota Ramos, Luiz Cláudio Costa, Cleide Maria Ferreira Pinto, Fernando Pinheiro Reis e Paulo Pirani pela colaboração.

Aos funcionários do DTA, de grande importância, e que nunca mediram esforços no atendimento, dentre nomes e apelidos: Adão, Tineca, Juarez, Geralda, Vaninha, Sueli, Bilico, Lelé, Perereca, Luiz, Zé Geraldo, Maria Rita, Divino, Piu, Pi.

A Hernani Santana, pelo amor, companheirismo, dedicação, carinho, paciência e força de vontade.

Ao meu filho, amor incondicional e motivação constante.

Aos meus queridos pais, pelo amor e dedicação. À minha querida mãe, exemplo de força e amizade.

Aos amigos Vicência, José Antônio, Nayah e Túlio, pelo apoio e amizade.

A todos aqueles que contribuíram para minha formação humana e auxiliaram de alguma forma na realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

MICHELE CORRÊA BERTOLDI, filha de Dirceu José D. Bertoldi e Helena Corrêa Calháu Bertoldi, nasceu em Juiz de Fora, Minas Gerais, em 12 de setembro de 1980.

Graduou-se em janeiro de 2004, em Engenharia de Alimentos, pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

Em março de 2004 iniciou o Programa de Pós-Graduação, cursando Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa. Obteve o título de *Magister Scientiae* pela defesa de tese em 3 de maio de 2006.

CONTEÚDO

LISTA DE QUADROS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3. REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1. Características da espécie <i>Schinus terebinthifolius Raddi</i>	6
3.2. Compostos fenólicos	8
3.3. Antioxidantes	12
3.4. Metodologias antioxidantes <i>in vitro</i>	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Determinação do método de extração do conteúdo fenólico da pimenta rosa	25
4.2. Determinação do conteúdo fenólico da pimenta rosa, utilizando diferentes métodos de quantificação	26
4.3. Determinação de umidade	27
4.4. Determinação do rendimento e da atividade antioxidante da oleorresina extraída da pimenta rosa, utilizando diferentes solventes e métodos de extração.	27
4.4.1. Quantificação da oleorresina	27
4.4.2. Atividade antioxidante da oleorresina	28
4.4.3. Estudo cinético	29

4.5. Quantificação da fração fenólica, da oleorresina e do óleo essencial da pimenta rosa, coletada em diferentes regiões.....	31
4.5.1. Fração Fenólica.....	31
4.5.2. Oleorresina.....	31
4.5.3. Óleo Essencial	31
4.6. Determinação da atividade antioxidante da fração fenólica, da oleorresina e do óleo essencial de pimenta rosa, coletada em diferentes regiões.	32
4.6.1. Fração Fenólica.....	32
4.6.2. Oleorresina.....	32
4.6.3. Óleo Essencial	33
4.7. Correlação entre métodos <i>in vitro</i> utilizados na avaliação da atividade antioxidante.....	33
4.7.1. Obtenção do extrato.....	33
4.7.2. Ensaio do radical livre DPPH	34
4.7.3. Ensaio do cátion radical ABTS	34
4.7.4. Ensaio do sistema emulsionado -caroteno- ácido linoléico	35
4.8. Aceitabilidade da pimenta rosa	36
4.8.1. Em salmão	36
4.8.2. Em chocolate.....	37
4.9. Análise Estatística	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1. Determinação do método de extração do conteúdo fenólico da pimenta rosa	39
5.2. Determinação do conteúdo fenólico da pimenta rosa, utilizando diferentes métodos de quantificação	43
5.3. Determinação de umidade	43

5.4. Determinação do rendimento e da atividade antioxidante da oleorresina extraída de pimenta rosa, utilizando diferentes solventes e métodos de extração.	44
5.4.1. Quantificação da oleorresina.....	44
5.4.2. Atividade antioxidante da oleorresina.....	47
5.4.3. Estudo cinético.....	49
5.5. Quantificação da fração fenólica, da oleorresina e do óleo essencial da pimenta rosa, coletada em diferentes regiões.....	56
5.5.1. Fração fenólica.....	56
5.5.2. Oleorresina e óleo essencial.....	59
5.6. Determinação da atividade antioxidante da fração fenólica, da oleorresina e do óleo essencial de pimenta rosa, coletada em diferentes regiões.	61
5.7. Correlação entre métodos <i>in vitro</i> utilizados na avaliação da atividade antioxidante.....	66
5.8. Aceitabilidade da pimenta rosa.....	76
5.8.1. Em salmão.....	76
5.8.2. Em chocolate.....	78
6. CONCLUSÕES.....	81
7. PERSPECTIVAS.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
APENDICE.....	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Efeito de diferentes sistemas extratores na ressuspensão de fenólicos totais da pimenta rosa.....	39
Quadro 2:	Efeito da temperatura de extração, pH e precipitação de proteínas com tungstato de sódio na ressuspensão de fenólicos totais da pimenta rosa.....	41
Quadro 3:	Umidade (%p/p) da pimenta rosa.	44
Quadro 4:	Efeito do tipo de solvente no rendimento (%p/p) da oleorresina de pimenta rosa extraída em soxhlet.....	45
Quadro 5:	Efeito do tipo de solvente no rendimento (%p/p) da oleorresina de pimenta rosa extraída a frio.	45
Quadro 6:	Efeito do tipo de solvente na atividade antioxidante (μ moles radicais DPPH reduzidos/ mL oleorresina) da oleorresina de pimenta rosa extraída em soxhlet.	47
Quadro 7:	Efeito do tipo de solvente na atividade antioxidante (μ moles radicais DPPH reduzidos/ mL oleorresina) da oleorresina de pimenta rosa extraída a frio.	48
Quadro 8:	Densidade (g/cm^3) da oleorresina de pimenta rosa a 25°C.	49
Quadro 9:	Valores de EC50 das oleorresinas (g oleorresina/ mmoles radical DPPH) e do padrão (g Trolox/ mmoles radical DPPH), em diferentes intervalos de reação.....	54
Quadro 10:	Conteúdo fenólico (g ácido gálico/ 100g pimenta rosa em peso seco) da pimenta rosa coletada em diferentes regiões, extraído com acetona 70%.	57
Quadro 11:	Conteúdo fenólico (g ácido gálico/ 100g pimenta rosa em peso seco) da pimenta rosa coletada em diferentes regiões, extraído com acetona 70%,acidificada com 1% de HCl concentrado.....	57
Quadro 12:	Teor de óleo essencial (mL oleo/100g pimenta rosa em peso seco) extraído de pimenta rosa, coletada em diferentes regiões.	59
Quadro 13:	Rendimento de oleorresina (%p/p) extraída de pimenta rosa, coletada em diferentes regiões.....	60

Quadro 14:	Leituras de absorvância a 517nm do branco e do extrato fenólico, pelo ensaio do radical DPPH.	61
Quadro 15:	Atividade antioxidante (mmoles DPPH reduz / 100g pimenta rosa em peso seco) do extrato fenólico de pimenta rosa, coletada em diferentes regiões.	62
Quadro 16:	Relação entre a quantidade de radicais livres de DPPH reduzidos e o conteúdo fenólico total (mmoles DPPH reduz / g acido gálico) de pimenta rosa, coletada em diferentes regiões.	63
Quadro 17:	Atividade antioxidante (%Inibição) de oleorresina extraída de pimenta rosa, coletada em diferentes regiões.	64
Quadro 18:	Atividade antioxidante (% Inibição) do óleo essencial extraído de pimenta rosa, coletada em diferentes regiões.	64
Quadro 19:	Atividade antioxidante (µmoles DPPH• reduzidos / g pimenta rosa em peso seco) da frações fenólica, do óleo essencial e da oleorresina da pimenta rosa, coletada em diferentes regiões....	65
Quadro 20:	Atividade antioxidante (% Inibição) de diluições do extrato fenólico, determinada por diferentes ensaios, em intervalos de tempos diferentes.	70
Quadro 21:	A atividade antioxidante de diferentes diluições do extrato fenólico, em TEAC(mM).....	71
Quadro 22:	A atividade antioxidante (micromoles DPPH reduzido / mL extrato) de diferentes diluições do extrato fenólico.	73
Quadro 23:	Atividade antioxidante de diferentes diluições do extrato fenólico, determinadas pelo ensaio do radical DPPH, representados em % Inibição e % DPPH• remanescente.	73
Quadro 24:	Atividade antioxidante do extrato fenólico (mg AGE/ mmoles radical DPPH) e do padrão Trolox (mM), determinadas pelo ensaio do radical DPPH, representada pelo EC50.	74
Quadro 25:	Atividade antioxidante de diferentes diluições do extrato fenólico, determinadas pelo ensaio do sistema emulsionado -caroteno-ácido linoléico, representados em I.A. e % Inibição.....	75
Quadro 26:	Distribuição das médias de aceitação da amostra (salmão com pimenta rosa) por faixa etária	78
Quadro 27:	Distribuição das médias de aceitação das amostras (chocolate com pimenta rosa) por faixa etária.....	80

Quadro 1A: Resumos da Análise de variância do rendimento de oleorresina (g oleorresina /100g pimenta rosa em peso seco) extraída por dois métodos de extração e cinco solventes diferentes.....	95
Quadro 2A: Resumos da Análise de variância da atividade antioxidante da oleorresina (μ moles DPPH reduzido/ g pimenta rosa em peso seco) extraída por dois métodos de extração e cinco solventes diferentes.	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Nomes vulgares atribuídos ao fruto desidratado da espécie <i>Schinus terebinthifolius Raddi</i> em diversos países.	7
Tabela 2:	Dados geográficos das regiões de coleta dos frutos da espécie <i>Schinus terebinthifolius Raddi</i>	24
Tabela 3:	Sistemas extratores utilizados na extração do conteúdo fenólico da pimenta rosa.	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Ficha de avaliação utilizada no teste sensorial.....	37
Figura 2:	Regressão entre os resultados do conteúdo fenólico da pimenta rosa (g ácido gálico/100g amostra em peso úmido), determinados pelos ensaios Folin-Denis e Folin-Ciocalteu.	43
Figura 3:	Comportamento cinético da oleorresina extraída de pimenta rosa, utilizando solventes diferentes. A) Éter de petróleo; B) Hexano; C) Éter etílico; D) Etanol; E) Acetona.....	50
Figura 4:	Comportamento cinético do padrão (Trolox).....	51
Figura 5:	Porcentagem do radical livre DPPH remanescente em função das diluições de oleorresina. (A) Éter de petróleo; (B) Hexano; (C) Éter etílico; (D) Etanol; (E) Acetona	53
Figura 6:	Porcentagem do radical livre DPPH remanescente em função das diluições do padrão (Trolox).....	54
Figura 7:	Efeito das diferentes diluições do extrato fenólico (I) e do padrão Trolox (II) na queda de absorvância, em função do tempo (min), determinada por diferentes ensaios. (A) Radical livre DPPH (B) Cátion radical ABTS (C) Sistema emulsionado -caroteno- ácido linoléico.	68
Figura 8:	Distribuição da faixa etária dos provadores	77
Figura 9:	Distribuição da faixa etária dos provadores. (A) Teste de aceitação da pimenta rosa em chocolate preto (B) Teste de aceitação da pimenta rosa em chocolate branco.....	79
Figura 10:	Distribuição da faixa etária dos provadores. (A) Teste de aceitação da pimenta rosa em chocolate preto (B) Teste de aceitação da pimenta rosa em chocolate branco.....	79
Figura 1A:	Curva Padrão de Ácido Gálico utilizada para quantificação de polifenóis totais pelo ensaio com reagente Folin-Denis.	93
Figura 2A:	Curva Padrão de Ácido Gálico utilizada para quantificação de polifenóis totais pelo ensaio com reagente Folin-Ciocalteu.	93
Figura 3A:	Curva Padrão de DPPH.....	93
Figura 4A:	Curva Padrão de Trolox utilizada para determinar a atividade antioxidante pelo ensaio do radical livre DPPH	94

Figura 5A:	Curva Padrão de Trolox utilizada para determinar a atividade antioxidante pelo ensaio do cátion radical livre ABTS.	94
Figura 6A:	Figura 6A: Porcentagem do radical livre DPPH remanescente em função das diluições do extrato fenólico	94

RESUMO

BERTOLDI, Michele Corrêa, M.S., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2006. **Atividade antioxidante *in vitro* da fração fenólica, das oleorresinas e do óleo essencial de Pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius Raddi*)**. Orientador: Paulo Cesar Stringheta. Conselheiros: José Carlos Gomes e Valéria Paula Rodrigues Minim.

Schinus terebinthifolius Raddi, pertencente à Família Anacardiaceae, é utilizada principalmente na medicina popular, no tratamento de doenças venéreas, reumatismo, dores, gengivite e febre. Muitos dos efeitos benéficos atribuídos à espécie estão associados à presença de compostos fenólicos, os quais conferem a ela propriedades antioxidantes. Além disso, a utilização dos frutos secos de *Schinus terebinthifolius Raddi* como condimento, conhecido como pimenta rosa, tem sido bastante difundida, apresentando elevada demanda e alto valor mercadológico. Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo geral avaliar o rendimento e o potencial antioxidante da fração fenólica, do óleo essencial e da oleorresina de pimenta rosa. Para se determinar as melhores condições de extração de compostos fenólicos foram avaliados diferentes solventes (água, metanol, acetona, etanol, acetato de etila) em proporções variadas, a temperatura de extração e, o pH do meio (HCl concentrado). O conteúdo fenólico total foi quantificado pelo ensaio com o reagente Folin-Denis. Avaliou-se também o efeito de dois métodos de extração, em soxhlet (6h) e a frio (25°C/48h) e cinco solventes no rendimento e na atividade antioxidante da oleorresina. A fração fenólica foi extraída com acetona 70% (v/v) e a oleorresina com acetona a frio. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação, por um período de 3 horas. A atividade antioxidante das frações foi determinada pelo ensaio do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). A aceitabilidade da pimenta rosa foi avaliada em chocolate e em salmão, utilizando escala hedônica de nove pontos. O sistema extrator mais eficiente na ressuspensão de fenólicos totais foi acetona 70% (v/v) acidificada com 1% de HCl concentrado, o que sugere a predominância de compostos poliméricos de alto peso molecular na pimenta rosa, como os taninos. O efeito do solvente no rendimento e na atividade antioxidante da oleorresina foi

dependente do método de extração utilizado. A oleorresina extraída com etanol em soxhlet apresentou a maior atividade antioxidante e o maior rendimento. Para a extração das oleorresinas em soxhlet, a ordem do rendimento e da atividade antioxidante das oleorresinas acompanhou a ordem de polaridade dos solventes: etanol > acetona > éter etílico > éter de petróleo = hexano. A maior contribuição à atividade antioxidante da pimenta rosa advém de compostos polares, principalmente compostos fenólicos. Em contrapartida, o óleo essencial apresentou a menor participação na atividade antirradical dos frutos. A pimenta rosa apresentou elevada aceitabilidade, tanto em chocolate quanto em salmão. O condimento aumentou a aceitabilidade do salmão. A média da aceitação do salmão situou-se entre os termos hedônicos “gostei moderadamente” e “gostei muito” e a média do salmão com a pimenta rosa entre os termos hedônicos “gostei muito” e “gostei extremamente”. Em chocolate preto a aceitabilidade da pimenta rosa situou-se entre os termos hedônicos “gostei moderadamente” e “gostei muito”. As propriedades antioxidantes da espécie poderão ser potencializadas através da aplicação do seu extrato fenólico, ou mesmo de outras frações como a oleorresina e o óleo essencial, em produtos farmacêuticos, alimentos e cosméticos. Além disso, a comercialização dos frutos na forma desidratada apresenta grande potencialidade de consumo quando utilizada na gastronomia, em razão de sua elevada aceitabilidade.

ABSTRACT

BERTOLDI, Michele Corrêa, M.S., Universidade Federal de Viçosa, May of 2006. **Antioxidant activity *in vitro* of phenolic extract, oleoresins and essential oil of Pink Pepper (*Schinus terebinthifolius Raddi*)** Advisor: Paulo Cesar Stringheta. Committee Members: José Carlos Gomes and Valéria Paula Rodrigues Minim.

Schinus terebinthifolius Raddi, belongs to Anacardiaceae family, is used mainly in folk medicine, to treat venereal disease, rheumatism, pain, gingivitis e fever. Many of these beneficial effects attributed to specie are associated with phenolic compounds, which confer antioxidant properties. Moreover, the use of dried fruits of *Schinus terebinthifolius Raddi* as seasoning, knowed as pink pepper, had been much diffused, with high demand and market value. In this context, the general objectives of this study were to evaluate the yield and antioxidant potential of phenolic content, essential oil and oleoresins of dried fruits from pink pepper. To determine the best extraction conditions of polyphenolics, the type of solvent (water, methanol, acetone, ethanol, ethyl acetate) in varied ratios, the extraction temperature, and the medium's pH (HCl concentrated) were evaluated. The phenolic content was quantified by Folin-Denis reagent assay. The effects of two extraction methods, soxhlet (6h) and cold method (25°C/48h), and five solvents in the yield and antioxidant potential of oleoresin were investigated. The phenolic content was extracted with acetone 70% (v/v) and oleoresin with acetone by cold method. The essential oil was extracted for 3 hours by hydrodistillation. The antioxidant activity of fractions was measured by radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) assay. The acceptability of pink pepper was evaluated in salmon and chocolate, using hedonic scale of nine points. Acetone 70% (v/v) acidified with 1% (v/v) of HCl concentrated was the best system to extract poliphenolics, which suggests the predominance of polymeric compounds of high molecular weight in pink pepper, like tannins. The effect of solvent on the yield and antioxidant activity of oleoresins depends of extraction method. The best yield and antioxidant activity of oleoresins was obtained with ethanol by Soxhlet. In Soxhlet, the order of yield and antioxidant activity of oleoresin followed the order of solvents' polarity:

ethanol>acetone> ethyl ether>petroleum ether=hexane. The best contribution to pink pepper's antioxidant activity was attributed to polar compounds, mainly polyphenolics. On the other hand, the essential oil had the minor participation in fruit's antiradical activity. The pink pepper had a good acceptability, as in chocolate as in salmon. The seasoning increased the acceptability of salmon. The acceptance media of salmon was between hedonic terms "like moderately" and "like very much" and the media of salmon with pink pepper were between hedonic terms "like very much" and "like extremely". The acceptability of pink pepper in black chocolate was between hedonic terms "like moderately" and "like very much". The antioxidant properties of specie could be potentialized by application of extracts of phenolics or others fractions, like oleoresins and essential oil, in pharmaceutical products, food and cosmetics. Moreover, the marketing of fruits in dried form present high potential of consumption in gastronomy because of its good acceptability.

1.INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são os principais componentes da medicina tradicional. A utilização de plantas para o tratamento de doenças que acometem os seres humanos é uma prática milenar e que ainda hoje aparece como o principal recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. No início da década de 90, a Organização Mundial de Saúde divulgou que 60% a 85% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados da saúde (VEIGA Jr., PINTO e MACIEL, 2005).

Ao longo dos anos, as observações populares conduziram ao acúmulo de informações relevantes sobre a eficácia e os efeitos medicinais das plantas. Todo este conhecimento continua sendo válido para estimular o uso dos vegetais como medicamentos, além de despertar grande interesse por pesquisas que conduzam à identificação de substâncias naturais bioativas. Estima-se que cerca de 75% dos compostos puros naturais empregados na indústria farmacêutica foram isolados seguindo recomendações da medicina popular (YUNES, PEDROSA e CECHINEL FILHO, 2001).

Investigações clínicas e epidemiológicas têm associado dietas ricas em frutas e hortaliças com a redução do risco de doenças crônicas, cardíacas, neurológicas e cardiovasculares, bem como vários tipos de câncer. Os potencializadores dos benefícios oferecidos pela dieta são compostos antioxidantes que incluem carotenóides, ascorbatos, tocoferóis e polifenóis. (BENAVENTE-GARCIA et al., 2000; TEMPLE, 2000).

Os vegetais são ricos em vários tipos de antioxidantes, como vitaminas C e E, alfa-tocoferol, beta-caroteno e compostos fenólicos, os quais constituem a maioria dos compostos com atividade antioxidante (MOURE et al.,2001). Conseqüentemente, a proteção à saúde derivada do consumo de vegetais e seus derivados foi atribuída, em grande parte, às propriedades biológicas do conteúdo fenólico destes alimentos, que incluem atividades antioxidante, antiinflamatória, anti-histamínica, antiviral, antimicrobiana, antialérgica, antitumoral, anticariogênica e antimutagênica (GOMIS, 2001).

O aumento do interesse na funcionalidade dos antioxidantes na saúde humana e na substituição de antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais tem estimulado pesquisas na área de ciência dos alimentos. A maioria destes estudos pretende extrair e identificar antioxidantes naturais de fontes vegetais, avaliar suas propriedades biológicas, determinar sua atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, estudar sua aplicabilidade em produtos processados e determinar como o seu conteúdo e atividade são influenciados pelo cultivar, maturidade, sazonalidade, práticas e período de colheita, procedimentos pós-colheita, tecnologias de processamento e condições de processamento (ALASALVAR et al., 2005; ARABBI, GENOVESE e LAJOLO, 2004)

Schinus terebinthifolius Raddi, pertencente à Família Anacardiaceae, é espécie pioneira e nativa, conhecida popularmente em todo o Brasil como aroeira (CORRÊA, 1984). É utilizada principalmente na medicina popular, no tratamento de doenças venéreas, reumatismo, diarreias, dores, gengivite e febre (NGOKWEY, 1995; STASI et al., 2002).

Em uma pesquisa de campo realizada em Feira de Santana, Bahia, a aroeira foi a décima erva medicinal mais usada na medicina popular. A planta enquadrou-se no grupo das onze mais consumidas, que correspondia a um terço do total de 138 ervas citadas (NGOKWEY, 1995). Em outro estudo feito com habitantes da zona rural e urbana de cidades do estado de São Paulo a respeito do tipo de plantas geralmente utilizadas na medicina popular, a utilização das folhas da aroeira como analgésico, no combate ao reumatismo e gengivite foi bastante citada (STASI et al., 2002).

Muitas das propriedades ou efeitos curativos atribuídos pela medicina popular à “aroeirinha” estão associados à presença de polifenóis na planta, como apigenina, ácido elágico e naringina (QUEIRES e RODRIGUES, 1998; DEGÁSPARI, WASZCZYNSKYJ e SANTOS, 2004), os quais conferem à planta propriedades antioxidantes, correlação demonstrada por ALVES, PIZZOLATTI e BRIGHENTE (2003) para a espécie *Schinus mole*, e por DEGÁSPARI, WASZCZYNSKYJ e SANTOS (2004) para a espécie *Schinus terebinthifolius Raddi*.

Além disso, a espécie *Schinus terebinthifolius Raddi* possui atividade antimicrobiana possivelmente, atribuída à presença de substâncias fenólicas, contra uma série de microorganismos, como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (gram-positivos), *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativos), e a levedura *Candida albicans* (GONZALEZ e BADELL, 1996b; GUERRA et al., 2000; MARTINEZ et al., 1996a; MARTINEZ, MOURE et al., 2001; SOKMEN et al.,2004).

No Brasil, a potencialidade biológica da planta ainda é pouco explorada. Todavia, a aplicação de seus frutos como produto condimentar denominado Pimenta rosa tem sido difundida, apesar de incipiente. O condimento é utilizado nas mais exigentes culinárias para temperar carnes brancas, salames e massas, e conferir sabores exóticos a bebidas e doces, como coquetéis e chocolate.

De grande potencial econômico, visto que atinge valores de mercado mais elevados que o da pimenta do reino, a maioria dos frutos secos da Aroeira produzidos no Brasil são exportados. No país, os frutos da aroeira são utilizados apenas em sua forma desidratada e comercializados, na maioria das vezes a granel. Neste contexto, é necessário avaliar sua aceitação pelos consumidores e utilizá-los na formulação de novos produtos, o que contribuirá para divulgação de um produto da flora nativa e agregação de valor da matéria-prima, gerando divisas para o país.

A utilização dos frutos como produto condimentar também pode ser uma alternativa ao uso de outros tipos de pimentas, consideradas prejudiciais ao organismo, por apresentarem substâncias como a capsaicina, que de acordo com a quantidade ingerida, pode apresentar toxicidade ou mutagenicidade (BOCCARDO et al., 2004 ; LACA-BUENDIA, BRANDÃO e OLIVEIRA, 1992; SURH e LEE,1995).

Em alguns países como Estados Unidos e México, além do fruto seco da aroeira, também são comercializados o mel e o óleo essencial (FERRITER, 1997). No Brasil, a produção de óleo essencial é incipiente e destinada exclusivamente à exportação, por ser uma alternativa para o refugo de frutos

de Pimenta rosa, excluídos por apresentarem qualidade inferior à exigida pelo mercado externo.

A agroatividade apresenta grande potencial, pois além de desenvolver a flora nativa e a avifauna que dela se alimenta, contribui com a redução do êxodo rural e com o desenvolvimento socioeconômico da população regional que, através do extrativismo, abastece as empresas exportadoras do fruto desidratado.

A presença de propriedades fitoterápicas, aliada à abundância e alto valor mercadológico do produto condimentar, valorizam a espécie nativa e impulsionam estudos mais aprofundados e direcionados acerca dos aspectos biológicos da planta, necessários para sua aplicação em cosméticos e produtos farmacêuticos.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar o rendimento e o potencial antioxidante da fração fenólica, do óleo essencial e das oleorresinas dos frutos secos de *Schinus terebinthifolius Raddi*, conhecidos popularmente como pimenta rosa.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o rendimento e a atividade antioxidante da fração fenólica, das oleorresinas e do óleo essencial dos frutos secos de *Schinus terebinthifolius Raddi* (pimenta rosa), coletados em diferentes regiões;
- Determinar o sistema extrator mais eficiente para ressuspensão de fenólicos totais da pimenta rosa;
- Comparar os métodos utilizados para quantificação do conteúdo fenólico;
- Determinar o rendimento e a atividade antioxidante das oleorresinas, extraídas por diferentes métodos e solventes;
- Comparar métodos *in vitro* utilizados para avaliar a atividade antioxidante;
- Avaliar a aceitabilidade da pimenta rosa.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Características da espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi

Família: Anacardiaceae

Nomes vulgares: Aroeira-mansa, aroeira-vermelha, araguaraíba, corneíba, cambuí, fruto –de-sabiá, Aroeira (Brasil); Brazilian pepper, Christmas berry , Florida holly (Estados Unidos); Copal (Cuba); Pimienta de Brasil (Porto Rico); NANI-O-HILO (Havaí); Chichita (Argentina); Faux poivrier ou False pepper (Riviera Francesa) (CORRÊA, 1984; BALBACH,1986; FERRITER,1997).

