

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

TATIANE LUIZA CADORIN OLDONI

**Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos
agroindustriais**

Piracicaba

2010

TATIANE LUIZA CADORIN OLDONI

**Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos
agroindustriais**

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear
na Agricultura da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e
no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Severino Matias de Alencar

Piracicaba
2010

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Oldoni, Tatiane Luiza Cadorin

Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos agroindustriais / Tatiane Luiza Cadorin Oldoni; orientador Severino Matias de Alencar. - - Piracicaba, 2010.

163p.: fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Amendoim 2. Antioxidantes 3. Método cromatográfico 4. Química analítica instrumental 5. Ressonância magnética nuclear 6. Viticultura I. Título

CDU 631.576.4:543.054

Ao meu esposo Cleverson e minha filha Gabriella, amores da minha vida

OFEREÇO

Á minha mãe Eloide e tia Elaine, por serem meus exemplos de luta, dedicação e amor

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo agradeço a Deus, que em sua enorme generosidade me acumulou de bênçãos, dando-me força física e mental para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Severino Matias de Alencar, pela oportunidade de realização do trabalho, meu agradecimento e admiração pelo exemplo de excelente orientação e, principalmente, pela sua contribuição na minha formação científica.

Seguidamente pela Dra. Roasângela Neves Bezerra, que contribuiu diretamente na realização de meu doutorado e à amiga Rosângela, que esteve sempre presente e disponível para me ouvir, incentivar e apoiar nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Daniel (CEBTEC), pelo empréstimo e confiança na utilização de seu Laboratório e equipamento.

Ao Prof. Dr. Gil (USP – Ribeirão Preto), obrigada pela identificação dos compostos isolados.

Aos professores doutores, Pedro Rosalen, Luciana Ferracini e Solange Carpes por suas importantes contribuições neste trabalho e pela participação no meu Exame de Qualificação.

À Profa. Dra. Adriana Martinelli pela sempre pronta colaboração.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

À Vinícola Miolo pela parceria e fornecimento dos subprodutos vinícolas.

À minha querida amiga Naiane, desde os velhos tempos de graduação parceira em todos os momentos..... pela força, interesse, entrega e que mesmo distante percebia minhas tristezas e conseguia me animar. Somos a maior prova de que uma amizade verdadeira supera qualquer tempo e distância.

As amizades verdadeiras e eternas que fiz durante estes anos no Laboratório de Bioquímica, e que me ajudaram na realização de meu doutorado Luciana Mourão, Ana Paula, Keityanne, Lucimara, Luciana Ferracini, Juliana, Izabella e Aline, em especial, Priscilla, Adna e Ivani, sem o apoio de vocês teria sido muito mais difícil. Sentirei saudades dos nossos cafézinhos e risadas.

Às amigas que fiz desde que cheguei em Piracicaba e até hoje estiveram presente, inclusive abrindo um cantinho para mim na republica no final de meu doutorado, Kerli, Aline (Esmerê), Priscilla (Pisgui), Isabel, Ana Paula (Flipper) e Naiane

Às minhas colegas de viagem para cursar disciplinas fora de Piracicaba, Keityanne e Luciana, nossas viagens e conversas foram sempre muito boas, além é claro, de tudo que aprendemos, sentirei saudades.

Aos amigos que mesmo longe sei que torceram por mim, Juliane, Vinícius, Anderson (Sinho), Ricardo (Xoio), Alvaro (Bicudo), Nilza, Marcelo, Caroline, Solange e Jailson.

Aos amigos que fiz durante esses seis anos em Piracicaba, em especial, Rodrigo (Paxuxu), Glaucia, Ingridy, Ligianne.

A todos os professores e funcionários do Centro de Energia Nuclear, em especial Neuda, Claudia, Sonia e Fabio, obrigada pela atenção e auxílio.

Aos funcionários da biblioteca e seção de pós-graduação, em especial a Marília pela atenção e pronta colaboração na revisão de minha tese.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição.

Aos Oldoni, dona Alda e seu Antônio, meus sogros, Jeferson e Carla, minha segunda família que tanto admiro.

Por fim, agradeço em especial àqueles que sempre me apoiaram incondicionalmente, que apostaram em mim mais do que ninguém e que seguramente são os que mais compartilham da minha alegria: minha amada família, mãe Eloide, tia Elaine, mana Tais, Murilinho, Nelson, tia Eliza, tia Eliane, vó Lurdes, meus tios e primos.

Às pessoas mais especiais da minha vida, Cleverson e Gabriella, pelas inúmeras chances dadas, pela compreensão, pelo ombro acolhedor, pela paciência, por me fazer acreditar em mim, nas minhas capacidades, e por fazer minha vida tão completa.

Mais uma etapa foi vencida! Sei que ainda é só o começo....

*“Bom mesmo é ir à luta com determinação,
Abraçar a vida e viver com paixão,
Perder com classe e viver com ousadia,
Pois o triunfo pertence a quem se atreve,
e a vida é muito bela para ser insignificante”.*

(Charles Chaplin)

RESUMO

OLDONI, T. L. C. **Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos agroindustriais**. 2010. 163 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

Atualmente, milhões de toneladas de subprodutos são produzidas durante o processamento de alimentos pelas agroindústrias. A maioria deles é rica em compostos bioativos, principalmente os fenólicos, os quais são responsáveis por várias atividades biológicas. Assim, este trabalho teve como objetivos avaliar o conteúdo de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante de três subprodutos agroindustriais – engaço e bagaço de uva (*Vitis vinifera*) da variedade Cabernet Sauvignon e película de amendoim (*Arachis hypogaea*) –, otimizar o processo de extração de compostos bioativos e selecionar o subproduto de maior potencial para a realização do fracionamento e isolamento bioguiado dos compostos responsáveis pela atividade antioxidante. Os subprodutos foram coletados no primeiro semestre de 2010, congelados e liofilizados. O conteúdo de compostos fenólicos totais dos extratos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e o potencial antioxidante durante a otimização do processo de extração foi avaliado pelo método de sequestro do radical DPPH. O processo de otimização da extração de compostos antioxidantes foi realizado primeiramente usando modelos univariáveis e, em seguida, foi desenvolvido planejamento fatorial 2^2 utilizando como variáveis a concentração de solvente e a temperatura de extração. Na última etapa do processo de otimização da extração, foi feito experimento utilizando ultrassom. Para os três subprodutos, observou-se maior sequestro do radical DPPH com o aumento da temperatura de extração e concentração de acetona. As melhores condições para a extração de compostos com atividade antioxidante foram concentração de acetona de 60% e temperatura de extração de 70°C em banho termostatizado. A partir dos resultados obtidos neste estudo, foi feito o isolamento bioguiado dos compostos bioativos da película de amendoim, pois foi o subproduto que apresentou o maior teor de compostos fenólicos e a maior atividade antioxidante. O extrato bruto da película de amendoim foi primeiramente purificado utilizando a resina Amberlite XAD2 para gerar duas frações, as quais foram denominadas frações metanólica (Fr-Met) e aquosa (Fr-aquosa). Após a avaliação da atividade antioxidante dessas frações pelas técnicas de sequestro dos radicais DPPH e ABTS, além da determinação do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a Fr-Met, a mais bioativa, foi recromatografada em coluna gel Sephadex LH-20. Nesse processo, foram obtidas 123 subfrações, as quais foram reagrupadas, após análise de cromatografia em camada delgada (CCD), em 18 subfrações. Essas subfrações foram avaliadas quanto à atividade antioxidante e a subfração 10, que apresentou elevada atividade antioxidante, foi submetida ao isolamento dos compostos pela técnica de CLAE semipreparativa. Dois compostos foram isolados e denominados composto 1 e composto 2. O composto 1 foi o mais potente, apresentando capacidade de sequestro do radical DPPH, em termos de IC_{50} , de $18,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e redução do Fe^{3+} de $7,59 \text{ mmol Fe}^{2+}\cdot\text{g}^{-1}$, valores maiores do que os do antioxidante sintético BHT. Os resultados de atividade antioxidante avaliada pelo método ABTS mostraram que o composto 1 ($6,54 \text{ mmol TEAC}\cdot\text{g}^{-1}$) possui atividade próxima a padrões naturais com reconhecida atividade, como quercetina e catequina. Por meio da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN), foi possível identificar o composto 1 como epicatequina-($2\beta\rightarrow\text{O}\rightarrow7$, $4\beta\rightarrow6$)-[epicatequina-($4\beta\rightarrow8$)]-catequina e o composto 2 como epicatequina-($2\beta\rightarrow\text{O}\rightarrow7$, $4\beta\rightarrow8$)-[epicatequina-($4\beta\rightarrow8$)]-catequina-($4\alpha\rightarrow8$)-epicatequina, ambos pertencentes à classe das proantocianidinas. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que os subprodutos agroindustriais analisados são ricos em compostos fenólicos de alta atividade

antioxidante e, portanto, devem ser mais bem explorados pelas indústrias de alimentos e farmacêutica.

Palavras-chave: subprodutos agroindustriais; metodologia de superfície de resposta; atividade antioxidante; fracionamento bioguiado; isolamento.

ABSTRACT

OLDONI, T. L. C. **Prospecting and identifying bioactive compounds in agroindustrial by-products**. 2010. 163 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

Nowadays, millions of tons of by-products are produced during food processing in agroindustrial plants. Most of them are rich in bioactive compounds, mainly phenolic substances, responsible for several biological activities. Therefore, this study aimed at assessing the total phenolic compound content and the antioxidant activity of three agroindustrial by-products – Cabernet Sauvignon grape stalks and pomace (*Vitis vinifera*) and peanut skin (*Arachis hypogaea*) –, optimizing the process to extract the bioactive compounds, and selecting the by-product with the highest potential for bioguided fractionation and isolation of the compounds responsible for antioxidant activity. All the by-products were collected in the first semester of 2010, frozen, and lyophilized. Total phenolic compound content was determined using the Folin-Ciocalteu method and antioxidant potential during optimization of the extraction process was assessed by the DPPH radical-scavenging method. The process used to optimize the extraction of antioxidant compounds was carried out initially using univariate models and, after that, a 2² factorial planning was developed using solvent concentration and extraction temperature as variables. In the last phase of the process used to optimize the extraction, we performed an experiment using ultrasound. For the three by-products analyzed we observed higher DPPH radical-scavenging activity as the extraction temperature and acetone concentration increased. The best conditions for the extraction of antioxidant compounds were acetone at 60% and extraction temperature of 70°C in thermostatic bath. Based on the results of this study, we carried out the bioguided isolation of bioactive compounds from peanut skin, since this was the by-product that presented the highest phenolic compound content and antioxidant activity. Peanut skin crude extract was purified using Amberlite XAD2 resin to generate two fractions, named methanol (Met-Fr) and aqueous fractions (Aqu-Fr). After evaluating the antioxidant activity of these fractions using the DPPH and ABTS radical-scavenging methods, as well as determining their chemical profile by high performance liquid chromatography (HPLC), Met-Fr, the fraction presenting the highest bioactivity, was rechromatographed on a Sephadex LH-20 gel column. During this process, 123 subfractions were obtained and they were regrouped, after thin-layer chromatography (TLC), into 18 subfractions. These subfractions were evaluated as to their antioxidant activity and subfraction 10, which presented high antioxidant activity, underwent isolation of compounds using semipreparative HPLC. Two compounds were isolated and named compound 1 and compound 2. Compound 1 was the most potent, presenting DPPH radical-scavenging activity, in terms of IC₅₀, of 18.25 µg.mL⁻¹, and Fe³⁺ reduction of 7.59 mmol Fe²⁺.g⁻¹, values that are higher than the synthetic antioxidant BHT. The results of antioxidant activity evaluated by the ABTS radical-scavenging method showed that compound 1 (6.54 mmol TEAC.g⁻¹) has activity similar to natural standards with known activity, such as quercetin and catechin. Using the nuclear magnetic resonance (NMR) technique we identified compound 1 as epicatechin-(2β→O→7, 4β→6)-[epicatechin-(4β→8)]-catechin and compound 2 as epicatechin-(2β→O→7, 4β→8)-[epicatechin-(4β→8)]-catechin-(4 α→8)-epicatechin, both belonging to the proanthocyanidin class. The results obtained in the present study showed that the agroindustrial by-products analyzed are rich in phenolic compounds with high antioxidant activity and, therefore, should be more explored by food and pharmaceutical industries.

Key words: agroindustrial by-products; surface response methodology; antioxidant activity; bioguided fractionation; isolation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Dados do crescimento da indústria e agroindústria no Brasil nos anos de 2002 a 2010.....	27
Figura 2	Principais regiões vinícolas do Brasil.....	29
Figura 3	Fluxograma do processo de fabricação de vinhos, obtendo como subprodutos e ongaço e bagaço da uva tinta.....	30
Figura 4	Núcleo básico dos flavonoides, composto por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C).....	34
Figura 5	Classificação das principais famílias de flavonoides na natureza.....	35
Figura 6	Fórmula geral do ácido benzoico.....	36
Figura 7	Fórmula geral do ácido cinâmico (A) e cumarina (B).....	36
Figura 8	Estrutura das catequinas mais abundantes na natureza.....	37
Figura 9	Reação de decomposição das proantocianidinas.....	38
Figura 10	Estrutura das procianidinas diméricas do tipo B.....	39
Figura 11	Estrutura das procianidinas diméricas do tipo A.....	39
Figura 12	Estrutura de uma procianidina esterificada com o ácido gálico (B2-3-“O-galato).....	40
Figura 13	Estrutura de uma procianidina trimérica do tipo C.....	40
Figura 14	Estrutura geral de oligômeros e polímeros de proantocianidinas.....	41
Figura 15	Estrutura do cátion flavílico (a) e estrutura da antocianidina cianidina (b)....	42
Figura 16	Estrutura da antocianina cianidina 3-glucosídeo.....	42
Figura 17	Possíveis transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH.....	44
Figura 18	Mecanismo antioxidante dos compostos fenólicos.....	47
Figura 19	Estrutura química do radical DPPH e reação de estabilização com um antioxidante.....	50
Figura 20	Formação do radical ABTS estável com o persulfato de potássio e reação com antioxidante.....	52
Figura 21	Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe ³⁺	53

Figura 22	Aspecto dos subprodutos coletados. (A) Película de amendoim, (B) Bagaço Cabernet Sauvignon, (C) Engaço Cabernet Sauvignon.....	83
Figura 23	Espectros de absorção na região UV-visível (200 a 600 nm), dos extratos alcoólicos bruto de película de amendoim, bagaço e engaço de uva Cabernet Sauvignon.....	84
Figura 24	Atividade antioxidante (%) pelo método de sequestro do radical DPPH da película de amendoim. P (película EtOH 80%), PA (película acidificada), PD (película desengordurada) e PDA (película desengordurada e acidificada).....	87
Figura 25	Atividade antioxidante (%) pelo método de sequestro do radical DPPH do engaço de uva. E (engaço EtOH 80%), EA (engaço acidificado), ED (engaço desengordurado) e EDA (engaço desengordurado e acidificado).....	88
Figura 26	Atividade antioxidante (%) pelo método de sequestro do radical DPPH do bagaço de uva. B (Bagaço EtOH 80%), BA (bagaço acidificado), BD (bagaço desengordurado) e BDA (bagaço desengordurado e acidificado).....	88
Figura 27	Atividade antioxidante (%) pelo método de sequestro do radical DPPH da película de amendoim.....	90
Figura 28	Atividade antioxidante (%) pelo método de sequestro do radical DPPH do engaço de uva.....	90
Figura 29	Atividade antioxidante (%) pelo método de sequestro do radical DPPH do bagaço de uva.....	91
Figura 30	Superfície de resposta e gráficos de contorno do efeito da concentração do solvente etanol e temperatura na porcentagem de atividade antioxidante em extratos de película de amendoim.....	96
Figura 31	Superfícies de resposta e gráficos de contorno do efeito da concentração dos solventes (A) acetona; (B) etanol e (C) propilenoglicol e temperatura na porcentagem de atividade antioxidante em extratos de bagaço.....	101
Figura 32	Porcentagem de atividade antioxidante obtida para o extrato de engaço testado com três solventes em quatro tempos diferentes.....	103
Figura 33	Porcentagem de atividade antioxidante obtida para extrato da película de amendoim testado com três solventes em quatro tempos diferentes.....	103
Figura 34	Porcentagem de atividade antioxidante obtida para o extrato de bagaço testado com três solventes em quatro tempos diferentes.....	104
Figura 35	Porcentagem de atividade antioxidante obtida para os subprodutos, comparando os resultados obtidos na extração em ultrassom e a extração em banho termostatizado (Metodologia de Superfície de Resposta – MSR)..	105

Figura 36	Aspecto da película de amendoim antes de ser triturada.....	123
Figura 37	Espectro de absorção na região UV-visível (200 – 600 nm) do extrato bruto da película de amendoim.....	124
Figura 38	Fluxograma do fracionamento e isolamento bioguiado de compostos com atividade antioxidante da película de amendoim.....	125
Figura 39	Cromatografia por coluna de resina Amberlite XAD 2. A: momento de aplicação do extrato bruto da película de amendoim; B: lavagem da coluna com água ácida e neutra para retirada de compostos não adsorvidos; C: desenvolvimento da eluição com metanol.....	126
Figura 40	Atividade antioxidante do extrato bruto (EB), fração metanólica (Fr-Met) e fração aquosa (Fr-aquosa) da película de amendoim avaliada pelo método de sequestro do radical ABTS ⁺	126
Figura 41	Atividade antioxidante do extrato bruto (EB), fração metanólica (Fr-Met) e fração aquosa (Fr-aquosa) da película de amendoim avaliada pelo método de sequestro do radical livre DPPH·.....	127
Figura 42	Cromatograma obtido por CLAE do extrato bruto (EB), fração metanólica (FrMet) e fração aquosa (Fr-aquosa). EB e frações avaliadas na concentração de 1000 µg/mL. Ácido gálico (1); Epigallocatequina (2); Catequina (3); Procianidina B2 (4); Epigallocatequina galato (5).....	129
Figura 43	Cromatografia por coluna de Sephadex LH-20. Início da eluição (A); desenvolvimento da eluição em dois momentos, evidenciando a fluorescência característica dos compostos (B) e (C).....	131
Figura 44	Cromatografia em Camada Delgada das principais subfrações obtidas pela coluna de Sephadex LH-20 e respectivos reagrupamentos. (A) subfrações 1-4, reveladas com anisaldeído sulfúrico sob luz UV 365 nm; (B) subfrações 4 e 5 reveladas com anisaldeído sulfúrico sob luz ambiente.....	132
Figura 45	Cromatografia em Camada Delgada das principais subfrações obtidas em Sephadex LH-20 e respectivos reagrupamentos. (C) subfrações 6-8; (B) subfrações 9-11 - ambas reveladas com anisaldeído sulfúrico sob luz ambiente.....	132
Figura 46	Cromatografia em Camada Delgada das subfrações obtidas em Sephadex LH-20 e respectivos reagrupamentos. (E) subfrações 12-16, reveladas com anisaldeído sulfúrico sob luz ambiente.....	133
Figura 47	Cromatografia em Camada Delgada das subfrações obtidas em Sephadex LH-20 e respectivos reagrupamentos. (F) subfrações 17 e 18, reveladas com anisaldeído sulfúrico sob luz ambiente.....	133
Figura 48	Perfil químico das subfrações obtido por Cromatografia de Alta Eficiência. Subfração 5 (A); subfração 8 (B); subfração 9 (C); subfração 10 (D); subfração 11 (E); subfração 12 (F); subfração 13 (G); subfração 14 (H); subfração 16 (I) e subfração 16 (J). Catequina (1) e epicatequina (2). As subfrações foram avaliadas na concentração de 1000 ppm.....	137

Figura 49	Cromatograma da coleta dos compostos 1 e 2 por CLAE-semipreparativo da subfração 10.....	138
Figura 50	Cromatograma obtido por CLAE dos compostos isolados da subfração 10 da película de amendoim (compostos 1 e 2).....	139
Figura 51	Cinética de redução do radical livre DPPH do extrato, fração, subfração e compostos isolados da película de amendoim.....	140
Figura 52	Atividade antioxidante do extrato bruto (EB), fração metanólica (Fr-Met), subfração 10, compostos isolados da película de amendoim e padrões avaliados pelo método ABTS.....	143
Figura 53	Atividade antioxidante do extrato bruto (EB), fração metanólica (Fr-Met), subfração 10, compostos isolados da película de amendoim e padrões avaliados pelo método da redução do ferro (FRAP).....	144
Figura 54	Estrutura do composto 1, isolado da subfração 10 da película de amendoim.	147
Figura 55	Estrutura do composto 2, isolado da subfração 10 da película de amendoim.	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Níveis das variáveis independentes estudados no planejamento experimental completo 2^2 para a otimização da extração.....	80
Tabela 2	Teor de compostos fenólicos totais de extratos de bagaço e engaço de uva e película de amendoim (g AG.100g ⁻¹ peso seco).....	86
Tabela 3	Teor de compostos fenólicos totais de extratos de bagaço e engaço de uva e película de amendoim (g AG/100g ⁻¹ peso seco) em função do tempo de extração em banho termostatzado.....	90
Tabela 4	Planejamento fatorial composto central, com valores reais e codificados para o estudo do efeito das variáveis na porcentagem de atividade antioxidante.....	93
Tabela 5	Dados experimentais para a resposta de atividade antioxidante total dos extratos de engaço, bagaço e película de amendoim sob diferentes condições de extração, apresentadas na Tabela 4.....	94
Tabela 6	Tabela 6: Efeito das variáveis temperatura e concentração do planejamento fatorial completo 2^2 do solvente etanol no resíduo película de amendoim.....	95
Tabela 7	Análise de variância no estudo do efeito das variáveis temperatura e concentração do solvente etanol na atividade antioxidante da película de amendoim.....	97
Tabela 8	Efeito das variáveis do planejamento fatorial completo 2^2 do bagaço para os solventes acetona, etanol e propilenoglicol.....	98
Tabela 9	Coefficiente de regressão do planejamento fatorial completo 2^2 considerando apenas os valores significativos no limite de confiança de 95%.....	98
Tabela 10	Análise de variância no estudo do efeito das variáveis temperatura e concentração dos solventes acetona, etanol e propilenoglicol na atividade antioxidante do bagaço de uva.....	100
Tabela 11	Porcentagem de atividade antioxidante dos extratos preparados pela técnica de extração por ultrassom no tempo de 15 minutos.....	104
Tabela 12	Padrões utilizados na identificação, tempos de retenção e comprimento de onda característico.....	128
Tabela 13	Rendimento das 18 subfrações obtidas a partir do fracionamento em colunas de gel de Sephadex da Fr-Met. A porcentagem foi calculada em relação a massa de 150,4 mg da fração aplicada a coluna.....	134
Tabela 14	Atividade antioxidante obtida pelos métodos de sequestro do radical livre DPPH e ABTS das 18 subfrações obtidas a partir do fracionamento em colunas de gel de Sephadex da Fr-Met.....	135

Tabela 15	Atividade antioxidante avaliada pelo método de sequestro do radical DPPH, e expressa como EC ₅₀ para o extrato bruto, fração, subfração e compostos isolados	141
Tabela 16	Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C do composto 1 (500 MHz, CD ₃ OD).....	146
Tabela 17	Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C do composto 2 (500 MHz, CD ₃ OD).....	148

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1 OBJETIVOS	25
1.1.1 Objetivo geral.....	25
1.1.2 Objetivos específicos.....	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 Caracterização dos Subprodutos Agroindustriais.....	27
2.1.1 Agroindústria.....	27
2.1.2 Vitivinicultura no Brasil	28
2.1.3 O Amendoim no Brasil	31
2.2 Composição química dos subprodutos da agroindústria vinícola e do processamento de amendoim	33
2.2.1 Compostos fenólicos	34
2.3 Formação das espécies reativas de oxigênio	45
2.4 Antioxidantes.....	46
2.4.1 Ação antioxidante dos compostos fenólicos	47
2.5 Avaliação da atividade antioxidante.....	49
2.5.1 Método de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil).....	49
2.5.2 Método ABTS (2,2- azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico))	50
2.5.3 Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	52
2.6 Processo de extração.....	53
2.7 Estudo bioguiado.....	54
2.7.1 Purificação, fracionamento e isolamento.....	55
REFERENCIAS	57
3. Otimização da extração de antioxidantes de subprodutos agroindustriais pela metodologia de superfície de resposta: engaço e bagaço de uva cabernet sauvignon e película de amendoim	71
RESUMO	71
ABSTRACT	73
3.1 INTRODUÇÃO	75
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	77
3.2.1 Coleta das amostras	77
3.2.2 Testes de extração univariáveis	78

3.2.3 Planejamento experimental completo 22 para otimização das condições de extração	80
3.2.4 Avaliação do tempo de ultrassom na extração de compostos bioativos	80
3.2.5 Análises físico-químicas dos extratos dos subprodutos, frações, subfrações e compostos isolados.....	81
3.2.6 Avaliação da atividade antioxidante.....	81
3.2.7 Análise Estatística.....	82
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
3.3.1 Subprodutos vinícolas e película de amendoim.....	83
3.3.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta-visível	84
3.3.3 Avaliação da influência do pH e do processo de remoção de gordura com hexano no teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante	85
3.3.4 Avaliação do tempo de extração no teor de fenólicos e atividade antioxidante	89
3.3.5 Superfície de resposta.....	92
3.3.6 Planejamento Experimental	92
3.3.7 Extração em ultrassom	102
3.4 CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS.....	107
4. Isolamento bioguiado de compostos antioxidantes de película de amendoim.....	111
RESUMO	111
ABSTRACT	113
4.1 INTRODUÇÃO.....	115
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	116
4.2.1 Coleta das amostras	116
4.2.2 Preparo do extrato bruto da película de amendoim (EB).....	116
4.2.3 Purificação do EB em resina Amberlite XAD 2.....	117
4.2.4 Fracionamento em gel Sephadex LH-20.....	117
4.2.5 Isolamento e identificação dos compostos bioativos	118
4.2.6 Análises físico-químicas do extrato bruto da película de amendoim (EB), frações, subfrações e compostos isolados	118
4.2.7 Avaliação da atividade antioxidante.....	120
4.2.8 Análise Estatística	122
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	122
4.3.1 Tratamento e processamento da película de amendoim.....	122
4.3.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta-visível	123

4.3.3 Purificação em resina Amberlite XAD 2.....	125
4.3.4 Perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência do EB, Fr-Met e Fr-aquosa	128
4.3.5 Fracionamento em coluna de gel SEPHADEX LH-20.....	130
4.3.6 Atividade antioxidante das subfrações.....	134
4.3.7 Perfil químico das subfrações obtido por CLAE.....	136
4.3.8 Isolamento de compostos bioativos pela técnica de CLAE-semipreparativo	138
4.3.9 Avaliação da atividade antioxidante dos compostos isolados	139
4.3.10 Identificação química dos compostos isolados por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	145
4.4 CONCLUSÕES.....	150
REFERENCIAS	151
APÊNDICES	155

1. INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais para tratamento, cura ou prevenção de doenças remonta o desenvolvimento da civilização humana. Por milhares de anos, produtos de origem vegetal, animal e mineral foram as principais fontes de recurso terapêutico disponível ao homem. Nas últimas décadas o ser humano tem manifestado um interesse crescente pelo seu bem-estar e qualidade de vida, o que tem motivado a comunidade científica a procurar e identificar substâncias, naturais ou sintéticas, potencialmente benéficas para o organismo (GURIB-FAKIM, 2006).

Neste sentido, os produtos naturais têm sido fontes valiosas para o desenvolvimento de novos princípios ativos (NEWMAN; CRAGG, 2008; NEWMAN; CRAGG, 2007; BUTLER, 2004), permitindo o avanço na descoberta de biomoléculas com potencial aplicação em várias áreas da ciência (CLARDY; WALSH, 2004). Os desafios agora são identificar novos compostos bioativos naturais com potencial de aplicação e/ou substituição de substâncias sintéticas, principalmente para a indústria de alimentos e farmacêutica.

A diversidade e as particularidades estruturais das moléculas com origem na natureza como, por exemplo, os centros quirais, anéis aromáticos, sistemas complexos de anéis, o número e o *ratio* de heteroátomos são particularmente relevantes na pesquisa de novos compostos bioativos (CLARDY; WALSH, 2004; NICOLAOU; SNYDER, 2004; PETERSON; OVERMAN, 2004; KOEHN; CARTER, 2005). Apesar dos grandes avanços das últimas décadas sobre o domínio de isolamento e identificação de metabolitos secundários e atividades biológicas, muitos destes metabólitos isolados como, por exemplo, os flavonoides (MIDDLETON et al., 2000; NIJVELT et al., 2001), não traduziram de forma direta a compreensão dos mecanismos de ação dos extratos complexos, dos quais são normalmente obtidos e usados com fins terapêuticos. Várias hipóteses têm sido postuladas para as diferenças verificadas entre a atividade biológica dos extratos e dos constituintes isolados (ZHANG, 2004), tais como, a complexidade das interações químicas que são estabelecidas entre os constituintes dos extratos, a ação sinérgica nos receptores ou as dificuldades de absorção dos constituintes isolados (BELOFSKY et al., 2006; BELOFSKY et al., 2004; GILBERT; ALVES, 2003).

Mesmo quando não são descobertas novas entidades químicas nas pesquisas com produtos naturais, as atividades biológicas de compostos conhecidos podem fornecer pistas importantes para o desenvolvimento de novos fármacos. Desde o sequenciamento do genoma

humano já foram identificados milhares de alvos nos quais diferentes substâncias naturais podem agir interferindo no processo de várias doenças (KRAMER; COHEN, 2004).

Pesquisas por novas substâncias naturais bioativas têm aumentado significativamente nos últimos anos e os seus diversos benefícios à saúde cada vez mais elucidados e disseminados (WENG; WANG, 2000; JAYAPRAKASHA et al., 2001). Dentre essas substâncias, destacam-se os antioxidantes, substâncias capazes de combater danos oxidativos causados por radicais livres e que estão presentes em uma ampla gama de alimentos naturais e produtos alimentares, apresentando larga aplicação nos setores farmacêutico, cosmético e de alimentos (HALLIWELL et al., 1994; WEIJL et al., 1997) .

Entretanto, não só a partir de alimentos *in natura* e plantas é possível obter esses compostos. Em todo o mundo e principalmente no Brasil, que possui sua economia fortemente baseada no agronegócio, são geradas grandes quantidades de subprodutos (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003; MAKRIS et al., 2007) que, apesar de considerados sérios problemas ambientais por seu descarte ao meio, podem servir em muitos dos casos, como fontes ricas de diversos antioxidantes (RUBILAR et al., 2007).

Os subprodutos¹ agrícolas contêm uma variedade de substâncias biologicamente ativas, dentre as quais compostos fenólicos antioxidantes, que na maioria das vezes são descartados (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Estes compostos apresentam valor agregado potencial, dentre os quais o uso para aplicação como aditivos naturais em alimentos e produção de alimentos funcionais para a prevenção de doenças relacionadas com a geração de radicais livres, tais como a aterosclerose e o câncer.

Embora ainda represente um campo científico que careça de pesquisas, alguns estudos têm demonstrado a presença de propriedades funcionais em muitos resíduos agroindustriais, bem como os vários potenciais de aplicação (ANASTASIADI et al., 2010; LOU et al., 2004; AMICO et al., 2008; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; DEL VALLE et al., 2007).

Muitas destas substâncias funcionais presentes naturalmente em frutas e vegetais, assim como nestes subprodutos, exibem, além da atividade antioxidante e antimicrobiana, propriedades antialérgicas, antiaterogênicas, anti-inflamatórias, antitrombóticas, bem como efeitos cardioprotetivos e vasodilatadores (BENAVENTE-GARCIA et al., 1997; MIDDLETON et al., 2000; PUUPPONEN-PIMIA et al., 2001; MANACH et al., 2005).

¹ Produto de um processo de produção conjunta com menos importância em relação ao faturamento, que possui condição de comercialização, mas seu faturamento é insignificante.

Aliado as contribuições à saúde, estes compostos também apresentam significativa importância para a esfera industrial, já que os antioxidantes sintéticos mais usados pela indústria de alimentos como o BHA (butil-hidroxianisol), o BHT (butil-hidroxitolueno) e o TBHQ (terc-butilhidroquinona) têm despertado preocupação quanto as doses de segurança e toxicidade (WANASUNDARA; SHAHIDI, 1998).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Identificar compostos antioxidantes naturais de fontes alternativas de potencial aplicação na indústria de alimentos e bebidas.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* dos subprodutos agroindustriais engaço e bagaço de uva da variedade Cabernet Sauvignon e película de amendoim;
- Otimizar o processo de extração de compostos bioativos dos subprodutos por meio de planejamento experimental e análise de superfície de resposta;
- Fracionar e isolar bioguiadamente compostos antioxidantes do subproduto de maior potencial antioxidante;
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* dos compostos isolados;
- Identificar a estrutura química dos compostos bioativos isolados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Caracterização dos Subprodutos Agroindustriais

2.1.1 Agroindústria

O Brasil, desde os primórdios de seu desenvolvimento, sempre teve uma ligação importante com a atividade agrícola e esta com o mercado internacional. Das monoculturas do período colonial à exploração da cafeicultura, no final do século XIX e começo do século XX, a dinâmica da atividade agrícola brasileira era, em grande parte, decorrente de sua inserção no mercado mundial (FIESP, 2004).

A agroindústria brasileira é um setor que vem, já há algum tempo, se superando, gerando divisas e empregos, tendo em vista que o país conta com uma enorme extensão territorial. Segundo dados do IBGE (Figura 1), a agroindústria brasileira apresentou um crescimento, no primeiro semestre de 2010, de 6%, resultado bem superior ao obtido no mesmo período de 2009 (-5,3%), porém abaixo do assinalado pela média da indústria geral (16,2%). Os setores vinculados à agricultura (4,4%), de maior peso na agroindústria, apresentaram desempenho semelhante aos setores associados à pecuária (4,3%).

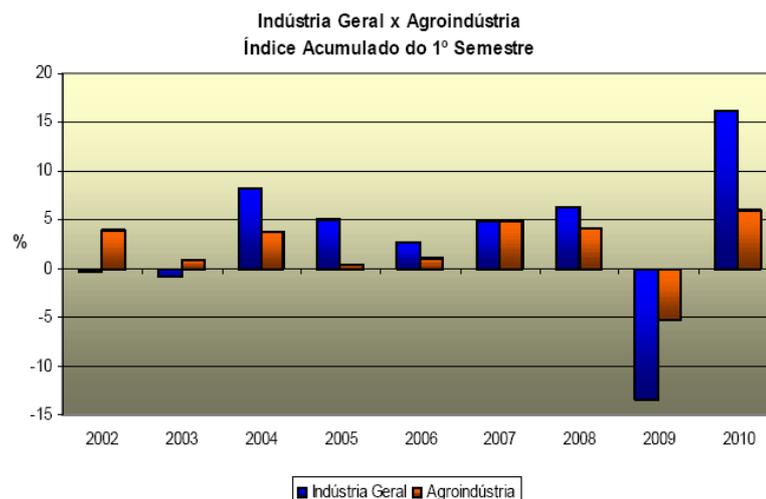


Figura 1 - Dados do crescimento da indústria e agroindústria no Brasil nos anos de 2002 a 2010
Fonte: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Indústria

O crescimento de 6% da produção agroindustrial deve-se a safra recorde que está sendo colhida em 2010, ao aumento moderado do volume e dos preços exportados de algumas

commodities e da recuperação na fabricação de máquinas e equipamentos agrícolas. Vale destacar também a baixa base de comparação no primeiro semestre do ano passado, decorrente dos efeitos da crise econômica internacional ocorrida no final de 2008, que provocou queda nas exportações e nos preços internacionais. O cenário positivo para a agroindústria e o aumento da renda agrícola estimularam os investimentos no setor (IBGE, 2010).

2.1.2 Vitivinicultura no Brasil

A vitivinicultura é uma atividade importante para a sustentabilidade da pequena propriedade rural no Brasil. Nos últimos anos tem se tornado importante também na geração de emprego, em grandes empreendimentos para produção de uvas de mesa e uvas para o processamento. Em 2009 foram produzidos no Brasil um total de 1.345.719 toneladas de uva, praticamente metade desta produção foi destinada ao processamento para elaboração de vinhos, suco de uva e derivados, sendo o restante destinado ao mercado de uva *in natura* (MELLO, 2009).

O estado do Rio Grande do Sul, responsável por cerca de 90% da produção nacional, apresentou no ano de 2009 um aumento de 19,53% na comercialização de suco e vinhos em relação ao ano anterior. Os vinhos de mesa apresentaram aumento de 17,66%, com destaque para os brancos que cresceram 48,22%, seguidos pelos rosados 26,78% e os tintos (12,84%), que representam mais de 80% do volume desta categoria de vinhos (MELLO, 2009).

No quadro vinícola descrito para as regiões fora do Rio Grande do Sul, existe uma novidade situada no Nordeste brasileiro, o promissor *Vale do rio São Francisco*, especialmente na cidade de Santa Maria da Boa Vista, próxima de *Petrolina e Juazeiro*, na fronteira dos Estados de Pernambuco e Bahia. Uma pequena parte restante dos vinhos brasileiros é proveniente de diminutas regiões vitivinícolas situadas nos estados de Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e São Paulo. No entanto, essas regiões cultivam quase que exclusivamente uvas americanas (Isabel, Niagara, etc.) que originam vinhos de categoria inferior. A Figura 2 ilustra atualmente as regiões produtoras de vinho no Brasil (SASSO; BASSIN; RONCHI, 2010).



Figura 2 - Principais regiões vinícolas do Brasil

2.1.2.1 Caracterização dos subprodutos da vinificação

O bagaço de uva é um subproduto agroindustrial obtido a partir do processo de fabricação de vinho e é constituído pelas partes sólidas das uvas (casca e semente) e por uma pequena parte do mosto ou do conjunto mosto/vinho que as embebe. É o produto resultante da prensagem das massas vínicas obtidas de uvas frescas, fermentadas ou não (SILVA, 2003). Os compostos presentes na uva, como resveratrol, ácido linoleico, ácido palmítico, entre outros, permanecem no bagaço em maior ou menor quantidade, dependendo do processo de fabricação do vinho.

Além do bagaço são gerados outros materiais sólidos durante a vinificação. Os principais subprodutos são obtidos durante o desengace (engaço), descuba e prensagem (cascas, sementes e borra). Atualmente, somente uma pequena quantidade desse material é reaproveitado, sem qualquer pré-tratamento (RUBERTO et al., 2007).

Os engacos são os materiais menos valorizados e de difícil disposição. Quando separados por máquina apropriada – desengaçadeira –, que os separam das bagas, constituem cerca de 3,5 – 4,5% da massa total da vindima (SILVA, 2003). Apresenta como principais constituintes os polifenóis, entre eles, compostos tânicos, os quais apresentam alto potencial nutracêutico e farmacológico (MURGA et al., 2000).

Os flavonóis glicosilados e as antocianinas estão entre os compostos fenólicos mais encontrados e estudados nas uvas, principalmente pela forte atividade antioxidante, além de propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas (NEGRO; TOMMASI; MICELI, 2003; SILVA; MATIAS; NUNES, 2005).

O fluxograma simplificado do processo de fabricação de vinhos, aonde é obtido como subproduto o bagaço e engaçó da uva estão apresentado na Figura 3.

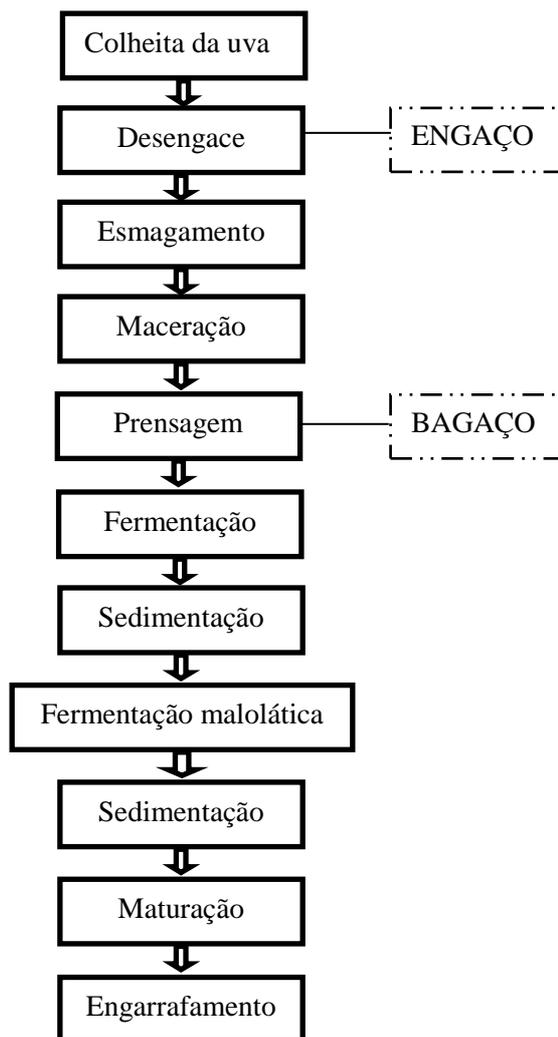


Figura 3 – Fluxograma do processo de fabricação de vinhos, obtendo como subprodutos o engaçó e bagaço da uva tinta

O bagaço e engaço representam um importante subproduto da indústria vinícola. Segundo dados da indústria, na produção de 100 litros de vinho branco obtêm-se 31,7 kg de resíduos e na produção de 100 litros de vinho tinto são gerados 25 kg de resíduos. Dos mais de 30 kg de resíduos dos vinhos brancos, aproximadamente 20 kg são de bagaço. Já dos 25 kg de subproduto dos vinhos tintos, aproximadamente 17 kg são de bagaço (SILVA, 2003).

Pelo fato destes resíduos apresentarem propriedades biológicas de importância para as indústrias farmacêuticas, químicas e de alimentos, e também pelo processo de fabricação do vinho gerar uma quantidade estimada de resíduo sólido de 30% do peso inicial (GÓMEZ-PLAZA; MIÑANO; LÓPEZ-ROCA, 2006), o aproveitamento dos subprodutos da vinificação tem nestes últimos anos merecido grande atenção dos responsáveis pelas políticas vitivinícola. Portanto, é possível e necessário se agregar valor a estes subprodutos agroindustriais, que atualmente são utilizados como ração animal e como adubo de vinhedos.

2.1.3 O Amendoim no Brasil

O Brasil é o 13^a produtor mundial de amendoim, com uma área plantada de 125,8 mil hectares e produção de aproximadamente 286,5 mil toneladas/ano (JOÃO; LOURENZANI, 2006). A região sudeste se destaca na produção dessa oleaginosa, sendo responsável por mais de 80% do total produzido na safra de 2004/05. O estado de São Paulo é o maior produtor, com produção estimada pelo Instituto de Economia Agrícola (IEA) de 216 mil toneladas/ano (MARTINS, 2006).

