

ROBERTA SAMPAIO PINHO

**COMPOSIÇÃO CENTESIMAL, TOCOIS E FITOSTEROIS
DE SEMENTES DE CINCO ESPÉCIES OCORRENTES EM
PERNAMBUCO (BRASIL)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, para obtenção do grau de Doutor em Botânica.

Orientadora:

Dr^a Suzene Izídio da Silva

Conselheira:

Dr^a Maria Beatriz P. P. Oliveira
Universidade do Porto, Portugal

**RECIFE
2010**

Ficha catalográfica

P654c Pinho, Roberta Sampaio
Composição centesimal, tocois e fitosteróis de sementes
de cinco espécies ocorrentes em Pernambuco (Brasil) /
Roberta Sampaio Pinho. -- 2010.
106 f.: il.

Orientadora: Suzene Izídio da Silva.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco. Departamento de Biologia, Recife, 2010.
Inclui referências e anexo.

1. Tocois 2. Fitosteróis 3. Composição química
4. Malpighiaceae 5. Euphorbiaceae 6. Lecythidaceae
I. Silva, Suzene Izídio da II. Título

CDD 581

**COMPOSIÇÃO CENTESIMAL, TOCOIS E FITOSTEROIS DE SEMENTES DE CINCO
ESPÉCIES OCORRENTES EM PERNAMBUCO (BRASIL)**

Roberta Sampaio Pinho

Data da aprovação: / / .

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Suzene Izídio da Silva
(UFRPE)

Examinadores:

Prof^o Dr. Antônio Salatino
(USP)

Prof^a. Dr^a. Laíse de Holanda Cavalcanti Andrade
(UFPE)

Prof^a Dr^a Márcia Silva do Nascimento
(UFPE)

Prof^o Dr. Antonio Fernando Morais de Oliveira
(UFPE)

Prof^a Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto
(UFRPE)

Suplentes:

Prof^a Dr^a Elcida de Lima Araújo
(UFRPE)

Prof^a Dr^a Maria Inês Sucupira Maciel
(UFRPE)

**RECIFE
2010**

*Disse ainda: A que assemelharemos o reino de Deus?
ou com que parábola o representaremos?*

*É como um grão de mostarda que, quando se semeia,
é a menor de todas as sementes que há na terra; mas, tendo sido semeado,
cresce e faz-se a maior de todas as hortaliças e cria grandes ramos,
de tal modo que as aves do céu podem aninhar-se à sua sombra.*

Mateus 13, 30-32

*Mas Deus lhe dá um corpo como lhe aprouve, e a cada uma
das sementes um corpo próprio.*

I Coríntios 15, 38

*No meio da sua praça, e de ambos os lados do rio, estava a árvore da vida,
que produz doze frutos, dando seu fruto de mês em mês;
e as folhas da árvore são para a cura das nações.*

Apocalipse 22, 2

Dedico

Aos meus Pais, Marluce Sampaio Pinho e José Amaro L. Pinho, pelo amor, estímulo e compreensão em todos os momentos.

*Ao meu esposo,
Alfredo Teixeira Filho, por entender a minha ausência durante todas as horas em que me dediquei à realização da Tese.*

Agradecimentos

A Deus, por tudo que tem me concedido, pela presença constante em todos os momentos da minha vida e pela força e conforto nas tribulações.

À Professora Doutora Suzene Izídio da Silva, manifesto o meu mais sincero reconhecimento por toda ajuda, apoio e imensa compreensão com que me teve. Queria ainda agradecer-lhe o seu exemplo de justiça, tranquilidade e bom senso, inspirando-me para continuar, bem como todos os ensinamentos, especialmente os de carinho pessoal e religiosos, que me passou ao longo deste trabalho.

À Professora Doutora Beatriz P. P. Oliveira quero também manifestar o meu reconhecimento por me ter acolhido no Serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal e pelo esforço em proporcionar todos os meios e condições necessárias para as análises.

Ao Dr. Manfred Oswald E. Schwartz pela solicitude, apoio e colaboração inicial para definição do tema desta tese, meu sincero agradecimento.

Ao Dr. Antonio Fernando Morais de Oliveira pelos ensinamentos, momentos de discussão e apoio durante a minha jornada na Pós-Graduação.

Aos membros da banca, Dr. Antônio Salatino, Dr^a Laíse de Holanda Cavalcanti Andrade, Dr^a Márcia Silva do Nascimento, Dr. Antonio Fernando Morais de Oliveira, Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto, Dr^a Elcida de Lima Araújo e Dr^a Maria Inês Sucupira Maciel pelas críticas e contribuição que enriqueceram todas as informações contidas nesta Tese.

Aos meus pais, Marluce Sampaio Pinho e José Amaro L. Pinho, com muito carinho, pelo amor, apoio constante e esforços imensuráveis dados nesta árdua caminhada, minha gratidão.

Ao meu marido, Alfredo Teixeira Filho, por me mostrar que tudo na vida precisa de esforço, superação, humildade e esperança, mostrando o quanto é importante manter a simplicidade de espírito e acreditar no meu trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Recursos Económico e Fitoquímica (LAREFI), Luana Cristina Andrade, Diógenes Gusmão Coutinho e Andréa Karla Morais de Araújo, por todo auxílio prestado nos momentos necessários, e de modo especial, para a amiga Mariana Oliveira, pelo convívio agradável e oportunidade de trabalharmos juntas.

A amiga Rosa Livia Carvalho de Moraes pela elaboração do abstract e disponibilidade em discutir aspectos químicos deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Ficologia (LABOFIC) pelo carinho, amizade e palavras de ânimo nos momentos difíceis e momentos de descontração compartilhados.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Botânica pela convivência saudável em todos os momentos.

Aos professores Ariadne M. Nascimento, Ulysses P. Albuquerque, Cibele C. de Castro e Carmen S. Zickel pelo apoio concedido como coordenadores do Programa de Pós-graduação em Botânica da UFRPE.

Aos amigos do Doutorado, turma 2006, Ladvânia M. do Nascimento, Eduardo B. de Almeida Júnior e Ênio Wolicy Dantas, por toda força e solidariedade durante a realização deste trabalho.

A todos do Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

As amigas Heryka Ramalho e Karla Lourenço, por terem me acolhido de forma tão carinhosa e prestativa tornando agradável o período de estadia na cidade do Porto em Portugal.

As colegas do laboratório de Bromatologia, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, em especial a Dr^a Susana Cabral e Eulália Mendes, pela disponibilidade, empenho, competência e dinamismo incansável que as caracterizam e também pela ajuda nas análises e interpretação dos dados da tese.

À Ana Katarina, bibliotecária do COMUT, pelas inúmeras buscas de artigos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro e por ter concedido o Doutorado sanduíche, através do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (PDEE).

À Universidade Federal Rural de Pernambuco nas pessoas de seus funcionários e professores por todo o acolhimento desde a graduação em Ciências Biológicas até este momento.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, ***meus sinceros agradecimentos!***

Lista de Figuras

- Figura 1.** Estrutura dos tocoferóis e tocotrienóis. 19
- Figura 2.** Estrutura do β -sitosterol, evidenciando a numeração usada em fitosteróis. 23
- Figura 3.** Estruturas dos fitosteróis. I: colesterol; II: campesterol; III: estigmasterol; IV: clerosterol; V: β -sitosterol; VI: β -sitostanol; VII: Δ^5 -avenasterol; VIII: Δ^7 -estigmasterol; IX: Δ^7 -avenasterol. 25

Lista de Tabelas

Tabela 1. Teor de Vitamina E em diversos alimentos (mg/100 g). Modificado de Bramley et al.(2000) e de Eskin e Przybylski (2001). 22

Tabela 2. Conteúdo médio de fitosteróis em óleos vegetais (mg/100 g de óleo). 27

Artigo 1

Tabela 1. Composição centesimal (g/100 g) das sementes de *Diplopterys pubipetala* e *Barnebya harleyi*. 51

Tabela 2. Conteúdo de tocois (mg/100 g) em óleos de sementes de *Diplopterys pubipetala* e *Barnebya harleyi*. 54

Tabela 3. Total de tocois, α -tocoferol, γ -tocoferol, ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) e estabilidade oxidativa em óleos das sementes de *Diplopterys pubipetala* e *Barnebya harleyi*. 58

Tabela 4. Fitosteróis (mg/100 g) em óleos de sementes de *Diplopterys pubipetala* e *Barnebya harleyi*. 60

Artigo 2

Tabela 1. Composição centesimal (mg/100 g) das sementes de *Couroupita guianensis*, *Croton adamantinus* e *Hippocratea volubilis* 77

Tabela 2. Conteúdo de tocois (mg/100 g) nos óleos das sementes de *Couroupita guianensis*, *Croton adamantinus* e *Hippocratea volubilis* e estabilidade oxidativa (EA) e ácidos graxos insaturados (%) (AGI) 81

Tabela 3. Fitosteróis (mg/100 g) em *Couroupita guianensis*, *Hippocratea volubilis* e *Croton adamantinus* 85

Pinho, Roberta Sampaio. Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Fevereiro, 2010. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL, TOCOIS E FITOSTEROIS DE SEMENTES DE CINCO ESPÉCIES OCORRENTES EM PERNAMBUCO (BRASIL)

Orientadora: Prof^a Dr^a Suzene Izídio da Silva (UFRPE, Recife)

Conselheira: Prof^a Dr^a Maria Beatriz P. P. Oliveira (FFUP, Porto)

Resumo - Neste trabalho foi feita a caracterização química das sementes, o conteúdo de tocois e fitosteróis a partir do óleo de sementes das espécies *Barnebya harleyi* e *Diplopterys pubipetala* (Malpighiaceae), *Croton adamantinus* (Euphorbiaceae), *Couroupita guianensis* (Lecythidaceae) e *Hippocratea volubilis* (Celastraceae), ocorrentes no Brasil, com o objetivo de fornecer informações que possam subsidiar o aproveitamento econômico dessas espécies. A composição centesimal das sementes foi realizada de acordo com AOAC (2000) e o teor de carboidratos + fibras alimentares foi calculado pela diferença dos outros componentes, utilizando a seguinte equação: Conteúdo de carboidratos + fibras alimentares = 100% - (%umidade + % proteína + % lipídios + % cinzas). Para fazer a análise dos tocois (tocoferóis e tocotrienóis) e dos fitosteróis, os óleos das sementes foram extraídos através de um aparelho de Soxhlet com *n*-hexano como solvente. Os tocois foram analisados em HPLC (High Performance Liquid Chromatography) e os componentes foram identificados por comparação dos tempos de retenção e espectro UV com padrões adquiridos da Sigma (α -, β -, γ - e δ -tocoferol e α -, β -, γ - e δ -tocotrienol). A composição dos esteróis foi avaliada por CG-FID de acordo com o método da Norma NP EN ISO 12228 (1999). Padrões de identificação utilizado foi adquirido da Sigma incluindo colestanol, colesterol, campesterol, estigmasterol, β -sitosterol, β -sitoestanol e betulina. Os teores de proteína variaram de 9,6 g/100 g em *H. volubilis* a 30,5 g/100 g em *D. pubipetala*. O conteúdo de carboidratos variou de 14,6 g/100 g em *B. harleyi* a 33,8 g/100 g em *C. adamantinus*. O conteúdo de cinzas variou de 7,78 g/100 g em *C. guianensis* a 2,13 g/100 g em *H. volubilis*. O conteúdo de óleo obtido das sementes variou de 35,5 g/100 g em *C. guianensis* a 49,9 g/100 g em *H. volubilis*. O conteúdo total de tocois variou de 25,1 mg/100 g em *C. guianensis* a 72,7 mg/100 g em *B. harleyi*. α -Tocoferol, γ -tocoferol e γ -tocotrienol foram detectados em todos os óleos das espécies analisadas, enquanto δ -tocotrienol foi detectado somente no óleo de *B. harleyi*. *D. pubipetala* foi a espécie com teor mais elevado de α -tocoferol (23 mg/100 g de óleo). *C. adamantinus* apresentou o maior teor de γ -tocoferol (63,3 mg/100 g). Entre os tocotrienóis, γ -tocotrienol atingiu o teor mais elevado (5,0 mg/100 g de óleo) em *B. harleyi*, a única espécie analisada contendo todos os tocois. O conteúdo total de fitosteróis no óleo variou de 79,81 mg/100 g em *C. guianensis* a 91,57 mg/100 g no óleo de *C. adamantinus*. O colesterol foi detectado em pequenas quantidades em todas as espécies analisadas, variando de 0,26 mg/100 g em *C. guianensis* a 0,90 mg/100 g em *D. pubipetala*. β -Sitosterol, campesterol e Δ^7 -estigmasterol foram os mais representativos nas cinco espécies estudadas. Dois picos correspondentes a substâncias desconhecidas eluíram no cromatograma do óleo de *C. guianensis* após Δ^7 -avenasterol (TR-24, 440 e TR-24, 680 min.) e a soma dos dois atingiu 57mg/100 g da fração dos esteróis. Além destes compostos, o clerosterol e campestanol foram encontrados em todas as amostras em pequenas quantidades e Δ^7 -avenasterol, com exceção em *C. guianensis*. β -Sitosterol foi o fitosterol com o maior teor, particularmente em *C. adamantinus*, *B. harleyi* e *H. volubilis*, com, respectivamente, 71,85, 70,40 e 62,64 mg/100 g. Δ^7 -Estigmasterol foi o segundo mais abundante fitosterol em *H. volubilis*, *D. pubipetala* e *B. harleyi*, com, respectivamente, 12,26, 12,22 e 7,13 mg/100 g. Os resultados deste trabalho são complementares e fornecem informações sobre vitamina E e fitosteróis dos óleos e composição centesimal de sementes de algumas espécies com perspectivas de aproveitamento econômico no Nordeste Brasileiro.

Palavras-chaves: Tocois, fitosteróis, composição química, Malpighiaceae, Euphorbiaceae e Lecythidaceae.

Pinho, Roberta Sampaio. Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). 2010, February.

CENTESIMAL COMPOSITION, TOCOLS AND PHYTOSTEROL FROM THE SEED OF THE FIVE SPECIES FROM PERNAMBUCO, BRAZIL

Advisor: Prof^a Dr^a Suzene Izídio da Silva (UFRPE, Recife)

Co-advisor: Prof^a Dr^a Maria Beatriz P. P. Oliveira (FFUP, Porto)

Abstract - This work carried out the chemical characterization, tocols and phytosterol contents from the seed oil of the species *Barnebya harleyi* and *Diplopterys pubipetala* (Malpighiaceae), *Croton adamantinus* (Euphorbiaceae), *Couroupita guianensis* (Lecythidaceae) and *Hippocratea volubilis* (Celastraceae) which are found in Brazil. The centesimal composition of the seeds was carried out in accordance with the AOAC (2000) and the carbohydrate content + alimentary fiber was estimated by the difference of the other components, using the following equation: $CC=100\% - (\% \text{ humidity} + \% \text{ proteins} + \% \text{ lipids} + \% \text{ ash})$. To make the analysis of the tocols and phytosterols, the seed oils were extracted through the Soxhlet apparatus using *n*-hexane as solvent. The tocols were analyzed by with HPLC (High Performance Liquid Chromatography) and the components identified by compararison of the retention times and UV spectrum with HPLC patterns (α -, β -, γ - e δ -tocopherol and α -, β -, γ - e δ -tocotrienol). The sterol composition was evaluated by GC-FID according to the method of the NP EN ISO 12228 (1999). Patterns used identification was acquired of Sigma including cholestanol, cholesterol, campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, β -sitostanol and betulin. The protein contents ranged from 9,6g/100 g *H. volubilis* to 30,5 g/100 g in *D. pubipetala*. The carbohydrate contents ranged from 14,6 g/100 g in *Barnebya harleyi* to 33,8 g/100 g in *Croton adamantinus*. The ash contents ranged from 7,78g/100 g in *C. guianensis* to 2,13 g/100 g in *H. volubilis*. The oil contents obtained from the seeds ranged from 35,5 g/100 g in *C. guianensis* to 49,9 g/100 g in *H. volubilis*. The total contents of tocols ranged from 25,1 mg/100 g in *C. guianensis* to 72,7 mg/100 g in *B. harleyi*. α -Tocopherol, γ -tocopherol and γ -tocotrienol were detected in all the oils from the species analyzed while δ -tocotrienol was detected only in the oil from *B. harleyi*. *D. pubipetala* was the species with the highest amount of α -tocopherol (23 mg/100 g oil). *C. adamantinus* presented the highest quantity of γ -tocopherol (63,3 mg/100 g). Among the tocotrienols, γ -tocotrienol reached the highest value (5,0 mg/100 g oil) in *B. harleyi*, the only species analyzed containing tocols in the oil. The total contents of phytosterols in the oil ranged from 79,81 mg/100 g in *C. guianensis* to 91,57 mg/100 g in the oil from *C. adamantinus*. Cholesterol was detected in small amounts in all analyzed species, ranging from 0,26 mg/100 g in *C. guianensis* to 0,90 mg/100 g in *D. pubipetala*. β -Sitosterol, campesterol, and Δ^7 -stigmastanol were the most representative phytosterols in the five investigated species. Two non identified peaks after Δ^7 -avenasterol (TR-24,440 and TR-24,680) in the chromatogram of the oil of *C. guianensis* corresponded to 57mg/100 g of the sterol fraction. In addition to these compounds, the clerosterol and campestanol were found in all the samples in small quantities and Δ^7 -avenasterol, with exception of *C. guianensis*. β -sitosterol was the phytosterol with the highest contents, particularly in *C. adamantinus*, *B. harleyi* and *H. volubilis*, with, respectively, 71,85, 70,40, and 62,64 mg/100 g. Δ^7 -estigmastanol was the second most abundant phytosterol in *H. volubilis*, *D. pubipetala* and *B. harleyi*, with, respectively, 12,26, 12,22 and 7,13mg/100 g. The results of this work, though exclusive for some species, are complementary, aiming to provide information on vitamin E, phytosterols and centesimal composition of the oil of some species with promising perspectives of economical benefits in Brazilian Northeast.

Keywords: Tocols, phytosterols, chemical characterization, Malpighiaceae, Euphorbiaceae and Lecythidaceae.

Sumário

| | |
|---|------|
| Agradecimentos | vi |
| Lista de figuras | viii |
| Lista de tabelas | ix |
| Resumo | x |
| Abstract | xi |
| 1. Introdução | 13 |
| 2. Fundamentação Teórica | 15 |
| 2.1 A Importância das sementes oleaginosa na alimentação | 15 |
| 2.2 Vitamina E | 17 |
| 2.3 Fitosteróis | 23 |
| 3. Referências Bibliográficas | 30 |
| Artigo 1. Composição centesimal e teores de tocois e fitosteróis de sementes de <i>Barnebya harleyi</i> e <i>Diplopterys pubipetala</i> (Malpighiaceae) | 43 |
| 1. Introdução | 45 |
| 2. Material e métodos | 48 |
| 3. Resultados e discussão | 51 |
| 4. Conclusão | 63 |
| Agradecimentos | 63 |
| Referências | 63 |
| Artigo 2. Composição centesimal e bioativos do óleo de sementes de <i>Couroupita guianensis</i> (Lecythidaceae), <i>Croton adamantinus</i> (Euphorbiaceae) e <i>Hippocratea volubilis</i> (Celastraceae) | 69 |
| 1. Introdução | 71 |
| 2. Material e métodos | 74 |
| 3. Resultados e discussão | 77 |
| 4. Comentário Final | 88 |
| Agradecimentos | 89 |
| Referências | 89 |
| Considerações Finais | 93 |
| Anexos | 95 |

1. INTRODUÇÃO

Sementes oleaginosas, além de serem fontes de lipídios e ácidos graxos essenciais, podem ser consideradas fontes de proteínas e carboidratos para dieta humana, tendo como vantagens serem recursos renováveis de baixo custo que podem fornecer compostos de alto valor agregado como bioativos, amplamente conhecidos pelas funções antioxidativas que desempenham no organismo, provendo benefícios à saúde.

Dentre as substâncias bioativas com poder antioxidante presentes em óleos vegetais, a vitamina E, também chamada de tocois, é um grupo de lipídios solúveis, de ocorrência natural, compreendendo oito isômeros: quatro tocoferóis (α -T, β -T, γ -T e δ -T) e quatro tocotrienóis (α -T₃, β -T₃, γ -T₃ e δ -T₃), sendo estes últimos a forma insaturada desses compostos (ADHIKARI et al., 2008). Tem sido observado que os tocoferóis e tocotrienóis são responsáveis pela inibição da síntese do colesterol, reduzindo o seu nível, bem como de outros fatores de riscos cardiovasculares e suprimindo a proliferação de células tumorais (CAMPBELL et al., 2003; MISHIMA et al., 2003; THERIAULT et al., 2003, SEN et al., 2006).

A ação antioxidativa mais eficaz de um determinado óleo em relação a outro pode ser resultante de diferenças no conteúdo e composição de bioativos polares e insaponificáveis, do sinergismo destes componentes com outros componentes presentes em cada óleo e da diferença no comportamento cinético de antioxidantes potenciais. Todos esses fatores podem contribuir para a eficiência de captação de radicais livres de óleos vegetais (RAMADANA e MOERSEL, 2006).

Os fitosteróis também estão entre os constituintes bioativos dos óleos vegetais que são conhecidos há mais de 50 anos pelo seu potencial em reduzir os níveis de colesterol em humanos. São compostos isoprenóides com um núcleo esterol e uma cadeia alquila. Muitos fitosteróis têm uma dupla ligação na posição C-5 do núcleo, enquanto outros são totalmente saturados, chamados assim de estanois (MOREAU et al., 2002).

Desta forma, a composição química de um óleo específico é considerada um fator determinante para direcionamento da produção de óleos para consumo humano ou aplicação industrial, uma vez que, a estabilidade oxidativa depende dos componentes do óleo. Aliado a isto, os compostos antioxidantes, apesar de minoritários, apresentam um papel fundamental nos óleos, já que a principal rota

de deterioração destes se dá pela oxidação, que tem lugar nos sítios das duplas ligações das moléculas de triglicéridos, acarretando perdas na economia (RAMADANA e MOESEL, 2006). Apesar de toda essa importância dos antioxidantes, esse tipo de informação, juntamente com a da estabilidade oxidativa e a composição nutricional das sementes, é pouco conhecida para espécies oleaginosas já consagradas (WARNER, 2005) e muito menos para espécies não convencionais.

Nas últimas décadas, muitos estudos sobre o teor de óleo e composição de ácidos graxos de sementes de plantas silvestres brasileiras foram realizados na tentativa de encontrar novas fontes de óleo que pudessem fornecer matéria-prima para aumentar a produção de alimentos e substituir em parte os derivados do petróleo. Com isso, muitas espécies nativas, de diversas regiões brasileiras, foram investigadas revelando um elevado teor de óleo (MAYWORM et al. 1998, SILVA, 1998, PINHO et al. 2009), mesmo assim, muitas dessas espécies não foram investigadas ainda quanto ao seu conteúdo em tocois e fitosteróis.

Desta forma, neste trabalho estudou-se a composição centesimal, os tocois, a estabilidade oxidativa e a composição dos fitosteróis das sementes de *Barnebya harleyi* W. R. Anderson & B. Gates e *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W. R. Anderson & C. Davis (Malpighiaceae), *Croton adamantinus* Mull. Arg. (Euphorbiaceae), *Hippocratea volubilis* L. e *Couroupita guianensis* Aubl. (Lecythidaceae) que tem significantes teores de óleo (29 a 46%) e ácidos graxos essenciais e incomuns (PINHO et al., 2009; LAGO et al., 1987; ANDRADE et al., 1999), e para as quais poucos estudos foram desenvolvidos.

As abordagens propostas nesta pesquisa procuram contribuir com novas informações para subsidiar principalmente a possível utilização de espécies coletadas em Pernambuco e amplamente distribuídas no Brasil e América Tropical, amparando-se no fato de que atualmente há uma intensa procura por substâncias bioativas provenientes da nossa flora.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A Importância das sementes oleaginosas na alimentação humana

As sementes oleaginosas, na sua generalidade, apresentam uma composição similar do ponto de vista nutricional, sendo caracteristicamente alimentos com elevado teor de lipídios e baixos níveis de sódio. Nos lipídios de sementes, verifica-se predominância de ácidos graxos insaturados em detrimento dos saturados, em alguns casos, como a noz (*Juglans regia* L.), se verifique o contrário. Em qualquer, dos casos, a razão insaturados/saturados é sempre extremamente favorável quando comparada com a maioria dos alimentos que possuem gorduras (SABATÉ et al., 2000; FERRARA et al., 2000; MYERS, 2007).

