

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Compostos fenólicos de resíduos agroindustriais: identificação,  
propriedades biológicas e aplicação em matriz alimentar de base lipídica**

**Priscilla Siqueira Melo**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em  
Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de  
Alimentos

**Piracicaba  
2016**

**Priscilla Siqueira Melo**  
**Bacharel em Ciências dos Alimentos**

**Compostos fenólicos de resíduos agroindustriais: identificação, propriedades biológicas e aplicação em matriz alimentar de base lipídica**

Orientador:  
Prof. Dr. **SEVERINO MATIAS DE ALENCAR**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba**  
**2016**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Melo, Priscilla Siqueira

Compostos fenólicos de resíduos agroindustriais: identificação, propriedades biológicas e aplicação em matriz alimentar de base lipídica / Priscilla Siqueira Melo. - - Piracicaba, 2016.

181 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Compostos fenólicos 2. Atividade antioxidante 3. Superfície de resposta  
4. Oxidação lipídica 5. Atividade anti-inflamatória 6. Atividade antiproliferativa  
7. Fracionamento bioquímico 8. UHPLC-ESI-LTQ-MS I. Título

CDD 664.06  
M528c

**"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"**

*Ao Zeca, meu fiel amigo.*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em todas as suas formas de manifestação, por ter me concedido serenidade para enfrentar os momentos difíceis, força e coragem para os dias de fraqueza, saúde para desfrutar das oportunidades e luz para que eu pudesse trilhar meu caminho.

Aos meus pais, Aparecida e Edison, minha eterna gratidão por terem, apesar das dificuldades, me apresentado com uma vida tão rica em amor, dedicação, simplicidade, educação e caráter. Aos meus avós, Matilde e João, e às minhas irmãs, Patrícia e Renata, por todo o apoio, conselhos e incentivos que recebi.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição por terem me acolhido durante esses doze anos e pela oportunidade concedida para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador, professor Severino, pela confiança depositada em mim desde o início, pela oportunidade que me concedeu e por todos os ensinamentos e experiências compartilhados, os quais me permitiram evoluir profissionalmente. Obrigada, sobretudo, por toda paciência, dedicação e amizade.

À minha co-orientadora, professora Thaís Vieira, por todo o apoio estrutural e intelectual generosamente despendido para a concretização desta pesquisa.

Agradeço especialmente ao professor Leif H. Skibsted por gentilmente ter me recebido na Universidade de Copenhagen, pelas suas valiosas contribuições feitas a este trabalho e por todos os ensinamentos que essa experiência me proporcionou, os quais levarei por toda a vida.

Ao professor Daniel Cardoso e ao Leandro Arrivetti, do Instituto de Química de São Carlos (USP), pelo auxílio com as análises de UHPLC-ESI-LTQ-MS.

À professora Isabel Ferreira, do Instituto Politécnico de Bragança – Portugal, pelas análises de atividade antiproliferativa.

Ao professor Pedro Rosalen e à Carina Denny, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), pelas sempre frutuosas colaborações nos trabalhos.

Meus sinceros agradecimentos ao pesquisador Giuliano Elias Pereira, da Embrapa Semi-Árido, pela parceria firmada para o fornecimento das amostras de resíduos vinícolas. Minha gratidão se estende a todos os que me ajudaram na árdua etapa de coleta de amostras: Margarida, Sérgio e Luzimário.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão das bolsas e auxílio financeiro (nº 2011/12640-9 e nº 2014/17786-0).

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental, especialmente à Adna e Ivani, que me acompanharam de perto durante esta trajetória e sempre estiveram prontas para me ajudar e incentivar.

Às minhas queridas parceiras de trabalho com as quais compartilhei muitas angústias, conquistas, descobertas e alegrias durante esses anos de doutorado: Ana Paula, Heloísa, Juliana, Keityane e Maria Augusta.

Às minhas companheiras da república Saia Daki, pelas inúmeras noites de conversa e pela companhia acolhedora depois de um dia de trabalho: Skuna, Renata Gatti, Rapel e Vanessa.

A todos os meus amados amigos que, apesar de muitas vezes distantes, vivem presentes em meu coração: Dã-top, Sábado, Inmetro, Locutor, Paiedi, Roque, Gergelim, Kurau, Groselha, Renata, Amanda, Vânia, Samuel, Spinho, Phóton e Maku. Às pessoas especiais que encontrei durante minha estadia em Copenhagen e que contribuíram para tornar tudo mais fácil e menos solitário: Feibai, Yuting, Ning, André, Sílvia, Jeferson, Thaís, Natália, Elaine, Daniel...

Minha enorme e sincera gratidão à minha amiga-irmã Miriam (Traks), por todos os anos de companheirismo, amizade pura e verdadeira, por ser meu sinônimo para serenidade, resiliência e determinação. À minha amada amiga Zilmar por todas as ricas e boas conversas e por ser minha fonte de inspiração para a vida.

Ao Zeca, meu salsicha sapeca, que chegou num momento difícil da minha vida tornando-a mais feliz.

Ao Luzimário por todo o amor, paciência, compreensão e companheirismo compartilhados durante esse período.

A amizade é, entre outras coisas, uma das mais esplêndidas manifestações divinas e sou grata por ter sido enormemente abençoada.

À todos vocês, manifesto aqui minha eterna gratidão e carinho.

Para ser grande, sê inteiro: nada  
Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a lua toda  
Brilha, porque alta vive.

Ricardo Reis, heterônimo de Fernando Pessoa, *in* “Odes”



## SUMÁRIO

RESUMO .....	13
ABSTRACT .....	15
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	17
1 INTRODUÇÃO .....	19
Referências .....	24
2 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS EMPREGANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL MULTIVARIADO .....	31
Resumo .....	31
Abstract.....	31
2.1 Introdução.....	32
2.2 Material e métodos .....	33
2.2.1 Coleta e preparo das amostras de resíduos agroindustriais .....	33
2.2.2 Otimização das condições de extração de resíduos agroindustriais empregando planejamento experimental multivariado .....	35
2.2.2.1 Atividade antioxidante pelo método do radical livre ABTS .....	37
2.3 Resultados e discussão .....	37
2.4 Conclusão .....	53
Referências .....	54
3 COMPOSIÇÃO FENÓLICA E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....	57
Resumo .....	57
Abstract.....	57
3.1 Introdução.....	58
3.2 Material e métodos .....	60
3.2.1 Coleta e preparo dos extratos dos resíduos agroindustriais.....	60
3.2.2 Composição fenólica dos extratos dos resíduos agroindustriais .....	60
3.2.2.1 Teor de compostos fenólicos totais .....	60
3.2.2.2 Determinação de ácidos fenólicos e flavonoides por HPLC-DAD .....	60
3.2.3 Triagem dos resíduos agroindustriais com alto potencial antioxidante.....	62
3.2.3.1 Atividade sequestrante do radical livre DPPH .....	62
3.2.3.2 Atividade sequestrante do radical livre ABTS .....	62
3.2.3.3 Capacidade sequestrante do radical peroxila (ORAC).....	62
3.2.3.4 Autoxidação do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.....	63
3.2.3.5 Sistema de oxidação em óleo para avaliação de antioxidantes .....	64
3.2.3.5.1 Determinação da concentração de hidroperóxidos.....	64

3.2.4 Análise estatística.....	65
3.3 Resultados e Discussão .....	65
3.3.1 Compostos fenólicos totais .....	65
3.3.2 Identificação e quantificação de compostos fenólicos em resíduos agroindustriais.....	67
3.3.2.1 Identificação e quantificação de antocianinas em resíduos agroindustriais.....	70
3.3.3 Triagem de resíduos agroindustriais de alto potencial antioxidante .....	73
3.4 Conclusão.....	79
Referências.....	80
4 CONCENTRAÇÃO E FRACIONAMENTO BIOGUIADO PELA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE ENGAÇO <i>CHENIN BLANC</i> E SEMENTE DE AÇAÍ.....	85
Resumo.....	85
Abstract .....	85
4.1 Introdução .....	86
4.2 Material e métodos.....	87
4.2.1 Concentração dos extratos brutos de engaço <i>Chenin Blanc</i> e semente de açaí por resina Amberlite XAD <sup>®</sup> -2 .....	87
4.2.2 Fracionamento dos extratos concentrados de engaço <i>Chenin Blanc</i> e semente de açaí em gel Sephadex LH-20.....	87
4.2.3 Análises físico-químicas dos extratos brutos, concentrados e frações obtidas pela resina LH-20 .....	88
4.2.3.1 Agrupamento de frações similares por cromatografia em camada delgada (CCD).....	88
4.2.3.2 Quantificação de compostos fenólicos nos extratos e frações pela técnica de HPLC-DAD .....	88
4.2.3.3 Avaliação do perfil fenólico dos extratos e frações por espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-ESI-LTQ-MS) .....	89
4.2.4 Atividade antioxidante dos extratos e frações de semente de açaí e engaço <i>Chenin Blanc</i> .....	89
4.2.4.1 Atividade sequestrante do radical livre ABTS.....	90
4.2.4.2 Capacidade sequestrante do radical peroxila .....	90
4.2.4.3 Capacidade sequestrante do radical ânion superóxido.....	91
4.2.4.4 Capacidade sequestrante do ácido hipocloroso.....	91
4.2.4.5 Determinação da atividade antioxidante <i>on-line</i> por HPLC-ABTS.....	92
4.2.5 Atividade anti-inflamatória .....	92
4.2.6 Citotoxicidade em linhagens celulares tumorais humanas .....	93
4.2.7 Hepatotoxicidade (células PLP2).....	93
4.2.8 Análise estatística.....	93
4.3 Resultados e Discussão .....	94

4.3.1 Concentração dos extratos de engaço de <i>Chenin Blanc</i> e semente de açaí em resina Amberlite XAD <sup>®</sup> -2 .....	94
4.3.1.1 Engaço <i>Chenin Blanc</i> .....	94
4.3.1.2 Semente de açaí .....	98
4.3.2 Fracionamento dos extratos concentrados por gel Sephadex LH-20 .....	102
4.3.2.1 Engaço de uva <i>Chenin Blanc</i> .....	102
4.3.2.2 Semente de açaí .....	106
4.3.3 Avaliação do perfil cromatográfico das frações Sephadex LH-20 do engaço <i>Chenin Blanc</i> e semente de açaí por HPLC-DAD .....	111
4.3.4 Atividade antioxidante do extrato bruto, concentrado e frações da Sephadex LH-20 do engaço <i>Chenin Blanc</i> e semente de açaí .....	115
4.3.4.1 Atividade antioxidante pelos métodos de sequestro do radical livre ABTSe desativação do radical peroxila (ORAC) .....	115
4.3.4.2 Capacidade de sequestro do ânion superóxido (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ) e do ácido hipocloroso (HOCl) das frações bioativas selecionadas de engaço <i>Chenin Blanc</i> e semente de açaí .....	120
4.3.4.3 Atividade antioxidante <i>on-line</i> das frações bioativas de engaço <i>Chenin Blanc</i> e semente de açaí por HPLC-ABTS .....	124
4.3.5 Avaliação do perfil de compostos fenólicos dos extratos brutos, concentrados e frações bioativas de engaço <i>Chenin Blanc</i> e semente de açaí por espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-ESI-LTQ-MS) .....	128
4.3.6 Quantificação dos principais compostos fenólicos identificados nos extratos e frações de engaço <i>Chenin Blanc</i> e semente de açaí por HPLC-DAD .....	141
4.4 Conclusão .....	147
Referências .....	147
<b>5 AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE SEMENTE DE AÇAÍ E ENGAÇO DE UVA <i>CHENIN BLANC</i> ASSOCIADOS COM ALFA-TOCOFEROL NA INIBIÇÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM ÓLEO DE SOJA E SISTEMAS COLOIDAIIS .....</b>	<b>155</b>
Resumo .....	155
Abstract .....	155
5.1 Introdução .....	156
5.2 Material e métodos .....	158
5.2.1 Coleta e preparo das amostras de semente de açaí e engaço <i>Chenin Blanc</i> .....	158
5.2.2 Extração e concentração dos extratos da semente de açaí e do engaço de uva <i>Chenin Blanc</i> em resina Amberlite XAD <sup>®</sup> -2 .....	158
5.2.3 Teor de compostos fenólicos totais .....	158
5.2.4 Purificação e caracterização do óleo de soja .....	159
5.2.5 Espectroscopia de Ressonância de Spin Eletrônico (ESR) em óleo de soja .....	159
5.2.6 Peroxidação de lipossomos .....	160
5.2.7 Consumo de oxigênio em emulsão de metil linoleato .....	161
5.2.8 Análise estatística .....	161

5.3 Resultados e discussão .....	162
5.3.1 Teor de compostos fenólicos totais .....	162
5.3.2 ESR em óleo de soja: monitoramento da formação dos primeiros radicais livres .....	162
5.3.3 Peroxidação de lipossomos: monitoramento da formação de dienos conjugados .....	166
5.3.4 Consumo de oxigênio em uma emulsão de metil linoleato .....	169
5.4 Conclusão .....	173
Referências .....	173
6 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	177
ANEXOS .....	179

## RESUMO

### **Compostos fenólicos de resíduos agroindustriais: identificação, propriedades biológicas e aplicação em matriz alimentar de base lipídica**