Segundo o IEA, nos últimos cinco anos, a produtividade paulista cresceu à taxa anual de 3,7%, enquanto a área plantada teve redução de 2% ao ano. A cultura do amendoim no país vem se recuperando após forte queda na área plantada a partir de meados da década de 80, devido à forte concorrência de outras oleaginosas, em especial a soja, que acabou tomando o espaço ocupado pelo amendoim no âmbito da indústria esmagadora, nas décadas de 60 e 70 (JOÃO; LOURENZANI, 2007).

O setor como um todo gera 42 mil empregos, dos quais 19% são na indústria, 24% na lavoura e 57% são indiretos. Em torno de 152 empresas produzem 92 mil toneladas de produtos finais, que representam um mercado da ordem de R\$ 840 milhões. Dessas empresas, 64% ficam em São Paulo, 24% no Paraná e as demais distribuídas pelo Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, estados do Sul e do Nordeste (JOÃO; LOURENZANI, 2007).

2.1.3.1 Mercado e Comercialização

A cadeia de produção de amendoim é composta pelo produtor da matéria-prima, que em São Paulo inclui arrendatários de áreas de produção de cana-de-açúcar, onde o cultivo e colheita são mecanizados. A produção é comercializada por meio de cooperativas ou diretamente ao cerealista, que avaliam a qualidade do produto, fixando preço e prazo de pagamento. O valor pago depende também da sazonalidade do mercado, seja para o consumo nacional ou para exportação (MARTINS, 2006).

O amendoim, uma oleaginosa de ciclo curto e fácil cultivo, possui grande atrativo como alimento e excelentes propriedades nutricionais. A região Nordeste é o segundo maior polo consumidor de amendoim no Brasil, com uma demanda anual superior a 50 mil toneladas de vagens. A produção regional de 10.000 toneladas/ano, é insuficiente para atender os principais mercados de consumo, como a Bahia, Sergipe, Ceará, Pernambuco e Paraíba (SANTOS; GONDIM; FREIRE, 2006).

Em 2004, o volume exportado de amendoim em casca era praticamente dezessete vezes maior que o volume exportado de amendoim preparado. Porém, em 2006, essa diferença caiu para 1,5 e as exportações de amendoim preparado somaram US\$ 880 mil, enquanto o produto em casca, cerca de US\$ 836 mil (MARTINS; PEREZ, 2007)

Com o aumento do processamento do amendoim, tem-se conseqüentemente um aumento do resíduo gerado. Os principais resíduos obtidos no processamento são a película e a farinha de amendoim, que possuem em torno de 20% de proteína bruta e atualmente são peletizados e utilizados na ração animal.

2.1.3.2 Película de amendoim

A técnica mais utilizada no processo de remoção da película do amendoim é a de blanchamento, onde o amendoim com película é submetido ao aumento de temperatura, o que provoca a expansão do grão. Em seguida, é submetido à diminuição de temperatura com ar frio, levando à contração. A película se solta do endosperma (grão) e, na etapa seguinte, é retirada por abrasão (lixamento). Todas as etapas são realizadas sem contato manual (IEA, 2007).

Estima-se que para uma produção de amendoim de 29,1 milhões de toneladas (safra mundial 1999/2000), a média do conteúdo de película gerada seja de 2,6%, o que corresponde a 750 mil toneladas. O valor comercial da película é de aproximadamente US\$ 12-20 por tonelada, o que a torna um subproduto de baixo valor (SOBOLEV; COLE, 2004).

A película apresenta uma coloração marrom, sabor adstringente e é rica em compostos fenólicos e outros compostos potencialmente promotores de saúde. Nepote, Grosso e Guzman (2002) verificaram que a película de amendoim contém aproximadamente 150 mg de fenólicos totais por grama de película seca e desengordurada, sendo que seis procianidinas do tipo A foram identificadas por Lou et al. (1999). Compostos fenólicos são reconhecidos por apresentarem atividades biológicas *in vivo* e *in vitro*, tais como sequestro de radicais ABTS, anion superóxido, radical hidroxil (MALDONADO et al., 2005) e inibição da peroxidação lipídica (VERSTRAETEN et al., 2005).

2.2 Composição química dos subprodutos da agroindústria vinícola e do processamento de amendoim

Segundo a literatura, os seguintes compostos químicos já foram identificados em uvas e seus subprodutos: flavonóis monoméricos e procianidinas: (+)-catequina; (-)-epicatequina; (-)-epicatequina 3-O-galato; procianidinas diméricas, procianidinas diméricas esterificadas com ácido gálico, procianidinas triméricas, procianidinas triméricas esterificadas com ácido gálico, bem como antocianinas (ANASTASIADI et al., 2010; AMICO et al., 2008; PASSOS et al., 2007; FREITAS et al., 1998; FLAMINI, 2003; GABETTA et al., 2000; HAYASAKA et al., 2003; REED; KRUEGER; VESTLING, 2005; SANTOS-BUELGA et al., 1995). Procianidinas tetrâmeras de sementes de uva já foram completamente separadas e identificadas (FULEKI; SILVA, 1997), entretanto, procianidinas com elevado grau de polimerização tem sido ainda objeto de estudo (MONAGAS et al., 2003).

A película de amendoim apresenta até 17% de procianidinas, monômeros, dímeros, trímeros, tetrâmeros; proantocianidinas oligoméricas, sendo que também já foram identificados flavonoides e ácidos fenólicos (YU; AHMEDNA; GOKTEPE, 2005; 2006; NEPOTE; GROSSO; GUZMAN, 2005; O'KEEFE; WANG, 2006; LOU et al., 1999; LOU et al., 2004; BALLARD et al., 2009; 2010).

Os grupos de compostos fenólicos de maior importância e maior ocorrência nesses subprodutos são abordados em maiores detalhes na sequência.

2.2.1 Compostos fenólicos

As plantas são fontes de alimentos energéticos e proteicos e também de diversos outros compostos químicos, principalmente do metabolismo secundário, comumente chamados de fitoquímicos. Os compostos fenólicos são uma classe específica de fitoquímicos, composta de pelo menos 8.000 substâncias já descritas (FARAH; DONANGELO, 2006).

Estes compostos desempenham um importante papel na natureza, atuando na regulação da maturação dos frutos (GOLSTEIN et al., 1963) e proteção destes face a agressão de agentes, tais como bactérias e insetos (STRONG et al., 1979). Nutricionalmente exercem uma ação preponderante no desenvolvimento de características sensoriais como a cor e o sabor de certos alimentos (HASLAM, 1980).

Além disto, exibem uma ampla faixa de propriedades biológicas, como atividade antialérgica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, antitrombótica, cardioprotetor e efeitos vasodilatadores (BENAVENTE-GARCIA et al., 1997; MANACH; MAZUR; SCALBERT, 2005; MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; PUUPPONEN-PIMIA et al., 2001; FRANKEL et al., 1993, 1995)

2.2.1.1 Flavonoides

Na natureza existe uma elevada variedade de compostos fenólicos que apresentam uma grande diversidade estrutural. Um dos grupos de maior importância é a dos flavonoides, que apresentam como estrutura básica o núcleo flavânico (Figura 4).

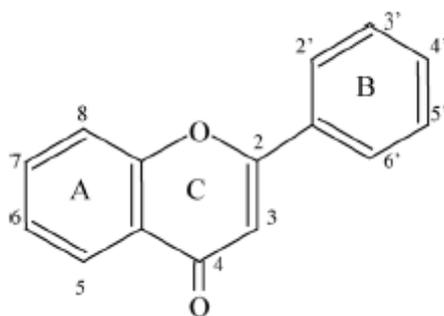


Figura 4 - Núcleo básico dos flavonoides, composto por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C)

Estima-se que existam cerca de 5000 tipos de flavonoides estruturalmente diferentes (CHUNG et al., 1998; BUELGA; SCALBERT et al., 2000). A explicação para a existência de

uma grande diversidade estrutural de flavonoides se dá pelas modificações que tais compostos podem sofrer, como: hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, entre outras (LOPES et al., 2000). Os flavonoides são frequentemente hidroxilados nas posições 3, 5, 7, 3', 4' e 5'. As ligações glicosídicas ocorrem geralmente nas posições 3 ou 7, e os monossacarídeos comuns são geralmente a L-ramnose, D-glucose, galactose e arabinose e o dissacarídeo glucoramnose. As prenilações geralmente ocorrem diretamente num átomo de carbono no anel aromático, mas *O*-prenilações também já foram encontradas (HAVSTEEN, 2002).

Como principais famílias de flavonóides na natureza pode-se citar as antocianidinas, os flavanóis, os flavonóis, as flavonas e as flavanonas (Figura 5).

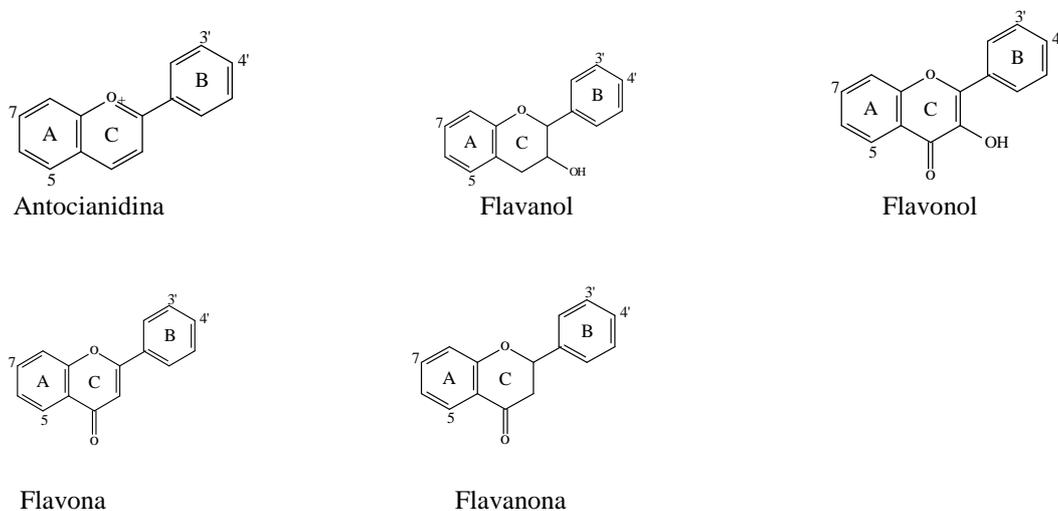


Figura 5 - Classificação das principais famílias de flavonoides na natureza

Além dos flavonoides, existem outras famílias de compostos fenólicos importantes na natureza, tais como os estilbenos e os ácidos fenólicos.

A família dos estilbenos, da qual faz parte o resveratrol, tem revelado importantes ações inibitórias face à oxidação lipídica (MARKUS; MORRIS, 2008; WENZEL, 2005). Resveratrol (3,5,4'-trihidroxistilbeno) é um fitoquímico que ocorre naturalmente em várias espermatófitas e está presente em amendoim, uva e vinho. Em vinhos tem sido responsabilizado pela capacidade protetora contra o câncer e doenças cardiovasculares, devido a sua ação antioxidante, antimutagênica e anti-inflamatória (LANDCAKE; PRICE, 1976; SIEMANN; CREASY, 1992).

Chung et al. (2003) observaram que o amendoim faz parte do limitado número de espécies de plantas que sintetizam o resveratrol, o qual também atua como uma fitoalexina, antibiótico produzido pela planta que está sob ataque, com atividade antifúngica.

2.2.1.2 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são divididos em três grupos. O primeiro é composto pelos ácidos benzoicos, que possuem sete átomos de carbono (C6-C1) e, são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. A fórmula geral está apresentada na Figura 6.

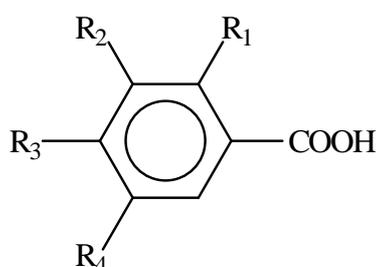


Figura 6 – Fórmula geral do ácido benzoico
Fonte: SOARES (2002).

O segundo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C6-C3), sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal (Figura 7). As cumarinas são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido *o*-cumárico (Figura 7) (SOARES, 2002).

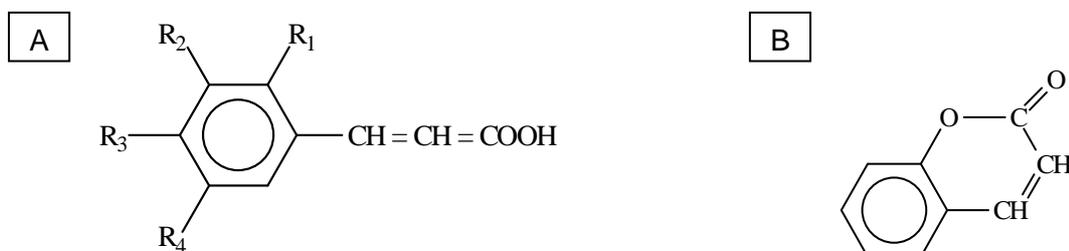


Figura 7 – Fórmula geral do ácido cinâmico (A) e cumarina (B)
Fonte: SOARES (2002).

Os ácidos fenólicos, como o cafeico, o cumárico e o ferrúlico abundantes em frutos, também se encontram distribuídos na casca e na polpa da uva, entretanto os seus teores diminuem com o amadurecimento e também durante a fermentação do vinho (MACHEIX; SAPIS; FLEURIET, 1991).

Embora outras características também contribuam para a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e seus ésteres, esta é, geralmente, determinada pelo número de hidroxilas presentes na molécula e também com a proximidade do grupo $-CO_2H$ com o grupo fenil.

Quanto mais próximo esse grupo estiver do grupo fenil maior será a capacidade antioxidante do grupo hidroxila na posição meta (HAVSTEEN, 2002).

2.2.1.3 Catequinas

As catequinas pertencem à família dos 3-flavanóis e são constituídas por um anel floroglucinol (A), um anel pirânico (C) e um anel catecol (B) (Figura 8).

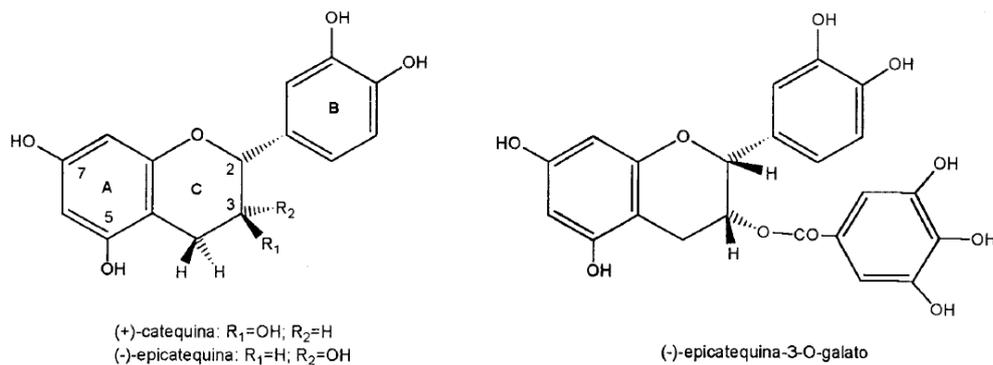


Figura 8 - Estrutura das catequinas mais abundantes na natureza

Os carbonos C2 e C3 desta unidade são assimétricos constituindo centros quirais, dos quais resultam 4 isômeros: (+), (-)-catequina e (+), (-)-epicatequina. Nos isômeros (+)-catequina e (+)-epicatequina o grupo 3,4-di-hidrofenilo ligado ao carbono C2 e o grupo hidroxilo no carbono C3 surgem em posição *trans* (2*R*, 3*S*) e nos restantes isômeros em posição *cis* (2*R*, 3*R*). Na natureza os isômeros mais abundantes são a (+)-catequina e a (-)-epicatequina. Estes compostos também podem encontrar-se esterificados com um grupo galóilo na posição C3 (ésteres do ácido gálico) (Figura 8).

Os flavonoides, como por exemplo catequina, epicatequina, epigalocatequina são os constituintes monoméricos dos taninos condensados, embora eles sejam também muito comuns como monômeros livres (MAZZA, 1995). Apesar de existirem estes 2 grupos, só os taninos condensados ocorrem realmente nas uvas e nos seus derivados. No caso das uvas (*Vitis vinifera* L.), os principais elementos são as formas monoméricas de (+)-catequina e (-)-epicatequina e ainda os oligômeros e polímeros formados a partir das formas monoméricas através do estabelecimento de ligações C₄-C₈'' ou C₄-C₆'' (RICARDO DA SILVA et al., 1991; PRIEUR et al., 1994; SOUQUET et al., 1996). Estas estruturas presentes nas uvas e vinhos podem ainda encontrar-se associadas a ácidos, como o ácido gálico, normalmente ao nível do carbono 3 (RICARDO DA SILVA et al., 1991).

2.2.1.4 Proantocianidinas

Proantocianidinas são polímeros constituídos por duas ou mais unidades de flavan-3-óis, sendo as catequinas e galocatequinas as unidades mais simples. Estes compostos existem na natureza hidroxilados nas posições 5 e 7 do anel A e variam na estereoquímica do carbono 3 do anel C e no grau de hidroxilação do anel B. As estruturas poliméricas de flavan-3-óis (proantocianidinas) dividem-se em dois grupos: as procianidinas, derivadas de catequina e epicatequina e as prodelfinidinas, derivadas de galocatequina e epigalocatequina. Os nomes procianidinas e prodelfinidinas resultam do fato destes compostos por hidrólise ácida originarem respectivamente a cianidina e a delfinidina (Figura 9) (BATE-SMITH, 1954).

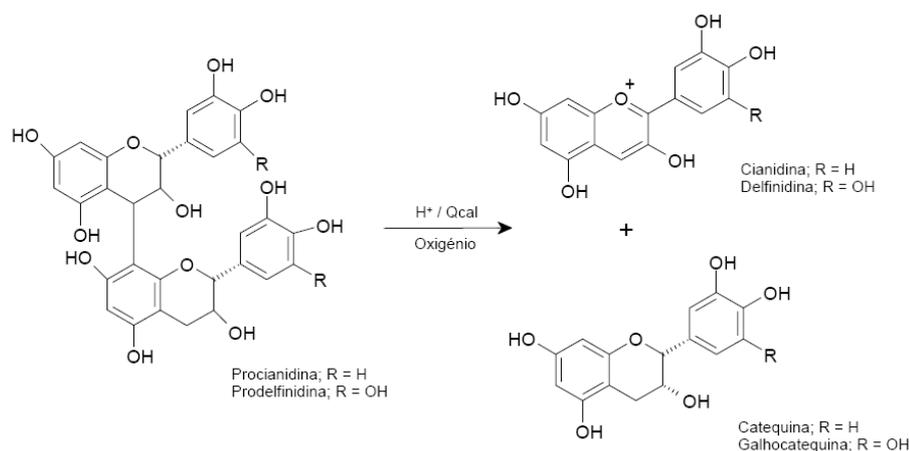


Figura 9 - Reação de decomposição das proantocianidinas (Bate-Smith, 1954)

As procianidinas também pertencem ao grupo dos 3-flavanóis e são formadas pela associação de várias unidades monoméricas (catequinas e epicatequinas): 2-5 unidades, para catequinas oligoméricas; e acima de 5 unidades, para catequinas poliméricas. As procianidinas diferem na posição e na configuração de suas ligações monoméricas (AUGER, 2004).

As estruturas dimericas destes compostos são do *tipo B* ($C_{30}H_{26}O_{12}$), se a ligação entre as unidades monoméricas (ligação interflavonoide) é estabelecida entre o carbono C4 da unidade superior e o carbono C8 ou C6 da unidade inferior (C4-C6 ou C4-C8) (Figura 10), ou do *tipo A* ($C_{30}H_{24}O_{12}$) se, para além da ligação entre átomos de carbono, apresentam uma ligação éter C2-O-C7 adicional entre as duas unidades monoméricas (Figura 11).

Procianidinas do tipo A apresentam menor atividade antioxidante quando comparadas com as do tipo B (KONDO et al., 2000).

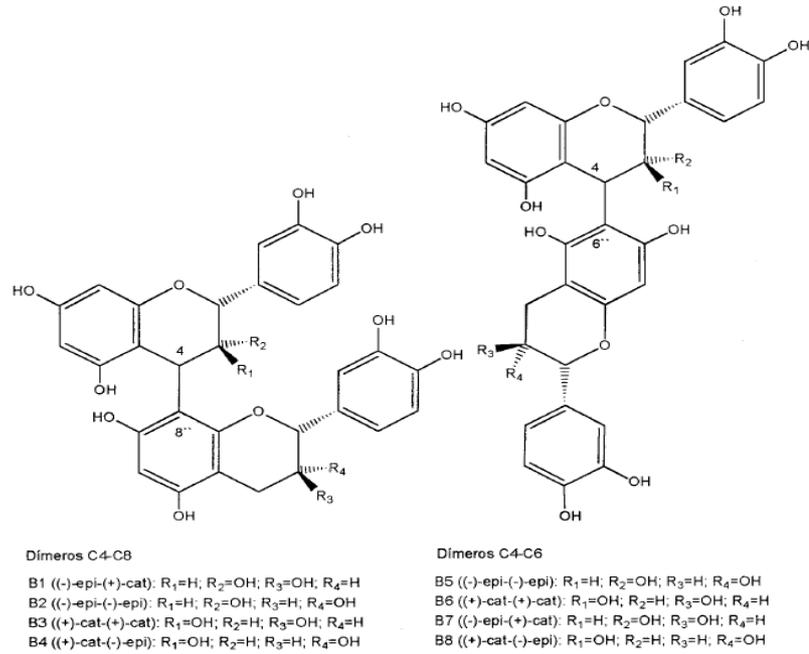


Figura 10 - Estrutura das procianidinas diméricas do tipo B

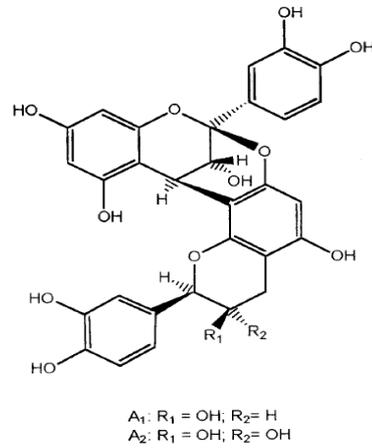


Figura 11 - Estrutura das procianidinas diméricas do tipo A

As procianidinas podem também apresentar na sua estrutura um ou mais grupos galoílo (ésteres galato) (Figura 12).

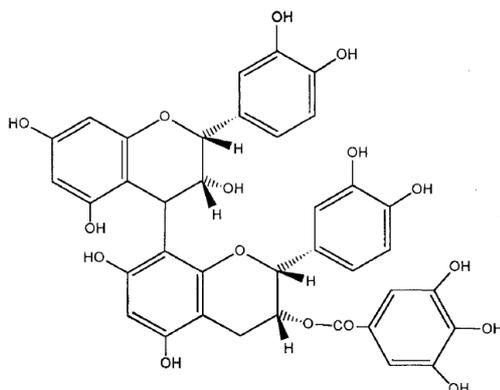
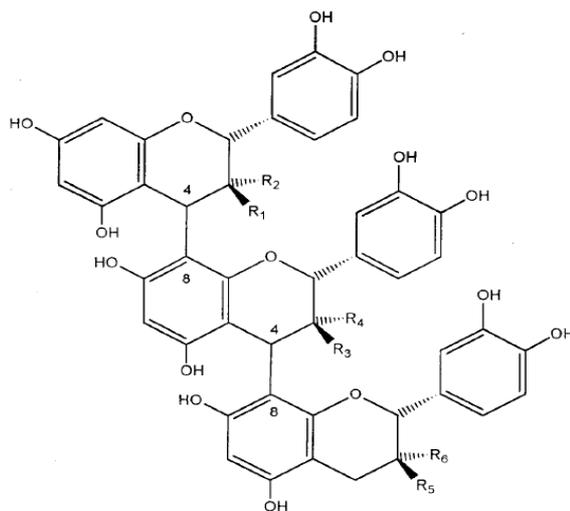


Figura 12 - Estrutura de uma procianidina esterificada com o ácido gálico (B2-3-“O-galato)

As procianidinas triméricas podem ser do *tipo C*, se as ligações interflavonoides são do tipo B, ou do *tipo D*, se uma ligação é do tipo B e outra é do tipo A (Figura 13).



C1 ((-)-epi-(-)-epi-(-)-epi) : R₁,R₃,R₆=H; R₂,R₄,R₆=OH
 T1 ((-)-epi-(-)-epi-(+)-cat) : R₁,R₃,R₆=H; R₂,R₄,R₆=OH

Figura 13 - Estrutura de uma procianidina trimérica do tipo C

Além das estruturas monoméricas, diméricas e triméricas existem formas mais polimerizadas de proantocianidinas; os oligômeros que apresentam até 6 unidades de monómeros e os polímeros compostos por mais de 6 monómeros. Em ambos podem existir ligações de tipo C4-C8 e C4-C6 que permitem a formação de um número ilimitado de isômeros (Figura 14) (HASLAM, 1998).

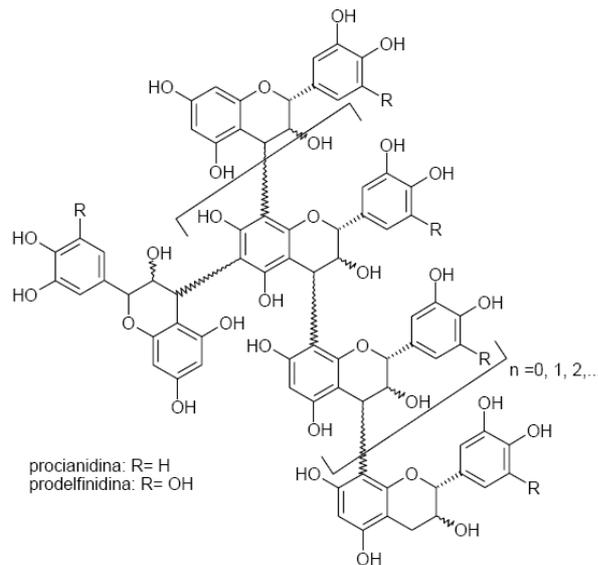


Figura 14 - Estrutura geral de oligômeros e polímeros de proantocianidinas

Procianidinas são potentes antioxidantes e suas formas oxidadas adquirem estabilização adicional devido ao extenso deslocamento do elétron, induzido pela unidade catecol no anel aromático B (WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004). Além disso, os vários grupos fenólicos *o*-di-hidroxi nas estruturas com alto peso molecular fornece as procianidinas uma alta capacidade de complexar metais como íons (Fe(III), Cu(II), Al(III)) e proteínas. Estas são as principais características responsáveis pelo interesse nutricional e biológico das procianidinas (CHUNG et al., 1998; SILVA et al., 1991). Diversos efeitos biológicos são atribuídos a esta classe de compostos, tais como: antimicrobiano, antiviral, anticarcinogênico, anti-inflamatório, antialérgico e também ação de vasodilatação (KONDO, 2000; LARANJINHA, CADENAS, 1999).

Em meio ácido, alcoólico e a quente, as proantocianidinas caracterizam-se por libertarem antocianidinas, devido à ruptura das ligações estabelecidas entre as unidades monoméricas.

2.2.1.5 Antocianidinas

As antocianidinas são a estrutura básica das antocianinas e apresentam como estrutura fundamental o cátion flavílico (2-fenilbenzopirilium) (Figura 15). As antocianidinas (agliconas) consistem de um anel aromático (A) ligado a um anel heterocíclico (C) que contem oxigênio, o qual está ligado por meio de uma ligação carbono-carbono a um terceiro anel aromático (B). A maioria possui hidroxilas nas posições 3, 5 e 7.

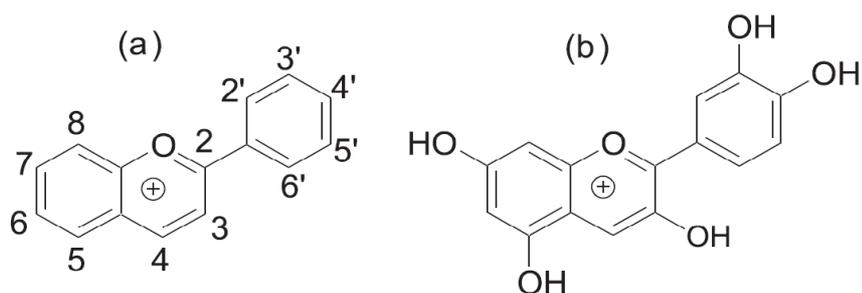


Figura 15 - Estrutura do cátion flavílico (a) e estrutura da antocianidina cianidina (b)

Já nas antocianinas, uma ou mais destas hidroxilas estão ligadas a açúcares, sendo os mais comuns glicose, xilose, arabinose, ramnose, galactose ou dissacarídeos constituídos por esses açúcares, aos quais podem estar ligados ácidos fenólicos, como *p*-coumárico, caféico, fenílico e vanílico. O açúcar presente nas moléculas de antocianinas confere maior solubilidade e estabilidade a estes pigmentos, quando comparados com as antocianidinas (KONCZAK, ZHANG, 2004). A cianidina 3-glucosídeo é um exemplo de antocianina presente na maioria dos vegetais (Figura 16).

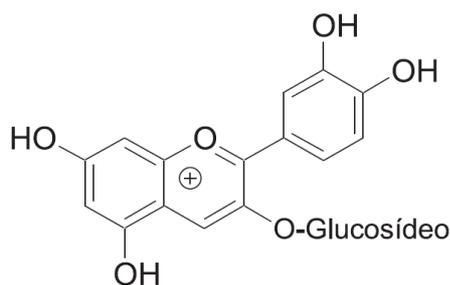


Figura 16 - Estrutura da antocianina cianidina 3-glucosídeo

Com a mesma origem biossintética dos outros flavonoides, as antocianinas são estruturalmente caracterizadas pela presença do esqueleto contendo 15 átomos de carbono na forma C6-C3-C6, porém, ao contrário dos outros flavonoides, as antocianinas absorvem fortemente luz na região visível do espectro, conferindo uma grande diversidade de cores (BROUILLARD, 1982)

Devido a solubilidade em água das antocianinas (TIMBERLAKE, 1975), estes compostos ocorrem nos tecidos de plantas dissolvidas no fluído da célula vegetal, que geralmente apresenta pH levemente ácido (HAYASHI, 1962). As antocianinas mais comumente encontradas em frutas são derivadas principalmente de seis antocianidinas: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina. A nomenclatura dos pigmentos é derivada da fonte (do vegetal) em que eles foram primeiramente isolados

(HARBORNE, 1994). As diferenças entre as várias antocianinas estão no número de grupos hidroxílicos na molécula, no grau de metilação destes grupos, na natureza e no número de açúcares ligados à molécula e na posição dessas ligações, bem como na natureza e no número de ácidos alifáticos e/ou aromáticos ligados ao(s) açúcar(es) na molécula de antocianina.

Uma característica marcante das antocianinas está no fato de que em soluções aquosas, apresentam diferentes estruturas em função do pH (Figura 17) (da COSTA et al., 1998; FLESCHHUT et al., 2006; HEREDIA et al., 1998). De modo geral, em meio extremamente ácido (pH entre 1-2), as antocianinas apresentam coloração intensamente avermelhada devido ao predomínio da forma cátion flavílico (AH^+) (Figura 17A). Para um meio com pH entre 2 e 4, é observado um equilíbrio entre o cátion flavílico e uma estrutura conhecida como pseudobase carbinol (Figura 17B-D).

Com o aumento do pH, as antocianinas perdem a cor até se tornarem praticamente incolores em pH aproximadamente 6, devido à predominância das espécies pseudobase carbinol (Figura 17E) e anidrobases quinoidais, estas podem formar a espécie cis-chalcona (C_C) (Figura 17F). A formação da chalcona ocorre com a ruptura do anel heterocíclico o que, dependendo do tipo de antocianina, pode tornar a reação irreversível. Em valores de pH entre 4 e 6, quatro formas estruturais coexistem: cátion flavílico, anidrobases quinoidais, pseudobase carbinol e chalcona. O equilíbrio entre as bases quinoidais e o carbinol ocorrem via cátion flavílico (Figura 17D, A e E) (COOPER-DRIVER, 2001).

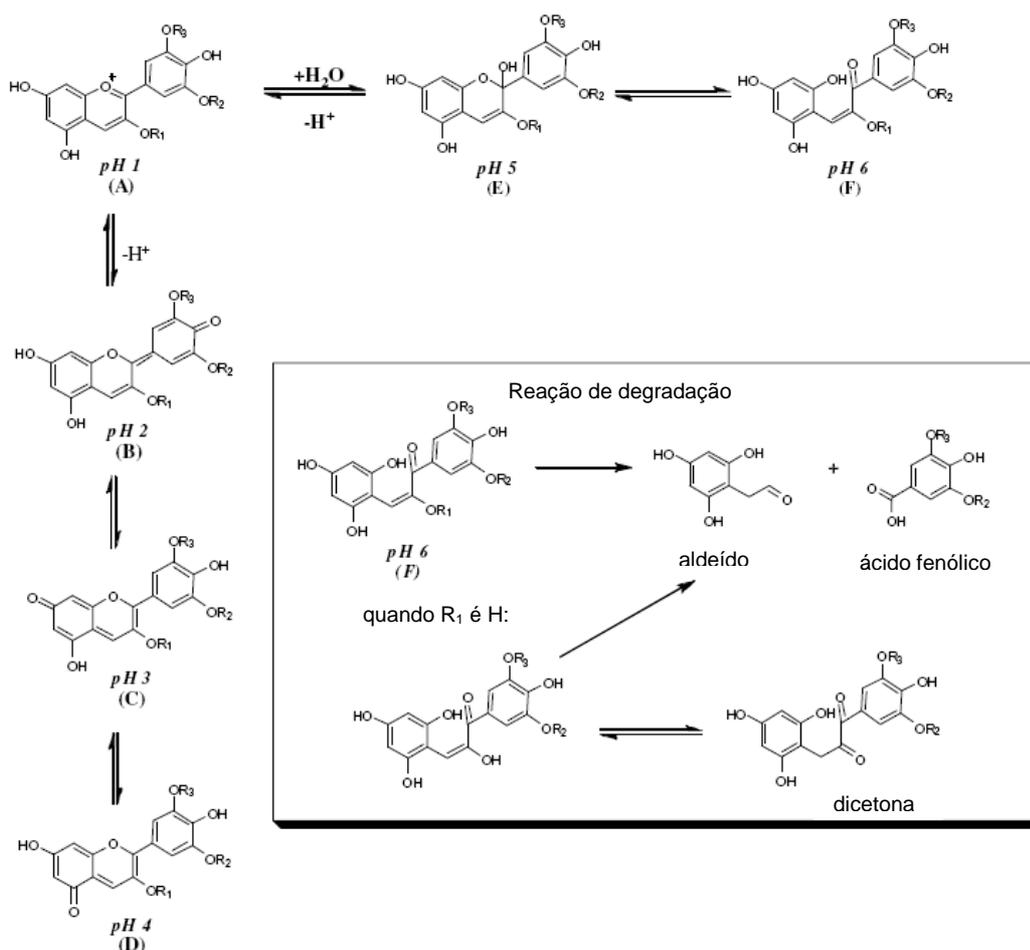


Figura 17 - Possíveis transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH

Nos últimos anos estes compostos têm recebido grande atenção, não somente devido ao seu papel e função nos produtos de origem vegetal, como na Enologia, mas também pelos potenciais benéficos para a saúde humana.

As antocianinas são muito importantes nas características gustativas dos vinhos, assim como na cor e sabor destes, devido à sua associação com as proantocianidinas (PRIEUR et al., 1994; SCHWARZ; HOFMAN; WINTERHALTER, 2004; SCHWARZ; WABNITZ, WINTERHALTER, 2003). Por outro lado, reagem com as proteínas da saliva, sendo esta reação a responsável pela adstringência apresentada pelos vinhos (BINDON et al., 2010).

2.3 Formação das espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (ERO) desempenham uma importante função em muitos processos biológicos. As EROs são produzidas durante reações de transferência de elétrons em células aeróbicas, especialmente pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. A alta reatividade das espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH^\bullet), pode causar danos funcionais ao homem, pois são constantemente formadas no corpo humano. Também estão envolvidos como mensageiros secundários em muitas respostas fisiológicas, bem como em condições patológicas (HAMID et al., 2002).

Cada ERO tem suas próprias características, mostrando diferentes reatividades e tempos de meia-vida. O oxigênio singlete (1O_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), não são radicais e seu tempo de meia-vida é diferente. O radical hidroxil (OH^\bullet) é o mais reativo e possui o menor tempo de vida. O radical peroxil (LOO^\bullet) possui o maior tempo de vida, sendo capaz de se difundir do seu sítio de geração, a menos que, seja neutralizado por antioxidantes (LEE; LEE, 2006; HALLIWELL, 2000).

A produção de EROs é bem controlada sob condições fisiológicas normais e estes exercem atividades microbicidas, sem acompanhar efeitos colaterais tóxicos. Entretanto, quando produzidas em quantidades excessivas a capacidade dos sistemas antioxidante da célula, as EROs tornam-se nocivas as membranas celulares e as moléculas biológicas (JACOB; BURRI, 1996).

A eliminação das espécies reativas de oxigênio é um dos pré-requisitos da vida aeróbia e, muitos sistemas de defesa antioxidante de prevenção e reparo estão envolvidos. Estes sistemas consistem em sequestradores não enzimáticos, conhecidos como antioxidantes, bem como sistemas enzimáticos que incluem a superóxido desmutase e hidroperoxidases, como a peroxidase glutatona, catalase e outras importantes peroxidases hemoproteicas (SIES, 1991). Embora os organismos tenham seus próprios sistemas para destruir as EROs, suas funções são limitadas, especialmente em condições de estresse severo (HAMID et al., 2002).

As EROs que são produzidas em excesso ou as que escapam dos sistemas de defesa antioxidantes, agem diretamente sobre vários componentes celulares, tais como DNA, proteínas e, lipídeos, e estão associadas ao desenvolvimento de muitas alterações patológicas, como câncer, doenças cardiovasculares, queda do sistema imunológico, disfunções cerebrais,

catarata, processos de envelhecimento e outras (HALLIWELL, 1994; ARUOMA, 1994; CHEUNG; CHEUNG, 2003).

Os ácidos graxos poliinsaturados das membranas, por exemplo, são muito vulneráveis ao ataque de radicais livres. Estas moléculas desencadeiam reações de oxidação nos ácidos graxos da membrana lipoprotéica, denominadas de peroxidação lipídica, que afetarão a integridade estrutural e funcional da membrana celular, alterando sua fluidez e permeabilidade (RICE-EVANS; BURDON, 1993; HAMID et al., 2002).

Devido aos sistemas defensivos antioxidantes em humanos não serem totalmente eficientes, é desejável a ingestão de antioxidantes exógenos para combater o excesso de EROs. Os antioxidantes da dieta como a vitamina C, vitamina E e os carotenóides reduzem o risco de desenvolvimento de certas doenças, pois combatem o excesso de radicais (JACOB; BURRI, 1996; LEE; LEE, 2006).

2.4 Antioxidantes

Uma definição ampla do termo antioxidante que cobre todos os substratos oxidáveis foi sugerida por Halliwell e Gutteridge (1990), da seguinte forma: "qualquer substância que diminui ou previne significativamente a oxidação de outra substância, sempre que presente em menor concentração comparada a substância oxidável de interesse".

Os antioxidantes são conhecidos pela ação em diferentes níveis do processo de oxidação envolvendo moléculas lipídicas. Podem agir diminuindo a concentração de oxigênio, interceptando o oxigênio singlete; evitando a fase de iniciação da oxidação pelo sequestro de radicais hidroxil; quelando íons metálicos, e decompondo produtos primários a compostos que não são radicais (HAVSTEEN, 2002).

Estas definições gerais não limitam a atividade antioxidante a um grupo específico de compostos químicos e nem se referem a um mecanismo particular de ação. Para a situação *in vivo*, o conceito de antioxidante é amplo, incluindo enzimas antioxidantes, ligações de ferro e proteínas transportadoras e outros compostos que afetam o sinal de transdução e expressão gênica. Para alimentos e bebidas, antioxidantes podem ser relacionados à proteção da oxidação de substratos específicos ou a formação de produtos de oxidação específicos, e valores podem ser definidos para diferentes produtos. De um ponto de vista termodinâmico, a ação antioxidante depende de parâmetros bem definidos, como as ligações de energia e potenciais de redução padrão, e, desta forma é possível deduzir se um dado radical pode ser sequestrado por um antioxidante específico ou não (BECKER; NISSEN; SKIBSTED; 2004).

2.4.1 Ação antioxidante dos compostos fenólicos

Recentemente tem havido um interesse cada vez mais crescente nos compostos fenólicos, principalmente pelas suas propriedades antioxidante, antimutagênica e destruidora de radicais livres. Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma correlação entre um aumento no consumo de antioxidantes fenólicos e um risco reduzido de doença cardiovascular e certos tipos de câncer (PUUPPONEN-PIMIA et al., 2001; MANACH; MAZUR; SCALBERT, 2005; FERNANDEZ-PANCHON et al., 2008).

Antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais (DUARTEALMEIDA et al., 2006), agindo tanto na etapa de iniciação quanto na propagação do processo oxidativo (Figura 18). Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (NAWAR, 1985). Os compostos fenólicos e alguns de seus derivados são, portanto, eficazes na prevenção da oxidação lipídica.

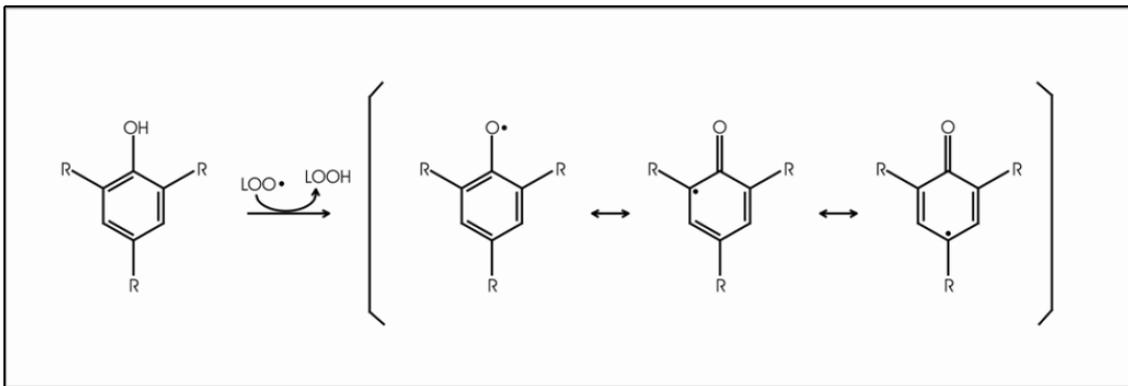


Figura 18 - Mecanismo antioxidante dos compostos fenólicos (WONG, 1985)

Desta maneira, os intermediários do radical fenóxi são relativamente estáveis; portanto, uma nova reação em cadeia não é facilmente iniciada. Os intermediários do radical fenóxi também agem como destruidores da rota de propagação pela reação com outros radicais livres (REISCHE et al., 2002).