A maioria dos frutos secos possui um teor proteico interessante, com a particularidade de apresentarem significantes teores de arginina (aminoácido que intervem na formação de óxido nítrico). As sementes oleaginosas são ainda ricas em determinados compostos amplamente conhecidos pelas funções que desempenham no organismo humano, nomeadamente ácido fólico, vitamina E, fitosteróis e minerais (cálcio, magnésio, cobre, potássio, selênio e zinco) (SABATÉ et al., 2000; FERRARA et al., 2000; MYERS, 2007).

A baixa incidência de doenças em alguns povos chamou a atenção dos cientistas que passaram a investigar a dieta e modo de vida. Os esquimós, com alimentação baseada em peixes e produtos do mar ricos em ácidos graxos poli-insaturados das famílias ômega 3 e 6, têm baixo índice de problemas cardíacos, assim como os franceses, devido ao consumo de vinho tinto, o qual apresenta grande quantidade de compostos fenólicos. Os asiáticos, devido ao consumo de soja, que contém fitosteróis, apresentam baixa incidência de câncer de mama. Nesses países, o costume de consumir frutas e verduras também resulta numa redução do risco de doenças coronarianas e de câncer, comprovada por dados epidemiológicos (ANJO, 2004).

Os alimentos funcionais fazem parte de uma nova concepção de alimentos, lançada pelo Japão na década de 80, através de um programa de governo que tinha como objetivo desenvolver alimentos saudáveis para uma população que envelhecia e apresentava uma grande expectativa de vida (ANJO, 2004).

Os alimentos funcionais devem apresentar propriedades benéficas além das nutricionais básicas, sendo apresentados na forma de alimentos comuns. São consumidos em dietas convencionais, mas demonstram capacidade de regular funções corporais de forma a auxiliar na proteção contra diversas doenças como hipertensão, diabetes, câncer, osteoporose e coronariopatias (SOUZA et al., 2003).

Nas últimas décadas, tem-se assistido a um interesse crescente neste tipo de alimento, principalmente devido aos resultados de estudos epidemiológicos prospectivos, os quais sugerem que o consumo freqüente de frutos secos pode ter efeitos benéficos para a saúde humana. O primeiro estudo realizado, denominado "The Adventist Health Study", foi desenvolvido numa comunidade religiosa da Califórnia, envolvendo a participação de mais de 31 mil pessoas durante um período de seis anos (FRASER et al., 1992; SABATÉ, 1999). Essa comunidade apresentava a particularidade de ser muito cuidadosa com a dieta e a saúde, sendo que a maioria dos seus membros não consumia tabaco nem álcool, e fazia uma dieta equilibrada, na qual se incluía o consumo freqüente de sementes oleaginosas. Os resultados obtidos sugeriram que o consumo de sementes oleaginosas estava inversamente relacionado com o risco de sofrer enfarte agudo do miocárdio ou de morrer devido a doenças cardiovasculares (DCV). Em estudos subseqüentes, conduzidos na mesma população, verificou-se que as pessoas que comiam frutos secos 5 ou mais vezes por semana apresentavam uma redução de 12% no risco de desenvolver DCV (FRASER et al., 1995). Esses dados pareciam indicar não somente uma proteção contra DCV devido ao consumo de frutos secos, como também um acréscimo de longevidade para aqueles que desenvolviam DCV, uma vez que essas doenças tinham tendência a manifestar-se mais tardiamente.

Outros estudos foram realizados, tendo-se obtido resultados semelhantes, nomeadamente o "Iowa Women's Health Study" (KUSHI et al., 1996), no qual cerca de 34 mil mulheres, com idades compreendidas entre 55 e 69 anos, foram acompanhados durante um período de 7 anos. O "Nurses' Health Study" (HU et al., 1998), analisando cerca de 86 mil enfermeiras durante um período de 14 anos e o "Physicians Health Study" (ALBERT et al., 2002), envolvendo cerca de 22 mil médicos do sexo masculino durante um período de 12 anos. Os resultados obtidos com os estudos epidemiológicos estimularam a realização de diversos estudos clínicos. Foram, então, realizados vários estudos envolvendo o consumo de diversas sementes oleaginosas. Todos eles demonstraram a redução dos níveis de

colesterol total e colesterol-LDL (lipoproteína de baixa densidade), embora os resultados não tenham sido unânimes relativamente aos resultados obtidos para o colesterol-HDL (lipoproteína de alta densidade) e triglicerídeos. Dentre as oleaginosas estudadas o maior número de estudos clínicos foi feito a partir de frutos secos (SABATÉ et al., 1993; CHISHOLM et al., 1998; ZAMBON, et al., 2000; ALMARIO et al., 2001; IWAMOTO et al., 2002; MORGAN et al., 2002).

Devido ao elevado teor em lipídios, o consumo de sementes oleaginosas foi associado ao aumento de peso corporal e, por este motivo, freqüentemente banido das dietas. No entanto, os estudos mais recentes parecem demonstrar que essa idéia não é correta. Em estudos epidemiológicos, as pessoas habitualmente consumidoras de frutos secos apresentam índices de massa corporal tendencialmente mais baixos (FRASER et al., 1992; HU et al., 1998). Em estudos clínicos também verificou-se a ausência de aumento de peso (SABATÉ et al., 1993; IWAMATO et al., 2002; GARCÍA-LORDA et al., 2003; SABATÉ, 2003). E em outros estudos verificou-se uma tendência para perda de peso (ABBEY et al., 1994; CHISHOLM et al., 1998; ZAMBÓN et al., 2000), que em alguns casos foi mesmo significativa (SABATÉ, 2003). Foram sugeridas várias hipóteses que pudessem explicar este fato: a incompleta absorção dos lipídeos presentes nos frutos secos, o efeito de saciedade e a adaptação do metabolismo de forma a que mais energia seja consumida, evitando a acumulação de gordura (SABATÉ, 2003).

2. 2 Vitamina E

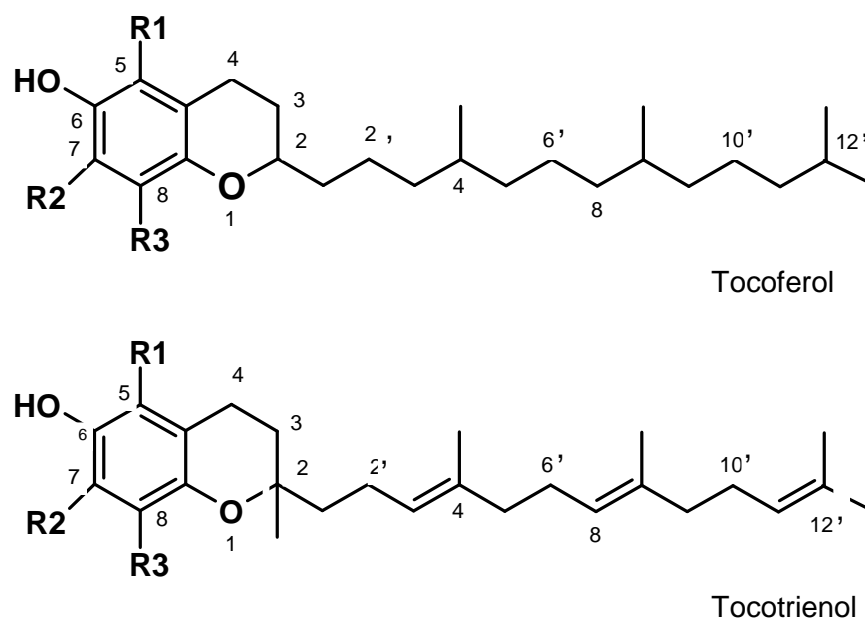
A vitamina E foi descoberta em 1922, em folhas verdes de hortaliças por pesquisadores da Universidade da Califórnia, como sendo um fator nutricional lipossolúvel que prevenia a morte e reabsorção de fetos em ratas grávidas (EVANS e BISHOP, 1922; EVANS et al., 1922). Em 1924, nomeou-se vitamina E (SURE, 1924) e em 1936, foi descoberto que a vitamina E é abundante em óleo de germen de trigo, ficando cientificamente denominado tocoferol, a partir da palavra grega “tokos”, que significa parto, “phero”, um verbo que significa trazer à luz, e o “ol” final foi adicionado para indicar a função do álcool dessa substância (EVANS et al., 1936).

Dois anos mais tarde, foi realizada a síntese química pela primeira vez nos Estados Unidos da América, pelo “National Research Council”, que patrocinou os estudos sobre as deficiências de vitamina E, que com base nos resultados obtidos, foi designada como uma vitamina essencial. A vitamina E passou a ser considerada um nutriente essencial solúvel em lipídios, que funciona como um antioxidante no corpo humano. É essencial porque o corpo não pode fabricar a sua própria vitamina E, sendo retirada dos alimentos e suplementos que possuem o composto. Desde a elucidação da estrutura química da vitamina E, em 1938, por Fehholz, e a síntese de α -tocoferol por Karrer no mesmo ano, muita atenção foi dirigida para essa classe química de compostos naturais e seu beneficiamento (FERNHOLZ, 1938; COHN, 1975).

O termo “vitamina E” ou tocois é utilizado para referir um grupo de compostos estruturalmente relacionados entre si, os tocoferóis e os tocotrienóis, que apresentam o 2-metil-6-cromanol como base estrutural sendo, por este motivo, muitas vezes designados coletivamente como tococromanois. Na natureza, existem quatro tocoferóis (α -T, β -T, γ -T e δ -T) e quatro tocotrienóis (α -T₃, β -T₃, γ -T₃ e δ -T₃), em ambos os casos designados por α -, β -, γ - e δ - (TASÍOULA-MARGARI e OKOGER, 2001; PEREIRA et al., 2002), diferindo entre si pelo número e posição dos grupos metila no anel aromático (Figura 1).

O grupo dos tocotrienóis distingue-se dos tocoferóis pela presença de três insaturações na cadeia lateral. Os tocoferóis apresentam três centros quirais nas posições 2, 4' e 8' sendo por isso possível a ocorrência de oito estereoisômeros. Os tocotrienóis apresentam apenas um centro quiral, na posição 2, permitindo a ocorrência de dois estereoisômeros, existindo na natureza apenas a forma *2R-3'-trans-7'-trans* (NELIS et al., 2000).

Em várias espécies de animais foram referidas manifestações associadas à deficiência em vitamina E, tais como atrofia testicular, lesões do sistema nervoso central e distrofia muscular (BRAMLEY et al., 2000), anemia hemolítica (NELIS et al., 2000), morte fetal e infertilidade, desordens renais e hepáticas e até mesmo câncer (TADMOR et al., 2000).



| COMPOSTO | R1 | R2 | R3 |
|----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| α | CH ₃ | CH ₃ | CH ₃ |
| β | CH ₃ | H | CH ₃ |
| γ | H | CH ₃ | CH ₃ |
| δ | H | H | CH ₃ |

Figura 1. Estrutura dos tocoferois e tocotrienóis.

Em humanos, excetuando os casos de bebês prematuros e de desordens específicas em nível da absorção de lipídios e/ou vitamina E, é pouco frequente a observação de sintomas associados a dietas deficitárias nessa vitamina, uma vez que é difícil atingir o estado de depleção das reservas do organismo (BRAMLEY et al., 2000; NELIS et al., 2000; JOHNSON et al., 2001). No entanto, níveis baixos de vitamina E podem afetar o sistema imune e nervoso e estão freqüentemente associados com infecções e anemias (NOGALA-KALUCKA, 2002).

A teoria de que espécies reativas, como é o caso dos radicais livres, poderão estar envolvidas no desenvolvimento de processos degenerativos e relacionadas com o envelhecimento e o câncer (CAMPBELL et al., 2003; MISHIMA et al., 2003; THERIAULT et al., 2003), originou um crescente interesse no estudo dos antioxidantes em geral e da vitamina E em particular. Desta forma, começou a ganhar corpo a idéia de que os antioxidantes presentes nos alimentos, além de contribuírem para a sua preservação, poderiam, após ingestão, atuar

beneficamente no organismo (WARNER e FRANKEL, 1987). Nos últimos anos, os estudos realizados têm sido muitos e abrangendo variadas vertentes. Têm sido conduzidos estudos epidemiológicos e clínicos, no sentido de estudar o papel desempenhado por estes tipos de compostos no organismo, bem como as conseqüências da sua suplementação.

Na forma pura, esses compostos apresentam-se como óleos viscosos, sendo sensíveis a luz, oxigênio, metais e soluções alcalinas. São insolúveis em água e facilmente solúveis em solventes orgânicos e óleos vegetais (BRAMLEY et al., 2000).

Devido às propriedades antioxidantes e solubilidade em lipídios, esses compostos inibem os processos de peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados e outros compostos nas membranas celulares (FRYER, 1992; ABIDI, 2000).

A vitamina E atua na proteção de ácidos graxos poli-insaturados contra a deteriorização oxidativa dos óleos (BOZAN e TEMELLI, 2008). A vitamina E é também utilizada na indústria química, como aditivo para alimentos e cosméticos (HESS, 1993; ESKIN et al., 1996).

A atividade biológica da vitamina E é definida pela sua influência em sintomatologias associadas à deficiência nutricional, sendo avaliada pelo teste de reabsorção fetal em ratos (BRAMLEY et al., 2000; RUPÉREZ et al., 2001). A atividade antioxidante dos tocoferóis tem sido estudada, sendo explicada quimicamente pela presença de um grupo hidroxila no anel aromático, permitindo a doação de um átomo de hidrogênio a um radical livre (JOHNSON et al., 2001; HALL, 2001).

Os isômeros da vitamina E distribuem-se de forma diferenciada nos órgãos vegetais, sendo o α -tocoferol o que predomina em folhas de vegetais e nas membranas dos tilacóides, enquanto o γ -tocoferol é a forma majoritária presente nas sementes (GRUSAK e DELLAPENNA, 1999).

Além de atuarem como antioxidantes fisiológicos, protegendo os ácidos graxos poli-insaturados e outros compostos de serem oxidados (SHAHIDI e SHUKLA, 1996), têm sido realizados vários estudos incidindo em diferentes propriedades potencialmente benéficas dos tocoferóis e tocotrienóis.

A principal função do α -tocoferol é a de antioxidante de radicais livres em membranas e lipoproteínas, bem como nos alimentos (KAMAL-ELDIN e APPELQVIST, 1996). Por isso, acredita-se que esses compostos reduzem o risco

de doenças cardiovasculares e de certos tipos de câncer (BURTON e TRABER, 1990; BURTON, 1994).

O γ -T, por exemplo, tem sido relatado como o mais potente tocoferol, diminuindo a agregação plaquetária, a oxidação de LDL e retardando a formação de trombo intra-arterial (LI et al., 1999; SALDEEN et al., 1999). Os tocotrienóis também têm sido relatados como fatores inibidores da biossíntese do colesterol (QURESHI et al. 1995) e relacionados à redução do risco do câncer de mama (SCHWENKE, 2002).

Ao contrário dos vegetais e de alguns microrganismos fotossintetizantes, os animais (humanos incluídos) são incapazes de biossintetizar esses compostos, tendo que adquiri-los pela alimentação. Os óleos vegetais e seus derivados são as fontes principais de vitamina E na dieta, sendo também importantes os frutos secos e os cereais, não somente pelo seu elevado teor, mas também pela diversidade de Vitamina E que apresentam na sua composição (Tabela 1). Os frutos e legumes são igualmente fontes importantes, não pelo teor nesses compostos, mas pelo elevado consumo (BRAMLEY et al., 2000 e ESKIN e PRZYBYLSKI, 2001).

Os alimentos referidos, além de apresentarem diferentes teores de vitamina E, diferem ainda na presença dos isômeros e nas proporções que estes se apresentam entre si. Nos países Mediterrâneos, o isômero de maior consumo é o α -tocoferol, devido ao elevado consumo de azeite de oliva (PSOMIADOU e TSIMIDOU, 1998; GIMENO et al., 2000). Por outro lado, na dieta Norte Americana verifica-se, sobretudo o consumo de alimentos ricos em γ -tocoferol, principalmente devido ao óleo de soja e seus derivados, tais como margarinas, maionese e molhos de saladas (CAMPBELL et al., 2003).

Refere-se ainda, que os tocoferóis encontram-se na maioria dos óleos vegetais, mesmo nos que foram sujeitos ao refinamento. Já os tocotrienóis existem em teores reduzidos na maioria dos óleos vegetais (com exceção do óleo de dendê), apresentando elevados teores, sobretudo, nos cereais (BELITZ, 2004).

Tabela 1. Teor de Vitamina E em diversos alimentos (mg/100 g). Modificado de Bramley et al.(2000) e de Eskin e Przybylski (2001).

| Alimento | Tocoferóis | | | | Tocotrienóis | | | |
|-------------------------|--|------------------------------------|--|---------------------------------------|--|------------------------------------|-------------------|------------------|
| | α | β | γ | δ | α | β | γ | δ |
| Óleos | | | | | | | | |
| Girassol ^{a,b} | 48,7 ^a , 100,0 ^b | - | 0,5 ^b , 5,1 ^a | 0,1 ^b , 0,8 ^a | - | - | - | - |
| Dendê ^{a,b} | 25,6 ^a , 27,9 ^b | - | 31,6 ^a 6,1 ^b , | nd ^b , 7,0 ^a | 14,6 ^a , 27,4 ^b | nd ^b , 3,2 ^a | 39,8 ^b | 6,9 ^b |
| Milho ^a | 11,2 | 5,0 | 60,2 | 1,8 | - | - | - | - |
| Oliva ^a | 11,9 | - | 0,7 | - | - | - | - | - |
| Gergelim ^a | 13,6 | - | 29,0 | - | - | - | * | * |
| Soja ^{a,b} | 7,5 ^a , 10,1 ^b | nd ^b , 1,5 ^a | 79,7 ^a 59,3 ^b , | 26,4 ^b , 26,6 ^a | nd ^b , 0,2 ^a | nd ^b , 0,1 ^a | - | - |
| Cereais | | | | | | | | |
| Arroz | 0,3 | - | 0,3 | 0,04 | 0,5 | - | * | * |
| Aveia ^{a,b} | 0,5 | - | - | - | 1,1 | 0,2 | - | - |
| Centeio | nd ^a , 0,2 ^b | 0,04, 0, 4 ^b | nd ^b , 0, 03 | 0,01, 0,1 ^b | 1,1 ^b | 0,3 ^b | 0,2 ^b | * |
| Trigo ^{a,b} | 1,0 ^a , 1,4 ^b | 0,7 ^{a,b} | - | - | 0,4 ^a , 3,3 ^b | 2,8 ^a , nd ^b | * | * |
| Frutos secos | | | | | | | | |
| Amêndoa ^a | 45,2 | 0,3 | 1,9 | 0,1 | 0,2 | - | * | * |
| Amendoim ^a | 11,4 | - | 8,4 | - | - | - | * | * |
| Avelã ^a | 21,5 | - | 0,1 | 0,01 | - | - | * | * |
| Caju ^a | 11,0 | - | 5,1 | 2,6 | - | - | * | * |

^a Bramley et al. (2000), * teores não referidos; ^b Eskin e Przybylski (2001); *: não referido na bibliografia; -: referido na bibliografia como não detectado.

Em 1989, nos Estados Unidos da América (EUA), a dose diária recomendada (RDA, Recommended Daily Allowance) de vitamina E para adultos era de 8 mg para as mulheres e 10 mg para os homens. Em 2000 esses valores foram atualizados, designando-se agora por DRI (Dietary Reference Intakes), sendo o seu valor de 15 mg /dia, quer para homens quer para mulheres (DELLAPENNA, 2005). De acordo com o “Scientific Committee on Food” (SCF, 2003), as recomendações relativas às necessidades diárias em vitamina E deverão ter em consideração a ingestão de ácido graxo poli-insaturado (AGPI), sendo recomendado o consumo diário de 0,4 mg de vitamina E por grama de AGPI.

Comparando os dados provenientes de diversos estudos realizados num total de seis países Europeus (Alemanha, Áustria, Holanda, Itália, Irlanda e Reino Unido), a estimativa do consumo de vitamina E (mg/g dia) variou entre 7,2 no Reino Unido (1110 mulheres) e 14,6 na Alemanha (854 homens) (SCF, 2003).

Devido à atividade antioxidativa de alimentos ricos em gorduras e óleo, a vitamina E encontra largo uso na indústria, sendo importante para aumentar o tempo de vida de prateleira de produtos alimentícios (BELITZ et al., 2004).

2.3 Fitosteróis

Fitosteróis são bioativos sintetizados a partir da via biossintética dos isoprenóides, ocorrendo apenas no citoplasma dos vegetais (BENVENISTE, 2002) não podendo ser sintetizados no corpo humano (LÓPES-ORTÍZ et al., 2006). Diferem do colesterol essencialmente na cadeia lateral em C17 (Figura 2). De forma geral, contêm um total de 28 ou 29 átomos de carbono e uma ou duas ligações duplas (Figura 2). A maioria dos fitosteróis apresenta uma ligação dupla entre C5 e C6, designando-se Δ^5 -fitosteróis, ou entre C7 e C8, designando-se neste caso por Δ^7 -fitosteróis (PIIRONEN et al., 2000; MOREAU et al., 2002; SCHWARTZ et al., 2008). Quando estes compostos se apresentam na sua forma saturada, denominam-se estanois, um subgrupo dos fitosteróis, menos abundantes na natureza do que os fitosteróis (NAIR et al., 2006).

Os fitosteróis podem ser divididos em três grupos principais, segundo o número de grupos metilas em C4: 4,4-dimetil (2 grupos), 4- α -metil (um grupo) ou 4-desmetil (nenhum grupo). Os 4,4-dimetil e 4-metilesteróis são precursores biossintéticos de outros esteróis e, por esta razão, via de regra, existem em quantidades muito inferiores às dos 4-desmetilesteróis (PIIRONEN et al., 2000).

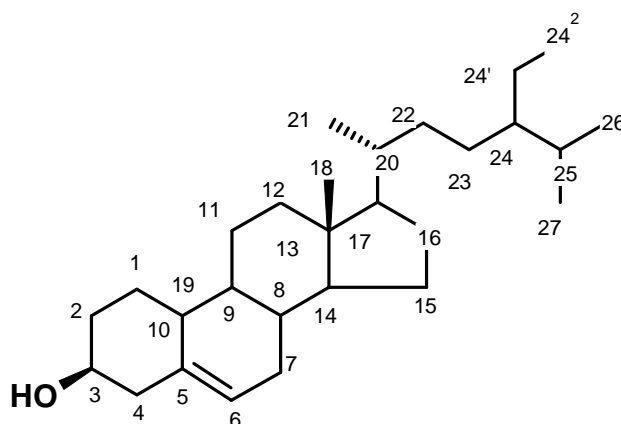


Figura 2. Estrutura do β -sitosterol, evidenciando a numeração usada em fitosteróis.

Os fitosteróis podem existir como esteróis livres (na forma de álcool) ou podem estabelecer ligações éster, através da hidroxila existente em C3, com ácido graxo, açúcares ou, mais raramente, com ácidos hidroxicinâmicos (PHILLIPS et al., 2002). No entanto, ocorrem geralmente na forma livre ou esterificada com ácido graxo, sendo a ocorrência das outras formas de menor significado, à exceção do que acontece em certos alimentos, como os cereais, que podem apresentar teores consideráveis de esteróis glicosilados (MÄÄTTÄ et al., 1999). No caso particular dos óleos vegetais, uma das fontes principais destes compostos na dieta ocorre na forma livre ou esterificada com ácidos graxos, em especial com os ácidos oléico ou linoleico (PIIRONEN et al., 2000).

Mais de 250 diferentes fitosteróis e compostos relacionados foram identificados em vários vegetais e organismos marinhos (BRUFAU et al., 2008). Os encontrados com mais abundância são o β -sitosterol, o campesterol e o estigmasterol (MOREAU et al., 2002; BERGER et al., 2004; KRITCHEVSKY e CHEN, 2005). Outros relevantes fitosteróis que podem ser encontrados em menores quantidades são brassicasterol, Δ^5 sitoestanol e campestanol (PHILLIPS et al., 2002).

