

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS ITAQUI
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**



**DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO GAMA
ORIZANOL *IN VITRO***

NEICÍ CACERES SILVA

**Itaqui
2013**

NEICÍ CACERES SILVA

**DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO GAMA
ORIZANOL *IN VITRO***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do grau em Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

**Orientador: Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse
(UNIPAMPA)**

**Co-orientador: Prof.^a Dr^a. Marina Prigol
(UNIPAMPA)**

**Itaqui
2013**

Caceres, Neicí Silva.
Determinação da capacidade antioxidante do gama orizanol *in vitro*.
Neicí Caceres Silva. - 13 de maio de 2013.
58 f.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse.
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Marina Prigol.
Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel) - Universidade Federal
do Pampa, Ciência e Tecnologia de Alimentos, 13 de maio de
2013.

1. ABTS. 2. DPPH. 3. Radicais livres. I. Jesse, Cristiano Ricardo,
II. Prigol, Marina III. Determinação da capacidade antioxidante do
gama orizanol *in vitro*.

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da
Biblioteca Central da UNIPAMPA, com os dados fornecidos pelo autor.

©2013

Todos os direitos autorais reservados a Neicí Caceres Silva. A reprodução de partes ou do
todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.

Endereço: Avenida Bento Gonçalves, n. 1646, Bairro Estação, Itaqui, RS, 97650-000.

Fone: (55) 9983 7200; E-mail: ncaceress@hotmail.com

NEICÍ CACERES SILVA

**DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO GAMA
ORIZANOL *IN VITRO***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em: 13 de maio de 2013.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse
(Orientador – UNIPAMPA ITAQUI)

Prof. Dr. Leomar Hackbart da Silva
(UNIPAMPA ITAQUI)

Prof. Dr. Tiago André Kaminski
(UNIPAMPA ITAQUI)

Dedico toda essa conquista à minha família e a DEUS que foram os maiores responsáveis por esta vitória e sempre serão o alvo mais importante que tenho na vida.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus, que é sabedor de toda a nossa fé. Se dia a dia aprendemos mais, é porque sabemos pouco dos ensinamentos da vida, é Deus que em determinados momentos nos coloca diante de algum desses ensinamentos. O Senhor é que nos fortalece de espírito durante a caminhada da vida, é nele que sempre buscamos superação para os momentos difíceis e devemos sempre agradecer a DEUS por qualquer vitória alcançada, esta conquista é uma delas.

A minha amada esposa Márcia Rósula, pela incansável ajuda nos momentos difíceis, de escassez de tempo, principalmente por nossos caminhos terem se unidos de uma forma tão abençoada.

Aos meus amados filhos, Bruno e Cristhian Matheus, os quais sempre souberam entender os momentos que me ausentei para concluir esse importante objetivo para nossa família.

Aos meus amados pais, Ney e Eva, pela dádiva da vida, pelas orientações e criação que são pilares importantes para nossa formação e crescimento, enfim, tudo que sou, teve a participação dos meus pais.

Aos meus irmãos Cibele, Cinara, Silene, Valdeci, Henrique, Tiago e Lucas, quem sempre foram meus incentivadores e companheiros inseparáveis.

A UNIPAMPA, instituição de ensino que oportunizou mais esta etapa de formação, especialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse pelo incentivo, apoio e sábias palavras nos momentos de ajuda e a Prof.^a Dr.^a Marina Prigol, que em conjunto são dignos dos maiores elogios por sua ética e profissionalismo. Aos professores Ana Flávia Furian, Leomar Hackbart, Larissa Canhadas Bhertan e Angelita Machado Leitão pela constante preocupação com assuntos pertinentes ao curso perante a função de coordenadores, enfim, a todos os professores que colaboraram com o nosso aprendizado ao longo desse período.

A todos os colegas de aula, por todo esse período que estivemos reunidos como uma grande família. É certo que sentiremos muita saudade um dos outros.

Agradeço a JOSAPAR, empresa na qual sou colaborador e que sempre me apoiou, oportunizando determinados ajustes nos horários, todos sabem que conciliar trabalho e estudo não é algo tão fácil. Ao Sr. Ilton de Oliveira Lopes pelos momentos de conversa e entendimento ao longo de vários anos e a todos os colegas de setor pela colaboração e ajuda nos momentos em que estive ausente.

EPÍGRAFE

“Através de atitudes corajosas que você será capaz de chegar aonde a maioria não se atreveu a ir, assumir os riscos de uma empreitada inédita ou dedicar suas energias e recursos onde outros acharam melhor deixar como está”.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 RADICAIS LIVRES.....	17
2.2 ESTRESSE OXIDATIVO	17
2.3 ANTIOXIDANTES	18
2.4 FITOQUÍMICOS	19
2.5 COMPOSTOS FENÓLICOS	20
2.6 GAMA ORIZANOL	21
2.6.1 Principais componentes do gama orizanol.....	22
2.6.1.1 Ferulatos	22
2.6.1.2 Ácido ferúlico.....	22
2.6.1.3 Ácido Caféico	23
2.6.2 Fontes de gama orizanol	23
2.6.2.1 Farelo de arroz	23
2.6.2.2 Óleo do farelo de arroz.....	24
2.6.2.3 Borra de neutralização do óleo do farelo de arroz (RBOS)	25
2.6.3 Aplicabilidades e estudos com gama orizanol	25
2.6.3.1 Suplementação e desempenho físico.....	26
2.6.3.2 Efeito hipercolesterolêmico	27
2.7 CAPTAÇÃO DE RADICAIS	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 MATÉRIA PRIMA.....	29
3.2 REAGENTES	29
3.3 MÉTODO PARA O SEQUESTRO DO RADICAL DPPH.....	29
3.4 MÉTODO PARA A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR ABTS.....	30
3.5 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 AVALIAÇÕES DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE DPPH.....	31
4.2 AVALIAÇÕES DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE ABTS	32
4.3 ESTIMATIVAS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE OBTIDOS NOS MÉTODOS DPPH E ABTS	33
4.4 ESTIMATIVAS PARA OS NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA	34
5 CONCLUSÃO	35
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
7 GLOSSÁRIO	43
8 ANEXOS	44

RESUMO

DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO GAMA ORIZANOL *IN VITRO*

Autor: NEICÍ CACERES SILVA
Orientador: CRISTIANO RICARDO JESSE
Local e data: Itaqui, 13 de maio de 2013

O gama orizanol é considerado através de vários estudos como um excelente antioxidante devido sua composição estar atribuída a uma mistura complexa de mais de 23 ésteres do ácido ferúlico e caféico com álcoois triterpenos e esteróis. O arroz (*Oryza Sativa L.*) é considerado um dos alimentos de maior consumo no mundo, no Brasil arroz é consumido em sua maioria na forma de arroz polido, devido a uma maior rapidez no tempo de preparo, aparência e solubilidade dos grãos, bem como, à aspectos culturais da maioria dos consumidores brasileiros. O arroz integral, dependendo da cultivar, contém em sua composição de 8 a 10% de farelo, onde ficam retidos os micronutrientes e os compostos bioativos do arroz, entre eles, o gama orizanol. O farelo de arroz é um subproduto do beneficiamento do arroz e constitui a matéria prima para a obtenção do óleo de arroz. A borra de neutralização do óleo de arroz (RBOS) que é um subproduto da extração do óleo de arroz é considerada uma das principais fontes para a extração do gama orizanol e vem recebendo muita atenção pelos países produtores de arroz, devido à presença de grande quantidade desse composto, que de acordo com vários estudos, oferece muitos benefícios à saúde. O objetivo desse estudo foi determinar a capacidade antioxidante do gama orizanol através dos métodos 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e 2,2-azinobis-3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico (ABTS). O resultado da avaliação de atividade antioxidante através do método por DPPH foi realizado através da monitorização do sequestro do radical livre DPPH, pelas alíquotas de ensaio das amostras, comprovada através das medidas do decréscimo das respectivas medidas de absorbância, o resultado de maior significância para este método foi obtido na concentração de $250 \mu\text{mol. mL}^{-1}$ onde sua atividade antioxidante foi expressa em 50,53%. O resultado da atividade antioxidante com o método ABTS que obteve maior significância também foi obtido na concentração de $250 \mu\text{mol. mL}^{-1}$ com 90,63%. Desta forma, verificou-se que o gama orizanol teve a sua capacidade antioxidante confirmada nos dois métodos de avaliação *in vitro*.

Palavras-chave: ABTS, ácido ferúlico, DPPH, radicais livres.

ABSTRACT

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY *IN VITRO* GAMMA ORYZANOL

Author: NEICÍ CACERES SILVA

Advisor: CRISTIANO RICARDO JESSE

Place and date: Itaquí, May 13, 2013

The gamma oryzanol is considered by many studies as an excellent antioxidant because of its composition being attributed to a complex mixture of over 23 esters of caffeic and ferulic acid with sterols and triterpene alcohols. Rice (*Oryza sativa* L.) is considered one of the most consumed foods in the world, in Brazil rice is consumed mostly in the form of polished rice, due to a faster time of preparation, appearance and separation grain and as the cultural aspects of most Brazilian consumers. Brown rice, depending on the cultivar, in its composition contains 8-10% bran, which are retained micronutrients and bioactive compounds of rice, between them, gamma oryzanol. The rice bran is a byproduct of rice milling and constitutes the raw material for obtaining rice bran oil. The sludge neutralization of rice bran oil (RBOS) which is a byproduct of the extraction of rice bran oil is considered one of the main sources for the extraction of gamma oryzanol and has received much attention by rice producing countries, due to the presence of large amounts this compound, which according to several studies, offers many health benefits. The aim of this study was to determine the antioxidant gamma oryzanol through methods 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) and 2,2-azinobis-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS). The result of the evaluation of antioxidant activity by DPPH method for monitoring was conducted by the kidnapping of free radical DPPH, the rates of test samples, proven by measuring the decrease of its absorbance measurements, the result of greater significance for this method was obtained at a concentration of 250 micromol. mL⁻¹ where its antioxidant activity was expressed in 50.53%. The result of antioxidant activity by the ABTS method with highest significance was also obtained at a concentration of 250 micromol. mL⁻¹ with 90.63%. Thus, it was found that the gamma oryzanol had its antioxidant capacity observed between the two methods of evaluation *in vitro*.

