

Atividade antioxidante e correlação com fenólicos totais em genótipos de Urucum (*Bixa orellana* L.)

Antioxidant activity and correlation with total phenolicin genotypes of Annatto (*Bixa orellana* L.)

RIALA6/1345

Alana Rocha LEMOS¹, Newton Oliveira RÊGO JÚNIOR², Abel Rebouças SÃO JOSÉ³, Mara Lúcia Albuquerque PEREIRA⁴, Marcondes Viana da SILVA^{4*}

*Endereço para correspondência: ⁴Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Praça Primavera, 40, Bairro Primavera, Itapetinga, BA, Brasil, CEP 45.700-000, tel: 77 3261-8461, e-mail: mviana@hotmail.com

¹Departamento de Ensino Básico, Técnico e Tecnológico, Instituto Federal Baiano.

²Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

³Departamento de Fitotecnia e Zootecnia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

⁴Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Recebido: 03.06.2010 – Aceito para publicação 09.01.2011

RESUMO

O estudo objetivou quantificar os fenóis totais em cinco genótipos de *Bixa orellana* (*Piave vermelha*, *Piave vermelha gigante*, *CPATU 0060*, *Bico-de-pato I* e *Peruana Paulista*). Os extratos foram obtidos em etanol PA e solução hidroetanólica (80:20,v.v⁻¹), sendo os resultados obtidos comparados a dois antioxidantes sintéticos, butil-hidroxitolueno (BHT) e ácido gálico (GAE). Os teores de fenólicos totais dos genótipos analisados apresentaram valores médios de 776,02 a 1.498,48 mg GAE.100 g⁻¹ de amostra (peso seco) e 297,08 a 450,97 mg GAE.100 g⁻¹, para os extratos hidroetanólicos e etanólicos, respectivamente. A medida da atividade antioxidante para os extratos hidroetanólicos variou entre 48,31% e 70,10%. Valores inferiores foram obtidos para atividade antioxidante dos extratos etanólicos (18,91% a 35,26%). Os resultados evidenciaram que o genótipo CPATU 0060 apresentou teores de fenólicos totais e atividade antioxidante superiores aos demais genótipos analisados. Foi observada baixa correlação entre as variáveis de fenóis totais e atividade antioxidante para os extratos hidroetanólicos (R= -0,5328) e etanólicos (R= 0,4115). Considerando a ampla aplicação do urucum na indústria de alimentos e farmacêutica, os resultados sugerem que seus grãos podem ser considerados uma fonte potencial de antioxidante natural.

Palavras-chave. alimento funcional, composição de alimentos, sistema modelo β -caroteno/ácido linoleico, espectrofotometria, análise de alimentos.

ABSTRACT

The study aimed to quantify total phenols in five genotypes of *Bixa orellana* (*Piave vermelha*, *Piave vermelha gigante*, *CPATU 0060*, *Bico de pato I* e *Peruana paulista*). The extracts were obtained from ethanol PA and hydroethanol solution (80:20, vv⁻¹), the results compared to two synthetic antioxidants, butylated hydroxytoluene (BHT) and gallic acid (GAE). The total phenolic contents of the genotypes studied showed mean values from 776.02 to 1498.48 mg GAE.100g⁻¹ sample (dry weight) and 297.08 to 450.97 mg GAE g⁻¹.100, for the extracts hydroethanolic and ethanol, respectively. The measurement of antioxidant activity of the hidroethanolic extracts ranged from 48.31% and 70.10%. Lower values were obtained for the antioxidant activity of ethanol extracts (18.91% to 35.26%). Studies indicate that the genotype CPATU 0060 showed total phenolic contents and antioxidant activity than the other genotypes studied. Low correlation was observed between the variables of total phenols and antioxidant activity of the hydroethanolic extracts (R = -0.5328) and ethanolic (R = 0.4115). Considering the wide application of annatto in food industry and pharmaceuticals, the results suggest that the grains can be considered a potential source of natural antioxidant.

Keywords. functional food, food composition, system model β -carotene/linileic acid, natural antioxidants, food analysis.

INTRODUÇÃO

A utilização de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos constitui um mecanismo de defesa na inibição da lipoperoxidação. Entretanto, esses aditivos são apontados como causadores ou promotores de diversas patologias^{1,2}. Assim sendo, é crescente o número de publicações relativas à substituição por antioxidantes de fontes naturais³⁻⁶.