Foi na década de 50 que, pela primeira vez, foram descritas as propriedades hipocolesterolêmicas dos fitosteróis. Em 1953, um estudo abrangendo 26 pessoas saudáveis ingerindo doses diárias de 5 a 10 g/dia de fitosteróis, durante duas semanas, revelou a redução dos níveis de colesterol plasmático em cerca de 28%, demonstrando-se que os fitosteróis poderiam contribuir de forma eficaz para a redução do colesterol (KRITCHEVSKY e CHEN, 2005), chegando mesmo a ser utilizados em nível farmacológico. Porém, na década de 70, o interesse por esses compostos diminuiu, devido à obtenção de resultados inconsistentes em estudos clínicos (MOREAU et al., 2002). Mais tarde, os resultados controversos viriam a ser explicados pela pouca solubilidade e conseqüente baixa biodisponibilidade dos fitosteróis usados em alguns dos estudos (AMARAL, 2006).

Na Figura 3 estão representadas as estruturas de alguns fitosteróis.

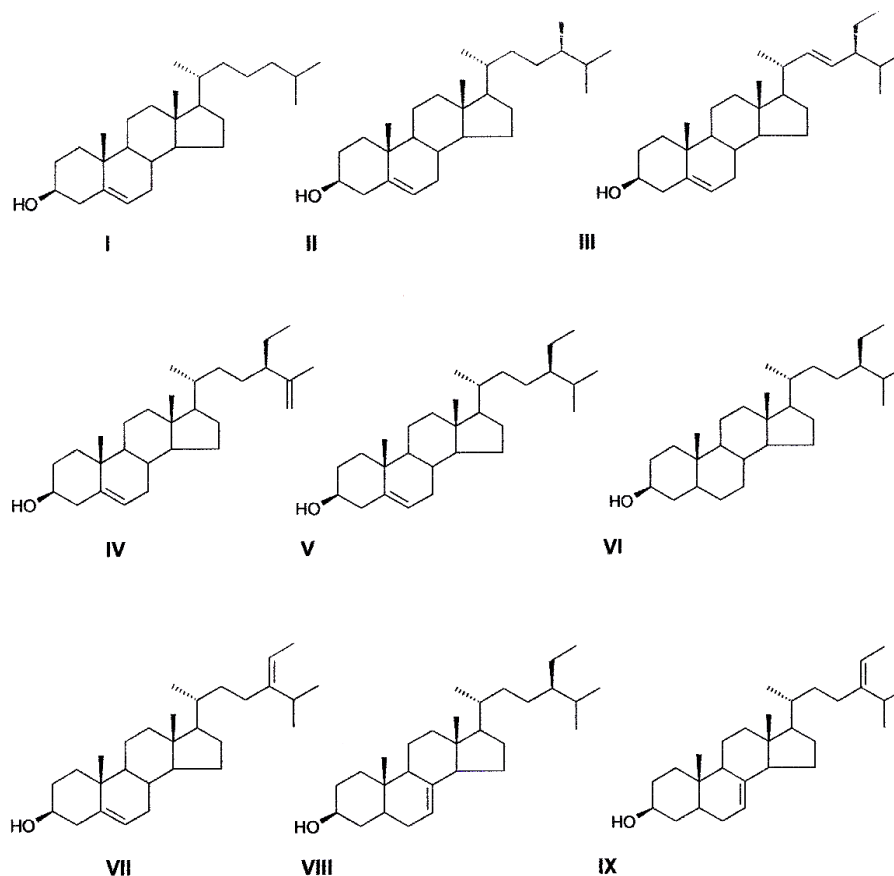


Figura 3. Estruturas dos fitosteróis. I: colesterol; II: campesterol; III: estigmasterol; IV: clerosterol; V: β -sitosterol; VI: β -sitostanol; VII: Δ^5 -avenasterol; VIII: Δ^7 -stigmastanol; IX: Δ^7 -avenasterol.

Durante alguns anos, o consumo de fitosteróis foi considerado de pouco interesse prático, tendo quase caído no esquecimento. Contudo, à medida que novos dados foram surgindo, não só referentes à sua ação, mas também relativamente à sua presença em quantidades apreciáveis em diversos alimentos, começou a crescer o interesse por esses compostos, bem como pelos alimentos que os contêm. Na década de 90, surgiu a idéia de que, além do consumo de fitosteróis naturalmente presentes na dieta, se poderia utilizar alimentos intencionalmente suplementados como modo de administração desses compostos, surgindo em 1995 o primeiro produto suplementado com ésteres de estanois à venda no mercado (KRITCHEVSKY e CHEN, 2005).

Atualmente, continua a se observar um interesse crescente em vários tipos de produtos alimentares funcionais, tais como iogurtes e leite com adição de fitosteróis que já estão disponíveis no mercado (LAGARDA et al., 2006). Uma vez

que, para a maioria dos consumidores, é uma forma mais prática e saudável consumi-los do que o uso de medicamentos ou a adesão à dietas especiais.

Esteróis vegetais estão geralmente distribuídos em meio gorduroso e à medida que se aumenta a sua solubilidade melhora a sua absorção. A maioria dos estudos tem usado margarinas e maioneses como fonte de esteróis vegetais, entretanto outras fontes de gorduras funcionais podem ser consideradas (RUDKOWSKA et al., 2006).

Os compostos utilizados para enriquecimento de produtos alimentares funcionais e uso em grande escala provêm principalmente de duas matérias prima, processo de desodorização de óleos vegetais, obtidos de subprodutos como a fibra de milho e soja, e do “tall-oil” (fração lipofílica do hidrolisado obtido durante o processo de polpagem das árvores durante a extração da celulose) (MOGHADASIAN, 2000; COSS et al., 2000; HAYES et al., 2002; QUILEZ et al., 2003).

Vários estudos, experimentais e epidemiológicos, têm relacionado os fitosteróis com uma possível ação anticancerígena (LING e JONES, 1995; MOGHADASIAN e FROHLICH, 1999; MOREAU et al., 2002; QUILEZ et al., 2003, CANABATE-DÍAZ et al., 2007). Em alguns desses estudos, foi sugerido que os fitosteróis poderiam atuar como protetores contra os câncer do cólon, mama e próstata (QUILEZ et al., 2003), e na redução da colesterolemia, por diminuírem a absorção do colesterol alimentar. A ingestão de 3 g a 4 g/dia de fitosteróis promove a redução do nível de LDL-colesterol entre 10 a 15% em média (SANTOS, 2007), mostrando que consumo freqüente de sementes ou de óleo com fitosteróis são benéficos para a saúde humana pela sua ação antioxidativa (SALDEEN e SALDEEN, 2005; KRITCHEVSKY e CHEN, 2005; CUNHA et al., 2006).

Foram também descritas propriedades anti-inflamatórias, funções imunomodeladoras e atividade antioxidante (MOREAU et al., 2002) para esses compostos (QUILEZ et al., 2003). Há ainda estudos que reportam que os fitosteróis que contêm um grupo etilideno em C24, à semelhança do Δ^5 -avenasterol (Figura 3) possuem propriedades antioxidantes e antipolimerizantes, que poderão ser mais uma propriedade importante para o processamento de alimentos (AKINTAYO, 2004).

Os fitosteróis são constituintes minoritários dos óleos vegetais (HARRABI et al., 2008) e de cereais, frutos secos e diversas frutas e legumes, sendo os três primeiros alimentos considerados como fontes naturais mais ricas nestes compostos (PIIRONEN et al., 2000).

Os teores totais de fitosteróis são muito variáveis, atingindo valores bastante elevados em óleos vegetais (Tabela 2.), como por exemplo, no óleo de milho (1364,7 até 2215,0 mg/100 g) e valores inferiores em determinados frutos e hortaliças (como por exemplo, 3,8 mg/100 g, na batata) (FIRESTONE e REINA, 1996; PIIRONEN et al., 2000; BELITZ et al., 2004). No entanto, cada espécie vegetal é caracterizada por proporções relativamente constantes entre os vários fitosteróis, proporções essas que podem ser influenciadas por fatores genéticos, mas também por fatores agrônômicos e climáticos (PIIRONEN et al., 2000), dando a esses compostos o poder de autenticidade dos óleos (CRANE et al., 2005).

Tabela 2. Conteúdo médio de fitosteróis em óleos vegetais (mg/100 g de óleo).

| Oleaginosas | | | | | | | |
|-------------------------------|----------|----------|-------|---------|--------|-------|-------|
| Fitosteróis | Girassol | Amendoim | Soja | Algodão | Milho | Oliva | Dendê |
| Colesterol | 0,05 | 0,62 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| Brassicasterol | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| Campesterol | 24,2 | 27,8 | 56,3 | 27,6 | 265,5 | 1,9 | 8,8 |
| Estigmasterol | 23,6 | 14,5 | 56,4 | 1,7 | 49,9 | 0,05 | 4,2 |
| β -sitosterol | 196,1 | 114,5 | 131,7 | 334,8 | 918,7 | 73,2 | 25,2 |
| Δ^5 -Avenasterol | 16,3 | 25,3 | 4,6 | 8,5 | 68,2 | 7,8 | 0,05 |
| Δ^7 - Estigmasterol | 29,8 | 0,5 | 9,2 | 0,05 | 9,6 | 0,05 | 5,1 |
| Δ^7 -Avenasterol | 9,9 | 3,4 | 6,3 | 1,8 | 10,2 | 3,0 | 0,05 |
| 24-Metileno- cicloartenol | 20,4 | 0,05 | 5,3 | 0,5 | 42,5 | 58,0 | 0,05 |
| Total | 320,4 | 186,27 | 269,9 | 37,46 | 1364,7 | 144,1 | 43,5 |

Fonte: Modificado de Belitz et al. (2004).

Vários estudos têm sido realizados sobre as estimativas médias do consumo de fitosteróis, em dietas britânicas (contendo em média 158 mg/dia de fitosteróis), em dietas vegetarianas escandinavas (em média 513 mg/dia), em dietas japonesas (em média 373 mg/dia) e em dietas gregas (cerca de 358 mg/dia) (FDA, 2000). Relativamente à população americana, existem estudos sobre dietas de

trabalhadores ferroviários (cerca de 170 mg/dia) e sobre habitantes de uma área de Los Angeles (78 mg/dia, aumentando para 344 mg/dia em grupos lacto-vegetarianos) (DE VRIES et al., 1997).

Os valores mais freqüentemente encontrados na literatura referentes às dietas ocidentais, correspondem ao consumo médio que varia entre 170 mg/dia (DE VRIES et al., 1997) e 250 mg/dia (MOREAU et al., 2002). Os estanois, regra geral, existem em muito menor quantidade nos alimentos e conseqüentemente os teores consumidos são menores, estimando-se um consumo de 20 a 50 mg/dia nas dietas ocidentais (FDA, 2000). Saliente-se que todos os valores citados são estimativas que dependem muito dos hábitos alimentares das diferentes populações.

Atualmente encontram-se publicados artigos onde é feita a revisão dos vários estudos clínicos realizados com fitosteróis (LING e JONES, 1995; MOGHADASIAN e FROHLICH, 1999; MOREAU et al., 2002; QUÍLEZ et al., 2003), e todos eles são unânimes em confirmar os resultados que demonstram a eficácia dos fitosteróis na redução dos níveis de colesterol total e LDL (lipoproteínas de baixa densidade), sem afetar os níveis das partículas HDL (lipoproteínas de alta densidade) e dos triglicerídeos, fazendo com que as indústria tenham o objetivo de identificar matrizes vegetais ricas em Fitosteróis (HARRABI et al., 2008).

Além disso, as análises dos fitosteróis proporcionam ricas informações sobre a qualidade e a identidade dos óleos investigados, e também para a identificação de óleos e misturas não reconhecidas pelo perfil de ácidos graxos (LERCKER e RODRIGUEZ-ESTRADA, 2000).

Segundo Kamm et al. (2001) os fitosteróis podem ser úteis como indicadores de maturação de determinados frutos. Outros trabalhos referem o seu uso como indicadores de determinados processamentos, como é o caso da refinação de óleos vegetais, pois apesar de serem relativamente estáveis ao calor, às temperaturas atingidas durante o processo podem afetar a sua composição e o seu teor total (FIRESTONE e REINA, 1996).

Também o perfil qualitativo e a proporção dos diferentes compostos apresentam variações entre os diferentes óleos vegetais. Dessa forma, o perfil qualitativo e quantitativo dos fitosteróis pode ser útil como fator para identificar diversos óleos vegetais (ABIDI, 2001), auxiliando na detecção de adulterações. Por exemplo, o azeite de Oliva, caracterizado por elevados teores de β -sitosterol e

baixos teores de campesterol e de estigmasterol, é alvo de frequentes adulterações devido ao seu elevado valor econômico. Os fitosteróis ainda são usados nas indústrias de cosméticos para fabricação de cremes e batons (FERNANDES e CABRAL, 2007).

Por fim, são relatados casos de doentes fitosterolêmicos que representam um caso específico. A fitosterolemia ou sitosterolemia é uma doença autossômica recessiva muito rara, caracterizada pela elevada absorção e diminuta excreção de Fitosteróis, resultando em concentrações plasmáticas muito elevadas (MOGHADASIAN e FROHLICH, 1999; KRITCHEVSKY e CHEN, 2005). Estão associados a esta doença episódios hemolíticos, xantomas e arteriosclerose acelerada. Dessa forma os doentes sitosterolêmicos deverão ter cuidados redobrados com a sua alimentação e deverão evitar os produtos suplementados com fitosteróis.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBEY, M.; NOAKES, M.; BELLING, G.B.; NESTEL, P.J. Partial replacement of saturated fatty acids with almonds or walnuts lowers total plasma cholesterol and low-density-lipoprotein cholesterol. **American Journal of Clinical Nutrition**. 59, 995-999. 1994.

ABIDI, S. L. Review: Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. **Journal of Chromatography A**, 881, 197-205, 2000.

ABIDI, S.L. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. **Journal of Chromatography A**, 935, 173–201. 2001.

ADHIKARI, P., HWANG, K. T., SHIN, M. K., LEE, B. K., KIM, S. K., KIM, S. Y., LEE, K., KIM, S. Z. Tocols in caneberry seed oils. **Food Chemistry**, 111, 687–690. 2008.

AKINTAYO, E.T. Characteristics and composition of *Parkia biglobbosa* and *Jatropha curcas* oils and cakes. **Bioresource Technology**, 92, 307-310. 2004.

ALBERT, C.M.; GAZIANO, M.; WILLETT; W.C., MANSON; J.E. Nut consumption and decreased risk of sudden cardiac death in the physician's health study. **Archives of Internal Medicine**, 162, 1382-1387. 2002.

ALMARIO, R.U.; VONGHAVARAVAT, V.; WONG, R.; KASIM-KARAKAS, S.E. Effects of walnut consumption on plasma fatty acids and lipoproteins in combined hyperlipidemia. **American Journal of Clinical Nutrition**, 74, 72-79. 2001.

AMARAL, J. S., CASAL, S., PEREIRA, J. A., SEABRA, R. M. A., OLIVEIRA, B. P. P. Determination of Sterol and Fatty Acid Compositions, Oxidative Stability, and Nutritional Value of Six Walnut (*Juglans regia* L.) Cultivars Grown in Portugal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 7698-7702, 2003.

AMARAL, J. A. S. **Contribuição para a caracterização química das folhas e sementes de avelã (*Coryllus avellana* L.) e de noz (*Juglans regia* L.)**. Tese (Doutorado em Bromatologia), Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 2006.

ANDRADE, E. H.A., MAIA, J. G.S., STREICH, R., MARX, F. Seed of Amazonian Lecythidaceae Species: Part 3 in the Series "Studies of Edible Amazonian Plants". **Journal of Food Composition and Analysis**, 12, 37-51. 1999.

ANJO, D. L. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, 3, 145- 154, 2004.

AZZI, A., STOCKER, A. Vitamin E: non-antioxidant roles. **Progress in Lipid Research**, 39, 231-255. 2000.

BELITZ, H-D., GROSCH, W., SCHIEBERLE, P. **Lipids**. In: Food Chemistry. 3rd rev.ed.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, 231-232. 2004.

BENVENISTE, P. **Sterol metabolism**. In E. M. Meyerowitz, C. Somerville(Eds.), The Arabidopsis book (pp. 1–31). American Society of Plant Biologists. 2002.

BERGER, A., JONES, P.J.H., ABUMWEIS, S.S. Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. **Lipids Health Dis**. 3, 5–23. 2004.

BOZAN, B., TEMELLI, F. Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. **Bioresource Technology**, 99, 6354–6359. 2008.

BRAMLEY, P.M., ELMADFA, I., KAFATOS, A., KELLY, F.J., MANIOS, Y., ROXBOROUGH, H.E., SCHUCH, W., SHEEHY, P.J.A., WAGNER, K.H. Review: Vitamin E. **Journal of the Science of Food and Agriculture** , 80, 913-938. 2000.

BRUFAU, G., CANELA, M. A., RAFECAS, M. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. **Nutrition Research**, 28, 217–225. 2008.

BURTON, G.W. Vitamin E: molecular and biological function. **Proceedings of the Nutrition Society**, 53, 251–262. 1994.

BURTON, G.W., TRABER, M.G. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. **Annual Review of Nutrition**, 10, 357–382. 1990.

CAMPBELL, S., STONE, W., WHALEY, S., KRISHNAN, K. Development of gamma (g)-tocopherol as a colorectal cancer chemopreventive agent. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, 47, 249-259. 2003.

CANABATE-DÍAZ, B., SEGURA CARRETERO, A., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A., BELMONTE VEGA, A., GARRIDO FRENICH, A., MARTÍNEZ VIDAL, J. L. Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC–MS. **Food Chemistry**, 102, 593–598. 2007.

CHISHOLM, A., MANN, J., SKEAFF, M., FRAMPTON, C., SUTHERLAND, W., DUNCAN A., TISZAVARI S. A diet rich in walnuts favourably influences plasma fatty acid profile in moderately hyperlipidaemic subjects. **European Journal of Clinical Nutrition**, 52, 12-16. 1998.

COHN, V.H. Fat-soluble vitamins: Vitamin K and vitamin E, in Goodman LS, Gilman A (ed): *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, ed 5. New York, Macmillan Publishing Co Inc, 1975, 1591-1600.

CRANE, S., AURORE, G., JOSEPH, H., MOULOUNGUI, Z., BOURGEOIS, P. Composition of fatty acids triacylglycerols and unsaponifiable matter in *Calophyllum calaba* L. oil from Guadeloupe. **Phytochemistry**, 66, 1825–1831. 2005.

COSS, J.L., KUTNEY, J.P., MILANOVA, R.K., JOLLEZ, P., Process of purifying phytosterols from woody or plant-derived sources and compositions resulting therefrom. WO0064921. 2000.

CUNHA, S.C.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Discrimination of vegetable oils by triacylglycerols evaluation of profile using HPLC/ELSD. **Food Chemistry**, 2006, 95, 518-524.

DELLAPENNA, D. A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants. **Journal Plant Physiology**, 2005, 162, 729-737.

DEVRIES, J.H.M., JANSEN, A., KROMHOUT, D., VAN DE BOVENKAMP, P., VAN STAVEREN, W.A., MENSINK, R.P., KATAN, M.D. The fatty acid and sterol content of food composites of middle-aged men in seven countries. **J. Food Compos. Anal.** 1997, 10, 115-141.

ESKIN, N.A.M., MCDONALD, B. E., PRZYBYLSKI, R. MALCOLMSON, L. J. SCARTH, R., MAG, T., WARD, K., ADOLF, D. **Canola oil**, in **Bailey's Industrial Oil & Fat Products**, vol. 2, Edible Oil and Fat Products: Oils and Oil Seeds, John Wiley & Sons, New York, 1996, 1-95.

ESKIN, N.A.M.; PRZYBYLSKI, R. **Antioxidants and Shelf Life of Foods**. In Food Shelf Life Stability: Chemical, Biochemical, and Microbiological Changes. Eskin, N.A.M.; Robinson, D.S., Eds., CRC Press: Boca Raton, US, 2001.

EVANS, H.M., BISHOP, K.S. On the existence of hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. **Science**, 56, 650-651, 1922.

EVANS, H.M., BISHOP, K.S. On the relationship between fertility and nutrition: II. The ovulation rhythm in the rat on inadequate nutritional regimes. **Journal of Metabolic Research**, 319-356, 1922.

EVANS, H.M., EMERSON, O. H., EMERSON, G.A. The isolation from wheat germ oil of an alcohol, α -tocopherol, having properties of vitamin E. **Journal of Biological Chemistry**, 113, 319-332, 1936.

FDA: Food labeling: health claims; plant sterol/stanol esters and coronary heart disease. **Food and Drug Admin Fed Reg**, 65, 54686-54739. 2000.

[http://www.access.gpo.gov/su_docs/fedreg/a000908c.html]

FELDMAN, E.B. LSRO Report: the scientific evidence for a beneficial health relationship between walnuts and coronary heart disease. **Nutrition Journal**, 132, 1062S-1101S. 2002.

FERNANDES, P., CABRAL, J.M.S., 2007. Phytosterols: applications and recovery methods. **Bioresource Technology**, 98, 2335–2350.

FERNHOLZ, E. On the constitution of α -tocopherol. **Journal of the American Chemical Society**, 60, 700. 1938.

FERRARA, L., RAIMONDI, S., D'EPISCOPO, L., GUIDA, L., DELLO RUSSO, A., MAROTTA, T. Olive oil and reduced need for antihypertensive medications. **Archives of Internal Medicine**, 837–842. 2000.

FIRESTONE, D.; REINA, R.J. **Authenticity of vegetable oils**. In: *Food authentication*. Ashurst, P.R.; Dennis, M.J., Eds., Chapman & Hall: London, 1996.

FRYER, M. J. The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α -tocopherol at tocopherol). **Plant Cell Environ**, 381–392. 1992.

FRASER, G.E.; LINSTED, K.D.; BEESON, W.L. Effect of risk factor values on lifetime risk of and age at first coronary event: the Adventist Health Study. **American Journal of Epidemiology**, 42, 746-758. 1995.

FRASER, G.E.; SABATÉ, J.; BEESON, W.L.; STRAHAN, M. A possible protective effect of nut consumption on risk of coronary heart disease. **Archives of Internal Medicine**, 152, 1416-1424. 1992.

GARCÍA-LORDA, P.; MEGIAS RANGIL, I.; SALAS-SALVADO, J. Nut consumption, body weight and insulin resistance. **European Journal of Clinical Nutrition**, 57, S8–S11. 2003.

GIMENO, E., CALERO, E., CASTELLOTE, A.I., LAMUELA-RAVENTÓS, R.M., DE LA TORRE, M.C., LÓPEZ- SABATER, M.C. Simultaneous determination of α -tocopherol and β -carotene in olive oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 881, 255-259. 2000.

GRUSAK, M. A., DELLAPENNA, D. Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 50, 133–161. 1999.

HALL III, C. **Sources of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources.** In *Antioxidantes in food. Practical applications.* Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M., Eds., CRC Press: Boca Raton, US, 2001.

HARRABI, S.; ST-AMAND, A.; SAKOUHI, F.; SEBEI, K.; KALLEL, H.; MAYER, P. M.; BOUKHCHINA, S. Phytosterols and phytosterols distributions in corn kernel. **Food Chemistry**, 111, 115–120. 2008.

HAYES, K.C., PRONCZUK, A., WIJENDRAN, V., BEER, M. Free phytosterols effectively reduce plasma and liver cholesterol in gerbils fed cholesterol. **Journal of Nutrition**, 132, 1983–1988. 2002.

HESS, J. L. **Vitamin E: α - tocoferol in antioxidants.** *In: Antioxidants in Higher Plants.* Ascher, R.G., Hess, J. L. Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1993, 111-134.

IWAMOTO, M.; IMAIZUMI, K.; SATO, M.; HIROOKA, Y.; SAKAI, K.; TAKESHITA A.; KONO M. Serum lipid profiles in Japanese women and men during consumption of walnuts. **European Journal of Clinical Nutrition**, 56, 629-637. 2002.

JOHNSON, I.T. **Antioxidants and antitumour properties**. In *Antioxidantes in food. Practical applications*. Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M., Eds., CRC Press: Boca Raton, US, 2001.

KAMM, W.; DIONISI, F.; HISCHENHUBER, C.; ENGEL, K. Authenticity assessment of fats and oils. **Food Reviews International**, 17, 249-290. 2001.

KAMAL-ELDIN, A., APPELQVIST, L.A . The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. **Lipids**, 31, 671–701. 1996.

KAMAL-ELDIN, A.; GORGEN, S.; PETTERSON, J.; LAMPI, A. Normal-phase high performance liquid chromatography of tocopherols and tocotrienols: Comparison of different chromatographic columns. **Journal of Chromatography A**, 2000, 881, 217-227.

KRITCHEVSKY, D.; CHEN, S.C. Phytosterols - health benefits and potential concerns: a review. **Nutrition Research**, 25, 413-428. 2005.