Arbusto com altura entre 2 e 3 m, às vezes arborescente (7-8 m), mas geralmente reduzido a 50-60 cm; folhas imparipinadas, compostas, 2 a 7 jugas, com pecíolos cilíndricos na parte inferior; flores amarelo-pálidas, pequenas, dispostas em panículas de 5-10 cm de comprimento; fruto drupa globosa, vermelho pálida, lúzida. Fornece madeira parda ou amarelo-clara. Mole, porém pesada e bastante resistente (CORRÊA, 1984).

A casca, devido aos seus efeitos adstringentes e ação depurativa e febrífuga, tem efeito imediato sobre as hemoptises, diarreia e as afecções uterinas em geral. Dela se obtém o azeite de aroeira, goma-resina terebentácea muito útil nas doenças da córnea e nos casos de debilidade dos membros e nos tumores. (CORRÊA, 1984; BALBACH,1986).

As folhas são dotadas de propriedades balsâmicas e anti-reumáticas, tendo aplicações medicinais na cura de feridas e úlceras; os ramos novos servem para os mesmos fins e também para branquear e limpar os dentes.

Aos frutos atribui-se propriedade diurética (CORRÊA, 1984; BALBACH, 1986). Entretanto, a maior aplicabilidade dos frutos se encontra na culinária, sob a forma desidratada, conhecidos como pimenta rosa. O produto condimentar é utilizado para temperar carnes brancas, salames, chocolate e massas. Na Tabela 1 estão apresentados alguns nomes vulgares atribuídos ao fruto desidratado da aroeira em diversos países.

Tabela 1: Nomes vulgares atribuídos ao fruto desidratado da espécie *Schinus terebinthifolius Raddi* em diversos países.

Brasil	Pimenta rosa
Bulgária	-
Croácia	Ameri ki papar
Dinamarca	Rød Peber
Holanda	Roze peper
Estados Unidos	Brazil Pepper, Pink pepper
Finlândia	Rosepippuri
França	Poivre rose, Baies roses, Poivrier d'Amérique, Poivre de Bourbon
Alemanha	Brasilianischer Pfeffer, Rosé-Pfeffer, Rosa Pfeffer, Rosa Beeren;
Hungria	Rózsaszín bors, Brazilbors
Itália	Pepe rosa, Schino brasiliano, Balsame delle Missioni
Letônia	Roz pipari
Polônia	Owoce schimusowe
Portugal	Pimenta-rosa
Romênia	Piper brazilian
Rússia	
Eslováquia	Brazílske korenje
Eslovênia	Ameriški poper, La ni poper, Perujski poper
Espanha	Arveira, Pirul, Pimienta Roja, Pimienta Rosa
Suécia	Rosépeppar
Turquia	Pembebiber, Yalanc karabiber

Fonte: <[www-ang.kfunigraz.ac.at/.../ engl/Schi_ter.html](http://www-ang.kfunigraz.ac.at/.../engl/Schi_ter.html)>

Membros da família Anacardinaceae são os mais freqüentes causadores de dermatites de contato, causadas pelas toxinas características em heras. (LAMPE, 1986). Algumas pessoas podem desenvolver irritações na pele, prurido, urticária, febre e transtornos visuais, quando em contato com a planta (CRUZ, 1982).

Apesar destas alterações decorrentes do contato com a planta, o extrato hidroalcoólico da espécie *Schinus terebinthifolius Raddi* não apresentou nenhum efeito tóxico ou genotóxico (RUIZ et al.,1996). Propriedades antimicrobianas foram encontradas nos extratos etanólicos das folhas desta espécie, em concentrações de extrato acima de 1%, verificando ação inibitória contra uma série de microorganismos (MARTNEZ et al., 1996a; MARTNEZ , GONZALEZ e BADELL, 1996b; GUERRA et al., 2000).

Espécies desta família são encontradas principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo, mas também possuem representantes nas floras do mediterrâneo e na América do Norte. (FERRITER, 1997). *Schinus*

terebinthifolius Raddi é largamente distribuída por todo território brasileiro, de Alagoas até Rio Grande do Sul e pode ser encontrada na Europa, onde a cultivam em zonas mais temperadas como espécie ornamental, adotada na arborização de parques e avenidas (CORRÊA, 1984).

3.2. Compostos fenólicos

Compostos fenólicos constituem uma mistura complexa de produtos originados do metabolismo secundário das plantas, que diferem em estrutura química e reatividade. Quimicamente são constituídos por anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxil substituintes no anel, incluindo seus derivados funcionais (SHAHIDI e NACZK, 1995).

Estes compostos são encontrados praticamente em todas as partes dos vegetais, mas distribuídos em quantidades diferentes em cada uma delas, podendo variar em diferentes populações de uma mesma espécie. O tipo e variedade de polifenóis variam com o estágio de desenvolvimento da planta, grau de maturação, condições ambientais, solo, manejo, processamento e armazenamento da matéria-prima. (AUW et al.,1996; CHAVAN, SHAHIDI e NACZK, 2001; MARKUS et al.,1999; YEN e DUH,1994; YEN e DUH,1995; SATO et al.,1996, SILVA, 2003)

O número e a diversidade destes compostos necessitam de eficientes métodos de determinação e análise. A escolha do método de extração depende dos tipos de compostos presentes no extrato e do tipo de análise, sendo que os procedimentos de extração são desenvolvidos com o objetivo de se obter um extrato enriquecido com todos os compostos de interesse, e livre de componentes interferentes, como carboidratos e lipídeos.

A natureza da amostra e do analito (fenóis totais, o-difenóis X classes fenólicas específicas como glicosídeos de flavononas ou compostos individuais; fenóis livres X ligados; espécies monoméricas ou poliméricas) afetam a escolha do método de extração (ROBARDS, 2003).

A diversidade estrutural dos compostos fenólicos interfere em seu comportamento físico-químico como solubilidade e fenômeno de partição, o que dificulta a otimização na ressuspensão dos fenólicos. Fenóis de plantas

são solúveis em água e em solventes orgânicos, ionizáveis em pKa entre 8 e 12, com coeficiente de partição água/óleo na faixa de 6×10^{-4} a 1,5. Assim, eles existem em uma grande diversidade em termos de acidez e solubilidade. (ROBARDS, 2003).

A alta atividade enzimática característica de certos alimentos e plantas também pode interferir e comprometer o resultado da extração. Mudanças estruturais nos compostos fenólicos como hidrólise, oxidação e isomerização podem ocorrer com a atuação de enzimas, como as polifenoloxidasas, disponibilizadas com a maceração da amostra. Assim, alguns procedimentos são utilizados para reduzir a atividade enzimática em materiais vegetais, como branqueamento (SILVA, 2003), metabissulfito de potássio (REDDY, UROOJ e KUMAR, 2005) ou metanol em concentrações superiores a 70% (ROBARDS, 2003).

O método de extração e escolha do solvente são geralmente tão críticos quanto o tempo e temperatura de extração, refletindo na dificuldade de solubilização e degradação dos compostos por oxidação, por exemplo. Nenhum solvente individual recuperará todos os fenólicos constituintes da amostra, já que terá uma faixa limitada a algum deles (SOONG e BARLOW, 2004).

A escolha do solvente utilizado na extração dos compostos é de grande importância, pois bioextratos com solubilidade limitada e outros fatores tais como efeitos sinérgicos e modificações químicas durante a extração podem comprometer a veracidade dos dados obtidos, além de alterar a atividade de certas substâncias. (BENAVENTE-GARCIA, 2000; CHAVAN, SHAHIDI e NACZK, 2001).

Diversos tipos de solventes de diferentes polaridades são comumente utilizados na extração de polifenóis, como água, acetato de etila, dimetil sulfóxido e misturas aquosas de etanol, metanol e acetona. (BENAVENTE-GARCIA, 2000; CHAVAN, SHAHIDI e NACZK, 2001; GUENDEZ et al., 2005; REDDY, UROOJ e KUMAR, 2005; PENG, et al., 2003; SKERGET et al., 2005).

Em geral, hexano remove interferentes como lipídeos, carotenóides e clorofila, metanol extrai açúcares, ácidos orgânicos e fenóis de baixo peso

molecular, acetato de etila e éter dietílico extraem fenóis de baixo peso molecular, enquanto acetona é enriquecida com fenóis poliméricos (MOURE et al.,2001; ROBARDS, 2003).

A acidificação do meio tem sido empregada em algumas situações para alterar a composição fenólica e aumentar a solubilidade de alguns compostos, auxiliando na sua determinação (BAUBLIS et al., 2000; SHAHIDI e NACZK, 1995; SHEABAR e NEEMAN,1998). A hidrólise ácida tem sido utilizada para medir agliconas e ácidos fenólicos de glicosídeos de flavonóides e ésteres de ácidos fenólicos, respectivamente. (ARABBI, GENOVESE e LAJOLO, 2004; GALLORI et al., 2004; ŠTERBOVÁ et al.,2004)

Soluções em pH alcalino são utilizadas para solubilizar frações com alto conteúdo de proteínas e ácidos graxos (LEHTINEM e LAAKSO,1998). A hidrólise alcalina tem sido empregada no isolamento de ácidos fenólicos de amostras de sucos cítricos, uva, café, cereais, sementes oleaginosas e plantas medicinais, para determinar fenóis ligados, em que grupos acil são removidos. Muitos fenóis e particularmente ácidos fenólicos são encontrados em sua forma conjugada, e esta etapa libera fenóis livres. Além disso, a estabilidade de fenóis de plantas tratados com álcalis tem sido de grande interesse (ROBARDS, 2003).

A temperatura utilizada durante a secagem e extração afeta a estabilidade dos compostos devido à degradação química, térmica e enzimática (IBANEZ et al., 1999), sendo um dos principais responsáveis pela redução do conteúdo fenólico. Entretanto, em certos casos, o uso de temperaturas de ebulição pode aumentar o rendimento de compostos fenólicos obtidos durante a extração (CHAVAN, SHAHIDI e NACZK, 2001; SHAHIDI e NACZK, 1995).

O tempo de extração é outro fator que afeta a ressuspensão de polifenóis, devendo ser otimizado para evitar a oxidação de compostos causada por períodos prolongados de extração. Períodos entre 1 e 24 horas são encontrados na literatura (SHAHIDI e NACZK, 1995).

A ressuspensão de compostos fenólicos também é influenciada pela relação amostra: solvente, sendo que proporções acima de 1:20 não aumentam consideravelmente o conteúdo fenólico (SHAHIDI e NACZK, 1995).

A análise de compostos fenólicos é influenciada pela sua natureza, pelo método de extração empregado, tamanho da partícula, tempo e condições de armazenamento, seleção dos padrões e presença de interferentes como ceras, gorduras, terpenos e clorofilas (SHAHIDI e NACZK, 1995).

Para extração do conteúdo fenólico dos frutos de aroeira, QUEIRES e RODRIGUES (1998) utilizaram solução etanólica 70%, em meio acidificado, com adição de tungstato de sódio 0,3M. A quantificação do conteúdo fenólico foi feita com reagente Folin, obtendo 9,54 mg de fenóis totais/ g de peso úmido.

DEGÁSPARI, WASZCZYNSKYJ e SANTOS (2004) submeteram os frutos à extração de polifenólicos com etanol absoluto a 20°C/1h e água deionizada a 50°C/ 1h, após eliminação da fração lipídica com éter etílico em aparelho Soxhlet e evaporação natural do solvente. Obtiveram 685 µg catequina/g amostra base seca para o extrato alcoólico e 88µg catequina/g amostra base seca para o extrato aquoso, pelo ensaio com reagente Folin-Ciocalteu.

Observa-se grande discrepância nos valores encontrados para o conteúdo fenólico dos frutos de aroeira, influenciados tanto pela escolha do método e tipo de sistema extrator, quanto pelo método e padrão utilizados para quantificação do conteúdo fenólico.

Todos os compostos fenólicos absorvem energia radiante na região do ultravioleta e esta característica fornece a base para quantificação espectrofotométrica de fenólicos totais. Estes métodos não são específicos e podem superestimar o conteúdo fenólico, entretanto são bastante utilizados pela praticidade e simplicidade (ROBARDS, 2003).

O ensaio Folin-Denis é o procedimento mais utilizado para quantificação de fenólicos totais em materiais vegetais. Ele baseia-se na redução do reagente ácido fosfomolibídico-fosfotungstico a um complexo de coloração azul em solução alcalina, quando em presença de compostos fenólicos, o que

permite a leitura de absorvância na região do visível (NACZK e SHAHIDI, 2004).

O ensaio Folin-Ciocalteu é usado para a mesma finalidade, e ambos os métodos não são específicos e detectam todos os grupos fenólicos encontrados nos vegetais, incluindo aqueles encontrados nas proteínas extraídas. A desvantagem do método é a interferência de substâncias redutoras como ácido ascórbico (SHAHIDI e NACZK, 1995).

O ensaio da vanilina é utilizado para quantificação de proantocianidinas (taninos condensados) em materiais vegetais. O método baseia-se na condensação da vanilina com proantocianidinas em soluções ácidas. A Vanilina protonada, radical eletrofílico, reage com o anel flavonóide na posição 6 ou 8. O produto intermediário desta reação desidrata prontamente, alterando a coloração do rosa claro ao vermelho vivo. Exclusão de luminosidade e temperatura constante aumentam a estabilidade do complexo vanilina-tanino (SHAHIDI e NACZK, 1995).

É específico para flavan-3-óis, dihidrochalconas e proantocianidinas, que tem uma dupla ligação na posição 2 e 3 e possui grupos metahidroxil livres no anel. Dihidrochalconas e antocianinas podem ser consideradas interferentes. Catequina, um flavan-3-ol monomérico, é utilizado como padrão do método. Segundo alguns pesquisadores, isso pode superestimar o conteúdo de taninos, pois o metanol, solvente empregado no método, é mais sensível a taninos poliméricos que flavan-3-óis monoméricos (NACZK e SHAHIDI, 2004).

Uma limitação do teste está no sistema extrator utilizado para obtenção da amostra, pois o emprego de ácidos e álcoois, associado com o calor, pode alterar a estrutura dos taninos, transformando-os em moléculas menores, e conseqüentemente, comprometer a veracidade dos resultados (SILVA, 2003).

3.3. Antioxidantes

Alimentos que, além de fornecerem benefícios à saúde, auxiliam na redução do risco de doenças, são conhecidos como alimentos funcionais. Os componentes benéficos dos alimentos funcionais têm sido chamados de

fitoquímicos, compostos funcionais ou componentes bioativos, e ocorrem naturalmente em aproximadamente 120 alimentos (PENNINGTON, 2002).

Bioativos incluem uma diversidade de compostos químicos com estruturas variadas como flavonóides, esteróis de plantas, carotenóides, ácidos graxos ômega 3, vitaminas C e E, selênio e outros micronutrientes, glucosinolatos e indóis, alil e dialil sulfidos, inibidores de proteases, fibras e ácidos fenólicos (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA ,1997). Estes componentes podem ter ação antioxidante, ativando enzimas de detoxificação, bloqueando a atividade de bactérias ou toxinas virais, inibindo a absorção do colesterol, dentre outros (PENNINGTON, 2002).

Nos organismos vivos, o estresse oxidativo leva à formação de compostos potencialmente tóxicos e danosos ao organismo, como os radicais livres, que podem prejudicar a saúde humana, aumentando o risco de doenças cardíacas e degenerativas, além de contribuir para o envelhecimento.

Este processo oxidativo está fortemente relacionado à ação de espécies reativas do oxigênio em componentes celulares vitais, como lipídeos, proteínas e DNA. Estas espécies incluem o oxigênio singlete, o ânion radical superóxido, o ânion peróxido e o radical hidroxila, e podem ser gerados durante a respiração celular, pela ativação de leucócitos, como parte da resposta imune, ou pela oxidação exógena, causada pela poluição ou fumo, por exemplo. (BECKER, NISSEN e SKIBSTED, 2004; HALLIWELL et al.,1998; TEMPLE, 2000).

A utilização de antioxidantes é necessária para prevenir ou retardar a oxidação de substratos potencialmente oxidáveis, como os lipídeos (BECKER, NISSEN e SKIBSTED, 2004) e, conseqüentemente, reduzir o risco de muitas doenças por sua capacidade de capturar, reativar ou consertar danos causados pelos radicais livres relacionados com estas doenças (ALONSO et al., 2004; MOURE et al.,2001).

Ademais, os compostos antioxidantes, quando presentes em pequenas concentrações, retardam a deterioração oxidativa de óleos e gorduras nos alimentos, responsável por odores de ranço e off-flavours. Assim, os antioxidantes além de preservarem as características intrínsecas dos alimentos

como cor e sabor, evitam a destruição de nutrientes e, conseqüentemente, o decréscimo na qualidade nutricional, sensorial e de segurança alimentar.

Os mecanismos de atuação dos antioxidantes podem ser diferenciados. Consistem na inativação de radicais livres, na complexação de íons metálicos ou na redução de hidroperóxidos para produtos incapazes de formar radicais livres ou produtos de decomposição (SHAHIDI e NACZK, 1995).

Os antioxidantes podem ser classificados em primários e sinérgicos. Os antioxidantes primários incluem os compostos fenólicos, e atuam bloqueando a ação dos radicais livres, convertendo-os em produtos estáveis por meio da doação de hidrogênio ou elétrons. Os sinérgicos agem na remoção do oxigênio, como o ácido ascórbico e sulfito, ou como agentes complexantes de íons metálicos, como o ácido cítrico e EDTA (ARAUJO, 1999).

Os vegetais em geral, assim como todos os alimentos e bebidas derivadas destes, são ricos em vários tipos de antioxidantes, como vitaminas C e E, alfa-tocoferol, beta-caroteno e compostos fenólicos, os quais constituem a maioria dos compostos com atividade antioxidante (MOURE et al.,2001). Conseqüentemente, a proteção à saúde derivada do seu consumo foi atribuída, em grande parte, às propriedades biológicas do conteúdo fenólico destes alimentos, como atividades antiinflamatória, anti-histamínica, antiviral, antimicrobiana, antialérgica, antitumoral, anticariogênica, antimutagênica, como sequestradores de radicais livres e protetores contra doenças cardiovasculares (GOMIS, 2001).

A utilização de plantas para o tratamento de doenças que acometem os seres humanos é uma prática milenar e que ainda hoje aparece como o principal recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. No início da década de 90, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 60-85% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados da saúde (VEIGA et al.,2005).

Embora os vegetais contenham milhares de constituintes químicos, as propriedades terapêuticas estão especialmente relacionadas com os chamados

metabólitos secundários. Os metabólitos secundários são compostos micromoleculares evolutivamente selecionados para conferir vantagens adaptativas às plantas. Alcalóides, terpenos, esteróides, flavonóides, cumarinas, xantonas, lignanas, fenilpropanóides, acetofenonas, cromanos, quinonas, derivados do ácido benzóico e da acetofenona são classes representativas de metabólitos secundários de plantas.

Os compostos fenólicos estão disponíveis nos alimentos como ácidos fenólicos, flavonóides, lignanas, estilbenos, coumarinas e taninos. Cerca de 5000 compostos fenólicos já foram identificados, o que inclui cerca de 2000 flavonóides de ocorrência natural. Os fenóis mais comuns são polímeros e ligninas insolúveis, e dentre os flavonóides mais encontrados estão a quercetina e a rutina, presentes em café, chá, grãos e numa grande variedade de frutas e hortaliças (SHAHIDI e NACZK, 1995).

A ação dos compostos fenólicos como antioxidantes é benéfica tanto para o alimento quanto para o organismo vivo, pois são oxidados preferencialmente a outros constituintes do alimento ou componentes celulares (ROBARDS, 2003). Eles atuam como antioxidantes em concentrações relativamente baixas, enquanto em altas concentrações comportam-se como proantioxidantes, visto que são suscetíveis à oxidação (ROBARDS, 2003), e contribuem para a redução do risco de doenças como catarata, câncer, aterosclerose, isquemia, alterações no sistema nervoso, dentre outras (TEMPLE, 2000).

Cada polifenol tem um poder antioxidante diferente em função de sua estrutura química, o que implica que compostos fenólicos presentes em maiores concentrações não são necessariamente os que possuem o maior poder antioxidante das amostras (ALONSO et al.,2004). A capacidade antioxidante de qualquer composto fenólico dependerá dos diferentes mecanismos de ação nos quais acontece cada caso particular, os quais são influenciados por fatores estruturais diferentes (BENAVENTE-GARCIA, 2000).

A atividade química dos polifenóis em termos de seu potencial antioxidante ocorre por meio da doação de elétrons ou átomos de hidrogênio aos radicais livres, ou como quelantes de metais, inibindo a formação de

radicais livres catalisados por metais de transição. Os radicais fenóxidos formados são intermediários bastante estáveis e dificilmente iniciam uma nova reação em cadeia, pois reagem com outros radicais livres, interrompendo as reações de propagação (SANCHEZ-MORENO, 2002).

A atividade antioxidante é determinada pelo seu potencial de redução, pela habilidade de estabilização e deslocalização do elétron desemparelhado, pela reatividade e efeito sinérgico com outros compostos, pelo seu potencial de quelar metais de transição, como ferro e cobre, e por rearranjos estruturais.(BENAVENTE-GARCIA et al., 2000; RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA ,1997).

A maioria dos estudos de bioatividade dos compostos fenólicos está relacionada com suas propriedades antioxidantes, atribuídas principalmente às propriedades redox de seus grupos hidroxil, dependentes das características estruturais das moléculas como a presença ou ausência de moléculas de glicosídeos nos polifenóis, número e posição das hidroxilas esterificadas e livres, dentre outros e das relações estruturais entre partes diferentes de sua estrutura química (BENAVENTE-GARCIA et al., 2000; ROBARDS, 2003).

A posição do segundo e terceiro grupo hidroxil dos compostos fenólicos têm considerável importância para a atividade antioxidante. Os compostos nos quais o segundo grupo hidroxila se encontra na posição orto ou para tem alta atividade antioxidante enquanto na posição meta a atividade é reduzida. A eficiência de orto e para difenóis ocorre, em parte, devido a estabilização do radical ariloxil pela dupla de hidrogênio ou pela regeneração de outro difenol (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995).

Para flavonóides, três arranjos estruturais são importantes para determinar a capacidade antioxidativa ou seqüestrante de radicais livres: a estrutura o-3,4'-dihidroxi no -anel que confere maior estabilidade ao radical aroxil ; a dupla ligação 2,3 em combinação com o grupo 4-ceto e com o grupo 3-hidroxil no anel C, responsável para deslocalização do elétron do -anel e a presença de ambos os grupos 5 - e 7- hidroxil no anel A, que contribuem para a máxima capacidade seqüestrante de radicais livres e forte absorção do radical (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA ,1997).

Os compostos fenólicos presentes nos alimentos contribuem para a manutenção de suas características sensoriais, como aparência, cor e sabor, além de proteger seu conteúdo nutricional. Quando em baixas concentrações, os compostos fenólicos podem proteger o alimento da deterioração oxidativa. Entretanto, em altas concentrações, contribuem para a perda de cor do alimento, adstringência e amargor, e interagem com proteínas, carboidratos e minerais, provocando redução do valor nutricional (SHAHIDI e NACZK,1995).

Alguns métodos de processamento podem provocar degradação de antioxidantes de ocorrência natural na matéria-prima fresca de origem vegetal, com perda de cor, sabor e qualidade. Particularmente, tratamento térmico intenso ou prolongado pode ser responsável por uma perda significativa de antioxidantes naturais, devido ao fato que a maioria das combinações é relativamente instável (MOURE et al.,2001).

Entretanto, há autores que afirmam que o processamento melhora as propriedades de antioxidantes naturais ou induza a formação de combinações novas que têm propriedades antioxidantes, de forma que a atividade antioxidante global do produto in natura permaneça inalterada ou possa aumentar apesar da perda eventual de ingredientes ativos (HALLIWELL et al.,1998; WIJEWICKREME e KITTS, 1998).

Para mascarar alterações durante o processamento e melhorar ou realçar as características sensoriais do produto, a utilização do óleo essencial e da oleorresina extraídas de ervas e condimentos é uma alternativa interessante à utilização do produto "in natura", principalmente no caso de condimentos como pimenta e páprica, em que o sabor característico é derivado de substâncias voláteis que se perdem facilmente com o processamento (ARAUJO,1999).

O aroma característico de ervas e condimentos é dependente do seu conteúdo de óleo essencial, uma mistura de hidrocarbonetos, álcoois e compostos carbonílicos obtida a partir do material vegetal por arraste de vapor, e do conteúdo de oleorresina, que pode representar grande parte da fração aromática, caracterizada por substâncias solúveis no solvente orgânico selecionado para extração (ARAUJO,1999; HEATH,1973).

Além da sua utilização como aromatizantes, o óleo essencial e as oleorresinas melhoram a qualidade do produto final, pois evitam inconvenientes na aparência e textura, realçam suas características sensoriais, evitam problemas de contaminação microbiológica e conferem propriedades antioxidantes e fitoquímicas ao produto (ARAUJO,1999).

Antioxidantes lipossolúveis de ocorrência natural, como os tocoferóis, protegem a fração lipídica da oxidação, bloqueando a ação dos radicais livres, convertendo-os em produtos estáveis por meio da doação de hidrogênio ou elétrons, e contribuem para a atividade antioxidante global do alimento (ARAUJO, 1999).