Entretanto, sob certas condições (altas concentrações de antioxidantes fenólicos, alto pH e presença de ferro), os antioxidantes fenólicos podem iniciar um processo de auto-oxidação e comportarem-se como prooxidantes (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992).

Os flavonoides estão entre os antioxidantes mais potentes, pois apresentam um ou mais elementos estruturais seguintes envolvidos na atividade antirradical: (1) a presença de um grupo catecol no anel B, o qual possui as melhores propriedades de doação de elétrons, (2) uma dupla ligação na posição 2, 3 conjugada com um grupo 4-oxo, o qual é responsável pelo deslocamento do elétron do anel B e (3) grupos hidroxil em posições 3 e 5 (WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004).

A ação antioxidante das catequinas e procianidinas ainda não se encontra totalmente descrita e compreendida em termos mecanísticos, mas analogamente a outros compostos fenólicos, especula-se estarem envolvidos em vários processos já descritos anteriormente: complexação de íons de metais de transição, neutralização de radicais livres e regeneração da vitamina E (FRANKEL et al., 1993; TURAN et al., 2007; MENDOZA-WILSON; GLOSSMAN-MITNIK, 2006).

Embora, tradicionalmente, a atividade antioxidante tenha sido atribuída apenas a compostos fenólicos solúveis (extrato de polifenóis), um estudo recente sugere que polifenóis não extraídos (procianidinas poliméricas e taninos hidrolisáveis de alto peso molecular) são de 15 a 30 vezes mais efetivos para na quelação de radicais peroxil que os fenóis simples (HAGERMAN et al., 1998). Como esses compostos não são absorvidos, eles poderiam exercer sua atividade antioxidante dentro do trato digestivo e proteger lipídios, proteínas e carboidratos contra o dano oxidativo durante a digestão e tornar disponível os antioxidantes solúveis (BRAVO, 1998)

Estudos têm demonstrado a eficiência antioxidante dos 3-flavanóis, mesmo em pequenas quantidades, provavelmente pelas características estruturais como a unidade catecol, que em conjugação com a sua aromaticidade proporcionam uma elevada estabilidade à forma oxidada do polifenol (BORS et al., 1999; WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004; FERNANDEZ-PANCHON et al., 2008). Estes compostos ao neutralizarem radicais livres transformam-se num radical, cuja reatividade depende do caráter redox e condições envolventes como concentração, temperatura, presença de ativadores, entre outras. Nas condições fisiológicas, as procianidinas surgem em baixa concentração e as suas propriedades químicas conferem-lhes uma estabilidade suficiente para não desencadear novos processos oxidativos.

2.5 Avaliação da atividade antioxidante

A determinação da capacidade antioxidante de uma amostra pode depender da tecnologia e do radical livre gerador ou oxidante utilizado nesta medida. Além disso, a comparação de diferentes métodos analíticos constitui um fator chave para ajudar os pesquisadores a escolherem um método e entender os resultados obtidos através do mesmo (CAO; PRIOR, 1998).

Poucos destes métodos cumprem os requisitos para a aplicabilidade em todas as matrizes: compostos puros, misturas simples de compostos em solução, extratos alimentícios ricos em antioxidantes e bebidas, fluidos biológicos, especialmente plasma e saliva, em certas circunstâncias, o potencial antioxidante total pode ser realmente mais informativo do que os resultados dos constituintes antioxidantes individuais (RICE-EVANS, 1999).

Um método ideal para avaliar a atividade antioxidante de um composto deve ser rápido, reprodutível, requerer pequenas quantidades de reagentes, e não ser influenciado pelas propriedades físicas do composto (MARCO, 1968). Vários métodos têm sido aplicados para avaliação da atividade antioxidante, mas deve-se notar que não existe um método universal simples, por meio do qual as atividades antioxidantes possam ser medidas precisa e quantitativamente (ARNAO, 2000; NIKI, 2002; BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004). Na sequência, são abordados os quatro métodos utilizados neste trabalho para se avaliar a atividade antioxidante dos resíduos agroindustriais.

2.5.1 Método de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil)

O ensaio do DPPH tornou-se bastante popular no estudo de antioxidantes naturais, sendo uma das razões por se apresentar como um método simples e altamente sensível. Pode-se verificar pela estrutura do DPPH (Figura 19), que o composto pode aceitar um elétron ou radical hidrogênio para se tornar uma molécula estável, que apenas raramente pode ser oxidada irreversivelmente (BLOIS, 1958).

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) é um radical de nitrogênio orgânico, estável, de cor violeta e possui absorção máxima na faixa de 515-520 nm. Na presença de um doador de hidrogênio ou elétron a intensidade de absorção diminui e a solução com o radical perde cor, tornando-se amarela, de acordo com o número de elétrons capturados. (BRANDWILLIANS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Apesar do ensaio do DPPH ser um teste rápido, simples, preciso e com boa reprodutibilidade dos resultados, que não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação, algumas precauções devem ser tomadas quanto à utilização do método e interpretação dos resultados. Dentre eles, o tipo e concentração do composto analisado, cinética de reação do antioxidante, características do meio reacional (pH, tipo de solvente), presença de interferentes, sinergismo, afinidade solvente-substrato e forma de expressão dos resultados (MOLYNEUX, 2003).

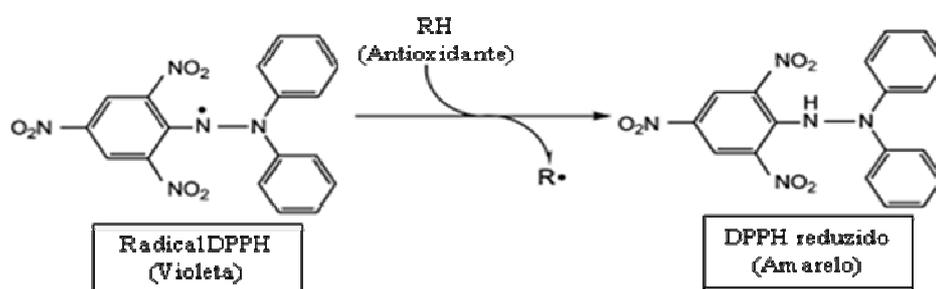


Figura 19 - Estrutura química do radical DPPH e reação de estabilização com um antioxidante
Fonte: Moon; Shibamoto (2009)

Os resultados podem ser expressos em porcentagem de atividade antioxidante, micromols de equivalentes do padrão utilizado (trolox, por exemplo) ou ainda como EC50, que é a quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de radical livre do meio em 50% (MOON; SHIBAMOTO, 2009; ATMANI et al., 2009).

2.5.2 Método ABTS (2,2- azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico))

Alem do método de sequestro do radical DPPH, outro método que é muito utilizado para a determinação da atividade antioxidante é o método do $ABTS^{+\bullet}$ (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina- 6-ácido sulfônico). Ambos apresentam excelente estabilidade em certas condições de análise, mas também mostram diferenças importantes frente aos antioxidantes e quanto à manipulação (ARNAO, 2000).

O $DPPH^{\bullet}$ é um radical livre que é adquirido dessa forma, sem a necessidade de preparo; já o radical $ABTS^{+\bullet}$ deve ser gerado por reações enzimáticas ou químicas. Outra diferença é que o $ABTS^{+\bullet}$ pode ser solubilizado em meios orgânicos e aquosos nos quais a atividade antioxidante pode ser determinada, dependendo da natureza dos compostos

antioxidantes, enquanto que o DPPH[•] somente pode ser solubilizado em meios orgânicos (meios alcoolicos, especificamente) (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

A determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre ABTS^{•+} (2,2- azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)) tem sido amplamente utilizada na avaliação da atividade antioxidante em alimentos e bebidas, devido à sua aplicabilidade na fase aquosa e lipídica e oferecer resultados reprodutíveis (KUSKOSKI et al., 2005).

Originalmente proposto por Miller et al. (1993), o procedimento baseava-se na ativação da metamioglobina com peróxido de hidrogênio na presença do ABTS para gerar o ABTS^{•+}, com ou sem antioxidantes no meio. Mas, devido algumas criticas, o método foi aperfeiçoado sendo que o radical agora é gerado sem a presença de antioxidantes.

O método, segundo Re et al. (1999), baseia-se na geração do radical ABTS, de cor azul esverdeado, formado pela reação de persulfato de potássio com (2,2- azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)) produzindo a oxidação do ABTS. A atividade antioxidante das amostras é determinada pela descoloração do ABTS, medindo-se a redução do radical a uma absorvância de 734 nm (Figura 20). A absorvância da reação da mistura de ABTS e um antioxidante é comparada com atividade do antioxidante sintético Trolox (padrão), e, os resultados expressos em μMol de Trolox $\text{TEAC}\cdot\text{g}^{-1}$ (atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

Essa metodologia pode avaliar a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica, mas vale ressaltar que a reação com doadores de hidrogênio apresenta baixa seletividade, e dependendo do composto, como por exemplo, alguns polifenóis e produtos de origem natural, a reação com ABTS é muito lenta podendo influenciar no resultado (SURVESWARAN et al., 2007).

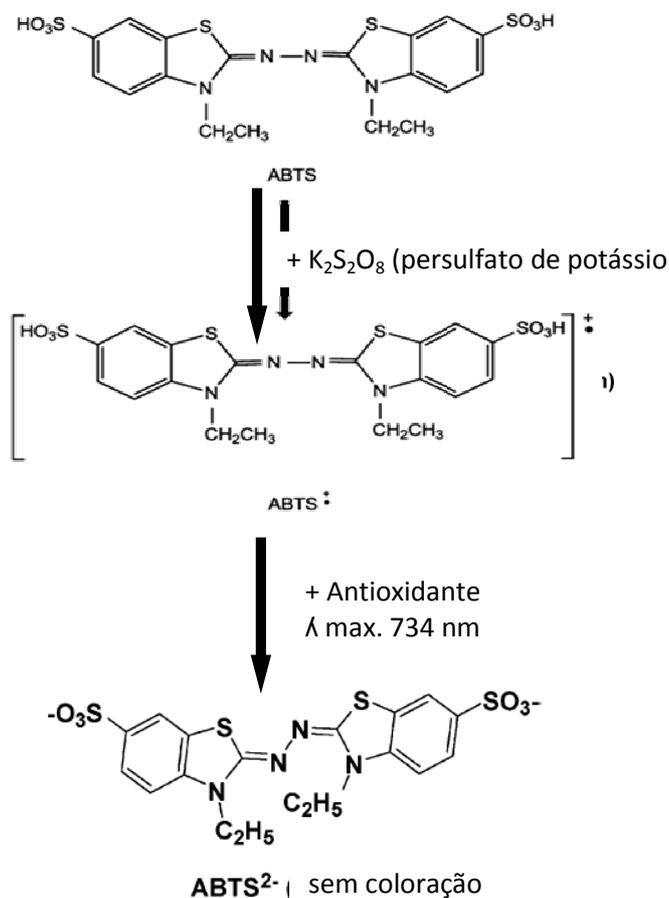


Figura 20 - Formação do radical ABTS estável com o persulfato de potássio e reação com antioxidante
 Fonte: Moon e Shibamoto (2009); Huang, Ou e Prior (2005)

2.5.3 Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

O ensaio do FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) – Poder Antioxidante de Redução do Ferro foi desenvolvido inicialmente para quantificar o ácido ascórbico em soro ou plasma (BENZIE; STRAIN, 1996). Este método está baseado na capacidade de um antioxidante em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} . Quando isso ocorre na presença de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) e em condições ácidas, a redução é acompanhada pela formação de um complexo corado (azul intenso) com o Fe^{2+} , com uma absorção máxima a 593 nm (Figura 21). Este ensaio oferece resultados rápidos e reprodutíveis, apresentando como desvantagens o fato de que a curva padrão deverá ser realizada com um antioxidante que seja solúvel em água como o ácido ascórbico e o Trolox e geralmente não se consegue medir todos os antioxidantes

presentes em uma matriz complexa (APAK et al., 2004). No entanto, muitos estudos sobre plantas e alimentos utilizam esse método em conjunto com outros ensaios.

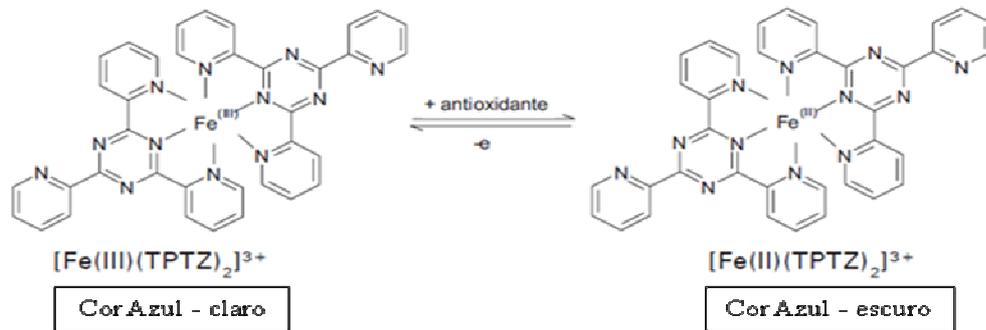


Figura 21 - Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe³⁺
 Fonte: Rufino et al. (2006)

2.6 Processo de extração

Diversos métodos e sistemas de solventes têm sido usados para a extração de compostos fenólicos de produtos vegetais (CHAVAN; SHAHIDI; NACZK, 2001), visando determinar a sua capacidade antioxidante (GOLI; BARZEGA; SAHARI, 2004). O tipo de solvente e a polaridade podem afetar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio, que é aspecto-chave na medida da capacidade antioxidante. A presença de compostos não antioxidantes nas soluções testadas também pode afetar os resultados (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006). O rendimento da extração depende tanto do solvente utilizado (GRAY et al., 2002; YU et al., 2002; SUN et al., 2005) quanto do método aplicado, que pode ser baseado em mecanismos diferentes. Além do rendimento, há grande variação na composição do extrato em função do sistema solvente utilizado (MOURE et al., 2001).

Existe uma crescente necessidade de se minimizar custos de produção por meio de maiores rendimentos, sem perda apreciável na produtividade, além da necessidade em se extrair ao máximo compostos com atividade biológica. Daí a importância do uso de ferramentas para a otimização de processos de maneira racional, que permitam um melhor conhecimento das variáveis de processo. O planejamento experimental é utilizado para análise de processos em que diversas variáveis explanatórias (fatores) influenciam uma variável dependente (resposta), permitindo a identificação de relações matemáticas e estatísticas entre níveis pré-determinados das variáveis (THOMPSON, 1982).

A otimização de um processo por análise de superfícies de resposta é baseada no planejamento fatorial. Consiste em um grupo de técnicas aplicadas ao estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas (como rendimento e produtividade), que possam ser medidas analiticamente, e um número de variáveis de entrada que possam ser controladas. Por meio dessas técnicas pode-se avaliar como uma resposta numa região de interesse é afetada por um conjunto de variáveis de entrada (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996; CURRALERO, 2000).

Nos últimos anos vem crescendo o interesse no aproveitamento de resíduos gerados na agroindústria. Estudos demonstram um elevado potencial biológico somado ao baixo custo destes subprodutos. A extração e o fracionamento bioguiado de compostos bioativos presentes nestes subprodutos ainda não foram estudados, com vistas a identificar os compostos responsáveis pela maior atividade presentes no bagaço e engaço da uva, e na película de amendoim. A identificação destas substâncias permitiria agregar valor a estes resíduos industriais, que na atualidade são descartados, na maioria das vezes, no meio ambiente

2.7 Estudo bioguiado

Quando está em causa a análise de uma dada atividade farmacológica num número elevado de amostras de material vegetal ou de uma matriz que apresenta elevada complexidade química, a estratégia de pesquisa normalmente adotada começa pelo estudo *in vitro* da sua interação com um ou mais sistemas biológicos, que sirvam de modelo para uma determinada via biomolecular associada com a atividade farmacológica em estudo.

A evolução da robótica, dos detectores e dos sistemas de software para gerir a integração e funcionamento de equipamentos complexos, permitiu o advento do *high-throughput screening*, possibilitando a análise de muitas milhares de amostras num reduzido espaço de tempo (CASTAGNÉ; PORSOLT; MOSER, 2006). Este é o tipo de *screening* levado a cabo pela indústria farmacêutica como ponto de partida na busca de novas moléculas com atividade terapêutica. Neste caso, os ensaios com modelos animais *in vivo* aparece apenas numa segunda fase, já com vista à confirmação dos resultados do estudo farmacológico *in vitro*.

Quando o objetivo do estudo é isolar componentes com atividade biológica, a realização de um isolamento bioguiado parece ser a melhor opção. A técnica do fracionamento bioguiado em estudos com produtos naturais já tem sido empregada por vários

pesquisadores (HO; KUMARAN; HWANG, 2009; TEKE et al., 2010; MARTINEZ-VAZQUEZ et al., 2005; ELHADJ et al., 2010), devido aos benefícios a partir de uma racionalização do processo de isolamento de substâncias biologicamente de extratos quimicamente complexos. A principal vantagem em se realizar o fracionamento bioguiado é que conforme o fracionamento é realizado e as frações/subfrações são obtidas, estas podem ser submetidas a ensaios biológicos e/ou químicos para saber onde a atividade está concentrada e, desta forma, seguir trabalhando somente com as frações de interesse, para que a atividade não seja perdida durante o processo de isolamento. Outras vantagens do isolamento bioguiado são:

- Evitar o descarte dos compostos bioativos durante os processos de fracionamento e isolamento cromatográfico em extrato bruto cuja diversidade química seja grande;
- Economia de solvente e rapidez no isolamento a partir de critérios biológicos de inclusão e exclusão de frações e subfrações;
- Viabilidade do estudo de substâncias bioativas em produtos naturais, que possuem grande complexidade química, uma vez que permite a exclusão de grande número de substâncias químicas, sem atividade biológica, presentes em frações e subfrações.

2.7.1 Purificação, fracionamento e isolamento

A metodologia de isolamento dos componentes bioativos de uma amostra segue normalmente os seguintes passos:

- 1 - Preparação do material de interesse;
- 2 - Procedimentos de extração;
- 3 - Cromatografia e/ou quantificação dos compostos bioativos;
- 4 - Procedimentos de isolamento dos compostos bioativos;
- 5 - Análise de estrutura por degradação e/ou técnicas instrumentais

Como alguns flavonoides são instáveis, como no caso das antocianinas e procianidinas, é necessário cuidado durante o armazenamento e o preparo da amostra. Se o objetivo é a análise e a subsequente quantificação, o congelamento em nitrogênio líquido é aconselhado (RICE-EVANS; PACKER, 1998). Como muitos polifenóis ocorrem na forma de ligações com glicosídeos ou ésteres, a preparação da amostra deve incluir hidrólise alcalina ou

ácida para liberar as ligações fenólicas, antes ou após a etapa de extração com solventes (LEE; WIDMER, 1996).

O isolamento e a purificação de flavonoides, por exemplo, é quase sempre necessário, pois na maioria das vezes estas substâncias são desconhecidas ou, não estão comercialmente disponíveis. O material puro pode ser também necessário para avaliação de atividades, por exemplo, atividade antioxidante ou anticarcinogênica, ou para estudos de biodisponibilidade em animais, humanos ou em cultura de células (WOLLGAST; ANKLAM, 2000).

No processo de isolamento de polifenóis para uma futura caracterização torna-se necessário remover potenciais interferentes. A remoção de interferentes poderá ser obtida por meio de um fracionamento líquido-líquido com um solvente não miscível e uma coluna cromatográfica Sephadex LH-20, poliamida, Amberlite XAD-2 e utilizando-se cartuchos comercialmente disponíveis (RICE-EVANS; PACKER, 1994).

As frações obtidas sem interferentes podem ser reunidas segundo seu perfil cromatográfico, verificado por CCD. As frações agrupadas, após terem sua atividade biológica avaliada, devem ser novamente submetidas à cromatografia em coluna ou, dependendo da complexidade da mistura, às técnicas cromatográficas modernas de isolamento, como cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa (PICCINELLI et al., 2005; QU et al., 2007; CASTRO et al., 2009; CABRAL et al., 2009).

Uma vez que os compostos ativos são isolados, deve-se proceder a elucidação estrutural dos mesmos. Uma ferramenta muito importante para a identificação rápida de compostos isolados é a técnica de espectrometria de massas (UZEL; CETIN, 2005). O uso em conjunto de técnicas espectrais, como infra-vermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN) também têm permitido se propor com segurança a estrutura molecular de substâncias naturais (HAYASHI et al., 2002; CAKIR et al., 2003; LOO; JAIN; DARAH, 2008; ZHANG et al., 2009).

REFERENCIAS

AMICO, V.; CHILEMMI, R.; MANGIAFICO, S.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C. Constituents of grape pomace from the Sicilian cultivar 'Nerello Mascalese'. **Food Chemistry**, Barking, v. 88, n. 4, p. 599-607, 2004.

AMICO, V.; CHILLEMI, R.; MANGIAFICO S.; SPATAFORA, C.; TRINGALI C. Polyphenol-enriched fractions from Sicilian grape pomace: HPLC–DAD analysis and antioxidant activity. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, p. 5960-5966, 2008.

ANASTASIADI, M.; PRATSINIS, H.; KLETSAS, D.; SKALTSOUNIS, A. L.; HAROUTOUNIAN, S. A. Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. **Food Research International**, Essex, v. 43, p. 805–813, 2010.

APAK, R.; GUÇLU, K.; OZYUREK, M.; KARADEMIR, S. E. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n.26, p. 7970-7981, 2004.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 11, p. 419-421, 2000.

ARUOMA, O. I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 32, p. 671-683, 1994.

ATMANI, D.; CHAHER, N.; BERBOUCHA, M.; AYOUNI, K.; LOUNIS, H.; BOUDAUD, H.; DEBBACHE, N.; ATMANI, D. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. **Food Chemistry**, Barking, v. 112, p. 303-309, 2009.

AUGER, C.; AL-AWWADI, N.; BORNET, A.; ROUANET, J. M.; GASC, F.; CROS, G.; TEISSEBRE, P. L. Catechins and procyanidins in Mediterranean diets. **Food Research International**, Essex, v. 37, p. 233-245, 2004.

BALLARD, T.S.; MALLIKARJUNAN, P.; ZHOU, K.; O'KEEFE, S.F. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from peanut skins. **Food Chemistry**, Barking, v. 120, p. 1185-1192, 2010.

BALLARD, T. S.; MALLIKARJUNAN, P.; ZHOU, K.; O'KEEFE, S. F. Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from peanut skins using response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 3064-3072, 2009.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence and potential uses. **Food Chemistry**, Barking, v. 99, p. 191-203, 2006.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1996. 299 p.

BATE-SMITH, E. C.; SWAIN, T. (1962). Flavonoid compounds. In: MASON, H. S.; FLORKIN, A. M. (Ed.). **Comparative biochemistry**. New York: Academic Press, 1962. p. 705-809.

BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 219, p. 561–571, 2004.

BELOFSKY G.; CARRENO R.; LEWIS K.; BALL A.; CASADEI G.; TEGOS G.P. Metabolites of the "Smoke Tree", *Dalea spinosa*, Potentiate Antibiotic Activity against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 69 n. 2, p. 261 -264, 2006.

BELOFSKY, G.; PERCIVILL, D.; LEWIS, K.; TEGOS, G. P.; EKART, J. Phenolic Metabolites of *Dalea versicolor* that enhance antibiotic activity against model pathogenic bacteria. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 67, n. 3, p. 481 -484, 2004.

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F. R.; ORTUNO, A.; DEL RIO, J. A. Uses and properties of citrus flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, p. 4505–4515, 1997.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 239, p. 70-76, 1996.

BINDON, K. A.; SMITH, P. A.; HOLT, H.; KENNEDY, J. A. Interaction between grape-derived proanthocyanidins and cell wall material. 2. Implications for vinification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 19, p. 10736–10746, 2010.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, London, v. 26, p. 1199–1200, 1958.

BORS, W.; MICHEL, C. Antioxidant capacity of flavanols and gallate esters: pulse radiolysis studies. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 27, n. 11/12, p. 1413-1426, 1999.

BRAND, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.). **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 1982. cap. 1, p. 1-40.

BUTLER, M. S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.

BUELGA, C.S.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, p. 1094–1117, 2000.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, p. 1523-1527, 2009.

CAKIR, A.; MAVI, A.; YILDINM, A.; DURU, M. E.; HARMANDAR, M.; KAZAZ, C. Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fractionation. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 87, n. 1, p. 73-83, 2003.

CAO, G.; PRIOR, R. L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 44, p. 1309-1315, 1998.

CASTAGNÉ, V.; PORSOLT, R. D.; MOSER, P. Early behavioral screening for antidepressants and anxiolytics. **Drug Development Research**, New York, v. 67, n. 9, p. 729–742, 2006.

CHAVAN, U. D.; SHAHIDI, F.; NACZK, M. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. **Food Chemistry**, Barking, v. 75, n. 4, p. 509-512, 2001.

CHEUNG, L. M.; CHEUNG, P. C. K.; OOI, V. E. C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 81, p. 249-255, 2003.

CHUNG, K. T.; WONG, T. Y.; HUANG, Y. W.; LIN, Y. Tannins and human health: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 38, n. 6, p. 421-464, 1998.

CHUNG, M.; MYOUNG, R. P.; CHUN, J. C.; YUN, S. J. Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stresses and hormones in peanut plants. **Plant Science**, Amsterdam, v. 164, p. 103–109, 2003.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, London, v. 432, p. 829-837, 2004.

COOPER-DRIVER, G. A. Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. **Phytochemistry**, Oxford, v. 56, n. 3, p. 229–236, 2001.

COSTA, C. T.; NELSON, B. C.; MARGOLIS, S. A.; HORTON, D. Separation of blackcurrant anthocyanins by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 799, n. 1–2, p. 321–327, 1998.

CURRALERO, I. C. B. **Estudo de sistema bifásico duplo estágio para produção de dextrana**. 2000. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

DEL VALLE, M.; CAMARA, M.; TORIJA, M.E. The nutritional and functional potential of tomato by-products. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 758, p. 165-172, 2007. Proceedings of the 10th International Symposium on the Processing Tomato, 2007.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

ELHADJ, S.; VÉRONIQUE MEGALIZZI, B.; TRAORÉ, M. S.; COS, P.; MAES, L.; DECAESTECKER, C.; PIETERS, L.; BALDÉ, A. M. *In vitro* antiprotzoal, antimicrobial and antitumor activity of *Pavetta crassipes* K. Schum leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 130, p. 529-535, 2010.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 23-36, 2006.

FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. **O sucesso da agroindústria: o que se pode aprender?** São Paulo: FIESP, CIESP, 2004. 38 p. Disponível em: http://www.fiesp.com.br/publicacoes/pdf/economia/referencias_5.pdf. Acesso em: 20 out. 2010.

FERNANDEZ-PANCHON, M. S.; VILLANO, D.; TRONCOSO, A. M.; GARCIA-PARRILLA, M. C. Antioxidant activity of phenolic compounds: from *in vitro* results to *in vivo* evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 48, p. 649-671, 2008.

FLAMINI, R. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v. 22, p. 218-250, 2003.

FLESCHHUT, J.; KRATZER, F.; RECHKEMMER, G.; KULLING, S. E. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins *in vitro*. **European Journal of Nutrition**, Darmstadt, v. 45, n. 1, p. 7-18, 2006.

FRANKEL, E. N.; KANNER, J.; GERMAN, J. B.; PARKS, E.; KINSELLA, J. E. Inhibition of oxidation of human low density lipoprotein by phenolic substances in red wine. **Lancet**, Barcelona, v. 341, p. 454-457, 1993.

FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; TEISSEDE, P. L. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low density lipoproteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, p. 890-894, 1995.

FREITAS, V. A. P.; GLORIES, Y.; BOURGEOIS, G.; VITRY, C. Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry. **Phytochemistry**, Oxford, v. 38, n. 4, p. 324-330, 1998.

FULEKI, T.; RICARDO DA SILVA, J. M. Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, p. 1156-1160, 1997.

GABETTA, B.; FUZZATI, N.; GRIFFINI, A.; LOLLA, E.; PACE, R.; RUFFILLI, T. Characterization of proanthocyanidins from grape seeds. **Fitoterapia**, Milano, v. 71, p. 172–175, 2000.

GILBERT B.; ALVES L. Synergy in plant medicines. **Current Medicinal Chemistry**, Hilversum v. 10, n. 1, p. 13-20, 2003.

GOLI, A. H.; BARZEGAR, M.; SAHARI, M. A. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 92, n. 3, p. 521-525, 2004.

GOLSTEIN, J. L.; SWAIN, T. Changes in tannins ripening fruits. **Phytochemistry**, Oxford, v. 2, p. 371-383, 1963.

GOMEZ-PLAZA, E.; MINAMO, A.; LÓPEZ-ROCA, J. M. Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. **Food Chemistry**, Barking, v. 97, n. 1, p. 87-94, 2006.

GRAY, D. A. Antioxidant activity of oat extracts added to human LDL particles and in free radical trapping assays. **Journal of Cereal Science**, London, v. 36, n. 2, p. 209-218, 2002.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v. 27, p. 1-93, 2006.

HAGERMAN, A. E.; RIEDL, K. M.; JONES, G. A. High-molecular-weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, p. 1887-1892, 1998.

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovascular Research**, London, v. 47, n. 3, p. 410–418, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1990. 543 p.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, New York, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

HAMID, .A. A.; SHAH, Z. M.; MUSE, R.; MOHAMED, S. Characterisation of antioxidative activities of various extracts of *Centella asiatica* (L) Urban. **Food Chemistry**, Barking, v. 77, p. 465-469, 2002.

HARBORNE, J. B. **The flavonoids**: advances in research since 1986. 1. ed. London: Chapman and Hall, 1994.

HASLAM, E. Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. **Phytochemistry**, Oxford, v. 19, p. 2577-2592, 1980.

HASLAM, E. **Practical polyphenolics**: From structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge: Cambridge University Press, 1998.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, London, v. 96, p. 67-202, 2002.

HAYASAKA, Y.; WATERS, E. J.; CHEYNIER, V.; HERDERICH, M. J.; VIDAL, S. Characterization of proanthocyanidins in grape seeds using electrospray mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v. 17, p. 9–16, 2003.

HAYASHI, J.; SEKINE, T.; DEGUCHI, S.; LIN, Q.; HORIE, S.; TSUCHIYA, S.; YANO, S.; WATANABE, K.; IKEGAMI, F. Phenolic compounds from *Gastrodia rhizome* and relaxant effects of related compounds on isolated smooth muscle preparation. **Phytochemistry**, Oxford, v. 59, n. 5, p. 513-519, 2002.

HAYASHI, K. The Anthocyanins. In: GEISSMAN, T. A. (Ed.). **The chemistry of flavonoid compounds**. New York: The MacMillian Company, 1962. cap. 9, p. 247-278.

HEREDIA, F. J.; FRANCIA-ARICHA, E. M.; RIVAS-GONZALO, J. C.; VICARIO, I. M.; SANTOS-BUELGA, C. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes –I. pH effect. **Food Chemistry**, Barking, v. 63, n. 4, p. 491–498, 1998.

HO, C. C.; KUMARAN, A.; HWANG, L. S. Bio-assay guided isolation and identification of anti-Alzheimer active compounds from the root of *Angelica sinensis*, **Food Chemistry**, Barking, v. 114, p. 246-252, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Agroindústria cresce 6% no primeiro semestre**. Comunicação Social, 06 de agosto de 2010. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1681&id_pagina=1. Acesso em: 20 out. 2010.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA - IEA. Amendoim descascado: o destaque nas exportações da cadeia de produção. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, São Paulo, v. 2, n. 3, mar. 2007.

JACOB, R. A.; BURRI, B. J. Oxidative damage and defense. **American Journal Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 63, p. 985S-990S, 1996.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. **Food Chemistry**, Barking, v. 73, p. 285-290, 2001.

JOAO, I. S.; LOURENZANI, W. L. Análise da Cadeia Agroindustrial do Amendoim na região de Tupã e Marília. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 45., 2007, Londrina. Londrina: SOBER, 2007. Disponível em: <http://www.sober.org.br/palestra/6/1134.pdf>. Acesso em: 20 out. 2010.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 4, n. 3, p. 206-220, 2005.

KONCZAK, I.; ZHANG, W. Anthocyanins - more than nature's colours. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Cairo, v. 5, p. 239–240, 2004.

KONDO, K.; KURIHARA, M.; FUKUHARA, K.; TANAKA, T.; SUZUKI, T.; MIYATA, N. Conversion of procyanidin B-type (catechin dimer) to A-type: Evidence for abstraction of C-2 hydrogen in catechin during radical oxidation. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 41, p. 485–488, 2000.

KRAMER, R.; COHEN, D. Functional genomics to new drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 3, n. 11, p. 965-72, 2004.

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

LANDCAKE, P.; PRICE, R. J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the vitaceae as a response to infection or injury. **Physiology Plant Pathology**, London, v. 9, p. 77–86, 1976.

LARANJINHA, J. A. N.; CADENAS, E. Redox cycles of caffeic acid, α -tocopherol and ascorbate: implications for protection of low-density lipoproteins against oxidation. **Life**, Chicago, v. 48, p. 57–65, 1999.

LEE, K. W.; LEE, H. J. Biphasic effects of dietary antioxidants on oxidative stress-mediated carcinogenesis. **Mechanisms of Ageing and Development**, Baltimore, v. 127, n. 5, p. 424–431, 2006.

LEE, I. I. S.; WIDMER, B. W. Phenolic compounds. In: NOLLET, L. M. L. **Handbook of food analysis**. Basel: Marcel Dekker, 1996. v. 1, p. 821-894.

LOO, A. Y.; JAIN, K.; DARAH, I. Antioxidant activity of compounds isolated from the pyroligneous acid, *Rhizophora apiculata*. **Food Chemistry**, Barking, v. 107, n. 3, p. 1151-1160, 2008.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S. Flavonóides. **Biociência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 17, p. 18-22, 2000.

LOU, H. X.; YAMAZAKI, Y.; SASAKI, T.; UCHIDA, M.; TANAKA, H. A-type procyanidins from peanut skin. **Phytochemistry**, Oxford, v. 51, p. 297–308, 1999.

LOU, H. X.; YUAN, H.; MA, B.; REN, D.; JI, M.; OKA, S. Polyphenols from peanut skins and their free radical-scavenging effects. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, p. 2391-2399, 2004.

MACHEIX, J. J.; SAPIS, J. C.; FLEURIET, A. Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 30, n. 1, p. 441-486, 1991.

MAKRIS, D.P.; BOSKOU, G.; ANDRIKOPOULOS, N.K. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, p. 125-132, 2007.

MALDONADO, P. D.; RIVERO-CRUZ, I.; MATA, R.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Antioxidant activity of A-type proanthocyanidins from *Geranium niveum* (Geraniaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 6, p. 1996–2001, 2005.

MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Current Opinion in Lipidology**, London, v. 16, p. 77–84, 2005.

MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RE´ME´SY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 81, p. 230S–242S, 2005.

MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 45, p. 594-598, 1968.

MARKUS, M. A.; MORRIS, B. J. Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging. **Clinical Interventions in Aging**, London, v. 3, n. 2, p. 331-339, 2008.

MARTINS, R. Amendoim: Evolução da Balança Comercial Paulista. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, São Paulo, v. 1, n. 3, mar. 2006.

MARTINS, R.; PEREZ, L.H. Amendoim descascado: O destaque nas exportações da cadeia de produção. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, São Paulo, v. 1, n. 3, mar. 2007.

MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M.; LOZANO, D. G. C.; ESTRADA-REYES, R.; GONZÁLEZ-LUGO, N. M.; APAN, T. R.; HEINZE, G. Bio-guided isolation of the cytotoxic corytenchine and isocoreximine from roots of *Annona cherimolia*. **Fitoterapia**, Milano, v. 76, p. 733-736, 2005.

MAZZA, G. Anthocyanins in grapes and grape products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 35, p. 341-371, 1995.

MELLO, L. M. R. **Viticultura brasileira** – Panorama 2009. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2009. Artigo Técnico. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/prodvit2009vf.pdf>> Acesso em: 21 set. 2010.

MENDOZA-WILSON, A. M.; GLOSSMAN-MITNIK, D. Theoretical study of the molecular properties and chemical reactivity of (+)-catechin and (–)-epicatechin related to their antioxidant ability. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 761, n. 1-3, p. 97-106, 2006.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A.; DAVIS, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, London, v. 84, p. 407-412, 1993.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 52, p. 673–751, 2000.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**, Songkla, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2003.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 1655–1666, 2009.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, Barking, v. 72, p. 145-171, 2001.

MONAGAS, M.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B.; LAUREANO, O.; RICARDO DA SILVA, J. M. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 6475–6481, 2003.

MURGA, R.; RUIZ, R.; BELTRÁN, S.; CABEZAS, J. L. Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 8, p. 3408-3412, 2000.

NAWAR, W. W. Lipids. In: FENNEMA, O. R. (Ed.). **Food chemistry**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1985. p. 139-244.

NEGRO, C.; TOMMASI, L.; MICELI, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. **Bioresource Technology**, Essex, v. 87, n. 1, p. 41-44, 2003.

NEPOTE, V., GROSSO, N.R., GUZMAN, C.A. Extraction of antioxidant components from peanut skins. **Grasas Y Aceites**, Sevilla, v. 54, p. 391–395, 2002.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products in medicinal chemistry. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, England, v. 17, n. 3, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Report**, London, v. 17, p. 215-234, 2000.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; HOLBECK, S.; SAUSVILLE, E. A. Natural products and derivatives as leads to cell cycle pathway targets in cancer chemotherapy. **Current Cancer Drug Targets**, Heidelberg, v. 2, p. 279-308, 2002.

NICOLAOU, K. C.; SNYDER, S. A. The essence of total synthesis. **Proceedings of the National Academy Sciences of the USA**, Washington, v. 101, p. 11929-11936, 2004.

NIJVELDT, R. J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D. E. C.; BOELEN, P. G.; KVAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of

action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 74, p. 418–425, 2001.

NIKI, E. Antioxidant activity: are we measuring it correctly? **Nutrition**, New York, v. 18, n. 6, p. 524-525, 2002.

NEPOTE, V.; GROSSO, N. R.; GUZMAN, C. A. Optimization of extraction of phenolic antioxidants from peanut skins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 85, n. 1, p. 33-39, 2005.

O'KEEFE, S. F.; WANG, H. Effects on peanut skin extract on quality and storage stability of beef products. **Meat Science**, Barking, v. 73, n. 2, p. 278-286, 2006.

PASSOS, C. P.; CARDOSO, S. M.; ROSÁRIO, M.; DOMINGUES, M. Evidence for galloylated type –A procyanidins in grape seeds. **Food Chemistry**, Barking, v. 105, p. 1457-1467, 2007.

PEREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, Essex, v. 39, n. 7, p. 791-800, 2006.

PETERSON, E. A.; OVERMAN, L. E. Contiguous stereogenic quaternary carbons: a daunting challenge in natural products synthesis. **Proceedings of the National Academy Sciences of the USA**, Washington, v. 101, p. 11943-11948, 2004.

PICCINELLI, A. L.; FERNÁNDEZ, M. C.; CUESTA-RUBIO, O.; HERNÁNDEZ, I. M.; SIMONE, F.; RASTRELLI, L. Isoflavonoids isolated from Cuban propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 9010–9016, 2005.

PRIEUR, C.; RIGAUD, J.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. **Phytochemistry**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 781-784, 1994.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, p. 494–507, 2001.

QU, L. P.; FAN, G. R.; PENG, J. Y.; MI, H. M. Isolation of six isoflavones from Semen sojae praeparatum by preparative HPLC. **Fitoterapia**, Milano, v. 78, n. 3, p. 200-207, 2007.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

RICARDO DA SILVA, J. M.; DARMON, N.; FERNANDEZ, Y.; MITJAVILA, S. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 39, p. 1549–1552, 1991.

REED, J. D.; KRUEGER, C. G.; VESTLING, M. M. MALDI-TOF mass spectrometry of oligomeric food polyphenols. **Phytochemistry**, Oxford, v. 66, p. 2248–2263, 2005.

REISCHE, D. W.; LILLARD, D. A.; EITENMILLER, R. R. Antioxidants. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 490-516.

RICE-EVANS, C. A. Measurement of total antioxidant activity as a marker of antioxidant status *in vivo*: procedures and limitations. **Free Radical Research**, London, v. 33, p. S59-66, 1999.

RICE-EVANS, C.; BURDON, R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 32, p. 71-110, 1993.

RICE-EVANS, C. A.; PACKER, L. **Flavonoids in health and disease**. New York: Marcel Dekker, 1998.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 20, p. 933–956, 1996.

RUBERTO, G.; RENDA, A.; DAQUINO, C.; AMICO, V.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C.; DE TOMMASI, N. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. **Food Chemistry**, Barking, v. 100, p. 203-210, 2007.

RUBILAR, M.; PINELO, M.; SHENE, C.; SINEIRO, J.; NUNEZ, M. J. Separation and HPLC-MS identification of phenolic antioxidants from agricultural residues: almond hulls and grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 10101–10109, 2007.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP)**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. 4 p. (Comunicado Técnico, 125).

SANTOS, R. C.; GONDIM, T. M. S.; FREIRE, R. M. M. **Cultivo do amendoim**. Campinas Grande: Embrapa Algodão, 2006. (Sistema de Produção, 7). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Amendoim/CultivodoAmendoim/mercado.html>>. Acesso em: 02 out. 2010.

SANTOS-BUELGA, C.; FRANCIA-ARICHA, E. M.; ESCRIBANO-BAILÓN, M. T. Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties. **Food Chemistry**, Barking, v. 53, p. 197–201, 1995.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 32, n.1, p. 67-103, 1992.

SIEMANN, E. H.; CREASY, L. L. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 43, p. 49-52, 1992.

SIES, H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 91, p. S31-S38, 1991. Supplement 3.

SILVA, L. M. L. R. Caracterização dos subprodutos da vinificação. **Millenium**, Viseu, v. 28, p. 123-133, 2003.

SILVA, S.; MATIAS, A.; NUNES, A. Identification of flavonol glycosides in winemaking by-products by HPLC with different detectors and hyphenated with mass spectrometry. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, Dois Portos, Portugal, v. 20, n. 1, p. 17-33, 2005.

SOUQUET, J. M.; CHEYNIER, V.; BROSSAUD, F.; MOUTOUNET, M. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. **Phytochemistry**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 509-512, 1996.

SOBOLEV, V. S.; COLE, R. J. Note on utilisation of peanut seed testa. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, p. 105-111, 2004.

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, p. 205-218, 2003.

STRONG, D. R.; LEVIN, D. A. Species richness of plants parasites and growth forms of their hosts. **American Naturalist**, Chicago, v. 114, p. 1-22, 1979.

SURVESWARAN, S.; CAI, Y. Z.; CORKE, H.; SUN, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, Barking, v. 102, p. 938-953, 2007.

SCHWARZ, M.; HOFMAN, G.; WINTERHALTER, P. Investigations on anthocyanins in wines from *Vitis vinifera* cv. Pinotage: Factors influencing the formation of Pinotin A and its correlation with wine age. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 3, p. 498-504, 2004.

SCHWARZ, M.; WABNITZ, T. T.; WINTERHALTER, P. Pathway leading to the formation of anthocyanin-vinylphenol adducts and related pigments in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 12, p. 3682-3687, 2003.