KRIS-ETHERTON, P.M.; PEARSON, T.A.; WAN, Y.; HARGROVE, R.L.; MORIARTY, K., FISHELL, V.; ETHERTON, T.D. High monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. **American Journal of Clinical Nutrition**, 70, 1009 -1015. 1999.

KUSHI, L.H.; FOLSOM, A.R.; PRINEAS, R.J.; MINK, P.J.; WU, Y.; BOSTICK, R.M. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. **New England Journal of Medicine**, 334, 1156-1162. 1996.

KWAK, N.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. **Food Control**. 12, 99-107, 2001a.

LAGARDA, M. J., GARCÍA-LLATAS, G., FARRÉ, R. Analysis of phytosterols in foods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1486–1496. 2006.

LAGO, R.C.A., PEREIRA, D.A., SIQUEIRA, F.A.R., SZPIZ, R.R., OLIVEIRA, J.P. Estudo preliminar das sementes e do óleo de cinco espécies da Amazônia. **Acta Amazonica**, 369-376. 1987.

LI, D., SALDEEN, T., ROMEO, F., MEHTA, J.L. Relative effects of alpha- and gamma-tocopherol on low-density lipoprotein oxidation and superoxide dismutase and nitric oxide synthase activity and protein expression in rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 4, p. 219–226. 1999.

LING, W.H.; JONES, P.J.H. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. **Life Sciences**, v. 57, 195-206, 1995.

LÓPEZ-ORTÍZ, C. M., PRATS-MOYA, M. S., BERENQUER-NAVARRO, V. A rapid chromatographic method for simultaneous determination of b-sitosterol and tocopherol homologues in vegetable oils. **Journal of Food Composition and Analysis**, 19, 141–149. 2006.

MÄÄTTÄ, K.; LAMPI, A.M.; PETTERSON, J.; FOGELFORS, B.M.; PIIRONEN, V.; KAMAL-ELDIN, A. Phytosterol content in seven oat cultivars grown at three locations in Sweden. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, 79, 1021-1027. 1999.

MAYWORM, M. A. S., NASCIMENTO, A. S., SALATINO, A. 1998. Seeds of species from the 'caatinga': proteins, oils and fatty acid contents. **Revista Brasileira de Botânica**, [online], 21 (3).

MIRALIAKBARI, H.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. **Food Chemistry**, 111, 421-427. 2008

MISHIMA, K.; TANAKA, T.; PU, F.; EGASHIRA, N.; IWASAKI, K.; HIDAKA, R.; MATSUNAGA, K.; TAKATA, J.; KARUBE, Y.; FUJIWARA, M. Vitamin E isoforms α -tocotrienol and γ -tocopherol prevent cerebral infarction in mice. **Neuroscience Letters** , 337, 56-60. 2003.

MOGHADASIAN, M.H. Pharmacological properties of plant sterols. In vivo and in vitro observations. **Life Sciences**, 67, 605-615, 2000.

MOGHADASIAN, M.H.; FROHLICH, J.J. Effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism and atherosclerosis: Clinical and experimental evidence. **American Journal of Medicine**, 107, 588-594. 1999.

MORAES, F. P. COLLA, L. M. Functional foods and nutraceuticals: definition, legislation and health benefits. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 3(2), 109-122, 2006

MOREAU, R.A.; WHITAKER, B.D.; HICKS, K.B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. **Progress in Lipid Research**, 41, 457-500. 2002.

MORGAN, J.M.; HORTON, K.; REESE, D.; CAREY, C.; WALKER, K.; CAPUZZI, D.M. Effects of walnut consumption as part of a low-fat, lowcholesterol diet on serum cardiovascular risk factors. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, 72, 341-347. 2002.

MYERS, V.H. Champagne CM. Nutritional effects on blood pressure. **Current Opinion in Lipidology**, 2007;18:20–4.

NAIR, V. D. P., KANFER, I., & HOOGMARTENS, J. Determination of stigmasterol, β -sitosterol and stigmastanol in oral dosage forms using high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. p. 41, 731–737. 2006.

NELIS, H.J.; D'HAESE, E.; VERMIS, K. **Vitamin E**. In: Modern Chromatographic Analysis of Vitamins, 3rd Edition. DeLeenheer, A.P.; Lambert, W.E.; Van Bocxlaer, J., Eds., Marcel Dekker: New York, 2000.

NOGALA-KALUCKA, M. **Fat-Soluble Vitamins**. In: Chemical and Functional Properties of Food Lipids. Sikorski, Z.E.; Kolakowska, A., Eds.; CRC Press: Boca Raton, USA, 2002.

PEREIRA, J.A.; CASAL, S.; BENTO, A.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Influence of olive storage period on oil quality of three portuguese cultivars of *Olea europea*, Cobrançosa, Madural, and Verdeal Transmontana. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 6335-6340. 2002.

PHILLIPS, K.M.; RUGGIO, D.M.; TOIVO, J.I.; SWANK, M.A.; SIMPKINS, A.H. Free and esterified sterol composition of edible oils and fats. **Journal of Food Composition and Analysis**, 15, 123–142. 2002.

PIIRONEN, V.; LINDSAY, D.G.; MIETTINEN, T.A.; TOIVO, J.; LAMPI, A. Review. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80, 939-966. 2000.

PIMENTEL, D., WILSON, C., MCCULLUM, C., HUANG, R., DWEN, P., FLACK, J., TRAN, Q., SALTMAN, T., CLIFF, B. Economic and environmental benefits of biodiversity. **Bioscience**, 47, 747-757. 1997.

PINHO, R.P.; OLIVEIRA, A.F.M.; SILVA, S.I. Potential oilseed crops from the semiarid region of northeastern Brazil. **Bioresource Technology**, 100, 6114–6117. 2009.

PSOMIADOU, E.; TSIMIDOU, M. Simultaneous HPLC determination of tocopherols, carotenoids, and chlorophylls for monitoring their effect on virgin olive oil oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46, 5132-5138. 1998.

QURESHI, A. A., BRADLOW, B. A., BRACE, L., MANGANELLO, J., PETERSON, D. M., PEARCE, B. C., WRIGHT, J. J., GAPOR, A., ELSON, C. E. Response of hypercholesterolemic subjects to administration of tocotrienols. **Lipids**, 30, 1171–1177. 1995.

QUILEZ, J.; GARCÍA-LORDA, P.; SALAS-SALVADO, J. Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions. **Clinical Nutrition**, v.22, p. 343-351. 2003.

RAMADAN, M. F., MOERSEL, J-T. Screening of the antiradical action of vegetable oils. **Journal of Food Compositions and Analysis**, 19, 838-842. 2006.

RAVEN, P. H., JOHNSON, G. B. **Biology, Mosby-year book**. St Louis. 1992.

RUPÉREZ, F.J.; MARTÍN, D.; HERRERA, E.; BARBAS, C. Chromatographic analysis of R-tocopherol and related compounds in various matrices. **Journal of Chromatography. A**, 935, 45-69. 2001.

SABATÉ, J.; FRASER, G.E.; BURKE, K.; KNUTSEN, S.; BENNETT, H.; LINDSTED, K.D. Effect of walnuts on serum lipid levels and blood pressure in normal men. **New England Journal of Medicine**, 328, 603-607. 1993.

SABATÉ, J. Nut consumption, vegetarian diets, ischemic heart disease risk, and all-cause mortality: evidence from epidemiologic studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, 70, 500-503. 1999.

SABATÉ, J.; RADA, T.; BROWN JR., J. **The role of nuts in cardiovascular disease prevention**. In Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods. Wildman, R., Ed., CRC Press: London, 2000.

SABATÉ, J. Nut consumption and body weight. **American Journal of Clinical Nutrition**, 78, 647–650. 2003.

SALDEEN, K., SALDEEN, T., Importance of tocopherols beyond α -tocopherol: evidence from animal and human studies. **Nutrition Research**, 25, 877–889. 2005.

SALDEEN, T., LI, D., MEHTA, J. L. Differential effects of α - and γ -tocopherol on low-density lipoprotein oxidation, superoxide activity, platelet aggregation and arterial thrombogenesis. **Journal of the American College of Cardiology**, 34, 208–215. 1999.

SANTOS, R.; LIMAS, E.; SOUSA, M.; CASTILHO, M. C.; RAMOS, F.; SILVEIRA, M. I. N. Optimization of analytical procedures for GC–MS determination of phytosterols and phytosteranols in enriched milk and yoghurt. **Food Chemistry**, 102, 113–117. 2007.

SCALBERT, A., WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, 130 (Suppl. 8S), 2073–2085. 2000.

SCHWARTZ, H.; OLLILAINEN, V., PIIRONEN, V.; LAMPINEN, A. Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. **Journal of Food Composition and Analysis**, 21, 152–161. 2008.

SCHWENKE, D.C. Does lack of tocopherols and tocotrienols put women at increased risk of breast cancer? **Journal of Nutritional Biochemistry**, 13, 2–20. 2002.

SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD. **Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Vitamin E**. In SCF/CS/NUT/UPPLEV/31 Final, 2003.

SEN, C. K., KHANA, S., ROY, S. Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. **Life Sciences**, 78, 2088–2098. 2006.

SHAHIDI, F., SHUKLA, V.K.S. 1996. Nontriacylglycerol constituents of fats, oils. **Inform** 7, 1227–1232.

SILVA, S. I. 1998. **Euphorbiaceae da Caatinga: distribuição de espécies e potencial oleaginoso**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da SBCTA**. 37, 127-135, 2003.

SURE, B. Dietary requirements for reproduction: II. The existence of a specific vitamin for reproduction. **Journal of Biological Chemistry**, 58, 693-709, 1924.

TASIOULA-MARGARI, M.; OKOGERI, O. Simultaneous determination of phenolic compounds and tocopherols in virgin olive oil using HPLC and UV detection. **Food Chemistry**, 74, 377-383. 2001

TADMOR, Y.; LARKOV, O.; MEIR, A.; MINKOFF, M.; LASTOCHKIN, E.; EDELSTEIN, M.; LEVIN, S.; WONG, J.; ROCHEFORD, T.; LEWINSOHN, E. Reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of vitamin E components in maize kernels. **Phytochem Anal**, 11, 370-374. 2000.

THERIAULT, A.; CHAO, J.; WANG, Q.; GAPOR, A.; ADELI, K. Tocotrienol: A review of its therapeutic potential. **Clinical Biochemistry**, 32, 309-319. 1999.

ZAMBÓN, D.; SABATÉ, J.; MUÑOZ, S.; CAMPERO, B.; CASALS, E.; MERLOS, M.; LAGUNA, J.C.; ROS, E. Substituting walnuts for monounsaturated fat improves the serum lipid profile of hypercholesterolemic men and women. **Annals of Internal Medicine**, 132, 538-546.2000.

ZWARTS, L.; SAVAGE, G.P.; MCNEIL, D.L. Fatty acid content of New Zealand-grown walnuts (*Juglans regia* L.). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 50, 189-194. 1999.

WARNER, K. Effect on the flavor and oxidative stability of stripped soybean and sunflower oils with added pure tocopherols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 9906-9910. 2005.

WILSON, E. O. **Biodiversity**. Washington (DC): National Academy of Sciences. 1988.

Artigo 1

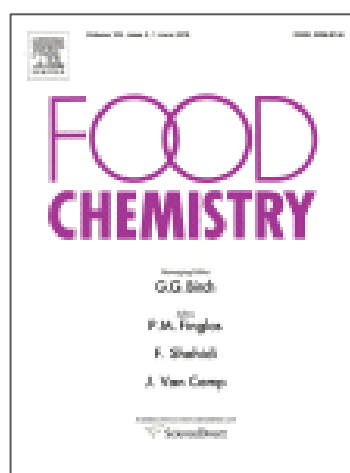
Composição centesimal e teores de tocois e fitosteróis de sementes de *Barnebya harleyi* e *Diplopterys pubipetala* (Malpighiaceae)

R.S. Pinho^a, S. Casal^b, E. Mendes^b, S.I. Silva^a, M.B.P.P Oliveira^b

^aLaboratório de Recursos Econômicos e Fitoquímica, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

^bREQUIMTE, Serviço de Farmacognosia e Bromatologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

Artigo a ser enviado à Food Chemistry



**Composição centesimal e teores de tocois e fitosteróis de sementes de
Barnebya harleyi e *Diplopterys pubipetala* (Malpighiaceae)**

R.S. Pinho^a, S. Casal^b, E. Mendes^b, M.B.P.P Oliveira^b, S.I. Silva^a

^aLaboratório de Recursos Econômicos e Fitoquímica, Departamento de Biologia,
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

^bREQUIMTE, Serviço de Farmacognosia e Bromatologia, Faculdade de Farmácia,
Universidade do Porto, Porto, Portugal.

Resumo

Sementes das Malpighiaceae, *Barnebya harleyi* e *Diplopterys pubipetala* foram analisadas em relação à composição centesimal, tocois, estabilidade oxidativa e fitosteróis do óleo. O total de tocois foi de 26,6 mg/100 g em *D. pubipetala* e 72,7 mg/100 g em *B. harleyi*. α -Tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol e α -tocotrienol, β -tocotrienol e γ -tocotrienol foram detectados nos óleos das duas espécies. δ -Tocoferol e δ -tocotrienol foram detectados apenas no óleo de *B. harleyi*. O teor de α -tocoferol foi mais elevado em *D. pubipetala* (24,0 mg/100 g) do que em *B. harleyi* (2,6 mg/100 g). O teor de γ -tocoferol de *B. harleyi* foi de 58,5, mg/100 g, enquanto em *D. pubipetala* foi encontrado apenas traços. *B. harleyi* apresentou teor de γ -tocotrienol de 5,0 mg/100 g. A estabilidade oxidativa do óleo foi mensurada a 110 °C, num fluxo de ar de 20L/h e *D. pubipetala* apresentou tempo de indução (16,1 h) maior que *B. harleyi* (2 h). Os fitosteróis de *D. pubipetala* e *B. harleyi* totalizam respectivamente, 85,06 mg/100 g e 89,20 mg/100 g. β -Sitosterol (50,64 e 70,40 mg/100 g), o campesterol (8,58 e 6,83 mg/100 g) e o Δ^7 -estigmastanol (12,22 e 7,13 mg/100 g) foram majoritários.

Palavras-chave: *Barnebya harleyi*, *Diplopterys pubipetala*, proteína, bioativos, óleo de sementes, tocoferóis e fitosteróis.

* Correspondência: Tel.: +55-81-3302-6350
E-mail: rsampaio@gmail.com

1. Introdução

Sementes oleaginosas, de modo geral, além de fonte de lipídios são consideradas fonte de carboidratos e proteínas para dieta humana, tendo como vantagem serem recursos renováveis de baixo custo que podem fornecer compostos de alto valor agregado, como as vitaminas lipossolúveis e os fitosteróis.

Entre as substâncias bioativas com poder antioxidante presentes em óleos e gorduras vegetais encontram-se a vitamina E e os fitosteróis.

A vitamina E, também chamada tocois, constitui-se em um grupo de substâncias solúveis em lipídeos, ocorrendo naturalmente, na forma de oito isômeros: quatro tocoferóis (α -T, β -T, γ -T e δ -T) e quatro tocotrienóis (α -T₃, β -T₃, γ -T₃ e δ -T₃), sendo estes últimos a forma insaturada destes compostos (Adhikari et al., 2008).

Óleos vegetais, frutos e sementes, incluindo nozes e cereais ou produtos derivados deles são as principais fontes de tocois na dieta humana (Murphy, 1990; Ryyänen et al., 2004) e também para uso industrial, pois as características antioxidativas dos tocois aumentam o tempo de vida em prateleira desses alimentos e de seus derivados (Belitz et al., 2004).

Os fitosteróis, por sua vez, são classificados em três grupos principais, segundo o número de grupos metila em C4: 4,4-dimetil (2 grupos), 4- α -metil (um grupo) ou 4-desmetil (nenhum grupo). Os 4,4-dimetil e 4-metilesteróis são precursores biossintéticos de outros esteróis e, por esta razão, são encontrados em quantidades muito inferiores às dos 4-desmetilesteróis (Piironen et al., 2000).

Em óleos e gorduras vegetais, os fitosteróis, são componentes insaponificáveis minoritários (Harrabi et al., 2008) e também em cereais, frutos secos, em diversas frutas e hortaliças, sendo os três primeiros alimentos considerados as fontes naturais mais ricas nestes compostos de complexa composição (Piironen et al., 2000). Correspondem em média a 0,3-2% do óleo, mas podem chegar a mais de 10% em determinadas plantas, como ocorre em espécies de *Amaranthus* e em *Butyrospermum parkii* (Stuchlík e Zák, 2002).

O interesse nutricional de fitosteróis na dieta humana se dá pelo seu potencial para reduzir tanto o colesterol plasmático total como o colesterol LDL, através da ação inibidora da absorção de colesterol proveniente da dieta e da bile durante a digestão e absorção intestinal (Piironen et al., 2000).

Estudos recentes mostram que tanto os fitosteróis como os tocois inibem a síntese do colesterol, reduzindo o nível deste, bem como de outros fatores de riscos cardiovasculares, além disso, atuam suprimindo a proliferação de células tumorais (Mishima et al., 2003). Assim, a indústria, em muitos países, tem dado grande atenção aos óleos ricos em ácidos graxos insaturados com elevado nível de tocois e aos fitosteróis, a fim de adicioná-los em formulações de alimentos infantis e em suplementos nutracêuticos (Oomah e Mazza, 1999; Moyad, 2005).

A composição química de um óleo específico e seus bioativos são considerados fatores determinantes para direcionamento da produção de óleo, se para consumo humano ou para aplicação industrial, uma vez que, a estabilidade oxidativa depende desses componentes (Wallis et al., 2000). Aliado a isto, os compostos antioxidantes, como tocois e fitosteróis, apesar de minoritários, apresentam um papel fundamental na rota de deterioração dos óleos, tendo em vista que ela se dá pela oxidação das duplas ligações nas moléculas de

triglicerídeos, acarretando perdas na economia (Ramadan e Moersel, 2006). Entretanto, esse tipo de informação, juntamente com a da estabilidade oxidativa e a composição nutricional das sementes, é pouco conhecida, para espécies oleaginosas já consagradas (Warner, 2005) e muito menos para espécies não convencionais.

Tem crescido o número de publicações sobre o aproveitamento econômico de espécies tropicais, e, embora Malpighiaceae seja bem representada na flora tropical, poucas espécies são aproveitadas economicamente. Nas Américas, a acerola (*Malpighia emarginata* DC. - cereja-das-Antilhas ou cereja-de-Barbados) é utilizada há muito tempo no preparo de sucos e sorvetes devido às elevadas quantidades de vitamina C (1000 a 4600 mg/100g de polpa) (Asenjo e Freire De Gúzman, 1946). *Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb.) C.V.Morton é um cipó da Amazônia, usado no preparo de chá, denominado “Ayahuasca” (inglês), “hoasca” (Brasil), “yage” (Colombia) e “caapi”, utilizado em ritual indígena e na seita Santo Daime, (Schultes e Raffauf, 1990), devido a substâncias alucinógenas presentes na casca. E, ultimamente, têm sido reportadas espécies de Malpighiaceae cujo teor de óleo nas sementes é elevado, tais como: *Hiptage benghalensis* Kurz, com 40,2% (Tyagi e Kakkar, 1991), *Banisteriopsis pubipetala* (Juss.) Cuatrec. (43,5%) e *Barnebya harleyi* W. R. Anderson & B. Gates (46,4%) (Pinho et al., 2009).

No estudo sobre o teor de óleo e composição dos ácidos graxos realizado por Pinho et al. (2009) com espécies ocorrentes no semiárido nordestino, constatou-se que *Banisteriopsis pubipetala* (Juss.) Cuatrec. (= *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W. R. Anderson & C. Davis) e *B. harleyi* W. R. Anderson & B. Gates são fontes promissoras de óleos e do ácido graxo essencial α -linoleico (42,8 % e 31,9 %) respectivamente. Sementes contendo elevado teor do ácido graxo α -

linoleico, como a linhaça (*Linum usitatissimum* L.), por exemplo, tem sido incorporada na dieta devido aos benefícios fisiológicos que promovem (Bozan e Temelli, 2008).

Por isso, mesmo não havendo informação sobre o uso de sementes de *D. pubipetala* e *B. harleyi* na alimentação, mas, considerando o conteúdo elevado de óleo e do ácido graxo α -linoleico bem como, a intensa procura de sementes ricas nessas substâncias e demais bioativos para uso alimentício, o presente trabalho objetivou analisar a composição centesimal dessas sementes, os teores de tocois e fitosteróis do óleo, e ainda sua estabilidade oxidativa.

2. Materiais e métodos

2.1 Amostras

Os frutos maduros de *Diplopterys pubipetala* e *Barnebya harleyi*, foram colhidos no estado de Pernambuco – Brasil, no período janeiro de 2007 a maio de 2008. No laboratório, as sementes foram retiradas manualmente dos frutos e armazenadas a 4° C até o momento da análise.

2.2 Composição centesimal

A umidade foi determinada em estufa (Scaltec, Goettingen, Germany) a 105°C \pm 2°C com 5 g da amostra. O conteúdo de nitrogênio foi estimado pelo método de Kjeldhal, (AOAC, 2000) e a proteína total foi calculada (N x 6,25). O teor total de lipídio e as cinzas foram determinados de acordo com o método oficial da AOAC (2000). O conteúdo de carboidratos mais fibras alimentares foi estimado pela diferença dos outros componentes, usando-se a seguinte fórmula: Conteúdo

de carboidrato + fibras alimentares = 100% - (% de umidade + % de proteína + % de lipídeo + % de cinzas).

2.3 Conteúdo de tocois

O óleo foi extraído em soxhlet utilizando como solvente *n*-hexano (Merck, Darmstsd, Germany) durante oito horas. Após extração, o solvente foi evaporado e a umidade restante removida sob corrente de nitrogênio. O óleo obtido foi conservado em frascos de vidro, envoltos em papel de alumínio e armazenados a 4 °C até análise.

Uma amostra de 0,5 g de óleo das sementes foi pesada em frasco âmbar de 4 mL, e foi adicionado 1 mL de *n*-hexano. Uma alíquota da mistura homogeneizada (1 mL) foi transferida para um frasco âmbar de 1,5 mL e 300 µL de solução do padrão interno (tocol 250 mg/L, Matreya, Pleasant Gap, PA) foi adicionado e mais 200 µL de *n*-hexano foi adicionado para completar o volume. Os tubos foram homogeneizados por 30 segundos. Todos os passos da preparação foram executados em sala escura e as amostras mantidas no escuro e refrigeradas até análise (Cunha et al., 2006).

As amostras foram injetadas no sistema de HPLC em Cromatógrafo Jasco (Tóquio, Japão) equipado com uma bomba Jasco (modelo PU-980), com injetor automático Jasco (modelo AS-950) e com um "loop" de 10 µl com detector de fluorescência Jasco (modelo FP-920) programado com λ (excitação) = 290 nm e λ (emissão) = 330 nm. Foi usada uma coluna Inertsil 5 SI, 250 x 3 mm, 5 µm de tamanho de partícula (Varian, The Netherland) operando em temperatura ambiente (20 °C).

Os dados cromatográficos foram analisados utilizando o software Borwin (JMBS, França). Os compostos foram identificados por comparação dos tempos de retenção e dos espectros UV com padrões de referência (α -, β -, γ - e δ -tocoferol e α -, β -, γ - e δ -tocotrienol, Calbiochem, La Jolla, CA). A quantificação dos compostos foi feita com base no sinal obtido pelo detector de fluorescência, utilizando o método do padrão interno.

2.4 Estabilidade oxidativa

O tempo de indução da oxidação foi mensurado com aparelho Rancimat (Metrohm CH serie 679, Harisau, Switzerland). No óleo (3,0 mL), aquecido a $110 \pm 0,2$ °C, fez-se borbulhar um fluxo de ar de 20 L/h. Os componentes voláteis liberados durante a oxidação foram coletados em células contendo água e o aumento da condutividade da solução foi continuamente mensurado. O tempo tomado até atingir o ponto de inflexão da condutividade foi registrado como tempo de indução (Amaral et al., 2003).

2.5 Composição em esteróis

A composição em esteróis foi avaliada por GC-FID seguindo o método da NP EN ISO 12228 (1999). Depois da adição de 1 mL de solução padrão interno (betulina 1,0 mL, Sigma, St. Louis, MO, USA) a 250 mg do óleo, procedeu-se à sua saponificação com solução metanólica de hidróxido de potássio; a fração insaponificável foi obtida por análise em coluna de óxido de alumínio, a fração de esteróis sendo purificada, após a eluição da coluna, por cromatografia em camada fina (Merck, Darmstadt, Germany), usando *n*-hexano/éter dietílico 1:1(v/v) como

solvente para desenvolvimento. A visualização das bandas foi conseguida com nebulização com metanol.