Key words: ABTS, ferulic acid, DPPH, free radicals.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Principais classes de fitoquímicos naturais.	19
FIGURA 2	Estrutura química dos principais componentes do gama orizanol.	21
FIGURA 3	Reação da evolução da cor do radical DPPH com antioxidantes.	27
FIGURA 4	Reação da evolução da cor do radical ABTS com antioxidantes.	27
FIGURA 5	Estabilização do radical ABTS por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio	27
FIGURA 6	Redução do radical DPPH com o uso do gama orizanol.	31
FIGURA 7	Redução do radical ABTS com o uso do gama orizanol.	32
FIGURA 8	Redução do radical DPPH e ABTS com o uso do gama orizanol.	33

LISTA DE SIGLAS

ABTS	2,2-Azinobis-3-Etil-Benzotiazolina-6-Ácido Sulfônico
ATP	Adenosina Trifosfato
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
CAT	Catalase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazil
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GPx	Glutaciona Peroxidase
GSH	Glutaciona Reduzida
GSSG	Glutaciona Oxidada
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
<i>IN VITRO</i>	Técnica Laboratorial com Reações em Vidro (tubos, placas, entre outros)
<i>IN VIVO</i>	Ensaio Laboratorial Envolvendo Seres Vivos
JOSAPAR	Joaquim Oliveira S/A e Participações
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
RBOS	Borra de Neutralização do Óleo do Farelo de Arroz
SOD	Superóxido Dismutase
TBHQ	Terc-Butilhidroquinona
UNIPAMPA	Universidade Federal do Pampa
UV-VIS	Espectroscopia no Ultravioleta Visível

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Concentrações utilizadas para sequestro do radical DPPH.	29
TABELA 2	Concentrações utilizadas para sequestro do radical ABTS.	29
TABELA 3	Resultados das avaliações antioxidantes do gama orizanol utilizando o método DPPH.	30
TABELA 3	Resultados das avaliações antioxidantes do gama orizanol utilizando o método ABTS .	31

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa.
β	Beta.
g	Gramas.
mg	Miligramas.
μ	Micro.
$\mu\text{mol. mg}$	Micro mol por Miligramas.
$\mu\text{mol. L}^{-1}$	Micro mol por Litro.
μL^{-1}	Micro Litros.
nm	Nano Mol.
n.	Número.
=	Igual.

1 INTRODUÇÃO

Dentre os cereais de importância no Brasil, destaca-se o arroz, que contém, aproximadamente, de 6 a 8 % do seu peso em farelo. É neste farelo que se encontra a maior parte da reserva lipídica do arroz, entre 15 e 20 %. Além disso, possui de 5 a 8 % de proteínas, 40 a 50 % de carboidratos solúveis e de 5 a 8% de fibras (MORETTO e FETT, 1998).

Outro estudo de Silva et al. (2001) indicou que o farelo de arroz possui teores de lipídios entre 16 % e 22 %, mas é no arroz parboilizado, devido ao tratamento diferenciado do grão, que esses índices são maiores e o teor de amido é reduzido. O óleo de arroz possui pouco ácido linolênico e alta quantidade de tocoferóis, o que garante mais estabilidade oxidativa. É uma boa fonte de ácidos graxos essenciais e possui orizanóis e tocotrienóis, que há muito são estudados por causarem benefícios à saúde.

Várias investigações mostram que o farelo de arroz, considerado um subproduto do processamento do arroz, assim como seu óleo, possuem propriedades hipocolesterolêmicas, diminuindo o nível de colesterol em animais e humanos (SCAVARIELLO, 1998).

O gama orizanol foi inicialmente encontrado no óleo de arroz em 1954. Como foi isolado do óleo obtido a partir do arroz (*Oryza Sativa L.*) e continha um grupo hidroxila em sua estrutura, foi convenientemente chamado de orizanol. Estudos posteriores revelaram que o orizanol não é um composto simples e sim uma mistura de ésteres do ácido ferúlico (GRAF, 1992).

Segundo Kim et al. (2001) e Fang et al. (2003), o gama orizanol é um importante fitoquímico do farelo de arroz, classificado como antioxidante e sendo mais resistente ao calor torna-se mais efetivo que os tocoferóis, consiste em uma mistura complexa de ésteres do ácido ferúlico com álcoois triterpenos e esteróis. Mais de 23 ésteres do ácido ferúlico e caféico já foram identificados no gama orizanol, sendo os principais componentes (mais de 80% da fração do gama orizanol): o 24-metileno cicloartenil ferulato, cicloartenilferulato ou cicloartenol, β -sistoterilferulato e campesterilferulato ou campesterol.

O grande interesse no estudo dos antioxidantes é decorrente, principalmente, do efeito dos radicais livres no organismo. A oxidação é indispensável à vida

aeróbica e, dessa forma, os radicais livres são produzidos naturalmente (BARREIROS et al., 2006).

Segundo Palanisamy et al. (2011), o desenvolvimento de novos métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante ou a quantificação de antioxidantes específicos em matrizes complexas como extratos vegetais, frutas e alimentos em geral, pode ser justificado pela relevância comercial e farmacológica destes aditivos e pela necessidade de metodologias mais simples e de baixo custo.

O método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) é amplamente utilizado para determinações de atividades antioxidantes, esse método é baseado na variação da absorbância obtida por uma perda estequiométrica da cor da solução do radical na presença de substâncias antioxidantes presentes nas amostras.

No Japão, em estudo de Akiyama et al. (2005), foi examinada a atividade sequestradora do radical DPPH em quatro componentes individuais do gama orizanol onde foi considerado que o ácido ferúlico foi a unidade ativa de todos os componentes. Com o resultado dessa atividade sequestradora, foi observado que o gama orizanol possui atividades biológicas, tais como, antioxidante e anti-inflamatória.

Outro método muito utilizado para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfonado (ABTS), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática (HALLIWELL et al., 1996).

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade antioxidante do gama orizanol *in vitro* através da utilização de duas metodologias: a captura do radical DPPH e o método ABTS.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Radicais livres

As moléculas orgânicas e inorgânicas, assim como os átomos que contém um ou mais elétrons não pareados, com existência independente podem ser classificadas como radicais livres (HALIWELL et al., 1995).

Radical livre é qualquer átomo, molécula ou íon que possui um ou mais elétrons livres na sua orbita externa. Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, mesmo tendo uma meia vida muito curta, apresentam uma grande capacidade reativa, que pode ocorrer com qualquer composto que esteja próximo, captando um elétron dessa substância para sua estabilização, independente de ser uma molécula, uma célula ou tecido do organismo. A partir disto, acontecem reações em cadeia de lesão celular e em razão dessas características, os radicais livres são denominados substâncias oxidantes (DOLINSKI, 2009).

A fração do oxigênio que é reduzida ao ânion radical superóxido durante a respiração mitocondrial depende das condições experimentais e tem sido estimada em 0,1 a 1%. Pode parecer pouco, mas não é porque consumimos uma grande quantidade de oxigênio. Um adulto de 70 kg em repouso consome aproximadamente 353 litros de oxigênio por dia, o equivalente a 14,7 mols de oxigênio por dia. Mesmo que só 1% desse oxigênio molecular seja reduzido ao ânion radical superóxido, forma-se 0,147 mols de superóxido por dia, ou 1,7 kg em um ano. Estimativas desse tipo só reforçam a ideia de que a enzima superóxido dismutase (SOD) é importante para proteger os organismos aeróbios do dano ocasionado por radicais livres e a evolução do conhecimento só tem corroborado essa teoria (AUGUSTO, 2006).

2.2 Estresse Oxidativo

Os radicais livres são constantemente produzidos durante o funcionamento normal da célula, na maior parte sob a forma de espécies reativas de oxigênio (EROs). Uma vez produzidos, a maior parte dos radicais livres são removidos pelas defesas antioxidantes da célula que incluem enzimas e moléculas não enzimáticas.

A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo (VALKO et al., 2007).

Em concentrações baixas ou moderadas, as EROs podem ser benéficas para a célula, estando envolvidas em vários processos fisiológicos de sinalização e de regulação (FRIDOVICH, 1999). No entanto, há situações em que o equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e as defesas antioxidantes pode ser destruído, devido a produções excessivas de EROs ou deficiência nas defesas antioxidantes da célula (MACHLIN et al., 1987).

O desequilíbrio entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes é chamado de estresse oxidativo, processo que pode oxidar e danificar lipídios celulares, proteínas e o ácido desoxirribonucleico (DNA), ocasionando sua modificação, inutilização ou inibindo sua função normal (FU et al., 1999, RIDNOUR et al., 2005, VALKO, 2007).

Segundo Oldham e Bowen (1998) o estresse oxidativo leva à redução de formação de adenosina trifosfato (ATP), à inibição da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e a diminuição da atividade da enzima ATP sintase durante a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, promovendo redução do metabolismo celular ou morte celular.

O estresse oxidativo é capaz de induzir a oxidação lipídica e, na presença de oxigênio, ocasionar a peroxidação lipídica de membranas celulares (OZATA, 2002).