SUN, T.; HO, C. Antioxidant activities of buckwheat extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 90, n. 4, p. 743-749, 2005.

TEKE, G. N.; KUIATE, J. R.; KUETÉ, V.; TEPONNO, R. B.; TAPONDJOU, L. A.; TANE, P.; GIACINTI, G.; VILAREM, G. Bio-guided isolation of potential antimicrobial and antioxidant agents from the stem bark of *Trilepisium madagascariense*. **South African Journal of Botany**, Pretoria, 2010. doi:10.1016/j.sajb.2010.09.011.

TIMBERLAKE, C. F.; BRIDLE, P. The anthocyanins. In: HARBORNE, J. B. (Ed.). **The flavonoides**. New York: Academic Press, 1975. p. 214-265.

THOMPSON, D. R. Response surface experimentation. **Journal of Food Processing and Preservation**, Westport, v. 6, n. 3, p. 155-188, 1982.

TURAN, B.; GULSEN, A.; MAKRIS, D.; KEFALAS, P. Interactions between quercetin and catechin in a model matrix: Effects on the in vitro antioxidant behaviour. **Food Research International**, Essex, v. 40, n. 7, p. 819-826, 2007.

UZEL, A.; CETIN, E. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Anthemis xylopada* O. Schwarz from Turkey. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausannem v. 95, n. 2-3, p. 151-154, 2004.

VERSTRAETEN, S. V.; HAMMERSTONE, J. F.; KEEN, C. L.; FRAGA, C. G.; OTEIZA, P. I. Antioxidant and membrane effects of procyanidin dimers and trimers isolated from peanut and cocoa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 12, p. 5041-5048, 2005.

SASSO, C.; BASSIN, J. P.; RONCHI, J. C. S. **Vinhos**. Disponível em: http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_grad2004/vinho/pagina_final.htm. Acesso em: 27 out. 2010.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. **Food Chemistry**, Barking, v. 63, n. 3, p. 335-342, 1998.

WEIJL, N. I.; CLETON, F. J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treatment Reviews**, London, v. 23, n. 4, p. 209-240, 1997.

WENG, X. C.; WANG, W. Antioxidant activity of compounds isolated from *Salvia plebeia* **Food Chemistry**, Barking, v. 71, p. 489-493, 2000.

WENZEL, E.; SOLDI, T.; ERBERSDOBLER, H.; SOMOZA, V. Bioactivity and metabolismo f trans-resveratrol orally administered to Wistar rats. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v. 49, n. 5, p. 482-494, 2005.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 37, n. 7, p. 838-849, 2004.

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, Essex, v. 33, p. 423-447, 2000.

WONG, D. W. S. **Química de los alimentos: mecanismos y teoria**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1995. 475 p.

YU, J.; AHMEDNA, M.; GOKTEPE, I. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. **Food Chemistry**. Barking, v. 90, p. 199-206, 2005.

YU, L.; HALEY, S.; PERRET, J.; HARRIS, M. Antioxidant properties of hard winter wheat extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 78, n. 4, p. 457-461, 2002.

YU, J.; AHMEDNA, M.; GOKTEPE, I.; DAI, J. Peanut skin procyanidins: Composition and antioxidant activities as affected by processing. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 4, p. 364-371, 2006.

ZHANG, Z.; LIAO, L.; MOORE, J.; WU, T.; WANG, Z. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). **Food Chemistry**, Barking, v. 113, n. 1, p. 160-165, 2009.

ZHANG, Z. J. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 75, p. 1659–1699, 2004.

3. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS PELA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA: ENGAÇO E BAGAÇO DE UVA CABERNET SAUVIGNON E PELÍCULA DE AMENDOIM

RESUMO

Atualmente, milhões de toneladas de subprodutos são geradas no decorrer do processamento de alimentos pelas agroindústrias. A maior parte deles é rica em compostos bioativos e constitui fonte natural destas substâncias, as quais podem ser destinadas para aplicações tecnológicas nas indústrias de alimentos e farmacêutica. Este estudo teve como objetivos avaliar o conteúdo de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante de três subprodutos agroindustriais – engaço e bagaço de uva (*Vitis vinifera*) da variedade Cabernet Sauvignon e película de amendoim (*Arachis hypogaea*) –, bem como otimizar o processo de extração de compostos antioxidantes. Os subprodutos foram coletados no primeiro semestre de 2010, congelados e liofilizados. O conteúdo de compostos fenólicos totais dos extratos etanólicos (etanol:água, 80:20) foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e o potencial antioxidante durante a otimização do processo de extração foi determinado pelo método de sequestro do radical DPPH. O processo de otimização da extração de compostos antioxidantes foi realizado primeiramente usando modelos univariáveis para determinar a influência do pH, a remoção da gordura e o tempo de extração em banho termostatizado no teor de compostos com atividade antioxidante. A seguir, foi realizado planejamento fatorial 2^2 utilizando como variáveis a concentração do solvente e a temperatura de extração. Nesse processo, foram empregados três solventes (acetona, etanol e propilenoglicol) em cinco concentrações (39%, 45%, 60%, 75% e 81% em água v/v) e cinco temperaturas (30°C, 35,8°C, 50°C, 64,2°C e 70°C). Na última etapa do processo de otimização da extração, foi feito um experimento utilizando ultrassom, no qual os solventes acetona, etanol e propilenoglicol na concentração de 60% foram mantidos em banho ultrassom por 1 h, sendo coletada uma alíquota de 1 mL do extrato a cada 15 min. Nos ensaios univariáveis, foram obtidos o maior teor de compostos fenólicos totais e a mais alta atividade antioxidante para os extratos produzidos em meio ácido (pH 1,5), tendo o engaço, o bagaço de uva e a película de amendoim apresentado teores de $6,42 \pm 0,43$, $3,38 \pm 0,01$ e $6,82 \pm 0,10$ g AG.100g⁻¹, respectivamente. O tempo de 30 min em banho termostatizado foi o que apresentou a maior extração de compostos antioxidantes. Nos resultados obtidos a partir da metodologia de superfície de resposta, os extratos preparados com acetona apresentaram as maiores atividades de sequestro do radical livre DPPH. Para os três subprodutos avaliados, observou-se maior sequestro do radical DPPH com o aumento da temperatura de extração e da concentração de acetona. Assim, as melhores condições para a extração de compostos com atividade antioxidante foram concentração de acetona de 60% e temperatura de extração de 70°C. O processo de extração em banho ultrassom não foi tão eficiente para extrair compostos bioativos quanto a extração em banho termostatizado. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que os subprodutos agroindustriais analisados são ricos em compostos fenólicos naturais de alta atividade antioxidante e, portanto, devem ser explorados mais eficientemente pelas indústrias de alimentos e farmacêutica.

Palavras-chave: subprodutos agroindustriais; engaço Cabernet Sauvignon; bagaço Cabernet Sauvignon; película de amendoim; superfície de resposta; atividade antioxidante.

ABSTRACT

Nowadays, millions of tons of by-products are generated during food processing in agroindustrial plants. Most of them are rich in bioactive compounds and constitute natural sources of these substances, which can be directed to technological uses in food and pharmaceutical industries. This study aimed at assessing the total phenolic compound content and the antioxidant activity of three agroindustrial by-products – Cabernet Sauvignon grape stalks and pomace (*Vitis vinifera*) and peanut skin (*Arachis hypogaea*) –, as well as optimizing the process of antioxidant compound extraction. The by-products were collected in the first semester of 2010, frozen, and lyophilized. Total phenolic compound content in ethanolic extracts (ethanol:water, 80:20) was determined using the Folin-Ciocalteu method and antioxidant potential during optimization of the extraction process was assessed by the DPPH radical-scavenging method. The process used to optimize the extraction of antioxidant compounds was carried out initially using univariate models in order to determine the influence of pH, fat removal, and extraction time using thermostatic bath on the content of compounds with antioxidant activity. After that, a 2² factorial planning was performed using solvent concentration and extraction temperature as variables. In this process we used three solvents (acetone, ethanol, and propylene glycol) in five concentrations (39%, 45%, 60%, 75%, and 81% in water v/v) and five temperatures (30°C, 35.8°C, 50°C, 64.2°C, and 70°C). In the last phase of the process used to optimize the extraction, we performed an experiment using ultrasound in which the solvents acetone, ethanol, and propylene glycol at 60% were maintained in ultrasound bath for 1 h and aliquots of 1 mL of extract were collected every 15 min. In the univariate experiments, we obtained the highest total phenolic compound content and antioxidant activity of the extracts produced in acidic medium (pH 1.5), since the grape stalks and pomace and peanut skin presented 6.42±0.43, 3.38±0.01, and 6.82±0.10 g GA.100g⁻¹, respectively. The period of 30 min in thermostatic bath produced the highest extraction of antioxidant compounds. As to the results obtained using the response surface method, the extracts prepared with acetone presented the highest DPPH radical-scavenging activities. For the three by-products assessed we observed higher DPPH radical-scavenging activity as the extraction temperature and acetone concentration increased. Therefore, the best conditions for the extraction of antioxidant compounds were acetone at 60% and extraction temperature of 70°C. The extraction process using ultrasound bath was not as efficient to extract bioactive compounds as the thermostatic bath. The results obtained in this study showed that the agroindustrial by-products analyzed are rich in natural phenolic compounds with high antioxidant activity and, therefore, should be explored more efficiently by food and pharmaceutical industries.

Key words: agroindustrial by-products; Cabernet Sauvignon grape stalks; Cabernet Sauvignon grape pomace; peanut skin; response surface; antioxidant activity.

3.1 INTRODUÇÃO

A agroindústria tem se expandido cada vez mais para atender a crescente demanda populacional por alimentos. No Brasil, somente no primeiro semestre de 2010, este crescimento foi de 6%, resultado bem superior ao obtido no mesmo período de 2009 (-5,3%). (IBGE, 2010). Dentro desse contexto, o Brasil, com sua economia fortemente baseada no agronegócio, contribui para a geração de uma grande quantidade de subprodutos agroindustriais resultantes das atividades de processamento. Esses subprodutos, em muitas situações, representam um grave problema, pois aparentemente sem aplicação viável, são descartados diretamente no meio ambiente. Dessa maneira, uma utilização eficiente, econômica e segura para o meio ambiente, está se tornando cada vez mais importante.

Embora ainda represente um campo científico que careça de pesquisas, alguns estudos têm demonstrado a presença de propriedades biológicas em muitos resíduos agroindustriais, bem como vários potenciais de aplicação (MOURE, 2001; JAYAPRAKASHA et al., 2003; OZKAN et al., 2004; GONZÁLEZ-PARAMÁS et al., 2004; BALASUNDRAM et al., 2006; AMIN E MUKHRIZAH, 2006; MAKRIS et al., 2007; DEL VALLE et al., 2007).

Dentre os diversos subprodutos gerados, o resíduo da vitivinicultura possui um valor estimado em 130.000 toneladas/ano (GÓMEZ-PLAZA; MIÑANO; LÓPEZ-ROCA, 2006), considerando-se apenas a produção brasileira. Além deste, outro subproduto importante, gerado pelo processamento do amendoim, apresenta uma produção mundial expressiva, estimada em 750.000 toneladas/ano (SOBOLEV; COLE, 2004).

Os subprodutos agrícolas contêm uma variedade de espécies biologicamente ativas, como compostos fenólicos antioxidantes, que na maioria das vezes são descartados (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Estes fenólicos apresentam um grande potencial para agregação de valor econômico, como a aplicação como aditivos naturais em alimentos e uso para elaboração de alimentos funcionais que previnem doenças.

Em subprodutos da indústria vinícola já foram identificados e quantificados os seguintes flavonóis monoméricos e procianidinas: (+)-catequina; (-)-epicatequina; (-)-epicatequina 3-O-galato; procianidinas diméricas, procianidinas diméricas esterificadas com ácido gálico, procianidinas triméricas, procianidinas triméricas esterificadas com ácido gálico, bem como antocianinas (ANASTASIADI et al., 2010; SANTAMARÍA et al., 2002; AMICO et al., 2008; PASSOS et al., 2007; DE FREITAS et al., 1998; FLAMINI, 2003; GABETTA et al., 2000; HAYASAKA et al., 2003; REED; KRUEGER; VESTLING, 2005; SANTOS-

BUELGA et al., 1995). Procianidinas tetrâmeras de sementes de uva já foram completamente separadas e identificadas (FULEKI; SILVA, 1997), entretanto, procianidinas com elevado grau de polimerização tem sido ainda objeto de estudo (MONAGAS et al., 2003).

A película oriunda do processamento de amendoim contém até 17% de procianidinas, monômeros, dímeros, trímeros, tetrâmeros; proantocianidinas oligoméricas, sendo que também foram identificados flavonoides, ácidos fenólicos (KARCHESY; HEMINGWAY, 1986; YU; AHMEDNA; GOKTEPE, 2005; 2006; NEPOTE; GROSSO; GUZMAN, 2005; O'KEEFE; WANG, 2006; LOU et al., 1999; LOU et al., 2004; BALLARD et al., 2009; 2010).

Os compostos antioxidantes obtidos de subprodutos agroindustriais podem não somente aumentar a estabilidade de alimentos, pela inibição da peroxidação lipídica, mas em humanos ou animais podem proteger biomoléculas e estruturas moleculares como membranas e ribossomos de danos oxidativos (OLIVEIRA et al., 2009). Muitas destas substâncias bioativas presentes naturalmente em frutas e vegetais, assim como nos seus respectivos subprodutos, exibem, além da atividade antioxidante e antimicrobiana, propriedades anti-alérgicas, anti-aterogênicas, anti-inflamatórias, anti-trombóticas, bem como, efeitos cardioprotetivos e vasodilatadores (BENAVENTE-GARCIA et al., 1997; MIDDLETON et al., 2000; PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2001; MANACH et al., 2005; BALASUNDRAM et al., 2006). Aliado as contribuições à saúde, estes compostos também apresentam significativa importância para a esfera industrial, já que os antioxidantes sintéticos mais usados pela indústria de alimentos como o BHA (butil-hidroxianisol), o BHT (butil-hidroxitolueno) e o TBHQ (terc-butilhidroquinona) têm despertado preocupação quanto às doses de segurança e toxicidade (BALASUNDRAM et al., 2006).

Diversos métodos e sistemas de solventes têm sido usados para a extração de compostos fenólicos de produtos vegetais (CHAVAN; SHAHIDI; NACZK, 2001), visando determinar a sua capacidade antioxidante (GOLI; BARZEGA; SAHARI, 2004). O tipo de solvente e a polaridade podem afetar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio, que é aspecto-chave na medida da capacidade antioxidante. A presença de compostos não antioxidantes nas soluções testadas também pode afetar os resultados (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006). O rendimento da extração depende tanto do solvente utilizado (GRAY et al., 2002; YU et al., 2002; SUN et al., 2005) quanto do método aplicado, que pode ser baseado em mecanismos químicos diferentes. Além do rendimento, há grande variação na composição do extrato em função do sistema solvente utilizado (MOURE et al., 2001).

A otimização de um processo por análise de superfícies de resposta é baseada no planejamento fatorial. Consiste em um grupo de técnicas aplicadas ao estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas (como rendimento e produtividade), que possam ser medidas analiticamente, e um número de variáveis de entrada que possam ser controladas. Por meio dessas técnicas pode-se avaliar como uma resposta numa região de interesse é afetada por um conjunto de variáveis de entrada (BARROS NETO et al., 1996; CURRALERO, 2000).

Sabe-se do elevado potencial biológico de subprodutos agroindustriais, constituindo assim uma fonte rica e barata de compostos bioativos. Desta forma, um destino mais nobre deve ser dado a esses materiais pela extração de substâncias com propriedades biológicas, principalmente compostos fenólicos, o que permitirá se agregar valor a estes subprodutos, os quais muitas vezes são descartados diretamente no meio ambiente.

O engaço e bagaço de uva da variedade Cabernet Sauvignon e película de amendoim foram selecionados para o trabalho de otimização das condições de extração, pois partindo de um universo de aproximadamente 40 subprodutos agroindustriais – trabalho realizado anteriormente no laboratório de Bioquímica – esses foram os que apresentaram as melhores atividades antioxidantes. Desta forma, justifica-se um estudo mais aprofundado destes subprodutos, com vistas a um posterior trabalho de isolamento e elucidação dos compostos de maior atividade antioxidante para uma possível aplicação pelas indústrias de alimentos e/ou farmacêutica, bem como a geração de patentes brasileiras.

Portanto, o objetivo deste estudo foi utilizar a metodologia de superfície de resposta para determinar as condições ótimas para a extração de compostos fenólicos antioxidantes dos subprodutos bagaço e engaço de uva da variedade Cabernet Sauvignon e película de amendoim.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Coleta das amostras

As amostras do bagaço e engaço de uva da variedade Cabernet Sauvignon foram coletadas na vinícola Miolo em Bento Gonçalves, RS no primeiro semestre de 2010. Após a coleta, os subprodutos foram imediatamente acondicionados em caixas refrigeradas e transportados até o Laboratório de Bioquímica.

A película de amendoim foi fornecida pela CAP Agroindustrial (Dumont – SP) no primeiro semestre de 2010, sendo produzida pelo processo de blanchamento. Neste processo a película é separada do endosperma (grão) por aumento de temperatura, o que promove a expansão do grão. Na sequência, a temperatura é abaixada com ar frio, ocorrendo à contração, e a película se solta do endosperma com auxílio de um processo de abrasão (lixamento).

No laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP, os subprodutos foram limpos, congelados e submetidos ao processo de liofilização.

3.2.2 Testes de extração univariáveis

3.2.2.1 Influência do pH e remoção de gordura na concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante

3.2.2.1.1 Extrato etanólico (80%)

Os extratos alcoólicos dos subprodutos foram feitos em triplicata, com o emprego do solvente etanol:água (80:20 v/v). Inicialmente pesou-se 1 grama de cada resíduo liofilizado e moído e, então, adicionou-se 10 mL de solvente. A extração foi conduzida em ultrassom, à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Decorrido o tempo, o extrato foi centrifugado a 5000 x g durante 15 minutos e o sobrenadante utilizado para as análises subsequentes.

3.2.2.1.2 Extrato etanólico (80%) acidificado

Os extratos alcoólicos acidificados dos subprodutos foram feitos em triplicata, com o emprego do solvente etanol:água (80:20 v/v). Foi pesado 1 grama de cada resíduo liofilizado e moído e, então, adicionou-se 10 mL do solvente. Em seguida o extrato foi acidificado com HCl 0,1M até pH 1,5. Após isto, a extração foi conduzida em ultrassom, à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Decorrido o tempo, o extrato foi centrifugado a 5000 x g durante 15 minutos e o sobrenadante utilizado para as análises subsequentes.

3.2.2.1.3 Extrato etanólico (80%) desengordurado

Neste caso, antes de se realizar o processo de extração, a amostra foi desengordurada com 10 mL de hexano em ultrassom, durante 15 minutos. Em seguida o hexano foi retirado por meio de filtração, e, o extrato preparado em triplicata com o emprego do solvente etanol:água (80:20 v/v). Para o preparo dos extratos pesou-se 1 grama do resíduo desengordurado e moído e, então, adicionou-se 10 mL dos solventes. A extração foi conduzida em ultrassom, à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Decorrido o tempo, o extrato foi centrifugado a 5000 x g durante 15 minutos e o sobrenadante utilizado para as análises subsequentes.

3.2.2.1.4 Extrato etanólico (80%) desengordurado e acidificado

A amostra foi primeiramente desengordurada conforme descrito no item 3.2.1.3. Em seguida, o extrato foi preparado em triplicata com o emprego do solvente etanol:água (80:20 v/v). Inicialmente pesou-se 1 grama de cada resíduo desengordurado e moído e, então, adicionou-se 10 mL dos solventes. Em seguida o extrato foi acidificado com HCl 0,1M até pH 1,5. Após isto, a extração foi conduzida em ultrassom, à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Decorrido o tempo, o extrato foi centrifugado a 5000 x g durante 15 minutos e o sobrenadante utilizado para as análises subsequentes.

3.2.2.2 Influência do tempo de extração em banho termostático na atividade antioxidante

A segunda etapa do experimento consistiu na determinação do melhor tempo para a extração de compostos antioxidantes. A extração foi feita com a mistura solvente etanol:água (80:20), utilizando diferentes tempos que variaram de 15 a 45 minutos, em banho-maria a 70°C.

3.2.3 Planejamento experimental completo 2² para otimização das condições de extração

Um planejamento experimental 2² foi realizado utilizando-se dois fatores, concentração do solvente e temperatura de extração. Os níveis das variáveis independentes estudadas neste planejamento experimental completo estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Níveis das variáveis independentes estudados no planejamento experimental completo 2² para a otimização da extração

Fator	$-\alpha^*$	-1	0	+1	$+\alpha^*$
Porcentagem Solvente	38,9	45	60	75	81,1
Temperatura (°C)	30	35,8	50	64,2	70

* $\alpha = 1,41$

Os resultados obtidos no planejamento experimental foram analisados pelo programa Statistica 5.0.

3.2.4 Avaliação do tempo de ultrassom na extração de compostos bioativos

Ainda com o objetivo de se avaliar a eficiência na extração dos compostos bioativos dos resíduos, um último experimento foi realizado com ultrassom. Foram utilizados os solventes etanol, acetona e propilenoglicol na concentração de 60%, a qual foi selecionada após análise dos resultados obtidos no planejamento experimental. A cada 15 minutos, durante uma hora, foi então coletada uma alíquota de 1 mL do extrato para avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH. O tempo de extração que apresentou o melhor resultado na atividade antioxidante foi comparado com os resultados obtidos no item 4.2.3. A partir desses resultados foi feita a escolha do melhor método, entre banho termostatizado e ultrassom, para a extração de compostos antioxidantes.

3.2.5 Análises físico-químicas dos extratos dos subprodutos, frações, subfrações e compostos isolados

3.2.5.1 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível

A determinação do espectro de absorção foi realizada segundo o método descrito por Silva et al. (2007). Os espectros de absorção na região UV-visível foram determinados na faixa de comprimento de onda de 200 a 600 nm.

3.2.5.2 Análise de compostos fenólicos totais

A análise do teor de compostos fenólicos totais foi feita de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton et al. (1999), utilizando ácido gálico como padrão. Os extratos dos subprodutos foram diluídos 1:10 e uma alíquota de 0,5 mL da amostra diluída foi transferida para um tubo com tampa de rosca e adicionado 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído em água 1:10. A mistura permaneceu em repouso por 3 a 8 minutos. Em seguida foi adicionado 2 mL de carbonato de sódio 4% e os tubos deixados em repouso por 2 horas, ao abrigo da luz. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 740 nm. Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições e os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos como ácido gálico.

3.2.6 Avaliação da atividade antioxidante

3.2.6.1 Atividade sequestrante do radical DPPH

A medida da capacidade sequestrante pelo método DPPH se baseia no princípio de que o DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil), sendo um radical estável de coloração violeta, aceita um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula estável, sendo reduzido na presença de um antioxidante e adquirindo uma coloração amarela. Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 517nm, que desaparece à medida que ele vai sendo reduzido pelo hidrogênio doado por um antioxidante (MENSOR et al., 2001). Para a determinação da atividade antioxidante, a mistura de reação constituída pela adição de 500 µL

dos extratos e/ou padrões, 3,0 mL de etanol 99% (v/v) e 300 µL do radical DPPH em solução de etanol 0,5mM, foi incubada por 45 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A atividade sequestrante do radical DPPH foi determinada na forma de Atividade Antioxidante (AA), de acordo com a equação:

$$AA(\%) = 100 - \left(\frac{((Aa - Ab) \times 100)}{Ac} \right)$$

Onde:

Aa = absorvância da amostra

Ab = absorvância do branco

Ac = absorvância do controle negativo

O controle negativo foi feito substituindo-se o volume do extrato por igual volume do solvente utilizado na extração. O branco foi preparado substituindo o volume da solução de DPPH por igual volume de solvente.

3.2.7 Análise Estatística

O delineamento experimental para todos os ensaios foi o inteiramente casualizado. Os dados foram analisados pelo programa SAS para a determinação da análise de variância. A separação entre as médias foi realizada usando-se o teste de Tukey com um nível de confiança de 95%.

Para a análise da metodologia de Superfície de Resposta foi utilizado o software Statistica 5.0. O planejamento fatorial composto central usou o método de regressão dos quadrados mínimos para ajustar os dados ao modelo quadrático. O modelo quadrático para cada resposta foi o seguinte:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

Onde Y é a resposta predita; β_0 é uma constante; β_i é um coeficiente linear; β_{ii} é o coeficiente quadrático ; β_{ij} é o coeficiente de interação das variáveis i e j; X_i e X_j são as variáveis independentes. A adequação do modelo foi determinada pela avaliação da falta de ajuste, coeficiente de determinação (R^2) e o valor do teste de Fisher (valor F), obtidos da análise de variância (ANOVA) que foi gerada pelo software. As Superfícies de Resposta foram determinadas para cada solvente e a significância estatística do modelo foi determinada a 5% de probabilidade ($\alpha = 0,05$).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Subprodutos vinícolas e película de amendoim

As amostras de bagaço e engaço de uva tinta da variedade Cabernet Sauvignon foram coletadas de uma vinícola localizada na cidade de Bento Gonçalves, RS, onde foi possível acompanhar todo o processamento, enquanto que a película de amendoim foi fornecida por uma Agroindústria processadora de amendoim, localizada no estado de São Paulo.

O transporte dos pontos de coleta até o Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental (ESALQ/USP) – onde foram realizadas as análises – foi feito sob refrigeração, e em seguida, esses resíduos foram congelados, liofilizados, homogeneizados, pesados e armazenados à -18°C . A Figura 22 ilustra o aspecto dos subprodutos antes de serem triturados e homogeneizados para a realização das análises.



Figura 22 - Aspecto dos subprodutos coletados. (A) Película de amendoim, (B) Bagaço Cabernet Sauvignon, (C) Engaço Cabernet Sauvignon

3.3.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta-visível

Os extratos etanólicos brutos dos três subprodutos apresentaram pico de absorção máxima em 280 nm (Figura 23). Os compostos fenólicos, de modo geral, apresentam o pico de absorção da luz ultravioleta na faixa de 250 e 350 nm (MARKHAM; THOMAS, 1970). Segundo Mabry; Markham; Thomas, 1970, a classe de flavonóides é a que absorve no comprimento de onda de 280 nm, entre as subclasses, este é o comprimento de onda característico das catequinas e procianidinas, classes de compostos possivelmente presentes nesses subprodutos estudados (LOU et al., 2004; APPELDOORN et al., 2009; ANASTASIADI et al., 2010).

Para a realização da varredura, os extratos foram diluídos na proporção de 1:200, mesma concentração utilizada para a realização dos testes de atividade antioxidante e determinação do teor de compostos fenólicos. Portanto, apesar dos extratos brutos apresentarem coloração característica intensa, após a diluição mostraram-se incolores, o que possibilitou uma análise segura por métodos colorimétricos, como no caso da determinação da atividade antioxidante, que utiliza o comprimento de onda de 517 nm.

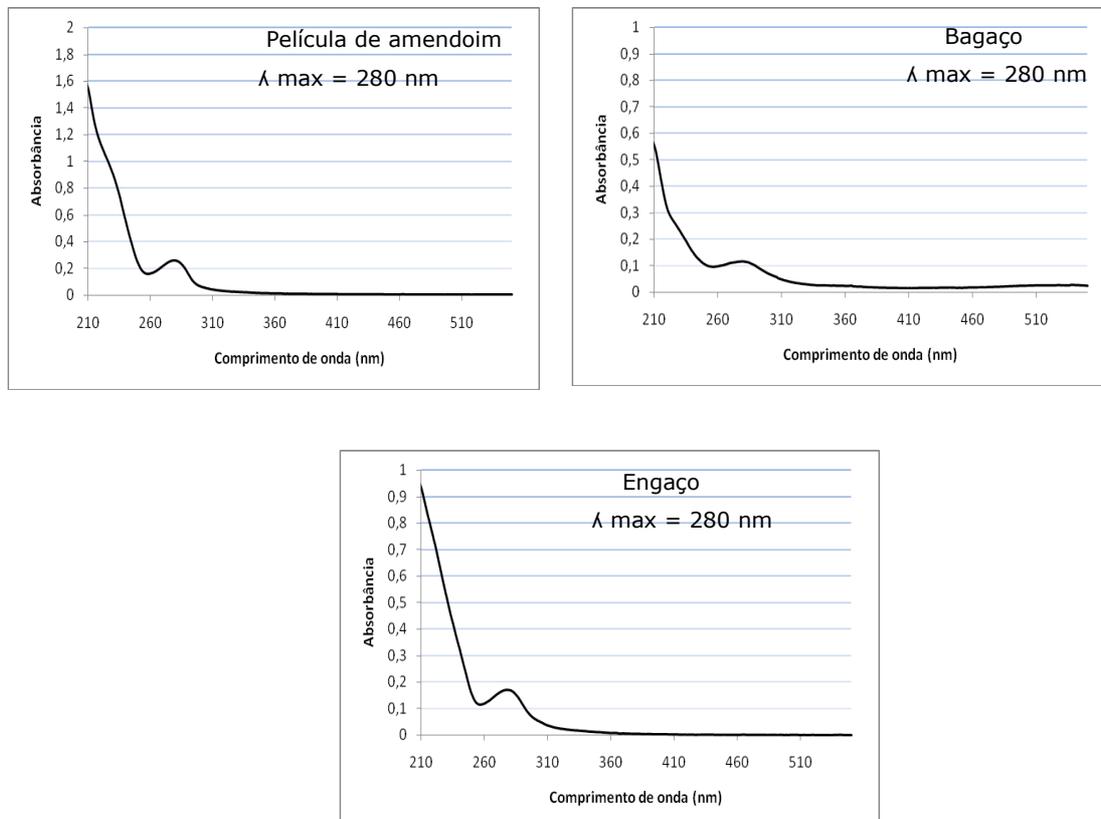


Figura 23 - Espectros de absorção na região UV-visível (200 a 600 nm), dos extratos alcoólicos brutos de película de amendoim, bagaço e engaço de uva Cabernet Sauvignon

3.3.3 Avaliação da influência do pH e do processo de remoção de gordura com hexano no teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante

A primeira etapa no processo de otimização da extração de compostos antioxidantes dos subprodutos agroindustriais foi o desenvolvimento de um ensaio univariável, onde as amostras foram submetidas a diferentes tratamentos de extração com a finalidade de se observar a influência do pH e também do processo de remoção de gordura da amostra. Os tratamentos foram divididos da seguinte maneira:

- extratos com etanol:água (80:20 v/v);
- extratos com etanol:água (80:20 v/v) e acidificados a pH 1,5 com HCl 0,1M;
- extratos com etanol:água (80:20 v/v) previamente desengordurados com hexano;
- extratos com etanol:água (80:20 v/v) previamente desengordurados com hexano e posteriormente acidificados a pH 1,5 com HCl 0,1M.

A escolha do pH a ser testado foi feita em função de trabalhos prévios da literatura, que indicavam o valor de 1,5 como sendo o melhor para a extração de compostos fenólicos. Lafka, Sinanoglou e Lazos (2007) realizaram experimento com bagaço de uva variando o pH de 3,5 a 1,5 e a eficiência máxima no rendimento de extração foi obtida com pH 1,5. Baublis, Decker e Clydesdale (2000) também verificaram aumento da atividade antioxidante de frações aquosas de farelo de trigo em condições muito ácidas, provavelmente devido à alteração da composição de fenólicos.

3.3.3.1 Teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos encontrados nos extratos submetidos à extração em meio ácido; previamente desengordurados e acidificados, variaram significativamente para o engaço e bagaço. Já a película não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2 - Teor de compostos fenólicos totais de extratos de bagaço e engaço de uva e película de amendoim (g AG.100g⁻¹ peso seco)

Extração	Fenólicos Totais (g AG.100g ⁻¹ subproduto)		
	Engaço	Bagaço	Película
Etanol 80%	4,64 ± 1,37 b	2,07 ± 1,03 b	6,51 ± 3,36 a
Ácido (pH 1,5)	6,42 ± 0,43 a	3,38 ± 0,01 a	6,82 ± 0,10 a
Desengordurado	4,68 ± 0,28 b	1,85 ± 1,86 b	6,74 ± 0,48 a
Desengordurado/ácido	6,10 ± 1,93 a	3,22 ± 0,02 a	6,94 ± 1,80 a

Valores representam as médias ± desvio padrão n = 3

Médias das colunas seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey p<0,05).

Estes resultados demonstram que o processo de acidificação da amostra aumenta a extração de compostos fenólicos, e que somente o processo de remoção da gordura não apresenta o mesmo efeito. Rockenbach et al. (2004) encontraram valores de compostos fenólicos em bagaços de uva da variedade *Tannat* e *Ancelota*, extraídos com etanol 70%, acidificados e desengordurados, de 5,59 e 5,86g AG.100g⁻¹ respectivamente. Göktürk Baydar, Özkan e Sagdiç (2004) encontraram em sementes e bagaço de uva, teores de compostos fenólicos totais de 4,54 g AG.100 g⁻¹ de peso seco, quando o sistema de extração foi acetato de etila:metanol:água (60:30:10) e, 2,95g AG.100 g⁻¹ quando o solvente foi etanol a 95%.

Yu et al. (2005) avaliaram influência da remoção da película de amendoim sobre o conteúdo de compostos fenólicos totais, utilizando etanol como solvente. Os teores encontrados foram de 8,99g; 1,6g e 12,5g AG.100 g⁻¹ quando foram usados os métodos de remoção direta (com as mãos), blanchamento e aquecimento a 175 °C respectivamente.

O teor de compostos fenólicos totais obtido neste trabalho de 6,7 g AG.100 g⁻¹ para a película de amendoim blanchada (Tabela 2), foi pelo menos três vezes maior que os encontrados por Yu et al. (2005) e Yu et al. (2006), onde as condições de blanchamento não foram especificadas.

Francisco e Resurreccion (2009) avaliaram a capacidade antioxidante e o teor de fenólicos totais na película de amendoim de três variedades submetidas ao tratamento de aquecimento. Os teores de compostos fenólicos totais variaram de 10,1 a 28,0 g AG.100 g⁻¹ para a variedade Runner, 10,6 a 14,8 g AG.100 g⁻¹ para a variedade Virginia e 9,5 a 13,6 g AG.100 g⁻¹ para a variedade Spanish. Estes valores são maiores do que o encontrado no

presente trabalho, porém os tratamentos empregados para remoção da película do endosperma foram diferentes.

Por tudo isto, vários autores concordam que não é possível se desenvolver um método universal que seja adequado para a extração de todos os compostos fenólicos, pois existe uma diversidade de estruturas químicas muito grandes, o que faz com que ocorra uma grande variação de sensibilidade desses compostos às condições de extração (ANTOLOVICH et al., 2000).

3.3.3.2 Atividade Antioxidante

Devido ao grande número de amostras geradas pelos três subprodutos durante a otimização do processo de extração, o método de sequestro do radical DPPH foi o escolhido para se monitorar a atividade antioxidante, pois este é simples, rápido, reprodutível e de amplo uso na literatura científica especializada.

Os resultados da avaliação do efeito do pH e da remoção de gordura dos extratos alcoólicos dos subprodutos sobre a atividade antioxidante estão mostrados nas Figuras 24, 25 e 26.

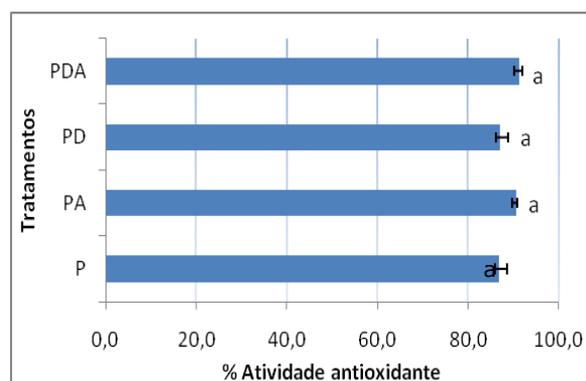


Figura 24 - Atividade antioxidante (%) pelo método de sequestro do radical DPPH da película de amendoim. P (película EtOH 80%), PA (película acidificada), PD (película desengordurada) e PDA (película desengordurada e acidificada). Os extratos foram avaliados na concentração de 500 µg/mL. Médias seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey $p < 0,05$) $n = 3$.

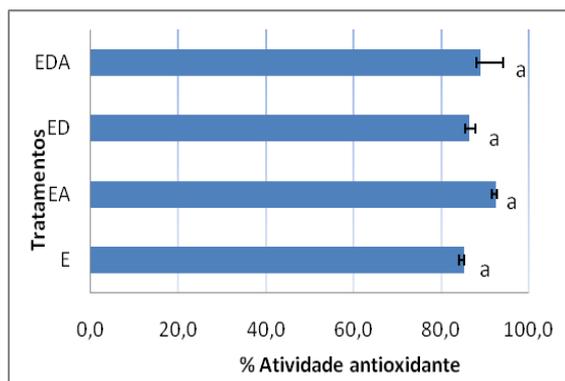


Figura 25 - Atividade antioxidante (%) pelo método de sequestro do radical DPPH do engaço de uva. E (engaço EtOH 80%), EA (engaço acidificado), ED (engaço desengordurado) e EDA (engaço desengordurado e acidificado). Os extratos foram avaliados na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. Médias seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey $p < 0,05$) $n = 3$.

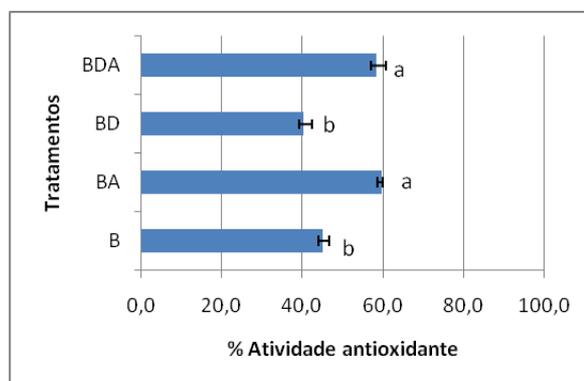


Figura 26 - Atividade antioxidante (%) pelo método de sequestro do radical DPPH do bagaço de uva. B (Bagaço EtOH 80%), BA (bagaço acidificado), BD (bagaço desengordurado) e BDA (bagaço desengordurado e acidificado). Os extratos foram avaliados na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. Médias seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey $p < 0,05$)

De acordo com os resultados mostrados acima, pode-se verificar que a película de amendoim e o engaço (Figuras 24 e 25), foram os subprodutos que apresentaram as maiores porcentagens de sequestro do radical DPPH, assim também como os maiores teores de compostos fenólicos (Tabela 2). O processo de acidificação aumentou a extração de compostos com atividade biológica, sendo que no extrato de bagaço foi possível observar diferença significativa entre os tratamentos (Figura 26). Existe uma grande variedade de classes de compostos fenólicos presentes no bagaço de uva, incluindo a dos flavonóides, como por exemplo, as antocianinas. As antocianinas são também compostos fenólicos que apresentam a alta instabilidade

Uma característica marcante das antocianinas está no fato de que em soluções aquosas apresentam diferentes estruturas em função do pH (da COSTA et al., 1998; FLESCHHUT et al., 2006; HEREDIA et al., 1998). Em meio extremamente ácido (pH entre 1 e 2), as antocianinas apresentam coloração intensamente avermelhada devido ao predomínio da forma

cátion flavílico (AH⁺). É possível que o processo de acidificação tenha aumentado a estabilidade destas, conforme observado para os tratamentos BA (bagaço acidificado) e BDA (bagaço desengordurado e acidificado) (Figura 26).

Portanto, e com vistas a se padronizar extração destes subprodutos, foi escolhido o processo de produção de extratos que utiliza a acidificação do meio a pH1,5. Este foi o processo que proporcionou os maiores teores de compostos fenólicos e também as melhores atividades antioxidantes.

3.3.4 Avaliação do tempo de extração no teor de fenólicos e atividade antioxidante

Na segunda etapa do processo de otimização da extração e, com o objetivo de se definir qual o tempo de extração mais apropriado para ser utilizado na superfície de resposta, os extratos acidificados foram extraídos com etanol:água (80:20), em banho termostatizado a 70°C em três tempos diferentes: 15, 30 e 45 minutos. Em seguida foram avaliados quanto o teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante.

3.3.4.1 Teor de compostos fenólicos

Pode-se observar que para o engaço de uva, o aumento no tempo de extração não resultou em um aumento no teor de compostos fenólicos (Tabela 3). Já para o bagaço foi observado aumento na extração dos compostos de interesse, quando estes ficaram mais tempo submetidos à ação da temperatura, sendo inclusive encontradas diferenças significativas com o aumento do tempo de 15 para 45 minutos. Diferentemente, a película de amendoim apresentou o maior teor de compostos fenólicos quando submetida somente aos primeiros 15 minutos de extração.

Tabela 3 - Teor de compostos fenólicos totais de extratos de bagaço e engaço de uva e película de amendoim (g AG/100g⁻¹ peso seco) em função do tempo de extração em banho termostático

Tempo de extração	Fenólicos Totais		
	Engaço	Bagaço	Película
15 minutos	6,01 ± 0,47 a	2,60 ± 1,12 b	8,48 ± 1,58 a
30 minutos	6,08 ± 2,45 a	2,84 ± 1,65 a,b	8,18 ± 0,33 b
45 minutos	6,65 ± 4,03 a	3,01 ± 1,02 a	7,99 ± 1,02 b

Valores representam as médias ± desvio padrão, n = 3

Médias das colunas seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey p<0,05).

3.3.4.2 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos de bagaço, engaço e película, avaliados na concentração de a 250 µg/mL, estão apresentadas nas Figuras 27, 28 e 29.

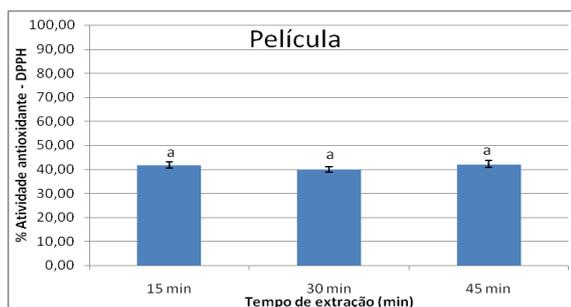


Figura 27 - Atividade antioxidante (%) pelo método de sequestro do radical DPPH da película de amendoim. Os extratos foram avaliados na concentração de 250 µg/mL.

Médias seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey p<0,05) n=3.

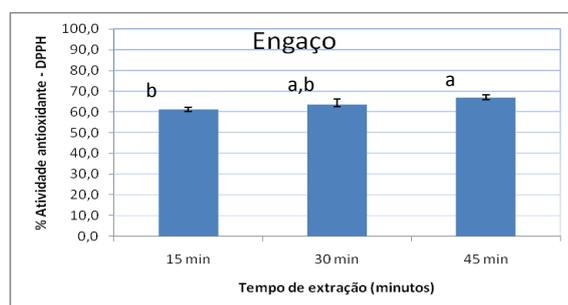


Figura 28 - Atividade antioxidante (%) pelo método de sequestro do radical DPPH do engaço de uva. Os extratos foram avaliados na concentração de 250 µg/mL.