Os ésteres trimetilsilílicos foram obtidos com a adição de 1-metilimidazol e N-metil-N-(trimetilsilil)-heptafluorobutiramida (MSHFBA, Sigma e Macherey-Nagel, Düren, Germany). O perfil dos esteróis foi analisado em Cromatógrafo Chrompack CP 9001 (Chrompack, Middelburg, The Netherlands) com injetor “split-splitless”, detector de ionização de chama (FID), injetor automático CP-9050, com uma coluna DB-5MS (J & W Scientific, Folsom, CA) de 30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m operando em temperatura máxima de 325 $^{\circ}$ C. A temperatura tanto do injetor quanto do detector, foram de 320 $^{\circ}$ C. A temperatura inicial da coluna foi de 250 $^{\circ}$ C aumentando-se até 300 $^{\circ}$ C, numa razão de 2 $^{\circ}$ C / min, permanecendo na temperatura final durante 12 min. O Hélio foi utilizado como gás de arraste com pressão de 100 kPa. A razão do split foi 1:50 e o volume injetado foi de 1,5 μ L.

O teor total de esteróis foi determinado considerando todos os picos dos esteróis eluídos entre o colesterol e o Δ^7 -avenasterol. A identificação foi feita comparando os tempos de retenção relativos das amostras com os obtidos com os padrões. Foram usados padrões para identificação adquiridos da Sigma (St. Louis, MO) incluindo colestanol, colesterol, campesterol, estigmasterol, β -sitosterol, β -sitostanol e betulina.

3. Resultados e discussão

3.1 Composição centesimal das sementes

Na tabela 1 são apresentados os resultados relativos à composição centesimal das sementes de *Diplopterys pubipetala* e *Barnebya harleyi*.

Tabela 1

Composição centesimal (g/100 g) das sementes de *Diplopterys pubipetala* e *Barnebya harleyi*.

| Composição | <i>D. pubipetala</i> | <i>B. harleyi</i> |
|----------------------------------|----------------------|-------------------|
| Proteína (N x 6,25) | 30,5±0,07 | 30,4±0,18 |
| Carboidrato + fibras alimentares | 19,4±1,34 | 14,6±1,02 |
| Óleo | 42,3±0,85 | 46,5±0,07 |
| Cinzas | 2,78±0,89 | 2,65±0,67 |
| Umidade | 5,02±1,02 | 5,81±0,98 |

Os valores são médias ± DP de três determinações.

As sementes das duas espécies analisadas apresentam mesmo teor proteico, com respectivamente 30,5 g/100 g e 30,4 g/100 g (Tabela 1), sendo superior ao teor de proteína de sementes de amendoim (*Arachis hipogaea* L.) (17-25,2%) (Prathiba e Reddy, 1994), do baru (*Dipteryx alata* Vogel) (23,9%) e catolé (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari) (11,5 g/100 g), essas duas últimas espécies sendo utilizadas na alimentação tradicional no cerrado e semiárido brasileiros (Takemoto et al., 2001; Crepaldi et al., 2001).

Diplopterys pubipetala e *Barnebya harleyi*, tem maior teor proteico do que a munguba (*Paqaira aquatica* Aubl.) com 12,9 g/100g, cujas sementes são eventualmente consumidas cruas ou torradas, na região amazônica, devido à semelhança de sabor com as castanhas (Lorenzi, 1992). *P. aquatica*, entretanto, apresentou toxicidade em ratos devido à presença de lectinas e inibidores de tripsinas (Oliveira et al., 2000).

O teor de carboidratos mais fibras alimentares em *D. pubipetala* (19,4 g/100 g) e em *B. harleyi* (14,6 g/100 g) são próximos aos teores de carboidratos de *D. alata* (15,8 g/100 g), superiores ao de *S. coronata* (9,7 g/100 g). Porém são inferiores ao de *A. hipogaea* (25,40 g/100 g) (Onyeike e Acheru, 2002) e de *P. aquatica* (29,7 g/100 g) (Oliveira et al., 2000).

Os teores de óleo de *D. pubipetala* (42,3 g/100 g) e *B. harleyi* (46,5g/100 g) confirmam a tendência de elevado teor de óleo para espécies de Malpighiaceae, tal como o de *Hiptage madablota* Gaertn. (67,0%) (Tyagi e Kakkar, 1991) e não apresentam variação em relação aos totais de óleo observados por Pinho et al. (2009), respectivamente, de $43,5 \pm 3,24$ e $46,4 \pm 0,16$. Esses teores são próximos daquele de *D. alata* (38,2 g/100 g), de *S. coronata* (49,2 g/100 g) e de *A. hipogaea* (46–52 g/100g) (Prathiba e Reddy, 1994) e menor do que o de *P. aquatica* (53,9 g/100 g).

Os teores de cinzas de *D. pubipetala* (2,78g/100 g) e *B. harleyi* (2,65g/100 g), são muito semelhantes ao de *D. alata* (2,7 g/100 g), sendo um pouco maior do que o de *S. coronata* (1,2 g/100 g) (Takemoto et al., 2001; Crepaldi et al., 2001). *D. pubipetala* e *B. harleyi* têm valores de cinza baixos comparados ao de *Arthocarpus hererophyllus* Lam. (Jaca) (6,72g/100 g) e *Treculia africana* Decne. ex Trécul (5,57g/100 g), cujas sementes são utilizadas na alimentação humana. Os teores de carboidratos e cinzas são parâmetros importantes em termos de utilização da torta das sementes para a composição de ração animal (Bozan e Temelli, 2008).

Haja vista, que o conteúdo de cinzas corresponde à medida total dos minerais presentes em alimentos e que se sementes oleaginosas são consideradas fontes de minerais como o ferro, cobre e selênio, elementos que devem ser incluídos em uma dieta saudável, torna-se interessante investigar os minerais presentes nessas espécies (Finley, 2005).

Os teores de umidade foram de 5,02 g/100 g para *D. pubipetala* e 5,81g/100 g em *B. harleyi*, valores próximos aos das sementes de *Papaver somniferum* L. (papoula) (5,3g/100 g), *Bixa orellana* L. (açafraão) (6,1g/100g) e *Linum usitatissimum* L. (linhaça) (6,4g/100 g) que são comestíveis (Bozan e Temelli,

2008) e *Dipteryx alata* (6,1g/100 g) e bastante inferior a *S. coronata* (28,6 g/100 g) (Takemoto et al., 2001; Crepaldi et al., 2001).

Considerando a composição centesimal das sementes de *B. harleyi* e *D. pubipetala*, que além de boa fonte de óleo e carboidratos, têm elevados teores de proteína, é importante conhecer sua composição em aminoácidos e também se há fatores inibidores de tripsina, tóxicos ou alergênicos. Uma vez comprovada a inexistência destes compostos, poderia se indicar essas sementes para alimentação humana e/ou animal. Os teores de proteína dessas sementes são suficientes para atender as necessidades diárias da dieta humana que é de 23,6 g para os adultos (National Research Council, 1974).

Algumas famílias de plantas cujos frutos e sementes têm elevado conteúdo de óleo e que já são utilizados na alimentação pertencem à ordem Malpighiales (Angiosperm Phylogeny Group III), tais como o pequi - *Caryocar brasiliensis* Camb. (*Caryocaraceae*), o mangostão - *Garcinia mangostana* L. (*Clusiaceae*) e a linhaça – *L. usitatissimum* (*Linaceae*) (The Angiosperm Phylogeny Group, 2009).

3.2 Composição de Tocois em Diplopterys pubipetala e Barnebya harleyi

O total de tocois para o óleo extraído das espécies analisadas variou bastante, de 26,6 mg/100 g em *Diplopterys pubipetala* a 72,7 mg/100 g no óleo de *Barnebya harleyi* (Tabela 2). Os tocois totais de *D. pubipetala* têm valores próximos aos do óleo de papoula (30,9 mg/100g) (Bozan e Temelli, 2008) enquanto os tocois totais de *B. harleyi* aproximam-se dos reportados para o óleo de linhaça (79,4 mg/100g).

Tabela 2

Conteúdo de tocois (mg/100 g) em óleos de sementes de *Diplopterys pubipetala* e *Barnebya harleyi*.

| Espécies | Tocoferóis | | | | Tocotrienóis | | | | Total |
|-------------------------------|------------|---------|----------|----------|--------------|---------|----------|----------|----------|
| | α | β | γ | δ | α | β | γ | δ | |
| <i>Diplopterys pubipetala</i> | 24,0±6,0 | 0,9±0,4 | 0,1±0,2 | nd | 0,8±0,1 | 0,3±0,1 | 0,5±0,2 | - | 26,6±4,2 |
| <i>Barnebya harleyi</i> | 2,6±3,6 | 0,7±0,6 | 58,5±4,0 | 3,3±1,0 | 1,0±0,5 | 1,6±0,2 | 5,0±1,2 | 0,6±0,4 | 72,7±8,0 |

Os valores são médias \pm DP de três determinações; - = não detectado.

Os tocois α -tocoferol, β - tocoferol, γ -tocoferol e α - tocotrienol, β - tocotrienol e γ -tocotrienol foram detectados nos óleos das duas espécies analisadas, enquanto que δ -tocoferol e δ -tocotrienol foram detectados apenas em *B. harleyi*. Os tocois majoritários nas espécies estudadas foram o α - e γ -tocoferol, que são os principais tocois de óleos e gorduras vegetais (Schwartz et al., 2008).

O teor de α -tocoferol de *D. pubipetala* (24,0 mg/100 g) foi quase dez vezes maior do que o de *B. harleyi* (2,6 mg/100g), sendo semelhante ao reportado para o azeite de dendê (*Elaeis guineensis* L.) (25,6 mg/100 g) (Bramley et al., 2000), superior ao do óleo de soja (17,9 mg/100 g) e amendoim (14,1 mg/100 g) (Belitz et al., 2004), e próximo do teor encontrado em algumas variedades de oliva (*Olea europaea* L.) (variação de 9-26 mg/100 g) (Cunha et al., 2006).

No trabalho de Crepaldi et al. (2001) foi reportado um teor de 3,8 mg/100 g do α -tocoferol na polpa dos frutos de *S. coronata*, enquanto Takemoto et al. (2001) reportaram 5,0 mg/100 g de α -tocoferol em sementes de *D. alata*, valores inferiores aos das Malpighiaceae deste estudo.

O α -tocoferol (α -T) tem sido considerado um dos tocoferóis mais potentes em termos antioxidantes, que atuam evitando a clivagem das cadeias de ácidos graxos, possivelmente doando um ou dois elétrons a partir do grupo metil do anel

cromano. Além disso, o α -T é o que atinge maiores concentrações no plasma sanguíneo, daí possuir grande relevância biológica (Saldeen e Saldeen, 2005).

A principal atividade do α -T é a de antioxidante de radicais livres em membranas e lipoproteínas, bem como nos alimentos, conferindo maior estabilidade antioxidante (Penna, 2005; Kamal-Eldin e Appelqvist, 1996). Por isso, acredita-se que esses compostos reduzem o risco de doenças cardiovasculares e de certos tipos de câncer (Burton e Traber, 1990; Burton, 1994). A ingestão diária de α -T recomendada é de 10-25 mg para suprimento das necessidades de um adulto (Andrade et al., 1999).

O teor mais elevado de γ -tocopherol (γ -T) foi encontrado no óleo de *B. harleyi* (58,5, mg/100 g). Esse valor é comparável aos encontrados no óleo de milho (60,2 mg/100 g) e soja (59,3 mg/100 g) (Bramley et al., 2000; Eskin e Przybylski, 2001) e inferior ao do óleo de linhaça (75,6 mg/100 g) (Bozan e Temelli, 2008).

Concentrações elevadas de γ -T foram registradas em espécies que não são convencionalmente usadas como alimento, como *Amaranthus mangostanus* L. (58,0 mg/100 g) (Matthaus et al., 2003) e *Platymiscium floribundum* Vogel (88,1 mg/100 g) (Vallilo et al., 2007).

O γ -T tem sido relatado como, o mais potente tocoferol diminuindo a agregação plaquetária, a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e retardando a formação de trombo intra-arterial (Li et al., 1999; Saldeen et al., 1999).

De acordo com Saldeen e Saldeen (2005), a ausência de substituintes na posição C-5 do anel cromano do γ -tocoferol lhe confere maior capacidade para capturar determinados tipos de óxidos nitrogenados, tais como peroxinitrito e

compostos nitrogenados semelhantes, sendo superior, neste aspecto, ao α -T na desintoxicação de dióxido de nitrogênio.

B. harleyi teve também o maior teor de γ -tocotrienol (5,0 mg/100 g), superior ao do óleo de coco-da-Bahia (*Cocos nucifera* L.) (0,4mg/100 g) (Belitz et al., 2004). O azeite de dendê é conhecido por conter os quatros isômeros de tocotrienóis, sendo considerada a única fonte dessa classe de tocol (Stuchlík e Zàk, 2002).

Os tocotrienóis vêm sendo investigados pela sua ação na inibição da biossíntese do colesterol (Qureshi et al., 1995), em doenças cardiovasculares, doenças da pele e envelhecimento (Goh et al., 1994), atuando ainda, na supressão do crescimento de células mamárias cancerígenas. Mesmo em concentração nanomolar, os tocotrienóis, foram eficazes em prevenir neurodegeneração celular (Khanna et al., 2003; Sen et al., 2000; Nesaretnam et al., 1995; Schwenke, 2002).

Bozan e Temelli (2008) ressaltam a importância da presença de tocois na proteção de ácidos graxos poli-insaturados contra a deteriorização oxidativa, tendo-se já observado relação entre as insaturações e a quantidade de tocois em óleos e em sementes oleaginosas (Shahidi e Shukla, 1996). O óleo da semente de *B. harleyi*, além de conter todos os isômeros de tocol, teve maior teor de tocol do que *D. pubipetala*. Constata-se uma relação positiva entre o elevado teor de ácidos insaturados (80,7%) reportado por Pinho et al. (2009) e o nível de tocois totais em *B. harleyi*. Entretanto, apesar de o óleo de *D. pubipetala* conter teor de ácidos graxos insaturados (71%) próximo ao de *B. harleyi* (80,7%), essa relação positiva não foi observada.

3.3 Estabilidade oxidativa dos óleos

B. harleyi apresentou valor de estabilidade oxidativa (EO) baixo (2 h), enquanto o valor da EO encontrado para o óleo de *D. pubipetala* foi bastante

elevado (16,1 h) (Tabela 3). Na literatura o valor mais alto registrado para a EO foi para *Corylus avellana* L. var. *tonda gentile romana* (3,3 - 10 h) (Parcerisa et al., 1995). Esses valores mostram que o óleo de *D. pubipetala* pode ser considerado muito estável.

Quando se compara o tempo de indução de *B. harleyi* e *D. pubipetala* com os parâmetros de tocois totais, tipos de tocois e totais de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) (tabela 3), nota-se que a concentração de α -tocoferol pode estar proporcionalmente influenciando no valor final do tempo de indução.

Tabela 3

Total de tocois, α -tocoferol, γ -tocoferol, ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) e estabilidade oxidativa em óleos das sementes de *Diplopterys pubipetala* e *Barnebya harleyi*.

| Espécies | Total de tocois ^a | α -T ^a | γ -T ^a | AGPI ^b (%) | Tempo de indução (h) |
|----------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------|----------------------|
| <i>D. pubipetala</i> | 26,6±4,2 | 24,0±6,0 | 0,1±0,2 | 71,0 | 16,1 |
| <i>B. harleyi</i> | 72,7±8,0 | 2,6±3,6 | 58,5±4,0 | 80,7 | 2,0 |

^a Os valores em mg/ 100 g são médias \pm DP de três determinações.

^b Dados de Pinho et al., 2009.

Nos resultados sobre o teor de α -tocoferol e o tempo de indução para linhaça e a papoula, observados por Bozan e Temelli (2008), que foram respectivamente de 0,59 mg/100 g e 1,57 h e 5,53 mg/100 g e 5,56 h, também houve correspondência entre o teor de α -tocoferol mais alto e EO maior.

D. pubipetala e *B. harleyi* têm óleos com elevado conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (Tabela 3). Óleos com elevado conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados são admitidos como instáveis (Savage et al., 1999). Por outro lado, foi observado por Demurin et al. (2006) que o tocoferol é um forte antioxidante, promovendo incrementos na estabilidade oxidativa de óleos ricos em ácidos linoleico e oleico na proporção de uma, duas e até três vezes. Foi observado

também que a atividade antioxidante dos tocois depende da sua natureza química e concentração e geralmente obedece à ordem seguinte: α - > β - \geq γ - > δ em termos de atividade antioxidativa. Assim, o conteúdo de tocol, juntamente com o grau de insaturação do óleo, pode ter um forte impacto sobre a estabilidade oxidativa (Shahidi e Shukla, 1996).

Embora o α -tocoferol seja considerado o mais ativo dentre os tocoferóis, ele pode perder eficiência na estabilização de ácidos graxos quando em concentrações elevadas (Shahidi e Shukla, 1996); verificou-se, ainda que, o acréscimo de α -tocoferol em óleos vegetais não melhorou a sua estabilidade oxidativa em virtude do nível de tocoferol do óleo já ser suficiente para estabilizar os ácidos graxos poli-insaturados (Lampi et al., 1999; Burton et al., 1985).

Bozan e Temelli (2008), relacionando o conteúdo total de ácidos graxos, tocol total e tempo de indução em óleos de papoula e açafraão, constataram não haver correlação entre a estabilidade oxidativa e o conteúdo de tocol. Foi observado que embora o óleo de açafraão tivesse maior concentração de tocol (53,20 mg/100 g) do que o óleo de papoula (30,94 mg/100 g), apresentou um valor de estabilidade oxidativa correspondente à metade do período de indução do óleo de papoula que foi de 5,56 h, contra 2,87 h no açafraão. Esse resultado foi atribuído à presença de pequena quantidade de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa presentes no óleo de açafraão, afetando negativamente a estabilidade oxidativa, o que não se observou no óleo de papoula.

Esse fato nos leva a observar que o óleo de *B. harleyi*, que também apresenta ácidos graxos insaturados de cadeia longa (20:1= 27,5%), Pinho et al. (2009), difere do óleo de *D. pubipetala*, que apresentou EO superior. Além disso, no óleo de *D. pubipetala*, que tem maiores quantidades de α -tocoferol, a

estabilidade oxidativa foi maior, sugerindo que não apenas o tipo de tocol, mas sua distribuição e quantidades presentes nos óleos podem afetar a estabilidade oxidativa.

3.4 Fitosteróis

Os resultados referentes aos fitosteróis presentes nos óleos de *D. pubipetala* e *B. harleyi* encontram-se na tabela 4 e totalizam, respectivamente, 85,06 mg/100 g e 89,20 mg/100 g. Os níveis de fitosteróis encontrados são inferiores aos óleos das oleaginosas tradicionais, como coco-da-Bahia (114 mg/100 g) e azeite de oliva (256 - 258mg/g) que são admitidos como tendo elevados níveis de fitosteróis (Schwartz et al., 2008).

O colesterol foi encontrado em pequena quantidade nas duas espécies analisadas, com 0,53 mg/100 g em *B. harleyi* e 0,90 mg/100 g em *D. pubipetala*, corroborando os dados da literatura sobre ocorrência minoritária desse esterol em sementes (Kochar, 1983). Já foi reportado que o colesterol pode estar presente em níveis de até 20% dos esteróis totais no óleo das sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Feinberg et al., 1987).

Os fitosteróis majoritários foram respectivamente para *D. pubipetala* e *B. harleyi*, o β -sitosterol (50,64 e 70,40 mg/100 g), o campesterol (8,58 e 6,83 mg/100 g) e o Δ^7 -estigmastanol (12,22 e 7,13 mg/100 g). O clerosterol, o campestanol e o Δ^7 -avenasterol foram encontrados em quantidades traços nas duas amostras.

Tabela 4

Fitosteróis (mg/100 g) em óleos de sementes de *Diploprerys pubipetala* e *Barnebya harleyi*.

| Fitosteróis | <i>Diploprerys pubipetala</i> | <i>Barnebya harleyi</i> |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| Colesterol | 0,90±0,07 | 0,53±0,11 |
| Campesterol | 8,58±0,02 | 6,83±0,46 |
| Estigmasterol | 18,82±0,63 | 2,52±0,04 |
| Clerosterol | 0,39±0,17 | 0,78±0,21 |
| β -Sitosterol | 50,64±0,06 | 70,40±0,83 |
| Campestanol | 0,10±0,02 | 0,20±0,02 |
| Δ^7 -Estigmastanol | 12,22±0,23 | 7,13±0,62 |
| Δ^7 -Avenasterol | 0,75±0,66 | 0,79±0,11 |
| Total | 85,06±2,1,89 | 89,20 ±2,36 |

Os valores são médias \pm DP de três determinações

O β -sitosterol é o fitosterol mais abundante em óleos vegetais e os teores encontrados nas amostras analisadas são próximos ao do azeite de oliva (73,2 mg/100 g) e de semente de uva (69,2%)(Feinberg et al., 1987; Besbes et al. 2004), e superior ao de dendê (25,2mg/100 g) (Belitz et al., 2004). O β -sitosterol predomina também na avelã (102,2 mg/100 g) e na macadâmia (147,7mg/100 g) e é encontrado em maiores quantidades no óleo de germe de trigo (2.510 mg/100g) (Schwartz et al. 2008), entretanto, esses compostos foram estudados para bem poucas espécies brasileiras.

Dentre os fitosteróis compartilhados pelas espécies analisadas, o Δ^7 -estigmastanol foi o segundo dos fitosteróis de frações mais elevadas, no óleo de *D. pubipetala* e *B. harleyi*, respectivamente, 12,22 e 7,13 mg/100 g,

Campesterol foi o terceiro composto em termos quantitativos em *D. pubipetala* e *B. harleyi*, respectivamente, 8,58 e 6,83 mg/100 g do óleo, valor muito inferior àqueles reportados para os óleos de milho (265,5 mg/100 g), soja (56,3 mg/100 g), amendoim (27,8 mg/100 g) e algodão (27,6 mg/100 g) e próximo do valor reportado para o óleo de dendê (8,8 mg/100g) (Belitz et al., 2004).

O estigmasterol contribui com 18,82 mg/100 g do total de fitosteróis do óleo de *D. pubipetala*, sendo superior ao encontrado em óleo de oliva (até 2,7 mg/100 g) (Schwartz, 2008), dendê (4,2 mg/ 100 g) e amendoim (14,5 mg/ 100 g) (Belitz, 2004) e constitui apenas 2,52 mg/100 g do óleo de *B. harleyi*.

Considerando que a necessidade de consumo médio diário de fitosteróis é de cerca de 250 mg/dia (Nair et al. 2006), a inclusão de cem sementes das espécies analisadas na dieta humana poderiam suprir quase um terço do total necessário.

Os teores totais de fitosteróis são muito variáveis, atingindo valores bastante elevados em óleos vegetais, como no óleo de milho (1364,7 mg/100 g) e valores mínimos em alguns frutos e hortaliças, como a batata (3,8 mg/100 g) (Firestone e Reina, 1996; Piironen et al., 2000; Belitz et al., 2004). No entanto, cada espécie vegetal é caracterizada por proporções relativamente constantes entre os vários fitosteróis, proporções essas que podem ser influenciadas por fatores genéticos, agrônômicos e climáticos (Piironen et al., 2000), permitindo que esses compostos possam ser utilizados para reconhecimento da autenticidade de óleos (Crane et al., 2005).

O mecanismo de ação pelo qual os fitosteróis (principalmente β -sitosterol, estigmasterol e campesterol) e fitostanois promovem a diminuição do colesterol plasmático está na habilidade de esses esteróis reduzirem a absorção intestinal do colesterol proveniente da dieta e bile em nível intestinal. Apesar de esses fitosteróis serem considerados potentes agentes redutores de colesterol, eles são absorvidos com considerável eficiência e alcançam no plasma concentrações de até 1% do colesterol total. Assim, os fitosteróis representam uma fonte segura na dieta para diminuir o colesterol plasmático (Berger et al., 2004; Cheikh-Rouhou et al., 2008).