A peroxidação lipídica é definida como um processo complexo e amplo de deterioração oxidativa dos ácidos graxos poli-insaturados. Ela inicia-se com a abstração de um átomo de hidrogênio do grupo metil localizado entre duas duplas ligações do ácido graxo. Ocorre, portanto, a formação de um radical peróxido suficientemente reativo para continuar a reação em cadeia, formando novos radicais peróxidos. A decomposição dos hidro peróxidos e dos radicais peróxidos resulta em uma variedade de intermediários e produtos finais, alguns biologicamente ativos, destacando-se o malondialdeído, que pode lesar proteínas e o DNA (STAHL, 2000).

2.3 Antioxidantes

De forma geral, denominam-se antioxidantes as substâncias que presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação desse substrato. Os radicais formados a

partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podem ser reciclados por outro antioxidante (BARREIROS et al., 2005).

Os antioxidantes agem interagindo com os radicais livres antes que estes possam reagir com as moléculas biológicas, evitando que ocorram as reações em cadeia ou prevenindo a ativação do oxigênio a produtos altamente reativos (RATNAM et al., 2006).

Segundo Ratnam et al. (2006), o sistema de defesa antioxidante humano não é completo sem os antioxidantes dietéticos, o que confirma a importância da ingestão diária destes compostos. Dessa forma, o consumo de antioxidantes apresenta vários benefícios, proporcionando melhoria na qualidade de vida.

Nos sistemas enzimáticos que ocorrem de forma endógena, as principais enzimas que fazem parte são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx). A (SOD) está localizada nas mitocôndrias e no citosol e possui função de catalisar a desmutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio. A (CAT) é uma enzima heme que contém ferro, localizada nos peroxissomos, sendo responsável pelo metabolismo de peróxido de hidrogênio a água e o oxigênio. A (GP) depende de selênio e atua com co-substrato na conversão da glutathione reduzida (GSH) a glutathione oxidada (GSSG), enquanto converte o peróxido de hidrogênio a água (DOLINSKI, 2009).

No sistema não enzimático, temos como principais antioxidantes as vitaminas C, E e carotenos que promovem proteção a célula e, principalmente, ao plasma ajudando as defesas enzimáticas ao combate das EROs (GALIZIA, 2001).

Os antioxidantes não enzimáticos são em sua maioria exógenos, ou seja, necessitam ser absorvidos pela alimentação apropriada. Os principais podem ser divididos em: vitaminas lipossolúveis (vitamina A, E e betacaroteno), vitaminas hidrossolúveis (vitamina C, do complexo B) e oligoelementos: zinco, cobre, selênio, magnésio, entre outros (DOLINSKY, 2009).

2.4 Fitoquímicos

De acordo com o estudo de Badger (2003), o gama orizanol é um importante fitoquímico do farelo de arroz.

Os fitoquímicos são classificados como compostos bioativos provenientes de diferentes partes das plantas, tais como, sementes, cereais, vegetais, frutos, folhas,

raízes, especiarias e ervas, e estão relacionados com a redução do risco de ocorrência de várias doenças crônicas. Já foram identificados mais de 5000 fitoquímicos, no entanto, uma grande percentagem destes compostos é ainda desconhecida, sendo importante a sua identificação para melhor compreender a sua contribuição para a saúde ao serem incluídos na nossa dieta (LIU et al., 2003).

Os fitoquímicos englobam carotenóides (α - caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina, astaxantina e licopeno); compostos fenólicos: ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos), flavonóides (flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavonóides), estibenos, cumarinas e taninos; alcaloides; compostos azotados (derivados da clorofila, aminoácidos e amins) e compostos organossulfurados: (isotiocianatos, indoles, compostos de enxofre alílicos) (HALL et al., 1997).

As principais classes de fitoquímicos naturais estão representados na Figura 1.

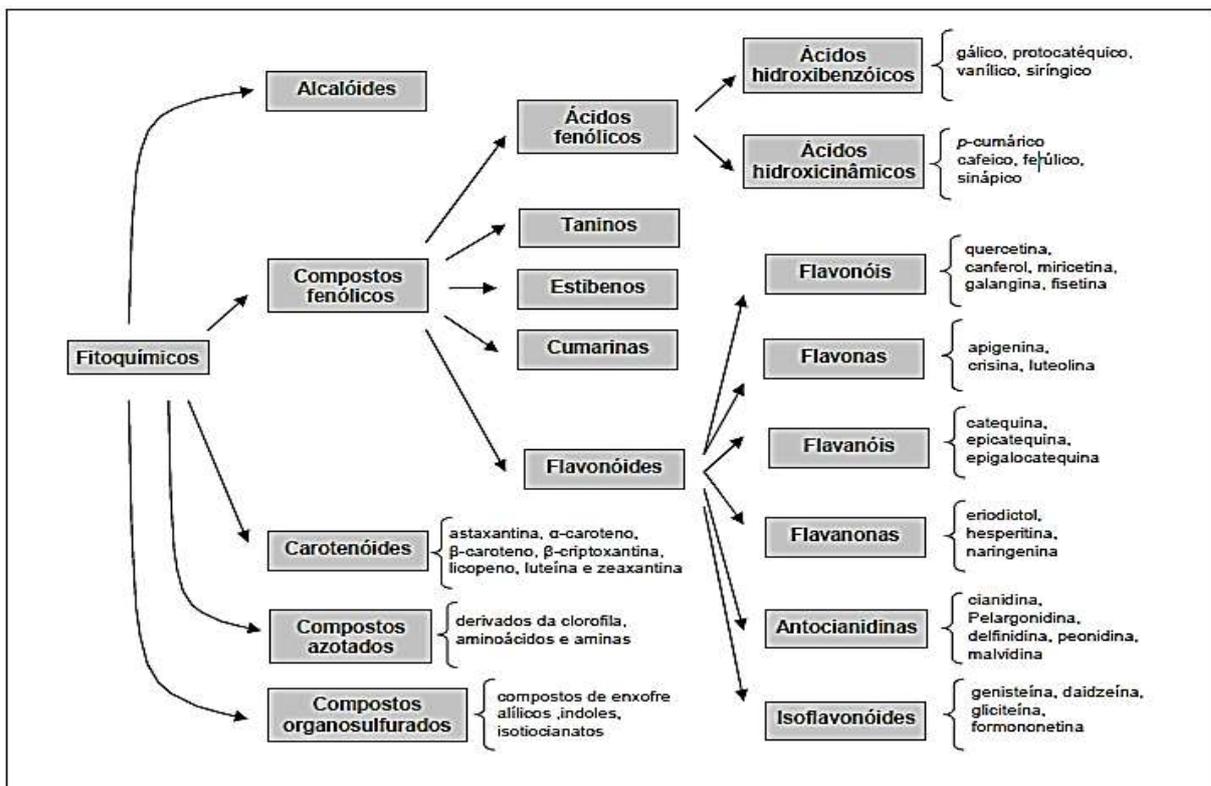


FIGURA 1. Principais classes de fitoquímicos naturais.

Fonte: LIU, R. H. et al., 2003.

2.5 Compostos fenólicos

Neste grupo incluem-se os flavonóides e demais polifenóis, que constituem um grupo extenso de substâncias amplamente distribuídas em vegetais (frutos,

folhas, caules, sementes). Fenólicos de plantas constituem um grupo quimicamente heterogêneo. Todos os compostos contêm um grupo fenol – função hidroxil em um anel aromático. Ocorrem frequentemente com derivados na forma de ésteres, éteres, glicosídeos ou misturas e são subdivididos em grupos incluindo milhares de compostos, com base na estrutura química. Vários desses compostos têm sido investigados como bioativos da dieta: ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinâmicos (ferúlico, caféico), xantonas (mangiferina), flavonoides, cumarinas, lignanas, ligninas, entre outros. (COSTA e PELUZIO, 2008).

O ácido ferúlico que é um dos principais componentes do gama orizanol e o ácido caféico pertencem ao grupo dos ácidos fenólicos. Os compostos fenólicos são metabólitos secundários e constituem a maior classe de fitoquímicos do reino vegetal. No arroz integral os principais compostos fenólicos pertencem ao grupo dos ácidos fenólicos e dos flavonoides (ADOM e LIU, 2002).

2.6 Gama orizanol

O gama orizanol é caracterizado como um pó branco ou levemente amarelo, cristalino, insípido, com pouco ou nenhum odor. Definido como uma mistura de ésteres do ácido ferúlico com esterol ou álcoois triterpênicos. Consiste principalmente de cicloartenil ferulato, 24-metileno-cicloartanil ferulato, campesteril ferulato, β -sistoteril ferulato e cicloartanil ferulato (EVERSHED et al. 1988).

Segundo Xu e Godber (1999) o gama orizanol possui também outros componentes menores como: estigmastenil ferulato, campestenil ferulato e sitostanil ferulato e dependendo da técnica cromatográfica utilizada, diferentes componentes têm sido identificados.

A atividade antioxidante do gama orizanol pode ser atribuída principalmente ao ácido ferúlico. Este esterificado com esteróis de plantas, como é o caso do gama orizanol, aumenta o potencial antioxidante promovendo acesso molecular a componentes hidrofóbicos que são mais susceptíveis à destruição celular oxidativa (GRAF, 1992).

As estruturas químicas dos principais componentes do gama orizanol estão representadas na Figura 2.

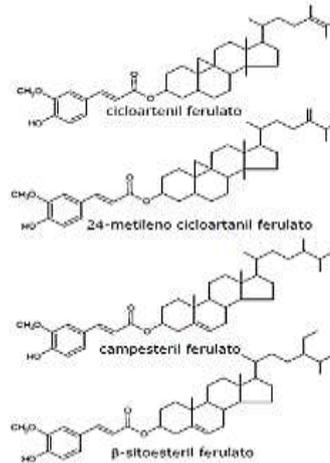


FIGURA 2. Estrutura química dos principais componentes do gama orizanol.
Fonte: TSUJI, 2003.