A lipoperoxidação é um processo complexo que ocorre em cadeia, no qual estão envolvidos fatores oxidantes, como tratamento térmico, luz UV, radiações ionizantes, metais, lipoxigenases e outros, que favorecem a produção de intermediários radiculares reativos e resultam em produtos secundários com potencial efeito toxicológico^{7,8}.

Os antioxidantes atuam minimizando o processo oxidativo durante as etapas da oxidação por diferentes mecanismos. Os antioxidantes de natureza enzimática integram o sistema de defesa antioxidante celular, removendo formas reativas de oxigênio, nitrogênio, enxofre e outras, enquanto os antioxidantes não enzimáticos podem atuar na complexação de íons metálicos e na redução de radicais livres e peróxidos, nestes últimos estão incluídos os compostos fenólicos, considerados potenciais antioxidantes⁹.

A maioria dos vegetais superiores sintetiza uma expressiva quantidade de metabólitos secundários relacionados a diversas funções, como quimopreventivos em resposta ao ataque de herbívoros e microrganismos, na biossíntese de compostos sinalizadores da polinização, para manter o equilíbrio ecológico e estabelecer, assim, a homeostase da planta, sendo sua síntese regulada por fatores bióticos e abióticos¹⁰. Estes fitoquímicos de ocorrência natural apresentam-se como misturas complexas que diferem entre vegetais, partes da planta (sementes, folhas e raízes), bem como durante os estádios de desenvolvimento da mesma. Em geral, são agrupadas estruturalmente em três grupos químicos: terpenos, compostos nitrogenados e fenólicos, neste último estão incluídos os flavonoides, considerados potenciais antioxidantes naturais¹¹.

A *Bixa orellana* L. (urucum) é uma importante fonte de matéria-prima empregada na indústria de alimentos brasileira, especialmente na produção de embutidos, massas, queijos, sorvetes e confeitarias, e corresponde a aproximadamente 90% do mercado de corantes. Em nível mundial, representa cerca de 70% do mercado de corantes naturais empregados na indústria

de alimentos. Apesar da sua utilização como corante há muitos séculos pelos índios, seu uso comercial é recente e vem aumentando cada vez mais em função das exigências do mercado por produtos mais “saudáveis”, uma vez que a legislação limita o uso de determinados aditivos artificiais na indústria alimentícia e farmacêutica¹².

O estado da Bahia possui uma área plantada de urucum estimada em 2 mil hectares, com maior concentração no sul e extremo sul, sudoeste e litoral norte. Por essa razão, o banco de germoplasma ativo da Bahia está instalado na Universidade do Sudoeste da Bahia/UESB, com mais de 120 acessos de urucum, sendo considerado um dos maiores do mundo com cerca de mil espécies de plantas^{13,12}. Dentre estas, destacam-se *Piave vermelha*, *Piave vermelha gigante* e *CPATU 0060*, pela boa produtividade, associada a elevados teores de bixina nas sementes, que variam de 3,5% a 6%. O genótipo de *Bico-de-pato* é o mais cultivado no extremo sul da Bahia, possui elevada produtividade e embora apresente limitado teor de bixina, entre 2,1 a 3,3%, destaca-se como um dos mais vigorosos genótipos no Brasil.

Pelo exposto e considerando as amplas aplicações das sementes do urucueiro na indústria de alimentos, objetivou-se com o presente estudo avaliar os teores de fenólicos bioativos a partir dos extratos de cinco genótipos de urucueiros, determinar o melhor solvente extrator, bem como verificar a correlação entre os teores de fenólicos totais e a atividade antioxidante.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido nos Laboratórios de Química Analítica e Bioquímica, Fisiologia Animal e Nutrição Animal, todos da UESB, Campus de Itapetinga/Bahia. Foram utilizados grãos de urucum (*Bixa orellana* L.) dos genótipos *Piave vermelha*, *Piave vermelha gigante*, *CPATU 0060*, *Bico-de-pato I* e *Peruana paulista*, cedidos gentilmente pelo banco ativo de germoplasma da UESB, Campus de Vitória da Conquista, Bahia, em setembro de 2007, os quais foram selecionados por serem os mais cultivados no Brasil.