4. Conclusão

Constata-se que, além de apresentarem alto teor de proteínas, as sementes das duas espécies de Malpighiaceae estudadas podem representar excelentes fontes de compostos bioativos (tocoferóis e fitosteróis). Os resultados justificam que mais investigações sejam realizadas para caracterizar os seus aminoácidos. Estudos sobre possível alergenicidade e toxicidade são necessários para estabelecer o real potencial para aproveitamento alimentar.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES pela Bolsa de Doutorado da autora Roberta Sampaio Pinho e também pelo estágio de doutoramento no Serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal.

Referências

- Adhikari, P., Hwang, K. T., Shin, M. K., Lee, B. K., Kim, S. K., Kim, S. Y., Lee, K., Kim, S. Z. 2008. Tocols in caneberry seed oils. *Food Chemistry*, 111, 687–690.
- Amaral, J.S.; Casal, S., Pereira, J. A., Seabra, R. M. A., Oliveira, B. P. P. 2003. Determination of Sterol and Fatty Acid Compositions, Oxidative Stability, and Nutritional Value of Six Walnut (*Juglans regia* L.) Cultivars Grown in Portugal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7698-7702.
- Andrade, E. H.A., Maia, J. G.S., Streich, R.; Marx, F. 1999. Seed Composition of Amazonian Lecythidaceae Species: Part 3 in the Series "Studies of Edible Amazonian Plants". *Journal of Food Composition and Analysis*, 12, 37-51.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th ed.; Horwitz, W., Ed.; AOAC: Arlington, VA, 2000. V. II, 40, 1-3.
- Asenjo, C. F.; Freire de Guzman, A. R. 1946. The high ascorbic acid content of the west indian cherry. *Science* 103: 219.
- Belitz, H-D., Grosch, W., Schieberle, P. 2004. Lipids. In: *Food Chemistry*. 3rd rev.ed.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, 231-232.

Berger, A., Jones, P.J.H., Abumweis, S.S., 2004. Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids in Health and Disease* 3, 5-23.

Besbes, S., Blecker, C., Deroanne, C., Bahloul, N., Lognay, G., Drira, N.E., Attia, H., 2004. Date seed oil: phenolic, tocopherol and sterol profiles. *Journal of Food Lipids* 11, 251–265.

Bramley, P.M., Elmadfa, I., Kafatos, A., Kelly, F.J.; Manios, Y.; Roxborough, H.E.; Schuch, W.; Sheehy, P.J.A.; Wagner, K.H. Review: Vitamin E. *J. Sci. Food Agric.* 80, 913-938. 2000.

Bozan, B., Temelli, F. Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 6354–6359. 2008.

Burton, G.W. Vitamin E: molecular and biological function. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 53, p. 251–262. 1994.

Burton, G.W., Traber, M.G., 1990. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annual Review of Nutrition* 10, 357–382.

Cheikh-Rouhoua, S., Besbes, S., Lognay, G., Blecker, C., Deroanne, C., Attia, H. 2008. Sterol composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) and Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seed oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 162–168

Crane, S., Aurore, G., Joseph, H., Mouloungui, Z., Bourgeois, P. 2005. Composition of fatty acids triacylglycerols and unsaponifiable matter in *Calophyllum calaba* L. oil from Guadeloupe. *Phytochemistry*, v. 66, p.1825–1831.

Creppaldi, I. C., Almeida-Muradian, L. B., Rios, M. D. G., Pentead, M. V. C., Salatino, A. 2001. Composição nutricional do fruto de licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari). *Revista Brasileira de Botânica*, 24, 155-159.

Cunha, S. C., Amaral, J. S., Fernandes, J. O., Oliveira, M. B. P. P. 2006. Quantification of tocopherols in Portuguese olive oils using HPLC with three different detection systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3351–3356.

Demurin, Y., Skoric, D., Karlovic, D. 2006. Genetic variability of tocopherol composition in sunflower seeds as a basis of breeding for improved oil quality. *Plant Breeding*, 115, 33-36.

Eskin, N. A. M.; Przybylski, R. 2001. Antioxidants and Shelf Life of Foods. In *Food Shelf Life Stability: Chemical, Biochemical, and Microbiological Changes*. Eskin, N.A.M.; Robinson, D.S., Eds., CRC Press: Boca Raton, US.

Feinberg, M., Favier, J.C., Ireland-Ripert, J., 1987. Répertoire général des aliments. In: Tables de Composition des Corps Gras, Lavoisier-Tec & Doc, INRA Editions, Paris.

Finley, J. W. 2005. Selenium Accumulation in Plant Foods. *Nutrition Reviews*, 63, 196–202.

Firestone, D.; Reina, R.J. Authenticity of vegetable oils. 1996. In: Food authentication. Ashurst, P.R.; Dennis, M.J., Eds., Chapman & Hall: London.

Goh, S.H., Hew, N.H., Norhanom, A.W., Yadav, M. 1994. Inhibition of tumor promotion by various palm-oil tocotrienols. *International Journal of Cancer*, 57, 529–531.

Harrabi, S.; ST-Amand, A.; Sakouhi, F.; Sebei, K.; Kallel, H.; Mayer, P. M.; Boukhchina, S. 2008. Phytosterols and phytostanols distributions in corn kernel. *Food Chemistry*, v. 111, p. 115–120.

Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L.A., Yousif, G. Lignan analysis in seed oils from four *Sesamum* species. Comparison of different chromatographic methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 71, p. 141–147. 1996.

Khanna, S., Roy, S., Ryu, H., Bahadduri, P., Swaan, P.W., Ratan, R.R., Sen, C. K., 2003. Molecular basis of vitamin E action: tocotrienol modulates 12- lipoxygenase, a key mediator of glutamate-induced neurodegeneration. *Journal of Biological Chemistry* 278, 43508–43515.

Kochar, S.P. 1983. Influence of processing on sterols of edible vegetable oils. *Prog. Lipid. Res.* 22,161-188.

Lee, S. M.; Lee, J. 2006. Tocopherol and tocotrienols contents of vegetable oils, margarines, butters, and peanut butters consumed in the Korean diet. *Food Science and Biotechnology*, 15, 183–188.

Li, D., Saldeen, T., Romeo, F., Mehta, J.L. Relative effects of alpha- and gamma-tocopherol on low-density lipoprotein oxidation and superoxide dismutase and nitric oxide synthase activity and protein expression in rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, v. 4, p. 219–226. 1999.

Lorenzi, H. 1992. *Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*, Editora Plantarum Ltd. São Paulo, Brasil: Nova Odessa.

Mishima, K., Tanaka, T., Pu, F., Egashira, N., Iwasaki, K., Hidaka, R., Matsunaga, K., et al. 2003. Vitamin E isoforms α -tocotrienol and γ -tocopherol prevent cerebral infarction in mice. *Neuroscience Letters*, 337, 56–60.

Murphy, S. P., Subar, A. F., & Block, G. 1990. Vitamin E intakes and sources in the United States. *American Journal of Clinical Nutrition*, 52, 361–367.

Moyad, M.A., 2005. An introduction to dietary/supplemental omega-3 fatty acids for general health and prevention. Part I. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 23, 23–35.

Nair, V. D. P., Kanfer, I., & Hoogmartens, J. 2006. Determination of stigmasterol, bsitosterol and stigmasterol in oral dosage forms using high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41, 731–737.

National Research Council, 1974. Recommended daily dietary allowance. Nutr. Rev. 31, 373–395.

Nesaretnam, K., Guthrie, N., Chambers, A.F., Carroll, K.K., 1995. Effect of tocotrienols on the growth of a human breast cancer cell line in culture. Lipids 30, 1139–1143.

NP EM ISO 1228. Animal and vegetable fats and oils – Determination of individual and total sterols contents – Gas chromatographic method. 1999.

Oliveira, J.T.A.; Vasconcelos, I.M.; Bezerra L.C.N.M.; Silveira, S.B.; Monteiro, A.C.O.; Moreira, R.A. 2000. Composition and nutritional properties of seeds from *Pachira aquatica* Aubl, *Sterculia striata* St Hil et Naud and *Terminalia catappa* Linn. Food Chemistry, 70, 185- 191.

Oomah, B. D.; Mazza, G. 1999. Health benefits of phytochemicals from selected Canadian crops. Trends in Food Science & Technology, 10, 193-198.

Parcerisa, J., Rafecas, M., Castellote, A.I., Condon, R., Farrà, J., Garcia, J., Gonzalez, C., López, A., Romero, A., Boatella, J. 1995. Influence of variety and geographical origin on the lipid fraction of hazelnut (*Corylus avellana* L.) from Spain: (III) Oil stability, tocopherol content and some mineral contents (Mn, Fe, Cu). Food Chemistry, 53, 71-74.

Pena, F.; Cárdenas, S.; Gallego, M.; Valcárcel, M. 2005. Direct olive oil authentication: Detection of adulteration of olive oil with hazelnut oil by direct coupling of headspace and mass spectrometry, and multivariate regression techniques. Journal Chromatography A 1074, 215-221.

Prathiba, K. M., Reddy, M. U. 1994. Nutrient composition of groundnut cultures (*Arachis hypogaea* L.) in relation to their kernel size. Plant Foods for Human Nutrition 45, 365 – 369.

Piironen, V.; Lindsay, D.G.; Miettinen, T.A.; Toivo, J.; Lampi, A. 2000. Review. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. Journal of The Science of Food and Agriculture, 80, 939-966.

Pinho, R.P.; Oliveira, A.F.M.; Silva, S.I. Potential oilseed crops from the semiarid region of northeastern Brazil. Bioresource Technology, v. 100, p. 100 6114–6117. 2009.

Qureshi, A.A., Bradlow, B.A., Brace, L., Manganello, J., Peterson, D.M., Pearce, B.C., Wright, J.J., Gapor, A., Elson, C.E., 1995. Response of hypercholesterolemic subjects to administration of tocotrienols. *Lipids* 30, 1171–1177.

Ramadan, M.F., Möersel, J-T. 2004. Oxidative stability of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and Niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) crude seed oils upon stripping. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106, 35–43.

Ramadan, M. F., Moersel, J-T. 2006. Screening of the antiradical action of vegetable oils. *Journal of Food Compositions and Analysis*, 19,838-842.

Ryynänen, M., Lampi, A.-M., Salo-Väänänen, P., Ollilainen, V., Piironen, V. 2004. A small-scale sample preparation method with HPLC analysis for determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 749–765.

Saldeen, K., Saldeen, T. 2005. Importance of tocopherols beyond α -tocopherol: evidence from animal and human studies. *Nutr. Res.* 25, 877–889.

Savage, G. P.; Dutta, P. C.; McNeil, D. L. 1999. Fatty acid and tocopherol contents and oxidative stability of walnut oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76, 1059-1063.

Schwartz, H.; Ollilainen, V.; Piironen, V.; Lampi, A. Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 21, p. 152–16. 2008.

Sen, C. K., Khana, S. Roy, S. 2006. Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. *Life Sciences*, 78, 2088–2098.

Shahidi, F., Shukla, V.K.S. 1996. Nontriacylglycerol constituents of fats, oils. *Inform* 7, 1227–1232.

Schwenke, D.C. 2002. Does lack of tocopherols and tocotrienols put women at increased risk of breast cancer? *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 2–20.

Schultes, R.E., Raffauf, R.F. *The healing forest*. Portland (OR): Dioscorides Press; 1990. p. 274–80.

Stuchlík, M., Zák, S., 2002. Vegetable lipids as components of functional foods. *Biomedical Papers* 146, 3–10.

Takemoto, E., Okada, I.A., Garbelotti, M.L., Tavares, M., Aued-Pimentel, S. 2001. Chemical composition of seeds and oil of baru (*Dipteryx alata* Vog.) native from Pirenópolis, State of Goiás, Brazil. *Goiás. Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 60, 113–117.

The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2009, 161, 105–121.

Tyagi, P.D., Kakkar, K.K. *Non-conventional vegetable oils*. New Delhi: Batra book Service; 1991.

Vallilo, M. I., Caruso, M. F.S., Takemoto, E. Pimentel, S-A. 2007. Caracterização química e físico-química do óleo das sementes de *Platymiscium floribundum* Vog. (sacambu), colhidas na fase de desenvolvimento e na época de maturação fisiológica. *Revista do Instituto Florestal*, 19, 73-80.

Artigo 2

Composição centesimal e bioativos do óleo de sementes de *Couroupita guianensis* (Lecythidaceae), *Croton adamantinus* (Euphorbiaceae) e *Hippocratea volubilis* (Celastraceae)

R.S. Pinho^a, S. Casal^b, E. Mendes^b, S.I. Silva^a, M.B.P.P Oliveira^b

^a*Laboratório de Recursos Econômicos e Fitoquímica, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.*

^b*REQUIMTE, Serviço de Farmacognosia e Bromatologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal.*

Artigo a ser enviado à Bioresource Technology



Composição centesimal e bioativos do óleo de sementes de *Couroupita guianensis* (Lecythidaceae), *Croton adamantinus* (Euphorbiaceae) e *Hippocratea volubilis* (Celastraceae)

R.S. Pinho^a, S. Casal^b, E. Mendes^b, M.B.P.P Oliveira^b, S.I. Silva^a

^aLaboratório de Recursos Econômicos e Fitoquímica, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

^bREQUIMTE, Serviço de Farmacognosia e Bromatologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

Resumo

Sementes de *Couroupita guianensis*, *Croton adamantinus* e *Hippocratea volubilis* foram analisadas em relação à composição centesimal, tocois, estabilidade oxidativa e fitosteróis do óleo. O teor de proteína foi de 9,6 g/100 g em *Hippocratea volubilis*, de 18,4 g/100 g em *Couroupita guianensis* e atingiu 20,9 g/100 g em *Croton adamantinus*. O teor de carboidratos mais fibras nas sementes foi de 33,8 g/100 g em *C. adamantinus*, 32,9 g/100 g em *Hippocratea volubilis* e 31,5g/100 g em *C. guianensis*. O óleo de *C. adamantinus* apresentou o maior teor total de tocois (67,2 mg/100 g), seguido pelo de *H. volubilis* (39,5 mg/100 g) e *Couroupita guianensis* (25,1 mg/100 g). O teor de α -tocoferol do óleo de *C. guianensis* (20,2 mg/100 g) foi o mais elevado. Os teores mais elevados de γ -tocoferol foram encontrados no óleo de *C. adamantinus* com 63,3 mg/100 g, seguido de *H. volubilis* com 37,5 mg/100g. Os fitosteróis de *C. adamantinus*, *H. volubilis* e *C. guianensis*, totalizam, respectivamente, 91,57, 82,21 e 79,81 mg/100 g, β -sitosterol (71,85, 62,64 e 15,28 mg/100 g), campesterol (9,74, 3,08 e 0,58 mg/100 g) e Δ^7 -estigmastanol (5,97, 12,26 e 0,58 mg/100 g) sendo os mais abundantes. Clerosterol, campestanol e Δ^7 -avenasterol foram encontrados em quantidades traços nas amostras estudadas. Δ^7 -Avenasterol não foi detectado em *C. guianensis*.

Palavras-chave: Tocoferóis, fitosteróis, carboidratos, de *Couroupita guianensis*, *Croton adamantinus* e *Hippocratea volubilis*

*Correspondência do autor: Tel.: +55-81-3302-6350
E-mail: rsampaio@gmail.com

1. Introdução

Couroupita guianensis, *Croton adamantinus* e *Hippocratea volubilis* são espécies tropicais com elevado teor de óleo nas sementes e grande possibilidade de serem aproveitadas como fontes de ácidos graxos essenciais (linoleico e linolênico) e incomuns, como o azelaico e o petroselinico (Pinho et al., 2009; Andrade et al., 1999).

As sementes de *C. guianensis* Aublet (Lecythidaceae) são consideradas de sabor agradável, com 29,4 % de óleo composto principalmente de ácido linoleico (82,7 %) e os seus frutos são chamados de “abricó-de-macaco” no Brasil e “Cannon ball” na Guiana Inglesa. A polpa e sementes são comidas por roedores, porcos e macacos (Lago et al., 1987; Andrade et al., 1999).

Dos frutos secos de *C. guianensis* podem ser obtidas substâncias com amplo espectro de propriedades terapêuticas e ação bactericida, antiprotozoária, antitumorais e antivirais, como a triptantrina, o indigo, a indirrubina e a isatina. A isatina (1H-indol-2,3-diona) se constitui em uma molécula de grande interesse para aplicações tecnológicas, devido à grande versatilidade como precursora para biossíntese de compostos orgânicos, ocorrendo em plantas do gênero *Isatis* (Brassicaceae), em *Calanthe discolor* Lindl. (Orchidaceae) e em *C. guianensis* (Bergman et al. 1985; Silva et al., 2001).

Croton é o segundo maior gênero de Euphorbiaceae, compreendendo cerca de 1.300 espécies, sendo a maioria de origem americana, e com mais de 200 espécies paleotrópicas (Webster, 1994). Quimicamente é rico em compostos com atividade biológica, principalmente diterpenos, tais como ésteres de forbol,

clerodano, labdano, caurano, traquilobânico, pimarano, alcalóides ativos e óleos essenciais (Webster, 1994; Salatino et al., 2007).

C. adamantinus Mull. Arg. é nativo e abundante no semiárido do Nordeste do Brasil, denominado localmente “marmeleiro-preto ou canelinha” e suas sementes contém 37 % de óleo com respectivamente, 44 % e 45 % dos ácidos graxos linoleico e linolênico (Silva, 1998; Pinho et al., 2009).

As sementes de *Hippocratea volubilis* L. apresentam de 45,3 % a 50 % de óleo e é comestível apesar de não possuir sabor agradável, o que se deve, provavelmente, à presença de ácidos graxos incomuns, como o ácido azelaico e petroselinico (Pesce, 1985; Pinho et al., 2009).

H. volubilis (Celastraceae) é nativa das Américas, conhecida como “cipó preto, cipó-estopinho, bejuco-preto e fava-de-arara”, usada na medicina caseira como expectorante (Pio Corrêa, 1984; Milward-de-Azevedo, 2006). Plantas desse gênero e família têm primordialmente interesse medicinal, como, por exemplo, substâncias com atividade analgésica, cicatrizante, anticancerígena e anti-inflamatória presentes em cascas do caule de *Hippocratea excelsa* H.B.K., folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Rissek e óleo de *Celastrus paniculatus* Willd. (Cáceres-Castillo et al., 2008, Ahmad et al., 1994, Ramadan et al., 2009).

Muitos trabalhos têm enfatizado a ingestão de sementes oleaginosas, a fim de se prover na dieta humana substâncias bioativas que, ao reduzir os riscos relacionados a doenças cardiovasculares, possam repercutir na melhoria da saúde e na redução dos gastos no tratamento de seqüelas que se constituem atualmente na primeira causa de incapacitação ao trabalho no mundo (Yang, 2009).

Embora *C. guianensis*, *C. adamantinus* e *H. volubilis* se constituam em fontes não convencionais para obtenção de óleos, Ramadan et al., (2006)

ênfatizam que plantas oleaginosas não tradicionais representam importante fontes de fitoquímicos com atividade antioxidativa, tendo em vista que grande parte dos constituintes minoritários com efeitos pro-oxidativos, como os ácidos graxos livres e hidroperóxidos, bem como antioxidativos, como tocoferóis, fenois e fosfolipídios, são usualmente removidos no processo de refinamento pelos quais passam as oleaginosas tradicionais.

O interesse pelos antioxidantes presentes em sementes tem crescido muito em função de sua capacidade em aumentar a estabilidade oxidativa de óleos como acontece com os tocois (Warner e Frankel, 1987) e dos benefícios que trazem na dieta humana ao prevenirem a absorção de colesterol intestinal e biliar, como fazem os fitosteróis, reduzindo os riscos de doenças relacionadas ao sistema cardiovascular. Apesar da reconhecida importância dos tocois o número de investigações reportadas para tocois presentes em espécies que não são tradicionalmente utilizadas na alimentação ainda é bastante limitado (Ramadan et al., 2009).

Assim, tomando-se em consideração o teor de óleo e tipos de ácidos graxos presentes nas espécies *C. guianensis*, *C. adamantinus* e *H. volubilis* e a importância que vem sendo dada na atualidade a novas fontes de ácidos graxos essenciais, para se incluir em uma dieta saudável ou para obtenção de fitoquímicos, este trabalho objetivou complementar o conhecimento no que diz respeito à composição centesimal, tocois, estabilidade oxidativa e fitosteróis, a fim de contribuir com informações que subsidiem um possível aproveitamento dessas espécies como oleaginosas não convencionais.

2. Materiais e métodos

2.1 Amostras

Os frutos maduros de *Croton adamantinus* Euphorbiaceae, *Hippocratea volubilis* Celastraceae e *Couroupita guianensis* Lecythidaceae, foram colhidos no estado de Pernambuco – Brasil, no período janeiro de 2007 a maio de 2008. No laboratório as sementes foram retiradas manualmente dos frutos e armazenadas a 4° C até o momento da análise.

2.2 Composição centesimal

A umidade foi determinada em estufa (Scaltec, Goettingen, Germany) a 105°C ± 2°C com 5 g da amostra. O conteúdo de nitrogênio foi estimado pelo método de Kjeldhal, (AOAC, 2000) e a proteína total foi calculada (N x 6,25). O teor total de lipídio e as cinzas foram determinados de acordo com o método oficial da AOAC (2000). O conteúdo de carboidratos mais fibras alimentares foi estimado pela diferença dos outros componentes, usando-se a seguinte fórmula: Conteúdo de carboidrato + fibras alimentares = 100% - (% de umidade + % de proteína + % de lipídeo + % de cinzas).

2.3 Conteúdo de tocois

O óleo foi extraído em soxhlet utilizando como solvente *n*-hexano (Merck, Darmstsd, Germany) durante oito horas. Após extração, o solvente foi evaporado e a umidade restante removida sob corrente de nitrogênio. O óleo obtido foi conservado em frascos de vidro, envoltos em papel de alumínio e armazenados a 4 °C até análise.

Uma amostra de 0,5 g de óleo das sementes foi pesada em frasco âmbar de 4 mL, e foi adicionado 1 mL de *n*-hexano. Uma alíquota da mistura homogeneizada (1 mL) foi transferida para um frasco âmbar de 1,5 mL e 300 µL de solução do padrão interno (tocol 250 mg/L, Matreya, Pleasant Gap, PA) foi adicionado e mais 200 µL de *n*-hexano foi adicionado para completar o volume. Os tubos foram homogeneizados por 30 segundos. Todos os passos da preparação foram executados em sala escura e as amostras mantidas no escuro e refrigeradas até análise (Cunha et al., 2006).

As amostras foram injetadas no sistema de HPLC em Cromatógrafo Jasco (Tóquio, Japão) equipado com uma bomba Jasco (modelo PU-980), com injetor automático Jasco (modelo AS-950) e com um “loop” de 10 µl com detector de fluorescência Jasco (modelo FP-920) programado com λ (excitação) = 290 nm e λ (emissão) = 330 nm. Foi usada uma coluna Inertsil 5 SI, 250 x 3 mm, 5 µm de tamanho de partícula (Varian, The Netherland) operando em temperatura ambiente (20 °C).

Os dados cromatográficos foram analisados utilizando o software Borwin (JMBS, França). Os compostos foram identificados por comparação dos tempos de retenção e dos espectros UV com padrões de referência (α -, β -, γ - e δ -tocoferol e α -, β -, γ - e δ -tocotrienol, Calbiochem, La Jolla, CA). A quantificação dos compostos foi feita com base no sinal obtido pelo detector de fluorescência, utilizando o método do padrão interno.

2.4 Estabilidade oxidativa

O tempo de indução da oxidação foi mensurado com aparelho Rancimat (Metrohm CH serie 679, Harisau, Switzerland). No óleo (3,0 mL), aquecido a $110 \pm$

0,2 °C, fez-se borbulhar um fluxo de ar de 20 L/h. Os componentes voláteis liberados durante a oxidação foram coletados em células contendo água e o aumento da condutividade da solução foi continuamente mensurado. O tempo tomado até atingir o ponto de inflexão da condutividade foi registrado como tempo de indução (Amaral et al., 2003).

2.5 Composição em esteróis

A composição em esteróis foi avaliada por GC-FID seguindo o método da NP EN ISO 12228 (1999). Depois da adição de 1 mL de solução padrão interno (betulina 1,0 mL, Sigma, St. Louis, MO, USA) a 250 mg do óleo, procedeu-se à sua saponificação com solução metanólica de hidróxido de potássio; a fração insaponificável foi obtida por análise em coluna de óxido de alumínio, a fração de esteróis sendo purificada, após a eluição da coluna, por cromatografia em camada fina (Merck, Darmstadt, Germany), usando *n*-hexano/éter dietílico 1:1(v/v) como solvente para desenvolvimento. A visualização das bandas foi conseguida com nebulização com metanol.