2.6.1 Principais componentes do gama orizanol

A concentração de cada componente pode variar de acordo com a cultivar e o tipo de extração. O cicloartenil ferulato e o 24-metileno cicloartanil ferulato são os componentes majoritários na mistura, com cerca de 42% e 31% da concentração total de gama orizanol, respectivamente (SCAVARIELO, 1998). Os demais componentes do gama orizanol estão demonstrados quimicamente no Anexo A.

2.6.1.1 Ferulatos

O gama orizanol é um éster de ferulato lipofílico encontrado no farelo de arroz, o ferulato é um composto fenólico vegetal pouco conhecido, mas quase onipresente, demonstrou propriedades de possível benefício para os halterofilistas. É um antioxidante potente, com propriedades semelhantes ao tocoferol e ao ascorbato (BONNER et al., 1996).

Os ferulatos são promovidos como alternativas seguras aos esteroides anabólicos para halterofilistas e fisiculturistas. Os resultados de pesquisa potencialmente úteis indicam que se necessita de uma confirmação dos efeitos ergogênicos reais (COOMBES, 2000).

2.6.1.2 Ácido ferúlico

De acordo com Bucci, (1989), o efeito anabolizante do ácido ferúlico está atribuído a este composto por ser rico em esteroides de plantas. O ácido ferúlico pertence ao grupo dos ácidos hidroxicinâmicos e é um precursor, componente ativo e purificado das duas partes que formam a molécula do gama orizanol, sendo

relatado como precursor de muitos componentes de plantas, incluindo lignina estrutural e flavanoides.

O ácido ferúlico esterificado com esteroides de plantas, como é o caso do gama orizanol, aumenta o potencial antioxidante, favorecendo o acesso molecular a componentes hidrofóbicos que são mais susceptíveis a destruição celular oxidativa (SCAVARIELLO, 1998).

2.6.1.3 Ácido Caféico

Segundo Badger (2003) ésteres do ácido caféico foram encontrados nas frações analisadas de gama orizanol. A suplementação com esse composto é útil para a recuperação a partir do estresse de um exercício intenso, possivelmente ajudando nos resultados dos programas de treinamento.

O ácido caféico, um polifenol amplamente distribuído em plantas superiores como glicosídeos ésteres, ou forma livre, é outro fitocomposto que por sua alta atividade antioxidante vem sendo exaustivamente estudado por técnicas eletroquímicas (HOTTA et al., 2002).

2.6.2 Fontes de gama orizanol

O estudo de Das et. al. (1998), indica que o óleo de farelo de arroz é a fonte natural mais acessível para recuperação do gama orizanol.

Como foi isolado do óleo obtido do arroz (*Oryza Sativa L.*) e por conter um grupo hidroxila em sua estrutura, foi chamado de gama orizanol (GRAF, 1992).

Dentre os cereais de importância no Brasil, destaca-se o arroz, que contém, aproximadamente, de 6 % a 8 % do seu peso em farelo. É neste farelo que se encontra a maior parte da reserva lipídica do arroz, entre 15 % e 20 %. Além disso, o arroz possui de 5 % a 8 % de proteínas, 40 % a 50 % de carboidratos solúveis e de 5 % a 8% de fibras (MORETTO e FETT, 1998).

Existe pouco estudo e informações para avaliar a presença desse composto em alguma outra fonte, porém, componentes de gama orizanol também foram isolados de grãos de milho, trigo e cevada (SEITZ, 1989 e MOUREAU et al., 1996).

2.6.2.1 Farelo de arroz

O farelo resulta da etapa de polimento dos grãos de arrozes e representa de 8% a 11% do peso total dos grãos, apresentando aspecto farináceo, fibroso e suave

ao tato. As condições de armazenamento, tipos de processamentos e genótipo são os principais fatores que definem a composição e as propriedades do farelo de arroz (PARRADO et al., 2006)..

Segundo Massaro (2001) corresponde às camadas mais externas do grão (germe, pericarpo, camada de aleurona e pequenas porções de endosperma) e possui proteínas em concentrações próximas às de outros alimentos que são boas fontes protéicas, sendo também rico em fibras e sais minerais, como fósforo, ferro e magnésio. O farelo de arroz contém fitoquímicos tal como o gama orizanol e tocoferóis, essas frações podem informar efeitos positivos na saúde humana.

Derivados do farelo de arroz, quando administrados por via oral em camundongos demonstraram atividades antitumoral. Estudos realizados *in vitro* evidenciaram que esse subproduto estimula os macrófagos aumentando a produção de interleucina e gerando efeito tumoricida (CARVALHO et al., 2004).

O farelo de arroz na dose de 36 g ao dia diminuiu a excreção renal de cálcio e aumentou a excreção de ácido em mulheres na menopausa submetidas à dieta com 1 g de cálcio/dia. Em pessoas com hipercalcúria e formadoras de cálculos renais, o tratamento com farelo de arroz reduziu drasticamente a formação dos cálculos (JARIWALLA, 2001).

2.6.2.2 Óleo do farelo de arroz

Segundo Scavariello et al. (2002), o conteúdo de gama orizanol no óleo de farelo de arroz bruto está na faixa de 1 a 2 %, porém, conforme Roger et al. (1993) o teor encontrado nos óleos refinados de farelo de arroz e comercializados por diferentes processadores varia entre 0,0144% e 0,0787%. Tal diferença é justificada pelo estudo de Luh et al. (1991) e Scavariello (2004) que argumenta que no refino químico é usado álcali para desacidificação, enquanto que no refino físico esta desacidificação é realizada por destilação. O estudo apresenta coerência com a avaliação de Orthofer et al. (1996), que verificou redução no conteúdo de gama orizanol de 2,0% para 0,1% ao usar o refino químico, enquanto que ao utilizar o refino físico a redução ficou na faixa de 1,0-1,5%.

Essas diferenças no conteúdo de gama orizanol também podem ser justificadas pela variedade e tipo de processamento dos grãos de arroz, perdas no processamento em virtude do tipo de extração e refino do óleo, além dos parâmetros empregados no seu processamento (SCAVARIELLO et al., 1997).

Vários estudos e técnicas estão sendo avaliados para melhorar a qualidade do óleo de farelo de arroz pela minimização das perdas de orizanol e outros micronutrientes importantes ou através da recuperação do orizanol perdido nas etapas do refino do óleo de farelo de arroz (CAVALHEIROS, 2007).

2.6.2.3 Borra de neutralização do óleo do farelo de arroz (RBOS)

O isolamento do gama orizanol a partir da RBOS que é considerado um subproduto da produção do óleo de farelo de arroz, tem recebido muita atenção, particularmente em países produtores de arroz. Porém a sua produção que envolve o isolamento e purificação de orizanol apresenta alguns problemas devido à quantidade de compostos que interferem durante sua lixiviação, extração e cristalização (NARAYAN et al., 2006).

Esse método consiste na saponificação total da RBOS, seguido pelos processos de aeração e secagem da mesma para obter um sabão poroso. Este sabão é submetido à extração com solvente orgânico para remoção da parte insaponificável. Após essa etapa utiliza-se uma solução de solventes para remoção das ceras presentes e cristaliza-se o material insaponificável para remoção de impurezas. Este material cristalizado é submetido à coluna cromatográfica para obtenção de uma fração rica em orizanol. Esta fração enriquecida é recristalizada, utilizando solvente orgânico, para obtenção de orizanol puro (RAO et al., 2002).

2.6.3 Aplicabilidades e estudos com gama orizanol

Uma das características do gama orizanol é que ele pode ser usado em associação com outros antioxidantes naturais, obtendo misturas capazes de superar os estabilizantes sintéticos mais comumente usados. Essa característica é muito interessante, visto que o mesmo possui outras atividades biológicas, podendo ser usado, assim, como um ingrediente multifuncional para formulações farmacêuticas, cosméticas e para alimentos (JULIANO et al., 2005).

O gama orizanol tem sido preconizado como potente antioxidante natural, além de estar relacionado a vários benefícios à saúde humana, o que lhe confere alto valor comercial (GONGYUANSSENG e YAO-HUIYUAN, 2001; XU et al., 2001).

Pesquisas sugerem que os antioxidantes são eficazes na prevenção de doenças crônicas associadas ao estresse oxidativo quando administrados a grupos

que apresentem concentrações plasmáticas inadequadas destes micronutrientes (CERQUEIRA et al., 2007).

Entre as múltiplas ações do gama orizanol, estão os efeitos no crescimento, combate a doenças cefálicas e cervicais, minimização dos sintomas da menopausa, combate à anemia, tratamento de úlceras do estresse e como coadjuvante no tratamento de doenças circulatórias. As propriedades do gama orizanol justificam seu amplo uso, seja como medicamento, na composição de cosméticos, como agente antienvhecimento da pele e até como filtro solar. Esse fitosterol apresenta efeito semelhante aos hormônios (esteroides) quando usado na alimentação de cavalos de corrida em que seu emprego é seguro e legalmente permitido (XU et al., 2001).

2.6.3.1 Suplementação e desempenho físico

Os suplementos nutricionais são auxiliares na melhoria do desempenho de quem pretende adquirir uma massa muscular mais avantajada, sem o uso de esteroides ou anabolizantes ou de quem esteja com intenção de competir. Estes devem ser utilizados em conjunto com alimentação balanceada e atividade física (JENKINS, 1993).

Efeitos do gama orizanol no crescimento com aumento da massa muscular magra, aumento da resistência física, melhora a recuperação após exercício e redução na gordura corporal constituindo uma alternativa natural aos esteroides anabólicos, é referido em estudos conduzidos com humanos por Fry et al. (1997) que utilizou níveis de 500 mg/dia de gama orizanol durante um período de até nove semanas comparativamente a um grupo controle sem gama orizanol. Não foram constatados efeitos na circulação de hormônios (testosterona, cortisol ou estradiol, insulina), dos minerais (cálcio e magnésio), da albumina e das lipoproteínas (colesterol total, triglicérides, e lipoproteína de alta densidade - HDL).