Em particular, a eficácia relativa de antioxidantes hidrófilos e lipofílicos é dependente do substrato lipídico, estado físico, concentração de antioxidante, tempo e temperatura de oxidação, e o método analítico utilizado para determinar a extensão e ponto final da oxidação. Além disso, é difícil avaliar antioxidantes naturais em óleos e emulsão de alimentos devido à afinidade do complexo interfacial ar-óleo e óleo-água (ABDALLA e ROOZEN, 1999). Finalmente deve ser levado em conta o chamado paradoxo polar, em que antioxidantes lipossolúveis tendem a ser menos efetivos em proteger lipídios que antioxidantes hidrossolúveis (PORTER, 1993; TOMAINO et al., 2005), entretanto este comportamento depende da cinética de reação do antioxidante e nem sempre é aplicável em todas as situações (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995).

A atividade antioxidante dos óleos essenciais e da oleorresina está provavelmente relacionada à sua composição química e estabilidade de seus componentes, e deve ser avaliada por testes *in vitro* e *in vivo*. Em estudo realizado por TOMAINO et al.(2005) a ordem de atividade antioxidante de óleos essenciais observada pelo ensaio com α -tocoferol presente em azeite de oliva virgem foi diferente daquela obtida pelo teste do DPPH, ressaltando a necessidade de se utilizar diferentes ensaios *in vitro* antes de avaliar sua bioatividade, além de identificar substâncias antioxidantes presentes no óleo.

O tipo de solvente utilizado para obtenção do extrato determina o seu potencial antioxidante, visto que o comportamento estrutural e a bioatividade

dos compostos presentes no extrato dependem da diversidade de polaridades encontradas. Estudos comparativos são requeridos para se otimizar o máximo enriquecimento de compostos bioativos no extrato dos órgãos vegetais de *Schinus terebinthifolius Raddi*.

ALVES, PIZZOLATTI e BRIGHENTE (2003) avaliaram a atividade antioxidante das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila, n-butanólica e aquosa, todas obtidas a partir do extrato bruto hidroalcoólico de folhas de *Schinus mole*. A atividade antioxidante, determinada pelo ensaio com DPPH, foi encontrada apenas no extrato bruto e nas frações acetato de etila e n-butanólica, o que pode estar relacionada a presença de flavonoides apenas nestas frações, evidenciada por teste analítico com magnésio metálico e ácido clorídrico concentrado.

DEGÁSPARI, WASZCZYNSKYJ e SANTOS (2004) determinaram a atividade antioxidante das frações etanólica e aquosa, extraídas do extrato etéreo dos frutos de *Schinus terebinthifolius Raddi*, cujas concentrações de polifenóis foram de 98,76 e 73,24 µg de catequina/mL extrato, respectivamente. A maior atividade antioxidante, determinada pelo ensaio β -caroteno-ácido-linoléico, foi obtida para fração etanólica, embora apresente uma atividade 4 vezes menor que aquela encontrada em soluções 25 µg/mL de BHA e BHT.

3.4. Metodologias antioxidantes *in vitro*

O problema em se determinar a atividade antioxidante dos compostos envolve dois lados. Primeiro, em avaliar o potencial antioxidante, que é determinado pela composição de antioxidantes e propriedades oxidativas de seus constituintes. Segundo, determinar seus efeitos biológicos, que dependem, dentre outros, da biodisponibilidade dos antioxidantes (ROGINSKY e LISSI, 2004).

Não existe um único método que consiga avaliar satisfatoriamente a atividade antioxidante de uma amostra, visto que ela depende da técnica utilizada, do tipo e concentração do substrato, dos constituintes presentes no extrato avaliado, parâmetros metodológicos como tempo e temperatura do

ensaio, fenômeno de partição, fatores interferentes, dentre outros. É recomendado que sejam avaliados mais de dois parâmetros na determinação da atividade antioxidante dos compostos, por ensaios diferentes.

Os métodos utilizados para avaliação da ação antioxidante deveriam ser baseados na identificação dos diferentes mecanismos antioxidativos sob condições variadas, refletindo as propriedades multifuncionais dos antioxidantes nos processos oxidativos encontrados nos alimentos e nos processos fisiológicos (BECKER, NISSEN e SKIBSTED, 2004).

A grande diversidade de ensaios existentes para determinar a atividade antioxidante, aliada à aplicação de metodologias inadequadas e conhecimento insuficiente a respeito das propriedades antioxidativas que os testes medem, comprometem a veracidade das informações a respeito do potencial antioxidante de determinados compostos (SHAHIDI, 1995).

Resultados conflitantes de atividade antioxidante de certos compostos puros e extratos têm sido encontrados na literatura (da SILVA, 2003). Diversos fatores são responsáveis por essas diferenças como o método analítico utilizado, a estrutura física do sistema testado, a natureza do substrato para oxidação, presença de componentes interferentes, a maneira como a oxidação foi iniciada e o mecanismo de ação do antioxidante (BECKER, NISSEN e SKIBSTED, 2004).

Os métodos *in vitro* são avaliações potenciais da atividade antioxidante de um determinado composto puro ou extrato, já que a interação fisiológica entre o organismo e o antioxidante não é estudada, como ocorre nos métodos *in vivo*. Para a utilização de antioxidantes em alimentos, para fins tecnológicos, a avaliação *in vitro*, se bem conduzida, fornece uma estimativa importante do potencial antioxidativo do composto em análise.

Dentre os métodos espectrofotométricos *in vitro* mais utilizados atualmente estão o ensaio do DPPH radical (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), o teste de branqueamento β -caroteno e o método ABTS (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfônico) (ROBARDS, 2003).

BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET (1995) avaliaram a atividade antioxidante de cerca de 20 substâncias puras incluindo compostos fenólicos,

ácido ascórbico e isoascórbico. Para cada componente, determinaram a cinética de reação, o poder antioxidante, a estequiometria e a quantidade de radicais DPPH reduzidos.

O princípio do ensaio do DPPH é a redução do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, o qual apresenta o máximo de absorção a 515-520 nm. Ao abstrair um radical hidrogênio do antioxidante em estudo, observa-se uma diminuição da absorbância e da coloração.

O ensaio do DPPH é um teste rápido e simples, com boa reprodutibilidade dos resultados, que não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação. Entretanto, algumas precauções devem ser tomadas quanto à utilização do método e interpretação dos resultados, dentre eles, o tipo e concentração do composto analisado (composto puro ou mistura de compostos), cinética de reação do antioxidante, características do meio reacional (pH, tipo de solvente), presença de interferentes, sinergismo, afinidade solvente-substrato e maneira de expressar os resultados (ARNAO,2000; BONDET, BRAND-WILLIAMS e BERSET, 1997; BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995; LLESUY et al. , 2001; MOLYNEUX,2004).

CAI et.al.(2004) compararam a atividade antioxidante de extratos aquosos e metanólicos de 112 espécies de plantas utilizando o ensaio do cátion radical ABTS, relacionando esta atividade com o conteúdo fenólico deste vegetais. SONG e BARLOW (2004) utilizaram este ensaio para avaliar a capacidade antioxidante total de porções comestíveis e sementes de algumas frutas.

Neste ensaio, o cátion radical ABTS, o qual apresenta máximos de absorção a 417, 645, 734 e 815 nm, é obtido a partir do ácido 2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfônico, em meio saturado em oxigênio. Na presença de oxidantes doadores de oxigênio pode-se medir a redução da absorbância deste radical por espectrofotometria (CAMPOS, ESCOBAR e LISSI,1996; CAMPOS e LISSI, 1997; SILVA, 1999; EREL, 2004; RE et al.,1999).

O ensaio do ABTS^{•+}, apesar de simples, não caracteriza a reatividade da amostra e, muitas vezes, a relação entre a estrutura de fenólicos com o valor

TEAC parece ser injustificável. (ARNAO, 2000; HAENEN, 2005; ROGINSKY e LISSI, 2004). O cátion radical reage com alguns aromáticos hidroxilados independente do seu potencial antioxidante real. Grupos hidroxilas que não contribuem com a atividade antioxidante são incluídos na análise, o que pode superestimar os resultados. Além disso, a reação com doadores de hidrogênio apresenta baixa seletividade, e dependendo do composto, como por exemplo, alguns polifenólicos e produtos de origem natural, a reação com ABTS é muito lenta (BECKER, NISSEN e SKIBSTED, 2004; ROGINSKY e LISSI, 2004).

Algumas diferenças no método convencional são observadas quanto à utilização de alguns compostos capazes de gerar o cátion cromóforo ABTS^{•+}, como mioglobina (PENG et al.,2003), metmioglobina (ALONSO et al., 2002), dióxido de manganês (BENAVENTE-GARCÍA et al.,2000) e persulfato de potássio (CAI et.al.,2004; SOONG e BARLOW,2004), o que impede comparações entre os resultados em virtude das variações metodológicas.

ALONSO et al.(2002) desenvolveram um método para determinar o poder antioxidante de amostras de uvas e vinhos utilizando o ABTS^{•+} por meio de uma oxidação eletroquímica acelerada. Segundo os autores, o método eletroquímico é mais sensível, rápido, apresenta maior repetibilidade dos dados e fornece resultados confiáveis quando monitorado em um único intervalo de tempo e uma absorvância quando comparado ao método convencional.

AMIN, NORAZAIDAH e HAINIDA (2006) e SOKMEN et al.(2004) avaliaram a atividade antioxidante de extratos vegetais utilizando o ensaio β -caroteno/ácido linoléico. Este método baseia-se na descoloração do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico, em emulsão aquosa saturada em oxigênio. A adição de uma amostra contendo antioxidantes individuais, ou extratos naturais contribui para retardar a queda de absorvância do β -caroteno.

Uma desvantagem do o ensaio β -caroteno /ácido linoléico é a falta de reprodutibilidade dos valores de absorvância médios. Ademais, há dificuldade de interpretação dos resultados devido a interação do β -caroteno com o oxigênio. Apesar destes inconvenientes, o método é amplamente usado, já que não recorre a altas temperaturas, permitindo a determinação do poder

antioxidante de compostos termossensíveis e a avaliação qualitativa da eficácia antioxidante de extratos vegetais. (SILVA, 1999).

Estes ensaios não fazem distinção entre compostos individuais ou classes de compostos de bioativos, fornecendo somente medidas semi-quantitativas das substâncias detectadas. Apesar disso, continuam sendo utilizados em virtude de sua simplicidade, baixo custo e para obtenção de dados gerais de atividade de relevância direta (ROBARDS, 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram realizadas no Laboratório de Pigmentos Naturais e Secagem do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

As regiões de produção dos frutos “in natura” de *Schinus terebinthifolius Raddi* foram Alcobaça- BA, São Mateus-ES, Campos dos Goytacazes -RJ, Piaçabuçu-AL e Ouro Preto-MG. O período de coleta dos frutos foi maio de 2005. Dados geográficos das regiões de produção dos frutos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Dados geográficos das regiões de coleta dos frutos da espécie *Schinus terebinthifolius Raddi*.

Origem	Latitude	Longitude	Altitude
Alcobaça-BA	17°31´9"S	39°11´44"W	9 m
São Mateus-ES	18°42´57"S	39°51´32"W	37 m
Campos –RJ	21°45´15"S	41°19´27"W	13 m
Piaçabuçu-AL	10°24´20"S	36°26´3"W	4 m
Ouro Preto-MG	20°17´15"S	43°30´29"W	1179 m

Fonte: BIM IBGE 2000

Os frutos “in natura” provenientes das cidades de Alcobaça, São Mateus, Campos dos Goytacazes e Piaçabuçu foram coletados pela empresa exportadora de pimenta rosa, Agrorosa Ltda, situada na cidade de São Mateus, Espírito Santo.

Os frutos foram desidratados e selecionados na própria empresa por equipamentos eletrônicos, segundo sua densidade e coloração, sendo que frutos verdes, pretos e de maior densidade foram excluídos do processo de secagem. Apenas os frutos de menor densidade e coloração vermelha foram analisados neste trabalho.

Os frutos provenientes de Ouro Preto-MG, por não serem comercializados pela empresa Agrorosa, foram coletados por pesquisadores e selecionados manualmente em laboratório, segundo sua coloração, semelhante à dos frutos processados. Os frutos foram desidratados em

secador de bandeja a 60°C por aproximadamente 17h, até atingirem umidade próxima àquela encontrada nos frutos processados.

A matéria prima foi embalada em polietileno de alta densidade e armazenada a -18°C, em freezer horizontal, até o início das análises.

4.1. Determinação do método de extração do conteúdo fenólico da pimenta rosa

Os frutos secos, coletados em São Mateus-ES, foram triturados em liquidificador até atingirem granulometria uniforme.

Primeiramente avaliou-se o efeito de diferentes solventes, puros e em combinações, no conteúdo fenólico da pimenta rosa. Os sistemas extratores avaliados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Sistemas extratores utilizados na extração do conteúdo fenólico da pimenta rosa.

Sistema extrator
Metanol
Acetona
Etanol
Água
Metanol 70% (v/v)
Metanol 90% (v/v)
Acetona 70% (v/v)
Acetona 90% (v/v)
Acetona: Etanol (1:1; v/v)
Etanol 70% (v/v)
Etanol 90% (v/v)
Metanol: Acetona (1:1; v/v)

Adicionou-se 40 mL do sistema extrator em um béquer contendo 1g de secos frutos triturados, que permaneceu em repouso, a temperatura ambiente, por um período de 17 horas. Após este período, a mistura foi filtrada e seu volume completado para 100 mL com água destilada, para obtenção do extrato fenólico.

Após a determinação do sistema extrator mais eficiente quanto à ressuspensão da fração fenólica, avaliaram-se os efeitos da temperatura de

extração (temperaturas de ebulição), do pH (1% (v/v) de HCl concentrado) e da precipitação de proteínas (2 mL de tungstato de sódio 0,3 M em meio acidificado com 1% (v/v) de HCl concentrado).

O conteúdo fenólico total foi determinado pelo ensaio com o reagente Folin-Denis, segundo metodologia citada por SHAHIDI e NACZK (1995), com algumas modificações. A 1 mL do extrato fenólico, adicionou-se 7,5 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Denis, nesta ordem. A solução foi agitada, permanecendo 3 minutos em repouso, ao abrigo da luz. Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio. A solução permaneceu 1 hora em repouso no escuro. A solução “branco” foi preparada nas mesmas condições do extrato, substituindo-se o volume de extrato fenólico pelo volume dos solventes contidos no extrato fenólico, na proporção sistema extrator: água de 2:3 (v/v). As leituras espectrofotométricas da amostra e do branco foram realizadas a 725 nm em espectrofotômetro UV-1601 PC Shimadzu, em cubetas de quartzo. A quantificação de polifenóis totais foi feita com base na curva-padrão de ácido gálico P. A., preparada com soluções do padrão variando entre 0 e 170 mg/L. O conteúdo fenólico total foi expresso em “ácido gálico equivalente” (g ácido gálico equivalente/ 100 g pimenta rosa em peso seco).

4.2. Determinação do conteúdo fenólico da pimenta rosa, utilizando diferentes métodos de quantificação.

A amostra foi preparada triturando-se os frutos secos em liquidificador até atingirem granulometria uniforme. Foram utilizadas amostras com quantidades variando entre 0,3 g e 0,9 g de pimenta rosa. Os frutos foram coletados em São Mateus-ES

Os extratos fenólicos foram extraídos com o sistema extrator mais eficiente determinado no item 4.1, conforme procedimento descrito neste item. Os extratos foram quantificados utilizando os ensaios com os reagentes Folin-Denis, segundo metodologia descrita no item 4.1., e Folin-Ciocalteu, segundo metodologia citada por SHAHIDI e NACZK (1995), com algumas modificações.

A 2 mL do extrato fenólico, adicionou-se 2 mL do reagente Folin-Ciocalteu, diluído 10 vezes. A mistura foi agitada, permanecendo 3 minutos em repouso no escuro. Em seguida, 7,5 mL de solução de carbonato de cálcio 0,2% e 1 mL de água destilada foram adicionados, nesta ordem. A solução permaneceu 1 hora em repouso ao abrigo da luz. O branco foi preparado substituindo-se 1 mL do extrato fenólico por 1 mL dos solventes contidos no extrato, nas devidas proporções. As leituras espectrofotométricas da amostra e do branco foram realizadas a 760 nm. Os resultados foram calculados com base na curva-padrão de ácido gálico, preparada nas mesmas condições que a amostra. O conteúdo fenólico total foi expresso em g ácido gálico/ 100 g pimenta rosa em peso úmido.

A relação matemática entre os resultados do conteúdo fenólico determinado pelos ensaios Folin-Denis e Folin-Ciocalteu foi obtida por regressão.

4.3. Determinação de umidade

A umidade da pimenta rosa foi determinada pelo método da destilação com tolueno, segundo metodologia descrita pela AOAC (1995). Cerca de 50g da pimenta rosa triturada foi destilada com 250mL de tolueno, por um período de 6 horas. O teor de umidade foi obtido por leitura direta do volume de água perdido durante a evaporação e expresso em % p/p (g água/ 100g pimenta rosa), considerando $0,9970 \text{ g/cm}^3$ a densidade da água a 25°C . As médias dos resultados foram obtidas de três repetições.

4.4. Determinação do rendimento e da atividade antioxidante da oleorresina extraída da pimenta rosa, utilizando diferentes solventes e métodos de extração.

4.4.1. Quantificação da oleorresina

Avaliou-se o rendimento da oleorresina de pimenta rosa, extraída a frio e em soxhlet com os solventes hexano, éter de petróleo, éter etílico, álcool etílico

e acetona. Os frutos utilizados nas análises foram coletados em São Mateus-ES.

A oleorresina foi extraída por dois métodos: a frio e em soxhlet. Na extração a frio, adicionou-se 100 mL do solvente em um béquer contendo 10 g de pimenta rosa triturada, a temperatura ambiente. A mistura permaneceu em repouso por um período de 48h. A solução foi filtrada a vácuo utilizando filtro de papel Whatman nº 1, transferida para um balão previamente pesado e concentrada em rota-vapor a 37°C, até completa evaporação do solvente.

A outra extração foi realizada em aparelho Soxhlet, por um período de 6h, utilizando 6 g de pimenta rosa triturada, e aproximadamente 250 mL do solvente. Após a extração, o solvente foi recuperado no próprio aparelho e o balão reservado para quantificação da oleorresina.

Os balões contendo a oleorresina permaneceram em estufa a 105°C, por um período de 1 h. Estes foram colocados em dessecador até atingirem temperatura ambiente, e pesados posteriormente em balança analítica. O rendimento de oleorresina presente na pimenta rosa foi expresso em %p/p (g oleorresina/ 100g pimenta rosa em peso seco).

4.4.2. Atividade antioxidante da oleorresina

Os frutos secos utilizados nas análises foram coletados em São Mateus-ES. O procedimento utilizado para extração da oleorresina está descrito no item 4.4.1. Entretanto, para evitar uma possível degradação dos compostos antioxidantes presentes na amostra, a etapa de evaporação do solvente foi realizada somente em rota-vapor a 37°C, ao abrigo da luz.

O extrato etanólico foi preparado diluindo-se uma alíquota de oleorresina em etanol absoluto 99,9% pureza, na diluição 1:1000 (v/v) para os solventes etanol e acetona; 1:500 (v/v) para éter etílico; 1:20 (v/v) para os solventes éter de petróleo e hexano.

A atividade antioxidante foi determinada pelo ensaio do radical livre DPPH, segundo metodologia descrita por BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET (1995), com modificações. A 1mL do extrato etanólico foi adicionado 3 mL de solução de DPPH 0,1mM. O branco foi preparado substituindo 1mL do

extrato etanólico por 1mL de etanol absoluto 99,9% pureza. A absorbância do branco (A_0) foi determinada imediatamente após a mistura (tempo zero) e a absorbância do extrato etanólico (A_{30}) foi lida após 30 min de repouso no escuro. A atividade antioxidante das oleorresinas extraídas por diferentes métodos e solventes foi determinada em três repetições, em triplicata. A concentração de DPPH remanescente no meio de reação foi calculada com base na curva de calibração de DPPHr. A atividade antioxidante da oleorresina foi expressa em μ moles radicais DPPH reduzidos / g pimenta rosa em peso seco.

4.4.3. Estudo cinético

A evolução dos diferentes tipos de cinética de reação depende da natureza do antioxidante que está sendo testado. Três comportamentos cinéticos são observados: **rápido**, em que os compostos antioxidantes reagem imediatamente com os radicais livres DPPH, atingindo o estado estacionário em menos de um minuto; **intermediário**, em que este comportamento ocorre entre 5 e 30 minutos; e **lento**, em que o tempo necessário para os compostos alcançarem o estado estacionário se encontra entre 1 e 6 horas (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995). Neste último caso, a determinação da atividade antioxidante dos compostos no intervalo de 30 minutos de reação pode ser errônea e comprometer a veracidade dos resultados, pois a reação entre os radicais livres DPPH e estes compostos ainda pode estar progredindo após este período.

A cinética de reação global das oleorresinas extraídas a frio com os solventes etanol, acetona, éter etílico, hexano e éter de petróleo foi estudada com base no monitoramento do decréscimo de absorbância dos radicais livres DPPH presentes no meio de reação em virtude da redução destes radicais pelos compostos antioxidantes.

As oleorresinas foram diluídas em etanol absoluto, 99,9% pureza, e várias diluições foram preparadas. Para as oleorresinas extraídas com os solventes hexano e éter de petróleo, foram preparadas diluições nas proporções 1:5; 1:10; 1:25; 1:50; 1:100 e 1:200 (v/v: mL oleorresina / mL

solução etanólica); para aquelas extraídas com éter etílico as diluições foram 1:100; 1:250; 1:500; 1:800; 1:1000 e 1:2000 (v/v); e para as oleorresinas extraídas com etanol e acetona as diluições estudadas foram 1:250; 1:500; 1:800; 1:1000; 1:2000 e 1:5000 (v/v). As diluições foram expressas em g oleorresina/ mmoles radical DPPH presentes no meio de reação antes da mistura dos radicais livres com a oleorresina diluída. A densidade das oleorresinas foi determinada pesando-se 1 mL da oleorresina em balança analítica, em seis repetições.

A atividade antioxidante foi determinada utilizando o ensaio do radical livre DPPH, segundo metodologia descrita no item 4.4.2. As leituras espectrofotométricas foram feitas em 517 nm, no tempo zero e a cada 15 minutos, durante 6 horas. A concentração de DPPH remanescente no meio de reação foi calculada segundo a curva de calibração de DPPHr.

Para cada diluição preparada, plotou-se a cinética de reação, representada por meio de curvas da % do radical livre DPPH remanescente no meio de reação em função do tempo (min). Este procedimento foi repetido para todas as oleorresinas. Para cada diluição, detectou-se o intervalo em que a redução destes radicais livres já não ocorre ou é muito discreta (estado estacionário). Neste intervalo, a porcentagem do radical livre DPPH remanescente foi determinada e utilizada para construir a curva % DPPH remanescente no estado estacionário em função das diluições da oleorresina. O valor do EC_{50} , definido como a quantidade do antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical livre DPPH, num determinado intervalo de tempo, foi determinado a partir desta curva. A atividade antioxidante de cada oleorresina foi expressa pelo EC_{50} . Determinou-se também o valor do EC_{50} para o padrão Trolox, seguindo o mesmo procedimento descrito para as oleorresinas.

4.5. Quantificação da fração fenólica, da oleorresina e do óleo essencial da pimenta rosa, coletada em diferentes regiões.

A origem dos frutos de *Schinus terebinthifolius Raddi* a serem analisados são Alcobaça- BA, São Mateus-ES, Campos-RJ, Piaçabuçu–AL e Ouro Preto-MG.

4.5.1. Fração Fenólica

A amostra foi preparada triturando-se os frutos secos em liquidificador até atingirem granulometria uniforme. O extrato fenólico foi obtido a partir de 0,8g de amostra, conforme procedimento descrito no item 4.1. Dois sistemas extratores foram utilizados: acetona 70% (v/v) e acetona 70% (v/v) acidificada com 1% (v/v) de HCl concentrado.

O conteúdo fenólico total foi determinado pelo ensaio com reagente Folin-Denis, segundo metodologia descrita no item 4.1. O conteúdo fenólico total foi expresso em g ácido gálico equivalente / 100 g pimenta rosa em peso seco, de acordo com a curva-padrão de ácido gálico P.A.

4.5.2. Oleorresina

A oleorresina foi extraída dos frutos secos com acetona a frio, conforme metodologia descrita no item 4.4.1. O rendimento da oleorresina foi expresso em % p/p (g oleorresina/ 100g pimenta rosa em peso seco).

4.5.3. Óleo Essencial

O óleo essencial foi extraído por arraste de vapor em um destilador de óleo essencial (TECNAL, modelo Te-276/2), na proporção de 100g de pimenta rosa triturada para 500mL de água destilada. O tempo mínimo necessário para se obter o teor máximo do óleo essencial foi determinado e utilizado nas análises. O volume do óleo foi determinado através de leitura direta no coletor.

O teor de óleo essencial foi expresso em %v/p (mL óleo essencial / 100g pimenta rosa em peso seco).

4.6. Determinação da atividade antioxidante da fração fenólica, da oleorresina e do óleo essencial de pimenta rosa, coletada em diferentes regiões.

4.6.1. Fração Fenólica

O extrato fenólico obtido no item 4.5.1. foi utilizado na determinação da atividade antioxidante imediatamente após sua quantificação.

O extrato etanólico foi preparado diluindo-se uma alíquota do extrato fenólico em etanol absoluto 99,9% pureza, na diluição 1:10 (v/v). A atividade antioxidante do extrato etanólico foi determinado conforme procedimento descrito no item 4.4.2. A absorbância do branco (A_0) foi determinada imediatamente após a mistura (tempo zero) e a absorbância da amostra (A_{30}) foi lida após 30 min de repouso no escuro. As leituras espectrofotométricas foram feitas em 517 nm. A concentração de DPPH remanescente no meio de reação foi calculada segundo a curva de calibração de DPPHr. A atividade antioxidante da fração fenólica foi expressa em mmoles DPPH reduzido/ g de pimenta rosa em peso seco.