Médias seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey p<0,05) n=3.

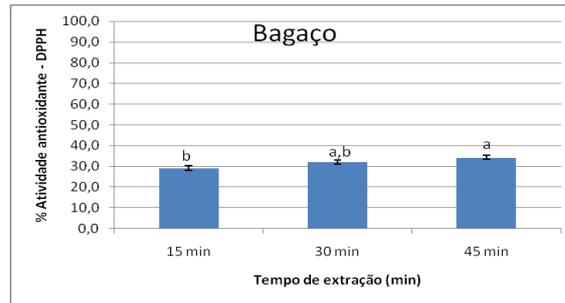


Figura 29 - Atividade antioxidante (%) pelo método de sequestro do radical DPPH do bagaço de uva. Os extratos foram avaliados na concentração de 250 µg/mL.

Médias seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey $p < 0,05$) $n=3$.

O extrato etanólico da película de amendoim não apresentou diferença significativa da atividade antioxidante entre os tempos avaliados (Figura 27). No entanto, o engaço e o bagaço apresentaram diferença estatisticamente significativa no tempo de 15 minutos e 45 minutos (Figuras 28 e 29).

Yu et al. (2005) analisaram película de amendoim e encontraram elevado teor de fenólicos, que variou de 9,0 a 12,5 g AG/100g⁻¹, além de alta atividade antioxidante. Esses autores concluíram que os resultados encontrados variaram de acordo com o tratamento empregado na remoção da película, bem como do solvente utilizado na extração. Rockenbach et al. (2008) avaliaram a influência do solvente na extração de compostos antioxidantes em extratos de bagaço de uva e concluíram que o sistema solvente utilizado na extração influencia diretamente no conteúdo de fenólicos totais, antocianinas e atividade antioxidante dos extratos. Compostos fenólicos totais foram melhor extraídos com acetona (50 e 70%), enquanto que as antocianinas foram melhor extraídas com etanol (50 e 70%).

Comparação similar pode ser feita para os extratos aqui testados, pois o tempo ideal de extração variou tanto para os compostos fenólicos quanto para a atividade antioxidante, ou seja, o melhor tempo de extração para compostos fenólicos não foi o mesmo para a atividade antioxidante. Devido a esta incompatibilidade, optou-se por acompanhar o processo de otimização de extração somente pela atividade antioxidante, pois o objetivo principal do trabalho é a extração, fracionamento e isolamento de compostos com esta propriedade. Como nem sempre existe uma correlação positiva entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante, a superfície de resposta apresentará como variável dependente somente a porcentagem de sequestro do radical DPPH.

Portanto, para a realização da metodologia de superfície de resposta e baseando-se nos resultados obtidos, optou-se por trabalhar com os extratos acidificados a pH 1,5 e tempo de extração de 30 minutos em banho termostaticado.

3.3.5 Superfície de resposta

Nos estudos de extração de compostos bioativos a partir de subprodutos de origem vegetal, diversos solventes e condições vêm sendo testados na tentativa de se encontrar o que apresente a melhor capacidade de extrair compostos com atividade biológica (BALLARD et al., 2009; BALLARD et al., 2010; YU et al., 2005; KARVELA et al., 2009; LIYANNA-PATHIRANA; SHAHIDIDI, 2005). No entanto, não existe um modelo universal que descreva as melhores condições que devem ser empregadas. O planejamento experimental é uma ferramenta que auxilia na otimização do processo de extração, sendo utilizado para análise de processos em que diversas variáveis explanatórias (fatores) influenciam uma variável dependente (resposta), permitindo a identificação de relações matemáticas e estatísticas entre níveis pré-determinados das variáveis (THOMPSON, 1982).

Desta forma, aplicando um delineamento estatístico do tipo fatorial e análise de superfície de resposta, foi possível prever qual o melhor solvente e a faixa ideal de trabalho em que foi obtida a máxima extração de compostos com atividade antioxidante para os subprodutos de interesse.

3.3.6 Planejamento Experimental

A otimização da extração dos compostos com atividade biológica do engaço, bagaço e película de amendoim foi realizada fixando a acidificação do extrato a pH 1,5 e tempo de extração de 30 minutos em banho termostaticado. Um planejamento fatorial 2^2 consistindo de 11 ensaios foi empregado, incluindo três replicatas no ponto central e utilizando dois fatores como variáveis independentes: a concentração do solvente e a temperatura de extração, enquanto a variável dependente foi a porcentagem de atividade antioxidante. Três solventes foram testados: acetona, etanol e propilenoglicol. Os níveis das variáveis independentes estudadas neste planejamento experimental completo estão apresentados na Tabela 1.

Em superfície de resposta, as variáveis naturais são transformadas em variáveis codificadas que são definidas como adimensionais, com um zero no ponto médio e a mesma propagação ou desvio padrão. Equações de regressão múltipla foram geradas relacionando a resposta da variável dependente, com os níveis codificados das variáveis independentes. A Tabela 4 mostra o planejamento fatorial com seus valores reais e codificados para cada

ensaio. Os valores utilizados para a análise de variância e geração da superfície de resposta foram os codificados.

Tabela 4 - Planejamento fatorial composto central, com valores reais e codificados para o estudo do efeito das variáveis na porcentagem de atividade antioxidante

Ensaio	Composição do solvente (% v/v)	Temperatura (°C)
1	75 (+1)	64,2 (+1)
2	45 (-1)	64,2 (+1)
3	75 (+1)	35,8 (-1)
4	45 (-1)	35,8 (-1)
5	38,9 (-1,41)	50 (0)
6	81,1 (+1,41)	50 (0)
7	60 (0)	30 (-1,41)
8	60 (0)	70 (+1,41)
9	60 (0)	50 (0)
10	60 (0)	50 (0)
11	60 (0)	50 (0)

Na Tabela 5 estão apresentados os valores das porcentagens de atividade antioxidante obtida para cada ensaio. Os valores em negrito são as repetições no ponto central. A partir dos resultados de atividade antioxidante obtidos para cada subproduto, foi feita a Análise de Variância dos dados, e, na sequência geradas as superfícies de resposta e gráficos de contorno.

Tabela 5 - Dados experimentais para a resposta de atividade antioxidante total dos extratos de engaço, bagaço e película de amendoim sob diferentes condições de extração, apresentadas na Tabela 4

Ensaio	EE ^{a,1}	EA ^{b,1}	EP ^{c,1}	BE ^{d,1}	BA ^{e,1}	BP ^{f,1}	PE ^{g,1}	PA ^{h,1}	PP ^{i,1}
1	53,58	72,28	64,78	45,50	61,76	50,86	50,94	86,00	55,90
2	55,24	69,54	63,94	46,03	58,25	51,86	50,00	79,41	49,87
3	55,66	68,03	59,54	40,87	58,81	46,59	52,35	90,56	50,84
4	55,99	67,40	61,06	41,37	53,69	40,85	48,20	82,02	49,70
5	57,07	66,72	60,89	41,82	57,07	42,58	48,82	82,02	48,02
6	56,57	68,83	64,53	41,85	61,51	50,50	52,90	91,94	53,62
7	60,40	65,88	64,95	43,96	58,41	51,86	53,45	83,32	53,12
8	63,14	73,71	64,86	48,07	68,23	58,87	54,47	84,70	55,52
9*	59,73	69,67	66,64	46,35	61,90	51,50	55,25	79,58	55,77
10*	60,90	69,04	65,96	46,60	63,66	54,69	54,94	85,52	57,66
11*	60,40	73,97	68,58	46,84	63,89	55,14	56,43	86,74	59,81

^a EE (Engaço Etanol); ^b EA (Engaço Acetona); ^c EP (Engaço Propilenoglicol); ^d BE (Bagaço Etanol); ^e BA (Bagaço Acetona); ^f BP (Bagaço Propilenoglicol); ^g PE (Película Etanol); ^h PA (Película Acetona); ⁱ PP (Película Propilenoglicol); * Repetições no ponto central.¹ Extratos diluídos a 500 ug/mL

3.3.6.1 Modelo Experimental para o Engaço

Os modelos quadráticos gerados para os solventes acetona, propilenoglicol e etanol não foram significantes ($p > 0,05$), ou seja, a faixa estudada não provocou diferença significativa entre os termos.

Karvela et al. (2009) realizaram estudo de otimização da extração de compostos fenólicos de engaço de uva de três diferentes variedades. Nos ensaios as variáveis foram o pH, concentração de etanol e tempo de extração. Os autores concluíram que uma concentração intermediária de etanol (entre 45 e 50%) com valores intermediários de pH (entre 2 e 3) fornecem os melhores rendimentos na extração dos compostos de interesse.

Apesar dos solventes acetona, propilenoglicol e etanol não apresentarem efeitos significantes na faixa estudada, foi possível concluir que o solvente que apresentou a maior

eficiência na extração de compostos com capacidade antioxidante foi a acetona (Tabela 5). A acetona pode ser considerada o solvente ideal para a extração dos compostos de interesse, pois ainda admite que a extração possa ser realizada na menor concentração de solvente (38,9%) e menor temperatura (30°C) ou ainda nas mesmas condições ideais para os demais subprodutos, sem perda na eficiência.

3.3.6.2 Modelo Experimental para a Película

Os valores da ANOVA para o modelo de regressão quadrática da película mostrou que a atividade antioxidante foi significativa ($p < 0,05$) quando o etanol foi utilizado como solvente extrator. Os modelos quadráticos gerados para acetona e propilenoglicol não foram significantes ($p > 0,05$).

A variável concentração quadrática (Q) e linear (L) apresentaram efeito negativo e significativo nas faixas estudadas a 95% de nível de confiança. Este resultado indica que uma diminuição na variável concentração (Q) e (L) poderia ocasionar um aumento na atividade antioxidante (Tabela 6).

Tabela 6 - Efeito das variáveis temperatura e concentração do planejamento fatorial completo 2^2 do solvente etanol no resíduo película de amendoim.

Fatores	Efeito	Desvio padrão	t (2)	p	Limite de confiança (-95%)	Limite de confiança (+95%)
Média	55,55*	0,4539	122,39	0,000067	53,60	57,50
Linear						
<i>Temperatura</i>	0,46	0,5570	0,82	0,496971	-1,94	2,85
<i>Concentração</i>	2,72*	0,5574	4,88	0,039474	0,32	5,12
Quadrático						
<i>Temperatura</i>	-2,61	0,6652	-3,93	0,059022	-5,48	0,25
<i>Concentração</i>	-5,73*	0,6665	-8,64	0,013139	-8,63	-2,89
Temp. x conc.	-1,60	0,7861	-2,04	0,177974	-4,99	1,78

* Fatores significativos no limite de confiança de 5%

A Tabela 7 apresenta a análise de variância (ANOVA) utilizada para a validação estatística e verificação da adequação do modelo. Conforme a Tabela 7 foi possível constatar que o valor de F calculado foi 2,15 vezes maior que valor F tabelado, indicando que o modelo de segunda ordem é estatisticamente significativo e preditivo, e descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

Tabela 7 - Análise de variância no estudo do efeito das variáveis temperatura e concentração do solvente etanol na atividade antioxidante da película de amendoim

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	52,48	2	26,24	9,61
Resíduo	22,10	8	2,76	
<i>Falta de ajuste</i>	20,87	6	3,48	5,70
<i>Erro puro</i>	1,23	2	0,61	
total	74,58	10		

Coefficiente de determinação (R^2): 0,70

F tabelado (regressão/resíduo) $F_{0,95;2;8}=4,46$; F calc/F tab = 2,15

F tabelado (falta de ajuste/erro puro) $F_{0,95;6;2}=19,33$

O teste F da razão Média Quadrática da falta de ajuste/Média Quadrática do erro puro (MQ_{faj}/MQ_{ep}) para avaliar se o modelo estava bem ajustado às observações, mostrou que o valor F estava quase quatro vezes menor que o tabelado, apresentando um erro baixo, o que indica que não há falta de ajuste.

A Equação 2, gerada a partir dos valores codificados, foi utilizada para se obter as superfícies de resposta e gráficos de contorno (Figura 30).

$$\text{Atividade Antioxidante\%} = 54,32 + 2,72 \times \text{Concentração} - 4,97 \times \text{Concentração}^2 \quad (\text{Eq. 2})$$

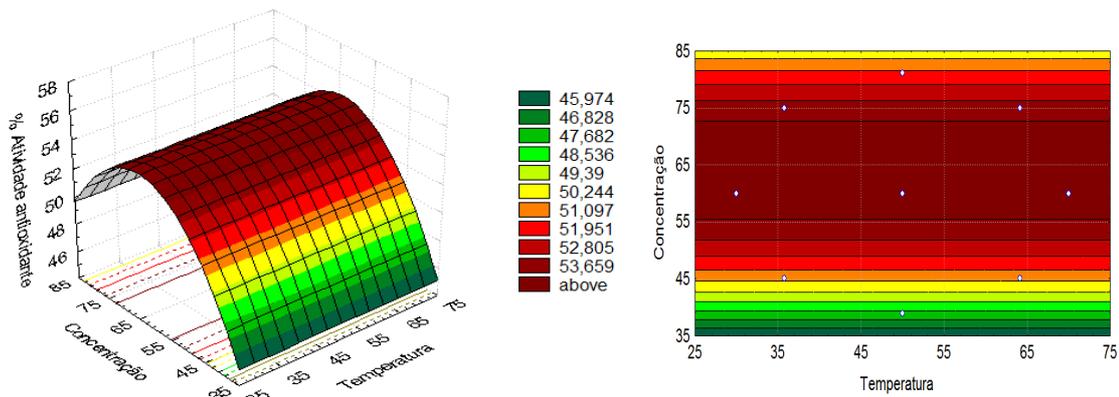


Figura 30 - Superfície de resposta e gráficos de contorno do efeito da concentração do solvente etanol e temperatura na porcentagem de atividade antioxidante em extratos de película de amendoim

As melhores atividades de sequestro do radical DPPH foram obtidas quando a concentração do solvente etanol esteve entre 55 e 75%. Em relação à temperatura, a mesma não exerceu influência no aumento da extração de compostos com atividade antioxidante.

Apesar do solvente acetona e propilenoglicol não apresentarem diferença significativa entre os termos nas faixas estudadas, a acetona foi o solvente que apresentou extração de compostos com as maiores atividades antioxidantes. A atividade de sequestro do radical DPPH apresentada pela acetona foi próxima de 80%, enquanto o solvente etanol e propilenoglicol apresentaram atividade na faixa de 55% a 60% (Tabela 5). Também no caso da película, é possível trabalhar com os níveis mais inferiores das variáveis ou ainda em condições determinadas para os demais subprodutos, sem perda na eficiência.

Ballard et al. (2009) realizaram estudo de otimização da extração de compostos fenólicos e compostos com atividade antioxidante para a película de amendoim, utilizando a superfície de resposta. Foram avaliados três solventes: metanol, etanol e água. Os autores concluíram que para a extração de compostos com atividade antioxidante, o melhor solvente foi o metanol na concentração de 30%, 52,9 °C e 30 minutos, seguido pelo etanol e água.

Em trabalho mais recente, Ballard et al. (2010) avaliaram a extração de fenólicos da película de amendoim pela utilização micro-ondas e concluíram que uma potência de 90%, durante 150 segundos de irradiação e 1,5 grama de película são as condições ideais para a extração de compostos com atividade antioxidante, avaliada pelo método ORAC.

3.3.6.3 Modelo Experimental para o Bagaço

O bagaço, diferentemente dos demais subprodutos estudados, mostrou modelo de regressão significativa ($p < 0,05$) para os três solventes testados: etanol, propilenoglicol e acetona.

Para o solvente acetona as variáveis temperatura e concentração (L) e concentração (Q) apresentaram efeito significativo. Já para os solventes etanol e propilenoglicol as variáveis significativas foram temperatura (L) e concentração (Q) (Tabela 8).

Tabela 8 - Efeito das variáveis do planejamento fatorial completo 2^2 do bagaço para os solventes acetona, etanol e propilenoglicol

Fatores	Acetona	Etanol	Propilenoglicol
Média	63,17*	46,60*	53,80*
Linear			
<i>Temperatura</i>	5,36*	3,78*	6,31*
<i>Concentração</i>	3,74*	-0,25	3,99
Quadrático			
<i>Temperatura</i>	-1,44	-0,81	-0,12
<i>Concentração</i>	-5,52*	-5,04*	-9,05*
Temp. x conc.	-0,80	-0,015	1,98

* Fatores significativos no limite de confiança de 5%

Os coeficientes de regressão (Tabela 9) forneceram os modelos matemáticos abaixo, sendo que o R^2 apresentou um bom valor, indicando bom ajuste do modelo, principalmente no caso do solvente etanol ($R^2 = 0,95$), o que mostra que mais de 95% das variações são explicadas pelo modelo. Para a construção das equações matemáticas foram considerados apenas os fatores significativos (Tabela 12). As Equações 3, 4 e 5 foram geradas para a acetona, etanol e propilenoglicol respectivamente, a partir dos valores codificados, e foram utilizadas para a obtenção das superfícies de resposta e gráficos de contorno.

Tabela 9 - Coeficiente de regressão do planejamento fatorial completo 2² considerando apenas os valores significativos no limite de confiança de 95%

Fatores	Acetona	Etanol	Propilenoglicol
Média	4,78	38,54	36,13
Linear			
<i>Temperatura</i>	0,1886	0,1332	0,2223
<i>Concentração</i>	1,4850		
Quadrática			
<i>Temperatura</i>			
<i>Concentração</i>	-0,0113	-0,00019	0,00086
R ²	0,80	0,95	0,72

Atividade antioxidante (%) = 4,776748 + 0,188628 x temperatura + 1,485034 x concentração – 0,011337 x concentração² (Eq. 3) acetona

Atividade antioxidante (%) = 38,54463 + 0,13328 x temperatura – 0,00019 x concentração (Eq. 4) etanol

Atividade antioxidante (%) = 36,13098 + 0,22232 x temperatura + 0,00086 x concentração (Eq. 5) propilenoglicol

A Análise de Variância (ANOVA) dos modelos de regressão quadrática para a acetona, etanol e propilenoglicol, mostrou que os modelos foram significantes ($p < 0,05$) com valores de F de 9,23; 79,18 e 9,22 respectivamente (Tabela 10). Também não houve significância na falta de ajuste, calculada pela razão MQ_{faj}/MQ_{ep} ($p > 0,05$) em cada um dos três modelos. Estes dados indicam que os modelos podem ser usados para prever as respostas. Os coeficientes de regressão não estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança foram excluídos do modelo, sendo incorporados no resíduo total.

Tabela 10 - Análise de variância no estudo do efeito das variáveis temperatura e concentração dos solventes acetona, etanol e propilenoglicol na atividade antioxidante do bagaço de uva

Fonte	Acetona				Etanol			
	SQ	g.l	MQ	F ^a	SQ	g.l	MQ	F ^b
Regressão	124,49	3	41,50	9,23	63,64	2	31,82	79,18
Resíduo	31,48	7	4,50		3,21	8	0,40	
<i>Falta de ajuste</i>	29,11	5	5,82	4,91	3,09	6	0,51	8,59
<i>Erro puro</i>	2,37	2	1,18		0,12	2	0,06	
Total	155,97	10			66,86	10		

Fonte	Propilenoglicol			
	SQ	g.l	MQ	F ^c
Regressão	202,71	2	101,35	9,22
Resíduo	82,40	8	10,30	
<i>Falta de ajuste</i>	74,52	6	12,42	3,15
<i>Erro puro</i>	7,88	2	3,94	
Total	285,10	10		

^a F tabelado $_{0,95; 3;7} = 4,35$ F calc/F tab = 2,12

^a F tabelado $_{0,95;5;2} = 19,30$

^b F tabelado $_{0,95; 2;8} = 4,46$ F calc/F tab = 17,75

^b F tabelado $_{0,95;6;2} = 19,33$

^c F tabelado $_{0,95; 2;8} = 4,35$ F calc/F tab = 2,12

^c F tabelado $_{0,95;6;2} = 19,33$

Os modelos foram utilizados para construir as superfícies de resposta e gráficos de contorno. A Figura 31 mostra os efeitos da temperatura e concentração dos solventes na porcentagem de atividade antioxidante.

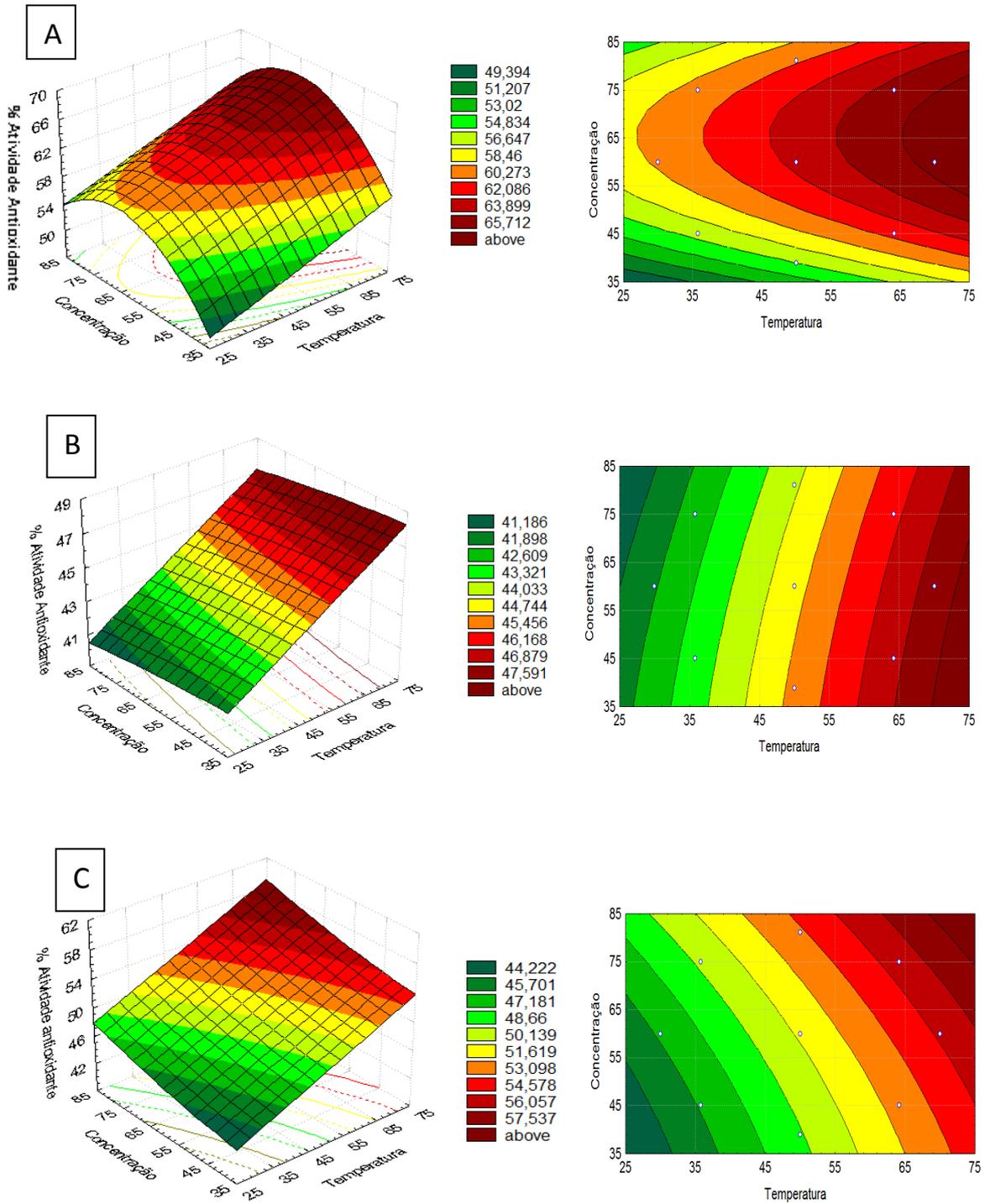


Figura 31 - Superfícies de resposta e gráficos de contorno do efeito da concentração dos solventes (A) acetona; (B) etanol e (C) propilenoglicol e temperatura na porcentagem de atividade antioxidante em extratos de bagaço.

Analisando a Figura 31 é possível concluir que dentro das faixas estudadas, os maiores valores para a atividade antioxidante apontam para uma maior temperatura (65 a 70⁰C) nos três modelos. Com relação à concentração do solvente, a faixa de concentração ótima para a acetona foi entre 65% e 70% (Figura 31A). No caso do etanol, a concentração do solvente não influenciou a extração de compostos com atividade antioxidante, apresentando em toda a faixa estudada (38,9% a 75%) uma boa extração dos compostos com atividade (Figura 31B). Para o propilenoglicol a extração máxima é conseguida quando o solvente apresenta concentração igual ou superior a 60% (Figura 31C).

Assim como aconteceu para os outros subprodutos, engaço e película de amendoim, o solvente acetona também extraiu a maior quantidade de compostos com atividade antioxidante no bagaço. Quando se compara os valores de atividade (Tabela 5) observa-se uma média de 85% para acetona, 55% para o etanol e 57% para o propilenoglicol.

Desta forma, conclui-se que o solvente mais apropriado para a extração de compostos bioativos, para posterior fracionamento e isolamento desses subprodutos, é a acetona. Como a superfície de resposta para a acetona foi gerada apenas quando o bagaço foi estudado, decidiu-se utilizar a melhor condição obtida (60% de solvente e 70⁰C) e, assim, aplicá-la para todos os subprodutos.

Merece destaque o fato que nenhum trabalho de otimização da extração de compostos com atividade antioxidante dos subprodutos aqui estudados foi publicado até o momento com os solventes acetona e propilenoglicol. Por isso, a comparação dos resultados foi realizada com base em estudos semelhantes.

3.3.7 Extração em ultrassom

Com o objetivo de avaliar se a técnica de ultrassom possui maior seletividade para a extração de compostos de interesse, e, ainda entender se a ação da temperatura poderia degradar os compostos presentes nos subprodutos, as amostras foram submetidas à extração ultra sônica em temperatura ambiente. Os três solventes anteriormente testados (acetona, etanol e propilenoglicol) e o tempo de extração foram as variáveis. Foram testados quatro tempos (15 min, 30 min, 45 min e 60 min) e uma concentração de 60% para todos os solventes analisados, pois foi a concentração que apresentou os melhores resultados no planejamento fatorial.

Os extratos obtidos foram avaliados quanto a capacidade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH. As Figuras 32, 33 e 34 ilustram os resultados para o engaço, película de amendoim e bagaço, respectivamente.

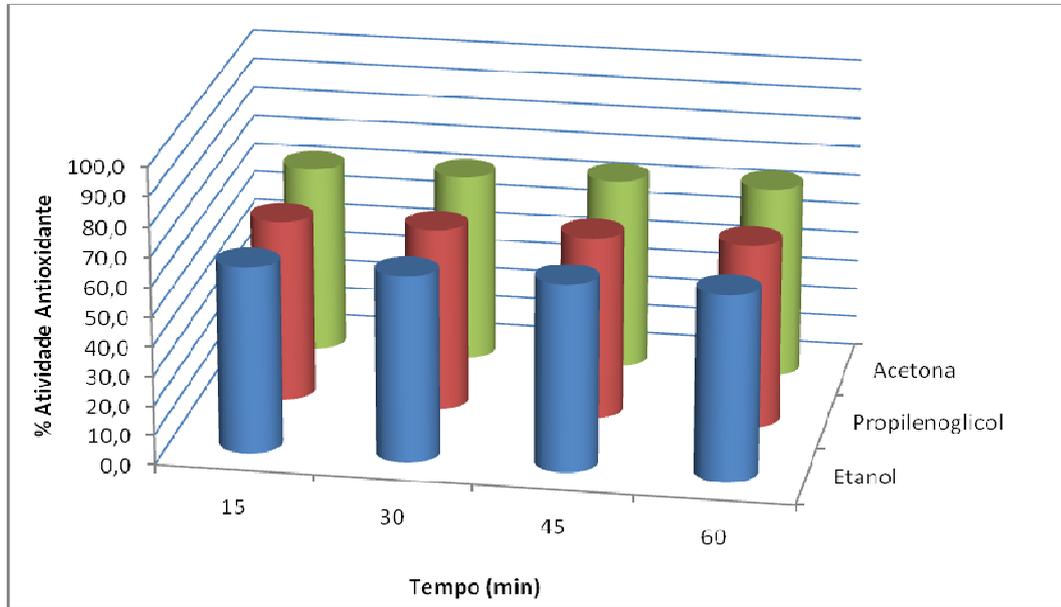


Figura 32 - Porcentagem de atividade antioxidante obtida para o extrato de engaço testado com três solventes em quatro tempos diferentes. Valores representam as médias, $n = 3$

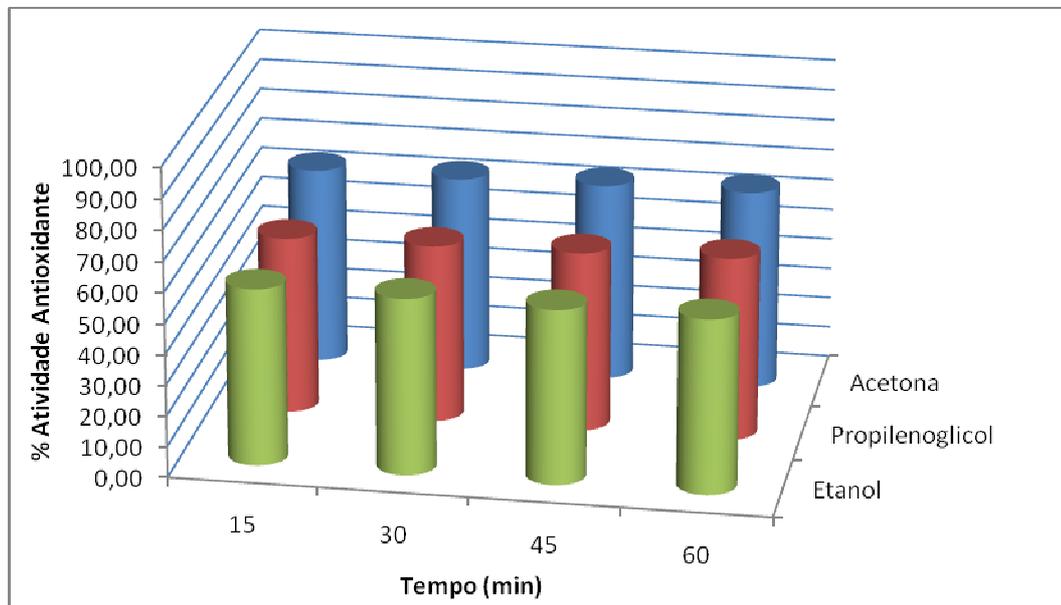


Figura 33 - Porcentagem de atividade antioxidante obtida para extrato da película de amendoim testado com três solventes em quatro tempos diferentes. Valores representam as médias, $n = 3$

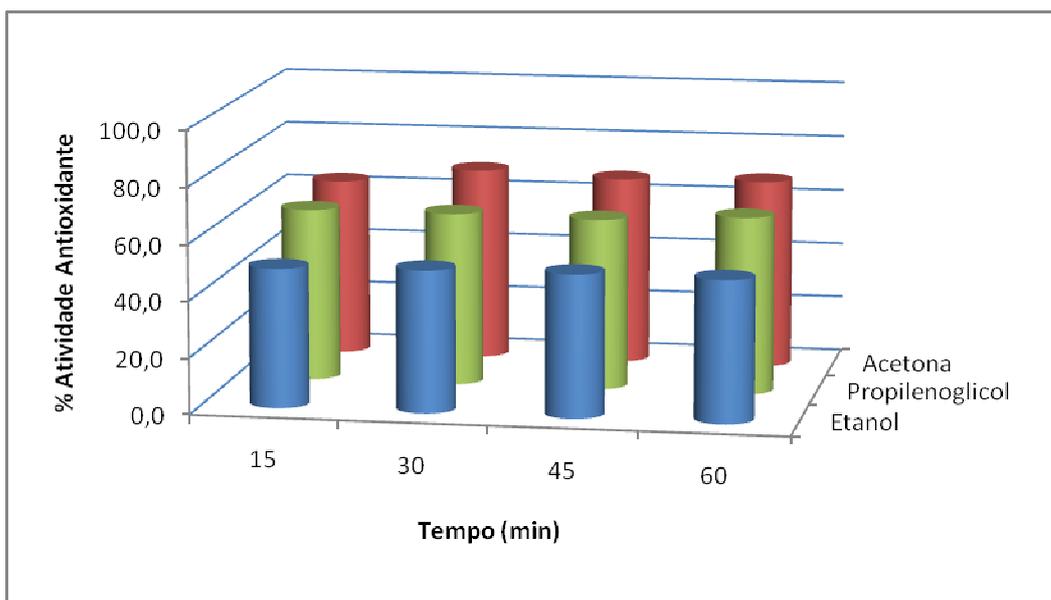


Figura 34 - Porcentagem de atividade antioxidante obtida para o extrato de bagaço testado com três solventes em quatro tempos diferentes. Valores representam as médias, n =3

De acordo com as Figuras 32, 33 e 34 é possível verificar que o tempo não exerceu influência na extração dos compostos com atividade antioxidante. Não foram observadas diferenças significativas entre os tempos testados para nenhum dos solventes em nenhuma amostra. Estes resultados indicam que 15 minutos é o tempo suficiente para extração dos compostos bioativos se a técnica de extração em ultrassom for a escolhida.

Apesar da variável tempo não ter exercido influência na extração, os solventes avaliados apresentaram diferenças na eficiência de extração (Tabela 11). Para realização da comparação de médias, foram utilizadas as atividades obtidas em 15 minutos de extração em ultrassom.

Tabela 11 - Porcentagem de atividade antioxidante dos extratos preparados pela técnica de extração por ultrassom no tempo de 15 minutos

Solventes	Tempo (15 minutos)		
	Bagaço	Engaço	Película
Acetona 60%	65,44 a	63,33 a	64,26 a
Etanol 60%	49,52 b	62,86 a	57,44 a,b
Propilenoglicol 60%	61,65 a	61,47 a	57,52 b

Valores representam as médias \pm desvio padrão, n = 3

Médias das colunas seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey $p < 0,05$).

Foi possível observar que para o subproduto engaço os solventes não apresentaram diferença significativa na extração de compostos bioativos. No caso do bagaço, os solventes

acetona e propilenoglicol apresentaram as melhores extrações de compostos com atividade antioxidante, e, para a película os melhores foram a acetona e etanol.

Cárcel et al. (2010) compararam a eficiência da extração em banho ultra sônico e em banho somente com agitação mecânica, em diferentes tempos, para engaço de uva e folhas de azeitona. A atividade antioxidante foi avaliada pelo método FRAP. No caso do engaço de uva, concluíram que a extração sob agitação mecânica foi realmente mais eficaz, com atividade de 9327 $\mu\text{mol trolox/L}$ contra 6113 $\mu\text{mol trolox/L}$, após 180 minutos de extração em banho ultra sônico.

Para a finalização do processo de otimização de extração, foi feita a comparação das médias da porcentagem de atividade antioxidante obtidas na superfície de resposta (repetição dos pontos centrais) com as médias obtidas no tempo de 15 minutos em ultrassom (Figura 35). O solvente utilizado para esta comparação foi a acetona, já que o mesmo mostrou-se mais eficiente em ambos os ensaios.

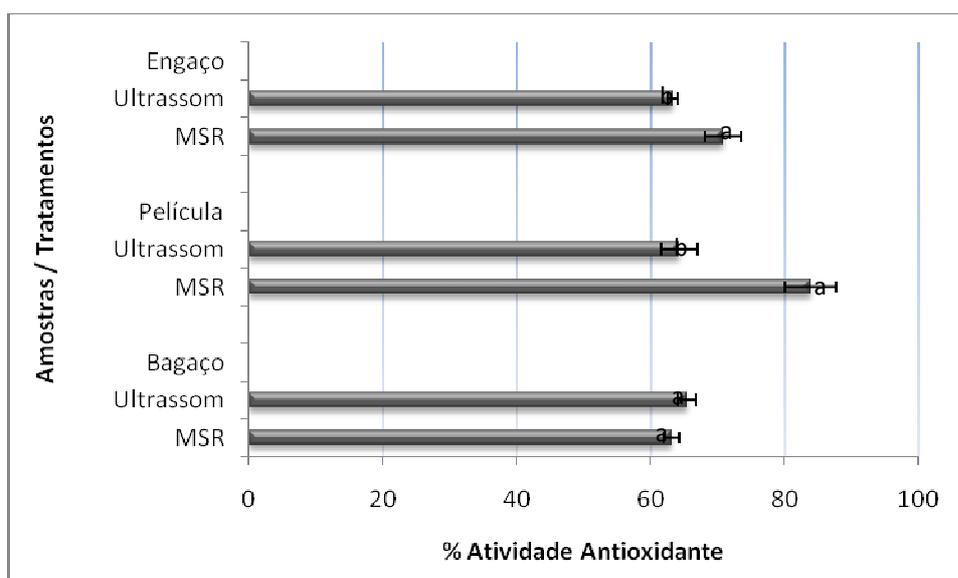


Figura 35 - Porcentagem de atividade antioxidante obtida para os subprodutos, comparando os resultados obtidos na extração em ultrassom e a extração em banho termostaticado (Metodologia de Superfície de Resposta – MSR)

De acordo com os resultados apresentados na Figura 35, foi possível concluir que a extração dos subprodutos possui maior eficiência quando realizada em banho termostaticado utilizando temperatura. A técnica de ultrassom apesar de também extrair compostos antioxidantes, não possui a mesma eficiência que o banho, com exceção para o bagaço.

Vários estudos têm mostrado que os passos no processamento, como o tratamento de aquecimento, podem liberar compostos fenólicos de fontes residuais, rendendo assim um

maior conteúdo de compostos bioativos. O tratamento de aquecimento já foi relatado como sendo efetivo para aumentar o conteúdo de fenólicos totais em cascas de amendoim (LEE et al., 2006), película de citrus (JEONG et al. 2004) e extratos de sementes de uva (KIM et al., 2006).

Os resultados deste trabalho corroboram com os resultados de trabalhos da literatura, pois as maiores atividades de sequestro do radical DPPH foram obtidas quando a temperatura foi utilizada. Isto provavelmente se deve a maior liberação de compostos fenólicos da matriz onde o solvente interage.

Para o estudo de fracionamento e isolamento de compostos bioativos, optou-se pelo subproduto película de amendoim, pois foi o subproduto que apresentou o maior teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH (Tabelas 3 e 5).

3.4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostram que as condições de extração empregadas para os subprodutos agroindustriais bagaço e engaço de uva e película de amendoim influenciam grandemente no teor de compostos bioativos;

A utilização de extratos acidificados a pH 1,5 aumenta a extração de compostos fenólicos e compostos com atividade antioxidante;

A elevada correlação obtida no modelo polinomial de segunda ordem para o bagaço de uva permitiu selecionar a melhor condição de extração de compostos com atividade antioxidante, que foi obtida com o sistema solvente acetona: água 60:40, com uma temperatura de 70° C, por um período de 30 minutos;

A extração dos subprodutos agroindustriais em banho termostaticado com sistema solvente acetona:água 60:40, por 30 minutos a 70° C, foi mais eficiente quando comparado a extração em banho ultrassom utilizando o mesmo solvente sob temperatura ambiente.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, S. M. **Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil**. 2002. 120 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 113, p. 278-283, 2007.
- AMIN, I.; MUKHRIZAH, O. Antioxidant capacity of methanolic and water extracts prepared from food-processing by-products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 86, p. 778–784, 2006.
- ANASTASIADI, M.; PRATSINIS, H.; KLETSAS, D.; SKALTSOUNIS, A. L.; HAROUTOUNIAN, S. A. Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. **Food Research International**, Essex, v. 43, p. 805–813, 2010.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. Critical Review. **Analyst**, London, v. 125, p. 989-1009, 2000.
- APPELDOORN, M. M.; SANDERS, M.; VINCKEN, J. P.; CHEYNIER, V.; GUERNEVÉ, C. L.; HOLLMAN, P. C. H.; GRUPPEN, H. Efficient isolation of major procyanidin A-type dimers from peanut skins and B-type dimers from grape seeds. **Food Chemistry**, Barking, v. 117, p. 713–720, 2009.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence and potencial uses. **Food Chemistry**, Barking, v. 99, p. 191 – 203, 2006.
- BALLARD, T.S.; MALLIKARJUNAN, P.; ZHOU, K.; O’KEEFE, S.F. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from peanut skins. **Food Chemistry**, Barking, v. 120, p. 1185-1192, 2010.
- BALLARD, T. S.; MALLIKARJUNAN, P.; ZHOU, K.; O’KEEFE, S. F. Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from peanut skins using response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 3064-3072, 2009.
- BAUBLIS, A. DECKER, E. A.; CLYDESDALE, F. M. Antioxidant effect of aqueous extracts from wheat based ready to eat breakfast cereals. **Food Chemistry**, Barking, v. 68, p. 1-6, 2000.
- BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F. R.; ORTUNO, A.; DEL RIO, J. A. Uses and properties of citrus flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, p. 4505–4515, 1997.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BRAND, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, London, v. 432, p. 829-837, 2004.

DEL VALLE, M.; CAMARA, M.; TORIJA, M.E. The nutritional and functional potential of tomato by-products. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 758, p. 165-172, 2007. Proceedings of the 10th International Symposium on the Processing Tomato, 2007.

FRANCISCO, M. L. D.; RESURRECCION, A. V. A. Development of a reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) procedure for the simultaneous determination of phenolic compounds in peanut skin extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 119, p. 356-363, 2009.

FREIMUND, S.; SAUTER, M.; KAPPELI, O.; DUTLER, H. A new non-degrading isolation process for 1,3- β -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 54, p. 159-171, 2003.

GOKTURK BAYDAR, N.; ÖZKAN, G.; SAGDIÇ, O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. **Food Control**, Guildford, v. 15, n. 5, p. 335-339, 2004.

GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M.; ESTEBAN-RUANO, S.; SANTOS-BUELGA, C.; PASCUAL-TERESA, S.; RIVAS-GONZALO, J. C. Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 234-238, 2004.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, New York, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SELVI, T.; SAKARIAH, K. K. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **Food Research International**, Essex, v. 36, n. 2, p. 117-122, 2003.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. **Food Chemistry**, Barking, 73, p. 285-290, 2001.

KARVELA, E.; MAKRIS, D. P.; KALOGEROPOULOS, N.; KARATHANOS, V. T.; KEFALAS, P. Factorial design optimisation of grape (*Vitis vinifera*) seed polyphenol extraction. **European Food Research Technology**, Heidelberg, v. 229, n. 5, p. 731-742, 2009.

KUKIC, J.; POPOVIC, V.; PETROVIC, S.; MUCAJI, P.; CIRIC, A.; STOJKOVIC, D.; SOKOVIC, M. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 107, p. 861-868, 2008.

LAFKA, T. I.; SINANOGLU, V.; LAZOS, E. S. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. **Food Chemistry**, Barking, v. 104, p. 1206-1214, 2007.

LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**, Barking, v. 93, p. 47-56, 2005.

LÓPEZ-ALARCON, C.; LISSI, E. A novel and simple ORAC methodology based on the interaction of Pyrogallol Red with peroxy radicals. **Free Radical Research**, London, v. 40, n. 9, p. 979-985, 2006.

LOU, H.; YUAN, H.; MA, B.; REN, D.; JI, M.; OKA, S. Polyphenols from peanut skins and their free radical-scavenging effects. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, p. 2391-2399, 2004.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. Berlin: Springer-Verlag, 1970. 354 p.

MAKRIS, D.P.; BOSKOU, G.; ANDRIKOPOULOS, N.K. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, p. 125-132, 2007.

MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RE'ME'SY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 81, p. 230S-242S, 2005.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 52, p. 673-751, 2000.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, Barking, v. 72, p. 145-171, 2001.

MURCIA, M. A.; JIMÉNEZ, A. M.; MATÍNEZ-TOMÉ. Evaluation of the antioxidant properties of mediterranean and tropical fruits compared with common food additives. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 64, n. 12, p. 2037-2046, 2001.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Report**, London, v. 17, p. 215-234, 2000.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; HOLBECK, S.; SAUSVILLE, E. A. Natural products and derivatives as leads to cell cycle pathway targets in cancer chemotherapy. **Current Cancer Drug Targets**, Heidelberg, v. 2, p. 279-308, 2002.

ÖZKAN, G.; SAGDIÇ, O.; BAYDAR, N. G.; KURUMAHMUTOGLU, Z. Antibacterial activities and total phenolic contents of grape pomace extracts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, p. 1807-1811, 2004.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, p. 494–507, 2001.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades *Tannat e Ancelota*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 238-244, 2008.

RUBILAR, M.; PINELO, M.; SHENE, C.; SINEIRO, J.; NUNEZ, M. J. Separation and HPLC-MS identification of phenolic antioxidants from agricultural residues: almond hulls and grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 10101–10109, 2007.

SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V. C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S. M. Chemical composition and botanical origin of red própolis, a new type of Brazilian própolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, July 2007. doi:10.1093/ecam/nem059.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, San Diego, 299, p. 152-178, 1999.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, p. 205-218, 2003.

TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. Chemical constituents of *Luehea divaricata* Mart (Tiliaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 28, p. 834–837, 2005.

THOMPSON, D. R. Response surface experimentation. **Journal of Food Processing and Preservation**, Westport, v. 6, n. 3, p. 155-188, 1982.

WEIJL, N. I.; CLETON, F. J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treatment Reviews**, London, v. 23, n. 4, p. 209-240, 1997.

WENG, X. C.; WANG, W. Antioxidant activity of compounds isolated from *Salvia plebeia*. **Food Chemistry**, Barking, v. 71, p. 489-493, 2000.

YU, J.; AHMEDNA, M.; GOKTEPE, I. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. **Food Chemistry**, Barking, v. 90, p. 199–206, 2005.

4. ISOLAMENTO BIOGUIADO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DE PELÍCULA DE AMENDOIM

RESUMO

A película de amendoim é um subproduto que possui grande quantidade de compostos fenólicos, os quais são responsáveis por várias atividades biológicas, como atividade antioxidante, por exemplo. Existem poucos estudos na literatura que demonstram a atividade antioxidante da película de amendoim e em nenhum deles foi feito o isolamento bioguiado dos compostos responsáveis por esta atividade. Este trabalho teve como objetivos realizar o fracionamento e o isolamento bioguiado de compostos com atividade antioxidante da película de amendoim utilizando técnicas cromatográficas. O extrato bruto da película de amendoim foi primeiramente purificado utilizando resina Amberlite XAD2, originando as frações metanólica (Fr-Met) e aquosa (Fr-Aqu). Após a avaliação da atividade antioxidante das frações pela técnica de sequestro dos radicais DPPH e ABTS e a determinação do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a Fr-Met, a fração mais bioativa, foi recromatografada em coluna gel Sephadex LH-20, gerando 123 subfrações, as quais foram reagrupadas, após análise de cromatografia em camada delgada (CCD), em 18 subfrações. Essas subfrações foram avaliadas quanto à atividade antioxidante e, por apresentar elevada atividade antioxidante, a subfração 10 foi submetida ao isolamento dos compostos pela técnica de CLAE semipreparativa. Dois compostos foram isolados e denominados composto 1 e composto 2. O composto 1 foi o mais potente, apresentando capacidade de sequestro do radical DPPH, em termos de IC_{50} , de $18,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e redução do Fe^{3+} de $7,59 \text{ mmol Fe}^{2+}\cdot\text{g}^{-1}$, valores maiores do que os do antioxidante sintético BHT. Os resultados de atividade antioxidante avaliada pelo método ABTS mostraram que o composto 1 ($6,54 \text{ mmol TEAC}\cdot\text{g}^{-1}$) possui atividade próxima a padrões naturais com reconhecida atividade, como quercetina e catequina. Por meio da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN), foi possível identificar o composto 1 como epicatequina-($2\beta\rightarrow\text{O}\rightarrow7$, $4\beta\rightarrow6$)-[epicatequina-($4\beta\rightarrow8$)]-catequina e o composto 2 como epicatequina-($2\beta\rightarrow\text{O}\rightarrow7$, $4\beta\rightarrow8$)-[epicatequina-($4\beta\rightarrow8$)]-catequina-($4\alpha\rightarrow8$)-epicatequina, ambos pertencentes à classe das proantocianidinas. A forte atividade antioxidante apresentada pelos compostos isolados da película de amendoim torna este subproduto uma importante fonte de compostos bioativos naturais com potencial aplicação na indústria de alimentos.

Palavras-chave: isolamento bioguiado; película de amendoim; atividade antioxidante; cromatografia semipreparativa.

ABSTRACT

Peanut skin is a by-product presenting high content of phenolic compounds, responsible for several biological activities, such as antioxidant activity, for instance. Few studies are found in the literature that demonstrate antioxidant activity of peanut skin and in none of them bioguided isolation of the compounds responsible for this activity was performed. The goals of this study were to carry out bioguided fractionation and isolation of the compounds responsible for antioxidant activity in peanut skin using chromatographic techniques. Peanut skin crude extract was initially purified using Amberlite XAD2 resin, generating methanol (Met-Fr) and aqueous fractions (Aqu-Fr). After evaluating the antioxidant activity of these fractions using the DPPH and ABTS radical-scavenging methods, as well as determining their chemical profile by high performance liquid chromatography (HPLC), Met-Fr, which presented the highest bioactivity, was rechromatographed on a Sephadex LH-20 gel column, generating 123 subfractions, which were regrouped, after thin-layer chromatography (TLC), into 18 subfractions. These subfractions were assessed as to their antioxidant activity and subfraction 10 underwent isolation of compounds using the semipreparative HPLC technique. Two compounds were isolated and named compound 1 and compound 2. Compound 1 was the most potent, presenting DPPH radical-scavenging activity, in terms of IC_{50} , of $18.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and Fe^{3+} reduction of $7.59 \text{ mmol Fe}^{2+}\cdot\text{g}^{-1}$, values that are higher than the synthetic antioxidant BHT. The results of antioxidant activity evaluated by the ABTS radical-scavenging method showed that compound 1 ($6.54 \text{ mmol TEAC}\cdot\text{g}^{-1}$) has activity similar to natural standards with known activity, such as quercetin and catechin. Using the nuclear magnetic resonance (NMR) technique we identified compound 1 as epicatechin-($2\beta\rightarrow\text{O}\rightarrow7$, $4\beta\rightarrow6$)-[epicatechin-($4\beta\rightarrow8$)]-catechin and compound 2 as epicatechin-($2\beta\rightarrow\text{O}\rightarrow7$, $4\beta\rightarrow8$)-[epicatechin-($4\beta\rightarrow8$)]-catechin-($4\alpha\rightarrow8$)-epicatechin, both belonging to the proanthocyanidin class. The strong antioxidant activity presented by the compounds isolated from peanut skin show that this by-product is an important source of natural bioactive compounds with potential use in food industries.

Key words: bioguided isolation; peanut skin; antioxidant activity; semipreparative HPLC chromatography.

4.1 INTRODUÇÃO

O amendoim possui grande atrativo como alimento e excelentes propriedades nutricionais. O estado de São Paulo é o maior produtor nacional desta oleaginosa, tendo como um dos maiores pólos consumidores a região Nordeste que possui uma produção regional de 10.000 toneladas/ano, insuficiente para atender os principais mercados de consumo como a Bahia, Sergipe, Ceará, Pernambuco e Paraíba (SANTOS; GONDIM; FREIRE, 2006).

Estima-se que para uma produção de amendoim de 29,1 milhões de toneladas (safra mundial 1999/2000), a média do conteúdo de película gerada seja de 2,6%, o que corresponde a 750 mil toneladas. O valor comercial da película é de aproximadamente US\$ 12-20 por tonelada, o que a torna um subproduto de baixo valor (SOBOLEV, COLE, 2004).

A literatura tem demonstrado muitos benefícios a saúde associados ao consumo de amendoim, incluindo proteção contra doenças cardiovasculares (FELDMAN, 1999), proteção contra doença de Alzheimer (Peanut-Institute, 2002) e inibição do câncer (AWAD et al., 2000). Estes benefícios estão relacionados principalmente ao fato de que amendoins não contêm ácidos graxos *trans* (SANDERS; McMICHAEL, HENDRIX, 2001), enquanto apresenta elevados teores de ácidos graxos mono e poliinsaturados (KRIS-ETHERTON et al., 1999), micronutrientes como vitamina E, folato, minerais (potássio, magnésio e zinco), fibras e fitoquímicos, especialmente resveratrol (SANDERS; McMICHAEL, HENDRIX, 2001; SOBOLEV; COLE, 1999), dentre outros compostos fenólicos.

As partes comestíveis consistem da semente e película. A película apresenta uma coloração marrom, sabor adstringente e é normalmente removida antes do consumo. A técnica mais utilizada no processo de remoção da película do amendoim é a de blanchamento, onde o amendoim com película é submetido ao aumento de temperatura, o que provoca a expansão do grão. Em seguida, é submetido à diminuição de temperatura com ar frio, levando à contração. A película se solta do endosperma (grão) e, na etapa seguinte, é retirada por abrasão (lixamento). Todas as etapas são realizadas sem contato manual (MARTINS, 2006).

A película de amendoim é rica em compostos fenólicos e outros compostos promotores da saúde. Compostos fenólicos são reconhecidos como antioxidantes naturais e tem sido muito estudados por apresentarem uma ampla faixa de propriedades biológicas, como atividade anti-alérgica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, antitrombótica, cardioprotetor e efeitos vasodilatadores (BENAVENTE-GARCIA et al., 1997;

MANACH; MAZUR; SCALBERT, 2005; MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; PUUPPONEN-PIMIA et al., 2001).

Nepote, Grosso e Guzman (2002) verificaram que a película de amendoim contem aproximadamente 150 mg de fenólicos totais por grama de película seca e desengordurada. Seis procianidinas do tipo A foram identificadas por Lou et al. (1999). A película de amendoim apresenta até 17% de procianidinas, monômeros, dímeros, trímeros, tetrâmeros; proantocianidinas oligoméricas, sendo que também já foram identificados flavonoides e ácidos fenólicos (YU; AHMEDNA; GOKTEPE, 2005; 2006; NEPOTE; GROSSO; GUZMAN, 2005; O'KEEFE; WANG, 2006; LOU et al., 2004; BALLARD et al., 2009; 2010).

Estes poucos estudos mostram que a película de amendoim é uma fonte de baixo custo e potencialmente rica em ingredientes funcionais e com atividades biológicas como os compostos fenólicos.

O objetivo deste estudo foi realizar isolar bioguiadamente compostos com atividade antioxidante da película de amendoim por meio técnicas cromatográficas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Coleta das amostras

A amostra de película de amendoim foi fornecida pela CAP Agroindustrial (Dumont – SP) no primeiro semestre de 2010, sendo produzida pelo de blanchamento. Neste processo a película é separada do endosperma (grão) por aumento de temperatura, o que promove a expansão do grão. Na sequência, diminui-se a temperatura com ar frio, ocorrendo à contração, e a película se solta do endosperma com auxílio de um processo de abrasão (lixamento)

4.2.2 Preparo do extrato bruto da película de amendoim (EB)

O extrato bruto da película de amendoim foi preparado com o emprego da mistura de solventes acetona:água (60:40 v/v). Inicialmente pesou-se 20 gramas do subproduto liofilizado e moído e, então, adicionou-se 200 mL de solvente. Em seguida, o extrato foi acidificado com HCl 0,1M até pH 1,5. Após isto, a extração foi conduzida em banho

termostatizado a 70°C, por 30 minutos. Decorrido o tempo, o extrato foi centrifugado a 5000 x g por 15 minutos, filtrado e concentrado em rotaevaporador a 36°C até evaporação completa da acetona. Na sequência, a amostra foi liofilizada para remoção da água e o concentrado sólido, utilizado para a purificação e análises subsequentes.

4.2.3 Purificação do EB em resina Amberlite XAD 2

Para a remoção de interferentes químicos da amostra, quatro gramas do material liofilizado, obtido conforme item 2.2, foram pesados e diluídos em metanol / água (5:65 v/v), acidificados a pH 2 e misturados com 30g de resina Amberlite XAD2 (Supelco, Bellefonte, PA – poros de 9 nm e partícula de 0,3-1,2mm). Na sequência, o extrato junto com a resina foi homogeneizado durante 10 minutos, e em seguida, a mistura empacotada em uma coluna de vidro (25 x 2 cm).

A coluna foi eluída com 100 mL de água ácida pH 2, 300 mL de água destilada pH 7, e em seguida, com 300 mL de metanol (Alencar, 2002). O metanol recolhido foi evaporado sob baixa pressão a temperatura de 36°C. A fração aquosa resultante foi congelada e em seguida liofilizada. Ambas as frações (metanólica e aquosa) foram testadas quanto a atividade antioxidante.

4.2.4 Fracionamento em gel Sephadex LH-20

O fracionamento da fração de maior atividade antioxidante foi realizado com o gel lipofílico Sephadex LH-20. Para a montagem da coluna, com base na metodologia descrita por Alencar (2002), foram pesados 7,0 g do gel, os quais foram misturados com metanol. A mistura foi então colocada em uma coluna de vidro e o empacotamento feito apenas com a força da gravidade. A coluna preenchida com o gel possuía 30 cm de altura por 1,5 cm de diâmetro.

A fração metanólica (Fr-Met), obtida pela purificação em resina Amberlite XAD2, foi utilizada para o preparo de uma solução onde foram dissolvidos 150 mg em 2 mL de metanol. Na sequência, a solução foi aplicada no topo da coluna de gel Sephadex LH-20, e, após a total penetração da amostra no gel, foi realizada a eluição com metanol. A vazão da coluna foi de 53 gotas por minuto e as frações foram retiradas a cada 1 minuto, por meio de um coletor

automático de frações. As subfrações obtidas foram avaliadas por cromatografia em camada delgada, onde foram utilizados como reveladores soluções de anisaldeído sulfúrico e DPPH. A atividade antioxidante das subfrações foi bioguiada pelos métodos de DPPH e ABTS.

4.2.5 Isolamento e identificação dos compostos bioativos

As subfrações provenientes da etapa 5.3.4 que apresentaram maior potencial antioxidante foram recromatografadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência preparativo, utilizando uma coluna semipreparativa Agilent PREP-ODS (H) (250 x 20 mm). A fase móvel utilizada foi água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), com vazão constante de 6 mL/min. O gradiente iniciou com 20% do solvente B até 30% de B em 30 minutos, 55% de B em 35 minutos e 20% de B em 40 minutos. A coluna foi mantida a uma temperatura constante de 30°C. Os picos dos compostos eluídos foram recolhidos em um coletor de frações acoplado ao sistema de cromatografia líquida e, então, testados quanto a atividade antioxidante pelos métodos do DPPH, FRAP e ABTS. Também foram analisados pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), para elucidação das estruturas químicas.

4.2.6 Análises físico-químicas do extrato bruto da película de amendoim (EB), frações, subfrações e compostos isolados

4.2.6.1 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível

A determinação do espectro de absorção foi realizada segundo o método descrito por Silva *et al.* (2007). Os espectros de absorção na região UV-visível foram determinados na faixa de comprimento de onda de 200 a 600 nm.

4.2.6.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises de cromatografia em camada delgada do EB, frações, subfrações e compostos isolados foram realizadas em cromatofolhas de sílica gel 60 F254 (Merck Co.), conforme descrito por Alencar *et al.* (2007). Alíquotas de 40 µL foram aplicadas na placa. O

tempo de desenvolvimento dos cromatogramas foi de aproximadamente 30 minutos, utilizando como fase móvel o sistema solvente acetato de etila: clorofórmio:metanol:água:ácido acético (85:15:4:1, v/v). As cromatoplasmas foram visualizadas sob luz ultravioleta, nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, antes e após a revelação com anisaldeído sulfúrico com aquecimento a 100°C por 5 minutos (TANAKA et al., 2005).

4.2.6.3 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)

As análises por CLAE em fase reversa do EB, frações, subfrações e compostos isolados bioativos foram feitas de acordo com o método descrito por Francisco e Resurreccion (2009), com algumas modificações. Vinte microlitros de cada amostra foram injetados em um cromatógrafo líquido acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos e uma coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm), com tamanho de partícula de 5 µm. A fase móvel utilizada foi água / ácido fórmico (0,1%, v/v) (solvente A) e acetonitrila / ácido fórmico (0,1% v/v) (solvente B), com vazão constante de 1 mL/min. O gradiente iniciou com 5% do solvente B até 7% de B em 7 minutos, 17% de B em 75 minutos, 45% de B em 110 minutos, 70% de B em 117 minutos, 100% de B em 124 minutos e 5% de B em 129 minutos. A coluna foi mantida a uma temperatura constante de 28 °C e os cromatogramas foram processados utilizando “*software*” específico. Os compostos foram identificados pelo espectro de absorção na região ultravioleta, utilizando os recursos do detector de arranjo de fotodiodos, pela comparação do tempo de retenção e cocromatografia de padrões. Neste trabalho, foram utilizados padrões autênticos de ácido gálico, epigallocatequina, catequina, epicatequina, epigallocatequina galato, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, resveratrol, procianidina B1 e procianidina B2.

4.2.6.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)²

Para as análises de RMN os compostos bioativos isolados foram secos em rotaevaporador para remoção completa do solvente e, então, redissolvidos em CD₃OD. Os

² Esta análise foi feita em parceria com a USP de Ribeirão Preto.

espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em um espectrômetro a 500 e 100 MHz, respectivamente. Como padrão interno será utilizado tetrametilsilano (TMS) (FREIMUND et al., 2003).

4.2.7 Avaliação da atividade antioxidante

4.2.7.1 Atividade sequestrante do radical DPPH

4.2.7.1.1 Porcentagem de atividade antioxidante

A medida da capacidade sequestrante pelo método DPPH baseia-se no princípio de que o DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil), sendo um radical estável de coloração violeta, aceita um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula estável, sendo reduzido na presença de um antioxidante e adquirindo coloração amarela. Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 517nm, que desaparece à medida que ele vai sendo reduzido por um elétron doado por um composto antioxidante (BRANDWILLIANS, CUVELIER, BERSET, 1995). A reação foi realizada em microplacas com 96 poços. A mistura de reação foi constituída pela adição de 50 μL do EB, frações, subfrações ou compostos isolados com 170 μL do radical DPPH em solução de etanol 60 μM e incubada por 45 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A atividade antirradical foi determinada na forma de Atividade Antioxidante (AA), pela equação:

$$AA(\%) = 100 - \left(\frac{((Aa - Ab) \times 100)}{Ac} \right) \quad (1)$$

Onde:

Aa = absorbância da amostra

Ab = absorbância do branco

Ac = absorbância do controle negativo

O controle negativo foi feito substituindo-se o volume do extrato por igual volume do solvente utilizado na extração. O branco foi preparado substituindo o volume da solução de DPPH por igual volume de solvente.

4.2.7.1.2 Valor EC₅₀

O EC₅₀ foi considerado como a concentração mínima necessária para o extrato, frações e compostos isolados reduzirem em 50% o radical DPPH inicial da reação. Os valores do EC₅₀ (µg/mL) foram calculados por regressão linear dos gráficos em que o eixo das abscissas representou a concentração dos extratos e o eixo das ordenadas a atividade antioxidante (%) calculada segundo a equação descrita no item 2.7.1.

4.2.7.1.3 Atividade antioxidante pelo método ABTS

A atividade antioxidante pelo método ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi feita conforme metodologia descrita por Re et al., (2007). O radical ABTS^{•+} foi formado pela reação de ABTS 7mM com persulfato de potássio 14 0mM, incubados à temperatura de 25 °C e no escuro, durante 12 - 16h. Uma vez formado, o radical foi diluído com etanol até a obtenção do valor de absorvância de $0,700 \pm 0,200$ a 734nm. Em ambiente escuro, um volume de 3,0 mL da solução de radical ABTS^{•+} foi acrescentado a 30µL de cada diluição dos extratos e as absorvâncias lidas após seis minutos em espectrofotômetro a 734 nm, utilizando etanol P.A. como branco. Foi utilizado como referência o Trolox, um antioxidante sintético análogo à vitamina E, nas concentrações de 100 - 2000µM. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em µM trolox/g de resíduo.

4.2.7.1.4 Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro - FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Para a determinação da atividade antioxidante, por meio da redução do ferro (FRAP), foi utilizada a metodologia descrita por Kukic et al. (2008), com algumas modificações. Este método se baseia na medida direta da habilidade dos antioxidantes (redutores) da amostra em reduzirem, em meio ácido (pH 3,6), o complexo Fe³⁺ /tripiridiltriazina (TPTZ), para formar Fe²⁺, de intensa cor azul e absorção máxima a 593 nm. O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, através da mistura de 25 ml de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5ml de solução TPTZ (10mM TPTZ em 40 mM HCl) e 2,5ml de FeCl₃ (20mM) em solução

aquosa. Uma alíquota de 100 µl de extrato foi adicionado a 3 ml do reagente FRAP e incubado a 37°C em banho-maria por 30 minutos. As absorbâncias foram medidas após esse tempo e o espectrofotômetro foi zerado com a solução FRAP. A curva de calibração foi feita com sulfato ferroso (100-2000µM), e os resultados foram expressos em mmol Fe²⁺/g amostra (liofilizada).

4.2.8 Análise Estatística

O delineamento experimental para todos os ensaios foi o inteiramente casualizado. Os dados foram analisados pelo programa SAS para a determinação da análise de variância. A separação entre as médias foi realizada feita usando o teste de Tukey com um nível de confiança de 95%.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Tratamento e processamento da película de amendoim

A amostra de película de amendoim foi fornecida por uma empresa processadora do estado de São Paulo, localizada em Dumont no estado de São Paulo. Após chegarem no laboratório, as amostras foram pesadas, congeladas, e armazenadas à -18°C. O processo de liofilização foi utilizado com o objetivo de conservar a amostra, pois neste processo a água é removida do material congelado por sublimação do gelo, o que resulta em produtos desidratados de alta qualidade (conservação de nutrientes como as vitaminas), devido à baixa temperatura utilizada no processo (RATTI, 2001). A Figura 36 ilustra o aspecto da película de amendoim antes de ser triturada para realização das análises.



Figura 36 - Aspecto da película de amendoim antes de ser triturada

Após a liofilização foi obtido um rendimento de 92%. É provável que o processamento interfira no teor natural de água do produto final, já que a película passa pelo processo de blanchamento. Neste processo, utiliza-se uma temperatura que varia de 94°C (DIDZBALIS et al., 2004) a 175°C (YU et al., 2005), com um tempo de 5 min (YU et al., 2005) a 25 min (WOODROOF, 1983). Além disto, outras alterações são observadas, como o aumento da coloração marrom do produto, devido a reações entre aminoácidos e açúcares, com concomitante produção de melaninas (SOBOLEV; COLE, 2004). Alguns produtos da reação de Maillard, especialmente as melanoidinas, apresentam atividade antioxidante pelo sequestro de radicais ou quelação de metais (YILMAZ; TOLEDO, 2006). Além das melanoidinas, compostos antioxidantes de baixo peso molecular podem ser liberados a partir de polímeros de alto peso molecular e outros componentes da parede celular (JEONG et al., 2004).

4.3.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta-visível

Foi possível observar que o extrato bruto (EB) apresentou apenas um pico de absorção máxima em 280 nm (Figura 37). Os compostos fenólicos, de modo geral, apresentam o pico de absorção da luz ultravioleta na faixa de 250 e 350 nm (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). Segundo estes autores, a classe de flavonóides absorve no comprimento de onda de 280 nm, e entre as subclasses, este é o comprimento de onda característico das catequinas e procianidinas, compostos que já foram relatadas na película de amendoim (LOU et al., 2004; APPELDOORN et al., 2009; ANASTASIADI et al., 2010)

Para a realização da varredura, os extratos foram diluídos na proporção de 1:200, a mesma concentração utilizada para na determinação da atividade antioxidante. Desta forma, apesar do extrato bruto apresentar coloração característica, após a diluição mostrou-se incolor, o que possibilitou uma análise segura por métodos colorimétricos, como no caso da determinação da atividade antioxidante pelo DPPH, ABTS, FRAP, que utilizam comprimentos de onda de 517, 734 e 593 nm, respectivamente.

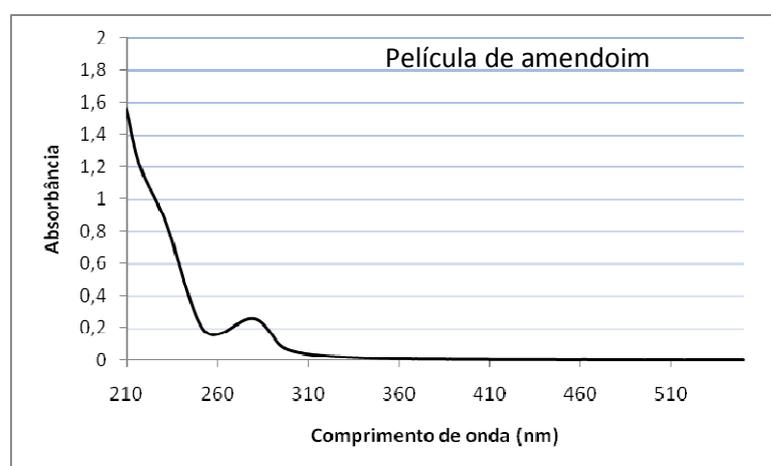


Figura 37 - Espectro de absorção na região UV-visível (200 – 600 nm) do extrato bruto da película de amendoim

Na sequência, o EB da película foi purificado com a resina XAD2 e, a fração de maior atividade antioxidante foi refractionada em coluna de Sephadex LH-20, gerando 123 subfrações. A subfração de maior atividade foi utilizada para o isolamento de compostos pela técnica de CLAE semipreparativa. O fluxograma do processo de fracionamento e isolamento, contendo o rendimento das frações, subfrações e compostos isolados, está ilustrado na Figura 38.

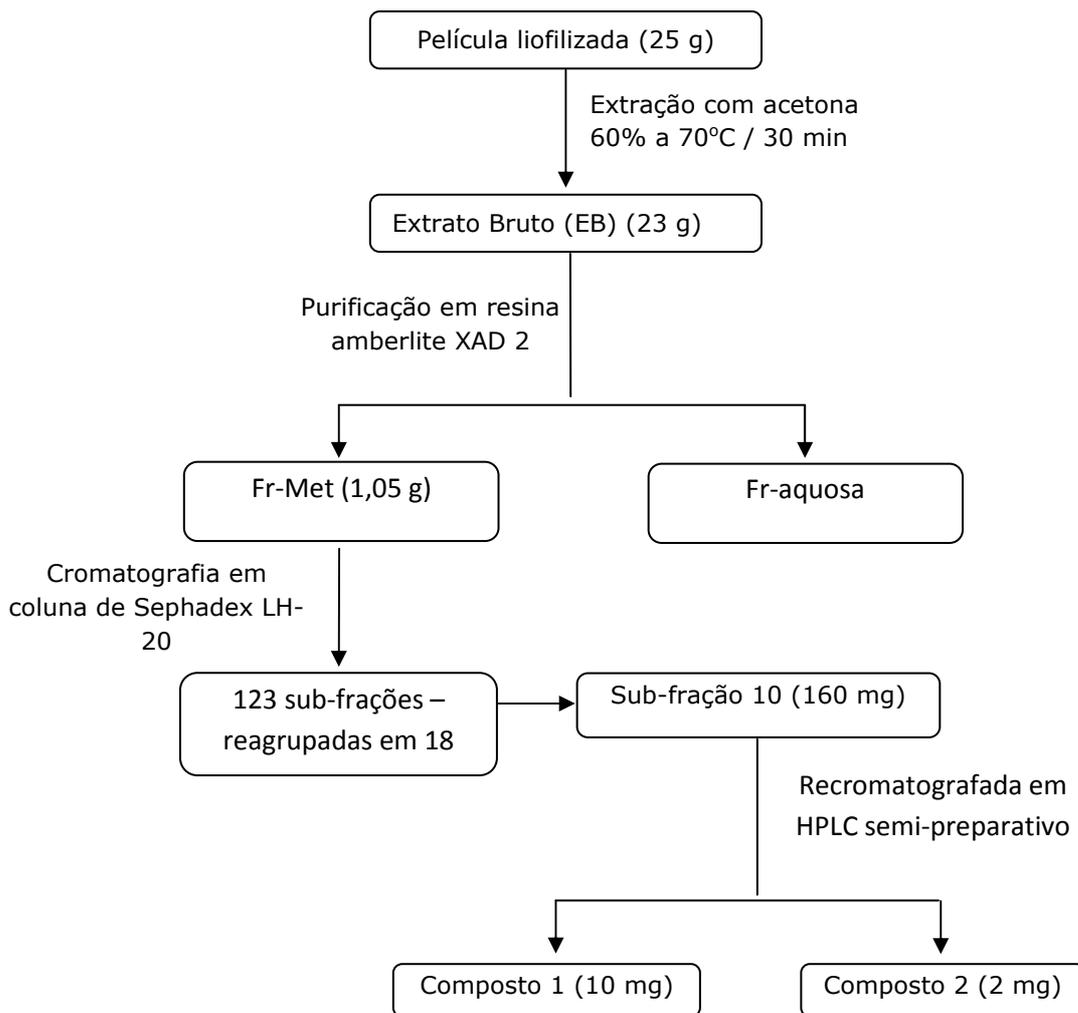


Figura 38 - Fluxograma do fracionamento e isolamento bioguiado de compostos com atividade antioxidante da película de amendoim.

4.3.3 Purificação em resina Amberlite XAD 2

A primeira etapa do processo de isolamento de compostos com atividade antioxidante foi a purificação com a resina Amberlite XAD 2. A aplicação do EB da película de amendoim, juntamente com a resina XAD 2 foi realizada em coluna de vidro (Figura 39A). Na sequência, foi feita a lavagem da coluna com água ácida e neutra, e, nesta etapa os compostos com menos afinidade pela resina, ou menos adsorvidos, são eluídos (Figura 39B). No processo de adsorção, a porção hidrofóbica da molécula de adsorvato é preferencialmente adsorvida na superfície de poliestireno da resina, enquanto a porção hidrofílica permanece orientada na fase aquosa. Por fim, a eluição da fração concentrada em compostos bioativos foi realizada com metanol P.A., sendo que a seta amarela indica a intensa coloração do eluato (Figura 39C).

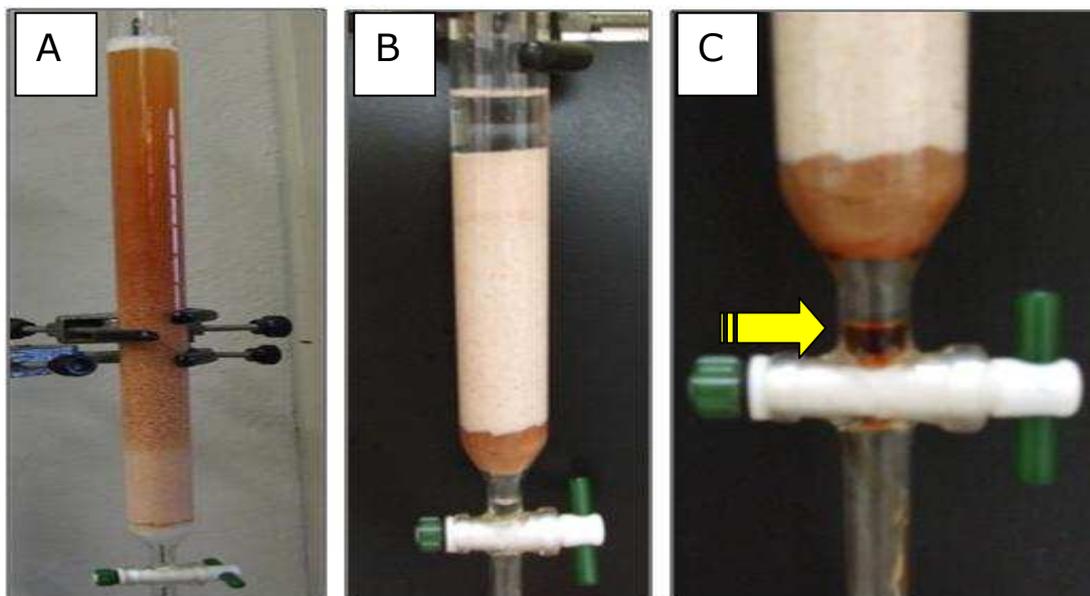


Figura 39 - Cromatografia por coluna de resina Amberlite XAD 2. A: momento de aplicação do extrato bruto da película de amendoim; B: lavagem da coluna com água ácida e neutra para retirada de compostos não adsorvidos; C: desenvolvimento da eluição com metanol.

As frações metanólica (Fr-Met) e aquosa (Fr-aquosa) recolhidas foram concentradas por rotaevaporção e liofilização, respectivamente. Na sequência foram avaliadas quanto à atividade antioxidante pelos métodos de sequestro dos radicais $ABTS^+$ e $DPPH\cdot$ (Figuras 40 e 41). Para a avaliação da atividade antioxidante as frações foram rediluídas na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$.

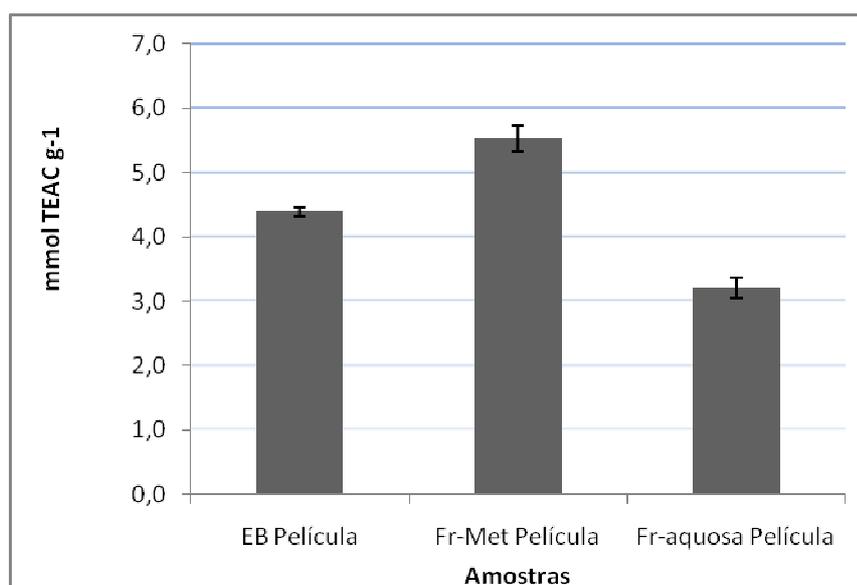


Figura 40 - Atividade antioxidante do extrato bruto (EB), fração metanólica (Fr-Met) e fração aquosa (Fr-aquosa) da película de amendoim avaliada pelo método de sequestro do radical $ABTS^+$.

Os resultados obtidos foram de 4,4; 5,5 e 3,2 mmol TEAC g⁻¹, para o EB, Fr-Met e Fr-aquosa, respectivamente. Estes valores são muito superiores aos encontrados por Francisco e Resurrecion (2009) que analisaram diferentes variedades de película de amendoim, avaliando o efeito da temperatura no teor de fenólicos e atividade antioxidante. Os valores de atividade antioxidante obtidos por esses autores variaram de 0,62 a 2,56 mmol TEAC g⁻¹.

As atividades obtidas no presente estudo também foram maiores que as encontradas por Yu et al. (2005), onde os valores de TEAC no extrato etanólico para película sem tratamento e película submetida a aquecimento foram de 4,10 e 3,70 mmol TEAC g⁻¹, respectivamente.

Os resultados obtidos para a porcentagem de sequestro do radical DPPH corroboram com os obtidos por Yu et al. (2006), que avaliaram a atividade antioxidante do extrato e fração purificada da película de amendoim submetida ao processo de blanchamento. Neste estudo os autores encontraram porcentagens de sequestro do radical DPPH de 46,5% e 96,4%, respectivamente, quando as amostras foram avaliadas na concentração de 120mM. Estes resultados demonstram que o processo de purificação da película de amendoim pode gerar frações com maior potencial do que o extrato bruto original.

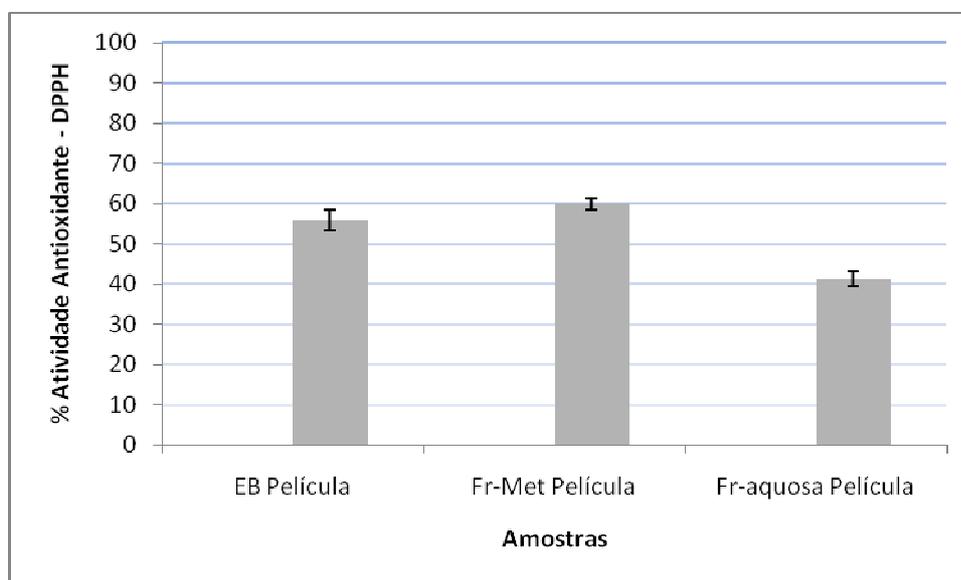


Figura 41 - Atividade antioxidante do extrato bruto (EB), fração metanólica (Fr-Met) e fração aquosa (Fr-aquosa) da película de amendoim avaliada pelo método de sequestro do radical livre DPPH. Os extratos foram avaliados na concentração de 50 µg/mL

Foi possível verificar que a Fr-Met apresentou as maiores atividades de sequestro para os radicais ABTS⁺ e DPPH[•], enquanto a Fr-aquosa apresentou a menor atividade (Figuras 40 e 41). Os resultados apresentados também indicam que o processo de purificação utilizando a

resina XAD 2 foi eficiente, pois resultou em um aumento da capacidade antioxidante na Fr-Met, quando comparada ao EB.

4.3.4 Perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência do EB, Fr-Met e Fr-aquosa

O extrato bruto (EB) e as frações (Fr-Met e Fr-aquosa) foram analisados pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (Figura 42), para comparação dos perfis químicos e avaliação da evolução do processo de fracionamento. Para a identificação dos compostos foram utilizados os padrões autênticos descritos na tabela 12, os quais foram identificados pelo tempo de retenção (TR), comprimento de onda característico (nm) das amostras, além de cocromatografia.

Tabela 12 - Padrões utilizados na identificação, tempos de retenção e comprimento de onda característico

Padrão	Tempo de retenção	Comprimento de onda máx (nm)
Ácido gálico	6,84	270
Procianidina B1	19,58	278
Epigallocatequina	23,90	269
Catequina	26,08	278
Procianidina B2	32,75	279
Epicatequina	40,69	278
Epigallocatequina galato	42,65	274
Ácido p-cumárico	46,23	309
Ácido ferúlico	55,80	323
Resveratrol	89,10	305/318

Os compostos ácido gálico, epigallocatequina galato, catequina, epicatequina e procianidina B2 foram identificados no extrato bruto EB e Fr-Met, enquanto na Fr-aquosa apenas o composto ácido gálico foi encontrado (Figura 42). Analisando o perfil cromatográfico obtido por CLAE, fica evidente que o processo de purificação, utilizando a

resina Amberlite XAD 2, concentrou os compostos bioativos na Fr-Met, o que está de acordo com as maiores porcentagens de sequestro dos radicais ABTS e DPPH (Figuras 40 e 41).

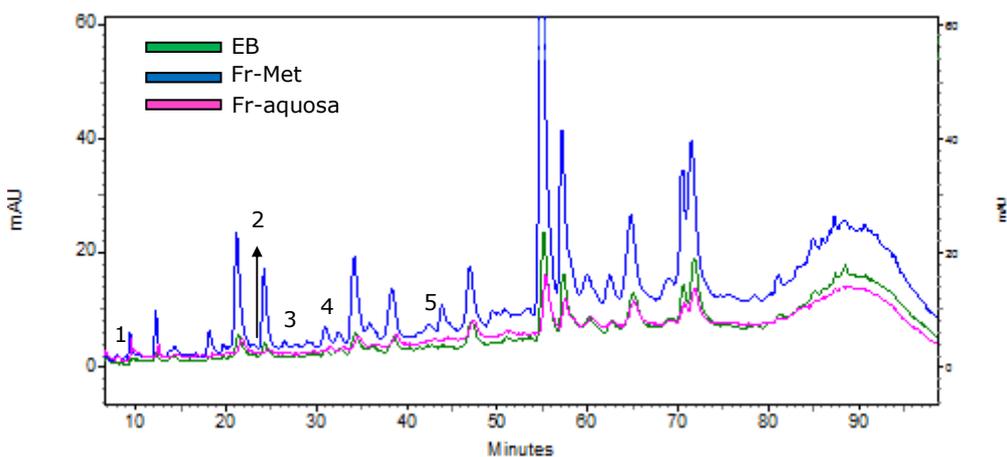


Figura 42 - Cromatograma obtido por CLAE do extrato bruto (EB), fração metanólica (FrMet) e fração aquosa (Fr-aquosa). EB e frações avaliadas na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Ácido gálico (1); Epigallocatequina (2); Catequina (3); Procianidina B2 (4); Epigallocatequina galato (5)

Francisco e Resurrecion (2009) avaliaram o perfil de compostos fenólicos na película de amendoim, com o mesmo método utilizado neste estudo. Estes autores verificaram a presença dos compostos epigallocatequina, catequina, epicatequina, resveratrol, ácido *p*-cumárico e quercetina, em três variedades de película de amendoim não submetidas ao processo de blanchamento. Portanto, a aplicação de calor do blanchamento talvez possa explicar a diferença do perfil fenólico obtido no presente estudo.