De acordo com Ávila et al. (2007), o gama orizanol é uma substância com propriedades anabolizantes que aumentam a massa muscular e antioxidantes que protegem as células durante o esforço físico.

Conforme estudo de Gonzaga et al. (2008) não foram observados aumento nas concentrações plasmáticas de testosterona, demonstrando que o gama orizanol não apresentou efeitos anabolizantes.

2.6.3.2 Efeito hipercolesterolêmico

Estudos com frações de gama orizanol extraídas pelo farelo de arroz foram testadas como alimento em animais e houve redução no colesterol sérico total, pode ter atividade anti-inflamatória e inibir efeitos de tumores (CHEN e BERGMAN, 2002).

Os níveis de colesterol e triglicerídeos de ratos alimentados com dietas ricas em colesterol foram reduzidos quando se empregou concentrado de substâncias bioativas do óleo do farelo de arroz como suplemento. Considera-se que a presença abundante de cicloartenol ferulato inibe a atividade do colesterol esterase no fígado, a qual reduz os níveis de colesterol circulante (HA et al., 2005).

O orizanol possui capacidade antioxidante e hipocolesterolêmica; Costa e França (1993) verificaram que seu consumo apresenta fatores fisiológicos positivos, como a diminuição no colesterol de baixa densidade (LDL) e de cálculos renais, pois diminui a absorção de cálcio pelo organismo.

2.7 Captação de radicais

A captação de radicais é o principal mecanismo de ação dos antioxidantes nos alimentos. Têm-se desenvolvido vários métodos em que se mede a capacidade antioxidante através da captação de radicais-livres sintéticos em solventes orgânicos polares, por exemplo, metanol a temperatura ambiente (PEREIRA, 2010).

Os métodos espectrofotométricos são relativamente simples e baseiam-se invariavelmente na capacidade descolorante da amostra. Os ensaios mais utilizados recebem o nome do reagente cuja absorção será atenuado pelo antioxidante, ou seja, ensaios de DPPH e ABTS.

No método de DPPH, mede-se a captação deste radical através da diminuição da absorbância que acontecem devido à redução de um antioxidante (AH) ou por reação com radicais.

Os radicais de DPPH, que inicialmente apresentam cor roxa por possuírem elétron livre, perdem esta cor quando um radical hidrogênio doado por uma molécula antioxidante entra em ressonância com a molécula de DPPH, diminuindo-se, assim, a absorbância (SOUZA et al., 2007).

Este método se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH que ao se reduzir perde sua coloração púrpura. Desta forma, avalia apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar

um elétron se oxida, e por este motivo não detecta substâncias pró-oxidantes (DUARTE e ALMEIDA, 2006). Esta reação está demonstrada na Figura 3.

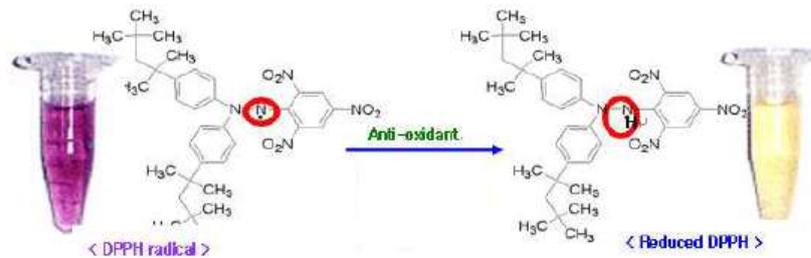


FIGURA 3. Reação da evolução da cor do radical DPPH com o antioxidante.
Fonte: PEREIRA et al., 2010.

No método ABTS a reação entre o antioxidante e o radical ocorre em temperatura ambiente e pode ser usada tanto para amostras químicas ou biológicas, esta reação pela transferência de elétrons obtido através de reação química, enzimática ou eletroquímica é uma técnica solúvel em água e solventes orgânicos e possui boa disponibilidade comercial. As reações estão demonstradas nas Figuras 4 e 5.

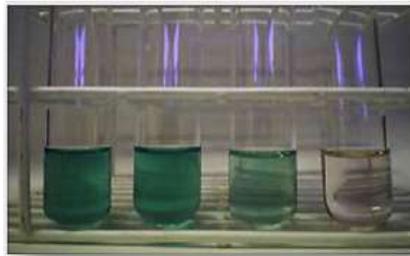


FIGURA 4. Reação da evolução da cor do radical ABTS com o antioxidante.
Fonte: UNIPAMPA, 2012.

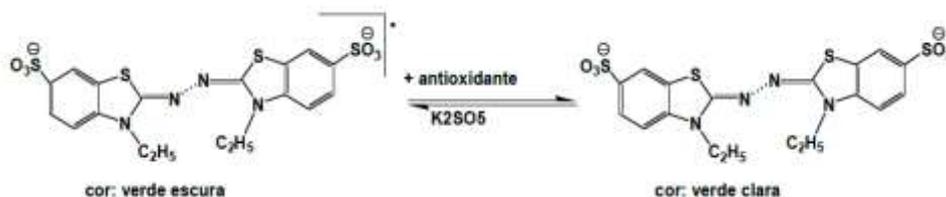


FIGURA 5. Estabilização pelo método ABTS por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.
Fonte: SOUSA et al., 2007.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Matéria prima

O gama orizanol utilizado nos ensaios foi adquirido junto ao Sigma (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Missouri). As análises de atividade antioxidante do gama orizanol foram realizadas no laboratório de Biologia da UNIPAMPA, campus localizado na cidade de Itaqui RS. Os resultados das leituras foram obtidos em espectrofotômetro marca Bioespectro.

3.2 Reagentes

Os reagentes utilizados foram metanol, DMSO, 2,2-difenil-1-picril-hidrazila, para o DPPH e para o método ABTS os reagentes 2,2-azinobis 3-etilbenzotiazolina-acidosulfônico e persulfato de potássio, todos adquiridos pela UNIPAMPA junto à Sigma (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Missouri).

3.3 Método para o sequestro do radical DPPH

Para avaliação da atividade antioxidante as concentrações do composto de gama orizanol reagiram com o radical estável DPPH, padrão Sigma-Aldrich D9132, em uma solução de etanol. Foi adotado como tempo padrão de leitura 30 minutos, a reação ocorreu em ambiente escuro com temperatura na média de 23°C (± 1). Como padrão para esse ensaio foi utilizado como antioxidante de referência o ácido ascórbico com atividade antioxidante equivalente à vitamina C.

Foram pipetados separadamente na solução DPPH os seguintes compostos: 10 μL^{-1} de água milli Q, DMSO e gama orizanol em concentrações contendo 1, 5, 25, 125 e 250 $\mu\text{mol. mL}^{-1}$ de DPPH com posterior incubação pelo período de 30 minutos em ambiente com pouca luminosidade. As leituras foram realizadas a 517 nm em espectrofotômetro calibrado e zerado com água destilada. As análises foram realizadas em triplicatas com intervalos entre as leituras de 30 em 30 segundos.

O método do sequestro do radical DPPH foi realizado de acordo com metodologia descrita por Charma (2009) e a atividade antioxidante foi expressa com o percentual de inibição da oxidação.

As quantificações das concentrações estão especificadas na Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações utilizadas para sequestro do radical DPPH

Tubos	Água milli Q (µl)	DMSO (µl)	Gama orizanol (µl)	DPPH Solução Diluída (µl)
Controle negativo	10	-	-	1000
Veículos	-	10	-	1000
Gama orizanol	-	-	10	1000

3.4 Método para a atividade antioxidante por ABTS

Foi adotado como tempo padrão de leitura 30 minutos, a reação ocorreu em ambiente escuro com temperatura na média de 23°C (± 1). Como padrão foi utilizado como antioxidante de referência o ácido ascórbico com atividade antioxidante equivalente à vitamina C. Foram pipetados separadamente na solução ABTS os seguintes compostos: 10 μL^{-1} de água milli Q, DMSO e gama orizanol em concentrações contendo 1, 5, 25, 125 e 250 $\mu\text{mol. mL}^{-1}$ com posterior incubação pelo período de 30 minutos em ambiente com pouca luminosidade. As leituras foram realizadas a 734 nm. As análises foram realizadas em triplicatas com intervalos entre as leituras de 30 em 30 segundos. O método ABTS foi realizado de acordo com a metodologia de Erel (2004). As quantificações das concentrações estão especificadas na Tabela 2.

Tabela 2. Concentrações utilizadas para sequestro do radical ABTS

Tubos	Água milli Q (µL)	DMSO (µL)	Gama orizanol (µL)	ABTS Solução Diluída (µL)
Controle	10	-	-	990
Veículos	-	10	-	990
Gama orizanol	-	-	10	990

3.5 Delineamento estatístico

Os resultados apresentados neste estudo correspondem à média de quatro repetições ($n=4$) \pm desvio padrão da média. Foram considerados estatisticamente diferentes os resultados de atividade antioxidante que apresentaram probabilidade de nível de significância (***) = $p < 0,001$, (**) = $p < 0,01$. Para essas avaliações, a análise estatística utilizada foi ONE WAY, seguido pelos testes de Newman-Keuls.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliações dos resultados das análises de DPPH

Neste estudo foram empregadas diferentes concentrações para que se pudesse avaliar a capacidade antioxidante do gama orizanol de forma fidedigna e na Tabela 3 estão expressos os resultados da avaliação da capacidade antioxidante utilizando a metodologia DPPH para cada concentração elaborada.

O estudo de Souza et al. (2007), sugere que o teste de DPPH é um dos métodos amplamente utilizado para determinação de atividades antioxidantes em extratos e substâncias isoladas como compostos fenólicos: campeferol, carotenoides, antocianinas, entre outros. Em outro estudo de Leja et al., (2007) foram determinados as capacidades antioxidantes de fenólicos totais, flavonóis e fenilpropanoides utilizando este método.