A proporção entre a quantidade de radicais livres reduzidos pelo conteúdo fenólico foi expressa em mmoles DPPH reduzido/ g ácido gálico. O conteúdo fenólico dos frutos secos, determinado no item 4.5.1, foi utilizado nos cálculos.

4.6.2. Oleorresina

O procedimento utilizado para extração da oleorresina foi descrito no item 4.4.2. O extrato etanólico foi preparado diluindo-se uma alíquota de oleorresina em etanol absoluto 99,9% pureza, na proporção 1:1000 (v/v).

A atividade antioxidante da oleorresina foi determinada pelo ensaio do radical livre DPPH, segundo metodologia descrita no item 4.4.2, e expressa em % Inibição, segundo a equação descrita a seguir,

$$\%I = \frac{(A_0 - A_{30})}{A_0} \times 100;$$

em que A_0 é a absorvância do branco no tempo zero e A_{30} a absorvância da amostra após 30 min de repouso no escuro.

4.6.3. Óleo Essencial

O extrato etanólico foi obtido diluindo-se uma alíquota do óleo essencial em etanol absoluto 99,9% pureza, na diluição 1:5 (v/v).

A atividade antioxidante do óleo essencial foi determinada segundo procedimento descrito no item 4.4.2., imediatamente após sua quantificação. A atividade antioxidante foi expressa em % Inibição, segundo a equação descrita no item anterior.

4.7. Correlação entre métodos in vitro utilizados na avaliação da atividade antioxidante.

4.7.1. Obtenção do extrato

O extrato fenólico foi preparado a partir de 0,8002g de pimenta rosa, coletada na cidade de Piaçabuçu (AL), nas mesmas condições descritas no item 4.1. O conteúdo fenólico total da pimenta rosa foi quantificado pelo ensaio com o reagente Folin-Denis, conforme metodologia descrita no item 4.1., e utilizado logo em seguida na determinação de sua atividade antioxidante.

Uma alíquota do extrato fenólico foi diluída em etanol absoluto 99,9% pureza, nas proporções 1:10; 1:20; 1:25; 1:40; 1:50 e 1:100 (v/v: mL extrato fenólico/ mL solução etanólica). Os extratos etanólicos foram utilizados em todas as análises de atividade antioxidante.

O Trolox, substância análoga à vitamina E, foi utilizada como padrão.

4.7.2. Ensaio do radical livre DPPH

A atividade antioxidante foi determinada pelo ensaio do DPPH*, segundo metodologia descrita por BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET (1995), conforme procedimento descrito no item 4.4.2.

O branco foi preparado substituindo 1mL do extrato por 1mL de etanol absoluto 99,9% pureza. A absorbância do branco foi determinada imediatamente após a mistura (tempo zero) e a absorbância da amostra foi lida no tempo zero e a cada 15 min após a mistura, durante 3 horas. As leituras espectrofotométricas foram feitas em 517 nm.

A atividade antioxidante foi expressa pelo EC₅₀, determinado segundo procedimento descrito no item 4.4.3; em % radical DPPH remanescente; em micromoles radical DPPH reduzido / mL extrato fenólico; pelo valor TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox, em mM), utilizando a curva padrão de Trolox; e em % Inibição (%I), segundo a equação descrita a seguir:

$$\%I = \frac{(A_0 - A_t)}{A_0} \times 100;$$

em que A₀ é a absorbância do branco no tempo zero e A_t a absorbância da amostra após “t” min de repouso no escuro.

4.7.3. Ensaio do cátion radical ABTS

A atividade antioxidante foi determinada pelo ensaio do cátion radical ABTS, segundo metodologia descrita por CAI et al. (2004), com modificações.

Em um tubo de ensaio misturou-se solução de ABTS 7mM e persulfato de potássio 2,45 mM na proporção 1:1 (v/v). A mistura permaneceu 15 min em banho-maria a 50°C, ao abrigo da luz para gerar o cátion cromóforo ABTS. A solução de ABTS^{•+} foi preparada diluindo a mistura com etanol absoluto até atingir absorbância 0,700 ± 0,050 no comprimento de onda 734 nm.

O branco foi preparado substituindo 1mL do extrato por 1mL de etanol absoluto 99,9% pureza. 3,5 mL da solução de ABTS foi adicionada a 0,5 mL de

extrato. A absorbância da amostra foi lida imediatamente e a cada 15 minutos, por um período de 3 horas. As leituras espectrofotométricas foram feitas em 734 nm.

A atividade antioxidante foi expressa em % Inibição (%I), segundo a equação descrita no item 4.7.2. e pelo valor TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox, em mM). O valor TEAC foi calculado utilizando a curva padrão de Trolox, preparada com soluções do padrão variando entre 0 e 0,15 mM.

4.7.4. Ensaio do sistema emulsionado -caroteno- ácido linoléico

A atividade antioxidante foi determinada pelo ensaio da emulsão - Caroteno-ácido linoléico, segundo metodologia descrita por WETTASINGHE e SHAHIDI (1999).

Adicionou-se 2mL de solução de -caroteno (0,2 mg/ mL clorofórmio) em um balão de fundo redondo contendo 20 µL de ácido linoléico e 200µL de Tween 40. A mistura foi evaporada em rota-vapor a 40°C, por 10 minutos, para remoção do clorofórmio. Após a evaporação, adicionou-se à mistura 100mL de água destilada saturada em oxigênio (30 minutos de oxigenação), que foi agitada para formar a emulsão.

A 0,2 mL de extrato adicionou-se 5mL da mistura, que foi colocada em banho-maria a 50°C por 2h. A solução branco foi preparada adicionando 0,2 mL de extrato e a 5 mL da mistura sem o -caroteno, sob as mesmas condições da amostra. Leituras espectrofotométricas do branco e da amostra foram feitas a 470nm, imediatamente após a mistura e a cada 15 minutos, por um período de 3 horas. A atividade antioxidante foi determinada em % Inibição (%I), segundo a equação descrita no item 4.7.2.; e pelo Índice do Antioxidante (I.A.), segundo a equação descrita a seguir:

$$I.A.= 100 \times [(A_s - A_c) / (A_0 - A_c)];$$

em que A_0 é o valor de absorvância no tempo inicial de incubação para o controle, e A_s e A_c são os valores de absorvância para as amostras ou padrão e o controle, respectivamente, após o intervalo de “t” minutos de incubação.

4.8. Aceitabilidade da pimenta rosa

A pimenta rosa é um condimento de sabor refinado utilizado nas mais exigentes culinárias para temperar carnes brancas, salames e massas, além de conferir sabores exóticos a bebidas e doces, como coquetéis e chocolate.

O condimento apresenta grande potencial econômico, visto que apresenta elevados valores de mercado e grande demanda no exterior. Embora seja um produto nativo da flora brasileira, a maioria dos frutos desidratados da aroeira produzidos no Brasil é exportada. No país, a procura por este condimento vem crescendo, apesar de incipiente. A pimenta rosa é comercializada a granel, nas casas de temperos, ou em potes de vidro nos supermercados, e até o momento, não se tem informações a respeito de sua utilização em produtos industrializados.

Neste contexto, é necessário avaliar a aceitabilidade da pimenta rosa pelos consumidores, o que contribuirá para divulgação de um produto da flora nativa e, conseqüentemente, agregação de valor da matéria-prima, geração de empregos e divisas para o país.

4.8.1. Em salmão

O teste sensorial foi realizado nos supermercados BAHAMAS e CARREFOUR, na cidade de Juiz de Fora-M.G. A avaliação sensorial das amostras foi realizada entre de 8:30 h às 10:30 h e de 14:00 h às 17:00 h, com 250 provadores que se propuseram a avaliá-las.

As amostras foram preparadas no local do teste e servidas aos provadores rapidamente. O salmão foi grelhado em azeite de oliva a temperatura média (180°C), e adicionado de um pouco de sal. Foram servidas duas porções do peixe aos provadores, e em uma delas foi adicionada a pimenta rosa, moída e peneirada, em quantidade suficiente a cobrir o peixe.

Os provadores foram orientados a degustar, aleatoriamente, as porções de salmão, bebendo um pouco de água entre uma porção e outra.

Após a degustação, os provadores preencheram duas fichas de avaliação (Figura 1), uma referente à avaliação do salmão (controle) e a outra referente à avaliação do salmão com a pimenta rosa (amostra). A escala utilizada no teste de aceitação foi a escala hedônica estruturada de nove pontos.

Nome: _____ Idade: _____ SEXO: () M () F	
Por favor, avalie a amostra abaixo e indique o quanto você gostou ou desgostou do produto.	
Nota	Código da Amostra
9 () Gostei extremamente	_____
8 () Gostei muito	
7 () Gostei moderadamente	
6 () Gostei ligeiramente	
5 () Indiferente	
4 () Desgostei ligeiramente	
3 () Desgostei moderadamente	
2 () Desgostei muito	
1 () Desgostei extremamente	
Comentários: _____	

Figura 1: Ficha de avaliação utilizada no teste sensorial

4.8.2. Em chocolate

Os testes sensoriais foram realizados no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa. A avaliação sensorial das amostras foi realizada em cabines individuais, com iluminação natural. Os testes foram realizados entre 8:30 h às 10:30 h e de 14:00 h às 17:00 h.

As amostras consistiram de bombons de chocolate preto e chocolate branco elaborados com a pimenta rosa triturada. Os bombons foram adquiridos da empresa Sabor e Arte-Ltda, situada em Viçosa-MG.

A aceitabilidade da pimenta rosa foi avaliada separadamente para cada tipo de chocolate, utilizando escala hedônica estruturada de nove pontos. Em

cada teste sensorial, as amostras foram analisadas individualmente, por 112 consumidores que se propuseram a realizar o teste. Os provadores utilizaram a ficha de avaliação apresentada na Figura 1, indicando o quanto gostaram ou desgostaram da amostra.

4.9. Análise Estatística

Para avaliar o efeito do sistema extrator no conteúdo fenólico, o experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram analisados por meio de análise de variância ($P < 0,05$), em três repetições, em duplicatas. Utilizou-se para a análise dos dados o suplemento “Ferramentas de Análise” do Excel, item “ANOVA fator único”. As médias do conteúdo fenólico foram comparadas utilizando o teste de Tukey ($P < 0,05$).

A relação matemática entre os resultados de quantificação do extrato fenólico determinados pelos ensaios Folin-Denis e Folin-Ciocalteu foi determinada por meio de curva de regressão, ao nível de 5% de probabilidade.

Para avaliar o efeito dos diferentes solventes e dos métodos de extração no rendimento e na atividade antioxidante da oleorresina de pimenta rosa realizou-se um experimento fatorial 2×5 , com 2 métodos de extração e 5 solventes, segundo delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram analisados por meio de análise de variância ($P < 0,05$), utilizando o suplemento “Ferramentas de Análise” do Excel, item “ANOVA fator duplo com repetição”. As médias dos dados foram obtidas de três repetições e comparadas pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

O rendimento e a atividade antioxidante da fração fenólica, do óleo essencial e da oleorresina, de diferentes origens foram expressos como médias de três repetições.

Os resultados do teste de aceitabilidade da pimenta rosa em salmão foram tabulados e analisados pelo teste t para dados pareados, ao nível de 5 % de probabilidade. A aceitabilidade da pimenta rosa em chocolate branco e em chocolate preto foi representada pelas médias de cada teste individualmente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação do método de extração do conteúdo fenólico da pimenta rosa

A escolha do método de extração foi um fator decisivo para a recuperação do conteúdo fenólico total da pimenta rosa, já que as características do sistema extrator, como polaridade do solvente utilizado, determinam o tipo de compostos presentes no extrato. Isto pode ser demonstrado pela grande variação nos resultados do conteúdo fenólico da pimenta rosa em resposta aos diferentes sistemas extratores, apresentados no Quadro 1.

Quadro 1: Efeito de diferentes sistemas extratores na ressuspensão de fenólicos totais da pimenta rosa.

Sistema Extrator	Conteúdo Fenólico (g AGE/ 100g pimenta rosa em peso seco)
Acetona 70% (v/v)	1,495 ± 0,044 a
Acetona 90% (v/v)	1,252 ± 0,211 a
Metanol: acetona (1:1; v/v)	1,153 ± 0,035 b
Metanol 70% (v/v)	1,130 ± 0,038 b
Metanol 90% (v/v)	1,111 ± 0,075 b
Etanol 70% (v/v)	1,077 ± 0,047 b
Etanol 90% (v/v)	0,974 ± 0,025 b
Acetona: etanol (1:1; v/v)	0,944 ± 0,201 b
Metanol	0,935 ± 0,056 b
Etanol	0,917 ± 0,134 b
Acetona	0,708 ± 0,050 c
Água	0,437 ± 0,025 c

* Dados apresentados como médias ± desvio padrão, de três repetições, em triplicata. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P > 0,05).

Em geral, solventes mais polares extraem maior quantidade de fenólicos. Entretanto, a utilização de solventes puros, que apresentam faixa de solubilidade limitada, não contribuiu efetivamente para extração de fenólicos da pimenta rosa. De acordo com os resultados apresentados no Quadro 1, os solventes puros água, acetona, etanol e metanol apresentaram a menor

eficiência para a extração de fenólicos. Dentre os solventes puros estudados, os álcoois extraíram a maior quantidade destes compostos.

DEGÁSPARI, WASZCZYNSKYJ e SANTOS (2004) submeteram os frutos secos à extração de fenólicos totais com etanol absoluto a 20°C/1h e água deionizada a 50°C/ 1h, após retirada de substâncias lipídicas com éter etílico em aparelho Soxhlet. Considerando os resultados obtidos neste trabalho, o método de extração e o tipo de solvente utilizado pelos pesquisadores parecem não contribuir efetivamente para a recuperação de fenólicos totais da pimenta rosa, em virtude da faixa de solubilidade limitada dos solventes puros. Além disso, o tempo de extração de 1h em baixas temperaturas pode ser insuficiente para uma boa extração destes compostos. Entretanto, comparações entre os resultados do conteúdo fenólico total encontrados por DEGÁSPARI, WASZCZYNSKYJ e SANTOS (2004) e os resultados deste experimento não podem ser realizadas, visto que há diferenças metodológicas como o tipo de ensaio e o padrão utilizados para quantificação, a região de coleta dos frutos, dentre outros.

Misturas aquosas de solventes polares aumentaram o poder de extração de compostos fenólicos da pimenta rosa, pois ampliaram sua faixa de solubilidade. As misturas aquosas de acetona (acetona 70% e acetona 90%) foram os sistemas de solventes mais eficientes na extração do conteúdo fenólico total da pimenta rosa, o que sugere a predominância de fenóis poliméricos nos frutos.

Neste estudo, a inativação enzimática foi considerada desnecessária, visto que foram encontrados resultados do conteúdo fenólico superiores àquele encontrado com metanol 90%, utilizado para inativação de enzimas.

Para avaliar os efeitos da temperatura, acidificação do meio e precipitação de proteínas na extração de fenólicos totais, utilizou-se acetona 70% (v/v) como solvente extrator. O conteúdo de fenólicos totais da pimenta rosa está apresentado no Quadro 2.

Quadro 2: Efeito da temperatura de extração, pH e precipitação de proteínas com tungstato de sódio na ressuspensão de fenólicos totais da pimenta rosa.

Sistema Extrator	Conteúdo Fenólico (g AGE/ 100g pimenta rosa em peso seco)
Acetona 70% (v/v) + 1% (v/v) HCl	2,343 ± 0,023 a
Acetona 70%(v/v)+ 1% (v/v) HCl (2 ml tungstato 0,3M)	2,294 ± 0,047 a
Acetona 70% (v/v)	1,495 ± 0,044 b
Acetona 70% (v/v) / 63°C / 10 min	1,220 ± 0,087 c
Acetona 70% (v/v) + 1% (v/v) HCl) / 63°C / 10 min	1,219 ± 0,097 c
Água / 100°C / 15 min	1,003 ± 0,054 c
Água	0,437 ± 0,025 d

* Dados apresentados como médias ± desvio padrão, de três repetições, em triplicata. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P > 0,05).

De acordo com os resultados do conteúdo fenólico apresentados no Quadro 2, o uso de calor contribuiu para aumentar a ressuspensão de fenólicos da pimenta rosa quando estes compostos foram extraídos com água em ebulição (100°C), em comparação à extração a frio. Entretanto, um efeito negativo da temperatura foi observado quando os fenólicos totais da pimenta rosa foram extraídos com acetona 70%(v/v) em ebulição (63°C), quando comparado com o sistema a frio. Esta redução no conteúdo fenólico total pode ter ocorrido em razão da degradação térmica de fenólicos (IBANEZ et al., 1999). Assim, a avaliação do efeito da temperatura na extração de fenólicos deve estar associada a um estudo em conjunto que inclui o tempo de extração e o tipo de sistema extrator utilizado, evitando assim, a degradação destes compostos.

Segundo os resultados apresentados no Quadro 2, água em ebulição foi um dos sistemas extratores menos eficientes para extrair compostos fenólicos da pimenta rosa. Por outro lado, NESELLO et al. (2004) obtiveram o maior conteúdo fenólico da pimenta rosa por processo de hidrossolubilização a quente durante 2 horas. Espera-se que as condições experimentais utilizadas por NESELLO et al. (2004) possam ter provocado degradação de compostos fenólicos em razão do tempo prolongado de extração e do tipo de solvente utilizado. Ademais, poucos sistemas extratores foram avaliados para extração

de fenólicos totais da pimenta rosa e, conseqüentemente, há escassez de dados a serem comparados.

A acidificação do meio empregada com a finalidade de alterar a estrutura e a solubilidade de alguns compostos aumentou o conteúdo de fenólicos totais da pimenta rosa quando extraída com acetona 70% (Quadro 2). Entretanto, a aplicação de temperaturas de ebulição em meio acidificado (acetona 70% (v/v) acidificada com 1%(v/v) de HCl) provocou a degradação de substâncias fenólicas, reduzindo em 48% o conteúdo fenólico quando comparado à extração a frio.

A adição de 2 mL de tungstato de sódio 0,3 M em meio acidificado para precipitar proteínas durante a extração de fenólicos totais da pimenta rosa com etanol 70%, não apresentou alteração significativa no conteúdo fenólico quando os compostos foram extraídos com acetona 70%, o que torna seu uso injustificável.

CHAVAN, SHAHIDI e NACZK (2001) extraíram taninos condensados de três variedades de ervilha e concluíram que acetona 70% (v/v) acidificada com 1% de HCl concentrado extraiu a máxima quantidade de taninos condensados destes vegetais. QUEIROZ, MORAIS e NASCIMENTO (2002) extraíram taninos da aroeira-preta com acetona 70% (v/v), encontrando o maior rendimento para extratos obtidos com este sistema.

Segundo dados apresentados no Quadro 2, o maior conteúdo fenólico da pimenta rosa foi obtido quando se utilizou acetona 70% (v/v) acidificada com 1% de HCl concentrado, o que sugere um enriquecimento do extrato com taninos condensados e a predominância destes compostos na pimenta rosa. A elevada quantidade de taninos pode ser explicada pelo fato de somente frutos maduros de *Schinus terebinthifolius Raddi*, selecionados eletronicamente durante o processamento, terem sido analisados, pois durante a maturação ocorre uma maior transformação de polifenólicos em compostos poliméricos de alto peso molecular (CHAVAN, SHAHIDI e NACZK, 2001; DESHPANDE e CHERYAN, 1985; SALUNKHE et al., 1982).

5.2. Determinação do conteúdo fenólico da pimenta rosa, utilizando diferentes métodos de quantificação

A relação matemática entre os dados de conteúdo fenólico da pimenta rosa obtidos pelos ensaios Folin-Denis e Folin-Ciocalteu pode ser visualizada na Figura 2.

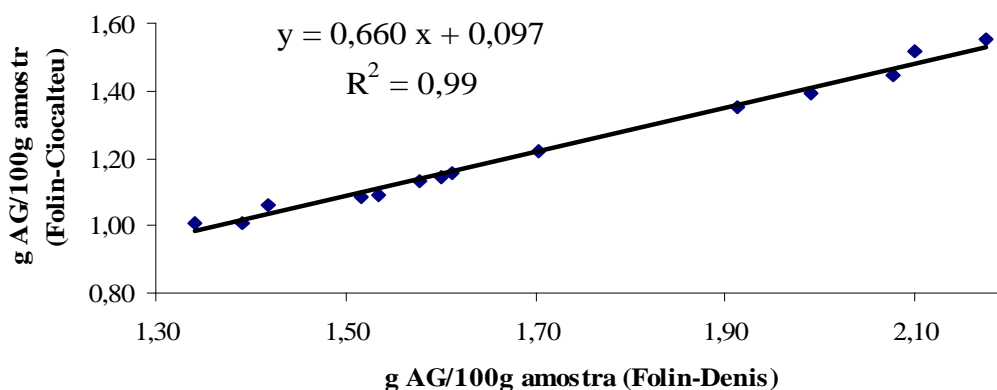


Figura 2: Regressão entre os resultados do conteúdo fenólico da pimenta rosa (g ácido gálico / 100g pimenta rosa em peso úmido), determinados pelos ensaios Folin-Denis e Folin-Ciocalteu.

Apesar dos ensaios fornecerem resultados diferentes, ambos expressam o conteúdo fenólico total, e apresentam ótima relação matemática, o que pode ser demonstrado pelo coeficiente de regressão obtido ($R^2 = 0,99$). Assim, resultados do conteúdo fenólico da pimenta rosa podem ser transformados e correlacionados para ambos os ensaios através da função encontrada, criando uma alternativa para a análise e possibilitando comparações.

5.3. Determinação de umidade

A destilação eliminou possíveis variações nos resultados relacionadas com a degradação térmica de voláteis devido a altas temperaturas, como ocorre no método gravimétrico em estufa a 105°C. Os valores de umidade dos frutos secos estão apresentados no Quadro 3.

Quadro 3: Umidade (%p/p) da pimenta rosa.

Origem	Teor de água (%p/p)
São Mateus-ES	7,71 ± 0,64
Piaçabuçu-AL	3,92 ± 0,12
Campos-RJ	7,44 ± 0,61
Alcobaça-BA	8,04 ± 0,68
Ouro Preto-MG	6,68 ± 0,20

* Dados apresentados como médias ± desvio padrão, de três repetições.

Os frutos da aroeira quando recém colhidos apresentam-se com elevada atividade de água e substratos, o que favorece a ação enzimática e alterações fisiológicas, com conseqüentes perdas de constituintes voláteis e de princípios ativos, além de mudanças na textura e na coloração. Assim, para garantir a qualidade sensorial e microbiológica da pimenta rosa, os frutos da aroeira devem ser comercializados na forma dessecada.

A variação entre o teor de água dos frutos de diferentes origens demonstra a falta de controle e padronização da etapa de secagem. Essa heterogeneidade pode comprometer a qualidade do produto. Uma elevada atividade de água pode criar condições favoráveis para o crescimento de microorganismos e, conseqüentemente, reduzir a vida de prateleira e aceitação mercadológica da pimenta rosa. Em contrapartida, a retirada excessiva de água durante a secagem acelera os processos oxidativos, além de ser um fator anti-econômico (ARAUJO,1999).

5.4. Determinação do rendimento e da atividade antioxidante da oleorresina extraída de pimenta rosa, utilizando diferentes solventes e métodos de extração.

5.4.1. Quantificação da oleorresina

O efeito do solvente no rendimento de oleorresina foi dependente do método de extração utilizado. Considerando a interação entre o tipo de solvente e o método de extração significativa ($P < 0,05$), as fontes de variação foram desdobradas por meio da análise de variância ($P < 0,05$). Os rendimentos

das oleorresinas extraídas em soxhlet e a frio com os solventes etanol, acetona, éter etílico, éter de petróleo e hexano estão apresentados no Quadro 4, para a extração em soxhlet e no Quadro 5, para a extração a frio.

Quadro 4: Efeito do tipo de solvente no rendimento (%p/p) da oleorresina de pimenta rosa extraída em soxhlet.

Solventes	Rendimento da oleorresina (%p/p)
Etanol	48,61 ± 1,90 a
Acetona	18,62 ± 0,46 b
Éter etílico	14,75 ± 0,33 c
Éter de petróleo	11,83 ± 0,81 d
Hexano	10,65 ± 0,42 d

* Dados expressos como médias ± desvio padrão, de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P > 0,05).

Quadro 5: Efeito do tipo de solvente no rendimento (%p/p) da oleorresina de pimenta rosa extraída a frio.

Solventes	Rendimento da oleorresina (%p/p)
Etanol	28,48 ± 1,36 a
Acetona	15,35 ± 0,34 b
Éter etílico	13,47 ± 0,33 b
Éter de petróleo	9,71 ± 0,23 c
Hexano	9,53 ± 0,56 c

* Dados expressos como médias ± desvio padrão, de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P > 0,05).

O efeito do método de extração foi significativo (P < 0,05) quando a extração foi feita com os solventes etanol, acetona e éter de petróleo. As oleorresinas extraídas com estes solventes em aparelho Soxhlet apresentaram maior rendimento que quando extraídas a frio. Isso pode ser explicado em virtude da temperatura interferir na capacidade de dissolução de um solvente com relação a um certo soluto. À medida que se eleva a temperatura, ocorre um aumento na capacidade de solubilização de alguns compostos no solvente, aumentando a eficiência da extração. Ademais, a agitação do solvente também pode ter favorecido a homogeneização da matéria-prima, aumentando a superfície de contato disponível para a extração.

De acordo com os resultados encontrados nos Quadros 4 e 5, os rendimentos das oleorresinas extraídas em soxhlet com etanol, acetona e éter de petróleo foram 70,7%, 21,3% e 24,13% maiores que na extração a frio, respectivamente, mostrando que o efeito da temperatura na extração é diferente para cada tipo de solvente utilizado.

Os dados apresentados no Quadro 4 mostram que, apesar de possuir elevada temperatura de ebulição (78°C) quando comparado à acetona (56°C) e éter de petróleo (60°C), etanol foi o solvente mais eficiente na extração em soxhlet. Para extração das oleorresinas com etanol, acetona e éter de petróleo em soxhlet, que apresentam temperaturas de ebulição superiores a 40°C, deveria ter ocorrido degradação de compostos termolábeis, entretanto, uma quantidade muito maior de compostos foi extraída em virtude da elevação da temperatura.