A geração de resíduos sólidos pelas atividades agroindustriais tem criado a demanda por um reaproveitamento tecnológico desses materiais. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial bioativo e tecnológico de resíduos agroindustriais, como fontes naturais de compostos fenólicos com atividade antioxidante. Foram analisados resíduos agroindustriais vinícolas, de indústrias produtoras de polpas congeladas de frutas (açai, cajá, cupuaçu e graviola) e provenientes do beneficiamento de café e de laranja. Inicialmente, foi realizado um estudo para a determinação das condições ótimas de extração, empregando planejamento experimental multivariado com delineamento composto central rotacional, cujos resultados foram avaliados empregando a técnica de superfície de resposta. Na sequência, foram feitos a triagem dos resíduos, baseada na atividade antioxidante, e a caracterização fenólica dos extratos hidroalcoólicos obtidos dos resíduos agroindustriais. De acordo com os resultados de atividade antioxidante, engaço de uva da variedade *Chenin Blanc* (EC) e semente de açai (SA) foram os resíduos selecionados, os quais seguiram para as etapas de concentração e fracionamento bioguiado de sua(s) molécula(s) bioativa(s), as quais foram posteriormente identificadas por UHPLC-ESI-LTQ-MS. Extratos brutos e concentrados foram avaliados *in vitro* quanto à capacidade de desativação de espécies reativas de oxigênio (radicais peroxila, ânion superóxido e ácido hipocloroso) e então, aplicados em óleo de soja, emulsão e suspensão de lipossomos, a fim de se avaliar a efetividade desses extratos como antioxidante natural em matrizes lipídicas. Concentrações intermediárias de etanol (40-60%) e alta temperatura (96°C), exceto para semente de açai (25°C), foram as condições ótimas para a extração de antioxidantes dos resíduos agroindustriais. Epicatequina, ácido gálico, catequina e procianidina B1 foram os compostos de maior ocorrência, quando avaliados pela técnica de HPLC-DAD. O EC apresentou a maior atividade antioxidante global e SA a maior atividade entre os resíduos de polpas de frutas, laranja e café. A concentração dos extratos brutos de EC e SA, pela resina Amberlite XAD<sup>®</sup>-2, produziu aumento significativo da atividade antioxidante. Além disso, extratos brutos e concentrados apresentaram atividade antiproliferativa e anti-inflamatória. Os extratos concentrados foram fracionados por meio de Sephadex LH-20, a partir da qual foi possível identificar quatro frações de maior bioatividade para o EC e três para o SA. Procianidina B1, catequina, epicatequina e resveratrol foram identificados no extrato concentrado e frações de EC. Dezoito procianidinas poliméricas, catequina, epicatequina foram os principais compostos identificados em SA, por meio de UHPLC-ESI-LTQ-MS. Resveratrol também foi encontrado em SA pela primeira vez. Quando avaliados em óleo de soja, EC e SA demonstraram atividade pro-oxidante. Contudo, elevada atividade antioxidante foi verificada quando essas amostras foram aplicadas em sistemas lipídicos coloidais, pois retardaram o consumo de oxigênio em uma emulsão óleo/água e o período de indução na produção de dienos conjugados em uma suspensão de lipossomos. Portanto, os resíduos agroindustriais EC e SA possuem potencial tecnológico de reaproveitamento industrial podendo ser considerados possíveis matérias-primas para a obtenção de extratos ricos em antioxidantes ou pela extração de antioxidantes naturais de uso pelas indústrias farmacêutica e/ou de alimentos.

Palavras-chave: Compostos fenólicos; Atividade antioxidante; Superfície de resposta; Oxidação lipídica; Atividade anti-inflamatória; Atividade antiproliferativa; Fracionamento bioguiado; UHPLC-ESI-LTQ-MS



## ABSTRACT

### **Phenolic compounds of agroindustrial residues: identification, biological properties and application in lipid-based food matrix**

The solid waste generation by agroindustrial activities have created the demand for a technology reuse of these materials. The objective of this study was to evaluate the bioactive and technological potential of agroindustrial residues as sources of phenolic compounds with antioxidant activity. Agroindustrial residues from wineries, from industries producing frozen fruit pulps (acai, caja, cupuaçu and soursop) and from the processing of coffee and orange, were analyzed. Initially, a study using a multivariate experimental planning with central composite rotatable design was performed, whose results were evaluated by response surface technique. After, it was made the screening based on the antioxidant activity and the phenolic characterization of hydroalcoholic extracts of optimized agroindustrial residues. According to the results obtained for the antioxidant activity the residues grape stem from the variety Chenin Blanc (EC) and açaí seed (SA) were selected and followed to the steps of concentration and bioguided fractionation of their(s) molecule(s) bioactive(s), which were subsequently identified by UHPLC-ESI-LTQ-MS. Crude and concentrated extracts were evaluated *in vitro* for the deactivation capability of reactive oxygen species (peroxyl radicals, superoxide and hypochlorous acid) and then applied to soybean oil, emulsion and liposome suspension in order to evaluate the effectiveness these extracts as natural antioxidant in lipid matrices. Intermediate concentrations of ethanol (40-60%) and high temperature (96 °C), except for acai seed (25 °C) were the optimal conditions for the extraction of antioxidants from agroindustrial residues. Epicatechin, gallic acid, catechin and procyanidin B1 compounds were the most frequent molecules, when assessed by HPLC-DAD. The EC had the highest overall antioxidant activity and SA the greatest activity between residues of fruit pulp, orange and coffee. Concentration of the crude extracts of EC and SA, by Amberlite XAD<sup>®</sup>-2 resin, produced a significant increase in antioxidant activity. Furthermore, crude and concentrated extracts showed antiproliferative and anti-inflammatory activity. The concentrated extracts were fractionated by Sephadex LH-20, from which it was possible to identify four fractions of greater bioactivity for the EC and three for SA. Procyanidin B1, catechin, epicatechin and resveratrol were identified in the concentrated extract and EC fractions. Eighteen polymeric procyanidins, catechin, epicatechin were the major compounds identified in SA by UHPLC-ESI-LTQ-MS. Resveratrol has also been found for the first time in SA. When evaluated in soybean oil, EC and SA demonstrated pro-oxidant activity. However, high antioxidant activity was observed when these samples were evaluated on lipid colloidal systems, for delayed oxygen consumption in an emulsion oil/water and the induction period in the production of conjugated dienes in a liposome suspension. Therefore, the agroindustrial residues EC and SA have technological potential for industrial reuse and, thus, can be considered as raw material for obtaining antioxidant-rich extracts or by extraction of natural antioxidants useful for pharmaceutical and/or food industries.

**Keywords:** Phenolic compounds; Antioxidant activity; Response surface; Lipid oxidation; Anti-inflammatory activity; Antiproliferative activity; Bioguided fractionation; UHPLC-ESI-LTQ-MS



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH	2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride
ABTS	radical livre sintético; 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
AUC	Area Under Curve
AUCnet	área sob a curva subtraída a AUC do controle
BHA	antioxidante sintético; 2 e 3- <i>tert</i> -butil-4-hidroxianisol
BHT	antioxidante sintético; 3,5-di- <i>tert</i> -4-butilhidroxitolueno
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DHR	dihidrorodamina
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
DPPH	radical livre sintético; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
EC <sub>50</sub>	quantidade de amostra requerida para reduzir 50% dos radicais livres
ESR	Electron Spin Resonance
GI <sub>50</sub>	quantidade de amostra para inibir 50% do desenvolvimento celular tumoral
HeLa	carcinoma cervical
HepG2	carcinoma de células hepáticas
Hm	grupo heme
HO•	radical hidroxila
HOCl	ácido hipocloroso
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPLC-DAD	HPLC-Diode Array Detector
IP	Induction Period
LOD	Limite de Detecção
LOOH	hidroperóxido
LOQ	Limite de Quantificação
LPS	lipopolissacarídeo

MCF-7	carcinoma de mama
MMb	metamioglobina
NADPH	dinucleotídeo de adenina e nicotinamida fosfato
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NCI-H460	câncer de pulmão de células pequenas
NO	óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	ânion superóxido
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PBN	N- <i>tert</i> -butil- $\alpha$ -fenilnitrona
PLP2	células não tumorais de fígado
PMS	Phenazine Methosulfate
ROO <sup>•</sup>	radical peroxila
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI-1640	meio para cultivo celular Roswell Park Memorial Institute
SOD	superóxido dismutase
TBHQ	antioxidante sintético; <i>tert</i> -butil-hidroquinona
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
UHPLC-ESI-LTQ-MS	Ultra High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Linear Trap Quadrupole-Mass Spectrometry
UV	ultravioleta

## 1 INTRODUÇÃO

Em 2013, o agronegócio brasileiro contribuiu com 22% do Produto Interno Bruto (PIB) (CEPEA, 2016) colocando o Brasil como um dos principais países exportadores de produtos agrícolas no comércio mundial (BRASIL, 2015). Apesar do atual momento de recessão econômica, o agronegócio ainda segue com perspectiva de queda menor do que a prevista para o restante da economia (CEPEA, 2016), consolidando a importância deste segmento para o País.

As atividades agroindustriais brasileiras, contudo, levam à consequente geração de grandes quantidades de resíduos/subprodutos, muitos deles com alta concentração de material orgânico. A maior parte desse material é ainda descartada sem tratamento no solo ou utilizada na alimentação animal, destinos que a priori, não geram ganhos econômicos para a indústria, além de representarem gargalos logísticos e ambientais na sua disposição (YI et al., 2009).

Associado a este panorama, projeções sobre escassez de recursos naturais e consequente queda na qualidade de vida têm propulsionado ações em busca de sustentabilidade (PNUMA, 2005). Assim, a otimização do uso dos recursos, renováveis ou não, ganhou a atenção do Estado brasileiro com a aprovação da Política Nacional de Resíduos Sólidos (Lei nº 12.305/10) (BRASIL, 2010), que prevê a redução ou prevenção da geração de resíduos e a correta destinação dos rejeitos.

Diante disso, a elevada geração de resíduos pelas atividades agroindustriais no Brasil, que possui sua economia fortemente baseada no agronegócio, requer esforços multidisciplinares para a busca de um reaproveitamento tecnológico e economicamente viável desses materiais negligenciados.

Frente a esta demanda, pesquisas têm sido feitas para avaliar a composição química de resíduos agroindustriais, visando torná-los matérias primas passíveis de exploração industrial. Muitos deles revelaram a presença de compostos bioativos de grande importância para a indústria de alimentos e farmacêutica, tais como os compostos fenólicos (WANG et al., 2010; ROCKENBACH et al., 2011).

Os compostos fenólicos são moléculas amplamente distribuídas no reino vegetal estando, portanto, presentes de forma significativa na dieta humana. Esses compostos são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas em resposta aos raios ultravioleta, estresse hídrico, insetos, vírus e bactérias. Estruturalmente, são caracterizados por possuírem pelo menos um anel aromático e um ou mais grupos hidroxila. Além disso, podem ocorrer na forma livre ou conjugada a açúcares, ácidos e outras biomoléculas, sendo divididos em dois grandes grupos: flavonoides e ácidos fenólicos. Devido à capacidade dos compostos fenólicos

estabilizarem radicais livres ao doarem um elétron ou hidrogênio, são reconhecidos como importantes antioxidantes (HELENO et al., 2015; ROLEIRA et al., 2015; SKROVANKOVA et al., 2015).

Os antioxidantes desempenham papel fundamental no sistema fisiológico, contribuindo para a prevenção de doenças cardiovasculares (VINSON et al., 1995), processos inflamatórios (DENNY et al., 2014), doenças neurodegenerativas (JEONG et al., 2011) e câncer (CHOUDHURY et al., 2010). São também empregados para fins tecnológicos como forma de combater a oxidação lipídica em alimentos – processo deteriorativo que promove perda de qualidade nutricional e sensorial pela produção de compostos finais tóxicos, representando uma das principais causas de degradação de alimentos durante o período de estocagem (BAYDAR; ÖZKAN; YAŞAR, 2007; LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

A fim de evitar o processo oxidativo, a indústria de alimentos utiliza antioxidantes como o BHA (butil-hidroxianisol), o BHT (butil-hidroxitolueno) e o TBHQ (terc-butilhidroquinona), os quais são obtidos de forma sintética. O uso deles, entretanto, tem despertado preocupação quanto às suas doses de segurança e toxicidade (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). No Brasil, a utilização desses aditivos é controlada (máximo de 200 mg/kg de óleos e gorduras) (BRASIL, 2011). Já a Europa, após extensa reavaliação das informações de toxicidade disponíveis sobre esses compostos sintéticos estabeleceu, além dos limites máximos permitidos para o uso de BHT (100 mg/kg de óleos e gorduras), BHA e TBHQ (200 mg/kg de óleos e gorduras), os valores de Ingestão Diária Aceitável (IDA) para esses antioxidantes: BHT (0,25 mg/kg/dia), BHA (1,0 mg/kg/dia) e TBHQ (0-0,7 mg/kg/dia), sendo este último até então de uso proibido (EFSA, 2004; EFSA, 2011; EFSA, 2012).

Como consequência disso, a busca por novas fontes de substâncias bioativas naturais têm sido o foco de várias pesquisas ultimamente, inclusive, investigando uma ampla gama de resíduos agroindustriais (MELO et al., 2011; OLDONI et al., 2016).

Embora estudos já tenham pesquisado a composição química de resíduos agroindustriais, em busca de novas fontes promissoras de compostos bioativos naturais, estudos mais aprofundados abordando a elucidação das moléculas de interesse para a indústria, bem como ensaios de aplicação tecnológica são escassos.

Muitas são as justificativas para o aumento das pesquisas nesta área: primeiramente, a diminuição do impacto do descarte desses resíduos no meio ambiente, ao passo que uma reutilização seja criada para esses materiais; em segundo lugar, a oportunidade para a

indústria em substituir os aditivos sintéticos por naturais; e, em terceiro, a maior taxa de aproveitamento da cadeia produtiva industrial e do alimento como um todo.