No estudo de Kuskoski et al. (2005) foram realizadas comparações no tempo de leitura com 30 e 60 minutos na metodologia do DPPH. Neste trabalho as avaliações foram realizadas em 30 minutos, conforme descrito por Sharma et al. (2008) para compostos puros, extratos de plantas e de alimentos.

Compostos fenólicos, cumarinas e quitosana com diferentes pesos moleculares foram analisados pelo método DPPH por Vogel et al., (2005), Kim e Thomas (2006) respectivamente. Segundo Kuskoski et al., (2005) o DPPH é um radical livre que pode ser obtido diretamente, sem uma preparação prévia.

Os resultados obtidos na determinação da capacidade antioxidante do gama orizanol pelo método DPPH estão demonstrados graficamente na Figura 6.

Tabela 3. Resultados das avaliações antioxidantes do gama orizanol utilizando o método DPPH.

COMPOSTO BIOATIVO	Atividade antioxidante em diferentes concentrações ($\mu\text{mol. mL}^{-1}$). ¹				
	1	5	50	125	250
Gama orizanol (n= 4)	11.87 \pm 0.54	17.07 \pm 5.04	21.45 \pm 2.67	32.93 \pm 3.14	50.53 \pm 1.29
Nível de significância			**	***	***

¹ Atividade antioxidante expressa das diferentes concentrações em $\mu\text{mol. mL}^{-1}$ das soluções DPPH. Resultados expressos como média das leituras de diferentes concentrações. **Valores na mesma coluna, houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$) e *** para ($p < 0,001$) pelo teste de Newman-Keuls.

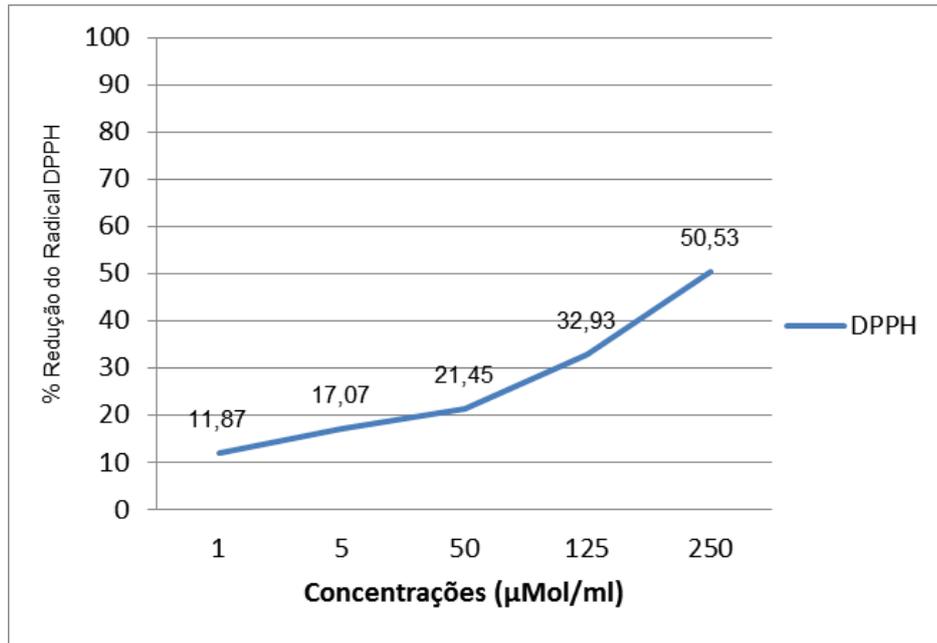


FIGURA 6. Redução do radical DPPH com o uso do gama orizanol.

4.2 Avaliações dos resultados das análises de ABTS

O método ABTS origina-se após uma reação, que pode ser química (dióxido de manganês, persulfato de potássio); enzimática (peroxidase, mioglobulina), ou também eletroquímica.

Segundo Kuskoski et al. (2005) o método ABTS é um dos mais rápidos e que oferece resultados reprodutíveis, além de outras vantagens como: oferecer vários máximos de absorção e boa solubilidade, permitindo análise de compostos tanto de natureza lipofílica quanto hidrofílica. Na tabela 4 podem-se visualizar os resultados da atividade antioxidante pelo método ABTS.

Tabela 4. Resultados das avaliações antioxidantes do gama orizanol utilizando o método ABTS.

COMPOSTO BIOATIVO	Atividade antioxidante em diferentes concentrações ($\mu\text{mol. mL}^{-1}$). ¹				
	1	5	50	125	250
Gama orizanol (n= 4)	4.15 ± 0.98	7.14 ± 2.50	14.05 ± 2.42	53.03 ± 6.76	90.63 ± 2.05
Nível de significância				**	***

¹ Atividade antioxidante expressa das diferentes concentrações em $\mu\text{mol. mL}^{-1}$ das soluções ABTS. Resultados expressos como média das leituras de diferentes concentrações. ** Valores na mesma coluna, houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$) e *** para ($p < 0,001$) pelo teste de Newman-Keuls.

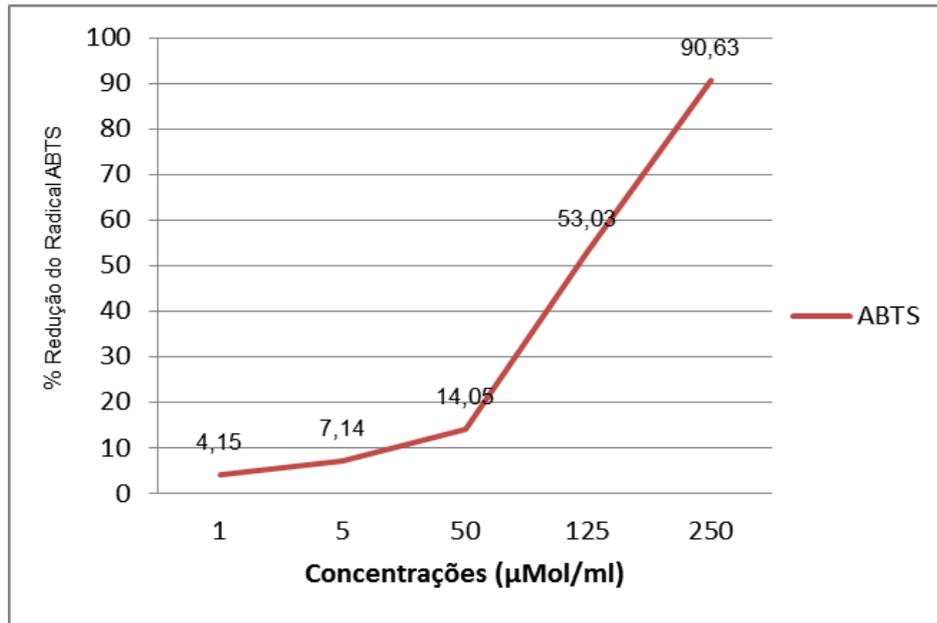


FIGURA 7. Redução do radical ABTS com o uso do gama orizanol.

4.3 Estimativas da atividade antioxidante obtidos nos métodos DPPH e ABTS

A capacidade de limpeza dos radicais livres determinadas por estes métodos são largamente utilizadas em atividades *in vitro*. O gama orizanol apresentou atividade sequestradora apreciável contra os radicais e a mesma ordem eliminadora foi observada em ambos os ensaios de cada método.

No método DPPH, o máximo de atividade sequestradora foi observado para concentração 250 μmol. mL⁻¹, seguido pelas concentrações de 125 e 25 μMol. mL⁻¹ respectivamente, obtendo parâmetros aceitáveis entre os nos níveis de significância.

O método de ABTS apresentou melhores resultados nas concentrações 250 e 125 μmol. mL⁻¹, porém, a diferença mais significativa em relação ao método DPPH foi observadas somente na concentração de 250 μMol. mL⁻¹. Conforme estudo de Awica et al., (2003) que relata a superioridade dos métodos ABTS sobre ensaios em DPPH, porque o ABTS é operável numa larga gama de pH, de baixo custo e mais rápida do que a do DPPH. No entanto, uma correlação linear entre o radical DPPH e eliminação de atividades antioxidantes em conteúdos polifenólicos têm sido relatado como intervalos variáveis em diferentes vegetais e frutas, tal afirmação pode ter uma relação com os valores superiores encontrados nas duas leituras do ABTS.

Os resultados das avaliações das avaliações de DPPH e ABST estão graficamente demonstrados na Figura 8.