O efeito do método de extração nos rendimentos das oleorresinas não foi significativo quando estas foram extraídas com éter etílico e hexano, indicando que, para estes solventes, a elevação da temperatura não aumentou a solubilização dos compostos presentes na pimenta rosa.

Em geral, solventes polares tendem a dissolver solutos polares, e solventes não polares a dissolver solutos não polares. Funções orgânicas como --OH, --NH, --CONH, --COOH, são mais solúveis em solventes hidroxilados polares como água, metanol e etanol, do que em hidrocarbonetos como éter de petróleo e hexano. Os compostos com mais de um grupo funcional apresentam grande polaridade, por isso não são solúveis em éter etílico, que apresenta baixíssima polaridade, ou em éter de petróleo e hexano, solventes apolares. Os compostos com menor polaridade são os que apresentam menor reatividade como, por exemplo, as parafinas, compostos núcleos aromáticos e os derivados halogenados.

O efeito do tipo de solvente utilizado na extração foi significativo ($P < 0,05$) para cada um dos métodos de extração estudados. De acordo com os resultados apresentados nos Quadros 4 e 5, pode-se afirmar a predominância de compostos polares na pimenta rosa, já que a ordem do rendimento das oleorresinas acompanha a ordem de polaridade dos solventes.

Etanol foi o solvente mais eficiente na extração da oleorresina, para ambos os métodos de extração. Acetona e éter etílico alcançaram resultados intermediários, sendo o rendimento da oleorresina extraída com acetona maior que com éter etílico, para o método em soxhlet, e estatisticamente iguais pelo método a frio. Os rendimentos das oleorresinas extraídas com éter de petróleo e hexano não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$), para ambos os métodos de extração utilizados. Estes solventes extraíram a menor quantidade de oleorresina, caracterizando um baixo rendimento de óleo e compostos apolares na pimenta rosa.

5.4.2. Atividade antioxidante da oleorresina

O efeito do solvente na atividade antioxidante da oleorresina depende do método de extração utilizado, já que houve interação significativa ($P < 0,05$) entre método e solvente. Assim, procedeu-se à decomposição das fontes de variação por meio de análise de variância. A atividade antioxidante das oleorresinas extraídas a frio e em soxhlet, com os solventes etanol, acetona, éter etílico, éter de petróleo e hexano estão apresentados no Quadro 6, para a extração em soxhlet e no Quadro 7, para a extração a frio.

Quadro 6: Efeito do tipo de solvente na atividade antioxidante (μ moles radicais DPPH reduzidos /g pimenta rosa em peso seco) da oleorresina de pimenta rosa extraída em soxhlet.

Solventes	Atividade antioxidante (μ moles radicais DPPH reduzidos /g pimenta rosa em peso seco)
Etanol	108,60 \pm 0,98 a
Acetona	11,38 \pm 0,62 b
Éter etílico	4,82 \pm 0,12 c
Éter de petróleo	0,43 \pm 0,01 d
Hexano	0,49 \pm 0,02 d

* Dados expressos como médias \pm desvio padrão, de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Quadro 7: Efeito do tipo de solvente na atividade antioxidante (μ moles DPPH reduzido/g pimenta rosa em peso seco) da oleorresina de pimenta rosa extraída a frio.

Solventes	Atividade antioxidante (μ moles radicais DPPH reduzidos /g pimenta rosa em peso seco)
Etanol	37,51 \pm 0,73 a
Acetona	15,88 \pm 1,79 b
Éter etílico	11,10 \pm 0,67 c
Éter de petróleo	0,38 \pm 0,03 d
Hexano	0,36 \pm 0,02 d

* Dados expressos como médias \pm desvio padrão, de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

O efeito dos métodos de extração na atividade antioxidante foi significativo quando a oleorresina foi extraída com etanol, acetona e éter etílico. Temperaturas de extração acima de 40°C podem provocar degradação de compostos, reduzindo a atividade antioxidante. Entretanto, isto não ocorreu ao se extrair a oleorresina com etanol em soxhlet. De acordo com os resultados apresentados no Quadro 6, ao contrário do que se esperava, a temperatura de extração favoreceu a recuperação de mais compostos com atividade antioxidante. As temperaturas de ebulição utilizadas na extração das oleorresinas com acetona (56°C) e éter etílico (35°C), apesar de menores que na extração etanólica, não contribuíram para o aumento das propriedades antioxidantes da oleorresina, provavelmente em virtude da degradação de compostos termolábeis.

Segundo dados apresentados nos Quadros 6 e 7, a atividade antioxidante das oleorresinas extraídas com hexano e éter de petróleo foi estatisticamente a mesma ($P > 0,05$) e muito inferior à da fração polar. Considerando que os solventes possuem polaridades muito próximas, a composição dos compostos presentes nas oleorresinas será muito semelhante.

O efeito do solvente na atividade antioxidante das oleorresinas foi significativo para cada um dos métodos. A ordem de atividade antioxidante das oleorresinas acompanha a ordem de polaridade dos solventes: etanol > acetona > éter etílico > éter de petróleo = hexano, em cada um dos métodos de extração. O fato pode ser explicado pela presença de compostos fenólicos nas

frações, que são compostos solúveis em solventes polares, e apresentam atividade antioxidante. Assim, a maior contribuição à atividade antioxidante da pimenta rosa advém de compostos polares, como polifenóis.

5.4.3. Estudo cinético

As diluições das oleorresinas utilizadas no estudo cinético para cada solvente foram expressas em g oleorresina/ mmoles de radical livre DPPH no meio reacional, utilizando os dados de densidade apresentados no Quadro 8.

Quadro 8: Densidade (g/cm³) da oleorresina de pimenta rosa a 25°C.

Solvente	Densidade (g/cm³)
Éter petróleo	0,877 ± 0,015
Éter etílico	0,901 ± 0,013
Etanol	0,856 ± 0,015
Acetona	0,854 ± 0,017
Hexano	0,782 ± 0,019

* Dados expressos como médias ± desvio padrão, de seis repetições.

O comportamento cinético das oleorresinas está apresentado na Figura 3 e o comportamento cinético do padrão na Figura 4.

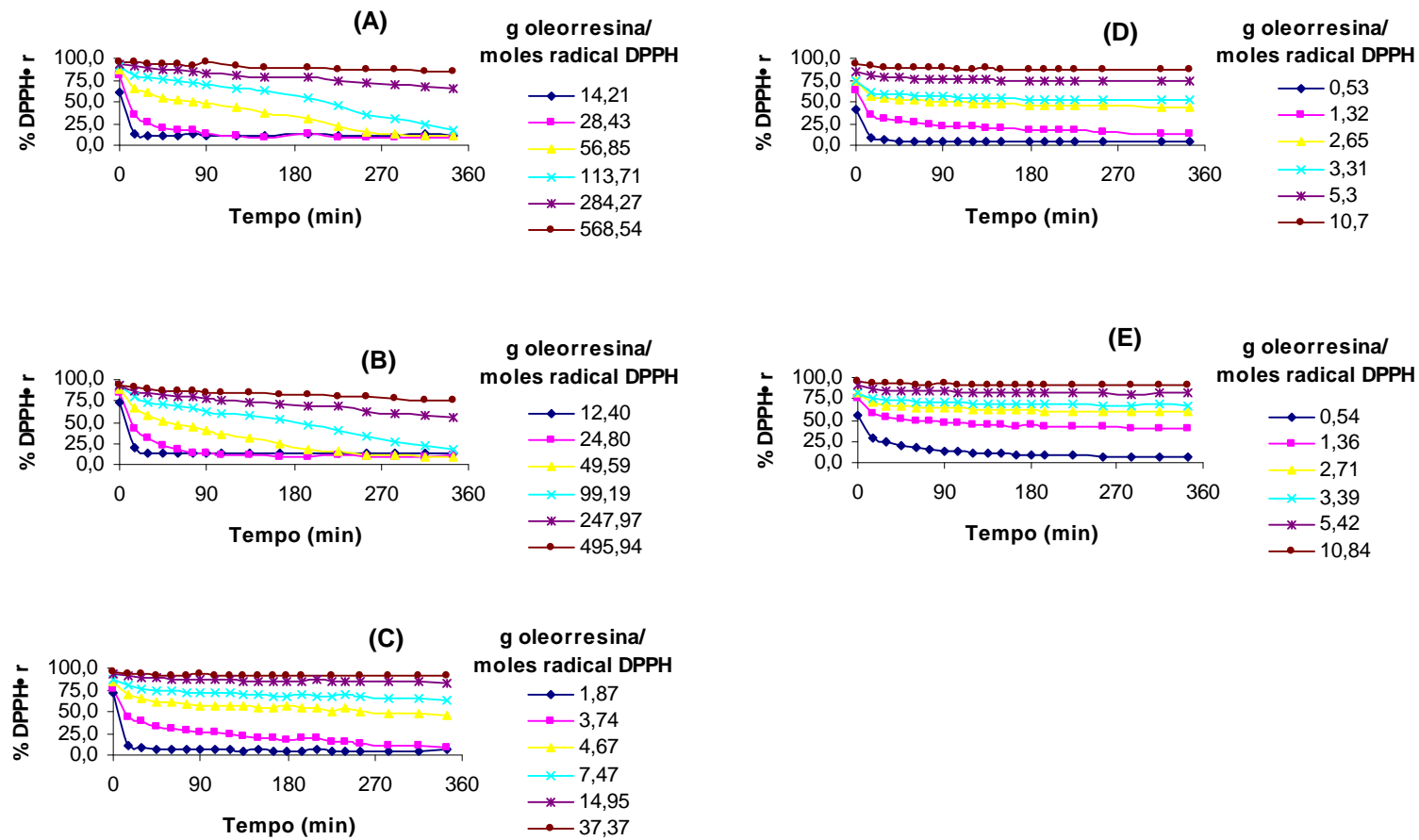


Figura 3: Comportamento cinético da oleoresina extraída de pimenta rosa, utilizando diferentes solventes. A) Éter de petróleo; B) Hexano; C) Éter etílico; D) Etanol; E) Acetona

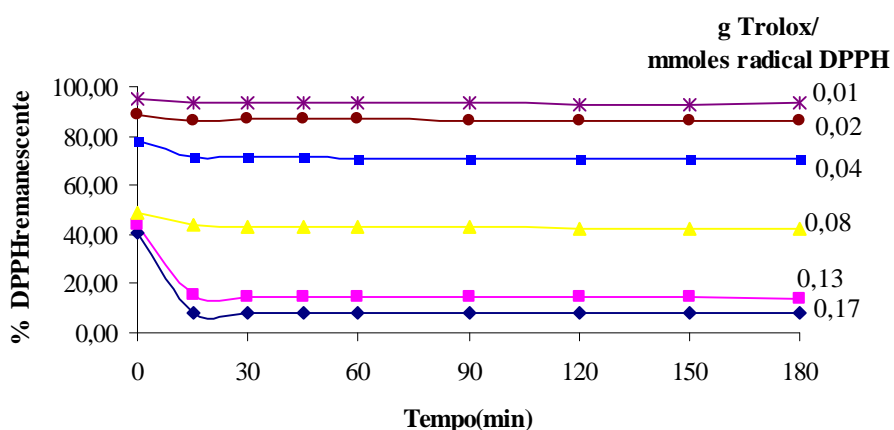


Figura 4: Comportamento cinético do padrão (Trolox).

Os gráficos apresentados nas Figuras 3 e 4 mostram a porcentagem de radicais DPPH existentes no meio reacional que ainda não reagiram com os compostos antioxidantes presentes no extrato, ao longo do tempo. Quando esta porcentagem atinge o estado estacionário, a reação entre os antioxidantes e os radicais DPPH cessa. Assim, é possível calcular a quantidade real de radicais DPPH que foram reduzidos pela amostra em estudo, evitando a seleção de um intervalo de tempo inadequado em que a reação ainda ocorre. Considerando que as oleorresinas são constituídas por uma mistura de compostos diferentes, a reação entre os radicais livres DPPH e a oleorresina diluída não cessa por completo em 6 horas, mas ocorre muito lentamente.

Para comparação do potencial antioxidante das oleorresinas e do padrão, a atividade antioxidante foi representada pelo EC_{50} , que expressa a quantidade de antioxidante necessário para reduzir em 50% a concentração inicial do radical livre DPPH no meio de reação, em um determinado intervalo de tempo.

Considerando que após um determinado intervalo de reação a redução dos radicais livres DPPH pelos compostos antioxidantes presentes na oleorresina ocorre muito lentamente e de forma muito discreta, o intervalo de 90 minutos de reação foi selecionado para a comparação do EC_{50} das oleorresinas.

A porcentagem de radical DPPH remanescente em 90 minutos, para cada uma das diluições testadas, foi transferida para o gráfico % radicais DPPH remanescentes no meio de reação em função das diluições da oleorresina em estudo, expressas em g oleorresina/ mmoles radical DPPH presentes no meio de reação, do qual se retirou o valor EC_{50} ; $t=90'$. Estes gráficos seguem uma curva de terceiro grau para todas as oleorresinas, e estão apresentados na Figura 5.

O Trolox, análogo da vitamina E, caracteriza-se como antioxidante primário, atuando no bloqueio da ação de radicais livres por meio da doação do radical hidrogênio. A redução dos radicais DPPH em função das diluições de Trolox também segue uma curva de terceiro grau, que pode ser visualizada na Figura 6. Portanto, pode-se considerá-lo representativo como padrão.

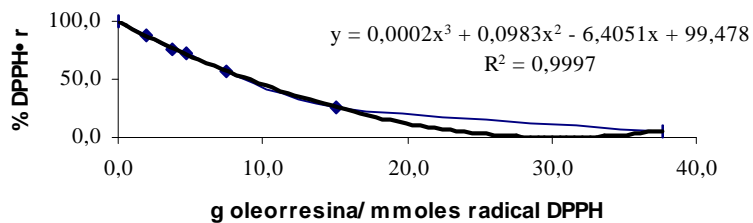
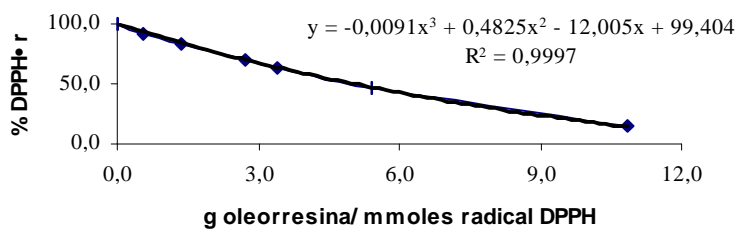
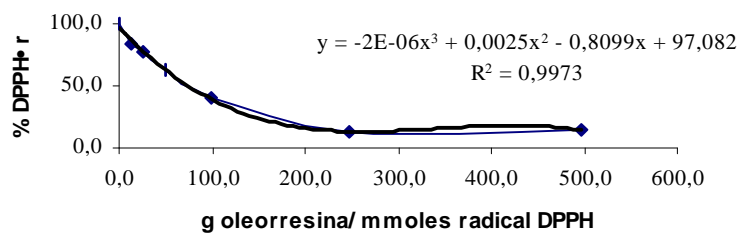
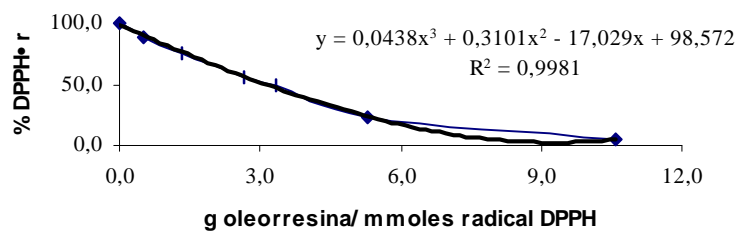
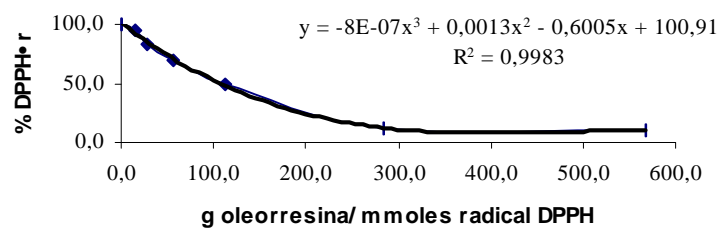


Figura 5: Porcentagem do radical livre DPPH remanescente em função das diluições de oleoresina. (A) Éter de petróleo; (B) Hexano; (C) Éter etílico; (D) Etanol; (E) Acetona.

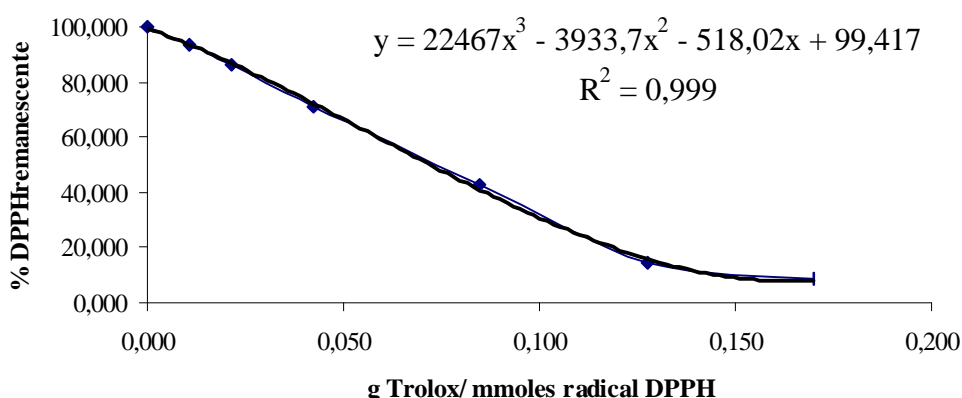


Figura 6: Porcentagem do radical livre DPPH remanescente em função das diluições do padrão (Trolox).

Valores comparativos do EC50 (g oleorresina/ mmoles radical DPPH) encontrados em intervalos de reação diferentes, segundo procedimento descrito anteriormente, estão apresentados no Quadro 9 para as oleorresinas e o padrão.

Quadro 9: Valores de EC50 das oleorresinas (g oleorresina/ mmoles radical DPPH) e do padrão (g Trolox/ mmoles radical DPPH), em diferentes intervalos de reação.

EC₅₀ (g/ mmoles radical DPPH)				
Oleorresinas	t=30'	t=90'	t=180'	t=360'
Etanol	3,510	3,110	2,890	3,010
Acetona	5,859	5,040	4,601	4,410
Éter etílico	11,290	9,000	8,150	6,800
Hexano	84,091	74,061	41,100	29,790
Éter petróleo	149,090	106,000	68,190	40,410
Padrão	t=30'	t=90'	t=180'	t=360'
Trolox	0,073	0,072	0,071	–

As oleorresinas constituem uma mistura bastante complexa, com estruturas químicas variadas e, conseqüentemente, diferentes atividades antioxidantes. Assim, o estado estacionário é alcançado de maneira gradativa. A cinética de reação das oleorresinas varia conforme a polaridade dos compostos presentes. Oleorresinas extraídas com solventes apolares demoram mais para atingir o estado estacionário que aquelas extraídas com solventes

polares. Este comportamento pode ser visualizado para cada oleorresina pelos resultados de EC_{50} encontrados em intervalos de tempo diferentes.

Em geral, extratos de plantas obtidos com solventes mais polares, como misturas aquosas de álcoois e acetona, são constituídos por uma mistura complexa de compostos antioxidantes, principalmente polifenóis, sugerindo a predominância da cinética lenta na maioria das vezes. Assim, a escolha do intervalo de tempo de reação para a determinação da atividade antioxidante de misturas complexas deve ser avaliada por meio do estudo cinético e determinação do EC_{50} . A seleção do tempo de 30 minutos, adotada pela grande maioria dos autores, pode não ser adequada, já que após este período ainda ocorre reação.

Para substância puras o estado estacionário é alcançado após determinado intervalo de tempo. De acordo com os resultados apresentados no Quadro 9, a cinética intermediária é característica do padrão selecionado neste estudo, que atingiu o estado estacionário entre 15 e 30 minutos. Portanto, a determinação do EC_{50} do padrão pode ser feita selecionando um intervalo de tempo a partir de 30 minutos, já que após este período a reação não ocorre.

SOKMEN et al. (2004) compararam a atividade antioxidante do óleo essencial e do extrato metanólico de *Thymus spathulifolius* pelo ensaio do radical DPPH e representaram a atividade antioxidante pelo EC_{50} , no intervalo de 30 minutos de reação. Considerando que a polaridade das amostras se difere e pode interferir na cinética de reação, seria recomendada uma avaliação prévia do comportamento cinético das amostras, para definição de um intervalo de tempo adequado na determinação do EC_{50} .

Quanto maior a polaridade do solvente utilizado na extração menor a quantidade de oleorresina necessária para reduzir a concentração inicial do radical DPPH em 50%. A rapidez desta redução está diretamente relacionada à concentração do extrato utilizado. Isto sugere que a atividade antioxidante da pimenta rosa se deve, em grande parte, à presença de compostos polares, como polifenólicos.

Em relação ao Trolox, a atividade antioxidante das oleorresinas foi inferior. Seria necessária uma quantidade de oleorresina extraída com etanol

ou acetona aproximadamente 50 a 80 vezes maior que a de Trolox, capaz de reduzir a metade do radical livre DPPH presente no meio de reação, num determinado intervalo de tempo. Isto demonstra a necessidade de se avaliar o solvente utilizado na extração a fim de enriquecer o extrato com substâncias com maior atividade antioxidante ou, até mesmo, isolar estes compostos.

Grandes variações nos resultados do EC_{50} podem ser observadas no Quadro 9 para as oleorresinas extraídas com hexano e éter de petróleo. Para solventes mais polares esta variação nos resultados é bem menor. Logo, a veracidade dos resultados pode ficar comprometida em virtude da seleção inadequada do intervalo de reação.

Ademais, a representação do EC_{50} varia de um trabalho para outro, mesmo quando utilizada para substâncias puras, visto que também depende da concentração inicial do radical DPPH e das concentrações do antioxidante testado. Comparações entre resultados do EC_{50} encontrados por outros pesquisadores podem ser inconsistentes. A maneira mais adequada seria representar a atividade antioxidante pela quantidade de radical DPPH reduzido pela amostra testada, principalmente nos casos em que a amostra é constituída por uma mistura de compostos antioxidantes diferentes.

5.5. Quantificação da fração fenólica, da oleorresina e do óleo essencial da pimenta rosa, coletada em diferentes regiões.

5.5.1. Fração fenólica

O extrato de fenólicos totais dos frutos secos de diferentes procedências foi obtido com acetona 70% e acetona 70% acidificada com 1% de HCl. O conteúdo fenólico dos frutos está apresentado no Quadro 10, para fenólicos totais extraídos com acetona 70%, e no Quadro 11, para fenólicos extraídos com acetona 70% acidificada.

Quadro 10: Conteúdo fenólico (g ácido gálico/ 100g pimenta rosa em peso seco) da pimenta rosa coletada em diferentes regiões, extraído com acetona 70%.

Origem	Conteúdo Fenólico (g ácido gálico/ 100g pimenta rosa em peso seco)
Ouro Preto-MG	1,941 ± 0,028
Piaçabuçu-AL	1,757 ± 0,045
Alcobaça-BA	1,544 ± 0,052
Campos-RJ	1,510 ± 0,018
São Mateus-ES	1,495 ± 0,044

* Dados apresentados como médias ± desvio padrão, de três repetições, em triplicata.

Quadro 11: Conteúdo fenólico (g ácido gálico/ 100g pimenta rosa em peso seco) da pimenta rosa coletada em diferentes regiões, extraído com acetona 70%, acidificada com 1% de HCl concentrado.

Origem	Conteúdo Fenólico (g ácido gálico/ 100g pimenta rosa em peso seco)
Ouro Preto-MG	2,507 ± 0,008
São Mateus-ES	2,219 ± 0,097
Campos-RJ	1,993 ± 0,116
Alcobaça-BA	1,897 ± 0,017
Piaçabuçu-AL	1,868 ± 0,050

*
Da
dos
apr
ese
nta
dos
do
co
mo
mé

dias ± desvio padrão, de três repetições, em triplicata.

Para cada sistema extrator avaliado, houve diferença entre o conteúdo fenólico dos frutos de origens diferentes, indicando a possível influência da região de cultivo da planta no seu conteúdo fenólico, para um mesmo estágio de maturação (maduro), uma determinada parte da planta (frutos) e um único período de coleta (maio).

Apesar destas diferenças, a ordem do conteúdo fenólico total não se repetiu quando sistemas extratores diferentes foram utilizados. Ademais, os valores do conteúdo fenólico não foram os mesmos para uma determinada região, demonstrando a influência do sistema extrator na seleção de certos compostos.

A maior ressuspensão de compostos fenólicos foi alcançada com acetona 70% acidificada, embora não tenha ocorrido um aumento proporcional do conteúdo fenólico para todas as regiões. Os resultados indicam que o perfil fenólico dos frutos é diferente para cada região em razão de apenas alguns compostos fenólicos terem sua estrutura modificada com a redução do pH.

Assim, a quantificação de polifenóis totais extraídos com um determinado sistema extrator é inadequado para se fazer comparações.

Para elucidar estas diferenças, seria necessário traçar o perfil fenólico destes compostos, separando-os por classes ou determinando estruturas fenólicas presentes. Cromatografia líquida de alta eficiência representa a técnica mais tradicional para separar e identificar compostos individuais ou classes de compostos (NACZK e SHAHIDI, 2004; ROBARDS, 2003) e várias metodologias têm sido desenvolvidas, como demonstrado por ALONSO et al. (2004) e HO, HOGG e SILVA (1999) para determinar polifenóis em vinhos e por GOMIS, PALOMINO e ALONSO (2001) e SHUI e LEONG (2002) para determinar compostos fenólicos em sucos de frutas e bebidas.