No contexto agroindustrial, o setor vinícola destaca-se mundialmente e tem se expandido no Brasil. Na safra de 2013-2014, a produção brasileira de uva alcançou 1,5 milhão de toneladas, consolidando o aumento progressivo na produção dessa fruta no País (FAO, 2016). A uva pode ser consumida *in natura* ou destinada ao processamento industrial para a produção de suco e vinho. Durante as etapas de transformação, contudo, são gerados resíduos agroindustriais, os quais destacam-se por serem fontes de antioxidantes e compostos fenólicos (GONZÁLEZ-PARAMÁS et al., 2004; RUBILAR et al., 2007; MELO et al., 2015), bem como pela quantidade expressiva gerada no processamento, já que a soma deles, bagaço (cascas e sementes), engaço e a borra do processo fermentativo, representam em média 30% do volume de uvas vinificadas (MAKRIS; BOSKOU; ANDRIKOPOULOS, 2007). Ácido gálico, catequina, epicatequina e quercetina, os quais se constituem em fortes antioxidantes, já foram identificados em bagaço de uva (WANG et al., 2010), sementes (SPRANGER et al., 2008) e engaço (MAKRIS; BOSKOU; ANDRIKOPOULOS, 2007). Embora recente, o setor vitivinícola brasileiro tem avançado tanto em novos produtos elaborados quanto na produção de uvas destinadas ao consumo *in natura* (MELLO, 2006), o que o torna uma grande fonte de resíduos com alto potencial de reaproveitamento.

Outra importante fonte geradora de resíduos agroindustriais no Brasil é a indústria processadora de frutas para a obtenção de sucos e polpas congeladas. O aumento da demanda por produtos de preparo rápido e prático tem contribuído para a expansão deste segmento agroindustrial no país. Muitas frutas regionais como o açaí, por exemplo, têm ganhado visibilidade e expansão de seu consumo. Isto se deve em parte devido ao reconhecimento dos valores nutricionais e biológicos e às técnicas de processamento aplicadas que permitem o aumento da vida útil, possibilitando o transporte e comercialização a mercados nacionais e internacionais (RUFINO et al., 2010). A grande oferta de frutas no Brasil aliada ao aumento da demanda por produtos de maior praticidade têm conduzido a ampliação deste setor no país, levando a um conseqüente aumento na geração de resíduos sólidos.

Os resíduos provenientes do processamento de quatro frutas destinadas à produção de polpas congeladas foram analisados neste trabalho, são elas: cajá, cupuaçu, graviola e açaí.

O cajá, fruto da cajazeira (*Spondias mombin* L.), originário da América Central, cresce espontaneamente na região nordeste do Brasil, onde é muito apreciado e consumido (SAMPAIO et al., 2007). Estudos mostraram que um composto presente nas folhas de cajá possui forte atividade inibitória para a enzima alfa-amilase, podendo assim ser usado para

diminuir hiperglicemia pós-prandial (FRED-JAIYESIMI; KIO; RICHARD, 2009), bem como controlar a *diabetes mellitus* (FRED-JAIYESIMI; KIO, 2009). Em outro estudo, extratos das folhas de cajá mostraram efeito sedativo e antidopaminérgico (AYOKA et al., 2006). Entretanto, pesquisas sobre a composição fenólica e atividade antioxidante de sua semente ainda não foram realizados.

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) é um fruto típico da Amazônia brasileira sendo um dos mais promissores economicamente, dentre os muitos da flora amazônica. Atualmente os frutos são industrializados e comercializados principalmente na forma de polpa (CARVALHO; GARCÍA; AMAYA-FARFÁN, 2006; QUIJANO; PINO, 2007). Por também pertencer ao mesmo gênero do cacaueteiro, as sementes, obtidas no despolpamento, têm recebido atenção especial devido o seu potencial de uso como substituintes do chocolate. Além disso, dois flavonoides glicosilados sulfatados e nove flavonoides agliconas, entre eles catequina, epicatequina, quercetina e kaempferol já foram identificados nas sementes de cupuaçu (YANG et al., 2003), o que torna o resíduo gerado uma fonte de antioxidantes naturais.

A graviola (*Annona muricata*) é encontrada da América Central à América do Sul e aqui no Brasil distribui-se nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste. Vários autores já isolaram e identificaram acetogeninas de espécies da família *Annonaceae*, à qual pertence à graviola. Estes compostos mostraram elevadas atividades antioxidante (LIMA; PIMENTA; BOAVENTURA, 2010), citotóxica, antiproliferativa, antimicrobiana e imunossupressiva (BERMEJO et al., 2005). Porém, ainda nada se conhece sobre os resíduos gerados no processamento dessa fruta.

O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) é o fruto de uma palmeira tropical nativa, a qual é disseminada naturalmente em toda a região Amazônica (KANG et al., 2012). Segundo o IBGE, a extração brasileira do fruto, em 2014, foi de 198 mil toneladas, sendo o estado do Pará o principal produtor (IBGE, 2015). Seus frutos são energéticos e ricos em fitoquímicos com propriedades antioxidante, antiproliferativa e anti-inflamatória (HOGAN, et al., 2010; KANG et al., 2011; YAMAGUCHI et al. 2015). O consumo, inicialmente restrito às regiões de produção desta palmeira, ganhou o mercado nacional e internacional, principalmente Estados Unidos e Europa, o que foi propulsionado, principalmente, por suas alegações de benefícios à saúde (HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011). O principal produto de exportação consiste de uma mistura da massa do açaí com outras frutas como o guaraná e a acerola. O processamento envolve a maceração e despolpamento dos frutos com água a fim de

se obter um líquido com textura cremosa, processo pelo qual se originam resíduos como cascas e sementes (EMBRAPA, 2006).

Além dos resíduos já citados, a indústria processadora de café também gera uma grande quantidade de materiais residuais. O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo, devido ao seu aroma e sabor agradáveis. A estimativa de produção da safra nacional de café para 2016, segundo o IBGE, é de 2,9 milhões de toneladas, configurando o Brasil como o maior produtor mundial de café (IBGE, 2015). Durante seu processamento, são gerados resíduos sólidos, dentre os quais a casca e a borra são os principais. As borras são geradas, a nível industrial, no beneficiamento do grão para a produção de café solúvel, numa proporção de 0,91 kg para cada quilo de café solúvel produzido, representando um grande montante residual (SILVA et al., 1998). Extrato aquoso de borra de café analisado por Yen et al. (2005), apresentou alta atividade antioxidante, a qual foi devida, segundo os autores, à presença de ácidos fenólicos (ácido clorogênico e ácido caféico) e compostos não fenólicos (cafeína, trigonelina, ácido nicotínico e 5-(hidroximetil) furfuraldeído). Esses compostos podem agir tanto como antioxidantes primários, quanto secundários. A borra de café torna-se assim um resíduo atraente, tanto em relação a sua interessante composição química, quanto à elevada quantidade gerada.

Outro setor de grande destaque nacional é a citricultura. A laranja é uma das frutas mais produzidas e consumidas em todo o mundo, estando o Brasil como o principal produtor e exportador de seu suco. Em 2015, ao final da safra de laranja, foram colhidas mais de 13,7 milhões de toneladas da fruta (IBGE, 2015). Na safra de 2013-2014, aproximadamente nove milhões de toneladas de laranja, produzidas somente no estado de São Paulo – o principal produtor nacional – foram destinadas à moagem industrial (CONAB, 2013). Durante seu processamento, metade do peso da laranja é convertido em suco, sendo o restante representado por seus resíduos e subprodutos, sólidos e líquidos. Embora muitos desses materiais sejam destinados à alimentação animal na forma de *pellets* ou comercializados como óleos essenciais, o resíduo líquido, como a “água amarela” ainda possui alto potencial de poluição ambiental por ser constituída por grande parte de matéria orgânica (REZZADORI; BENEDETTI; AMANTE, 2012). Em contrapartida, cascas e folhas de laranja demonstraram possuir alta atividade antioxidante em muitos estudos já realizados (GARAU et al., 2007; KHAN et al., 2010; LAGHA-BENAMROUCHE; MADANI, 2013), revelando a possibilidade de reaproveitamento desses materiais que ainda são descartados.

Diante do panorama exposto, o objetivo geral desse estudo foi identificar compostos fenólicos naturais com atividade antioxidante de fontes alternativas e com potencial aplicação

industrial. A partir das informações aqui geradas, espera-se criar subsídios para a reinserção de subprodutos agroindustriais por meio da obtenção de extratos/frações ricos em antioxidantes naturais ou pela extração de compostos bioativos de interesse e uso pelas indústrias farmacêutica e/ou de alimentos.

Para isso, este trabalho foi dividido em cinco etapas, as quais originaram os capítulos desta tese. O capítulo 1 apresentou uma introdução geral acerca do tema estudado. No segundo capítulo, o estudo de otimização das condições de extração de compostos antioxidantes a partir de resíduos agroindustriais é apresentado. O capítulo 3 é composto pela composição fenólica e a triagem dos dezessete resíduos de acordo com a atividade antioxidante. Após a seleção das amostras mais bioativas, estas seguiram para o fracionamento bioguiado para a obtenção de frações mais concentradas em compostos fenólicos e de maior atividade antioxidante (capítulo 4). Por fim, extratos brutos e concentrados dos resíduos selecionados foram aplicados em matrizes lipídicas como fontes de antioxidantes naturais (capítulo 5).

## Referências

- AYOKA, A.O.; AKOMOLAFE, R.O.; IWALEWA, E.O.; AKANMU, M.A.; UKPONMWAN, O.E. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (*Anacardiaceae*) in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 103, n.2, p. 166–175, 2006.
- 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, n.1, p. 191–203, 2006.
- BAYDAR, N. G.; ÖZKAN, G.; YAŞAR, S. Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 9, p. 1131–1136, 2007.
- BERMEJO, A.; FIGADÈRE, B.; ZAFRA-POLO, M.-C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Reports**, London, v. 22, p. 269–303, 2005.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução –RDC nº 23, de 15 de fevereiro de 2005**. Brasília, 2005. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2005/rdc/23\\_05rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2005/rdc/23_05rdc.htm)>. Acesso em: 29 jun. 2011.
- \_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do agronegócio**. Brasil 2014/15 a 2024/25. Projeções de Longo Prazo. Brasília, 2015. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/PROJECOES\\_DO\\_AGRONEGOCIO\\_2025\\_WEB.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/PROJECOES_DO_AGRONEGOCIO_2025_WEB.pdf)>. Acesso em: 26 jan. 2016.

\_\_\_\_\_. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. **Lei nº12.305, de 02 de agosto de 2010**. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei nº9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. Brasília, 2010. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2010/lei/l12305.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/l12305.htm)>. Acesso em 22 jan. 2016.

CARVALHO, A.V.; GARCÍA, N.H.P.; AMAYA-FARFÁN, J. Physico-chemical properties of the flour, protein concentrate, and protein isolate of the cupuassu (*Theobroma grandiflorum* Schum) seed. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 71, n.8, p. 573-578, 2006.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA (CEPEA). **PIB do Agronegócio – dados de 1994 a 2013**. Piracicaba, 2016. Disponível em: <<http://cepea.esalq.usp.br/pib/>>. Acesso em: 26 jan. 2016.

\_\_\_\_\_. **Retrospectiva 2015**. Desempenho do agronegócio brasileiro em 2015 e perspectivas para 2016. Piracicaba, 2016. Disponível em: <<http://cepea.esalq.usp.br/pib/>>. Acesso em: 26 jan. 2016.

CHOUDHURY, D.; DAS, A.; BHATTACHARYA, A.; CHAKRABARTI, G. Aqueous extract of ginger shows antiproliferative activity through disruption of microtubule network of cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 10, p. 2872–2880, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira – Laranja**. Safra 2013/2014, Segunda Estimativa, São Paulo e Triângulo Mineiro. Agosto de 2013. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_08\\_09\\_14\\_40\\_40\\_boletim\\_laranja\\_2o\\_2013.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_09_14_40_40_boletim_laranja_2o_2013.pdf)>. Acesso em: 10 mar. 2014.

DENNY, C.; LAZARINI, J.G.; FRANCHIN, M.; MELO, P.S.; PEREIRA, G.E.; MASSARIOLI, A.P.; MORENO, I.A.M.; PASCHOAL, J.A.R.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L. Bioprospection of Petit Verdot grape pomace as a source of anti-inflammatory compounds. **Journal of Functional Foods**, London, v. 8, p. 292-300, 2014.

EFSA. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the commission related to tertiary-butylhydroquinone (TBHQ). **The EFSAJ Journal**, Parma, v. 84, p. 1–50, 2004.

\_\_\_\_\_. Panel on food additives and nutrient sources added to food (ANS); Scientific opinion on the reevaluation of butylated hydroxyanisole – BHA (E320) as a food additive. **The EFSAJ Journal**, Parma, v. 9, n.10, p. 1-49, 2011.

\_\_\_\_\_. Panel on food additives and nutrient sources added to food (ANS); Scientific opinion on the reevaluation of butylated hydroxytoluene BHT (E321) as a food additive. **The EFSAJ Journal**, Parma, v. 10, n.3, p. 1-43, 2012.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Sistema de produção do açaí**. Embrapa Amazônia Oriental. Sistemas de Produção, 4 - 2ª Edição ISSN 1809-4325 Versão Eletrônica, 2006. Disponível em: <[https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai\\_2ed](https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed)>. Acesso em: 02 jun. 2014

FAO. **FAOSTAT**. 2016. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 22 jan 2016.

FRED-JAIYESIMI, A.; KIO, A. Antidiabetic activity of *Spondias mombin* extract in NIDDM rats. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 47, n. 3, p. 215–218, 2009.

FRED-JAIYESIMI, A.; KIO, A.; RICHARD, W.  $\alpha$ -Amilase inhibitory effect of 3 $\beta$ -olean-12-en-3-yl (9Z)-hexadec-9-enoate isolated from *Spondias mombin* leaf. **Food Chemistry**, Barking, v. 116, p. 285-288, 2009.

GARAU, M.C.; SIMAL, S.; ROSSELLÓ, C.; FEMENIA, A. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fiber and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. Canoneta) by-products. **Food Chemistry**, Barking, v. 104, n. 3, p. 1014–1024, 2007.

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 Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 2, p. 234–238, 2004.

HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) – A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. **Phytochemistry Letters**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 10–21, 2011.

HELENO, S.A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M.J.R.P.; FERREIRA, I.C.F.R. Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds: a review. **Food Chemistry**, Barking, v. 173, p. 501–513, 2015.