Os ésteres trimetilsilílicos foram obtidos com a adição de 1-metilimidazol e N-metil-N-(trimetilsilil)-heptafluorobutiramida (MSHFBA, Sigma e Macherey-Nagel, Düren, Germany). O perfil dos esteróis foi analisado em Cromatógrafo Chrompack CP 9001 (Chrompack, Middelburg, The Netherlands) com injetor “split-splitless”, detector de ionização de chama (FID), injetor automático CP-9050, com uma coluna DB-5MS (J & W Scientific, Folsom, CA) de 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm operando em temperatura máxima de 325 °C. A temperatura tanto do injetor quanto do detector, foram de 320 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 250 °C aumentando-se até 300 °C, numa razão de 2 °C / min, permanecendo na

temperatura final durante 12 min. O Hélio foi utilizado como gás de arraste com pressão de 100 kPa. A razão do split foi 1:50 e o volume injetado foi de 1,5 µL.

O teor total de esteróis foi determinado considerando todos os picos dos esteróis eluídos entre o colesterol e o Δ^7 -avenasterol. A identificação foi feita comparando os tempos de retenção relativos das amostras com os obtidos com os padrões. Foram usados padrões para identificação adquiridos da Sigma (St. Louis, MO) incluindo colestanol, colesterol, campesterol, estigmasterol, β -sitosterol, β -sitostanol e betulina.

3. Resultados e discussão

3.1 Composição centesimal das sementes

Os resultados da composição centesimal das sementes das espécies estudadas são mostrados na tabela 1.

O teor de proteína foi de 9,6 g/100 g em *Hippocratea volubilis*, de 18,4 g/100 g em *Couroupita guianensis* e atingiu 20,9 g/100 g em *Croton adamantinus*. Esses valores são inferiores aos de oleaginosas tradicionais, como o amendoim (*Arachis hypogaea* L). (25-28%) e da soja (*Glycine max* L.) (38,9-41,8%) (Redondo-Cuenca et al., 2006).

Comparado a outras Euphorbiaceae, *C. adamantinus* teve teor proteico inferior a outras espécies do semiárido do nordeste brasileiro, como *Jatropha molissima* Pohl Baill. (40,9 g/100 g) (Mayworm et al., 1998), superior a *Ditaxis heterantha* Zucc. (18,8 g/100 g), do México e a *Caryodendron orinocense* Karst. (17,16g/100 g), sendo a última espécie utilizada na alimentação humana na Amazônia venezuelana e cuja farinha foi reconhecida como tendo propriedades semelhantes à da soja para aplicação industrial (Padilla et al., 1998).

Em algumas espécies de *Croton*, como *tiglium* L. ocorrem proteínas tóxicas, como a crotina (Stirpe et al. 1976), sendo por isso importante que mais estudos sejam realizados para investigar a ocorrência dessa substância ou de outras que sejam antinutricionais, em *C. adamantinus*.

Tabela 1

Composição centesimal (mg/100 g) das sementes de *Couroupita guianensis*, *Croton adamantinus* e *Hippocratea volubilis*

| Composição | <i>C. guianensis</i> | <i>C. adamantinus</i> | <i>H. volubilis</i> |
|----------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|
| Proteína (N x 6,25) | 18,4±1,43 | 20,9±1,26 | 9,6±0,26 |
| Carboidrato + fibras | 31,5±1,38 | 33,8±0,97 | 32,9±0,77 |
| Óleo | 35,5±0,23 | 36,5±0,06 | 49,9±0,89 |
| Cinzas | 7,78±1,07 | 2,54±0,55 | 2,13±0,48 |
| Umidade | 6,77±1,32 | 6,30±0,67 | 5,48±0,58 |

Os valores são médias ± DP de três determinações.

O teor de proteína de *C. guianensis* foi semelhante ao reportado por Andrade et al. (1999) em indivíduos da mesma espécie coletados na região Amazônica (17,0g/100 g) e superior ao encontrado nas Lecythidaceae, castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa* H.B.K) com 13,6g/100 g, *Lecythis usitata* Miers. (15,1 g/100 g) e *Allantoma lineata* Miers. (10,0g/100 g) (Andrade et al., 1999).

Nas espécies analisadas, o teor de carboidratos mais fibras alimentares foi maior do que o de proteínas (Tabela 1) sendo maiores do que os presentes em sementes de *L. usitata* (15,4 g/100 g), *A. lineata* (20,6 g/100 g) e *B. excelsa* (10,3 g/100 g) (Andrade et al., 1999).

As sementes de *C. guianensis*, *C. adamantinus* e *H. volubilis* rendem entre, 35,5 - 49,9 g/100 g, de óleo (Tabela 1) e são visualmente bem distintos.

O óleo de *H. volubilis* tem aspecto bastante viscoso e cor amarelo-esverdeado. O óleo de *C. adamantinus* é bastante fino e de cor clara, mas não transparente.

Já o óleo de *C. guianensis* é fino e de cor forte (rosa-cereja) e após dois meses, observa-se em temperatura ambiente (27 °C) mudança na coloração do óleo acompanhada de um precipitado de cor azul nos frascos. Os pigmentos encontrados nesse óleo são desprendidos do tegumento da semente e podem estar relacionados com substâncias descritas por Silva et al. (2001) e Bergman et al. (1985) como o indigo, a indirubina e a isatina, presentes nos frutos. Além disso, os frutos e sementes apresentam odor forte, lembrando aquele do enxofre. Assim, o óleo de *C. guianensis* é caracteristicamente muito diferente dos óleos vegetais utilizados na alimentação e indústria.

C. guianensis apresentou um pouco mais de óleo (35,5 g/100 g) em relação aos teores reportados por Lago et al. (1987) e Andrade et al. (1999), respectivamente 29,4 e 30,0 g/100 g, extraído de sementes coletadas na região Amazônica, sendo aproximadamente a metade daquela encontrada em *B. excelsa* (66,8 g/100 g, Andrade et al., 1999). Diferenças quantitativas e qualitativas na composição química de sementes podem ocorrer na dependência do estado de maturidade e influência das condições edafoclimáticas. Efeitos desse tipo foram relatados por Rahman et al. (1999) na composição química das sementes de *Artocarpus hererophyllus* Lam. (Moraceae).

Andrade et al. (1999) reportam que as sementes de *C. guianensis* são consideradas comestíveis e de sabor agradável. Zuo e Sun (1996) encontraram um teor notável de metionina nestas sementes. Lago et al. reportaram elevada concentração do ácido linoleico (82,7 %), que foi por nós também verificada (82,9 %) (dado não publicado). Assim, baseando-se na composição centesimal e a excelente qualidade do óleo de *C. guianensis*, que se destaca por possuir um dos maiores teores de ácido linoleico em sementes, verifica-se que há grande

possibilidade de aproveitá-la na alimentação humana ou como fonte desse ácido graxo.

O conteúdo de cinzas em *C. guianensis* (7,7 g/100 g) diferiu do reportado por Andrade et al. (1999) para exemplares da mesma espécie coletados na região Amazônica (3,0g/ 100 g), sendo também maior do que o de outras espécies de Lecythidaceae, como *Allantoma lineata* (2,6 g/100 g), *Bertholletia excelsa* (3,6 g/100 g) e *Lecythis usitata* (3,8 g/ 100 g) (Andrade et al., 1999). Assim, tendo em vista que *C. guianensis* além de elevado teor de cinzas é da mesma família da castanha-do-Pará (*B. excelsa*), que é uma espécie conhecida pelo elevado teor de selênio, um mineral que possui ação antioxidativa, antitumoral e estimuladora do sistema imune (Finley, 2005), torna-se interessante investigar o conteúdo de sais minerais presentes em sementes de *C. guianensis*.

Os teores de cinzas de *C. adamantinus* (2,54 g /100 g) e *H. volubilis* (2,13 g/100 g) foram baixos e menores do que os valores determinados por Ajayi (2008) para as sementes de *Arthocarpus hererophyllus* (6,72 g/100 g) e *Treculia africana* Decne. ex Trécul (5,57 g/100 g) (Moraceae), utilizadas na alimentação humana.

Considerando os teores significativos de carboidratos presente nas espécies analisadas e o teor de cinzas de *C. guianensis*, o aproveitamento da torta das sementes para a ração animal é indicado.

Os teores de umidade nas três espécies estudadas situam-se entre 5,48 g/100 g e 6,77 g/100 g, valores semelhantes aos achados para as sementes de *Linum usitatissimum* L. (linhaça) (6,4 g/100 g), *Papaver somniferum* L. (papoula) (5,3 g/100 g) e *Bixa orellana* L. (açafraão) (6,1 g/100 g) (Bozan e Temelli, 2008).

3.2 Tocois e estabilidade oxidativa

A tabela 2 apresenta o total de tocois para o óleo extraído das sementes das três espécies analisadas. *Croton adamantinus* apresentou o maior teor total de tocois (67,2 mg/100 g), seguidos por *H. volubilis* (39,5 mg/100 g) e *Couroupita guianensis* (25,1 mg/100 g). Os totais de tocois das espécies analisadas foram inferiores ao encontrado no óleo comercial de soja (99,9 mg/100 g) (Adhikari et al. 2008) e de dendê (117,2 mg/100 g), que é considerado fonte natural de tocois, mas superiores ao do amendoim (29,15 mg/100 g) (Belitz et al., 2004). Os totais de tocois no óleo da Celastraceae, *Celastrus paniculatus* Willd. (156 mg/100 g) (Ramadan et al., 2009) também foram superiores ao de *H. volubilis*.

Na família Euphorbiaceae, Bruni et al. (2004) reportaram teores variáveis de tocois, tendo sido encontrado em *Euphorbia pithyusa* L. o teor de 56,02 mg/100 g, próximo daquele de *C. adamantinus* (67,2 mg/100 g), enquanto em *E. semiperfoliata* Viv. o valor foi superior (93,8 mg/100 g) e bem menor do que o de *E. dendroides* L. (15,01 mg/100 g).

α -Tocoferol (α -T), γ -tocoferol (γ -T) e γ -tocotrienol (γ -T3) foram detectados em todos os óleos analisados. α -Tocotrienol (α -T3) e β -tocoferol foram detectados apenas no óleo de *C. guianensis*. Os tocois majoritários foram o α -T e γ -T que, de acordo com Schwartz et al. (2008), são os principais tocois de óleos e gorduras vegetais.

Tabela 2

Conteúdo de tocois (mg/100 g) nos óleos das sementes de *Couroupita guianensis*, *Croton adamantinus* e *Hippocratea volubilis* e estabilidade oxidativa (EA) e ácidos graxos insaturados (%) (AGI)

| Tocois | Espécies | | |
|--------------|----------------------|-----------------------|---------------------|
| | <i>C. guianensis</i> | <i>C. adamantinus</i> | <i>H. volubilis</i> |
| α -T | 20,2 \pm 4,4 | 0,3 \pm 0,0 | 0,9 \pm 0,0 |
| α -T3 | 0,2 \pm 0,2 | - | - |
| β -T | 0,1 \pm 0,0 | - | - |
| γ -T | 4,0 \pm 0,0 | 63,3 \pm 3,2 | 37,5 \pm 6,9 |
| γ -T3 | 0,4 \pm 0,2 | 3,5 \pm 1,2 | 1,0 \pm 0,1 |
| Total | 25,1 \pm 5,1 | 67,2 \pm 1,4 | 39,5 \pm 3,1 |
| EO (h) | 7,80 | 2,0 | 4,57 |
| AGI | 82,7** | 92,9* | 30,8* |

Os valores são médias \pm DP de três determinações; - = não detectados

* Pinho et al. (2009) ** Lago et al. (1987)

Os tocois distribuem-se de forma diferenciada nos órgãos vegetais, sendo o α -T o que predomina em folhas e nas membranas dos tilacóides, enquanto o γ -T é a forma majoritária presente nas sementes (Grusak e Dellapenna, 1999).

O teor de α -T em *C. guianensis* (20,2 mg/100 g) foi o mais elevado, sendo próximo ao encontrado no óleo de dendê (25,6 mg/100 g) e superior ao dos óleos de soja (17,09 mg/100 g) e amendoim (14,1 mg/100 g) (Belitz et al., 2004), situando-se na faixa de variação do azeite de oliva, que é de 9-26 mg/100 g de óleo (Cunha et al., 2006).

Apesar do baixo conteúdo de tocois totais, as sementes de *C. guianensis* apresentaram 20,2 mg/100 g de α -T no óleo, que é bem superior ao reportado por Andrade et al. (1999) para o óleo de sementes de indivíduos desta espécie (4,7 mg/100 g) coletadas no estado do Pará (Região da Amazônia brasileira). Mesmo assim, o valor de α -T encontrados em *C. guianensis*, é mais elevado do que o referido para as outras espécies de mesma localidade e família como *Allantoma lineata* (1,54 mg/100 g), *Bertholletia excelsa* (0,78 mg/100 g) e *Lecythis usitata* (0,35 mg/100 g) (Andrade et al., 1999).

O teor de γ -T do óleo de *C. adamantinus* (Tabela 2) pode ser considerado elevado e situa-se próximo do encontrado nos óleos de soja (60,4 mg/100 g) e milho (56,6 mg/100 g) Belitz et al. (2004). Já no óleo de sementes de *Aleurites montana* E. H. Wilson (Euphorbiaceae), Matthaus et al. (2003) encontraram 12,06 mg/100 g de γ -T, um teor muito inferior ao de *C. adamantinus*. Outras espécies reportadas com elevado teor de γ -T e perspectiva de aproveitamento alimentar incluem *Amaranthus mangostanus* L. (Amaranthaceae) com 58,0 mg/100 (Matthaus et al., 2003) e *Platymiscium floribundum* Vog. (Fabaceae) com 88,1 mg/100 g (Vallilo et al., 2007).

C. adamantinus com 3,5 mg/100 g apresentou maior teor de γ -T3, dentre as três espécies analisadas (Tabela 2). Os totais de γ -T3 destas três espécies foram iguais ou superiores ao reportado para o óleo de coco-da-Bahia (*Cocos nuciferae* L.) (0,4mg/100 g) Belitz et al. (2005).

O óleo da semente de *C. adamantinus* foi o mais rico em tocois totais. Constata-se uma relação positiva entre o elevado teor de ácidos insaturados (92,9%), reportado por Pinho et al. (2009), e os níveis totais de tocol. Entretanto, apesar de o óleo de *C. guianensis* conter teor de ácidos graxos insaturados semelhantes (80 %), essa relação positiva não foi observada.

A atividade antioxidante dos tocoferóis tem sido estudada, sendo explicada quimicamente pela presença de um grupo hidroxila no seu anel aromático, permitindo a doação de um átomo de hidrogênio a um radical livre (Hall, 2001).

Apesar de o α -T ser considerado o isômero biologicamente mais ativo, acredita-se que, de modo geral, esses compostos poderão estar envolvidos numa diversidade de funções fisiológicas e bioquímicas, principalmente devido à sua

capacidade antioxidante e também pela sua ação em nível da estabilidade das membranas (Kamal-Eldin e Appelqvist, 1996).

A principal atividade do α -T é a de antioxidante de radicais livres em membranas e lipoproteínas, bem como nos alimentos (Kamal-Eldin e Appelqvist, 1996). Por isso, acredita-se que esses compostos reduzem o risco de doenças cardiovasculares e de certos tipos de câncer (Burton, 1994). O γ -tocoferol, por exemplo, tem sido relatado como o mais potente tocoferol, diminuindo a agregação plaquetária, a oxidação de LDL (lipoproteína de baixa densidade) e retardando a formação de trombo intra-arterias (Li et al., 1999). Os tocotrienóis também têm sido relatados como inibidores da biossíntese do colesterol e relacionados à redução do risco do câncer de mama (Schwenke, 2002).

Os valores da estabilidade oxidativa (EO) apresentaram grande amplitude de variação desde 2 h para *C. adamantinus* a 7,8 h para *C. guianensis* (Tabela 2).

O óleo das sementes de *C. adamantinus* fornece o valor mais baixo de EO (2 h), um pouco menor do que o do óleo de *Jatropha curcas* (2,56 h) (Sarin et al., 2009) e do óleo de nozes (*Juglans regia* L.), que variou de 2,7 a 3,4 h (Amaral et al., 2003). Savage et al. (1999) acreditam que óleos com elevado conteúdo de ácidos graxos insaturados, como é o caso dessas espécies, são relativamente instáveis.

De acordo com Shahidi e Shukla (1996), o conteúdo de tocol, juntamente com o grau de insaturação do óleo, pode ter um forte impacto sobre sua estabilidade oxidativa. A atividade antioxidante dos tocois depende de sua natureza química e concentração. Em geral, a atividade antioxidante de tocoferóis tem sido classificada na ordem α - > β - \geq γ - > δ -.

Observa-se que, no óleo de *C. guianensis* e de outras espécies, que têm elevada insaturação e maior quantidade de α -tocoferol, a estabilidade oxidativa é maior, sugerindo que não apenas o tipo de tocol, mas sua distribuição e quantidades presentes nos óleos podem afetar a estabilidade oxidativa.

3.3 Fitosteróis

A concentração de fitosteróis foi maior para o óleo de *C. adamantinus* (91,57 mg/100 g) e menor em *C. guianensis* (79,81 mg/100 g), enquanto em *H. volubilis* foi de 82,21 mg/100 g (Tabela 3).

Colesterol foi encontrado em pequena quantidade, com menor teor em *Couroupita guianensis* (0,26 mg/100 g) e maior teor em *Croton adamantinus* (0,66 mg/100 g) (Tabela 3). Bruni et al. (2004) também relataram traços de colesterol em *Euphorbia semiperfoliata* Viv. (0,47%) e *E. dendroides* L. (0,94 %), o que não foi detectado em outra Euphorbiaceae, *Plukenetia conophora* Müll. Arg. (Akintayo e Bayer, 2002). É reconhecida a ocorrência minoritária de colesterol em sementes de tomate (Kochar, 1983).

Entre os óleos vegetais com níveis significantes de fitosteróis se incluem óleos como o de milho (1364,7 mg/100 g). Há, no entanto, uma ampla variação de totais de fitosteróis na faixa entre 60 e 150 mg/100 g, como foi observado nas espécies analisadas e em outras referidas na literatura, como, por exemplo, o coco-da-Bahia (114 mg/100 g), citado por Schwartz et al. (2008). Valores bem inferiores foram determinados em alguns frutos e hortaliças como a batata (*Solanum tuberosum* L.) (3,8 mg/100 g) (Piironen et al., 2000; Belitz et al., 2004). No entanto, cada espécie vegetal é caracterizada por proporções relativamente constantes entre os vários fitosteróis, proporções essas que podem ser

influenciadas por fatores genéticos, mas também por fatores agronômicos e climáticos (Piironen et al., 2000).

Tabela 3

Fitosteróis (mg/100 g) em *Couroupita guianensis*, *Hippocratea volubilis* e *Croton adamantinus*

| Fitosteróis | Espécies | | |
|---------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|
| | <i>C. guianensis</i> | <i>C. adamantinus</i> | <i>H. volubilis</i> |
| Colesterol | 0,26±0,04 | 0,66±0,13 | 0,63±0,01 |
| Campesterol | 0,58±0,08 | 9,74±0,11 | 3,08±0,10 |
| Estigmasterol | 7,32±0,65 | 2,00±0,01 | 2,38±0,35 |
| Clerosterol | 0,52±0,05 | 0,52±0,08 | 0,69±0,01 |
| β -Sitosterol | 15,28±0,03 | 71,85±1,03 | 62,64±3,02 |
| Campestanol | 0,04±0,21 | 0,23±0,02 | 0,95±0,01 |
| Δ^7 -Estigmastanol | 0,58±0,05 | 5,97±0,34 | 12,26±0,83 |
| Δ^5 -Avenasterol | - | 0,44±0,03 | 0,73±0,01 |
| Não-identificado | 57,45±2,66 | - | - |
| Total | 79,81±2,12 | 91,57±1,36 | 82,21±3,92 |

Os valores são médias \pm DP de três determinações.

- = não detectado

O β -sitosterol foi mais abundante com 15,28 mg/100 g no óleo de *C. guianensis*, 62,64 mg/100 g em *H. volubilis* e 71,85 mg/100 g no óleo de *C. adamantinus*. Em espécies de *Euphorbia*, Bruni et al. (2004) observaram uma variação de 7,31 até 25,8 mg/100 g nas espécies analisadas.

Dois picos correspondentes a substâncias desconhecidas eluíram após Δ^7 -avenasterol (TR-24,440 e TR-24,680 minutos) em *C. guianensis*, a soma dos dois atingindo 57 mg/100 g na fração de esteróis do óleo (Tabela 3).

Além desses compostos, o clerosterol, o campestanol e o Δ^7 -avenasterol foram encontrados em quantidades traços nas amostras estudadas, e o último deles não foi detectado em *C. guianensis*.

Há estudos que relatam que os fitosteróis que contêm um grupo etilideno em C24, à semelhança do Δ^5 -avenasterol, possuem propriedades antioxidantes e antipolimerizantes, que poderão ser mais uma propriedade importante para o processamento de alimentos (Akintayo, 2004).

Teores relativamente elevados de β -sitosterol foram observados em *C. adamantinus* (71,85 mg/ 100 g) e *H. volubilis* (62,64 mg/100 g), semelhantes ao teor reportado para o azeite de oliva (73,2 mg/100 g) e óleo de semente de uva (69,2 mg/100 g) (Feinberg et al., 1987; Besbes et al. 2004), e muito superior ao de dendê (25,2 mg/100 g) (Belitz et al., 2004).

Para a Euphorbiaceae *Plukenetia conophora*, Akintayo e Bayer (2002) encontraram um teor de β -sitosterol (31,5 mg/100 g) inferior ao de *C. adamantinus*. Em *Adenopus breviflorus* Benth. (Cucurbitaceae), que apresenta perspectiva de aproveitamento alimentar, o teor é de 53,3 mg/100 g (Akintayo e Bayer, 2002). De acordo com Phillips et al. (2002) o β -sitosterol predomina em sementes como a de avelã (*Corylus avellana* L.) (102,2 mg/100 g) e a de macadâmia (*Macadamia integrifolia* Maiden & Betche) (147,7 mg/100 g).

C. guianensis foi a espécie entre as estudadas, com menor teor de β -sitosterol (15,28 mg/100 g) (Tabela 3), sendo inferior ao reportado por Andrade et al. (1999) (26,10 mg/100 g).

H. volubilis foi a espécie com maior teor de Δ^7 -estigmastanol (12,26 mg/100 g) (Tabela 3). Campesterol foi o terceiro composto com quantidades mais significantes em *C. adamantinus* (9,74 mg/100 g), sendo bem inferior àqueles reportados para os óleos de milho (265,5 mg/100 g), soja (56,3 mg/100 g), amendoim (27,8 mg/ 100 g), e próximo do valor reportado para o óleo de dendê (8,8 mg/ 100 g) (Belitz et al., 2004).

Estigmasterol foi mais elevado no óleo de *C. guianensis*, com 7,32 mg/100 g, seguida de *H. volubilis* e *C. adamantinus*, com respectivamente, 2,38 e 2,00 mg/100 g (Tabela 3).

Para *C. guianensis*, Andrade et al. (1999) reportaram um teor de 26,10 mg/100 g de estigmasterol, mais elevado do que o encontrado no presente estudo, além de terem detectado um teor de 7,98 mg/100 g de Δ^7 -avenasterol. Assim, os resultados relativos aos fitosteróis neste trabalho, referentes ao óleo de *C. guianensis* diferem dos reportados por outros autores. Esse fato pode ser explicado pelas diferenças relativas à origem geográfica e de clima de onde foram obtidas as sementes.

O interesse nutricional de fitosteróis na dieta humana se dá pelo seu potencial para reduzir tanto o colesterol plasmático total como o colesterol LDL, através da ação inibidora da absorção de colesterol proveniente da dieta e da bile durante a digestão e absorção intestinal (Piironen et al., 2000). Além disso, tem-se verificado a importância dos fitosteróis na indústria farmacêutica para produção de esteroides e de cosméticos, como cremes e batom, e em terapêutica, devido as suas propriedades anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e antitumoral (Stuchlík e Zák, 2002).

Comentário Final

O conhecimento do conteúdo total em proteínas, tocois e fitosteróis dos óleos das sementes de *Couroupita guianensis*, aliado ao conhecimento do perfil de seus ácidos graxos, contribuem para atrair mais atenção em se avaliar o seu valor nutricional e possível aproveitamento industrial.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES pela Bolsa de Doutorado da autora Roberta Sampaio Pinho e também pelo estágio de doutoramento no serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal.