Dependendo da aplicação do extrato, o estudo preliminar do perfil fenólico seria interessante para identificar as estruturas responsáveis pelo efeito requerido, como a atividade antioxidante ou efeito antimicrobiano de um composto presente no extrato, por exemplo. Após determinar o sistema extrator mais adequado para o enriquecimento deste composto, a comparação entre o conteúdo fenólico da matéria prima coletada em diferentes regiões seria uma maneira prática e eficiente de selecionar a matéria prima mais adequada.

Apesar de terem sido verificadas diferenças na quantidade e composição do conteúdo fenólico de frutos de diferentes origens, não se deve fazer inferências entre as características das regiões estudadas como clima, solo e vegetação, e os resultados obtidos neste trabalho. Os frutos utilizados nas análises são oriundos do extrativismo e, portanto, não seguem restrições durante o plantio, como adubação e irrigação, na seleção dos frutos, dentre outros.

Ademais, algumas características como tipo de solo, índice pluviométrico e oscilação de temperatura diferem entre as regiões. Estas diferenças exercem influência na qualidade e quantidade dos produtos originados do metabolismo secundário dos vegetais e, portanto, não devem ser descartadas. Seria necessário um estudo de campo para verificar a influência destas características na quantidade e perfil de fenólicos da pimenta rosa.

5.5.2. Oleorresina e óleo essencial

O teor máximo de óleo essencial extraído dos frutos da aroeira foi obtido em um período de 3 horas, que foi o tempo selecionado para todas as extrações do óleo. O teor de óleo essencial (mL óleo essencial/ 100g pimenta rosa em peso seco) dos frutos secos de diferentes origens está apresentado no Quadro 12.

Quadro 12: Teor de óleo essencial (mL óleo/100g pimenta rosa em peso seco) extraído da pimenta rosa, coletados em diferentes regiões.

Origem	Teor de óleo essencial (mL óleo/100g PR peso seco)
São Mateus-ES	7,7 ± 0,2
Campos-RJ	7,7 ± 0,1
Piaçabuçu-AL	7,1 ± 0,1
Alcobaça-BA	6,3 ± 0,2
Ouro Preto-MG	5,6 ± 0,3

* Dados expressos como médias ± desvio padrão, de três repetições.

De acordo com os resultados apresentados no Quadro 15, o teor médio de óleo essencial extraído dos frutos secos da aroeira foi de 7%(v/p). SANTOS dos et al. (2004) extraíram o óleo essencial de folhas, frutos e flores frescas de *Schinus terebinthifolius Raddi* por meio de hidrodestilação em aparelho Clevenger, durante uma hora. O teor médio encontrado variou entre 0,15% e 0,17%. Assim, pode-se concluir que há uma grande variação entre os teores de óleo essencial encontrados em partes diferentes da planta, ou que o período de extração selecionado por SANTOS dos et al.(2004) foi insuficiente para se obter um bom teor do óleo essencial.

Variações nas características das regiões de produção dos frutos da aroeira como temperatura, índice pluviométrico, solo, umidade relativa, altitude, dentre outros, podem interferir na qualidade e quantidade de substâncias presentes na planta, pois afetam sua fisiologia e, conseqüentemente a síntese dos compostos.

Constatou-se que o perfil de fenólicos totais dos frutos secos variou conforme a região em estudo. Assim, espera-se que a composição da oleorresina extraída com acetona a frio também varie, já que grande parte dos

compostos polares extraídos pela acetona inclui substâncias fenólicas. Os rendimentos de oleorresina (%p/p) dos frutos de diferentes origens estão apresentados no Quadro 13.

Quadro 13: Rendimento de oleorresina (%p/p) extraída de pimenta rosa, coletada em diferentes regiões.

Origem	Rendimento de oleorresina (%p/p)
Ouro Preto-MG	15,73 ± 0,20
Piaçabuçu-AL	15,35 ± 0,08
Alcobaça-BA	14,65 ± 0,33
São Mateus-ES	14,17 ± 0,32
Campos-RJ	13,66 ± 0,22

* Dados expressos como médias ± desvio padrão, de três repetições.

A ordem do rendimento das frações variou conforme a fração estudada. Os frutos coletados em Ouro Preto, por exemplo, apresentaram grande discrepância entre os resultados obtidos: maior conteúdo de polifenóis totais e oleorresina e o menor teor de óleo essencial. Alguns fatores podem ter contribuído para essa diferença como, por exemplo, a altitude diferenciada, quando comparada à das outras regiões, que exerce grande influência na temperatura e umidade e, por conseguinte, altera a composição das frações estudadas. Além disso, diferenças entre os parâmetros de secagem da empresa e do laboratório podem ter influenciado os resultados, já que frutos provenientes da cidade de Ouro Preto foram secos no laboratório em secador de bandeja, a 60°C, por um período de 17 horas.

Alguns parâmetros da secagem devem ser estudados e monitorados como temperatura de secagem, velocidade do ar e umidade relativa, pois um processo inadequado pode aumentar o número de alterações físico-químicas, causando reduções significativas na quantidade e qualidade dos princípios ativos, principalmente voláteis.

Neste contexto, as diferenças nos teores de óleo essencial também podem ser explicadas pela perda de voláteis ocasionada por degradação térmica. O teor de óleo essencial na pimenta rosa é uma característica relevante em sua comercialização, visto que as características aromáticas influenciam drasticamente na aceitação global do produto condimentar. Assim,

o estudo e o monitoramento das condições de processamento dos frutos é de extrema importância.

5.6. Determinação da atividade antioxidante da fração fenólica, da oleorresina e do óleo essencial de pimenta rosa, coletada em diferentes regiões.

Acetona 70% acidificada com 1% HCl concentrado foi o sistema extrator mais eficiente na ressuspensão de fenólicos totais. Assim, houve interesse em determinar a atividade antioxidante de várias diluições deste extrato fenólico. Os dados de absorvância obtidos para a solução “branco”, a amostra e o controle estão apresentados no Quadro 14.

Quadro 14: Leituras de absorvância a 517nm do branco e do extrato fenólico, pelo ensaio do radical DPPH.

Diluição (v/v) ^a	Tempo leitura (min)	
	0'	60'
	ABS Branco ^b	
1,00	0,713	0,028
0,20	0,600	0,079
0,10	0,601	0,174
0,04	0,828	0,425
0,01	0,864	0,673
	ABS Amostra ^c	
1,00	0,279	0,045
0,20	0,543	0,047
0,10	0,569	0,159
0,04	0,580	0,396
0,01	0,607	0,491
	ABS Controle ^d	
	0,693	0,690

* Dados apresentados como médias de três repetições.

^a Diluições (v/v) da amostra, do branco e do controle foram feitas com etanol absoluto 99,9% pureza; ^b Branco: Acetona 70% acidificada com 1% HCL; ^c Amostra: Extrato fenólico obtido com acetona 70% acidificada com 1% HCL; ^d Controle: Etanol absoluto 99,9% pureza.

Os dados obtidos foram superestimados devido ao pH da mistura, que variou em torno de 2,0. A dissociação do ácido clorídrico provoca a liberação de íons hidrogênio no meio, os quais reduzem os radicais livres DPPH. Este comportamento pode ser observado através da queda de absorvância num intervalo de 60 minutos encontrada para a solução “branco”, bem maior que

aquela encontrada para o controle. Quanto menor a diluição da solução “branco”, maior é a queda da absorvância ocasionada pela redução dos radicais DPPH. Assim, a atividade antioxidante da amostra fica superestimada pela ação dos íons H⁺ provenientes do ácido clorídrico.

Resultados inconsistentes foram apresentados por ORTEGA, ROMERO e PEREZ (2003). Os autores determinaram a atividade antioxidante do extrato etanólico de feijão, com e sem a adição de 0,5% de ácido trifluoracético, pelo ensaio do radical livre DPPH. Segundo os pesquisadores, o extrato acidificado foi o que apresentou maior capacidade antioxidante. Um equívoco foi cometido nesta conclusão em virtude da acidificação do meio superestimar a atividade antioxidante do extrato. Comportamento idêntico foi observado em estudo realizado por GUENDEZ et al.(2005), em que os pesquisadores avaliaram a atividade antioxidante do extrato metanólico de sementes de uva, acidificado com 5%(v/v) de ácido perclórico, pelo ensaio do DPPH*.

Considerando a interferência do pH na redução dos radicais DPPH, optou-se por utilizar o sistema extrator com acetona 70% sem adição de HCl concentrado. Os resultados da atividade antioxidante (mmoles DPPH reduz / 100g pimenta rosa em peso seco) da fração fenólica da pimenta rosa estão apresentados no Quadro 15 e a relação entre a quantidade de radicais livres de DPPH reduzidos e o conteúdo fenólico total (mmoles DPPH reduz / g ácido gálico) está apresentada no Quadro 16.

Quadro 15: Atividade antioxidante (mmoles DPPH reduz / 100g pimenta rosa em peso seco) do extrato fenólico de pimenta rosa, coletada em diferentes regiões.

Origem	Atividade Antioxidante (mmoles DPPH reduz / 100g PR)
São Mateus-ES	32,591 ± 1,073
Ouro Preto-MG	26,378 ± 0,679
Campos-RJ	25,287 ± 0,338
Alcobaça-BA	23,995 ± 0,136
Piaçabuçu-AL	22,291 ± 0,348

* Dados apresentados como médias ± desvio padrão, de três repetições, em triplicata.

Quadro 16: Relação entre a quantidade de radicais livres de DPPH reduzidos e o conteúdo fenólico total (mmoles DPPH reduz / g ácido gálico) de pimenta rosa, coletada em diferentes regiões.

Origem	Atividade Antioxidante (mmoles DPPH reduz / g ácido gálico)
São Mateus-ES	21,80
Campos-RJ	16,75
Alcobaça-BA	15,54
Ouro Preto-MG	13,59
Piaçabuçu-AL	12,69

* Dados apresentados como médias, de três repetições, em triplicata.

Observou-se diferença entre a atividade antioxidante da fração fenólica de frutos coletados em diferentes regiões (Quadro 15). Essa variação ocorre em razão da diferença entre a composição de fenólicos dos extratos, já que a atividade antioxidante de uma substância depende da sua característica estrutural. Além disso, a quantidade de um determinado composto varia de um extrato para outro.

Os dados da atividade antioxidante e o conteúdo fenólico dos frutos não apresentaram boa correlação ($R^2= 0,3928$). Isto sugere uma contribuição de compostos antioxidantes não fenólicos na atividade antioxidante da pimenta rosa ou a presença de compostos fenólicos com elevado poder antioxidante, mas em pequena quantidade. A primeira hipótese é menos provável quando se observa a contribuição das frações apolares (oleorresinas extraídas com hexano e éter de petróleo) da pimenta rosa em sua atividade antioxidante global, demonstrada por meio do EC_{50} . Os dados apresentados no Quadro 15 reforçam a segunda premissa, pois nem sempre os frutos de uma determinada origem que apresentaram a maior atividade antioxidante, possuem o maior conteúdo fenólico.

A atividade antioxidante da oleorresina de pimenta rosa extraída com acetona segue praticamente o mesmo comportamento do extrato fenólico quanto à ordem de atividade das frações dos frutos de diferentes origens, em virtude de estas frações extraírem compostos de polaridade semelhante.

A atividade antioxidante da oleorresina dos frutos secos está apresentada no Quadro 17.

Quadro 17: Atividade antioxidante (%Inibição) de oleorresina extraída de pimenta rosa, coletada em diferentes regiões.

Origem	Atividade antioxidante (% Inibição)
São Mateus-ES	78,37 ± 3,50
Ouro Preto-MG	61,66 ± 3,45
Campos-RJ	41,06 ± 2,18
Piaçabuçu-AL	30,38 ± 2,84
Alcobaça-BA	24,31 ± 0,64

* Dados expressos como médias ± desvio padrão, de três repetições.

Variações na atividade antioxidante do óleo essencial extraído dos frutos de diferentes origens também foram observadas, e está apresentada no Quadro 18.

Quadro 18: Atividade antioxidante (% Inibição) do óleo essencial extraído de pimenta rosa, coletada em diferentes regiões.

Origem	Atividade antioxidante (% Inibição)
Ouro Preto-MG	78,07 ± 2,11
São Mateus-ES	51,98 ± 4,73
Piaçabuçu-AL	50,86 ± 3,16
Alcobaça-BA	47,52 ± 3,94
Campos-RJ	45,01 ± 2,10

* Dados expressos como médias ± desvio padrão, de três repetições.

Apesar dos frutos coletados em Ouro Preto apresentarem o menor teor de óleo essencial, sua atividade antioxidante foi a maior. Assim, a aplicação do óleo essencial destes frutos em produtos farmacêuticos, por exemplo, é mais recomendada que a utilização destes frutos como produto condimentar.

Conforme já discutido no item 5.6., variações de origem climática, no cultivo, no método de extração, no tipo de processamento, dentre outros, interferem nas alterações fisiológicas da planta e, conseqüentemente, na qualidade e quantidade de seus compostos. Isto tem implicações diretas na atividade antioxidante das diversas frações dos frutos secos.

A relação comparativa entre a quantidade de radicais livres de DPPH reduzidos pelas frações de fenólicos totais, do óleo essencial e da oleorresina

de pimenta rosa estão apresentados no Quadro 19 e expressos em mmoles do radical DPPH reduzidos / g de pimenta rosa em peso seco.

Quadro 19: Atividade antioxidante (μ moles DPPH• reduzidos / g pimenta rosa em peso seco). da frações fenólica, do óleo essencial e da oleorresina da pimenta rosa, coletada em diferentes regiões.

Origem	Atividade Antioxidante (μ moles radicais DPPH reduzidos/ g pimenta rosa)		
	Fração fenólica	Oleorresina	Óleo essencial
São Mateus-ES	325,910 \pm 10,735	37,734 \pm 2,311	0,042 \pm 0,004
Ouro Preto-MG	263,782 \pm 6,791	31,240 \pm 2,090	0,086 \pm 0,002
Campos-RJ	252,871 \pm 3,388	20,994 \pm 2,915	0,043 \pm 0,002
Alcobaça-BA	239,958 \pm 1,369	14,950 \pm 2,887	0,044 \pm 0,004
Piaçabuçu-AL	222,917 \pm 3,482	16,009 \pm 2,014	0,060 \pm 0,004

* Dados apresentados como médias \pm desvio padrão, de três repetições, em triplicata.

A fração fenólica e a oleorresina extraída com acetona oferecem a maior contribuição para a atividade antioxidante global da pimenta rosa. Em contraposição, o óleo essencial, assim como as frações apolares de oleorresina, têm a menor participação na atividade antiradical dos frutos, que pode ser considerada insignificante.

A alteração da polaridade da acetona pela adição de água contribuiu para o enriquecimento do extrato com compostos com maior atividade antioxidante, especialmente fenólicos, aumentando aproximadamente em dez vezes a sua atividade. Isto demonstra a importância da escolha do solvente na atividade antioxidante do extrato.

Neste contexto, pode-se afirmar que os compostos polares, principalmente compostos fenólicos, contribuem de maneira mais efetiva para a atividade antioxidante de pimenta rosa.

Justificativas para as diferenças encontradas entre o conteúdo das frações fenólica, de oleorresina e óleo essencial estão limitadas à escassez de informações a respeito do efeito de determinadas características na fisiologia dos frutos. Portanto, torna-se necessário um aprofundamento nas pesquisas

realizadas com os órgãos vegetais de *Schinus terebinthifolius Raddi*, em todas as áreas de atuação: fisiologia, manejo da planta, condições de processamento dos frutos, identificação de princípios ativos, etc.

5.7. Correlação entre métodos *in vitro* utilizados na avaliação da atividade antioxidante.

O princípio que rege os ensaios do radical DPPH e do cátion radical ABTS é semelhante. Os radicais livres apresentam perda de coloração e queda de absorvância ao serem reduzidos por compostos doadores de hidrogênio ou elétrons, retardando o processo oxidativo.

No ensaio do radical DPPH, o radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil apresenta o máximo de absorção a 515-520 nm, que diminui à medida que o radical abstrai um radical hidrogênio do antioxidante em estudo. No ensaio do cátion radical ABTS, o radical cromóforo ABTS^{•+}, o qual apresenta máximo de absorção a 417 nm, é obtido a partir do ácido 2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolína-6-sulfônico pela ação do agente oxidante persulfato de potássio. A atividade antioxidante é medida pela supressão da cor do radical e queda de absorvância quando substâncias antioxidantes são adicionadas, em virtude da diminuição deste radical no meio.

O ensaio do sistema emulsionado β -caroteno-ácido linoléico baseia-se na descoloração do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico, em emulsão aquosa saturada em oxigênio. A adição de uma amostra contendo antioxidantes contribui para retardar a queda de absorvância do β -caroteno.

A atividade antioxidante de várias diluições do extrato fenólico e do padrão Trolox foi determinada pelos ensaios do radical livre DPPH, do Cátion radical ABTS e do sistema emulsionado β -caroteno-ácido linoléico. Avaliou-se o efeito das diferentes diluições do extrato fenólico (mg ácido gálico/ 100g pimenta rosa em peso seco) e do padrão Trolox (mM) na queda de absorvância, apresentado na Figura 7, para todos os ensaios.

O conteúdo de fenólicos totais do extrato fenólico analisado foi de 1757 \pm 45 mg ácido gálico/ 100g pimenta rosa em peso seco. Para construção dos gráficos, o extrato fenólico foi diluído em etanol absoluto 99,9% pureza, nas proporções 1:10; 1:20; 1:25; 1:40; 1:50 e 1:100 (v/v: mL extrato fenólico/ mL solução etanólica).

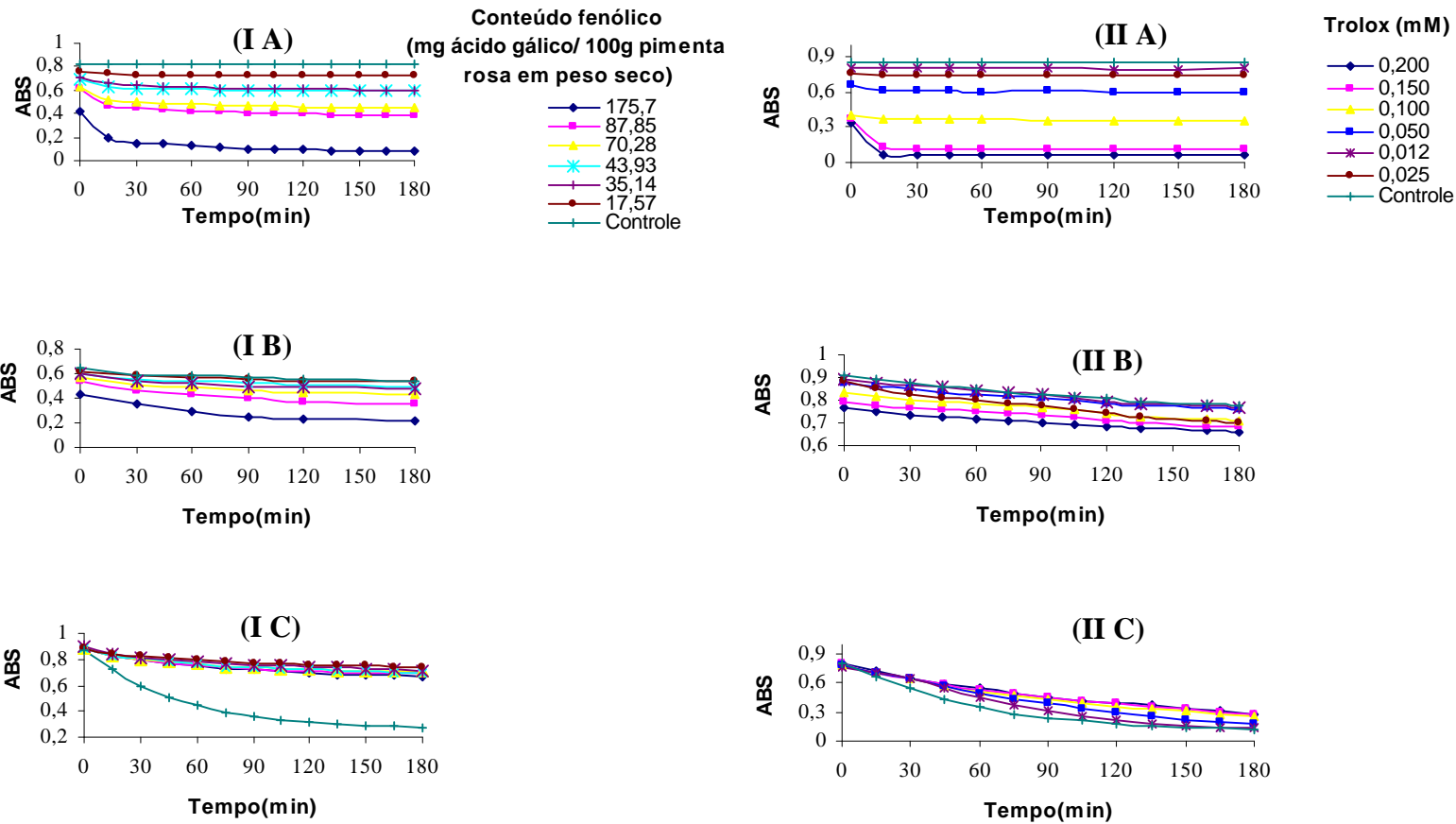


Figura 7: Efeito das diferentes diluições do extrato fenólico da pimenta rosa (I) e do padrão Trolox (II) na queda de absorvância, em função do tempo (min), determinada por diferentes ensaios. (A) Radical livre DPPH (B) Cátion radical ABTS (C) Sistema emulsionado -caroteno- ácido linoléico.

O DPPH• é um radical muito estável, de difícil degradação, apresentando absorvância sem alterações por um período de até 6 horas. O radical ABTS^{•+} também apresenta boa estabilidade, embora menor, e degrada de forma discreta ao longo do tempo. Entretanto, a degradação do β -caroteno ocorre rapidamente e de forma descontrolada, já que não é possível controlar o nível de oxigenação, a interação do oxigênio com o β -caroteno e a quantidade e o tipo de produtos de degradação derivados da oxidação do ácido linoléico.

No ensaio do radical DPPH e do ABTS a redução dos radicais pelo antioxidante ocorre imediatamente após a mistura da solução do radical livre e o composto antioxidante (tempo zero). Assim, a queda de absorvância no tempo zero ocorre instantaneamente e reduz gradativamente ao longo do tempo, para todas as diluições. No ensaio do β -caroteno- ácido linoléico, a queda de absorvância do β -caroteno não ocorre de forma gradativa e oscilações são observadas. Este comportamento dificulta a reprodutibilidade e a interpretação dos resultados. Isto pode ser observado na Figura 5 pela queda de absorvância da solução controle, para todos os ensaios.

Os radicais DPPH• atingem estados estacionários diferentes para cada diluição do extrato testado, e não são degradados completamente. O contrário é observado para o comportamento da absorvância dos radicais ABTS, que se reduz por completo.

No ensaio dos radicais DPPH e ABTS, a redução da absorvância ao longo do tempo é bem definida para cada diluição, e à medida que se dilui a amostra, percebe-se uma redução proporcional em sua absorvância em virtude de uma menor quantidade de antioxidantes presentes na amostra. Este comportamento não é observado para o ensaio do sistema emulsionado β -caroteno- ácido linoléico, em que as curvas de queda da absorvância apresentam-se de maneira bem próxima entre elas e não há uma boa distinção da atividade antioxidante em relação às diferentes concentrações do antioxidante, o que dificulta o estabelecimento de uma ordem coerente de atividade das amostras, tornando o método pouco confiável.

Isto pode ser observado pelos resultados da atividade antioxidante de diferentes diluições do extrato fenólico (% Inibição), apresentados no Quadro

20. Para um determinado intervalo de tempo, quanto mais diluído o extrato fenólico, menor será a atividade antioxidante da amostra, determinada pelo ensaio dos radicais DPPH e ABTS. Além disso, a quantidade de radicais DPPH• reduzidos é bem maior que a de radicais ABTS^{•+}, quando a mesma diluição de extrato fenólico é avaliada num determinado intervalo de reação. Em se tratando do ensaio do β -caroteno, não se observa uma redução significativa da atividade antioxidante proporcionalmente à diluição do extrato fenólico. Esta baixa sensibilidade do método dificulta a distinção das diferentes diluições da amostras quanto à sua atividade antioxidante.

Quadro 20: Atividade antioxidante (% Inibição) de diluições do extrato fenólico, determinada por diferentes ensaios, em intervalos de tempos diferentes.

Conteúdo fenólico (mg AG/ 100g PS)	Atividade antioxidante (%Inibição)								
	Ensaio do DPPH•			Ensaio do ABTS•+			Ensaio do β -caroteno-ácido linoléico		
	30'	90'	180'	30'	90'	180'	30'	90'	180'
175,70	81,46	87,56	90,61	44,63	60,96	65,94	8,71	17,98	26,12
87,85	45,61	49,88	53,17	28,93	38,41	44,01	8,82	17,41	22,68
43,93	24,88	26,83	28,05	13,53	19,75	23,64	8,71	16,49	22,68
17,57	11,10	11,71	11,46	9,02	14,62	17,26	6,07	12,60	17,98

A escolha do padrão a ser utilizado no ensaio é muito importante para a representatividade dos resultados. O padrão deve apresentar, dentre outras características, boa linearidade, estabilidade e mecanismo de ação semelhante ao dos antioxidantes em estudo. Trolox foi utilizado como padrão para representar a atividade antioxidante do extrato fenólico, utilizando os ensaios dos radicais ABTS e DPPH. O valor TEAC (mM) foi determinado por meio da curva padrão de Trolox. Os resultados da atividade antioxidante do extrato fenólico, em TEAC (mM), estão apresentados no Quadro 21.

Quadro 21: A atividade antioxidante de diferentes diluições do extrato fenólico, em TEAC(mM).