HOGAN, S.; CHUNG, H.; ZHANG, L.; LI, J.; LEE, Y.; DAI, Y.; ZHOU, K. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. **Food Chemistry**, Barking, v. 118, n. 2, p. 208–214, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola 2015**. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default\\_publica.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default_publica.shtm)>. Acesso em: 22 jan. 2016.

\_\_\_\_\_. **Produção da extração vegetal e da silvicultura 2014**. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2014/default\\_xls.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2014/default_xls.shtm)>. Acesso em: 18 set. 2015.

JEONG, C.H.; KWAK, J.H.; KIM, J.H.; CHOI, G.N.; KIM, D.O.; HEO, H.J. Neuronal cell protective and antioxidant effects of phenolics obtained from *Zanthoxylum piperitum* leaf using in vitro model system. **Food Chemistry**, Barking, v. 125, n. 2, p. 417–422, 2011.

KANG, J.; THAKALI, K.M.; XIE, C.; KONDO, M.; TONG, Y.; OU, B.; JENSEN, G.; MEDINA, M. B.; SCHAUSS, A. G.; WU, X. Bioactivities of açai (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. **Food Chemistry**, Barking, v. 133, n. 3, p. 671–677, 2012.

KANG, J.; XIE, C.; LI, Z.; NAGARAJAN, S.; SCHAUSS, A. G.; WU, T.; WU, X. Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Chemistry**, Barking, v. 128, n. 1, p. 152–157, 2011.

KHAN, M.K.; ABERT-VIAN, M.; FABIANO-TIXIER, A.S.; DANGLES, O.; CHEMAT, F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. **Food Chemistry**, Barking, v. 119, n. 2, p. 851–858, 2010.

LAGHA-BENAMROUCHE, S.; MADANI, K. Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 50, p. 723–730, 2013.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 244–282, 2007.

LIMA, L.A.R.S.; PIMENTA, L.P.S.; BOAVENTURA, M.A. D. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. **Food Chemistry**, Barking, v. 122, n. 4, p. 1129–1138, 2010.

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, n. 2, p. 125–132, 2007.

MELLO, L.M.R. **Produção e comercialização de uvas e vinhos: panorama 2005**. Embrapa Uva e Vinho – Artigo Técnico, 2006. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/panorama2005-producao.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2011.

MELO, P.S.; BERGAMASCHI, K.B.; TIVERON, A.P.; MASSARIOLI, A.P.; OLDONI, T.L.C.; ZANUS, M.C.; PEREIRA, G.E.; ALENCAR, S.M. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 6, p. 1088–1093, 2011.

MELO, P.S.; MASSARIOLI, A.P.; DENNY, C.; SANTOS L.F.; FRANCHIN, M.; PEREIRA, G.E.; VIEIRA, T.M.F.S.; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.M. DE. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, Barking, v. 181, p. 160–169, 2015.

OLDONI, T.L.C.; MELO, P.S.; MASSARIOLI, A.P.; MORENO, I.A. M.; BEZERRA, R. M.N.; ROSALEN, P.L.; SILVA, G.V.J.; NASCIMENTO, A.M.; ALENCAR, S.M. Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*) skin by combination of chromatography techniques. **Food Chemistry**, Barking, v. 192, p. 306–312, 2016.

PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O MEIO AMBIENTE – PNUMA. **A produção mais limpa e o consumo sustentável na América Latina e Caribe**. Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB. 2005, 134 p.

QUIJANO, C.E.; PINO, J. A. Volatile compounds of copoazú (*Theobroma grandiflorum* Schumann) fruit. **Food Chemistry**, Barking, v. 104, n. 3, p. 1123–1126, 2007.

REZZADORI, K.; BENEDETTI, S.; AMANTE, E.R. Proposals for the residues recovery: Orange waste as raw material for new products. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 90, n. 4, p. 606–614, 2012.

ROCKENBACH, I.I.; RODRIGUES, E.; GONZAGA, L.V.; CALIARI, V.; GENOVESE, M.I.; GONÇALVES, A.E.D.S.S.; FETT, R. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. **Food Chemistry**, Barking, v. 127, n. 1, p. 174–179, 2011.

ROLEIRA, F.M.F.; TAVARES-DA-SILVA, E.J.; VARELA, C.L.; COSTA, S.C.; SILVA, T.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Plant derived and dietary antioxidants: anticancer properties. **Food Chemistry**, Barking, v. 183, p. 235–258, 2015.

RUBILAR, M.; PINELO, M.; SHENE, C.; SINEIRO, J.; NUÑEZ, 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, n. 25, p. 10101–10109, 2007.

RUFINO, M.D.S.M.; ALVES, R.E.; DE BRITO, E.S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, Barking, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.

SAMPAIO, S.A.; BORA, P.S.; HOLSCHUH, H.J.; SILVA, S.D.M. Postharvest respiratory activity and changes in some chemical constituents during maturation of yellow mombin (*Spondias mombin*) fruit. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 511–515, 2007.

SILVA, M.A.; NEBRA, S.A.; MACHADO SILVA, M.J.; SANCHEZ, C.G. The use of biomass residues in the Brazilian soluble coffee industry. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 14, n. 5/6, p. 457–467, 1998.

SKROVANKOVA, S.; SUMCZYNSKI, D.; MLCEK, J.; JURIKOVA, T.; SOCHOR, J. Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 16, p. 24673 – 24706, 2015.

SPRANGER, I.; SUN, B.; MATEUS, A.M.; FREITAS, V.; RICARDO-DA-SILVA, J.M. Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds. **Food Chemistry**, Barking, v.108, p. 519-532, 2008.

TORRES, J.L.; BOBET, R. New flavanol derivatives from grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant aminoethylthio-flavan-3-ol conjugates from a polymeric waste fraction used as a source of flavanols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 10, p. 4627–4634, 2001.

VINSON, J.A.; DABBAGH, Y.A.; SERRY, M.M.; JANG, J. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 43, n. 11, p. 2800–2802, 1995.

- WANG, X.; TONG, H.; CHEN, F.; GANGEMI, J.D. Chemical characterization and antioxidant evaluation of muscadine grape pomace extract. **Food Chemistry**, Barking, v. 123, n. 4, p. 1156–1162, 2010.
- YAMAGUCHI, K.K.D.L.; PEREIRA, L.F.R.; LAMARÃO, C.V.; LIMA, E.S.; VEIGA-JUNIOR, V.F. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, Barking, v. 179, p. 137–151, 2015.
- YANG, H.; PROTIVA, P.; CUI, B.; MA, C.; BAGGETT, S.; HEQUET, V.; MORI, S.; WEINSTEIN, B.; KENNELLY, E. J. New bioactive polyphenols from *Theobroma grandiflorum* (“cupuaçu”). **Journal of Natural Products**, Pittsburg, v. 66, n. 11, p. 1501–1504, 2003.
- YEN, W.-J.; WANG, B.-S.; CHANG, L.-W.; DUH, P.-D. Antioxidant Properties of Roasted Coffee Residues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 7, p. 2658–2663, 2005.
- YI, C.; SHI, J.; KRAMER, J.; XUE, S.; JIANG, Y.; ZHANG, M.; MA, Y.; POHORLY, J. Fatty acid composition and phenolic antioxidants of winemaking pomace powder. **Food Chemistry**, Barking, v. 114, n. 2, p. 570–576, 2009.



## **2 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS EMPREGANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL MULTIVARIADO**

### Resumo

Uma grande quantidade de resíduos sólidos é gerada a partir das atividades agroindustriais em todo o mundo. Alguns desses resíduos já foram identificados como fontes promissoras de antioxidantes naturais, porém a determinação das melhores condições de extração de compostos bioativos dessas matrizes não é muito investigada. Assim, esse trabalho teve como objetivo otimizar as condições de extração de resíduos agroindustriais visando a obtenção de extratos com elevada atividade antioxidante, empregando planejamento experimental multivariado com Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), cujos resultados foram avaliados empregando a técnica estatística de superfície de resposta. Dezesete amostras de resíduos agroindustriais foram extraídas de acordo com os onze ensaios estabelecidos no DCCR. A medida dos efeitos das variáveis independentes (porcentagem de etanol e temperatura) sobre a resposta (atividade antioxidante) foi realizada por meio do método de sequestro do radical livre ABTS. Os gráficos de superfície de resposta permitiram identificar quatro diferentes condições de extração onde a atividade antioxidante foi mais elevada e os recursos (temperatura e etanol) foram utilizados de forma racional: 96°C/43% de etanol; 96°C/57% de etanol; temperatura ambiente/57% de etanol; e 96°C/96% de etanol. Os modelos matemáticos de cada amostra foram validados e mostraram ser adequados. O uso do método de superfície de resposta permitiu a otimização das condições de extração de resíduos agroindustriais e o uso eficiente dos recursos para a obtenção de extratos com elevada atividade antioxidante.

Palavras-chave: Delineamento Composto Central Rotacional; Atividade antioxidante; Extração

### Abstract

A big quantity of solid wastes is generated by agroindustrial activities all over the world. Many of these agroindustrial residues have already been identified as promising sources of natural antioxidants, but the knowledge about the best conditions to extract bioactive compounds of these materials is not be so investigated. Thus, this work aimed the optimization of the extraction conditions of agroindustrial residues to obtain extracts with high antioxidant activity, using multivariate experimental planning with Central Composite Rotatable Design (CCRD), whose results were evaluated by response surface statistical technique. Seventeen samples of agroindustrial residues were extracted according to eleven assays established by CCRD. The measurement of the effects of independent variables (ethanol percentage and temperature) on response (antioxidant activity) was performed by the scavenging of the free radical ABTS method. The response surface graphs allowed to identify four different extraction conditions where the antioxidant activity was higher and the resources (heat and ethanol) were used rationally: 96°C/ 43% of ethanol; 96°C/57% of ethanol; room temperature/57% of ethanol; and 96°C/96% of ethanol. The mathematic models of each sample were validated and showed to be adequate. The use of response surface method allowed the optimization of extraction conditions of agroindustrial residues and the efficient utilization of the resources to obtain the extracts with high antioxidant activity.

Keywords: Central Composite Rotatable Design; Antioxidant activity; Extraction

## 2.1 Introdução

O setor agroindustrial brasileiro é de grande importância para a economia do país e, como resultado de suas atividades, são produzidas enorme quantidade e diversidade de resíduos sólidos, os quais são descartados ao meio ambiente, em sua maioria, sem tratamento. Muitos desses materiais são fontes de compostos fenólicos e antioxidantes naturais (MELO et al., 2015). Contudo, essas substâncias se encontram em baixa concentração em fontes vegetais e para que extratos com alta atividade antioxidante sejam produzidos, de forma a possibilitar o uso industrial, são necessários processos que otimizem a extração dos compostos ativos (OLDONI et al., 2016).

Para isso, delineamentos experimentais guiados por métodos estatísticos podem ser utilizados para estudar as variáveis que influem sobre a resposta esperada e, dessa forma, auxiliar na escolha da melhor combinação de variáveis que resultem em maior resposta ao passo que combinam o uso racional dos recursos. Um dos métodos que têm sido usados para aumentar a extratibilidade de compostos antioxidantes é o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), utilizando o método de superfície de resposta (POMPEU; SILVA; ROGEZ, 2009; KARACABEY; MAZZA, 2010). Esse método engloba um conjunto de cálculos estatísticos e matemáticos baseados no ajuste de uma equação polinomial que mostra o comportamento dos dados obtidos em função das variáveis estudadas. É usado para aperfeiçoar processos por meio do conhecimento das faixas ótimas de interesse para essas variáveis. Esse método é composto por números reduzidos de ensaios experimentais e, portanto, depende de menor tempo e custo de análise (TABARAKI; HEIDARIZADI; BENVIDI, 2012).

Muitas variáveis podem afetar, positiva ou negativamente, a extração de antioxidantes a partir de fontes naturais. Entre elas estão a composição, tipo e coeficiente de partição do solvente, tempo de extração, temperatura, pH, tamanho de partícula, razão sólido-líquido, agitação, entre outros (POMPEU et al., 2009). Tradicionalmente, o estudo de otimização de um processo é realizado empregando planejamentos experimentais univariados avaliando os efeitos individuais de cada um dos fatores estudados sobre a resposta, a fim de identificar as condições ótimas de extração. Isso resulta em experimentos de longo tempo de duração, além de negligenciar as interações entre os fatores e os efeitos dessas interações. Por outro lado, o emprego de planejamentos experimentais multivariados, cujos resultados podem ser avaliados por superfície de resposta, considera, além dos efeitos individuais de cada variável os efeitos decorrentes de suas interações sobre a resposta, nesse caso, a atividade antioxidante (LIYANA-PATHIRANA; SHAHIDI, 2005).

Assim, o objetivo desse trabalho foi identificar as condições otimizadas para a extração de antioxidantes naturais a partir de resíduos agroindustriais, utilizando um planejamento experimental multivariado. A partir disso, propor condições de extração eficientes visando o uso racional de solventes, recursos energéticos e matéria-prima.

## **2.2 Material e métodos**

### **2.2.1 Coleta e preparo das amostras de resíduos agroindustriais**

As amostras de resíduos vinícolas (bagaços e engaços de uvas das variedades *Chenin Blanc*, *Petit Verdot* e *Syrah*) foram fornecidas pela Embrapa Semi-Árido: Uva e Vinho, Petrolina, PE. Os resíduos da indústria processadora de café (borra e casca) foram coletados na cidade de Cornélio Procópio, PR, e os da indústria processadora de laranja (água do processamento de laranja ou “água amarela” e bagaço), em Araras, SP. A coleta desses materiais ocorreu entre os meses de julho e outubro de 2012.

Já as amostras de resíduos da indústria de polpas de frutas (semente e “fibra” de graviola, semente e casca de açaí, semente e casca de cupuaçu e semente de cajá) foram coletadas em uma indústria processadora localizada no município de Ipiaú, na Bahia, em março de 2013.