Yu, Ahmeda e Goktepe (2005) foram avaliadas os efeitos do processamento e solventes de extração na concentração de fenólicos e atividade antioxidante da película de amendoim. Nos extratos aquosos de película submetidos ao processo de blanchamento foram identificados o resveratrol e os ácidos fenólicos: ferúlico, cumárico, clorogênico e cafeico. Os extratos que foram submetidos à remoção da película com as mãos e aquecimento suave a 175⁰C apresentaram, além dos compostos mencionados, epicatequina, epigallocatequina, epicatequinacatequina galato, epicatequina galato e resveratrol. Portanto, fica evidente que o processo de blanchamento interfere na presença dos flavonoides, pois na amostras que receberam tal processo somente ácidos fenólicos e resveratrol foram identificados.

Os resultados obtidos no presente trabalho são diferentes, já que foram identificados os flavonoides catequina, epigallocatequina e epigallocatequina galato, indicando assim que o processamento térmico, temperatura e tempo de exposição ao calor, podem afetar a

composição química do produto final. Outro fator que pode interferir no perfil químico é a origem das amostras, bem como o solvente utilizado na extração dos compostos fenólicos.

Apesar do resveratrol já ter sido identificado em película de amendoim (YU; AHMEDA; GOKTEPE, 2005; FRANCISCO; RESURRECION, 2009), este composto não foi identificado nas amostras estudadas. Ballard et al. (2009) e Ballard et al. (2010) realizaram estudo de otimização da extração de compostos fenólicos e resveratrol em película de amendoim, utilizando a ferramenta superfície de resposta. No entanto, os extratos apresentaram teores de resveratrol bastante inferiores ao esperado, ao contrário do teor de fenólicos e atividade antioxidante que foram elevados. Isto demonstra que o resveratrol pode não ser o principal responsável pela atividade antioxidante neste subproduto.

Portanto, a realização de um estudo de isolamento bioguiado se torna muito importante para se chegar ao(s) verdadeiro (s) composto(s) responsável (éis) pela atividade biológica.

Pelo fato da Fr-Met apresentar alta atividade antioxidante e perfil cromatográfico com a presença de substâncias que absorvem na região dos compostos fenólicos, esta foi selecionada para o fracionamento pela técnica de cromatografia em coluna aberta em gel de Sephadex LH-20.

4.3.5 Fracionamento em coluna de gel SEPHADEX LH-20

Como segunda etapa do processo de isolamento dos componentes bioativos, a Fr-Met foi fracionada em coluna Sephadex LH-20. A Figura 43A ilustra o início da eluição da Fr-Met, na sequencia, compostos que apresentam fluorescência sob luz ultravioleta a 365 nm são evidenciados (Figuras 43B e 43C).

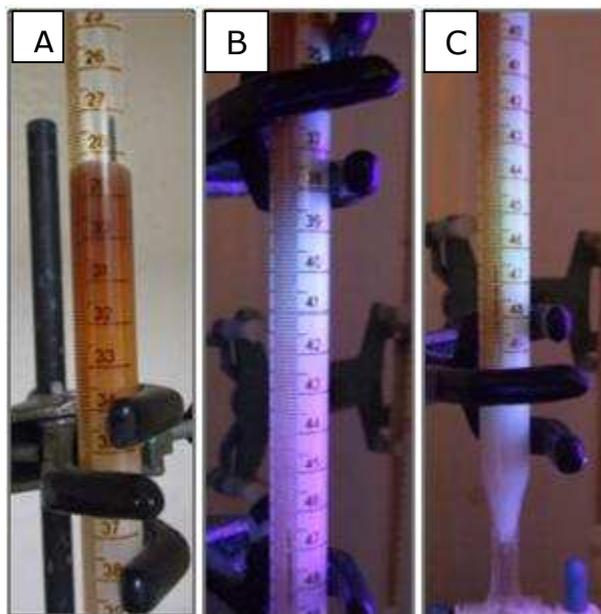


Figura 43 - Cromatografia em coluna aberta de Sephadex LH-20. Início da eluição (A); e desenvolvimento da coluna evidenciada pela fluorescência característica dos compostos (B) e (C).

A eluição da Fr-Met possibilitou a coleta de 123 subfrações, que na sequência foram submetidas a análise por CCD e revelação com anisaldeído sulfúrico (Figuras 44 a 47). Pode-se observar nos cromatogramas que o fracionamento possibilitou a separação de substâncias distintas, de acordo com as várias bandas eluídas em diferentes tempos. As subfrações semelhantes em função da coloração apresentada e R_f foram reagrupadas em 18 subfrações (Figuras 44 a 47). Essas subfrações foram utilizadas para os testes de atividade antioxidante e avaliação do perfil químico pela técnica de CLAE.

Nas primeiras subfrações foi possível observar bandas que apresentaram fluorescência quando irradiadas com luz ultravioleta a 365 nm (Figura 44A). A subfração 1 apresentou bandas inferiores, indicativas de compostos polares. Na subfração 5, observam-se bandas superiores com tonalidade amarela que se apresentaram mais intensas com o decorrer do fracionamento (Figura 44B). Na subfração 6, estas bandas aparecem com maior intensidade, até o momento em que desaparecem na subfração 7 (Figura 45 A).

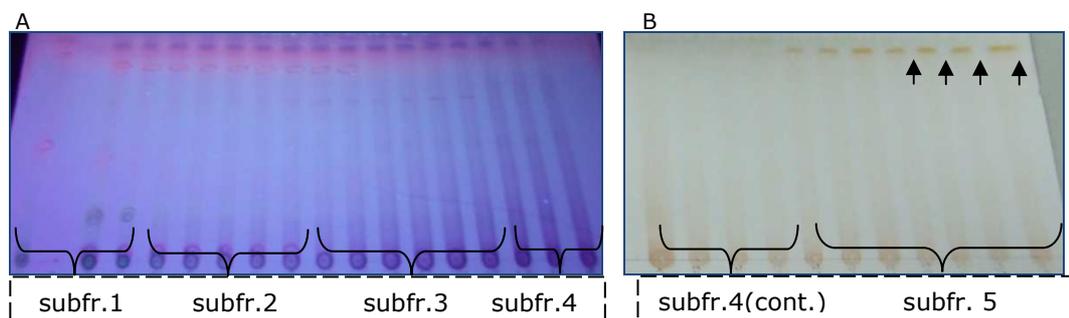


Figura 44 - Cromatografia em Camada Delgada das principais subfrações obtidas pela coluna de Sephadex LH-20 e respectivos reagrupamentos. (A) subfrações 1-4, reveladas com anisaldeído sulfúrico sob luz UV 365 nm; (B) subfrações 4 e 5 reveladas com anisaldeído sulfúrico sob luz ambiente

No trabalho realizado por Glavnik, Simonovska e Vovk (2009) foi otimizada a separação e revelação das classes de catequina e epicatequina pela utilização do reagente revelador 4-dimetilaminocinamaldeído. Entre as amostras estudadas, a película de amendoim, juntamente com padrões, apresentaram bandas características e similares às encontradas nas subfrações 5 e 6, o que indica que estas bandas podem representar estes compostos.

A partir da subfração 8, novas bandas marrons de grande intensidade puderam ser visualizadas (Figura 45 A). Nas subfrações 9, 10 e 11, estas bandas se intensificam, sendo possível observar o surgimento de uma nova banda um pouco inferior, menos intensa, que também apresenta coloração amarronzada (Figura 45 B).

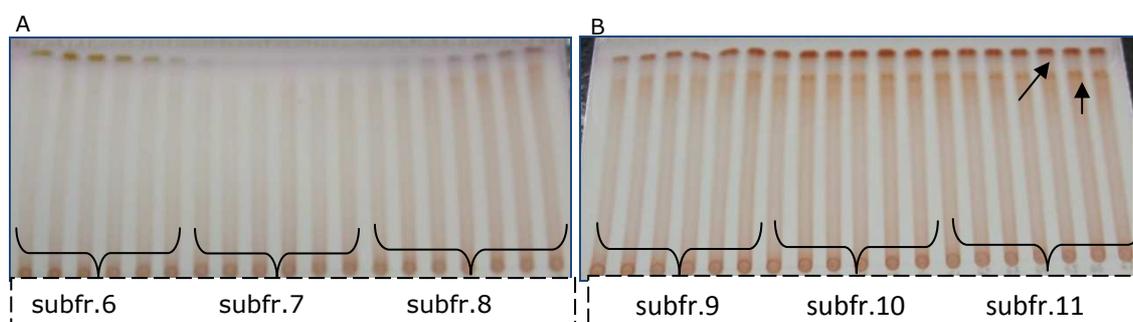


Figura 45 - Cromatografia em Camada Delgada das principais subfrações obtidas em Sephadex LH-20 e respectivos reagrupamentos. (A) subfrações 6-8; (B) subfrações 9-11 - ambas reveladas com anisaldeído sulfúrico sob luz ambiente.

Com o decorrer do fracionamento, foi possível observar a diminuição da intensidade das bandas marrons observadas nas subfrações 8, 9, 10, 11 e 12, até seu total desaparecimento na subfração 13 (Figura 46). Poblocka-Olech e Krauze-Baranowska (2008), otimizaram e validaram um método por CCDAE (cromatografia em camada delgada de alta eficiência) para a identificação de procianidinas em amostras de diferentes espécies de cascas de *Salix*. A melhor resolução foi encontrada para a fase móvel clorofórmio:etanol:ácido

fórmico (50:40:6 v/v), fase esta que possui polaridade similar a utilizada neste estudo. Os autores obtiveram êxito na separação da procianidina B1 e de seu isômero, a procianidina B2. Comparando os cromatogramas obtidos das subfrações 9-12, com o trabalho citado acima, foi possível observar semelhança das bandas formadas, tanto pela coloração quanto pela posição na placa, o que pode indicar a presença da procianidina B2.

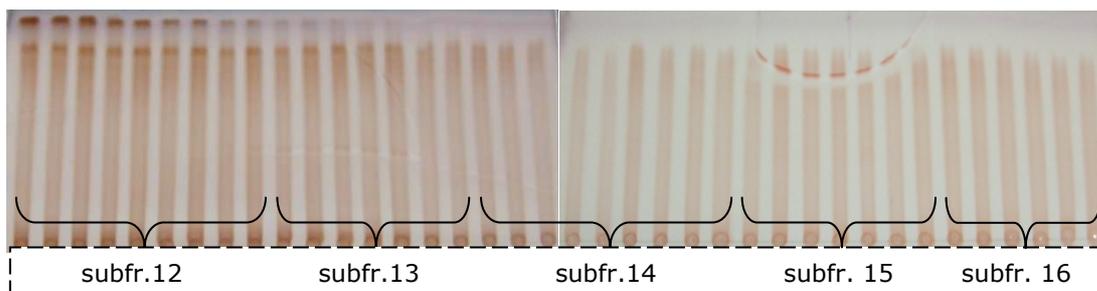


Figura 46 - Cromatografia em Camada Delgada das subfrações obtidas em Sephadex LH-20 e respectivos reagrupamentos. (E) subfrações 12-16, reveladas com anisaldeído sulfúrico sob luz ambiente.

A partir da subfração 13 (Figura 46) até a subfração 18 (Figura 47) não são observadas mais bandas características.

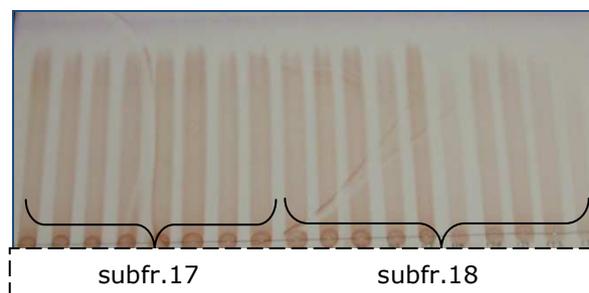


Figura 47 - Cromatografia em Camada Delgada das subfrações obtidas em Sephadex LH-20 e respectivos reagrupamentos. (F) subfrações 17 e 18, reveladas com anisaldeído sulfúrico sob luz ambiente.

Portanto, e de acordo com os cromatogramas apresentandos, foi possível concluir que o fracionamento da Fr-Met em gel Sephadex LH-20 separou compostos de polaridades distintas. O rendimento do fracionamento em relação a massa da Fr-Met aplicada a coluna foi de 77,5%, sendo que a subfração 2 foi a que apresentou o melhor resultado (10,9 mg) (Tabela 13).

Tabela 13 - Rendimento das 18 subfrações obtidas a partir do fracionamento em colunas de gel de Sephadex da Fr-Met. A porcentagem foi calculada em relação a massa de 150,4 mg da fração aplicada a coluna

Subfração	Rendimento (mg)	Rendimento (%)
1	4,4	2,9
2	16,4	10,9
3	11,1	7,4
4	7,2	4,8
5	5,6	3,7
6	5,2	3,5
7	5,5	3,7
8	5,2	3,5
9	5,5	3,7
10	5,3	3,5
11	7,2	4,8
12	7,1	4,7
13	7,8	5,2
14	3,4	2,3
15	5,2	3,5
16	5,4	3,6
17	4,4	2,9
18	4,3	2,9
Total	116,6	77,5

4.3.6 Atividade antioxidante das subfrações

As subfrações agrupadas foram avaliadas quanto a atividade antioxidante, por meio dos métodos de sequestro do radical $ABTS^{\cdot+}$ e $DPPH^{\cdot}$.

De acordo com os resultados obtidos foi possível verificar que as diferentes subfrações apresentaram atividade antioxidante com os métodos utilizados (Tabela 14). As subfrações que apresentaram as maiores capacidades de sequestro dos radicais $ABTS^{\cdot+}$ e $DPPH^{\cdot}$ foram as subfrações 10, 11, 12 e 13, subfrações estas que também apresentaram as maiores concentrações de bandas marrons com alto tempo de retenção (Figuras 45 e 46). A subfração

17 mostrou uma alta capacidade de sequestro do radical DPPH, porém não apresentando a mesma eficiência para o radical ABTS.

Tabela 14 - Atividade antioxidante obtida pelos métodos de sequestro do radical livre DPPH e ABTS das 18 subfrações obtidas a partir do fracionamento em colunas de gel de Sephadex da Fr-Met

Subfrações	Atividade antioxidante	
	DPPH (%)	ABTS (mM TEAC g ⁻¹ peso seco)
1	3,51 ± 0,61	0,424 ± 0,07
2	9,64 ± 2,84	1,05 ± 0,06
3	35,13 ± 0,65	2,39 ± 0,06
4	42,01 ± 1,94	1,54 ± 0,05
5	59,34 ± 2,79	4,42 ± 0,05
6	55,97 ± 3,04	3,43 ± 0,02
7	40,66 ± 0,84	2,58 ± 0,04
8	56,91 ± 3,05	3,32 ± 0,06
9	65,27 ± 3,07	4,37 ± 0,05
10	82,80 ± 2,28	6,68 ± 0,06
11	72,76 ± 2,95	5,22 ± 0,01
12	81,93 ± 1,42	6,32 ± 0,03
13	72,02 ± 2,56	5,69 ± 0,06
14	52,19 ± 1,11	3,14 ± 0,05
15	66,42 ± 2,14	3,40 ± 0,05
16	61,56 ± 3,68	3,47 ± 0,07
17	88,97 ± 0,43	4,16 ± 0,01
18	78,35 ± 1,18	2,13 ± 0,01

4.3.7 Perfil químico das subfrações obtido por CLAE

Com o objetivo de se avaliar a composição química das subfrações, foi realizada a separação dos compostos que absorvem na região UV pela técnica de cromatográfica líquida de alta eficiência (CLAE).

Os compostos identificados, de acordo com tempo de retenção e similaridade espectral, nas subfrações foram os seguintes: catequina e epicatequina nas subfrações 5, 9, 10, 12, e 13 e ácido gálico na subfração 16 (Figura 48). Assim como para o EB e Fr-Met, outros compostos fenólicos e o estilbeno resveratrol não foram identificados em nenhuma subfração.

Deve-se ressaltar a presença majoritária da catequina e epicatequina na subfração 5, sendo que este resultado corrobora com as bandas características presentes no topo do cromatograma obtido por CCD (Figura 44B). Estes compostos foram identificados em outras subfrações, no entanto, em uma concentração menor (subfrações 9, 10, 12 e 13).

Nas subfrações 9, 10, 11 e 12 pode-se observar a presença de um pico majoritário em 50 minutos. No entanto não foi possível identificá-lo, pois este pico não apresentou tempo de retenção e perfil espectral semelhante a nenhum dos compostos utilizados como padrões. A subfração 10, que possui as maiores atividades pelos métodos de sequestro dos radicais DPPH e ABTS, foi também a que apresentou a maior intensidade do composto não identificado no tempo de retenção de 50 minutos.

Portanto a subfração 10 foi selecionada para o isolamento bioguiado pela técnica de cromatografia semipreparativa.

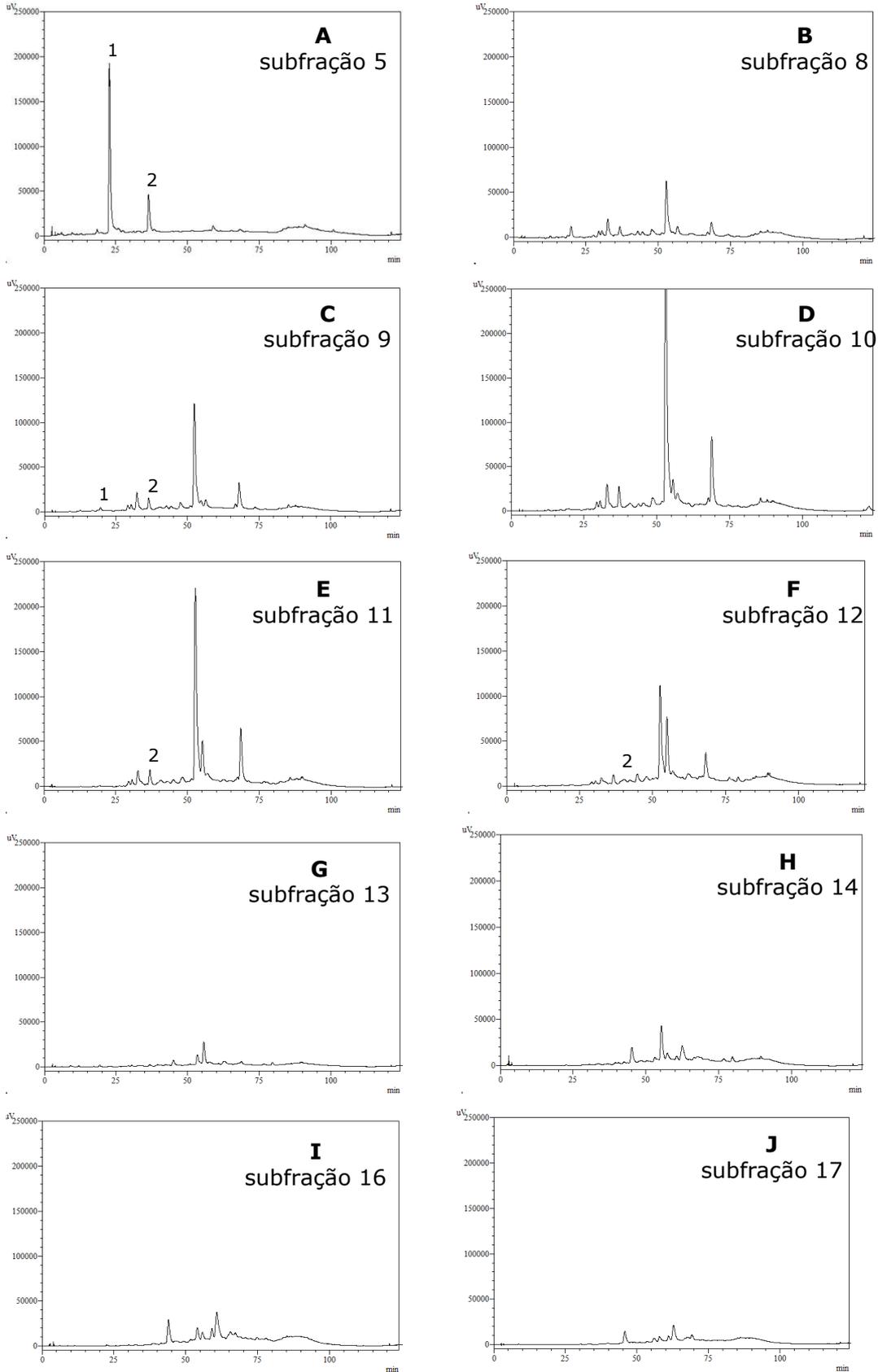


Figura 48 - Perfil químico das subfrações obtido por Cromatografia de Alta Eficiência. Subfração 5 (A); subfração 8 (B); subfração 9 (C); subfração 10 (D); subfração 11 (E); subfração 12 (F); subfração 13 (G); subfração 14 (H); subfração 16 (I) e subfração 16 (J). Catequina (1) e epicatequina (2). As subfrações foram avaliadas na concentração de 1000 ppm

Também foi possível verificar que em relação à Fr-Met (Figura 42), as subfrações obtidas após o fracionamento em gel Sephadex LH-20 apresentaram um menor número de picos, demonstrando assim a eficiência do processo de purificação.

Os picos principais da subfração 10 (Figura 48D) foram selecionados para o processo de isolamento pela técnica de CLAE preparativa. Esses compostos além de serem majoritários, quando analisados pelos recursos do detector de arranjo de fotodiodos apresentaram altos índices de pureza.

4.3.8 Isolamento de compostos bioativos pela técnica de CLAE-semipreparativo

Para o isolamento utilizando a técnica de cromatografia líquida foi desenvolvido um método de separação específico, descrito no item 5.3.5. A coleta dos compostos da subfração 10 foi realizada pela técnica de CLAE-semipreparativo (Figura 49).

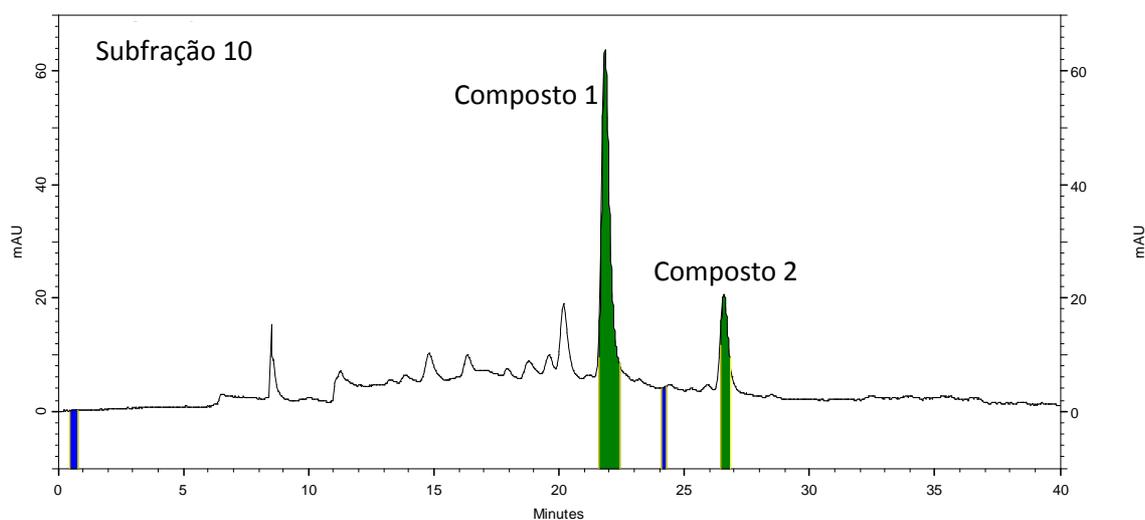


Figura 49 - Cromatograma da coleta dos compostos 1 e 2 por CLAE-semipreparativo da subfração 10

Foram coletados dois compostos, que quando monitorados pelo detector de arranjo de fotodiodos apresentaram alto índice de pureza. Uma quantidade de 10 e 2 mg dos compostos 1 e 2, respectivamente, foram obtidos a partir de 23 gramas de película de amendoim liofilizada.

Após o isolamento, os compostos foram reavaliados por CLAE. Conforme os cromatogramas da Figura 50 pode-se observar a existência de somente um pico, indicando assim que os mesmos estavam realmente puros.

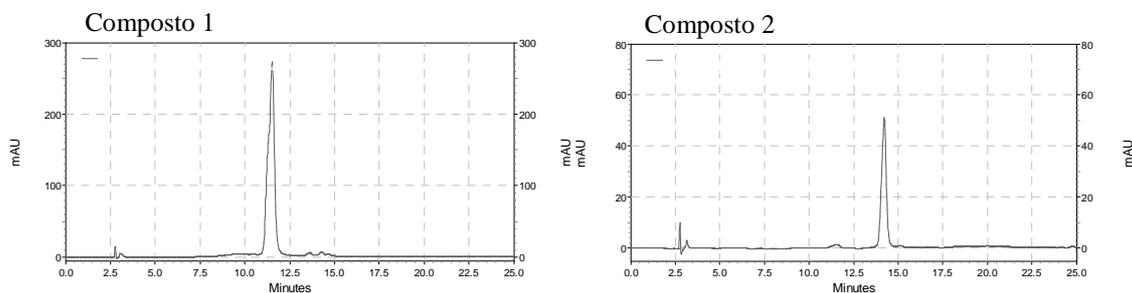


Figura 50- Cromatograma obtido por CLAE dos compostos isolados da subfração 10 da película de amendoim (compostos 1 e 2).

4.3.9 Avaliação da atividade antioxidante dos compostos isolados

Depois de isolados os compostos tiveram suas atividades avaliadas, como parte do monitoramento bioguiado. Observando os gráficos de cinética do teste de EC_{50} (Figura 51), pode-se concluir que após 80 minutos do início da reação a estabilidade para o extrato, fração, subfração e compostos isolados com o radical livre DPPH foi estabelecida. Desta forma, este tempo foi escolhido para o cálculo da concentração mínima necessária para as substâncias reduzirem em 50% o radical DPPH inicial da reação.

Outro fato importante, que pode ser observado nestes gráficos, refere-se às baixas concentrações do extrato da película, Fr-Me, subfração 10 e composto 1, que na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ reduziram a absorbância inicial até uma faixa inferior a 0,15 ao final dos 140 minutos. Isto demonstra a eficiência das substâncias presentes em sequestrar radicais DPPH, mesmo em baixas concentrações.

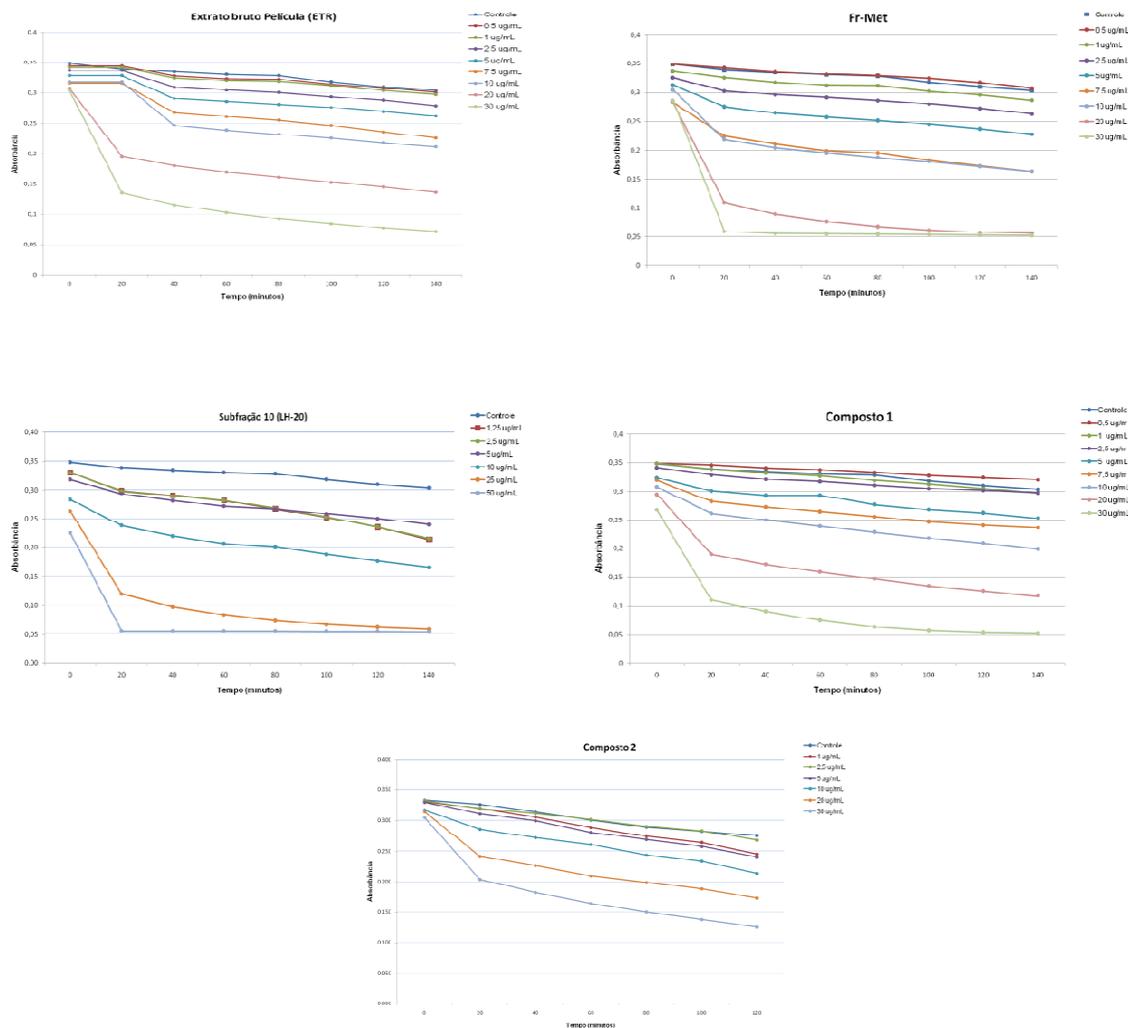


Figura 51 - Cinética de redução do radical livre DPPH do extrato, fração, subfração e compostos isolados da película de amendoim.

Os resultados do EC_{50} foram expressos em $\mu\text{g/mL}$ e estão apresentados na Tabela 15. Esses resultados indicam que o processo de purificação e isolamento aumentaram a atividade antioxidante, o que pode ser constatado pela avaliação das atividades da subfração 10 e Fr-Me e extrato bruto, que apresentaram valores de EC_{50} de $15,65 \mu\text{g/mL}$; $16,10 \mu\text{g/mL}$ e $20,62 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabela 15).

Tabela 15 - Atividade antioxidante avaliada pelo método de sequestro do radical DPPH, e expressa como EC₅₀ para o extrato bruto, fração, subfração e compostos isolados

Amostra	EC ₅₀ (µg/mL)
Extrato bruto (EB)	20,62 ± 0,05
FR-Me	16,10 ± 0,21
Subfração 10	15,65 ± 0,07
Composto 1	18,25 ± 0,01
Composto 2	31,10 ± 0,05

Comparando os valores de EC₅₀ com o de compostos naturais de elevada atividade antioxidante, como catequina e o resveratrol, que segundo Villaño et al. (2007) é de 1,74 µg/mL e 7,16 µg/mL, respectivamente, observa-se um grande potencial destas frações e compostos isolados (Tabela 15). Quando esta comparação é feita com o antioxidante sintético BHA, que segundo Yuan, Bone e Carrington (2005) é de 25µg/mL, conclui-se que estes compostos são muito promissores e possuem grande potencial de aplicação na indústria de alimentos.

Lou et al. (2004) isolaram proantocianidinas da película de amendoim, utilizando resinas de purificação e técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. Os compostos isolados foram avaliados pelo teste de EC₅₀ e, assim como os compostos isolados deste estudo, apresentaram valores de EC₅₀ próximos ao controle positivo – epigallocatequina galato (1,13 µM).

Villaño et al. (2007) avaliaram a habilidade de compostos polifenólicos, disponíveis comercialmente em sequestrar o radical DPPH. Entre os compostos testados estavam aqueles normalmente encontrados na película de amendoim, como as procianidinas B1 e B2 e os flavonoides: catequina, epicatequina, epigallocatequina, epicatequina galato e epigallocatequina galato. Dentre estes, a epicatequina foi a que apresentou o melhor resultado para o EC₅₀ (1,52 µg/mL). No entanto quando a eficácia antioxidante (AE) foi considerada, que leva em consideração a velocidade do composto em reagir com o DPPH, as procianidinas foram os compostos que apresentaram os melhores resultados.

Es-Safi et al. (2007) avaliaram a atividade antioxidante de compostos isolados de *Globularia alypum* L. e verificaram que três compostos isolados e identificados como

flavonas glicosiladas foram os que apresentaram as maiores atividades de sequestro do radical DPPH (6,6 – 7,8 $\mu\text{mol/L}$), enquanto os compostos isolados da classe dos iridoídes foram os menos ativos.

Silva, Malva e Dias (2008) avaliaram a atividade antioxidante do extrato de *Hypericum perforatum* e dos compostos isolados por cromatografia semipreparativa. Foi verificado que o processo de isolamento rendeu compostos mais ativos. O extrato bruto apresentou valor de EC_{50} de 49,3 $\mu\text{g/mL}$, enquanto os compostos isolados, pertencentes a família dos fenólicos, apresentaram valores de EC_{50} bem inferiores. A melhor atividade entre os compostos isolados foi a da quercetina – 2,50 $\mu\text{g/mL}$.

Zhang et al. (2009) verificaram a atividade antioxidante de compostos isolados da semente da noz da espécie *Juglans regia* L. Assim como nos resultados obtidos neste estudo, os compostos isolados foram mais eficientes em sequestrar o radical DPPH. Os valores de EC_{50} obtidos ficaram próximos ao padrão de referência TROLOX (0,026 mM).

Ammar et al. (2009) realizaram isolamento de flavonoides a partir de folhas de *Rhamnus alaternus* L. e avaliaram a atividade destes compostos pela técnica de sequestro do radical DPPH. A ramnetina glicosilada foi a mais bioativa, com valor de EC_{50} igual a 1,5 $\mu\text{g/mL}$, resultado duas vezes maior que o obtido para a Vitamina C, utilizada como controle positivo (3 $\mu\text{g/mL}$). Os outros dois compostos apresentaram valores de EC_{50} de 23 $\mu\text{g/mL}$ e 38 $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados obtidos na literatura estão de acordo com os deste estudo, pois a atividade antioxidante aumentou após o processo de purificação e isolamento dos compostos. Entretanto, o principal diferencial deste trabalho é que ele foi bio guiado, ou seja, somente as frações e compostos ativos é que seguiram sendo estudados.

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical ABTS, além do EB, frações e compostos isolados foram também avaliados os padrões quercetina, catequina e epicatequina, com o objetivo de se comparar o poder de sequestro das amostras com padrões puros (Figura 52).

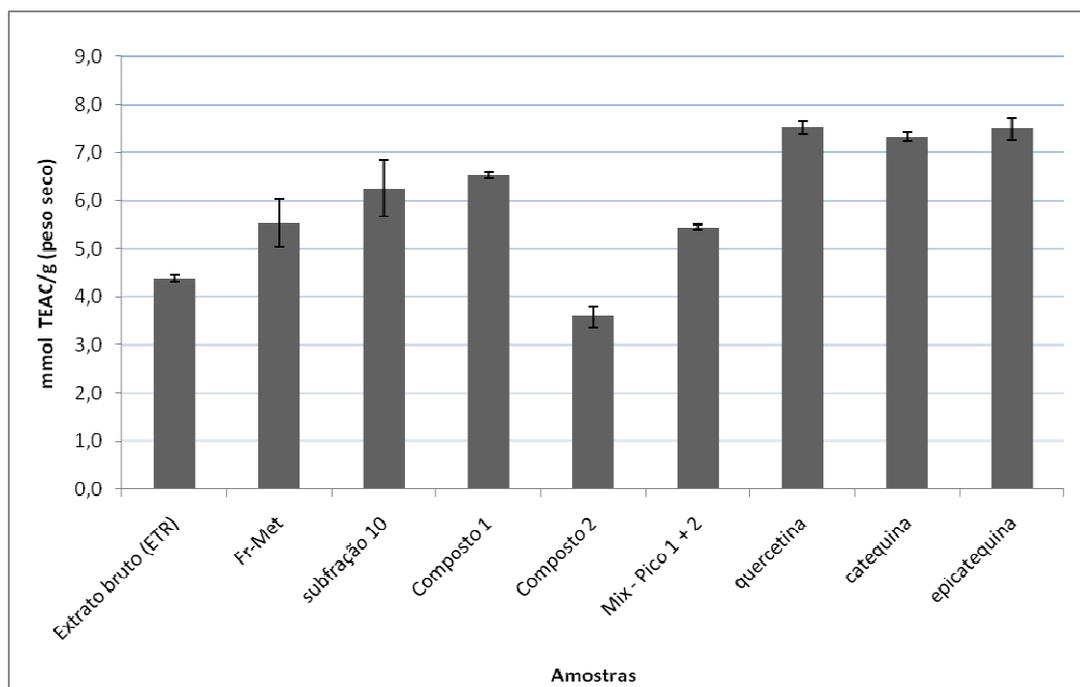


Figura 52 - Atividade antioxidante do extrato bruto (EB), fração metanólica (Fr-Met), subfração 10, compostos isolados da película de amendoim e padrões avaliados pelo método ABTS.

Quando a atividade antioxidante dos compostos isolados foi avaliada pelo método de sequestro do radical $ABTS^{\cdot+}$, pode-se verificar que à medida que o processo de purificação e isolamento avançou, a atividade antioxidante foi aumentando. O maior valor de atividade encontrada foi para o composto isolado 1 ($6,54 \text{ mmol TEAC g}^{-1}$), valor este muito próximo ao apresentado pelos padrões quercetina, catequina e epicatequina ($7,52$; $7,33$ e $7,50 \text{ mmol TEAC g}^{-1}$ respectivamente). O composto 2 e a mistura dos compostos 1 + 2 (mix) apresentaram os menores valores para a atividade antioxidante.

Appeldoorn et al. (2009) isolaram duas procianidinas da película de amendoim, procianidinas A1 e A2, utilizando técnicas semelhantes as utilizadas neste estudo. Apesar do trabalho de isolamento, estes compostos não tiveram suas atividades testadas por nenhum método. Vale ressaltar novamente a importância do estudo bioguiado, pois além do isolamento, é possível se determinar qual ou quais os compostos são realmente responsáveis pela atividade biológica em questão.

Os compostos isolados também foram avaliados quanto a sua atividade antioxidante pelo método FRAP, que é o método da redução do ferro. Este método é utilizado para se avaliar a atividade antioxidante de compostos fenólicos de plantas e alimentos, pois é relativamente simples e fácil. Nele é determinado o potencial de um antioxidante em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} na presença de TPTZ, que em condições ácidas é acompanhada pela formação de um complexo azul intenso (RUFINO et al., 2006).

Não existem estudos na literatura que descrevam a atividade antioxidante da película de amendoim pelo método FRAP. Desta forma, a comparação e discussão foram realizadas com relação a compostos isolados de outras matrizes. Assim como nos métodos avaliados anteriormente (Tabela 15 e Figura 52), foi possível verificar que o processo de purificação e isolamento produziu compostos com elevada atividade antioxidante pelo método FRAP (Figura 53). As atividades obtidas para o EB, Fr-Me, subfração 10 e composto 1 que foram de 7,75; 7,33; 7,55 e 7,59 mmol Fe²⁺g⁻¹, respectivamente. Os padrões epicatequina e catequina apresentaram valores de 21,3 e 20,9 mmol Fe²⁺ g⁻¹.

Quando se compara os valores de FRAP obtidos neste estudo com o de um padrão sintético como BHT, que segundo Borneo et al. (2009) é de 1,59 mmol Fe²⁺ g⁻¹, observa-se novamente o grande potencial antioxidante e de aplicação que estes compostos isolados possuem.

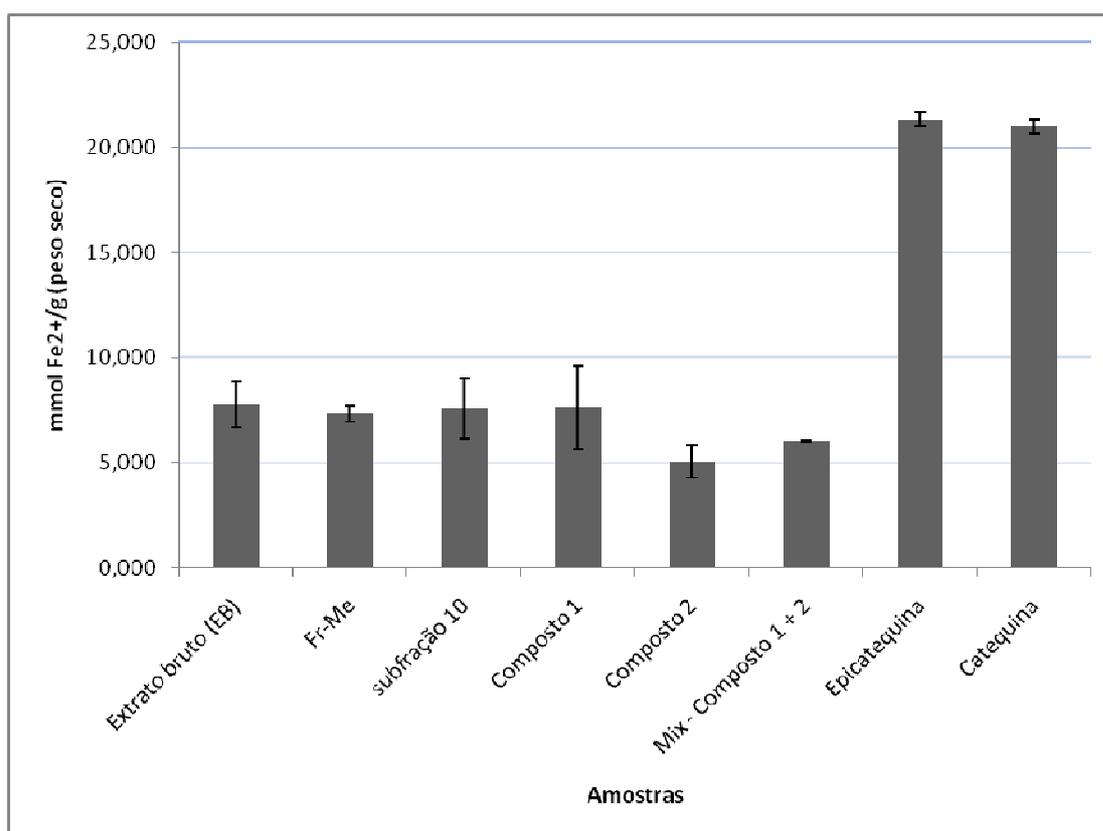


Figura 53 - Atividade antioxidante do extrato bruto (EB), fração metanólica (Fr-Met), subfração 10, compostos isolados da película de amendoim e padrões avaliados pelo método da redução do ferro (FRAP).