Conteúdo fenólico (mg AG/ 100g PS)	Atividade antioxidante (TEAC mM)					
	Ensaio do DPPH•			Ensaio do ABTS•+		
	30'	90'	180'	30'	90'	180'
175,70	0,143	0,153	0,158	0,736	0,884	0,929
87,85	0,084	0,091	0,096	0,593	0,679	0,730
43,93	0,049	0,053	0,055	0,453	0,509	0,545
17,57	0,027	0,028	0,027	0,412	0,463	0,487

De acordo com os dados apresentados no Quadro 21, a atividade antioxidante do extrato fenólico determinada pelo ensaio do radical ABTS é maior que aquela determinada pelo ensaio do DPPH, quando Trolox é utilizado como padrão. Relação inversa pode ser observada quando os dados foram expressos em % Inibição. Assim, seria mais indicada a utilização do ensaio do radical ABTS quando a atividade antioxidante é representada em TEAC.

A maneira com a qual os dados são representados é fundamental para a interpretação e a comparação dos resultados.

O ensaio do radical DPPH apresenta a maior versatilidade quanto à representação da atividade antioxidante. Apesar de versátil, algumas condições metodológicas são relevantes para a escolha da forma mais adequada de se representar atividade antioxidante por este método. A atividade antioxidante de diferentes diluições do extrato fenólico foi determinada pelo ensaio do DPPH•, e representada em termos de % Inibição; pelo EC₅₀; em % DPPH• remanescente; em TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox, mM) e micromoles de DPPH reduzidos/ mL extrato fenólico.

Resultados equivocados foram apresentados por GUENDEZ et al.(2005). Os autores representaram a atividade antioxidante do extrato metanólico de sementes de uva, pelo ensaio do DPPH, por meio da % DPPH remanescente, em que a [DPPH•] no tempo zero corresponde à concentração do radical DPPH imediatamente após a mistura da solução de DPPH com a amostra. Entretanto, para se calcular a % DPPH remanescente, a [DPPH•] no tempo zero presente no meio de reação deve ser determinada por meio da

leitura de absorvância da solução branco, visto que a amostra contém antioxidantes que podem provocar a redução imediata dos radicais livres, subestimando a quantidade de radicais DPPH presentes no meio antes da reação e, conseqüentemente, a % DPPH remanescente fica superestimada.

TOMAINO et al. (2005) apresentaram resultados inconsistentes em virtude da forma inadequada de representar os resultados. Os autores compararam a atividade antioxidante de diferentes diluições dos extratos metanólicos de óleos essenciais de condimentos, utilizando o ensaio do radical DPPH. A atividade dos extratos foi representada através da %Inibição, apesar dos extratos comparados não apresentarem as mesmas diluições. Comparar a atividade antioxidante de extratos contendo tipos de óleo essencial distintos em diferentes diluições não é uma forma correta de se fazer comparações. Considere dois tipos de amostras: A1, contendo grande quantidade de uma substância com elevada capacidade antioxidante e, A2, contendo uma pequena quantidade de um composto com baixo poder antioxidante. A1 pode ser suficientemente diluída e apresentar % Inibição menor que A2, se esta estiver muito concentrada. Com base nesta premissa é que se representou a atividade antioxidante das oleorresinas, extraídas por diferentes métodos e solventes, em μ moles DPPH reduzido/mL oleorresina, e não em % I.

Para a situação descrita anteriormente, a maneira mais indicada para representar a atividade antioxidante pelo ensaio do DPPH seria pela quantidade de radical DPPH reduzido pela amostra testada, pois esta representação permite a comparação da atividade antioxidante entre amostras diferentes quanto à diluição, tipo e quantidade de compostos antioxidantes, dentre outros. A atividade antioxidante de diferentes diluições do extrato fenólico, em termos de micromoles DPPH reduzido / mL extrato, está apresentada no Quadro 22.

Quadro 22: A atividade antioxidante (micromoles DPPH reduzido / mL extrato) de diferentes diluições do extrato fenólico.

Conteúdo fenólico (mg AG/ 100g PR peso seco)	Atividade Antioxidante (micromoles DPPH reduzido/ mL extrato)		
	30'	90'	180'
175,70	0,234	0,252	0,261
87,85	0,131	0,144	0,153
43,93	0,072	0,077	0,081
17,57	0,032	0,034	0,033

A % Inibição, assim como a % DPPH• remanescente, expressa apenas a queda de absorvância num determinado intervalo de tempo, e não leva em consideração a quantidade de amostra necessária para reduzir uma certa quantidade de radicais DPPH. Na % DPPH• remanescente, os dados de absorvância são convertidos em [DPPHr], por meio da curva padrão de DPPH• remanescente. O somatório dos valores de % Inibição e % DPPH• remanescente aproximam-se de 100%, em razão do ajuste dos dados de absorvância. Dados comparativos da representação da atividade antioxidante de diferentes diluições do extrato fenólico, em % DPPH• remanescente e % Inibição, estão apresentados no Quadro 23.

Quadro 23: Atividade antioxidante de diferentes diluições do extrato fenólico, determinadas pelo ensaio do radical DPPH, representados em % Inibição e % DPPH• remanescente.

Conteúdo fenólico (mg AG/ 100g PS)	Ensaio do radical livre DPPH					
	Atividade antioxidante (% Inibição)			Atividade antioxidante (% DPPH• remanescente)		
	30'	90'	180'	30'	90'	180'
175,70	81,46	87,56	90,61	19,71	13,70	10,70
87,85	45,61	49,88	53,17	55,05	50,84	47,60
43,93	24,88	26,83	28,05	75,48	73,56	72,36
17,57	11,10	11,71	11,46	89,06	88,46	88,70

Apesar de mais simples, não foi possível expressar a atividade antioxidante do extrato fenólico de frutos de diferentes procedências em %Inibição ou % DPPH remanescente, visto que frutos secos de diferentes origens possuem umidades diferentes e, conseqüentemente, a quantidade de pimenta rosa em peso seco não seria a mesma para todos os extratos fenólicos. Esta representação também não pode ser feita para comparação da atividade antioxidante da oleorresina, já que as amostras analisadas não apresentam a mesma diluição.

O valor EC₅₀ representa outra forma de expressar a atividade antioxidante pelo ensaio do radical DPPH, em termos da quantidade de amostra necessária para reduzir em 50% a quantidade de radicais livres DPPH presentes no meio, no início da reação. Esta representação considera a cinética de reação dos compostos antioxidantes, que varia conforme sua estrutura química. Apesar de constituir uma boa forma de representação, deve-se atentar para o intervalo de reação escolhido. Comparações da atividade antioxidante no intervalo de 30 minutos de reação, realizadas pela maioria dos autores, podem comprometer a veracidade dos resultados, pois a reação ainda pode estar progredindo após este período. A atividade antioxidante do extrato fenólico e do padrão, em termos de EC₅₀, está apresentada no Quadro 24.

Quadro 24: Atividade antioxidante do extrato fenólico (mg AGE/ mmoles radical DPPH) e do padrão Trolox (mM), determinadas pelo ensaio do radical DPPH, representada pelo EC₅₀.

Tempo (min)	Atividade antioxidante (EC ₅₀)	
	Extrato fenólico (mg AGE/ mmoles radical DPPH)	Trolox (mM)
30	20,550	0,073
90	18,610	0,072
180	17,530	0,071

A representação da atividade antioxidante pelo ensaio ABTS fica limitado à comparação com algum padrão ou em termos de % Inibição, pois a formação de cátions ABTS^{•+} não pode ser quantificada.

Em se tratando do ensaio do sistema emulsionado β -caroteno- ácido linoléico, a maneira mais adequada de se representar a atividade antioxidante

seria pelo Índice do antioxidante (I.A.) em virtude da redução de absorvância da mistura contendo o antioxidante ser comparada à redução de absorvância do controle (sem antioxidantes). O I.A. expressa a porcentagem de proteção do β -caroteno pelo antioxidante em relação à degradação deste cromóforo na ausência do antioxidante, considerada 100%. Ele nos dá uma idéia de quanto a amostra retardou a oxidação do β -caroteno em relação à sua degradação em um meio isento de antioxidantes.

Resultados inconsistentes, representados em %Inibição do ácido linoléico, foram apresentados por SOKMEN et al. (2004). Os autores determinaram a atividade antioxidante do óleo essencial e do extrato metanólico de *Thymus spathulifolius* em diferentes concentrações, pelo ensaio do sistema emulsionado β -caroteno- ácido linoléico. A % Inibição não leva em consideração a degradação do controle e subestima os resultados. Dados comparativos da atividade antioxidante de diferentes diluições do extrato fenólico, determinadas pelo ensaio do sistema emulsionado β -caroteno- ácido linoléico, estão apresentados no Quadro 25.

Quadro 25: Atividade antioxidante de diferentes diluições do extrato fenólico, determinadas pelo ensaio do sistema emulsionado β -caroteno- ácido linoléico, representados em I.A. e % Inibição.

Conteúdo fenólico (mg AG/ 100g PS)	Ensaio do sistema emulsionado β -caroteno- ácido linoléico					
	Atividade antioxidante (I.A.)			Atividade antioxidante (%Inibição)		
	30'	90'	180'	30'	90'	180'
175,70	72,46	69,46	61,94	8,71	17,98	26,12
87,85	72,10	70,43	66,94	8,82	17,41	22,68
43,93	72,46	71,98	66,94	8,71	16,49	22,68
17,57	80,80	78,60	73,79	6,07	12,60	17,98

O ensaio da emulsão β -Caroteno-ácido linoléico é pobre para quantificação da atividade antioxidante. O sistema testado é oxidado sobre condições não controladas, o que impossibilita uma boa reprodutibilidade dos resultados. Assim, para todas as análises, a emulsão β -Caroteno-ácido linoléico e a curva padrão com Trolox devem ser preparadas no momento da

análise. Em algumas situações, como ocorreu com o extrato fenólico, a amostra apresenta leitura no comprimento de onda do teste, o que reduz sua simplicidade quando se avalia a queda de absorvância ao longo do tempo, em concentrações variadas. Dependendo da polaridade do solvente utilizado para obtenção do extrato (oleorresinas foram extraídas com cinco solventes de polaridades distintas), a sua aplicação torna-se ainda mais complexa.

Dentre os métodos testados, o DPPH e o ABTS foram os mais adequados para avaliação da atividade antioxidante da fração fenólica, do óleo essencial e da oleorresina obtida com cinco solventes diferentes (hexano, éter etílico, éter de petróleo, etanol e acetona), em virtude da estabilidade dos radicais DPPH e ABTS e da boa reprodutibilidade dos resultados. Além disso, a amostra pôde ser extraída com uma diversidade de solventes com polaridades variadas, já que nestes ensaios, o extrato pode ser preparado ressuspensando a amostra (oleorresina, óleo essencial ou extrato fenólico) em solução etanólica ou metanólica. Como ambos os métodos possuem princípios semelhantes, optou-se por utilizar o ensaio do DPPH para determinar a atividade antioxidante de todas as frações da pimenta rosa em razão das limitações na representação da atividade antioxidante do ensaio do radical ABTS.

5.8. Aceitabilidade da pimenta rosa

5.8.1. Em salmão

O teste “t” para dados pareados confirmou a diferença significativa entre o controle (salmão) e a amostra (salmão acrescentado de pimenta rosa), indicando que a pimenta rosa aumentou a aceitabilidade do salmão. A média da aceitação do salmão (7,2) situou-se entre os termos hedônicos “gostei moderadamente” e “gostei muito” e a média do salmão com a pimenta rosa situou-se entre os termos hedônicos “gostei muito” e “gostei extremamente” (8,1). Apenas 9,2% dos provadores atribuíram notas iguais ou inferiores a 6, em que a aceitabilidade da amostra situou-se abaixo do termo hedônico “gostei ligeiramente” .

Dentre os 250 provadores que avaliaram as amostras, 58 eram mulheres. A maior participação de indivíduos do sexo masculino na avaliação sensorial da pimenta rosa está associada, provavelmente, ao tipo de produto apresentado.

A distribuição da faixa etária dos provadores está apresentada na Figura 8. Pode-se observar que a faixa etária predominante dos provadores situou-se entre 40 e 49 anos (23,6%), seguida de indivíduos com idade entre 30 e 39 anos (17,2%). Em contrapartida, a porcentagem de crianças e adolescentes (10,4%) e indivíduos com mais de 70 anos de idade (8%) que participaram do teste sensorial foi bem inferior.

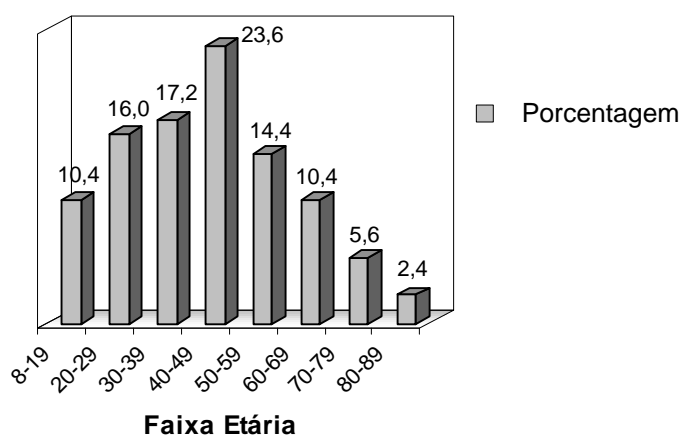


Figura 8: Distribuição da faixa etária dos provadores.

A aceitabilidade da pimenta rosa em salmão foi elevada em todas as idades. A média da aceitação para provadores entre 8 e 19 anos e entre 60 e 79 anos situou-se no termo hedônico “gostei muito”. Para as demais faixas etárias, a média da aceitação situou-se entre os termos hedônicos “gostei muito” e “gostei extremamente”. A distribuição das médias da amostra (salmão com pimenta rosa) por faixa etária está apresentada no Quadro 26.

Quadro 26: Distribuição das médias de aceitação da amostra (salmão com pimenta rosa) por faixa etária.

Faixa Etária	Média da aceitação da amostra
8-19	8,0
20-29	8,1
30-39	8,1
40-49	8,1
50-59	8,1
60-69	8,0
70-79	8,0
80-89	8,1

Os comentários gerais a respeito do produto caracterizaram-no como um condimento saboroso, de sabor suave, exótico, sofisticado, aromático, e um pouco adocicado. Os provadores aprovaram a combinação do peixe com o condimento, afirmando que a pimenta rosa realçou o sabor característico do salmão.

O pré-julgamento de alguns provadores em relação à ardência encontrada na maioria das pimentas favoreceu a aceitabilidade da pimenta rosa para aqueles que não apreciam esta característica. Assim, a pimenta rosa torna-se uma alternativa para este tipo de consumidor.

Em raras situações, a pimenta rosa reduziu a aceitabilidade do peixe, e em situações em que o salmão não era apreciado pelos provadores, o condimento aumentou drasticamente sua aceitabilidade.

5.8.2. Em chocolate

A faixa etária predominante para ambos os testes foi de 15 a 25 anos, correspondendo a 83,0 % dos provadores para o teste de aceitação da pimenta rosa em chocolate preto e 87,5% para o teste de aceitação da pimenta rosa em chocolate branco. A predominância de indivíduos nesta faixa etária pode ser explicada pelo local de realização do teste sensorial. O Laboratório de Análise Sensorial (DTA) situa-se no campus da Universidade Federal de Viçosa e localizado próximo ao Colégio Universitário (COLUNI). A distribuição da faixa etária destes provadores está apresentada na Figura 9.

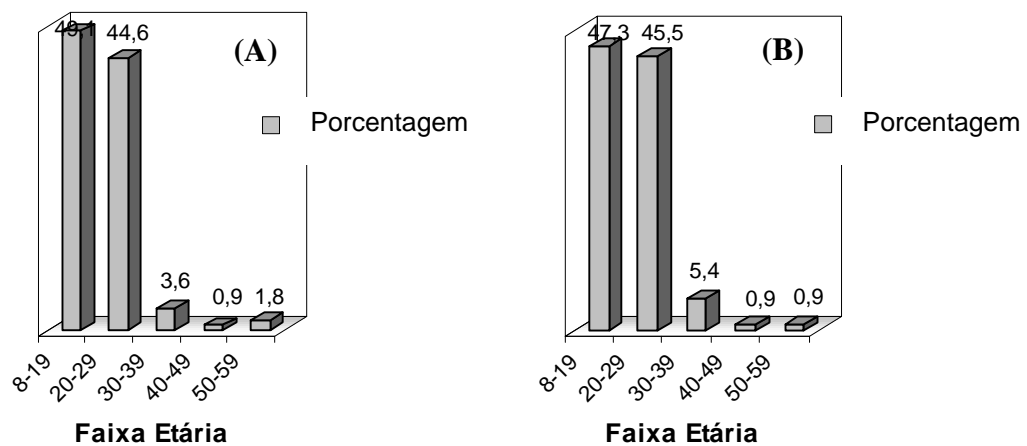


Figura 9: Distribuição da faixa etária dos provadores. (A) Teste de aceitação da pimenta rosa em chocolate preto (B) Teste de aceitação da pimenta rosa em chocolate branco.

As mulheres corresponderam à maioria da população amostrada: 55,4% para o teste sensorial da pimenta rosa em chocolate preto e 51,8% para o outro teste.

A aceitabilidade da pimenta rosa em chocolate preto situou-se entre os temas hedônicos "gostei moderadamente" e "gostei muito" (média= 7,7). Para o chocolate branco, a média da aceitação da pimenta (média= 6,6) situou-se entre os temas hedônicos "gostei ligeiramente" e "gostei moderadamente".

Para o teste sensorial com chocolate preto, 78,6% dos provadores atribuíram notas superiores a 8, e para o outro teste, 69,7% dos provadores atribuíram notas superiores a 7. As médias da aceitação em cada faixa etária para ambos os testes sensoriais está apresentada no Quadro 27.

Quadro 27: Distribuição das médias de aceitação das amostras (chocolate com pimenta rosa) por faixa etária.

Média da aceitação da amostra		
Faixa Etária	Chocolate preto	Chocolate branco
8-19	7,7	6,6
20-29	7,7	6,6
30-39	7,8	6,6
40-49	8,0	8,0
50-59	8,0	8,0

A média da aceitação encontrada para as três primeiras faixas etárias foi idêntica ou muito próxima à média encontrada no teste sensorial (Quadro 26). Esta observação é válida para ambos os testes, mostrando que a aceitabilidade da pimenta rosa entre 8 e 39 anos é praticamente a mesma. Entretanto, as médias encontradas para indivíduos entre 30 e 39 anos, 40 e 49 anos e entre 50 e 59 anos não são representativas em razão do pequeno número de indivíduos que participaram do teste.

Os comentários gerais a respeito do produto caracterizam-no, assim como para o salmão, como um condimento de sabor exótico e aromático. Para os apreciadores desse condimento, um sabor doce e suave foi atribuído à pimenta. Outros, entretanto, consideraram que a pimenta mascarou o sabor do chocolate.

6.CONCLUSÕES

A complexidade dos compostos fenólicos presentes nos materiais vegetais exige um estudo específico quanto ao estabelecimento de critérios para a padronização de métodos de extração e quantificação de polifenóis.

O método de extração e quantificação do conteúdo fenólico são tão críticos quanto o tipo e proporção dos solventes utilizados, o tempo e a temperatura de extração, o tamanho das partículas do material vegetal e o pH, já que estes interferem nas modificações estruturais e biológicas dos compostos, refletindo na dificuldade de solubilização e degradação dos fenólicos.

Para extração de fenólicos totais, solventes polares são mais adequados, e a mistura destes aumenta o poder de extração por aumentar a faixa de solubilidade destes compostos. Temperaturas de ebulição podem auxiliar a extração, entretanto o binômio tempo-temperatura deve ser otimizado para cada sistema de solventes.

Acetona 70%(v/v) acidificada com 1%(v/v) de HCl é o sistema extrator mais eficiente para a ressuspensão de fenólicos totais da pimenta rosa, sugerindo o enriquecimento do extrato com compostos polares e fenóis poliméricos de alto peso molecular, como os taninos.

A atividade antioxidante depende tanto do método e da técnica utilizados, quanto do substrato e das condições experimentais, como, por exemplo, o tipo de solvente utilizado na extração, o qual afetará diretamente a solubilidade dos compostos. Assim, recomenda-se que sejam avaliados mais de dois parâmetros na determinação da atividade antioxidante dos compostos.

A quantidade e o tipo de compostos fenólicos podem variar em diferentes populações de uma mesma espécie. Estas variações no perfil fenólico e na quantidade de certas substâncias presentes na planta têm implicações diretas nas propriedades antioxidantes da matéria prima.

Em se tratando da oleorresina, o efeito do solvente extrator no rendimento e na atividade antioxidante é dependente do método de extração utilizado. A ordem do rendimento e da atividade antioxidante da oleorresina sugere que a maior contribuição à atividade antioxidante global da pimenta

rosa é atribuída a compostos polares, principalmente polifenóis. Além disso, a pimenta rosa apresenta um baixo teor de óleo e compostos polares, com atividade antioxidante desprezível quando comparada à fração polar.

As oleorresinas extraídas com solventes de maior polaridade e o extrato fenólico da pimenta rosa apresentam a maior atividade antioxidante. Em contrapartida, o óleo essencial e as oleorresinas de menor polaridade apresentam a menor participação na atividade anti-radical da pimenta rosa.

A constante procura dos consumidores por inovações e o aumento da exigência em relação ao produto como um todo, faz da pimenta rosa uma oportunidade de inovação e refino do paladar. Os frutos comercializados na forma desidratada apresentam grande potencialidade de consumo em virtude de sua elevada aceitabilidade, atendendo a todas as faixas etárias. Além disso, o condimento apresenta grande versatilidade em sua utilização, podendo ser utilizado na gastronomia em produtos variados, salgados e doces, atribuindo-lhes sabor exótico e aromático.

7-PERSPECTIVAS

Isolamento, extração e estudo do mecanismo de ação dos bioativos naturais encontrados na pimenta rosa e demais partes da planta, como polifenólicos, e aplicações destes componentes na indústria farmacêutica e cosmética.

Estudos epidemiológicos incluindo testes *in vivo*, a fim de verificar a eficácia, segurança e qualidade dos extratos de aroeira com alegações fitoterápicas, assegurando confiabilidade ao consumidor.

Desenvolvimento de metodologias simples, confiáveis e de uso prático para avaliar o potencial antioxidante de produtos para fins tecnológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, A. E., e ROOZEN, J. P. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. **Food Chemistry**, n.64, p.323–329, 1999.
- ALASALVAR, C.; AL-FARSI, M.; QUANTICK, P.C.; SHAHIDI, F.; WIKTOROWICZ, R. Effect of chill storage and modified atmosphere packaging (MAP) on antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready-to-eat shredded orange and purple carrots **Food Chemistry** n.89 p. 69–76, 2005.
- ALONSO, A. M.; CASTRO, R.; RODRÍGUEZ, M. C.; GUILLÉN, D. A.; BARROSO, C. G. Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlation with their content in polyphenols **Food Research International** n.37, p. 715–721, 2004.
- ALONSO, A. M.; DOMINGUEZ, C.; GUILLEN, D.A.; BARROSO, C.G. Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content **J. Agric. Food Chem.** n.50, p. 3112-3115, 2002.
- ALVES, L. O.; PIZZOLATTI, M.G.; BRIGHENTE, I.M.C. Efeito antioxidante de extratos e frações de *Schinus molle*. **XI Encontro de Química da Região Sul** QO-18 Pelotas, RS Nov/ 2003.
- AMORIM de, M.M. R.; SANTOS, L. C. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*): ensaio clínico randomizado **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v. 25, n.2 Rio de Janeiro Mar/2003.
- AMIN, I.; NORAZAIDAH, Y.; HAINIDA, K.I.E. Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched *Amaranthus* species **Food Chemistry**, n.94, p.47-52, 2006.
- AOAC Association of official analytical chemists **Official Methods of analysis**. 16 ed. Washington AOAC. 2000 p., 1995
- ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in Vegetable Foods Commonly Consumed in Brazil and Estimated Ingestion by the Brazilian Population **J. Agric. Food Chem.** n. 52, p. 1124-1131, 2004.
- ARAUJO, J.M.A., **Química de Alimentos: teoria e prática** 2. ed. Viçosa: MG Editora da UFV, 416p. 1999.

- ARNAO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case **Trends in Food Science e Technology** n.11, p. 419–421, 2000.
- AUW, J.M.; BLANCO, V.; O'KEEFE, S.F.; SIMS, C.A. Developmental changes of procyanidins in grapes of red *Vitis vinifera* varieties and their composition in respective wines. **Am. J. Enol. Vitic.** n. 4, v. 51, p. 397-403, 2000.
- BALBACH, A. **A flora nacional na medicina doméstica-** 23. ed., v. II Ed. A Edificação do Lar São Paulo- S.P. 919p. 1986.
- BAUBLIS, A., DECKER, E. A., e CLYDESDALE, F. M. Antioxidant effect of aqueous extracts from wheat based ready-to-eat breakfast cereals. **Food Chemistry**, n.68, p.1-6, 2000.
- BECKER, E. M.; NISSEN, L.R.; SKIBSTED,L.H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects **Eur Food Res. Technol-** Review, n. 219, p. 561-571, 2004.
- BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO,J.; LORENTE,J; ORTUNO, A.; DEL RIO, J.A. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea L.* leaves **Food Chemistry** n.68 p.457-462, 2000.
- BLANCO, M.C.S.G.; MING, L.C.; MARQUES, M.O.M.; BOVI, O.A. Drying temperature effects in peppermint essential oil content and composition. **Acta Horticulturae**, n.569, p.95-98, 2002.
- BOCCARDO, L.; CRUZ JR, D.O.; PAULA, V.F.; BARBOSA, L.C.A.; SOARES, J.M. Toxicidade de extratos de *Piper nigrum* e da piperina no diplópodo neotropical *Orthoporus fuscipes* (Porat, 1888). Resumo 1202 p.298 Myriapoda **XXV CBZ** fev / 2004.
- BONDET, V. BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET,C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method **Lebensmittel Wissenschaft and Technologie**, n. 30, p. 609–615,1997.
- BONDET, V. BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET,C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method **Lebensmittel Wissenschaft and Technologie-** ERRATUM-, n. 30, p. 772,1997.
- BRAND-WILLIAMS, W.;CUVELIER,M.E.; BERSET,C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft and Technologie** n. 28, v. 1, p. 25-30, 1995.
- CAI,Y.;LUO,Q.;SUN,M.;CORKE,H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer **Life Sciences** n.74 , p. 2157–2184, 2004.