As amostras foram mantidas congeladas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  até serem liofilizadas. Logo após o processo de liofilização foi determinado o rendimento para cada material. Na sequência, todos os materiais foram triturados e armazenados a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração. O aspecto dos resíduos agroindustriais coletados pode ser visualizado na Figura 1.



Figura 1 – Aspecto visual dos resíduos agroindustriais, após a liofilização

### 2.2.2 Otimização das condições de extração de resíduos agroindustriais empregando planejamento experimental multivariado

Para a obtenção de extratos com a maior concentração de antioxidantes naturais, foi utilizado o planejamento experimental multivariado, onde os efeitos das variáveis, porcentagem de etanol e temperatura, sobre a atividade antioxidante dos extratos foram estudados. O planejamento experimental empregado foi desenvolvido por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Planejamento experimental (Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR)

Ensaio	Variáveis Independentes			
	Valores codificados		Valores reais	
	Etanol (%)	Temperatura (°C)	Etanol (%)	Temperatura (°C)
1	-1	-1	15	36
2	1	-1	85	36
3	-1	1	15	89
4	1	1	85	89
5	0	0	50	62
6	0	0	50	62
7	0	0	50	62
8	-1,41	0	0	62
9	0	1,41	50	100
10	1,41	0	100	62
11	0	-1,41	50	25

Com base nas condições estabelecidas no planejamento experimental, 0,5g dos resíduos agroindustriais, liofilizados e moídos, foram pesados em tubos falcon e a eles adicionados 5 mL do solvente. A mistura foi agitada e mantida, por 20 minutos, em banho aquecido, de acordo com os parâmetros estabelecidos para cada ensaio do planejamento experimental (Tabela 1). Em seguida, permaneceram por 15 minutos em banho ultrassom (180 W) e, na sequência, foram centrifugados por 15 minutos (5000xg). Após isto, o sobrenadante foi filtrado e os extratos foram analisados quanto sua atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre ABTS. Todas as extrações foram conduzidas em triplicata.

O etanol foi escolhido como solvente de extração por apresentar baixa toxicidade, boa extratibilidade, ampla disponibilidade e menor custo comparado à de outros solventes orgânicos. A atividade antioxidante foi avaliada usando o método de captura do radical livre ABTS por ser um procedimento rápido, prático e que engloba a avaliação de uma ampla faixa de compostos antioxidantes, polares e apolares (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

As respostas da atividade antioxidante, juntamente com os valores codificados para cada ensaio, foram analisadas utilizando o *software* STATITICA versão 11.

Os dados experimentais foram ajustados a um modelo de segunda ordem e, a partir disso, os coeficientes de regressão foram gerados.

Através da análise de variância (ANOVA) obteve-se também a falta de ajuste e o valor F ( $p=0,05$ ), os quais foram utilizados para avaliar a significância e adequação do modelo. As superfícies de resposta foram então geradas para cada resíduo.

A superfície de resposta pode ser representada de forma geral pela Equação 1:

$$Y=b_0+b_1X+b_2Z+b_{11}X^2+b_{22}Z^2+b_{12}XZ \quad (1)$$

Nessa equação, Y representa a resposta (variável dependente), que nesse caso foi a atividade antioxidante. Os valores b são as estimativas dos coeficientes do polinômio e os valores X e Z são, respectivamente, os valores dos fatores codificados das variáveis independentes para a concentração de etanol e temperatura. Os termos lineares, representados por  $b_1X$  e  $b_2Z$  na equação, referem-se aos efeitos principais; os termos quadráticos ( $b_{11}X^2$  e  $b_{22}Z^2$ ) à curvatura da superfície e ao produto bilateral dos termos; e  $b_{12}XZ$  representa os efeitos das interações entre os termos (HOFFMANN-RIBANI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

Para verificar a adequação dos modelos gerados nas superfícies de resposta de cada resíduo agroindustrial, os mesmos foram validados em laboratório, por meio da realização de três novos ensaios, considerando condições não testadas no planejamento experimental para as variáveis independentes: concentração de etanol e temperatura de extração. Na Tabela 2 encontram-se os valores reais, testados para cada variável, e seus respectivos valores codificados, os quais foram utilizados nos cálculos.

Tabela 2 – Ensaios realizados na validação dos modelos matemáticos das superfícies de resposta

Ensaio	Etanol (%)		Temperatura (°C)	
	Valores reais	Valores codificados	Valores reais	Valores codificados
1	30	-0,564	50	-0,47
2	60	0,282	70	0,282
3	90	1,128	90	1,034

Após análise dos gráficos de superfície de resposta, os intervalos das condições otimizadas de extração foram identificados e as amostras com perfil semelhante agrupadas. Estas condições foram então utilizadas no preparo dos extratos.

#### **2.2.2.1 Atividade antioxidante pelo método do radical livre ABTS**

A atividade antioxidante pelo método ABTS foi determinada de acordo com o método descrito por Al-Duais et al. (2009), com modificações. Em cada poço da microplaca foram colocados 20 $\mu$ L dos extratos e, então, adicionados 220 $\mu$ L da solução do radical ABTS. O radical ABTS foi previamente preparado misturando-se 5mL da solução de ABTS 7mM com 88 $\mu$ L da solução de persulfato de potássio 140mM, ambos em água. A mistura permaneceu ao abrigo de luz por pelo menos 16 horas e, em seguida, sua absorbância foi ajustada para 0,7+0,01 com tampão fosfato de potássio 75mM, pH 7,4, o qual também foi utilizado como branco na análise. Após 6 minutos de reação, a leitura foi realizada a 730nm, em uma leitora de microplacas (Molecular Devices). A curva padrão foi construída utilizando o Trolox em concentrações que variaram de 12,5 a 200 $\mu$ M. Os resultados de atividade antioxidante dos extratos foram expressos em equivalentes de Trolox (TEAC).

### **2.3 Resultados e discussão**

Todas as amostras foram pesadas antes e depois do processo de liofilização, para a determinação do rendimento dos resíduos desidratados. Na Tabela 3 pode ser visualizado o rendimento, em porcentagem, dos 17 resíduos liofilizados.

Tabela 3 – Percentual de rendimento dos resíduos agroindustriais após liofilização

<b>Resíduos agroindustriais</b>	<b>Rendimento (%)</b>
Água Laranja	2,44
Bagaço Laranja	21,19
Bagaço de uva branca <i>Chenin Blanc</i>	33,55
Engaço de uva branca <i>Chenin Blanc</i>	33,80
Bagaço de uva tinta <i>Petit Verdot</i>	45,79
Engaço de uva tinta <i>Petit Verdot</i>	42,16
Bagaço de uva tinta <i>Syrah</i>	21,05
Engaço de uva tinta <i>Syrah</i>	39,07
Borra Café	36,38
Casca Café	90,23
Semente Graviola	64,73
“Fibra” Graviola	14,40
Semente Açaí	58,08
Casca Açaí	40,63
Semente Cupuaçu	41,09
Casca Cupuaçu	38,59
Semente Cajá	55,78

De acordo com os resultados, o resíduo que apresentou o maior rendimento foi a casca do café (90,23%). Esse material já foi obtido com baixo teor de umidade, devido, provavelmente, ao processo de secagem do grão ocorrido no próprio campo, o que justifica, assim, o seu alto rendimento após o processo de liofilização. Os resíduos de uva apresentaram rendimento que variou de 21 a 45%. Essa diferença pode ser devida aos processos de prensagem e composição da amostra, principalmente em relação ao teor de açúcares e a presença de sementes. A amostra que apresentou o menor rendimento (2,44%) foi a água do processamento de laranja, como já esperado.

Com exceção da fibra de graviola, a qual se refere ao material resultante após o processo de refino da polpa, todos os demais resíduos provenientes da indústria processadora de polpa de frutas apresentaram alto rendimento (38,59 a 64,73%).

Estes resultados são importantes, pois em escala industrial, por exemplo, dados de rendimento são extremamente relevantes para a análise da viabilidade econômica de um determinado processo ou matéria-prima.

Os extratos dos resíduos liofilizados foram preparados de acordo com as condições previstas para cada ensaio do planejamento experimental. As respostas da atividade antioxidante obtidas por meio do método de sequestro do radical ABTS estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4– Respostas da variável dependente (atividade antioxidante) aos onze ensaios do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), para cada resíduo agroindustrial

Resíduos agroindustriais	Variável dependente: atividade antioxidante (TEAC) <sup>a</sup>										
	Ensaios do DCCR										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Água Laranja	116	113	127	167	126	137	131	116	223	50	117
Bagaço Laranja	90	95	94	113	100	106	100	83	164	56	108
Bagaço <i>Chenin Blanc</i>	128	162	167	211	175	179	202	68	272	180	193
Engaço <i>Chenin Blanc</i>	966	1058	1119	1443	1134	1200	1073	715	1528	1022	1246
Bagaço <i>Petit Verdot</i>	295	555	380	468	416	432	396	118	666	480	444
Engaço <i>Petit Verdot</i>	370	268	562	357	447	515	504	221	887	312	667
Bagaço <i>Syrah</i>	121	194	242	353	190	173	221	75	561	236	290
Engaço <i>Syrah</i>	372	533	375	542	490	511	478	266	775	179	505
Borra Café	8	42	11	58	36	37	35	7	34	51	40
Casca Café	58	33	110	60	87	81	81	61	168	12	64
Semente Graviola	11	17	15	30	23	22	22	12	33	12	18
“Fibra” Graviola	64	49	69	60	84	82	80	48	117	35	84
Semente Açaí	609	694	583	701	773	740	727	557	786	675	753
Casca Açaí	135	89	177	199	215	199	203	120	305	37	143
Semente Cupuaçu	151	161	173	240	270	260	280	118	331	58	235
Casca Cupuaçu	50	100	100	111	140	158	134	23	212	67	111
Semente Cajá	25	52	31	69	75	76	71	6	103	29	61

<sup>a</sup> TEAC: *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (µmol/grama de resíduo agroindustrial liofilizado). Valores são médias de triplicatas

A análise estatística das variáveis dependente (atividade antioxidante) e independentes (porcentagem de etanol e temperatura) gerou os gráficos de superfície de resposta e as curvas de contorno, os quais estão mostrados na Figura 2.

(continua)

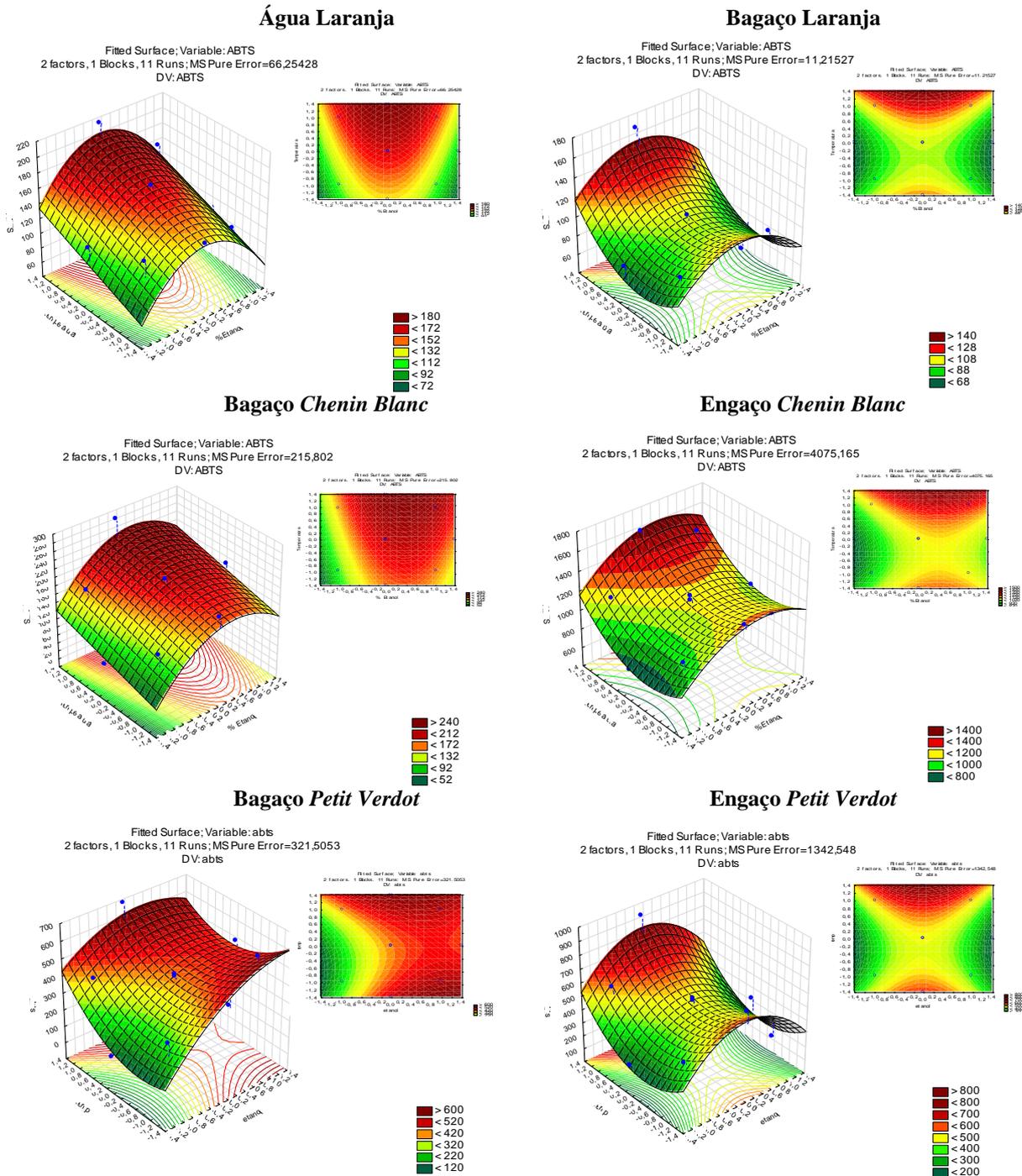
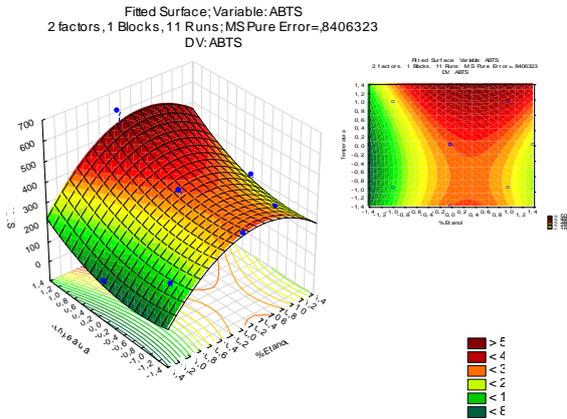