Referências

Adhikari, P., Hwang, K. T., Shin, M. K., Lee, B. K., Kim, S. K., Kim, S. Y., Lee, K., Kim, S. Z. 2008. Tocols in caneberry seed oils. *Food Chemistry*, 111, 687–690.

Ahmad, F., Khan, R.A., Rasheed, S. 1994. Preliminary screening of methanolic extracts of *Celastrus paniculatus* and *Tacomelia undulata* for analgesic and anti-inflammatory activities. *Journal Ethnopharmacology*, 42, 193-198.

Ajayi, I. A. 2008. Comparative study of the chemical composition and mineral element content of *Artocarpus heterophyllus* and *Treculia africana* seeds and seed oils. *Bioresource Technology*, 99, 5125–5129.

Akintayo, E. T., Bayer, E. 2002. Characterisation and some possible uses of *plunkenetia conophora* and *Adenopus breviflorus* seeds and seed oils. *Bioresource Technology*, 85, 95-97.

Amaral, J.S., Casal, S., Pereira, J. A., Seabra, R. M. A., Oliveira, B. P. P. 2003. Determination of Sterol and Fatty Acid Compositions, Oxidative Stability, and Nutritional Value of Six Walnut (*Juglans regia* L.) Cultivars Grown in Portugal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7698-7702.

Andrade, E. H.A., Maia, J. G.S., Streich, R.; Marx, F. Seed Composition of Amazonian Lecythidaceae Species: Part 3 in the Series "Studies of Edible Amazonian Plants". *Journal of Food Composition and Analysis*, 12, 37-51. 1999.

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th ed.; Horwitz, W., Ed.; AOAC: Arlington, VA, 2000. V. II, 40, 1-3.

Belitz, H-D., Grosch, W., Schieberle, P. 2004. Lipids. In: *Food Chemistry*. 3rd rev.ed.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, 231-232.

Bozan, B., Temelli, F. 2008. Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. *Bioresource Technology*, 99, 6354–6359.

Burton, G.W. 1994. Vitamin E: molecular and biological function. *Proceedings of the Nutrition Society*, 53, 251–262.

- Cáceres-Castillo, D., Mena-Rejon, G. J., Cedillo-Rivera, R., Quijano, L. 2008. 21 β -Hydroxy-oleanane-type triterpenes from *Hippocratea excelsa*. *Phytochemistry* 69, 1057–1064.
- Cunha, S. C., Amaral, J. S., Fernandes, J. O., Oliveira, M. B. P. P. 2006. Quantification of tocopherols in Portuguese olive oils using HPLC with three different detection systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3351-3356.
- Finley, J. W. 2005. Selenium Accumulation in Plant Foods. *Nutrition Reviews*, 63, 196–202.
- Grusak, M. A., Dellapenna, D. 1999. Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 133–161.
- Hall III, C. Sources of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources. In *Antioxidantes in food. Practical applications*. Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M., Eds., CRC Press: Boca Raton, US, 2001.
- Lago, R. C. A., Pereira, D. A., Siqueira, F. A. R., Szpiz, R. R., Oliveira, J. P. 1987. Estudo preliminar das sementes e do óleo de cinco espécies da Amazônia. *Acta Amazônica*, 16/17, 369-376.
- Li, D., Saldeen, T., Romeo, F., Mehta, J.L. 1999. Relative effects of alpha- and gamma-tocopherol on low-density lipoprotein oxidation and superoxide dismutase and nitric oxide synthase activity and protein expression in rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 4, 219–226.
- Matthaus, B.; Vosmann, K.; Pham, L. Q.; Aitzetmüller, K. 2003. FA and Tocopherol composition of Vietnamese oilseeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80, 1013-1020.
- Mayworm, M. A. S., Nascimento, A. S., Salatino, A. 1998. Seeds of species from the 'caatinga': proteins, oils and fatty acid contents. *Revista Brasileira de Botânica [online]*, 21 (3).
- Milward-de-Azevedo, M. A; Valente, M. C., Marquete, R. 2006. Hippocrateaceae da mata de encosta do Jardim Botânico do Rio de Janeiro e arredores, Rio de Janeiro. *Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro*, 64, 3-10.
- Padilla, F.C., Alfaro, M.J., Chávez, J.F. 1998. Note. Chemical composition of the nogal de Barquisimeto (*Caryodendron orinocense*, euphorbiaceae) seeds. *Food Science and Technology International*, 4, 285-289.
- Pesce, C., 1985. *Oil Palms and Other Oilseeds of the Amazon*. Reference Publ. Inc., Michigan.
- Pinho, R.P., Oliveira, A.F.M., Silva, S.I. 2009. Potential oilseed crops from the semiarid region of northeastern Brazil. *Bioresource Technology*, 100, 6114–6117.

Pio Corrêa, M. 1984. Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Ministério da Agricultura-Instituto de Desenvolvimento Florestal, II, 301-302.

NP EM ISO 1228. 1999. Animal and vegetable fats and oils – Determination of individual and total sterols contents – Gas chromatographic method.

Rahman, M. A., Nahar, N., Jabbar, M. A., Mosihuzzaman, M. 1999. Variation of carbohydrate composition of two forms of fruit from Jack tree (*Artocarpus heterophyllus* L.) with maturity and climatic conditions. Food Chemistry, 65, 91-97.

Ramadan, M. F., Sharanabasappa, G., Seetharam, Y. N., Seshagiri, M., Moersel, J-T. 2006. Profile and levels of fatty acids and bioactive constituents in mahua butter from fruit-seeds of Buttercup tree (*Madhuca longifolia* Koenig). European Food Research and Technology, 222, 710-718.

Ramadan, M. F., Kinni, S.G., Rajana, L.N., Seetharam, Y.N., Seshagiri, M., Moersel, J-T. 2009. Fatty acid, bioactive lipids and radical scavenging activity of *Celastrus paniculatus*. Scientia Horticulturae, 123, 104-109.

Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M.J., Rodríguez-Sevilla, M.D. 2006. Chemical composition and dietary fibre of yellow and green commercial soybeans (*Glycine max*). Food Chemistry, 101, 1216–1222.

Salatino, A., Salatino, M. L. F., Negri, G. 2007. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). Journal of Brazilian Chemical Society, 18 11-33.

Saldeen, K., Saldeen, T. 2005. Importance of tocopherols beyond α -tocopherol: evidence from animal and human studies. Nutrition Research, 25, 877–889.

Sarin, R., Sharma, M., Khan, A.,A. 2009. Studies on *Guizotia abyssinica* L. oil: Biodiesel synthesis and process optimization. Bioresource Technology, 100, 4187–4192.

Savage, G. P., Dutta, P. C., McNeil, D. L. 1999. Fatty acid and tocopherol contents and oxidative stability of walnut oils. Journal of the American Oil Chemists' Society, 76, 1059-1063.

Schwartz, H., Ollilainen, V., Piironen, V., Lampi, A. 2008. Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. Journal of Food Composition and Analysis, 21, 152–16.

Schwenke, D.C. 2002. Does lack of tocopherols and tocotrienols put women at increased risk of breast cancer? Journal of Nutritional Biochemistry, 13, 2–20.

Shahidi, F., Shukla, V.K.S. 1996. Nontriacylglycerol constituents of fats, oils. Inform 7, 1227–1232.

Silva, S. I. 1998. Euphorbiaceae da Caatinga: distribuição de espécies e potencial oleaginoso. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Silva, J. M., Garden, S. J., Pinto, A. C. 2001. The Chemistry of Isatins: a Review from 1975 to 1999. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 12, 273-324.

Stirpe, F., Pession-Brizzi, A., Lorenzoni, E., Strocchi, P., Montanaro, L., Sperti, S. Studies on the proteins from the *Croton tiglium* and *Jatropha curcas*. *Biochemical Journal*, 156, 1-6.

Stuchlík, M., Zák, S., 2002. Vegetable lipids as components of functional foods. *Biomedical Papers*, 146, 3–10.

Zuo, W. N., Sun, S. S. 1996. Purification and characterization of the methionin-rich 2S proteins from the Brazil nut family (*Lecythidaceae*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 44, 1206-1210.

Vallilo, M. I., Caruso, M. F.S., Takemoto, E. Pimentel, S-A. 2007. Caracterização química e físico-química do óleo das sementes de *Platymiscium floribundum* Vog. (sacambu), colhidas na fase de desenvolvimento e na época de maturação fisiológica. *Revista Instituto Florestal*, 19, 73-80.

Warner, K., Frankel, E. N. 1987. Effect of β -caroteno on light stability of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, 64, 113-118.

Webster, G.L. 1994. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 81, 33-44.

Yang, J. 2009. Brazil nuts and associated health benefits: A review, *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1573–1580.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo-se em vista o aproveitamento econômico das espécies analisadas destaca-se que:

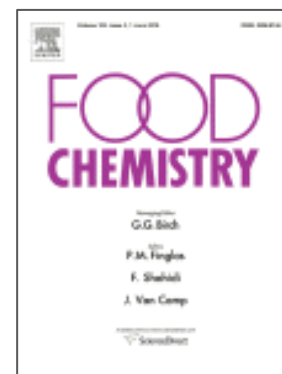
1. Apesar de não haver informação sobre o uso alimentar de *Diplopterys pubipetala* e *Barnebya harleyi*, a composição centesimal das sementes, os tocois e fitosteróis do óleo e os elevados teores de proteínas, tornam essas sementes importantes alvos para investigação complementar, visando o aproveitamento alimentício;
2. Sabendo-se que as sementes de *Couroupita guianensis* são consideradas comestíveis e de sabor agradável, contendo elevados teores de ácido linoleico em seu óleo, elevado teor proteico e a presença do aminoácido metionina, além de boa quantidade do α -tocoferol, verifica-se que há grande possibilidade de aproveitá-las na alimentação humana ou como fonte de ácido linoleico;
3. *Croton adamantinus* tem um conteúdo apreciável de proteína, entretanto, devido à ocorrência de proteínas tóxicas em *Croton* e em outros gêneros da família Euphorbiaceae, é importante que sejam realizados mais estudos para se determinar a melhor forma de aproveitamento dessa espécie;
4. *B. harleyi* foi a única dentre as espécies analisadas que apresentou todos os isômeros de tocois, assemelhando-se neste aspecto ao azeite de dendê e diferenciando-se da maioria das oleaginosas tradicionais que não apresentam o δ -tocotrienol;
5. *B. harleyi* e *C. adamantinus* podem ser consideradas boas fontes de tocois e do isômero γ -tocoferol. Constatou-se nessas espécies uma relação positiva entre os elevados teores de ácidos insaturados e os níveis totais de tocol;
6. *D. pubipetala* e *C. guianensis* tiveram maiores teores do α -tocoferol e maior estabilidade oxidativa nos óleos, podendo-se admitir, desta forma, que o elevado teor do α -tocoferol foi responsável pela estabilidade oxidativa do óleo das sementes dessas duas espécies;

7. Apesar de não se constituir no tipo mais frequente de fitosterol, o Δ^7 -estigmastanol foi o segundo dos fitosteróis mais abundante nos óleos de três das espécies analisadas: *Hippocratea volubilis*, *D. pubipetala* e *B. harleyi*.

Anexos

Normas da Food Chemistry

Guide for Authors - Submission of Papers



All manuscripts for Food Chemistry should be submitted online via EES - Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/foodchem> . **This is the preferred method of submission, and facilitates processing of your manuscript.** Only in exceptional cases where the authors have no electronic facilities whatsoever, the author should submit one original copy of the manuscript, plus two photocopies and a copy on disk, to the Managing Editor:

Professor Gordon Birch
School of Food Biosciences
University of Reading
Whiteknights, PO Box 226
Reading RG6 6AP, UK

Authors are required to submit, with their manuscripts, the names and full contact details (including e-mail address) of 3 potential referees (who should not come from the same institute).

It is the author's responsibility to ensure that papers are written in clear and comprehensible English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission. English language help service: Upon request, Elsevier will direct authors to an agent who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact authorsupport@elsevier.com for further information.

Submission of a paper implies that it has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

Review Policy

A peer review system involving two or three reviewers is used to ensure high quality of manuscripts accepted for publication. The Managing Editor and Editors have the

right to decline formal review of a manuscript when it is deemed that the manuscript is 1) on a topic outside the scope of the Journal; 2) lacking technical merit; 3) focused on foods or processes that are of narrow regional scope and significance; 4) fragmentary and providing marginally incremental results; or 5) is poorly written.

Types of Contributions

Original research papers; review articles; rapid communications; short communications; viewpoints; letters to the Editor; book reviews.

1. *Research papers* - original full-length research papers which have not been published previously, except in a preliminary form, and should not exceed 7,500 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations).

2. *Review articles* - will be accepted in areas of topical interest, will normally focus on literature published over the previous five years, and should not exceed 10,000 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations).

3. *Rapid communications* - an original research paper reporting a major scientific result or finding with significant implications for the research community, designated by the Editor.

4. *Short communications* - Short communications of up to 3000 words, describing work that may be of a preliminary nature but which merits immediate publication.

5. *Viewpoints* - Authors may submit viewpoints of about 1200 words on any subject covered by the Aims and Scope.

6. *Letters to the Editor* - Letters are published from time to time on matters of topical interest.

7. *Book reviews*

Manuscript Preparation

General: Manuscripts must be typewritten, double-spaced with wide margins on one side of white paper. Each page must be numbered, and lines must be consecutively numbered from the start to the end of the manuscript. Good quality printouts with a font size of 12 or 10 pt are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. An electronic copy of the paper should accompany the final version. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain a copy of their manuscript since we cannot accept responsibility for damage or loss of papers. Original manuscripts are discarded one month after publication unless the Publisher is asked to return original material after use.

Abstracts: Each paper should be provided with an abstract of 100-150 words, reporting concisely on the purpose and results of the paper.

Text: Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

Units: The SI system should be used for all scientific and laboratory data; if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion'

(10^9 in America, 10^{12} in Europe) is ambiguous and should not be used.

Symbols: Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and '/' should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Current recognised (IUPAC) chemical nomenclature should be used, although commonly accepted trivial names may be used where there is no risk of ambiguity.

The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

References: All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. No more than 30 references should be cited in your manuscript. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Steventon, Donald and Gladden (1994) studied the effects..." or "...similar to values reported by others (Anderson, Douglas, Morrison & Weiping, 1990)..."). For 2-6 authors all authors are to be listed at first citation. At subsequent citations use first author et al.. When there are more than 6 authors, first author et al. should be used throughout the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, publisher and year. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

References should be given in the following form:

Ahmed, I. A., & Robinson, R. K. (1999). The ability of date extracts to support the production of aflatoxins. *Food Chemistry*, 66(3), 307-312.

Marasas, W. F. O. (1996). Fumonisin: History, worldwide occurrence and impact. In L. S. Jackson, J. W. DeVries, & L. B. Bullerman, *Fumonisin in food, advances in experimental medicine and biology*, vol. 392 (pp. 1-18). New York: Plenum Press.

Massart, D. L., & Kauffmann, L. (1983). *Interpretation of analytical data by use of cluster analysis*. New York: Wiley.

Noel, S., & Collin, S. (1995). Trans-2-nonenal degradation products during mashing. In *Proceedings of the 25th European brewery convention congress* (pp. 483-490). Oxford: IRL Press.

Citing and listing of web references. As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly "Articles in Press" because they have not yet received their

full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Illustrations

Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations should be clearly marked with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet. Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption and each table typed on a separate sheet. Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript (e.g. in graphs).

If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations. As only one figure caption may be used for both colour and black and white versions of figures, please ensure that the figure captions are meaningful for both versions, if applicable.

Preparation of electronic illustrations

Submitting your artwork in an electronic format helps us to produce your work to the best possible standards, ensuring accuracy, clarity and a high level of detail.

General points

- ?Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- ?Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- ?Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
- ?Number the illustrations according to their sequence in the text.
- ?Use a logical naming convention for your artwork files.
- ?Provide all illustrations as separate files.
- ?Provide captions to illustrations separately.
- ?Produce images near to the desired size of the printed version.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

☞ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> . **You are urged to visit this site.**

Preparation of Supplementary Data

Elsevier now accepts electronic supplementary material (e-components) to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect:

⇒ <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the final version of the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at ⇒ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Proofs

When your manuscript is received at the Publisher it is considered to be in its final form. Proofs are not to be regarded as 'drafts'. One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely your responsibility. A form with queries from the copy editor may accompany your proofs. Please answer all queries and make any corrections or additions required. The Publisher reserves the right to proceed with publication if corrections are not communicated. Return corrections within two working days of receipt of the proofs. Should there be no corrections, please confirm this. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. In order to do this we need your help. When you receive the (PDF) proof of your article for correction, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete. Note that this does not mean you have any less time to make your corrections, just that only one set of corrections will be accepted. Proofs are to be returned to the Log-in Department, Elsevier Ltd, Bampfylde Street, Exeter, EX1 2AH, UK, fax +44 (0)1392 425370.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Copies of the issue can be ordered at a specially reduced rate using the order form sent to the corresponding author after the manuscript has been accepted.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright see ⇒ <http://authors.elsevier.com>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners

and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier Ltd., Global Rights Department, The Boulevard, Langford Lane, Oxford, OX5 1GB, UK; phone: (+44) 1865 843830, fax: (+44) 1865 853333, e-mail: permissions@elsevier.com

Author Enquiries

Authors can keep a track on the progress of their accepted article, by visiting <http://www.elsevier.com/trackarticle>. Other questions or queries will also be dealt with via the website <http://authors.elsevier.com>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided when an article is accepted for publication. Do not contact the editors - they do not have access to this information.



Normas da Bioresouce Tecnology

When submitting a manuscript to the journal, authors must choose one or more classifications that best describe their manuscript. A list of classifications can be found here

Submission of papers:

Papers from all over the World: Please use Elsevier's online submission system to submit to the journal. The direct link is <http://ees.elsevier.com/bite/>. Authors may choose among Dr. Ashok Pandey, Dr. Christian Larroche and Dr. Steve Ricke

Covering letter to the editor:

When submitting the manuscript, it is mandatory to include a covering letter to the editor. The covering letter must state:

- (1) Subject Classification selected from the list (see guide for authors).
- (2) That all the authors mutually agree that it should be submitted to BITE.
- (3) It is the original work of the authors.
- (4) That the manuscript was not previously submitted to BITE.
- (5) State the novelty in results/ findings, or significance of results.

Submission language: English (Link to the Oxford English Dictionary <http://dictionary.oed.com/entrance.dtl>)

English language help service: Upon request Elsevier will direct authors to an agent who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact authorsupport@elsevier.com for further information.

Types of contributions: Original research papers, review articles, case studies, short communications, book reviews.

Review articles would be generally solicited by the editors from the experts. However, these can be contributed by others also. In this case, authors must consult the editor with an extended summary and outline before preparing the article.

Corresponding author: Clearly indicate who is responsible for correspondence at all stages of refereeing and publication, including post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.** Full postal addresses must be given for all co-authors. Please consult a recent journal paper for style if possible.

Original material: Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a

published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

Editor's requirements: Nucleotide or protein sequences should be deposited in a publicly available database such as Genbank or EMBL before a manuscript is submitted for review in the journal. Accession numbers must be obtained and included in the manuscript before it is fully accepted for publication by the editor.

Detailed instructions on manuscript preparation and artwork instructions can be found below. The editor reserves the right to return manuscripts that do not conform to the instructions for manuscript preparation and artwork instruction, as well as paper that do not fit the scope of the journal, prior to refereeing.

If at the time you submit your manuscript for review to *Bioresource Technology*, you also have other manuscripts in review (with other journals) that are similar to, or are pertinent to your *Bioresource Technology* manuscript, please send a copy of these manuscripts to the relevant handling editor, so that they may be able to conduct a full review on your *Bioresource Technology* manuscript.

Manuscript Preparation:

General:

Authors must follow guide for authors strictly, failing which the manuscripts would be rejected without review. Editors reserve the right to adjust the style to certain standards of uniformity. Please use Word, Word Perfect or LaTeX files for the text of your manuscript. (For further information about LaTeX submission, please go to <http://www.elsevier.com/locate/latex>.)

Structure:

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, Figure Captions, Tables and Figures. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be avoided. Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

Text Layout:

Use double spacing and wide (3 cm) margins on white paper. (Avoid full justification, i.e., do not use a constant right-hand margin.) Ensure that each new paragraph is clearly indicated. Present tables and figure legends on separate pages at the end of the manuscript. If possible, consult a recent issue of the journal to

become familiar with layout and conventions. Number all pages consecutively, use 12 pt font size and standard fonts.

Page length: Maximum page length should be 12, 35 and 40 pages for Short Communication, Original article/case study and review paper, including text, references, tables and figures. Each figure and table must be put separately on a single page.

Corresponding author:

Clearly indicate who is responsible for correspondence at all stages of refereeing and publication, including post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.** Full postal addresses must be given for all co-authors. Please consult a recent journal paper for style if possible.

Abstract:

Each paper should be provided with an Abstract of about 100-150 words, reporting concisely on the purpose and results of the paper.

Keywords:

Immediately after the abstract, provide a maximum of five keywords (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible.

Symbols:

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), '%' and '/' should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Units:

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' is ambiguous and must not be used.

Maths:

Authors should make clear any symbols (e.g. Greek characters, vectors, etc.) which may be confused with ordinary letters or characters. Duplicated use of symbols should be avoided where this may be misleading. Symbols should be defined as they arise in the text and separate Nomenclature should also be supplied.

References:

All publications cited in the text should be presented in a list of references (maximum 20, 35 and 75 references for short communication, original research

paper/case study and review papers, respectively) following the text of the manuscript.

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Colour Costs and Queries:

For colour illustrations, a colour printing fee is charged to the author per colour unit. Further information concerning colour illustrations and costs is available from Author Support at authorsupport@elsevier.ie, and at <http://authors.elsevier.com/locate/authorartwork>.

FREE ONLINE COLOUR

If, together with your accepted article, you submit usable colour and black/white figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. 'Usable' means the formats comply with our instructions. See the information about Illustrations at <http://authors.elsevier.com/locate/authorartwork>. For colour illustrations in the print journal see Colour Costs above.

Tables:

Tables should be numbered consecutively and given suitable captions and each

table should begin on a new page. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript (for example, in graphs). Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. Note that the maximum number of figures allowed for Original article, case study, and review papers is 6.

Figures:

Please make sure that figure files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see

☞ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Note that the maximum number of figures allowed for Original article, case study, and review papers is 6. Multiple figures can be expressed as one figure (for e.g. 1a, 1b, 1c etc...), while retaining the maximum limit of 6.

Conclusions:

State here the inferences drawn from the results, preferably in running text form, in maximum 100 words. No results should be given here.

Electronic Annexes

We strongly encourage you to submit electronic annexes, such as short videos, computer-enhanced images, audio clips and large databases. Please refer to the Artwork Instructions (Multimedia files) at

☞ <http://authors.elsevier.com/locate/authorartwork> for details on file types to be used. If you are submitting on hardcopy, please supply 3 disks/CD ROMs containing the electronic annex to the editor for review. In the text of your article you may wish to refer to the annex. This is not mandatory, however, if you do wish to refer to the annex in the text then please do so using this example: "?see Electronic Annex 1 in the online version of this article." Production will insert the relevant URL at the typesetting stage after this statement.

Notification:

Authors will be notified of the acceptance of their paper by the editor. The Publisher will also send a notification of receipt of the paper in production.

Copyright:

All authors must sign the Transfer of Copyright agreement before the article can be

published. This transfer agreement enables Elsevier to protect the copyrighted material for the authors, but does not relinquish the authors' proprietary rights. The copyright transfer covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article, including reprints, photographic reproductions, microfilm or any other reproductions of similar nature and translations. Authors are responsible for obtaining from the copyright holder permission to reproduce any figures for which copyright exists. For more information please go to our copyright page <http://www.elsevier.com/copyright>

PDF Proofs:

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. The corrections should be returned within 48 hours. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely the author's responsibility. Any queries should be answered in full. Please correct factual errors only, or errors introduced by typesetting.

For more information on proofreading please go to our proofreading page <http://authors.elsevier.com/quickguide>. Please note that once your paper has been proofed we publish the identical paper online as in print.

Author Benefits:

No page charges: Publication in this journal is free of charge.

Free offprints: The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

Author discount: Contributors to Elsevier journals are entitled to a 30% discount on all Elsevier books. See <http://www.elsevier.com/homepage/booksbutler> for more information.