Preparo da Matéria-Prima

Os grãos de urucum foram ajustados a teores de umidade de 10%, em estufa com circulação forçada de ar à temperatura de (50 ± 2) °C. Em seguida, foram triturados para redução do seu tamanho, em um moinho de bancada, e os grãos triturados foram classificados em peneiras Tyler para tamanho da partícula igual a 180 µm.

As frações obtidas foram acondicionadas a vácuo em sacos de polipropileno e mantidas em local seco, à temperatura ambiente e protegidas da luz.

Obtenção dos Extratos

Para a extração dos compostos fenólicos foram utilizados dois solventes: etanol PA e uma solução hidroetanólica (80:20, v.v-1). Os extratos em etanol PA e hidroetanólicos foram obtidos por processo de extração sólido-líquido: 5 g de amostra desidratada foram mantidos em contato, por 30 minutos e sob agitação constante, com 50 mL dos respectivos solventes, à temperatura ambiente, (28 ± 2) °C. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 3600 x g por 10 minutos. O resíduo obtido foi submetido a mais uma extração idêntica à descrita anteriormente. Os extratos obtidos foram particionados com hexano, em funil de separação e, posteriormente, clarificados com 5 mL de solução aquosa de hidróxido de bário 0,3 M e 5 mL da solução de sulfato de zinco a 5% e homogeneizada, sendo a mistura deixada em repouso por 20 minutos. Após esta etapa, a mistura foi centrifugada para remoção dos interferentes da análise, conforme procedimento recomendado por Furlong et al¹⁴. Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo à temperatura de (50 ± 2) °C, transferidos para tubos de ensaio com tampa e acondicionados a -18 °C. Os extratos concentrados foram liofilizados.

Determinação Espectrofotométrica dos Fenólicos Totais (FT)

Para determinação dos compostos fenólicos totais, foi adotado procedimento proposto por Wettasinghe e Shahidi¹⁵ utilizando o reagente de *Folin-Ciocalteu* (Sigma-Aldrich). O ensaio envolve reações de oxidorredução em meio alcalino, no qual ânions fenolatos são oxidados e o complexo fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) fosfomolibdídico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), de cor amarela, proveniente do reagente que é reduzido a uma mistura de óxidos de tungstênio e molibdênio, de cor azul. A intensidade de cor que se desenvolve é proporcional ao teor de compostos fenólicos presentes no extrato. O total de compostos fenólicos nos extratos obtidos foi expresso em mg de equivalente de ácido gálico.100 g⁻¹ da amostra desidratada.

Determinação da Atividade Antioxidante *in vitro* dos Compostos Fenólicos Totais

A atividade antioxidante dos extratos de urucueiros foi avaliada utilizando-se o sistema modelo do β -caroteno/

ácido linoleico, que consiste na cooxidação do β -caroteno/ácido linoleico em uma emulsão aquosa, monitorada com o decaimento da absorvância na região do visível, proposto por Marco¹⁶, Miller¹⁷ e Lee et al.¹⁸ e modificado por Emmons e Peterson¹⁹. A metodologia consiste na homogeneização de 2 mg de β -caroteno em 20 mL de clorofórmio em um balão de fundo redondo contendo 40 mg de ácido linoleico e 400 mg do emulsificante Tween 20 (Emulsão A). Após a dissolução da mistura, foi removido o solvente em evaporador rotativo a (50 ± 2) °C. Posteriormente, foi-se adicionando 100 mL de água destilada saturada com oxigênio sob agitação vigorosa. Alíquotas de 3 mL da emulsão A foram transferidas para uma sequência de nove tubos de ensaio contendo 40 μ L dos extratos brutos liofilizados na concentração de 1 mg.mL⁻¹. Ao primeiro tubo foi realizada a leitura imediata a 470 nm em espectrofotômetro (tempo zero), enquanto os demais tubos foram incubados em banho-maria a (45 ± 2) °C, sendo as leituras realizadas em intervalos de 15 min, durante um período de duas horas. A amostra em branco foi constituída de 3 mL da emulsão ácido linoleico-Tween 40 (Emulsão B) e 40 μ L água destilada oxigenada. A amostra controle, sem antioxidante, foi preparada adicionando 3 mL da emulsão A em uma sequência de nove tubos de ensaio e 40 μ L do solvente testado.