- CAMPOS, A.M.; ESCOBAR, J.; LISSI, E.A. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant activity (TAR) of *Ilex paraguayensis* extracts and red wine. **J. Braz. Chem. Soc.** n.7, p. 43-49, 1996.
- CAMPOS, A.M.; LISSI, E.A. Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. **Int J Chem Kinetics** n.29, p. 219-224, 1997.
- CATUNDA, P. H. A.; VIEIRA, H.D.; DA SILVA, R.F.; POSSE, S.C.P. Influência do teor de água, da embalagem e das condições de armazenamento na qualidade de sementes de maracujá amarelo **Rev. Bras.Sementes** v.25, n.1 Pelotas Julho/ 2003. ISSN 0101-3122.
- CHANG, M. J.; COLLINS, J. L.; BAILEY, J. W.; CO.EY, D. L. Cowpea tannins related to cultivar, maturity, dehulling and heating. **Journal of Food Science**, n. 59, p.1034-1036, 1994.
- CHAVAN, U.D., SHAHIDI, F., NACZK, M. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus L.*) as affected by different solvents. **Food Chemistry** n.75 p. 509-512, 2001.
- CORRÊA, M.P. **Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas** 6v. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p.170-171, 1984.
- CRUZ, G. L. Aroeira In: **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**, 2° Ed., Rio de Janeiro, Civilização Brasileira, p.70-72, 1982 .
- DECKER, E. A.; WARNER, K.; RICHARDS, M.P., SHAHIDI, F. Measuring Antioxidant Effectiveness **Food Journal of Agricultural and Food Chemistry** n.53, p. 4303-4310, mar/ 2005.
- DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.; SANTOS, R.J. dos Atividade antioxidante de extrato de fruto de aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*). **Visão Acadêmica** ISSN: 1518-5192 Curitiba v.5, n.2, p. 83-90, Jul/Dez, 2004.
- DESHPANDE, S. S.; CHERYAN, M. Evaluation of vanillin assay for tannin analysis of dry beans. **Journal of Food Science**, n. 50, p.905–910, 1985.
- FERRITER, A. **Brazilian Pepper Management Plant for Florida**. Florida Exotic Pest Council's Brazilian Pepper Task Force, 1997.
- GALLORI, S.; BILIA, A.R.; BERGONZI, M.C.; BARBOSA, W.L.R.; VINCIERI, F.F. Polyphenolic Constituents of Fruit Pulp of *Euterpe oleracea Mart.* (Açaí palm) **Chromatographia** vol. 59 n. 11/12 ,2004.
- GIAMPERI, L.; FRATERNALE, D.; BUCCHINI, A.; RICCI, D. Antioxidant activity of *Citrus paradisi* seeds glyceric extract **Fitoterapia** n.75, p. 221–224, 2004.

- GUENDEZ,R.;KALLITHRAKA,S.;MAKRIS,D.P.;KEFALAS,P. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity **Food Chemistry** n.89 ,p. 1–9, 2005.
- GUERRA,M.J,M.;BARREIRO,M.L.;RODRÍGUEZ,Z.M.;RUBACALBA,Y.Activida d antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Copal) **Rev. Cubana Plant Med** v.5, n.1 p.23-25, 2000.
- GOMIS, D. B. ; PALOMINO, N. F. ; ALONSO, J. J. M. Capillary liquid chromatographic determination of neutral phenolic compounds in apple juices **Analytica Chimica Acta** n.426 p. 111–117, 2001.
- GUENDEZ,R.;KALLITHRAKA,S.;MAKRIS,D.P.;KEFALAS,P. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity **Food Chemistry** 89 p. 1–9, 2005.
- HAENEN, G. R.M.M; ARTS, M. J.T.J.; BAST,A.; COLEMAN, M.D. Structure and activity in assessing antioxidant activity *in vitro* and in vivo A critical appraisal illustrated with the flavonoids **Environmental Toxicology and Pharmacology**, ago/2005
- HALLIWELL, B., MURCIA, M. A., CHIRICO, S., e AUROMA, O. I. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: What they do and how they work? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n. 35, p. 7–20, 1998.
- HEATH, H.B. Herbs ad spices for manufacture. In: Tropical Products Institute Conference Proceedings. **Spices**. London,1973, Cap. 2, p. 39-48. ISBN 0-85954-010-3
- HO,P.; HOGG, T.A. ; SILVA, M.C.M. Application of a liquid chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines **Food Chemistry** n.64, p. 115-122,1999.
- IBANEZ, E., OCA, A., MURGA, G. DE, LOPEZ-SEBASTIAN, S., TABERA, J., REGLERO, G. Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed rosemary plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.47, p. 1400-1404, 1999.
- KUDA,T.; IWAI, A.; YANO,T. Effect of red pepper *Capsicum annuum* var. *conoides* and garlic *Allium sativum* on plasma lipid levels and cecal microfora in mice fed beef tallow **Food and Chemical Toxicology** n. 42 p. 1695–1700, 2004.

- KUMAR, R. S., e VAITHIYANATHAN, S. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. **Animal Feed Science and Technology**, n.30, p. 363–380, 1990.
- LACA-BUENDIA, J.P.; BRANDÃO, M.; OLIVEIRA, L.M.S. Utilização dos frutos de *Schinus terebinthifolius Raddi* (Anarcadiaceae) na substituição da pimenta-do-reino (*Piper Nigrum L.*) Daphne, Belo Horizonte v.2, n.4, p.34-36, 1992.
- LEHTINEN, P., e LAAKSO, S. Effect of extraction conditions on the recovery and potency of antioxidants in oat fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.46, p.4842-4845, 1998.
- LLESUY, S.; EVELSON, P.; CAMPOS, A.; LISSI, E. Methodologies for evaluation of total antioxidant activities in complex mixtures. **Biol. Res. - Review** - v.34, n.2, Santiago, 2001
- MAKKAR, H. P. S., BLUMMEL, M.; BECKER, K. In-vitro effect of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n.69, p.481-493, 1995.
- MARKUS, F., DAOOD, H. G., KAPITANY, J., e BIACS, P. A. Change in the carotenoid and antioxidant content of spice red pepper (Paprika) as a function of ripening and some technological factors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.47, p.100-107, 1999.
- MARTINEZ, M.J. ; BETANCOURT, J. ; ALONSO-GONZALEZ, N. ; J A U R E G U I, A. Screening of some Cuban medicinal plants activity for antimicrobial activity **Journal of Ethnopharmacology** n.52 p.171-174, 1996.a
- MARTINEZ, M.J.; GONZALEZ, N.A.; BADELL, J.B. Actividad antimicrobiana del *Schinus terebinthifolius Raddi* (Copal) **Rev. Cubana Plant Med** v.1, n.3 p.37-39, 1996.b
- MELO, E.C.; RADÜNZ, L.L.; de ALVARENGA e MELO, R.C.A. Influência do processo de secagem na qualidade de plantas medicinais – Revisão **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, M.G., v.12, n.4, p.307-315, out./dez., 2004.
- MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity **Songklanakarin J. Sci. Technol.** v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.
- MOURE, A; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUNEZ, M.J.; PARAJO, J.C. Natural antioxidants from residual sources **Food Chemistry- Review** - n.72, p. 145 -171, 2001.

- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food **Journal of Chromatography A- Review** - n.1054, p. 95–111, 2004.
- NAKATANI, N; KAYANO, S; KIKUZAKI, H; SUMINO, K; KATAGIRI, K; MITANI, T. Identification, quantitative determination and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.) **J. Agric Food Chem** v.48, n.11, p.5512- 5516, 2000.
- NESELO, M.A.; SERAFINI, L. A.; ROSSATO, M.; SALVADOR, M.; dos SANTOS, A.C.A.; BERGAMINI, G. **Avaliação quantitativa de compostos fenólicos totais e da capacidade antioxidante de extratos da espécie *Schinus terebinthifolius***. XII Encontro de Jovens Pesquisadores. 2004. Disponível em: <http://www.uces.br/ucs/tp/JovensPesquisadores2004/pesquisa/jovenspesquisadores/trabalhos_pdf/vida/marianaavilaneselo.pdf> Acesso em: 15/01/2006.
- NEWMAN, A. Free Radical Biology e Medicine 3 The last 20 years: The most highly cited papers **Free Radical Biology e Medicine**, 27/set., 2005.
- NGOKWEY, N. Home remedies and doctors' remedies in Feira (Brazil). **Social Science e Medicine**, v.40, n. 8, p. 1141-1153, 1995.
- ORTEGA, M.P. I.; ROMERO, M.A.R.; PEREZ, F.J.I. **Alimentos funcionales: evaluación de la capacidad de extractos del frijol cocido para inactivar radicales libres**. Universidad Juarez Del Estado de Durango y el INIFAP2003. Disponível em: <http://www.pncta.com.mx/pages/pncta_investigaciones_03h.asp?page=03e6> Acesso em: 26-05-2005.
- PENG, Z.F.; STRACK, D.; BAUMERT, A.; SUBRAMANIAM, R. GOH, N.K.; CHIA, T.F.; TAN, S.N.; CHIA, L.S. Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. **Phytochemistry** n.62 p. 219–228, 2003.
- PENNINGTON, J. A. T. Food Composition Databases for Bioactive Food Components **Journal of food composition and analysis** – Review n.15 p. 419–434, 2002.
- Pepper Rosé (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Disponível em: <www.kfunigraz.ac.at/.../engl/Schi_ter.html> Acesso em: 11-07-2004.
- PEREZ, D. D.; LEIGHTON, F.; ASPEE, A.; ALIAGA, C.; LISSI, E. A comparison of methods employed to evaluate antioxidant capabilities. **Biol. Res.** ISSN 0716-9760 v.33 n.2 Santiago 2000.
- PORTER, W. L. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. **Toxicol. Ind. Health** n.9, p. 93-122. 1993.
- QUEIRES, L. C. S.; RODRIGUES, L. E. A. Quantificação das Substâncias Fenólicas Totais em Órgãos da Aroeira *Schinus terebinthifolius* (RADDI)

- Brazilian Archives of Biology and technology**, v.41, n.2, p.247-253, 1998.
- QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A. L. de; NASCIMENTO, E. A. do. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*) **Rev. Árvore** ISSN 0100-6762 v.26 n..4 Viçosa Jul/Agos. 2002.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A., PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant Activity Applying An Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay **Free Radical Biology e Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.
- REDDY ,V.;UROOJ ,A. ; KUMAR,A. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application in biscuits **Food Chemistry** n.90 p. 317–321, 2005.
- REIS,A.S.;MOREIRA,D.L.;LEITAO,S.G;LEITAO,G.G. Avaliação da atividade antioxidante de extrato e frações de *Leudopiptadenia contorta* (Leguminosae-mimosoideae). Maio/2000. Poços de Caldas/ M.G. Disponível em: <<http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/0753/index.html>> Acesso em: 26-05-2005.
- RICE-EVANS,C.A.; MILLER,N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds **Plant Science** -Review- v.2, n.4, 1997.
- ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables **Journal of Chromatography A** - Review, n.1000, p. 657–691, 2003.
- ROGINSKY,V.;LISSI,E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food **Food Chemistry** V. 92, n. 2, p. 235-254, 2004.
- RUIZ, A .R.; TORRE, R.A.; ALONSO, N.; VILLAESCUSA, A.; BETANCOURT, J.; VIZOSO,A. Screening of medicinal plants for indution of somatic segregation activity in *Aspergillus nidans*. **Journal of Ethnopharmacology** Vol.52 p. 123-127,1996.
- SATO, M.; RAMARATHNAM, N.; SUZUKI, Y.; OHKUBO, T. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources **J. Agric. Food Chem.** N.44, p. 37-41, 1996.
- SALUNKHE, D. K.; JADHAV, S. J.; KADAM, S. S.;CHAVAN, J. K. Chemical, biochemical and biological significance of polyphenols in cereals and legumes. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 17, 277–305, 1982.
- SANCHEZ-MORENO,C. Compuestos polifenolicos: efectos fisiológicos. Atividade antioxidante. **Alimentaria** p.29-40,2002.

- SANTOS dos, P.L.; SERAFINI,A.;ROSSATO,M.;PANSERA,M.R.;SANTOS dos,A.C.A. **Análise mensal da composição química e do teor do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius Raddi***. Ciências exatas e da Terra, n.66 Disponível em: http://www.ucs.br/ucs/2004/pesquisa/jovenspesquisadores/trabalhos_pdf/vida/paula_santos.pdf> Acesso em: 10/01/2006.
- SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: souces, chemistry, effects and applications**. 1 ed. Lancaster: Technomic Publishing Co,Inc.,1995. 331p.
- SHEABAR, F. Z., e NEEMAN, I. Separation and concentration of natural antioxidants from the rape of olives. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, n. 65, p.990-993, 1998.
- SHUI, G; LEONG, L. P. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography **Journal of Chromatography A**, n. 977, p. 89–96, 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-** Revisão v. 22, n. 1, Jan/Fev 1999.
- SILVA, P.C.F. da **Propriedades antioxidantes *in vitro* de uva branca e de uva tinta e de seus respectivos vinhos elaborados** Viçosa-MG, Universidade Federal de Viçosa, 2003. 138p. Tese de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa (UFV).
- SKERGET, M.; KOTNIK, P. ;HADOLIN,M.; HRAS, A. R.; SIMONIC, M.; KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities **Food Chemistry** n.89 p. 191–198, 2005.
- SOKMEN,A.; GULLUCE,M;AKPULAT ,A.; DAFERERA,D.; TEPE ,B.; POLISSIOU , M.; SOKMEN , M.; SAHIN,F. The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius* **Food Control** n.15 ,p. 627–634, 2004.
- SOONG, Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds **Food Chemistry** n.88 p.411– 417, 2004.
- STASI di, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.;QUEIROZ-JUNIOR M.; TIEN, O.S. ; KAKINAMI, S.H.; REIS, M.S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia** , n. 73 p. 69-91, 2002.
- ŠTERBOVÁ, D.; MATEJICEK, D.; VLCEK,J.; KUBÁN,V. Combined microwave-assisted isolation and solid-phase purification procedures prior to the chromatographic determination of phenolic compounds in plant materials **Analytica Chimica Acta** n. 513, p. 435-444, 2004.

- SURH, Y; LEE, S.S. Capsaicin, a double-edged sword: Toxicity, metabolism, and chemopreventive potential **Life Sciences**, v. 56, n. 22, p. 1845-1855, 1995.
- TEMPLE, N. J. Antioxidants and disease: More questions than answers **Nutricion Research**, v. 20, n. 3, p. 449-459 , 2000.
- TOMAINO, A. ; CIMINO, F. ; ZIMBALATTI, V. ; VENUTI, V. ; SULFARO, V. ; DE PASQUALE, A. ; SAIJA , A. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils **Food Chemistry** n.89 p.549-554, 2005.
- VEIGA Jr., V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
- WETTASINGHE,M.; SHAHIDI, F. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds. **Food Chemistry** v. 67, p. 399-414, 1999.
- WIJEWICKREME, A. N.; KITTS, D. D. Oxidative reactions of model Maillard reaction products and α -tocopherol in a flour-lipid mixture. **Journal of Food Science**, n.63, p.466–471, 1998.
- SOONG,Y-Y;BARLOW,P.J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, n.88, p.411–417, 2004.
- YEN, G.-C., e DUH, P. D. Antioxidant activity of methanolic extracts of peanut hulls from various cultivars. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, n.72, p.1065-1067, 1995.
- YEN, G.-C., e DUH, P. D. Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 42, p.629-632, 1994.
- YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V.; Pharmaceutics and phytotherapics: the need for development of the industry of phytopharmaceutics and phytotherapics in Brazil. **Química Nova** v. 24, n.1, p.147-152. ISSN 0100-4042. Jan./Fev. 2001.

APENDICE

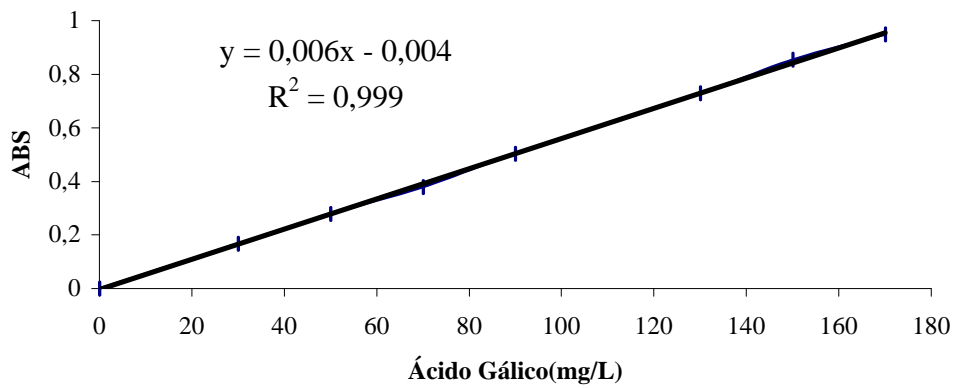


Figura 1A: Curva Padrão de Ácido Gálico utilizada para quantificação de polifenóis totais pelo ensaio com reagente Folin-Denis.

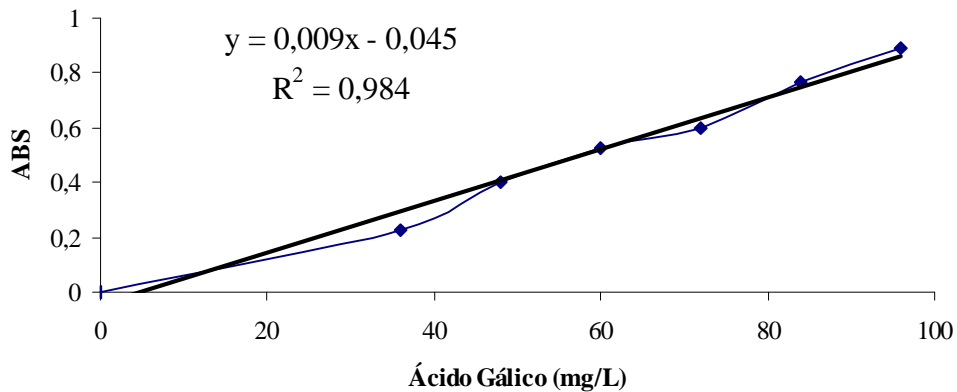


Figura 2A: Curva Padrão de Ácido Gálico utilizada para quantificação de polifenóis totais pelo ensaio com reagente Folin-Ciocalteu.

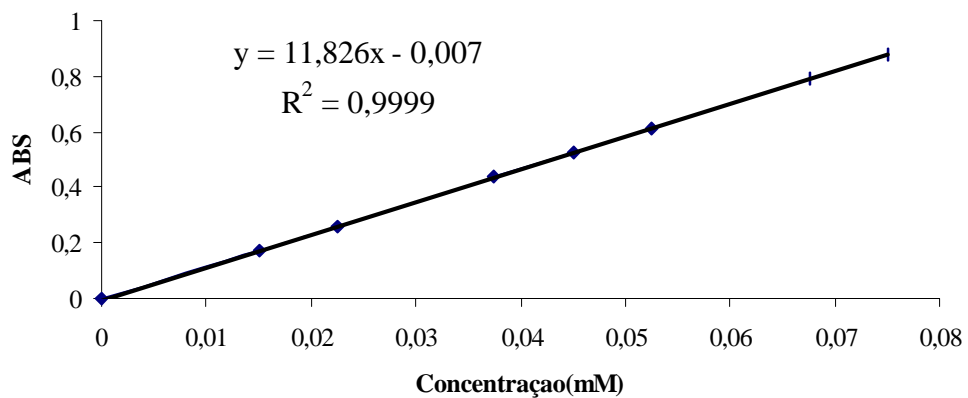


Figura 3A: Curva Padrão de DPPH.

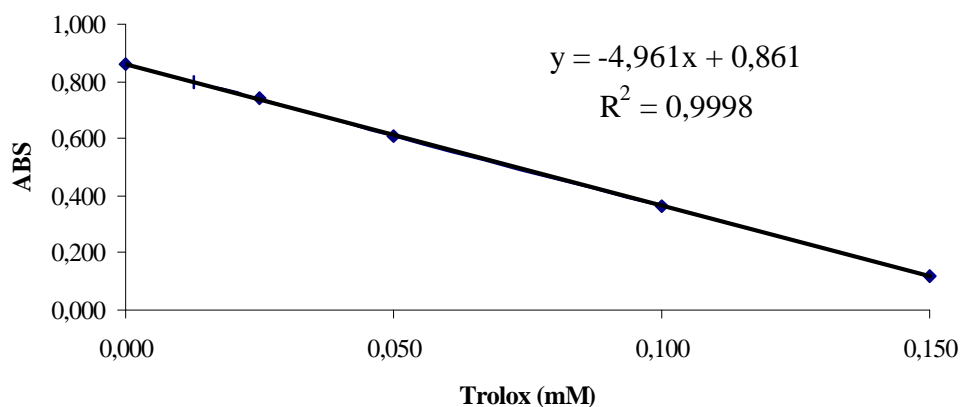


Figura 4A: Curva Padrão de Trolox utilizada para determinar a atividade antioxidante pelo ensaio do radical livre DPPH.

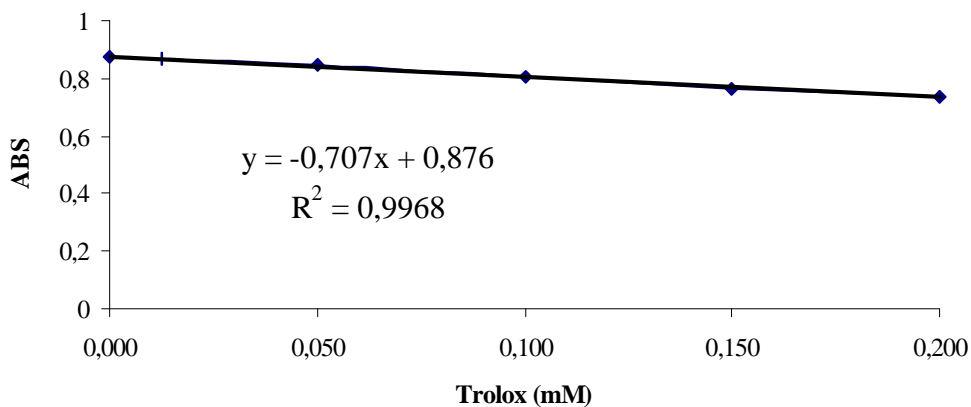


Figura 5A: Curva Padrão de Trolox utilizada para determinar a atividade antioxidante pelo ensaio do cátion radical livre ABTS.

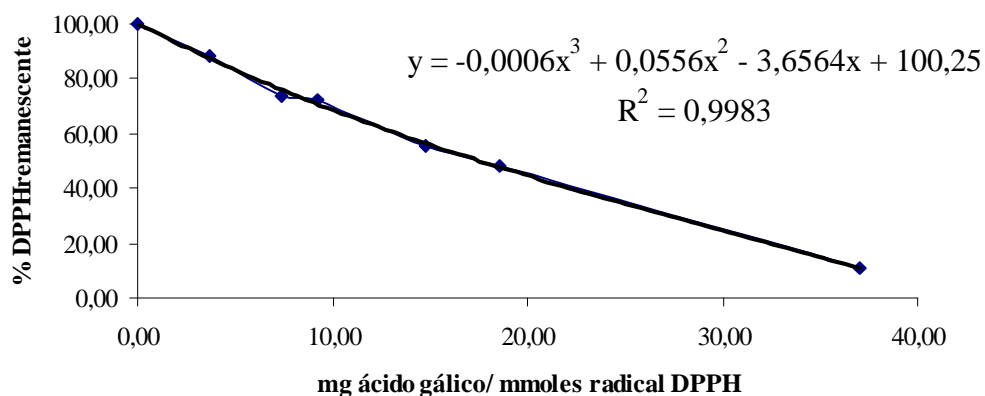


Figura 6A: Porcentagem do radical livre DPPH remanescente em função das diluições do extrato fenólico.

Quadro 1A: Resumos da Análise de variância do rendimento de oleorresina (g oleorresina /100g pimenta rosa em peso seco) extraída por dois métodos de extração e cinco solventes diferentes.

Fonte da variação	GL	QM
Solventes	4	829,86 **
Método de Extração	1	233,82 **
Interação	4	100,27 **
Resíduo	20	0,72

** Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte da variação	GL	QM
Solventes	4	
Método/ Etanol	1	607,80 **
Método/ Acetona	1	16,01 **
Método/ Éter etílico	1	2,48
Método/ Éter petróleo	1	6,72 **
Método/ Hexano	1	1,88
Resíduo	20	0,72

** Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte da variação	GL	QM
Métodos de extração	1	
Solventes/ Extração em soxhlet	4	748,84 **
Solventes/ Extração a frio	4	181,29 **
Resíduo	20	0,72

** Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Quadro 2A: Resumos da Análise de variância da atividade antioxidante da oleorresina (μ moles radicais DPPH reduzidos /g pimenta rosa em peso seco) extraída por dois métodos de extração e cinco solventes diferentes.

Fonte da variação	GL	QM
Solventes	4	5645,21 **
Método de Extração	1	1098,50 **
Interação	4	1643,16 **
Resíduo	20	0,56

** Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte da variação	GL	QM
Solventes	4	
Método/ Etanol	1	7581,82 **
Método/ Acetona	1	30,26 **
Método/ Éter etílico	1	59,03 **
Método/ Éter petróleo	1	0,01
Método/ Hexano	1	0,02
Resíduo	20	0,56

** Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte da variação	GL	QM
Métodos de extração	1	
Solventes/ Extração em soxhlet	4	6589,73 **
Solventes/ Extração a frio	4	698,64 **
Resíduo	20	0,56

** Significativo ao nível de 5% de probabilidade.