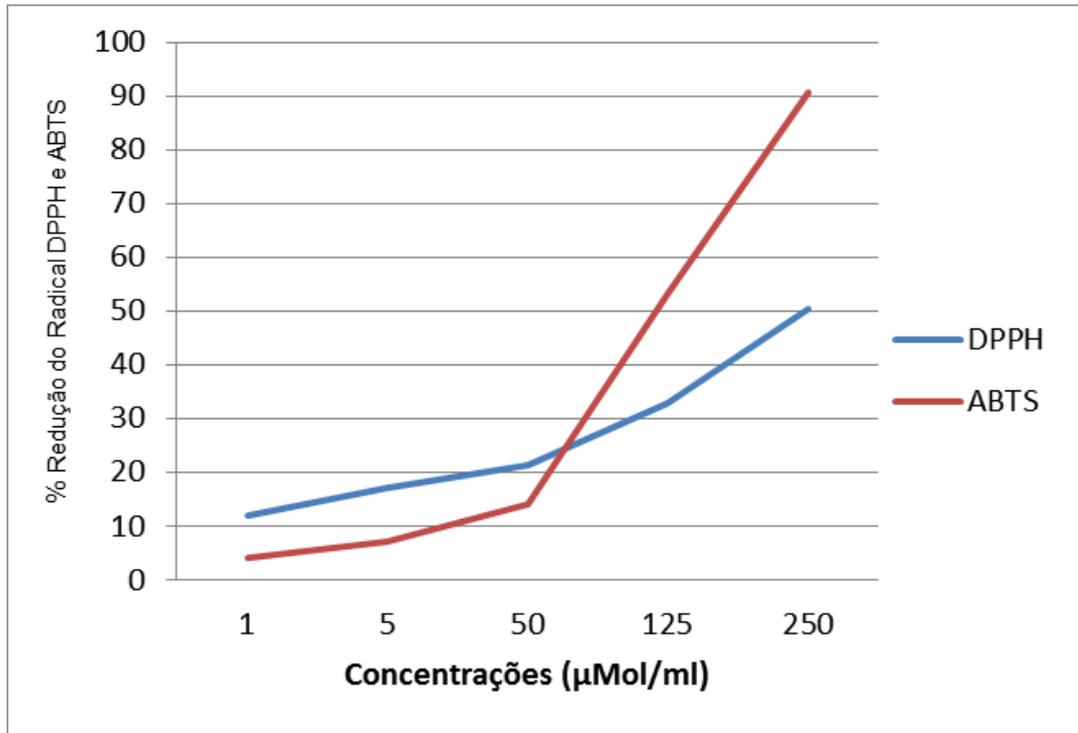


FIGURA 8. Redução do radical DPPH e ABTS com o uso do gama orizanol.

4.4 Estimativas para os níveis de significância

Diante dos resultados obtidos é importante ressaltar que no estudo de Frankel (1993) foi observado que o uso das diversas metodologias disponíveis, muitas vezes, coloca dúvidas quanto à escolha do método mais adequado para um determinado estudo de estabilidade oxidativa ou avaliação da capacidade antioxidante. A diversidade das condições de ensaio (substratos lipídicos, concentrações, tempo de oxidação, temperaturas, oxigenação) poderá também estar relacionada com possíveis diferenças.

Porém todo o embasamento científico realizado é de extrema importância para o estabelecimento de uma melhor certificação em comparação a resultados obtidos. Conforme estudos de Gong et al., (2001) e Xu et al., (2001), onde foi citado que a utilização do gama orizanol tem sido bastante restrita, principalmente devido ao alto custo desse produto, atribuído em grande parte à etapa de purificação das frações. Convém ressaltar que outro aspecto limitante e relevante, é a relativa falta de estudos sobre a atividade antioxidante desse composto quando associado com outros constituintes nos alimentos.

5 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste trabalho para determinar a capacidade antioxidante do gama orizanol foi possível concluir que:

Apesar das diferenças observadas entre os métodos DPPH e ABTS, foi possível obter conclusões semelhantes quanto à atividade antioxidante das amostras testadas.

O método ABTS demonstrou um maior sequestro de radicais livres, com uma maior evidencia nas concentrações de 250 micro mols por ml em comparação com o método DPPH.

De uma maneira global com os resultados obtidos, conclui-se com este trabalho que o gama orizanol possui atividade antioxidante.

Convém ressaltar a importância da pesquisa e dos órgãos científicos na relevância dos estudos com o objetivo de garantir a eficiência e a segurança dos resultados.

Como sugestão para trabalhos futuros, considera-se que mais estudos podem ser realizados para avaliar o potencial antioxidante do gama orizanol, vindo a somar com outras demais avaliações já realizadas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADOM, K. K., LIU, R. H. Antioxidant activity of grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Easton, v. 50, n. 21, p. 6182-6187. Oct. 2002.

ÁVILA, C. M.; et al., Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. **Food Chemistry**. p. 982-988, 2007.

AUGUSTO, H. **Radicais livres, bons, maus e naturais**. Ilustrações Marcio Beraldi, São Paulo, p. 46-47, 2006.

AKIYAMA, Y. Free Radical Scavenging Activities of Gamma Oryzanol Constituents. **Food Sci. Technol. Res.**, 11 (3), p. 295-297, 2005.

AWIKA, J. M., ROONEY, L. W., WU, X., PRIOR, R. L., & ZEVALLOS, L. C. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51, 6657–6662, 2003.

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

BONNER, B., BUCCI, L. N. Influence of ferulato supplementation on post exercise stress hormone levels after repeated exercise stress. **J Appl Sport Science Res**. p.110, 1990.

BUCCI, L. A natural magic bullet? **Flex February**. p. 52-56, 1989.

CARVALHO JÚNIOR, R. **Obtenção de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por extração supercrítica: determinação do rendimento global, de parâmetros cinéticos e de equilíbrio e outras variáveis do processo**. Campinas, 2004. Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

CAVALHEIROS M. N. **Extração de orizanol da borra de neutralização do óleo de farelo de arroz**. Florianópolis: UFSC, 2007. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Centro Tecnológico Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

CERQUEIRA, F.; MEDEIROS, M.; AUGUSTO, O. **Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas.** Quim. Nova, p. 441-449, 2007.

CHEN, M. H.; BERGMAN, C. **Rice bran antioxidant content: effect of degree of milling, and kernel milling quality and maturation.** U.S.A., 01 jun. 2002. Disponível em <http://ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=132953> Acesso em: 15 abr. 2013.

COSTA, C.; FRANÇA, V. Alternativas alimentares: soluções nutritivas baratas e regionais para combater a fome. São Paulo: **Revista Pólis**, 1993.

COSTA N. M. B, PELUZIO M. C. G. **Nutrição básica e metabolismo.** 1 ed. Minas Gerais: UFV, p. 392, 2008.

COOMBES, J. S., Improved cardiac performance after ischemia in aged rats supplemented with vitamin E and alpha-lipoic acid. **Am J Physiol.** p. 279, 2000.

_____. Effect of combined supplementation with vitamin E and alpha lipoic acid on myocardial performance during in vivo eschemiareperfusion. **Acta Physiol Scand**, p. 261-269, 2000.

DAS, P.K.; CHAUDHURI, A.; KAIMAL, T.N.B.; BHALERAO, U. T. Isolation of γ -oryzanol through calcium ion induced precipitation of anionic micellar aggregates. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 3073-3080, 1998.

DOLINSKY, M. **Nutrição funcional.** 1 ed., São Paulo: Ed. Roca Ltda., p. 123-126, 2009.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, p. 446-52, 2006.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry.** p. 277-285, 2004.

EVERSHED, R. P.; SPOONER, N.; PRESCOTT, M. C.; GOALD, L. J.; Isolation and characterization of intact steryl ferulates from seeds. **Journal of Chromatography. Amsterdam.** p. 23-35, 1998.

FRANKEL, E. N. **Trends Food Sci. & Technol.** p. 220, 1993.

FRY, A. C. et al. The effects of gamma oryzanol supplementation during resistance exercise training. **International Journal of Sport Nutrition.** V.7, p. 318-329, 1997.

FRIDOVICH I. **Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?** Ann N Y Acad. Sci., p. 8-13, 1999.

FU, S., DAVIES, M. J., STOCKER, R., DEAN, R. T. Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. **Biochem J.** p. 519-25, 1999.

GALIZIA, M. S., WAITZBERG, D. L. Mecanismo de ação dos radicais livres e antioxidantes. **Revista Brasileira em Nutrição Clínica.** p. 79-89, 2001.

GONG-YUANSSENG, Y.; YAO-HUIYUAN, H. Purification and identification of gamma-oryzanol from rice bran. **Journal of the Chinese Cereals and Oils Association,** v.16, p.30-34, 2001.

GONZAGA, I.V.F. **Supplementation with rice bran oil semirefined with high level of gamma-oryzanol in stallion's diets.** [Suplementação com óleo de farelo de arroz semi-refinado rico em gama-orizanol na dieta de garanhões]. 2008. 87f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

GRAF, E. **Antioxidant Potential of ferulic acid.** Free Radical Biology e Medicine. p. 345-448, 1992.

HA, T-Y; HAN, S.; KIM, S-R.; KIM, I-H.; LEE, H-Y.; KIM, H-K. Bioactive components in rice bran oil improve lipid profiles in rats fed a high-cholesterol diet. **Nutrition Research,** v.25, p.597-606, 2005.

HALL, C. A., CUPPETT, S. L. **Structure-activities of natural antioxidants.** In: **Aruoma OI, Cuppett SL, editors.** Antioxidant Methodology In Vivo and *IN VITRO* Concepts. AOCS Press. p. 2-29, 1997.

HALLIWELL, B., WISEMAN, H. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochemistry Journal.** p. 17-29, 1996.

HOTTA, H, UEDA, M, NAGANO, S, TSUJINO, Y, KOYAMA, J, OSAKAI, T, Mechanistic study of the oxidation of caffeic acid by digital simulation of cyclic voltammograms. **Analytical Biochemistry**. 303, 66-72. 2002.

JARIWALLA, R.J. Rice-bran products: phytonutrients with potential applications in preventive and clinical medicine. **Drugs Exp. Clin. Res.**, n.27, p. 17-26, 2001.

JENKINS, R. R. Exercise, oxidative stress and antioxidant: a reviews. **Int J Sports Nutr.** p. 356, 1993.

JULIANO, C.; COSSU, M.; ALAMANNI, M. C.; PIU, L. Antioxidant activity of gammaoryzanol: Mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. **International Journal of Pharmaceutics**, p.146-154, 2005.

_____. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weight. **Food Chemistry**. 2006.

KIM, KW, THOMAS, RL. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weight. **Food Chemistry**. 2006.

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

LACHANCE, P. A.; NAKAT, Z.; JEONG, W. S. **Antioxidants: an integrative approach**. Nutrition, 2001.

LEJA, M., MARECZEK, A., WYZGOLIK, G., KLEPACZ-BANIAK, J., CZEKONSKA, K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. **Food Chemistry**. p. 237-240, 2007.