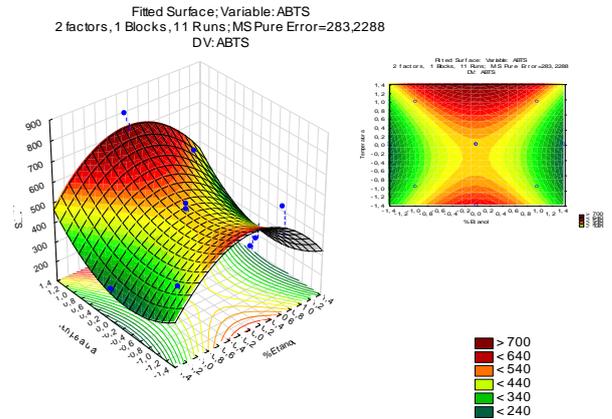
Figura 2 – Gráficos de superfície de resposta (3D) e curvas de contorno (2D) mostrando as regiões de maior extração de antioxidantes (em vermelho). Abscissas correspondem ao percentual de etanol e coordenadas à temperatura de extração

(continuação)

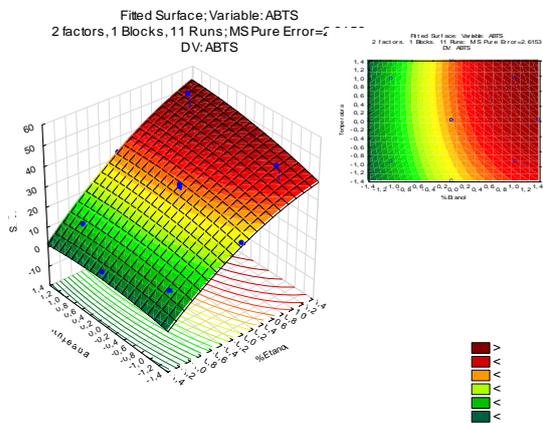
**Bagaço Syrah**



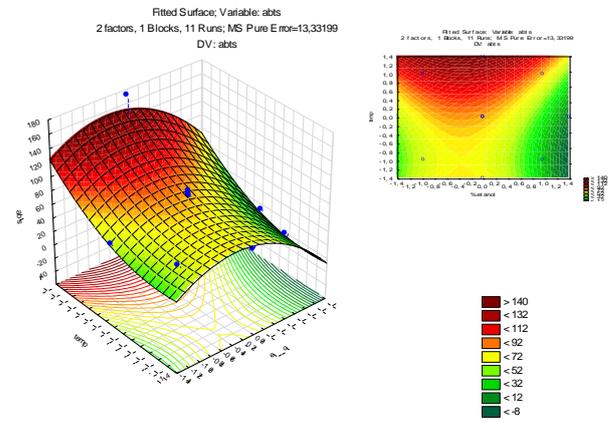
**Engaço Syrah**



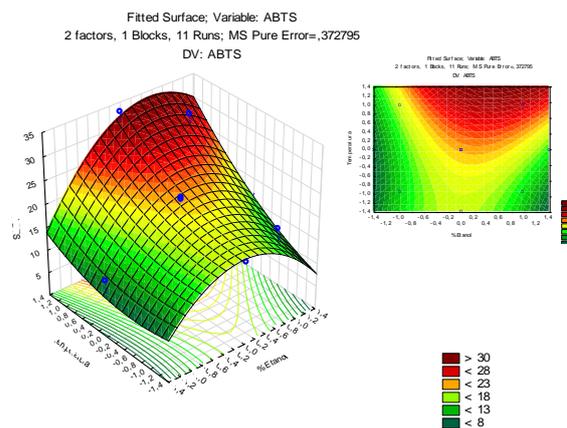
**Borra Café**



**Casca Café**



**Semente Graviola**



**Fibra Graviola**

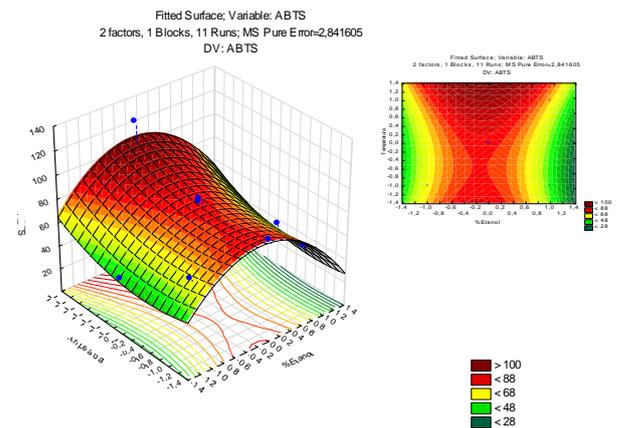


Figura 2 – Gráficos de superfície de resposta (3D) e curvas de contorno (2D) mostrando as regiões de maior extração de antioxidantes (em vermelho). Abscissas correspondem ao percentual de etanol e coordenadas à temperatura de extração

(conclusão)

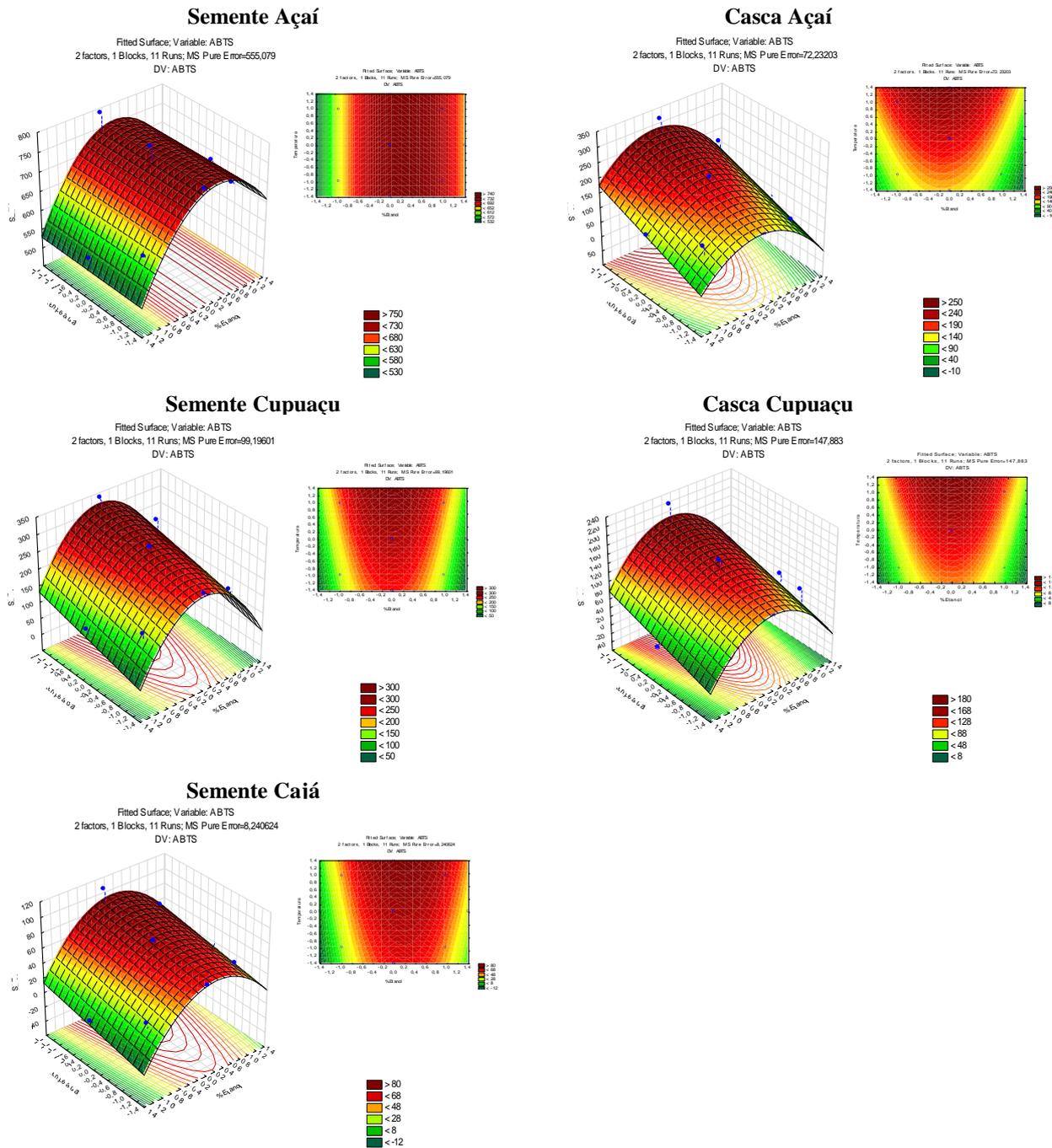


Figura 2 – Gráficos de superfície de resposta (3D) e curvas de contorno (2D) mostrando as regiões de maior extração de antioxidantes (em vermelho). Abscissas correspondem ao percentual de etanol e coordenadas à temperatura de extração

O ponto máximo para a extração de antioxidantes, levando em conta a combinação das variáveis estudadas, pode ser obtido através da derivação das equações polinomiais geradas pelo modelo. Entretanto, como o objetivo dessa etapa não foi obter o ponto ótimo, mas sim, a região de melhor extração de antioxidantes dentro do intervalo estudado, a análise dos gráficos foi feita com base nos intervalos (em vermelho), que compreenderam as maiores respostas para atividade antioxidante. Além disso, a identificação de intervalos ótimos, ao invés de condições pontuais, possibilita verificar a robustez do método de extração para cada amostra, uma vez que permite ajustar as condições ótimas para regiões de extração onde têm-se menores custos e tempo operacional, sem afetar a resposta.

Nas regiões de maior atividade antioxidante, a porcentagem de etanol no solvente de extração variou de 40 a 60% (v/v), exceto para a borra de café (96%, v/v) (Figura 2). A fração de interesse a ser extraída é dependente do tipo de solvente usado, devido à relação de polaridade estabelecida entre ambos. Solventes de maior polaridade, como os empregados neste caso, extraem com maior eficiência substâncias polares, como compostos fenólicos e grande parte das substâncias antioxidantes, além daquelas que necessitem de quebra de pontes de hidrogênio ou forças eletrostáticas maiores para se liberarem da matriz (TIR; DUTTA; BADJAH-HADJ-AHMED, 2012).

Exceto para bagaço *Syrah* e borra de café, para as demais amostras, os termos quadráticos da variável porcentagem de etanol produziram efeitos negativos nas respostas de atividade antioxidante, ou seja, ao se aumentar a concentração de etanol do solvente a atividade antioxidante não apresentou progressão linear. Concentrações de etanol muito baixas (< 20%, v/v) ou muito altas (>85%, v/v) levaram à produção de extratos com baixa atividade antioxidante. Para a borra de café, entretanto, a produção de extrato com atividade antioxidante pode ocorrer em concentrações extremamente baixas de etanol, porém somente se for combinado com temperaturas elevadas de extração (acima de 80°C).

De fato, o emprego de temperaturas mais elevadas contribuiu significativamente para o aumento da eficiência de extração de antioxidantes de resíduos agroindustriais. A exceção foi para a semente de açaí, onde a variável temperatura não teve efeito significativo. Para todas as outras amostras observou-se que a utilização de temperaturas mais elevadas foi mais eficiente, pois produziu efeitos positivos significativos, ou seja, ao se aumentar a temperatura, aumentou-se linearmente a atividade antioxidante.

Condições semelhantes às encontradas neste trabalho também foram relatadas por Sheng et al. (2013) para a extração de flavonoides de uma planta medicinal chinesa (*Flos*

*populi*) onde foi utilizada a temperatura de 95°C e concentração de etanol de 46% (etanol:água; 46:54, v:v).

Em outro trabalho, sobre a extração aquosa de antocianinas de bagaço de uva, Monrad et al. (2012) concluíram que o aquecimento de 140°C foi fundamental para aumentar a eluição desses pigmentos naturais. Segundo os autores, o tratamento térmico promoveu maior difusibilidade e solubilização de antocianinas no solvente de extração. Paralelamente, foi detectada baixa quantidade de compostos secundários da degradação térmica de antocianinas, como chalconas, por exemplo, mostrando assim que o aquecimento utilizado na extração não provocou alteração significativa na estrutura desses flavonoides.

Portanto, o uso de aquecimento pode favorecer o processo de extração, uma vez que aumenta a razão de difusão do soluto no meio, acelera a transferência de massa, solubiliza compostos e diminui as interações soluto-matriz (MONRAD et al., 2010).