A atividade antioxidante da amostra foi comparada a dois antioxidantes sintéticos, BHT (2,6-di-tert-butil-4-metil fenol) e ácido gálico, ambos na concentração de 1 g.100 mL⁻¹ em etanol PA, que foi determinada nas mesmas condições acima descritas. O percentual da inibição da oxidação em relação ao controle foi obtido pela relação das absorvâncias no tempo final e inicial dos extratos. A atividade antioxidante (AA) foi calculada como percentual de inibição, relativa ao controle, sendo utilizada a seguinte expressão:

$$\% \text{ de Inibição} = 100 \frac{DT_c - DT_a}{DT_c}$$

Onde:

$$DT_c \text{ (Absorbância do controle no início e ao final da análise)} = \ln \frac{A_{t=0}}{A_{t=120}}$$

$$DT_a \text{ (Absorbância da amostra no início e ao final da análise)} = \ln \frac{A_{t=0}}{A_{t=120}}$$

Tabela 1. Teores de fenólicos totais nos extratos etanólicos (EE) e hidroetanólicos (EHE) de urucum

Genótipos	Teor de fenólicos totais	
	EHE (mg GAE.100 g ⁻¹)	EE (mg GAE.100 g ⁻¹)
CPATU 0060	1.498,48 ± 14,50 a	450,97 ± 42,20 a
<i>Piave vermelha gigante</i> (PVG)	1.280,72 ± 14,57 a	310,85 ± 45,87 a
<i>Peruana paulista</i> (PP)	1.024,98 ± 33,29 a	382,21 ± 69,72 a
<i>Bico-de-pato I</i> (BP)	821,15 ± 54,10 a	389,99 ± 22,02 a
<i>Piave vermelha</i> (PV)	776,02 ± 12,49 a	297,80 ± 35,78 a

Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão (n = 3); médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente (p > 0,05)

Análises Estatísticas

Todas as determinações foram realizadas em triplicata e todos os resultados foram apresentados como média ± desvio-padrão (DP). Foram realizadas análises de variância (ANOVA) com duas repetições e o teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, usando o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG) versão 8.0. O coeficiente de correlação foi estabelecido entre os teores de fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos utilizando o software Excel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados os teores médios de fenólicos totais (FT) obtidos em função do tipo de extrato para cada um dos genótipos de urucueiros, sendo verificada maior eficiência na extração destas fitomoléculas em etanol a 80%, fato que pode ser atribuído à maior afinidade química dos fenólicos por este solvente quando comparado à extração em etanol PA e evidencia que a presença da água no solvente extrator aumenta a eficiência extratora nas matrizes analisadas.

Cardarelli e Mercadante²⁰ quantificaram os FT pelo método de *Folin Ciocalteu* em sementes de urucum empregando diversos solventes e obtiveram 184 mg GAE.100 g⁻¹ para os extratos metanólicos, 156,50 mg GAE.100 g⁻¹ para o hidroetanólico (50:50 v.v⁻¹) e 109,80 mg GAE.100 g⁻¹ para o etanólico. A diferença observada em relação ao presente estudo pode ser atribuída ao tamanho da partícula, o método e o tempo de extração utilizado, além dos genótipos envolvidos. Beal²¹ avaliou os teores de FT em extratos etéreo, acetônico, alcoólico e aquoso de rizomas de gengibre,

utilizando o método de *Folin Ciocalteu* e observou teores médios entre 846,37 a 1409,05 mg GAE.100 g⁻¹, semelhantes aos obtidos neste trabalho.

Shahidi e Nacz²² consideram complexo selecionar a forma mais eficiente de extração dos compostos fenólicos, devido à influência de inúmeros fatores, como a matriz a ser analisada, o solvente extrator, o tamanho das partículas e natureza química. Estes fitoquímicos podem apresentar diferentes graus de polaridades nos alimentos, bem como sua presença em elevados teores, além da possibilidade de sua interação com carboidratos, proteínas e outros componentes dos alimentos, o tempo e a temperatura de extração e outros. Segundo Andreo e Jorge²³, procedimentos adicionais podem ser realizados para remover substâncias não fenólicas, razão pela qual neste estudo foram particionados com hexano e clarificados com solução de Ba(OH)₂ 0,3M e sulfato de zinco a 5% para remoção de interferentes conforme proposto por Furlong¹⁴. A extração com solventes orgânicos de alta polaridade (metanol, etanol e acetona) e água é frequentemente utilizada para a extração dos compostos fenólicos^{24,25}, sendo que o etanol e a água são os solventes mais empregados para a extração de polifenóis totais por questões de baixa toxicidade.