LIU, R. H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **Am J. Clin. Nutr.** p. 517-520, 2003.

LUH, B.; BARBERS, S.; BARBER, C. B. **Rice bran: chemistry and technology**. In Rice: utilization. 2 ed. New York: Van Nostrand Reinhold, p. 313-363, 1991.

MACHLIN, L. J., BENDICH, A. **Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients.** *FASEB J.* p. 441-5, 1987.

MASSARO, A. F. **Enriquecimento protéico de farelo de arroz desengordurado, som sangue bovino, utilizando a técnica de leite de jorro.** Rio Grande. 2001. Tese de Doutorado em Ciência, Tecnologia e Engenharia de Alimentos. Programa de Pós- Graduação em Ciência, Tecnologia e Engenharia de Alimentos. Fundação Universidade Federal de Rio Grande – FURG.

MORETTO, E.; FETT, R. A. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos.** Livraria varela, São Paulo, 1998.

NARAYAN, A. V.; BARHATE, R. S.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. **Extraction and purification of orizanol from rice bran oil and rice bran oil soapstock.** *Journal of the American Oil Chemists Society*, p. 663-670, 2006.

OZATA, M.; BOERGEN, M.; OKTENLI, C. et al., Increased oxidative stress and hypo-zincemia in male obesity. **Clin. Biochem.** p.627-631, 2002.

ORTHOEFER, F. T. Rice bran oil: healthy lipid source. **Food Technology.** p. 62-64, 1996.

PALANISAMY, U. D., LING, L. T., MANAHARAN, T., **Appleton, D. Rapid isolation of geraniin from Nephelium lappaceum rind waste and its anti-hyperglycemic activity.** *Food Chemistry.* p. 21-27, 2011.

PARRADO, J.; MIRAMONTES, E.; JOVER, M.; GUTIERREZ, J. F.; TERÁN, L. C. DE; BAUTISTA, J. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. **Food Chemistry** ,v.98, p.742–748, 2006.

PEREIRA, M. O. S. **Estudo Comparativo de Métodos de Avaliação da Capacidade Antioxidante de Compostos Bioactivos.** Lisboa, 2010. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnica de Lisboa.

RAO, K.V.S.A.; RAO, B.V.S.K.; THENGUMPILLIL, N.B.K. Processes for the isolation of oryzanols from rice bran oil soap stock. **United States Patent 6410762**, 2002.

RATNAM, D.; ANKOLA, D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D.; KUMAR, M. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal Control Release.** v. 113, n. 2, p. 189-207, 2006.

RIDNOUR, L. A.; ISENBERG, J. S.; ESPEY, M. G.; THOMAS, D. D.; ROBERTS, D. D.; WINK, D. A. **Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1.** Proc Natl Acad Sci USA. p. 13147-52, 2005.

ROGERS, E. J.; RICE, S. S. M.; NICOLOSI, R. J.; CARPENTER, D. R.; McCLELLAND, C. A.; ROMANCZYK, L. J. Identification and quantification of gamma orizanol components and simultaneous assessment of tocols in rice bran oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society.** p. 301-307, 1993.

SEITZ, L. M. Stanol and sterol esters of ferulic and p – coumaric acids in wheat, corn, rye and triticale. **Journal Agriculture Food Chemistry.** p. 662-667, 1989.

SHARMA O. P.; BHAT T. K. DPPH Antioxidant assay revisited. **Food Chemistry.** p. 113, 2009.

SILVA, B. S.; FERRERES, F.; MALVA, J. O.; DIAS, A. C. P. Phytochemical and antioxidant characterization of Hypericum perforatum alcoholic extracts. **Food Chemistry.** p. 157-167. 2005.

SOUSA, et al. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais.** Quimica Nova. p. 351-355. 2007.

SCAVARIELLO, E. M. S. **Recuperação de gama orizanol da borra de neutralização de óleo de farelo de arroz.** Campinas, 1997. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

_____. Gama orizanol: un importante componente del aceite de salvado de arroz. **Archivos latino Americanos de Nutricion.** 1998.

_____. **Modificação química e enzimática da borra de neutralização do óleo de farelo de arroz.** Campinas: UNICAMP, 2002. Tese de Doutorado em Tecnologia de Alimentos, Faculdade de engenharia de Alimentos, Universidade estadual de campinas - UNICAMP.

_____. **Optimización del proceso de acidulación de la borra de neutralización de aceite de salvado de arroz.** Grasas y Aceite. p. 155-159, 2004.

RAO, K.V.S.A.; RAO, B.V.S.K.; THENGUMPILLIL, N.B.K. Processes for the isolation of oryzanols from rice bran oil soap stock. **United States Patent 6410762**, 2002.

TSUJI, E. **Atherosclerosis Supplements**. p. 278-278, 2003.

UNIPAMPA – Universidade Federal do Pampa. **Laboratório de Biologia**. 2013.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**. p. 44-84, 2007.

VOGEL, H.; GONZALEZ, M.; FAINI, F.; RAZMILIC, I.; RODRIGUEZ, J.; SAN MARTIN, J.; URBINA, F. Antioxidant properties and TLC characterization of four Chilean haplopappus-species known as bailahue'n. **Journal of thnopharmacology**. 2005.

XU, Z.; GODBER, J. S. Purification and identification of components of gamma-oryzanol in rice bran oil. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v. 47, p. 2724-2728, 1999.

XU, Z.; GODBER, J. S. Antioxidant activities of major components of gama-oryzanol from rice bran using a linolenic acid model. **Journal of the American Oil Chemists Society**, p. 6, 2001.

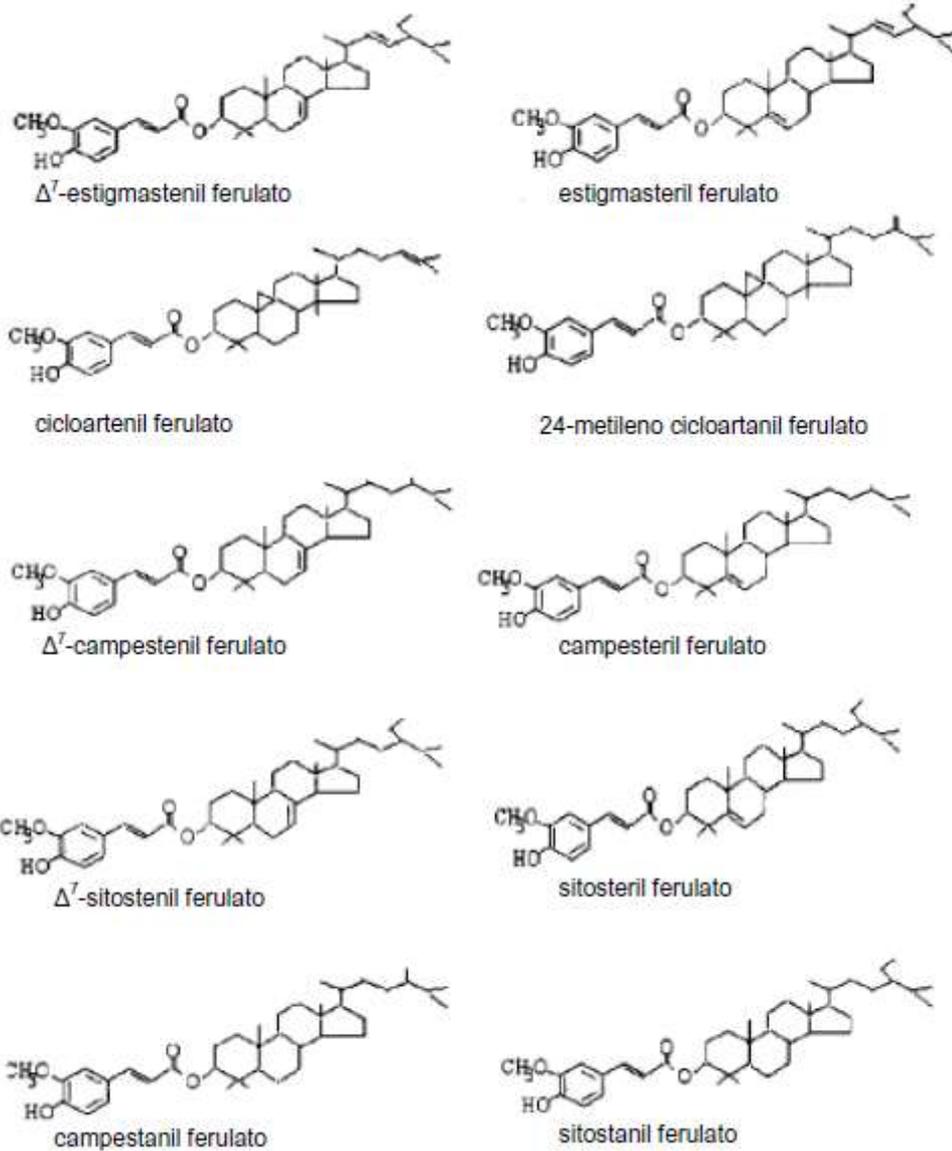
XU, Z.; HUA, N.; GODBER, J. S. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and gamma-oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride. **Journal Agric. Food Chem.**, v.49, p.2077-2081, 2001.

7 GLOSSÁRIO

Aleuoma:	Proteína encontrada no endosperma de sementes.
Endosperma:	Tecido vegetal, parte nutritiva da semente.
et al:	Entre outros.
Germe:	Embrião, parte vital do arroz.
Hipercalcúria:	Aumento da excreção de cálcio na urina.
Interleucina:	Tipos de proteínas produzidas por células.
Macrófagos:	Célula com importante função imune.

8 ANEXOS

Anexo A – Estrutura química dos demais componentes do gama orizanol.



Fonte: XU e GODBER et al., 1999.