Na tabela 5 estão mostradas as equações polinomiais geradas nas superfícies de resposta de cada resíduo agroindustrial. Essas equações indicam que os modelos polinomiais de segunda ordem foram ajustados às variáveis estudadas. Entretanto, para avaliar se os modelos possuíam bons ajustes, foram realizadas análises de regressão e de variância (ANOVA). Os resultados obtidos permitiram verificar os ajustes dos modelos e as significâncias dos termos (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 – Modelos matemáticos gerados para cada superfície de resposta dos resíduos agroindustriais

<b>Resíduos</b>	<b>Modelo matemático</b>
Água Laranja	$z=167,83563695297-32,963316677455*x^2+21,599518768336*y+0,$
Bagaço Laranja	$z=102,01499490807-17,486726760167*x^2+12,68837980492*y+15,782852234854*y^2+0,$
Bagaço <i>Chenin Blanc</i>	$z=205,53311014168+29,580955342143*x-39,790565878304*x^2+25,047844713021*y+0,$
Engaço <i>Chenin Blanc</i>	$z=1136,230418231+106,3733808079*x-129,72799769594*x^2+117,39440936787*y+131,17577978005*y^2+0,$
Bagaço <i>Petit Verdot</i>	$z=415,31773946378+107,47070600035*x-58,997140434728*x^2+39,019651989669*y+69,916681807614*y^2-43,14363*x*y+0,$
Engaço <i>Petit Verdot</i>	$z=489,75502945549-145,47853398974*x^2+74,125068077531*y+111,17867641215*y^2+0,$
Bagaço <i>Syrah</i>	$z=161,77527809834+51,573892768486*x+83,074411775031*y+110,34441976358*y^2+0,$
Engaço <i>Syrah</i>	$z=493,04214307945-129,62505890376*x^2+48,989772209824*y+80,321402541841*y^2+0,$
Borra Café	$z=28,777683636364+16,002704525965*x+2,6277449913493*y+0,$
Casca Café	$z=83,329673843353-20,115062390612*x-23,290291544148*x^2+29,808280672501*y+13,783345093848*y^2+0,$
Semente Graviola	$z=22,404542316125+2,6466739800908*x-5,1090874209853*x^2+4,7804866979263*y+1,4556477533017*y^2+2,20675*x*y+0,$
“Fibra” Graviola	$z=82,286137718166-5,2329555427396*x-23,243358181285*x^2+7,6929189338281*y+6,5675165232067*y^2+0,$
Semente Açaí	$z=746,79173491276+46,188595070334*x-77,245139795935*x^2+0,$
Casca Açaí	$z=213,96615251715-17,746456859156*x-66,887956381315*x^2+47,746834633033*y+0,$
Semente Cupuaçu	$z=275,09960253053-93,907634943441*x^2+29,533548506808*y+0,$
Casca Cupuaçu	$z=149,269149102-54,711662837197*x^2+25,58069347559*y+0,$
Semente Cajá	$z=76,450703699272+12,097022187675*x-30,609190595186*x^2+10,212430831724*y+0,$

Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) variaram de 0,79 a 0,95, indicando que os modelos foram ajustados (Tabela 6). A análise de variância mostrou que, com exceção do engaçõ *Syrah* e da fibra de graviola, todos os modelos apresentaram falta de ajuste não significativa ( $p=0,05$ ). Para o engaçõ *Chenin Blanc*, bagaçõ *Syrah*, borra e casca de café, casca e semente de cupuaçu, casca e semente de açaí e semente de cajá os modelos foram preditivos, ou seja, podem ser usados para predizer as respostas (Tabela 7).

Tabela 6 – Efeitos significativos das variáveis independentes sobre a atividade antioxidante, no limite de confiança de 5%

	Efeito	Erro Puro	<i>p</i>	$R^2$
<b>(continua)</b>				
<b>Água de Laranja</b>				
Média	167,84	3,42	0,00	0,79
%Etanol(Q)	-65,93	6,58	0,01	
Temperatura(L)	43,20	5,76	0,02	
<b>Bagaço de Laranja</b>				
Média	102,01	1,93	0,00	0,84
%Etanol(Q)	-34,97	2,83	0,01	
Temperatura(L)	25,37	2,37	0,01	
Temperatura(Q)	31,56	2,83	0,01	
<b>Bagaço <i>Chenin Blanc</i></b>				
Média	205,53	6,18	0,00	0,84
%Etanol(L)	59,16	10,40	0,02	
%Etanol(Q)	-79,58	11,87	0,02	
Temperatura(L)	50,10	10,40	0,04	
<b>Engaçõ <i>Chenin Blanc</i></b>				
Média	1136,23	36,86	0,00	0,95
%Etanol(L)	212,75	45,21	0,04	
%Etanol(Q)	-259,46	53,94	0,04	
Temperatura(L)	234,79	45,21	0,03	
Temperatura(Q)	262,35	53,94	0,04	
<b>Bagaço <i>Petit Verdot</i></b>				
Média	415,32	10,35	0,00	0,91
%Etanol(L)	214,94	12,70	0,00	
%Etanol(Q)	-117,99	15,15	0,01	
Temperatura(L)	78,04	12,70	0,02	
Temperatura(Q)	139,83	15,15	0,01	
Etanol x Temperatura	-86,29	17,93	0,04	
<b>Engaçõ <i>Petit Verdot</i></b>				
Média	489,75	21,15	0,00	0,82
%Etanol(Q)	-290,96	30,96	0,01	
Temperatura(L)	148,25	25,95	0,03	
Temperatura(Q)	222,36	30,96	0,02	
<b>Bagaço <i>Syrah</i></b>				
Média	161,77	10,21	0,00	0,89
%Etanol(L)	103,15	17,20	0,02	
Temperatura(L)	166,15	17,20	0,01	
Temperatura(Q)	220,69	19,63	0,01	
<b>Engaçõ <i>Syrah</i></b>				
Média	493,04	9,72	0,00	0,80

Tabela 6 – Efeitos significativos das variáveis independentes sobre a atividade antioxidante, no limite de confiança de 5%

	<b>Efeito</b>	<b>Erro Puro</b>	<b>p</b>	<b>(conclusão)</b> <b>R<sup>2</sup></b>
%Etanol(Q)	-259,25	14,22	0,00	
Temperatura(L)	97,98	11,92	0,01	
Temperatura(Q)	160,64	14,22	0,01	
<b>Borra Café</b>				
Média	28,78	0,49	0,00	0,91
%Etanol(L)	32,00	1,15	0,00	
Temperatura(L)	5,26	1,15	0,04	
<b>Casca Café</b>				
Média	83,33	2,11	0,00	0,95
%Etanol(L)	-40,23	2,59	0,00	
%Etanol(Q)	-46,58	3,09	0,00	
Temperatura(L)	59,62	2,59	0,00	
Temperatura(Q)	27,57	3,09	0,01	
<b>Semente Graviola</b>				
Média	22,40	0,35	0,00	0,88
%Etanol(L)	5,29	0,43	0,00	
%Etanol(Q)	-10,21	0,51	0,00	
Temperatura(L)	9,56	0,43	0,00	
Temperatura(Q)	2,91	0,51	0,03	
Etanol x Temperatura	4,41	0,61	0,01	
<b>Fibra Graviola</b>				
Média	82,28	0,97	0,00	0,92
%Etanol(L)	-10,46	1,19	0,01	
%Etanol(Q)	-46,48	1,42	0,00	
Temperatura(L)	15,38	1,19	0,00	
Temperatura(Q)	13,13	1,42	0,01	
<b>Semente Açaí</b>				
Média	746,79	9,90	0,00	0,89
%Etanol(L)	92,37	16,68	0,03	
%Etanol(Q)	-154,49	19,04	0,01	
<b>Casca Açaí</b>				
Média	213,96	3,57	0,00	0,93
%Etanol(L)	-35,49	6,01	0,02	
%Etanol(Q)	-133,77	6,87	0,00	
Temperatura(L)	95,49	6,01	0,00	
<b>Semente Cupuaçu</b>				
Média	275,10	4,18	0,00	0,92
%Etanol(Q)	-187,81	8,05	0,00	
Temperatura(L)	59,06	7,05	0,01	
<b>Casca Cupuaçu</b>				
Média	149,26	5,11	0,00	0,85
%Etanol(Q)	-109,42	9,83	0,00	
Temperatura(L)	51,16	8,61	0,02	
<b>Semente Cajá</b>				
Média	76,45	1,20	0,00	0,94
%Etanol(L)	24,19	2,03	0,00	
%Etanol(Q)	-61,21	2,32	0,00	
Temperatura(L)	20,42	2,03	0,00	

L= fator linear, Q= fator quadrático

Tabela 7– Análise de variância no estudo dos efeitos das variáveis temperatura e porcentagem de etanol sobre a atividade antioxidante

	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	Teste F	( <i>continua</i> ) F tabelado (95%)
<b>Água Laranja</b>					
Regressão	10372,67	3	3457,56	8,71	4,35
Resíduo	2777,76	7	396,82		
<i>Falta de ajuste</i>	2645,25	6	440,88	6,65	19,33
<i>Erro puro</i>	132,51	2	66,25		
Total	13150,44	10			
<b>Bagaço Laranja</b>					
Regressão	5665,35	3	1888,45	12,51	4,35
Resíduo	1056,66	7	150,95		
<i>Falta de ajuste</i>	1034,23	5	206,84	18,44	19,30
<i>Erro puro</i>	22,43	2	11,21		
Total	6722,01	10			
<b>Bagaço C. Blanc</b>					
Regressão	21675,72	3	7225,24	12,37	4,35
Resíduo	4088,96	7	584,14		
<i>Falta de ajuste</i>	3657,36	5	731,47	3,39	19,30
<i>Erro puro</i>	431,60	2	215,80		
Total	25764,68	10			
<b>Engaço C. Blanc</b>					
Regressão	469233,80	4	117308,45	28,35	4,53
Resíduo	24825,40	6	4137,57		
<i>Falta de ajuste</i>	16675,10	4	4168,78	1,02	19,25
<i>Erro puro</i>	8150,30	2	4075,15		
Total	494059,20	10			
<b>Bagaço P. Verdot</b>					
Regressão	177659,30	5	35531,86	10,69	5,05
Resíduo	16622,90	5	3324,58		
<i>Falta de ajuste</i>	15979,90	3	5326,63	16,57	19,16
<i>Erro puro</i>	643,00	2	321,50		
Total	194282,20	10			
<b>Engaço P. Verdot</b>					
Regressão	306742,60	3	102247,53	10,48	4,35
Resíduo	68282,90	7	9754,70		
<i>Falta de ajuste</i>	65597,80	5	13119,56	9,77	19,30
<i>Erro puro</i>	2685,10	2	1342,55		
Total	375025,50	10			
<b>Bagaço Syrah</b>					
Regressão	150796,60	3	50265,53	19,19	4,35
Resíduo	18332,50	7	2618,93		
<i>Falta de ajuste</i>	17152,50	5	3430,50	5,81	19,30
<i>Erro puro</i>	1180,00	2	590,00		
Total	169129,10	10			
<b>Engaço Syrah</b>					
Regressão	198633,41	4	49658,35	6,00	4,53
Resíduo	49679,66	6	8279,94		
<i>Falta de ajuste</i>	49113,20	5	9822,64	34,68	19,30
<i>Erro puro</i>	566,50	2	283,23		
Total	248313,10	10			
<b>Borra Café</b>					

Tabela 7– Análise de variância no estudo dos efeitos das variáveis temperatura e porcentagem de etanol sobre a atividade antioxidante

	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	Teste F	F tabelado (95%)
<b>(continuação)</b>					
Regressão	2097,67	4	524,42	14,44	4,53
Resíduo	217,83	6	36,31		
<i>Falta de ajuste</i>	212,60	6	35,43	13,55	19,16
<i>Erro puro</i>	5,23	2	2,61		
Total	2315,50	10			
<b>Casca Café</b>					
Regressão	15943,04	4	3985,76	29,92	4,53
Resíduo	799,36	6	133,23		
<i>Falta de ajuste</i>	772,70	4	193,17	14,49	19,25
<i>Erro puro</i>	26,66	2	13,33		
Total	16742,40	10			
<b>Semente Graviola</b>					
Regressão	163,90	1	163,90	7,17	5,12
Resíduo	205,60	9	22,84		
<i>Falta de ajuste</i>	200,95	7	28,70	12,36	19,35
<i>Erro puro</i>	4,64	2	2,32		
Total	369,51	10			
<b>Fibra Graviola</b>					
Regressão	4806,17	4	1201,54	19,56	4,35
Resíduo	368,42	6	61,40		
<i>Falta de ajuste</i>	362,74	4	90,68	31,91	19,30
<i>Erro puro</i>	5,68	2	2,84		
Total	5174,60	10			
<b>Semente Açaí</b>					
Regressão	53541,96	2	26770,98	34,17	4,46
Resíduo	6266,82	8	783,35		
<i>Falta de ajuste</i>	5156,66	6	859,44	1,54	19,35
<i>Erro puro</i>	1110,15	2	555,07		
Total	59808,79	10			
<b>Casca Açaí</b>					
Regressão	48083,26	3	16027,75	31,28	4,35
Resíduo	3586,39	7	512,34		
<i>Falta de ajuste</i>	3441,93	5	688,38	9,53	19,30
<i>Erro puro</i>	144,46	2	72,23		
Total	51669,65	10			
<b>Semente Cupuaçu</b>					
Regressão	60940,13	2	30470,06	52,24	4,46
Resíduo	4665,42	8	583,17		
<i>Falta de ajuste</i>	4467,03	6	744,50	7,50	19,33
<i>Erro puro</i>	198,39	2	99,19		
Total	65605,55	10			
<b>Casca Cupuaçu</b>					
Regressão	23543,19	2	11771,59	24,00	4,46
Resíduo	3922,74	8	490,34		
<i>Falta de ajuste</i>	3626,98	6	604,49	4,08	19,33
<i>Erro puro</i>	295,76	2	147,88		
Total	27465,94	10			
<b>Semente Cajá</b>					
Regressão	7734,43	3	2578,14	40,51	4,35

Tabela 7– Análise de variância no estudo dos efeitos das variáveis temperatura e porcentagem de etanol sobre a atividade antioxidante

	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	Teste F	(conclusão) F tabelado (95%)
Resíduo	445,46	7	63,63		
<i>Falta de ajuste</i>	428,98	5	85,79	10,41	19,30
<i>Erro puro</i>	16,48	2	8,24		
Total	8179,89	10			

Os modelos gerados nas superfícies de resposta de cada resíduo agroindustrial foram avaliados por meio da realização de três novos ensaios em laboratório, para verificar a validação dos mesmos, conforme descrito na Tabela 2. Os resultados obtidos e previstos nestes ensaios estão mostrados na Tabela 8. Paralelamente, nas equações polinomiais (Tabela 5) atribuiu-se à X os valores codificados para a variável “Concentração de etanol” e à Y os valores referentes à variável “Temperatura”, de acordo com seus eixos nos gráficos da superfície de resposta.