No Brasil, o uso de antioxidantes adicionados em alimentos é controlado pelo Ministério da Saúde e não deve ser superior a 200 mg.kg⁻¹ para BHA e TBHQ e 100 mg.kg⁻¹ para BHT. Estudos utilizando antioxidantes sintéticos em alimentos têm sido frequentemente monitorados considerando os possíveis danos que estes podem provocar ao organismo²⁶. Observa-se que os extratos retardaram de forma expressiva a descoloração do β-caroteno, demonstrados pelos percentuais de inibição (Tabela 2).

Tabela 2. Teores de fenólicos totais nos extratos etanólicos (EE) e hidroetanólicos (EHE) de urucum

Genótipos	Inibição da oxidação do β -caroteno	
	EHE (%)	EE (%)
<i>Peruana paulista</i> (PP)	48,31 \pm 6,73 a	35,26 \pm 3,56 a
<i>Piave vermelha</i> (PV)	65,01 \pm 1,98 a	34,54 \pm 5,26 a
<i>Bico de pato I</i> (BP)	69,94 \pm 7,22 a	33,37 \pm 1,92 a
<i>Piave vermelha gigante</i> (PVG)	55,32 \pm 5,26 a	21,61 \pm 1,26 a
CPATU 0060	70,10 \pm 0,65 a	18,91 \pm 3,34 a

Os resultados estão expressos como média \pm desvio-padrão (n = 3); médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente (p > 0,05)

O extrato hidroetanólico oriundo da variedade CPATU 0060 apresentou percentual de inibição da oxidação do β -caroteno correspondente a 70,10%, sendo esse valor inferior aos obtidos com os antioxidantes sintéticos, ácido gálico e BHT que apresentaram valores de 71% e 99,69% respectivamente (Figuras 1 e 2).

Resultados semelhantes aos obtidos neste estudo foram relatados por Cardarelli e Mercadante²⁰, que avaliaram a atividade antioxidante (AA) pelo radical DPPH de extratos de urucueiro obtidos a partir de solventes com diferentes polaridades e observaram porcentagens da AA de 38% e superiores a 100 %, para os extratos hidroetanólicos, e a 50% para os etanólicos, respectivamente.

Estão disponíveis na literatura vários estudos que demonstram relação entre os teores de fenólicos totais e a atividade antioxidante²⁸⁻³². Observa-se que vários fatores estão envolvidos no efeito antioxidante apresentado pelos fenólicos, tais como a estrutura química e composição dos fitoquímicos fenólicos bioativos, a posição e o número de hidroxilas presentes nas moléculas dos polifenóis, dentre outros. Acredita-se que a ortohidroxilação influencia positivamente no efeito da atividade antioxidante dos fenólicos³³.

Neste estudo, foi observada baixa correlação entre as variáveis, Fenóis Totais e Atividade Antioxidante para os extratos hidroetanólicos (R = -0,5328) e etanólicos (R = 0,4115).

Os coeficientes de correlação (R) e de determinação (R²) para o extrato hidroetanólico de urucum foram inferiores aos observados por Melo et al.³⁴, que investigaram extratos metanólicos de hortaliças utilizando o sistema modelo de oxidação do β -caroteno/ácido linoleico para a medida de AA e o teor