Cerezo et al. (2010) determinaram a atividade antioxidante de compostos isolados de morango pelo método do FRAP e encontraram valores que variaram de 2,75 – 7,67 mmol

Fe²⁺/g. Os compostos isolados foram identificados como antocianinas, sendo o composto pelargonidina-3-glicosídeo foi o mais ativo.

Os resultados obtidos nos diferentes métodos avaliados apresentaram uma boa correlação, ou seja, as melhores atividades foram obtidas principalmente para a Fr-Met, subfração 10 e composto isolado 1, tendo o composto 2 e o mix dos padrões as menores atividades (Figuras 50, 51 e 52).

A atividade antioxidante apresentada pelo EB revela o elevado potencial biológico e de aplicação que o extrato da película de amendoim apresenta. O processo de purificação e isolamento bioguiado forneceu frações e compostos isolados com atividade maior que o encontrado no EB, o que demonstra que o isolamento bioguiado foi realizado com sucesso. Os compostos isolados apresentam atividades maiores que os antioxidantes sintéticos BHA e BHT, e, atividades próximas a antioxidantes naturais reconhecidamente potentes como a quercetina, resveratrol e epicatequina. Isto sugere um grande potencial de aplicação pela indústria alimentícia, entretanto estudos *in vivo* para se verificar a eficiência destes antioxidantes em sistemas biológicos, ainda são necessários.

4.3.10 Identificação química dos compostos isolados por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As estruturas das substâncias isoladas foram elucidadas com base nas análises dos dados espectrais de RMN e por comparação com dados da literatura. Os compostos isolados foram recentemente descritos na literatura por Lou et al. (2004). Na tabela 16 está descrita atribuições dos compostos isolados, as quais foram confirmadas após análises dos espectros bidimensionais (2D) de correlação homonuclear ¹H-¹H COSY e heteronuclear HMBC e HMQC.

Tabela 16 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 1 (500 MHz, CD_3OD)

Nº	Δc	δH
2	101.8	
3	68.4	4.05, <i>d</i> (3.8)
4	30.8	4.34, <i>d</i> (3.8)
5	155.9	
6	97.0	6.09, <i>d</i> (2.0)
7	158.9	
8	97.6	6.02, <i>d</i> (2.0)
9	155.7	
10	105.9	
11	132.0	
12	114.8	6.92, <i>d</i>
13	146.5 ^a	
14	146.6 ^a	
15	117.0	6.69, <i>d</i> (8.2)
16	119.8	6.93, <i>d</i> (8.2, 1.8)
2'	82.4	5.07, <i>d</i> (7.5)
3'	68.8	4.20, <i>m</i>
4'	26.8	2.76, <i>dd</i> (16.5, 4.0) H- α 2.57, <i>dd</i> (16.5, 4.6), H- β
5'	151.9	
6'	109.6	
7'	151.0	
8'	111.7	
9'	152.8	
10'	103.8	
11'	133.5	
12'	116.9	6.88, <i>d</i> (2.0)
13'	146.3	
14'	146.5	
15'	117.1	6.78, <i>d</i> (8.2)
16'	121.1	6.13, <i>dd</i> (8.2, 2.0)
2''	78.0	5.34, <i>s</i>
3''	74.5	3.78, br. <i>s</i>
4''	37.7	4.83, br. <i>s</i>
5''	158.6	
6''	97.6	
7''	158.2	5.63, <i>d</i> , (2.2)
8''	97.2	
9''	158.7	6.04, <i>d</i> , (2.2)
10''	105.2	
11''	134.0	
12''	116.7	6.94, <i>d</i> , (2.0)
13''	145.5	
14''	146.9	
15''	116.8	6.69, <i>d</i> (8.2)
16''	121.2	6.57, <i>dd</i> , (8.2, 2.0)

De acordo com os dados obtidos por RMN de ^1H e ^{13}C , e da literatura especializada, foi possível identificar o composto 1 como sendo Epicatequina-(2 β →O→7, 4 β →6)-[epicatequina-(4 β →8)]-catequina (Figura 54).

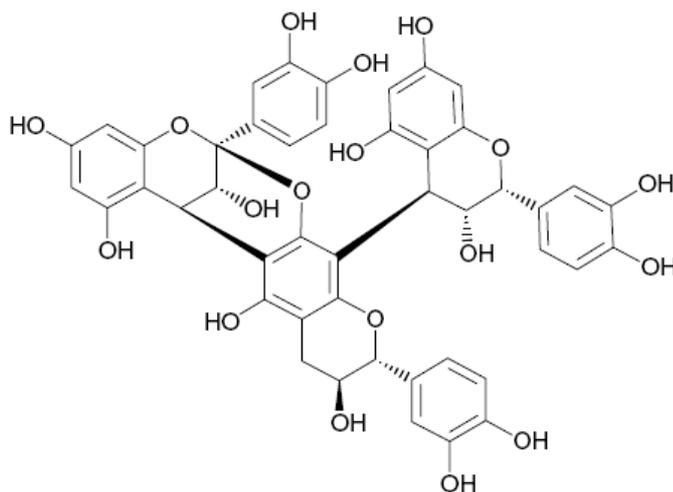


Figura 54 - Estrutura do composto 1, Epicatequina-(2 β →O→7, 4 β →6)-[epicatequina-(4 β →8)]-catequina, isolado da subfração 10 da película de amendoim.

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 2 (Tabela 17) permitiu a sua identificação como Epicatequina-(2 β →O→7,4 β →8)-[epicatequina-(4 β →8)]-catequina-(4 α →8)-epicatequina. A estrutura do composto está apresentada na Figura 55.

Tabela 17 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 2 (500 MHz, CD_3OD)

(continua)

Carbonos		H correlacionado
N ^o	δc	δH
2	100.3	
3	67.2	3.59, <i>d</i> (3.5)
4	29.1	4.03, <i>d</i> (3.8)
5	154.4	
6	97.8	5.98, <i>d</i> (2.0)
7	156.6	
8	98.6	5.84, <i>d</i> (2.0)
9	154.9	
10	105.4	
11	132.6	
12	116.0	6.89, <i>d</i> (1.8)
13	146.8**	
14	146.6**	
15	115.8	6.87, <i>d</i> (8.0)
16	120.3	6.72, <i>dd</i> (8.0, 1.8)
2'	77.7	5.78, <i>s</i>
3'	70.8	3.68, <i>s</i>
4'	38.0	4.46, <i>s</i>
5'	157.8	
6'	96.2	5.82, <i>s</i>
7'	153.3	
8'	111.7	
9'	151.6	
10'	106.7	
11'	131.2	
12'	117.0	7.21, <i>br. s</i>
13'	146.0*	
14'	145.8*	
15'	115.0	6.85, <i>d</i> (8.2)
16'	121.5	6.81, <i>br. d</i> (8.2)
2''	84.0	3.93, <i>d</i> (6.6)
3''	74.9	4.41, <i>d</i> (6.6)
4''	38.5	4.40, <i>s</i>
5''	156.0*	
6''	98.5	6.10, <i>s</i>
7''	155.7	
8''	109.7	
9''	151.6	
10''	98.6	
11''	133.9	
12''	116.0	7.11, <i>d</i> (1.8)
13''	145.7	
14''	146.0	
15''	116.4	6.76, <i>d</i> (8.0)
16''	120.4	6.72, <i>dd</i> (8.0, 1.8)
2'''	80.2	4.92, <i>s</i>

Tabela 17 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 2 (500 MHz, CD_3OD)

(conclusão)		
Carbonos	H correlacionado	
N ^o	δ_c	δ_H
3'''	67.0	4.03, <i>m</i>
4'''		2.53, br. <i>d</i> (16.2)
	23.7	
		2.08, <i>dd</i> (16.2, 3.6)
5'''	157.3*	
6'''	95.6	6.02, <i>s</i>
7'''	155.8	
8'''	109.7	
9'''	154.4	
10'''	100.7	
11'''	132.0	
12'''	112.9	5.91, <i>d</i> (2.1)
13'''	145.8	
14'''	145.7	
15'''	116.6	6.40, <i>d</i> (8.2)
16'''	118.2	5.39, <i>dd</i> (8.2, 2.1)

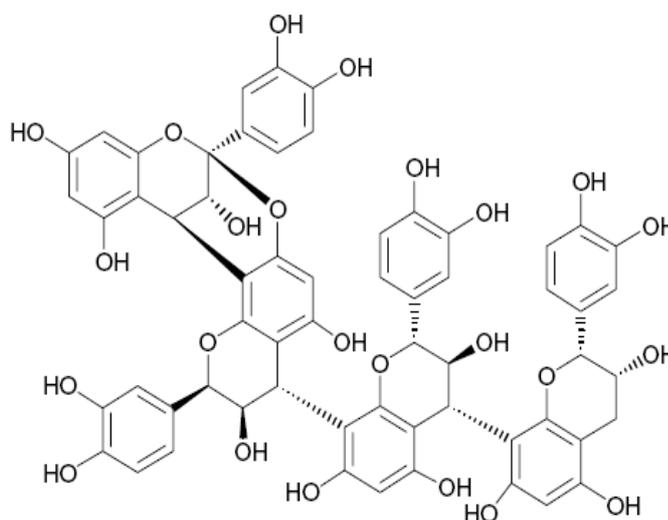


Figura 55 - Estrutura do composto 2, isolado da subfração 10 da película de amendoim.

De acordo com Ferrera e Slade (2002), as proantocianidinas são oligômeros/polímeros que resultam em antocianidinas pela quebra da ligação C-C sob condições fortemente ácidas na presença de oxigênio molecular. Junto com os bi e tri-flavonoides, representam as duas maiores classes de metabólitos secundários complexos $\text{C}_6\text{.C}_3\text{.C}_6$. A classe das proantocianidinas tem recentemente atraído a atenção nos campos da nutrição, saúde e medicina. Isto é resultado de um rápido crescimento de evidências que sugerem que esta

classe pode agir como potentes antioxidantes e/ou modular importantes vias *in vivo* em mamíferos (RICE-EVANS; PACKER, 1998).

4.4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo demonstram o grande potencial antioxidante do do subproduto película de amendoim em testes *in vitro*;

O processo de purificação e fracionamento bioguiado possibilitou a obtenção de frações e subfrações mais bioativas que o extrato bruto;

Os compostos identificados pela técnica de CLAE no extrato bruto (EB) e fração purificada (Fr-Met) foram: ácido gálico, epigallocatequina galato, catequina, epicatequina e procianidina B2. Estes compostos estavam mais concentrados na Fr-Met, o que possibilitou uma maior atividade antioxidante;

A purificação em resina Amberlite XAD2 e o fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 possibilitaram a obtenção de frações e subfrações quimicamente distintas;

A técnica de CLAE semipreparativa possibilitou o isolamento de duas proantocianidinas de elevada pureza e alta atividade antioxidante, sendo elas a Epicatequina-(2 β →O→7, 4 β →6)-[epicatequina-(4 β →8)]-catequina e a Epicatequina-(2 β →O→7,4 β →8)-[epicatequina-(4 β →8)]-catequina-(4 α →8)-epicatequina.

REFERENCIAS

ALENCAR, S. M. **Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil**. 2002. 120 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 113, p. 278-283, 2007.

AMMAR, R. B.; BHOURI, W.; SGHAIER, M. B.; BOUBAKER, J.; SKANDRANI, I.; NEFFATI, A.; BOUHLEL, I.; KILANI, S.; MARIOTTE, A. N.; GHEDIRA, L. C.; FRANCA, M. G. D.; GHEDIRA, K. Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. **Food Chemistry**, Barking, v. 116, p. 258-264, 2009.

ANASTASIADI, M.; PRATSINIS, H.; KLETSAS, D.; SKALTSOUNIS, A. L.; HAROUTOUNIAN, S. A. Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. **Food Research International**, Essex, v. 43, p. 805–813, 2010.

APPELDOORN, M. M.; SANDERS, M.; VINCKEN, J. P.; CHEYNIER, V.; GUERNEVÉ, C. L.; HOLLMAN, P. C. H.; GRUPPEN, H. Efficient isolation of major procyanidin A-type dimers from peanut skins and B-type dimers from grape seeds. **Food Chemistry**, Barking, v. 117, p. 713–720, 2009.

AWAD, A. B.; CHAN, K. C.; DOWNIE, A. C.; FINK, C. S. Peanuts as a source of B-sitosterol, a sterol with anticancer properties. **Nutrition and Cancer**, Hillsdale, v. 36, p. 238-241, 2000.

BALLARD, T. S.; MALLIKARJUNAN, P.; ZHOU, K.; O'KEEFE, S. F. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from peanut skins. **Food Chemistry**, Barking, v. 120, p. 1185-1192, 2010.

BALLARD, T. S.; MALLIKARJUNAN, P.; ZHOU, K.; O'KEEFE, S. F. Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from peanut skins using response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 3064-3072, 2009.

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F. R.; ORTUNO, A.; DEL RIO, J. A. Uses and properties of citrus flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, p. 4505–4515, 1997.

BORNEO, R.; LÉON, A. E.; AGUIRRE, A.; RIBOTTA, P.; CANTERO, J. J. Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system. **Food Chemistry**, Barking, v. 112, n. 3, p. 664-670, 2009.

BRAND, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Food Science and Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

CEREZO, A. B.; CUEVAS, E.; WINTERHALTER, P.; GARCIA-PARRILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. Isolation, identification and antioxidant activity of anthocyanin compounds in *Camarosa* strawberry. **Food Chemistry**, Barking, v. 123, p. 574-582, 2010.

DIDZBALIS, J.; RITTER, K. A.; TRAIL, A. C.; PLOG, F. J. Identification of fruity/fermented odorants in high-temperature-cured roasted peanuts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 4828-4833, 2004.

ES-SAFI, N. E.; KOLLMANN, A.; KHLIFI, S.; DUCROT, P. H. Antioxidant effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L. structure-activity relationship. **Lebensmittel - Wissenschaft + Technologie**, Kidlington v. 40, p. 1246-1252, 2007.

FELDMAN, E. B. Assorted monounsaturated fatty acids promote healthy hearts. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 70, p. 953-954, 1999.

FRANCISCO, M. L. D.; RESURRECCION, A. V. A. Development of a reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) procedure for the simultaneous determination of phenolic compounds in peanut skin extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 119, p. 356-363, 2009.

FREIMUND, S.; SAUTER, M.; KAPPELI, O.; DUTLER, H. A new non-degrading isolation process for 1,3- β -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 54, p. 159-171, 2003.

GLAVNIK, V.; SIMONOVSKA, B.; VOVK, I. Densitometric determination of (+)-catechin and (-)-epicatechin by 4-dimethylaminocinnamaldehyde reagent. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 126, p. 4485-4491, 2009.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

JEONG, S. M.; KIM, S. Y.; KIM, D. R.; JO, S. C.; NAM, K. C.; AHN, D. U. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 3389-3393, 2004.

KRIS-ETHERTON, P. M.; PEARSON, T. A.; WAN, Y.; HARGROVE, R. L.; MORIARTY, K.; FISHELL, V. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentration. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 7, p. 1009-1015, 1999.

KUKIC, J.; POPOVIC, V.; PETROVIC, S.; MUCAJI, P.; CIRIC, A.; STOJKOVIC, D.; LOU, H.; YUAN, H.; MA, B.; REN, D.; JI, M.; OKA, S. Polyphenols from peanut skins and their free radical-scavenging effects. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, p. 2391-2399, 2004.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. Berlin: Springer-Verlag, 1970. 354 p.

MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Current Opinion in Lipidology**, London, v. 16, p. 77-84, 2005.

MARTINS, R. Amendoim: Monitoramento da cadeia de produção. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, São Paulo, v. 1, n. 1, 2006. Disponível em: <http://www.iaea.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=4418>. Acesso em: 04 set. 2010.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 52, p. 673–751, 2000.

NEPOTE, V.; GROSSO, N. R.; GUZMAN, C. A. Optimization of extraction of phenolic antioxidants from peanut skins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 85, n. 1, p. 33-39, 2005.

O'KEEFE, S. F.; WANG, H. Effects on peanut skin extract on quality and storage stability of beef products. **Meat Science**, Barking, v. 73, n. 2, p. 278-286, 2006.

OLECH-POBLOCKA, L.; KRAUZE-BARANOWSKA, M. SPE-HPTLC of procyanidins from the barks of different species and clones of *Salix*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 48, p. 965-968, 2008.

PEANUT INSTITUTE. **Antioxidants from food sources, like peanuts and peanut butter, may protect against Alzheimer disease**. Arlington, June 2002. Disponível em: http://www.peanut-institute.org/news-and-information/downloads/20020626_peanutantioxidants_help_alzheimers.pdf. Acesso em: 20 set. 2010.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, p. 494–507, 2001.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-values foods: a review. **Journal of Food Engineering**, London, v. 49, p. 311-319, 2001.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

RICE-EVANS, C. A.; PACKER, L. **Flavonoids in health and disease**. New York: Marcel Dekker, 1998.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. 4 p. (Comunicado Técnico, 125).

SANDERS, T. H.; McMICHAEL JUNIOR, R. W.; HENDRIX, K. W. Occurrence of resveratrol in edible peanuts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 4, p. 1243-1264, 2000.

SANTOS, R. C.; GONDIM, T. M. S.; FREIRE, R. M. M. **Cultivo do amendoim**. Campinas Grande: Embrapa Algodão, 2006. (Sistema de Produção, 7). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Amendoim/CultivodoAmendoim/mercado.html>>. Acesso em: 01 ago. 2010.

SILVA, B. A.; MALVA, J. O.; DIAS, A. C. P. St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) extracts and isolated phenolic compounds are effective antioxidants in several *in vitro* models of oxidative stress. **Food Chemistry**, Barking, v. 110, p. 611-619, 2008.

SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V. C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S. M. Chemical composition and botanical origin of red própolis, a new type of Brazilian própolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, July 2007. doi:10.1093/ecam/nem059.

SOBOLEV, V. S.; COLE, R. J. Note on utilisation of peanut seed testa. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, p. 105-111, 2004.

SOKOVIC, M. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 107, n. 2, p. 861-868, 2008.

TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; CARVALHO, J. E.; FOGGIO, M. A. Chemical constituents of *Luehea divaricata* Mart (Tiliaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 28, p. 834-837, 2005.

VILLAÑO, D.; FERNANDÉZ-PACHÓN, M. S.; MOYÁ, M. L.; TRONCOSO, A. M.; GARCÍA-PARRILLA, M. C. Radical Scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta**, London, v. 71, p. 230-235, 2007.

WOODROOF, J. G. Salted peanuts. In: _____. (Ed.). **Peanuts: Production, processing, products**. 3. ed. Connecticut: AVI Publishing, 1983. p. 229-263.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 1, p. 41-48, 2006.

YU, J.; AHMEDNA, M.; GOKTEPE, I. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. **Food Chemistry**. Barking, v. 90, p. 199-206, 2005.

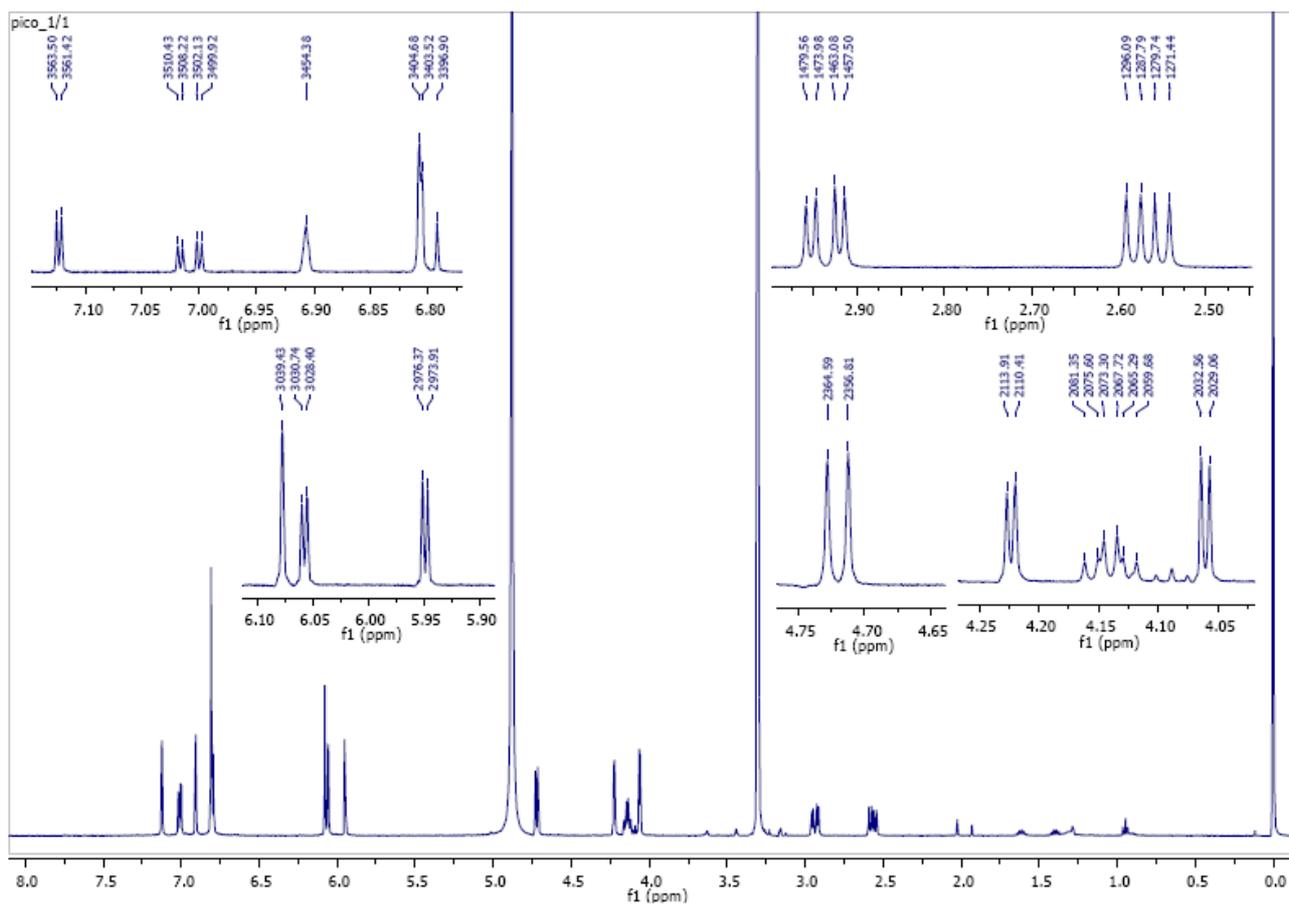
YU, J.; AHMEDNA, M.; GOKTEPE, I.; DAI, J. Peanut skin procyanidins: Composition and antioxidant activities as affected by processing. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 4, p. 364-371, 2006.

YUAN, Y. V.; BONE, D. E.; CARRINGTON, M. F. Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmata*) extract evaluated *in vitro*. **Food Chemistry**, Barking, v. 91, n. 3, p. 485-494, 2005.

ZHANG, Z.; LIAO, L.; MOORE, J.; WU, T.; WANG, Z. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). **Food Chemistry**, Barking, v. 113, p. 160-165, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Figura 56 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) do composto 1

APÊNDICE B

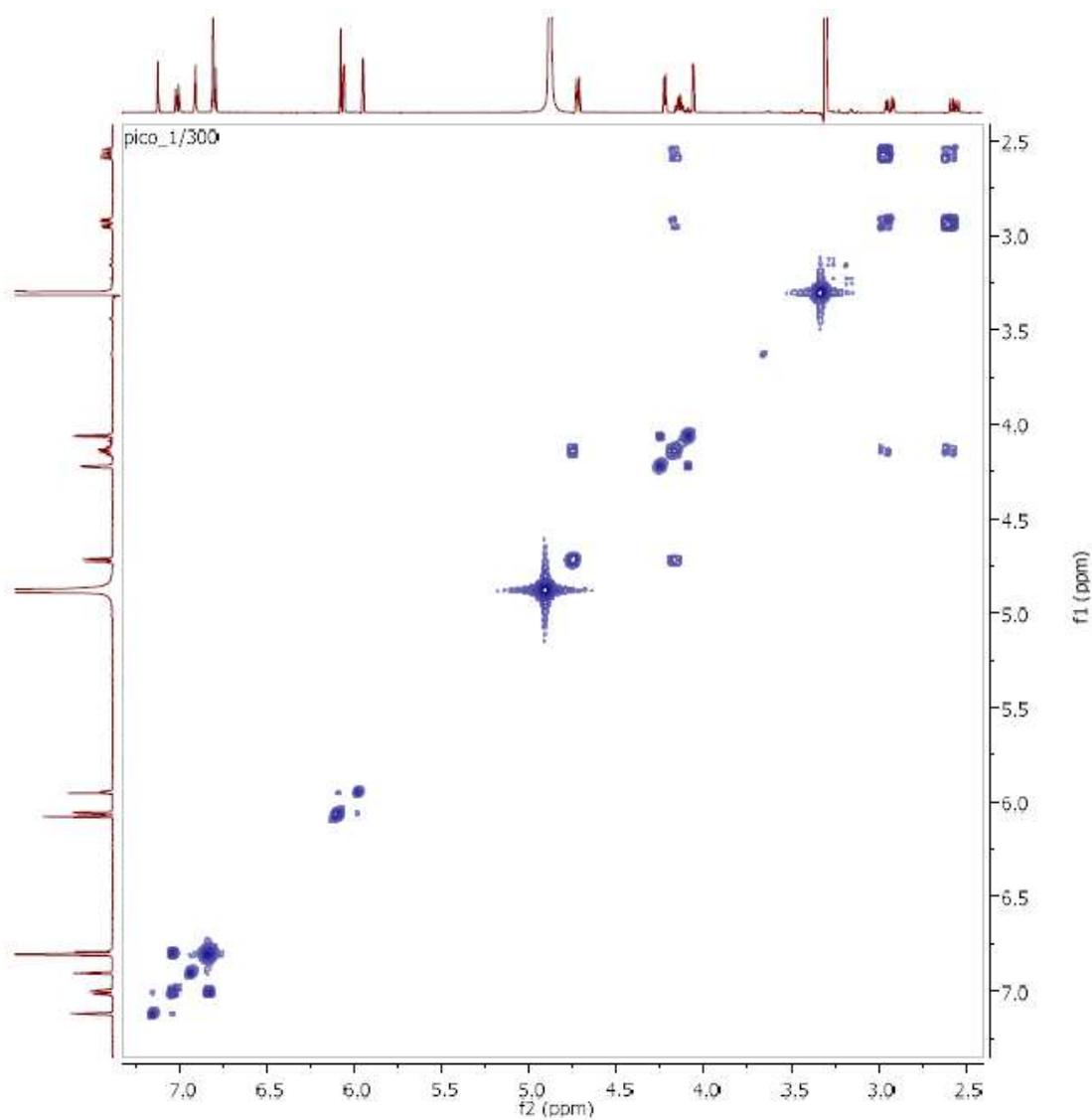
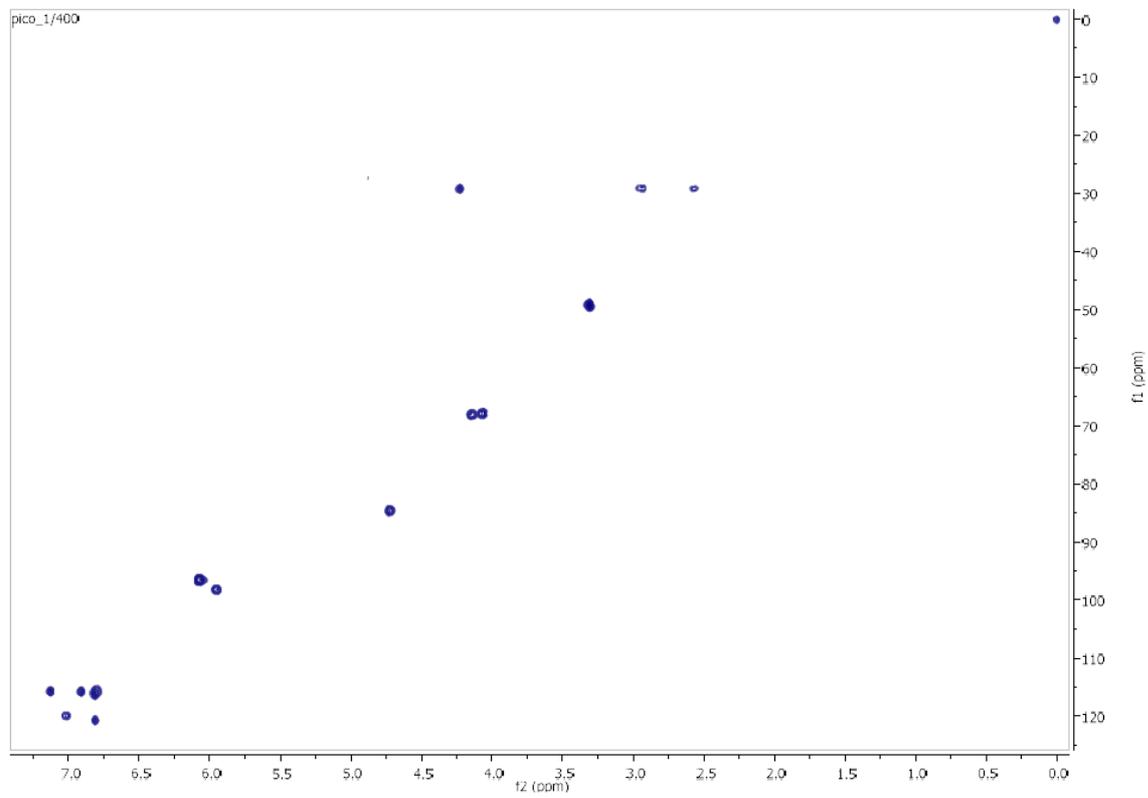


Figura 57 - Espectro COSY ^1H (500 MHz, CD_3OD) do composto 1

APÊNDICE C

Figura 58 - Espectro HMQC (500 MHz, CD₃OD) do composto 1

APÊNDICE D

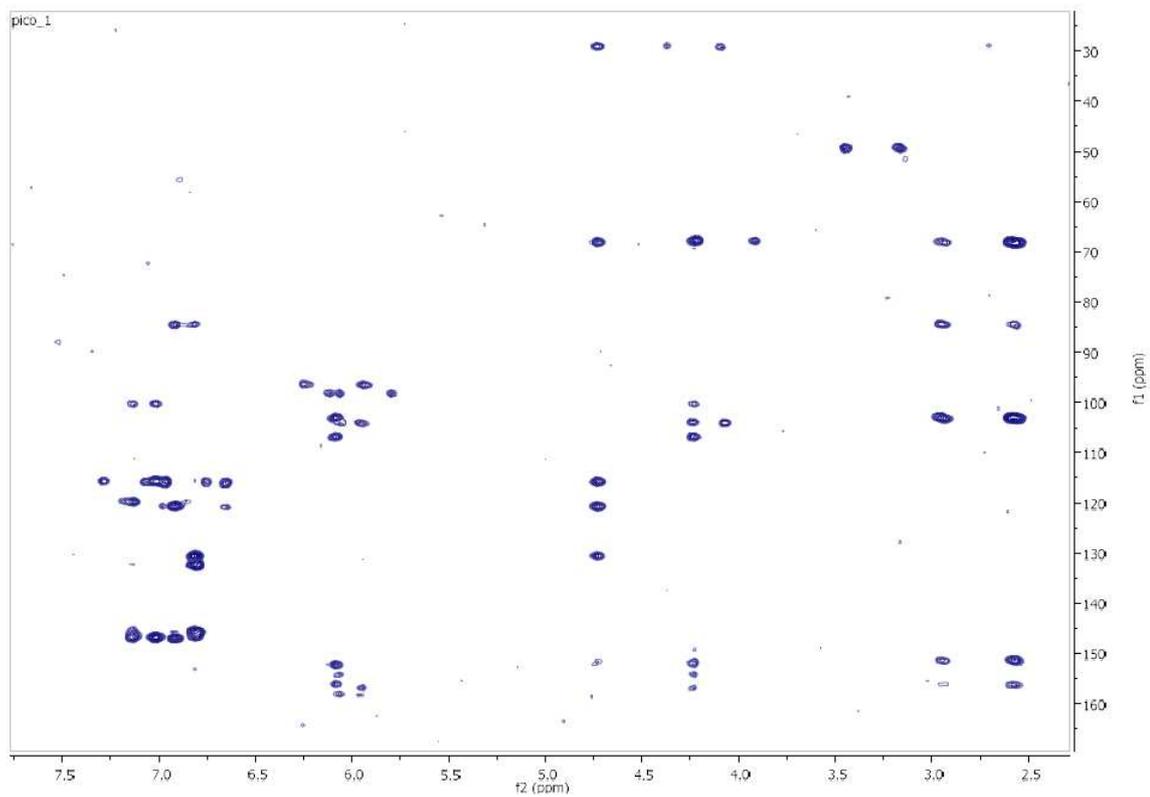


Figura 59 – Espectro HMBC 8Hz (500 MHz, CD₃OD) do composto 1

APÊNDICE F

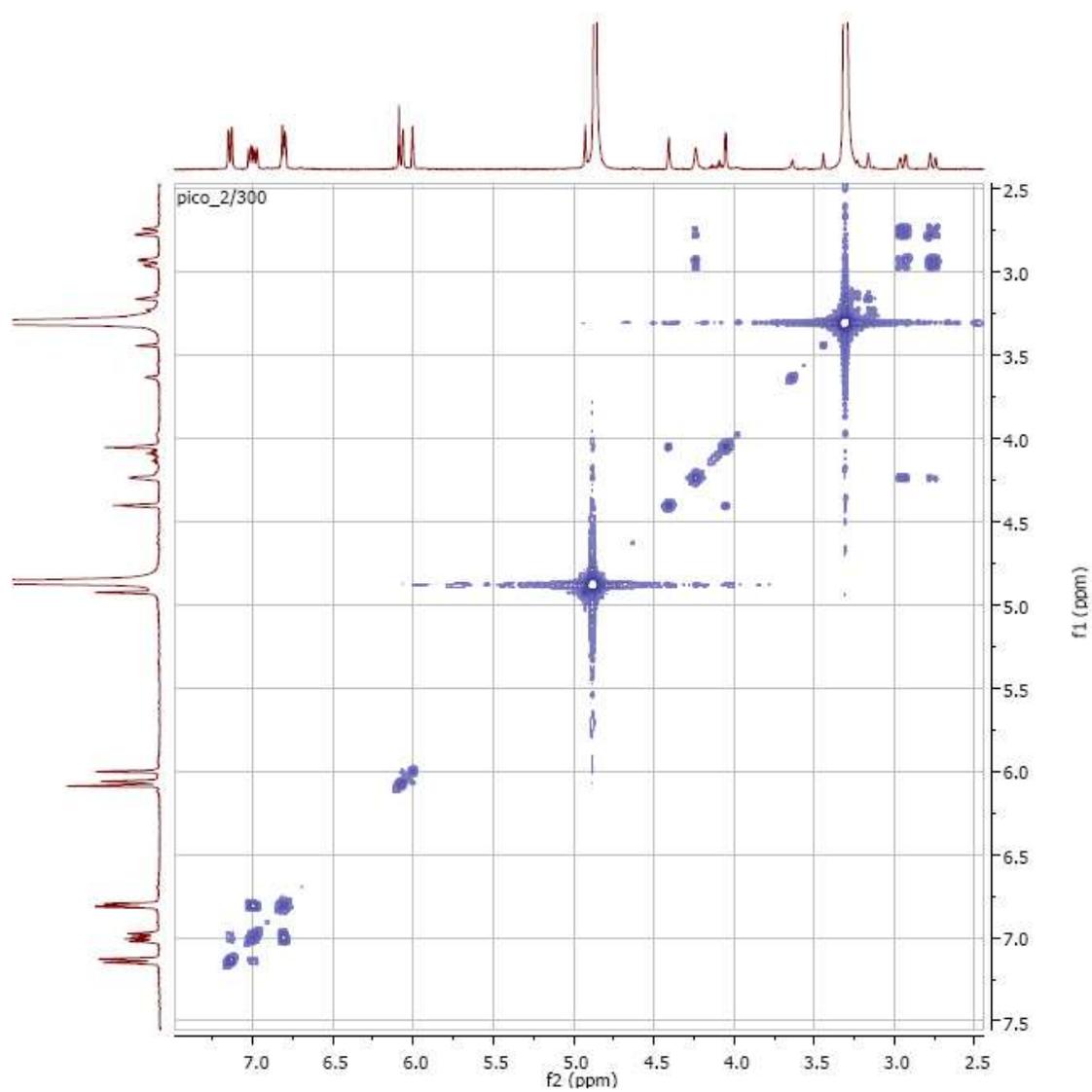
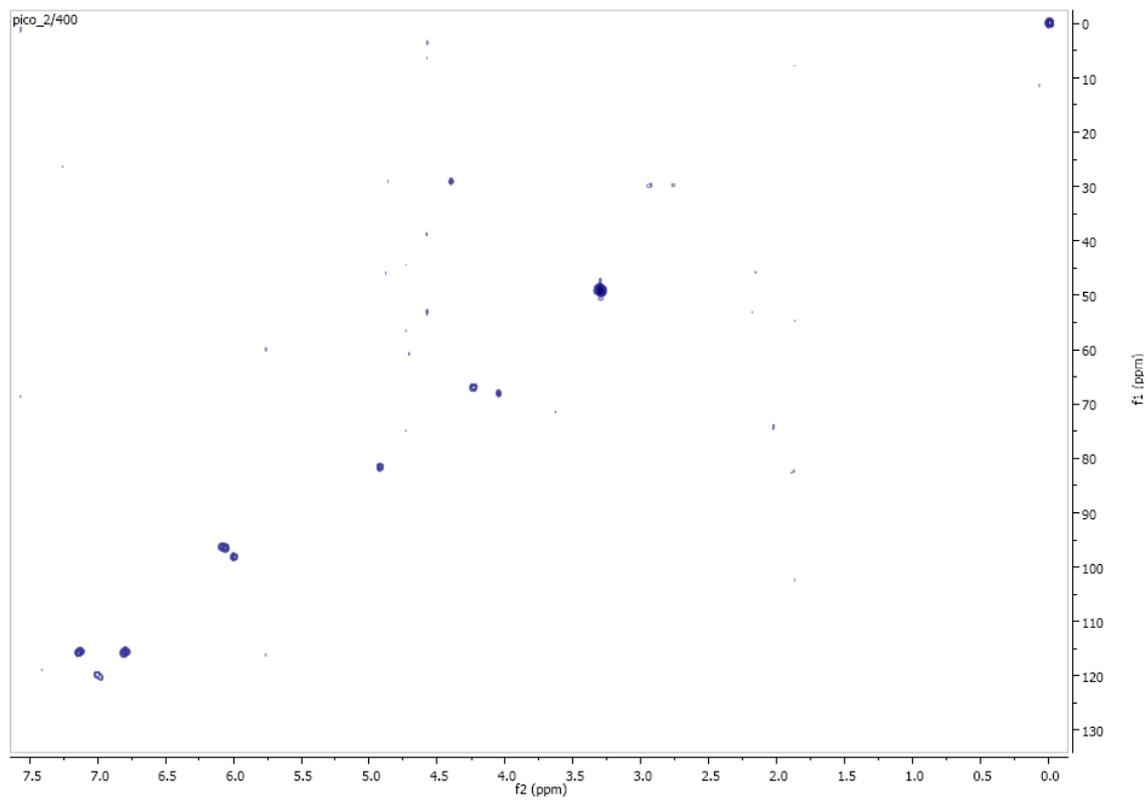


Figura 61 - Espectro COSY ^1H (500 MHz, CD_3OD) do composto 2

APÊNDICE G

Figura 62 - Espectro HMQC (500 MHz, CD₃OD) do composto 2

APÊNDICE H

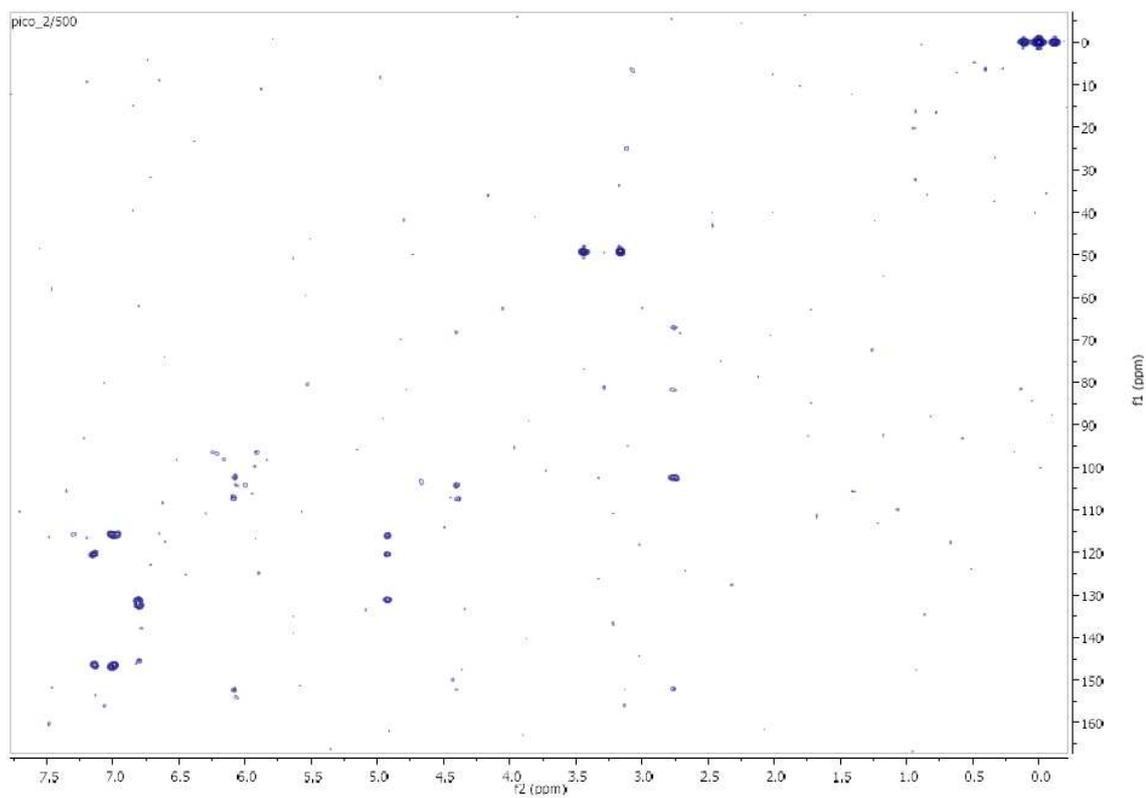


Figura 63 – Espectro HMBC 8Hz (500 MHz, CD₃OD) do composto 2