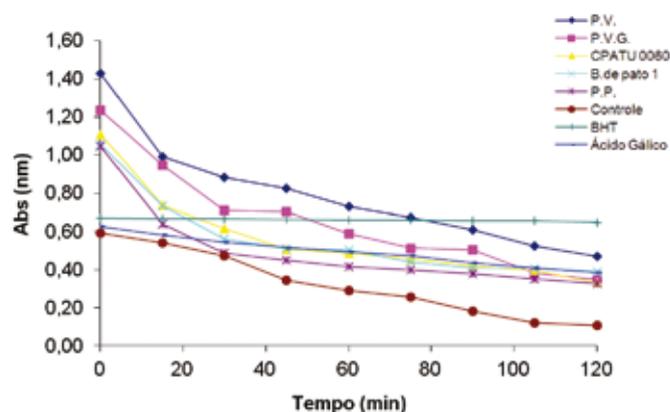


Figura 1. Efeito antioxidante dos extratos etanólicos de genótipos de urucueiros sistema modelo β -caroteno/ácido linoleico. Piave vermelha (PV), Piave vermelha gigante (PVG), CPATU 0060, Bico-de-pato I, Peruana Paulista (PP)

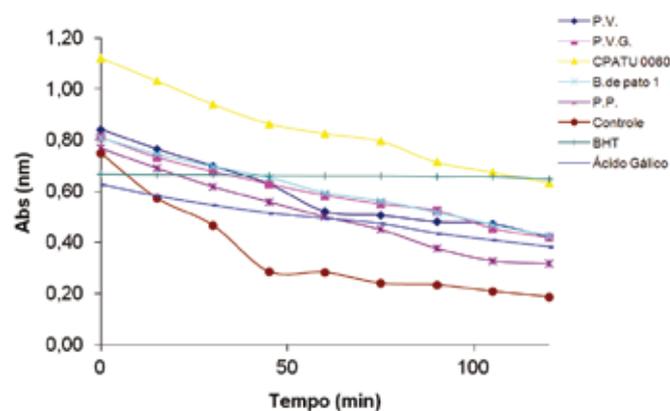


Figura 2. Efeito antioxidante dos extratos hidroetanólicos de genótipos de urucueiros sistema modelo β -caroteno/ácido linoleico. Piave vermelha (PV), Piave vermelha gigante (PVG), CPATU 0060, Bico-de-pato I, Peruana Paulista (PP)

de FT determinado pelo método de *Folin Ciocauteau*. De acordo com Melo et al.³⁴, vários fatores podem influenciar a determinação de fenólicos em matrizes vegetais e, conseqüentemente, a medida da AA, com destaque para aqueles relativos ao cultivo da planta, condições edafoclimáticas, características genéticas da planta, estresses biótico e abiótico e outros.

CONCLUSÃO

Constatou-se uma considerável variação nos teores de compostos fenólicos totais nas sementes dos genótipos estudados, tanto nos extratos hidroetanólicos quanto nos etanólicos. Embora as soluções hidroetanólicas tenham aumentado tanto a extração dos compostos fenólicos presentes nas sementes de urucueiros como a atividade antioxidante, foi observada baixa correlação entre as variáveis de fenóis totais e atividade antioxidante para os dois tipos de extratos estudados. Os extratos hidroetanólicos do genótipo CPATU 0060 apresentaram atividade antioxidante superior a 70%, embora inferior aos antioxidantes sintéticos testados.

Os resultados sugerem que os grãos do urucum podem ser considerados como uma fonte potencial de antioxidante natural e, embora estudos sistemáticos *in vivo* devam ser conduzidos para explorar a biodisponibilidade das fitomoléculas avaliadas, o seu uso deveria ser estimulado, tanto o doméstico como nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica.

REFERÊNCIAS

1. Siegel D, Malkinson AM, Ross D. Butylated hydroxytoluene (BHT)-mediated increases in NAD(P)H-quinone oxidoreductase (QR) in mouse lung: Evidence for the alveolar type II cell as a site of QR activity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1988; 96(1): 68-74.
2. Hwang Deng F, Tsai Ming R, Jeng YT, Sen S. Toxicity and excretion of butylated hydroxytoluene (BHT) through feed in Japanese eel. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 1992; 58(1): 69-74.
3. Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, dos Santos TC, Coube CS et al. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. *Phytother Res*. 2001;15(2):127-30.
4. Koleva II, van Beek TA, Linssen JP, de Groot A, Evstatieva LN. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a comparative study of three testing methods. *Phytochem Anal*. 2002;13(1):8-17.
5. Prior RL, Cao G, Martin A, Sofic E, Mcewan J, O'Brien C et al. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium* species. *J Agric Food Chem*. 1998;46(7):2686-93.
6. Mariutti LRB, Bragagnolo N. Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentícios. *Braz J Food Technol*. 2007;10(2):96-103.
7. Addis PB. Occurrence of lipid oxidation products in foods. *Food Chem Toxicol*. 1986;24(10/11):1021-30.
8. Tawfik MS, Huyghebaert A. Interaction of packaging materials and vegetable oils: oil stability. *Food Chem*. 1997; 64(4):451-9.
9. Halliwell B. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. *Bioch Pharmacol*. 1995; 49(10):1341-8.
10. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 1996; 20(7):933-56.
11. Wink M. Phytochemical diversity of secondary metabolites. *Encycl Plant Crop Sci*. 2004; [s/n]: 915-9.
12. São José AR. Sustentabilidade do Agronegócio de Corantes Naturais de Urucum (*Bixa Orellana* L.) no Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE URUCUM, 2006, João Pessoa. Anais. João Pessoa: EMEPA.
13. Souza J. Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária do Estado da Bahia. Urucum teve áreas de plantio reduzidas. [Acesso em 12 de julho de 2009.]. Disponível em: [http://www.seagri.ba.gov.br/noticias.asp?qact=view¬id=7960].
14. Furlong EB, Colla E, Bortolato DS, Baisch ALM, Souza-Soares LA. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. *Vetor*. 2003;13:105-14.
15. Wettasinghe M, Shahidi F. Evening Primrose Meal: A Source of Natural Antioxidants and Scavenger of Hydrogen Peroxide and Oxygen-Derived Free Radicals. *J Agric Food Chem*. 1999; 47(5):1801-12.
16. Marco GJ. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc*. 1968;45(9):594-8.
17. Miller HE. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc*. 1971;48(2):91.
18. Lee Y, Howard LR, Villalon B. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. *J Food Sci*. 1995;60(3):473-6.
19. Emmons CL, Peterson DM. Antioxidant activity and phenolic contents of oat groats and hulls. *Cereal Chem*. 1999;76(6):902-6.
20. Cardarelli CR, Benassi MT, Mercadante AZ. Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and colour properties. *Food Sci Technol*. 2008;41:1689-93.
21. Beal BH. Atividade Antioxidante e Identificação dos Ácidos Fenólicos do Gengibre (*Zingiber officinale*) [dissertação de Mestrado]. Florianópolis, SC: Universidade Federal de Santa Catarina, 2006. p. 87.
22. Shahidi F, Naczk M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic Publishing Co, Inc. 1995. p. 281-319.
23. Andreo D, Jorge N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *Bol Centr Pesq Processam Alim*. 2006; 24(2): 319-36.
24. Araújo JMA, Silva MV, Chaves JBP. Supercritical fluid extraction of daidzein and genistein isoflavones from soybean hypocotyl after hydrolysis with endogenous β -glucosidases. *Food Chem*. 2007;105(1): 266-72.

25. Jardini FA, Mancini Filho J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). *Rev Bras Ciênc Farm*. 2007; 43(1).
26. Brasil. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução nº 04/88. In: Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação. *Compêndio da Legislação de Alimentos*. São Paulo, SP, 2001. v. 1, p. 326.
27. Babich H. Butylated hydroxytoluene (BHT): a review. *Environm Res*. 1992;29(2/3):1-29.
28. Kaur C, Kapoor HC. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int J Food Sci Technol*. 2002;37(2):153-61.
29. Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agric Food Chem*. 2002;50(25):7449-54.
30. Chinnici F, Bendini A, Gaiani A, Riponi C. Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. golden delicious apples as related to their phenolic composition. *J Agric Food Chem*. 2004;52(15):4684-9.
31. Santos GM, Maia GA, Sousa PHM, Costa JMC, Figueiredo RW, Prado GM. Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart). *Arch Latinoam Nutr*. 2008;58(2):187-92.
32. Ismail A, Marjan ZM, Foong CW. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chem*. 2004;87(4):581-6.
33. Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD. Phenolic antioxidants. *Food Sci Nutr*. 1992;32(1): 67-103.
34. Melo EA, Maciel MIS, Lima VLAG, Leal FLL, Caetano ACS, Nascimento RJ. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. *Ciênc Tecnol Alim*. 2006;26(3):639-44.