Tabela 8 – Atividade antioxidante ( $\mu\text{mol TEAC/g}$  de resíduo agroindustrial) observada em laboratório e prevista pelas equações polinomiais para cada resíduo agroindustrial, em cada ensaio

Resíduos	Atividade antioxidante ( $\mu\text{mol TEAC/g}$ de resíduo agroindustrial)					
	Observados (laboratório)			Previstos		
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	<i>Ensaio</i> 1	<i>Ensaio</i> 2	<i>Ensaio</i> 3
Bagaço <i>C. Blanc</i>	144±7	205±11	147±8	164	218	214
Bagaço Laranja	118±9	118±9	97±3	94	105	110
Água Laranja	310±11	346±11	263±20	147	171	148
Bagaço <i>P. Verdot</i>	339±5	467±64	552±47	322	454	526
Bagaço <i>Syrah</i>	299±5	308±59	314±8	118	208	424
Borra Café	49±7	37±0,4	48±2	18	34	49
Casca Café	93±8	84±13	52±8	75	85	73
Engaço <i>C. Blanc</i>	1046±40	1116±152	990±101	1009	1199	1353
Engaço <i>P. Verdot</i>	441±45	504±22	501±99	433	508	500
Engaço <i>Syrah</i>	625±7	528±17	482±19	446	503	465
Semente Graviola	11±0,1	17±1	20±1	18	24	28
Fibra Graviola	74±5	82±7	46±3	76	82	62
Semente Açai	696±39	813±49	740±96	696	754	700
Casca Açai	134±3	172±5	114±7	180	217	158
Semente Cupuaçu	206±7	267±22	240±5	231	276	186
Casca Cupuaçu	76±3	171±8	134±4	120	152	106
Semente Cajá	56±3	85±2	71±3	55	80	62

Em sua maioria, as respostas de atividade antioxidante observadas em laboratório se aproximaram das previstas pelos modelos polinomiais. A variabilidade observada pode ser devida aos acúmulos de variações que podem ocorrer durante os processos de extração, diluição, pipetagem etc.

Após análise dos gráficos de superfície de resposta gerados, foram estabelecidos os intervalos de maior extração para atividade antioxidante de cada amostra de resíduo, a qual foi mensurada pelo método de sequestro do radical livre ABTS. A Figura 3 apresenta os intervalos para as variáveis independentes estudadas (porcentagem de etanol e temperatura de extração).

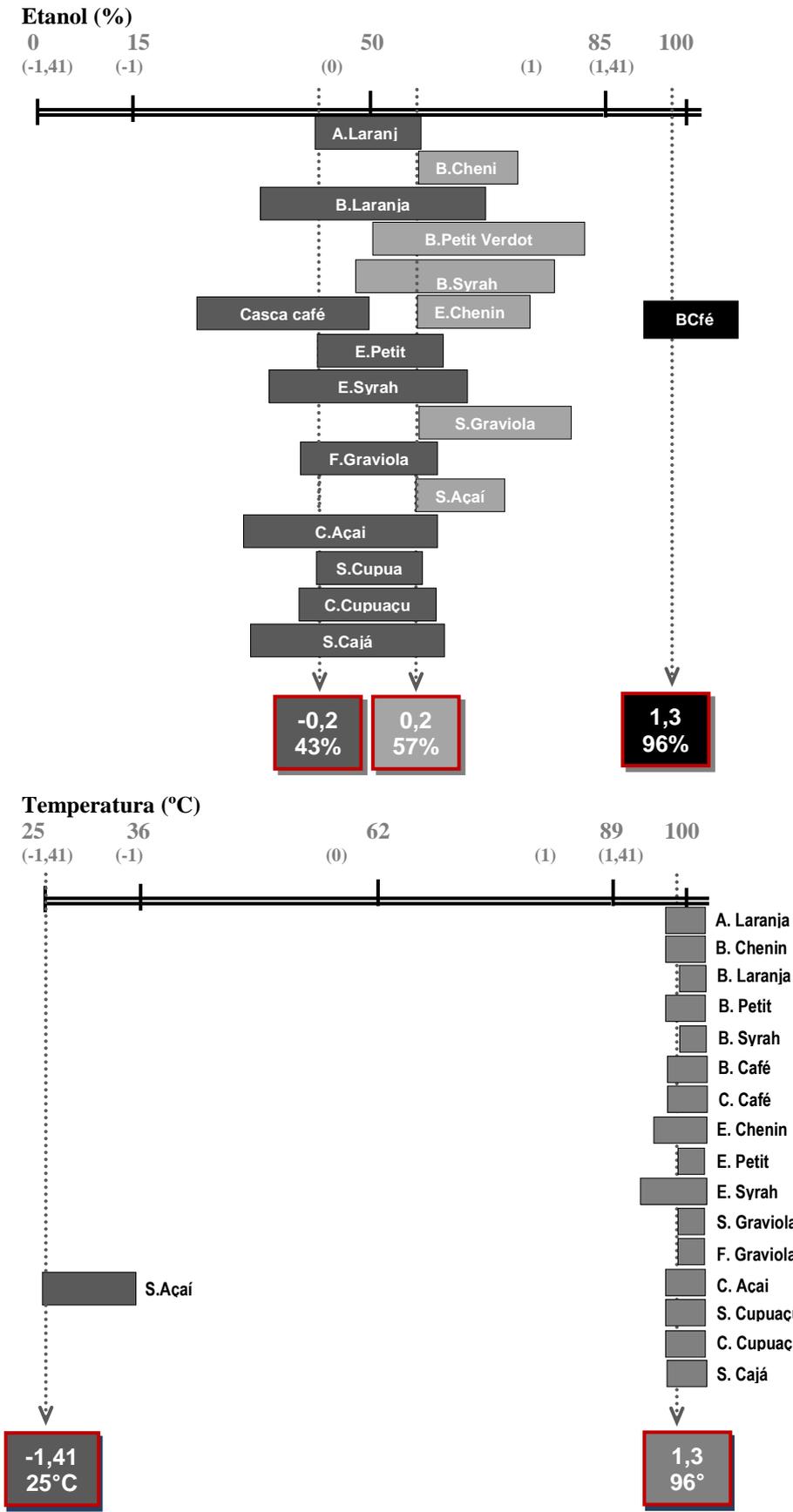


Figura 3 – Intervalos de porcentagem de etanol e temperatura, onde houve maior extração de antioxidantes, e condições ótimas de extração selecionadas

De acordo com os resultados, foram estabelecidas três concentrações diferentes de etanol (43%, 57% e 96%), as quais representam as menores porcentagens desse solvente dentro da faixa ótima de extração de cada resíduo. Esse critério de seleção foi adotado visando o racionamento do uso do etanol. Assim sendo, o percentual de 43% foi usado para a extração da água e bagaço de laranja, da casca de café, do engaço *Petit Verdot*, do engaço *Syrah*, da casca de açaí, da casca e semente de cupuaçu e da fibra de graviola; 57% de etanol foi utilizado para os bagaços *Chenin Blanc*, *Petit Verdot* e *Syrah*, engaço *Chenin Blanc*, semente de graviola, de cajá e de açaí; e 96% para a borra de café. Para a determinação da temperatura de extração também foi considerada a menor temperatura dentro da faixa ótima de cada resíduo, sendo assim fixada em 96°C, exceto para a semente de açaí que teve sua extração feita à temperatura ambiente (Figura 3).

Condições de extração parecidas às desse trabalho já foram encontradas para grão de trigo em estudo realizado por Liyana-Pathirana e Shahidi (2005). Os autores verificaram que as condições ótimas para a extração de compostos fenólicos com atividade antioxidante neste cereal incluíram uma concentração de etanol na faixa entre 49 e 54%, a temperatura entre 61 e 64°C e tempo de extração entre 60 e 64 minutos.

Em outro estudo, concentrações moderadas de etanol (40-55%, v/v) e temperatura de 84°C foram as condições onde os extratos de engaços de uva tiveram maior atividade antioxidante (KARACABEY; MAZZA, 2010).

De acordo com Pompeu et al. (2009), a maior extração de compostos fenólicos com atividade antioxidante de polpa de açaí foi verificada na proporção de etanol entre 70-80%, concentração de ácido clorídrico entre 0,065-0,074M e temperatura de 58°C.

Entretanto, no presente estudo a maior atividade antioxidante para a semente de açaí foi encontrada quando foi usada a concentração de etanol de 57% e temperatura ambiente. Isto mostra claramente a necessidade de otimização do processo de extração para matrizes distintas, independente de serem frações do mesmo produto vegetal.

## 2.4 Conclusão

De acordo com o planejamento experimental realizado, quatro condições de extração diferentes foram estabelecidas levando-se em consideração as variáveis porcentagem de etanol (%) e temperatura (°C): a) 43%/96 °C (água e bagaço de laranja, casca de café, engaço *Petit Verdot*, engaço *Syrah*, casca de açaí, casca e semente de cupuaçu e fibra de graviola); b) 57%/96 °C (bagaços *Chenin Blanc*, *Petit Verdot* e *Syrah*, engaço *Chenin Blanc*, sementes de graviola e de cajá); c) 57%/temperatura ambiente (semente de açaí); d) 96%/96 °C (borra de

café). Assim, o uso do método de superfície de resposta possibilitou a otimização das condições de extração de resíduos agroindustriais e o uso eficiente dos recursos para a obtenção de extratos com elevada atividade antioxidante.

## Referências

- AL-DUAIS, M.; MÜLLER, L.; BÖHM, V.; JETSCHKE, G. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 228, n.5, p. 813–821, 2009.
- HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Otimização de método para determinação de flavonóis e flavonas em frutas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando delineamento estatístico e análise de superfície de resposta. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1378–1384, 2008.
- KARACABEY, E.; MAZZA, G. Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology. **Food Chemistry**, Barking, v. 119, n. 1, p. 343–348, 2010.
- LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**, Barking, v. 93, n. 1, p. 47–56, 2005.
- MELO, P. S.; MASSARIOLI, A. P.; DENNY, C.; SANTOS L. F.; FRANCHIN, M.; PEREIRA, G. E.; VIEIRA, T. M. F. S.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M. DE. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, Barking, v. 181, p. 160–169, 2015.
- MONRAD, J. K.; HOWARD, L.R.; KING, J.W.; SRINIVAS, K.; MAUROMOUSTAKOS, A. Subcritical solvent extraction of anthocyanins from dried red grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 7, p. 2862-2868, 2010.
- MONRAD, J.K.; SRINIVAS, K.; HOWARD, L.R.; KING, J.W. Design and optimization of a semicontinuous hot-cold extraction of polyphenols from grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, p. 5571–5582, 2012.
- OLDONI, T.L. C.; MELO, P.S.; MASSARIOLI, A.P.; MORENO, I.A.M.; BEZERRA, R. M.N.; ROSALEN, P.L.; SILVA, G.V.J.; NASCIMENTO, A.M.; ALENCAR, S.M. Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*) skin by combination of chromatography techniques. **Food Chemistry**, Barking, v. 192, p. 306–312, 2016.
- POMPEU, D.R.; SILVA, E.M.; ROGEZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, n. 23, p. 6076–6082, 2009.
- 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, n. 10, p. 4290–4302, 2005.

SHENG, Z.L.; WAN, P.F.; DONG, C.L.; LI, Y.H. Optimization of total flavonoids content extracted from Flos Populi using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 43, n. 1, p. 778–786, 2013.

TABARAKI, R.; HEIDARIZADI, E.; BENVIDI, A. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, New York, v. 98, p. 16–23, 2012.

TIR, R.; DUTTA, P.C.; BADJAH-HADJ-AHMED, A.Y. Effect of the extraction solvent polarity on the sesame seeds oil composition. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 114, n. 12, p. 1427–1438, 2012.



### 3 COMPOSIÇÃO FENÓLICA E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

#### Resumo

Diariamente são geradas milhares de toneladas de resíduos provenientes das atividades agroindustriais em todo o mundo. Alguns desses materiais têm se demonstrado fontes promissoras de antioxidantes naturais. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de compostos fenólicos, bem como a atividade antioxidante de dezessete resíduos provenientes de vários setores agroindustriais. Os engaços de uva e a semente de açaí foram os resíduos que apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos totais. Por meio da análise de HPLC-DAD, foram identificados onze compostos distribuídos em seis classes diferentes. Ácido gálico apresentou a maior concentração em semente de cajá, procianidina B1 em engaço *Chenin Blanc*, procianidina B2 em casca de cupuaçu, catequina em semente de açaí, epicatequina em semente de cupuaçu e hesperidina em resíduos de laranja. Antocianinas foram encontradas em bagaços tintos de uva (mirtilina, peonidina e oenina) e casca de açaí (kuromanina). O engaço *Chenin Blanc* apresentou as maiores atividades antioxidante, seguido pelos demais resíduos de uva e semente de açaí. Os extratos da água de laranja, bagaço de *Syrah* e engaço *Chenin Blanc* protegeram o óleo de linhaça da oxidação mais do que os antioxidantes sintéticos BHT e TBHQ, nas concentrações testadas. Assim, os resíduos agroindustriais avaliados demonstraram ser fontes alternativas promissoras de compostos bioativos com atividade antioxidante.

Palavras-chave: HPLC; Antocianinas; Compostos fenólicos; Antioxidantes naturais

#### Abstract

Thousands tons of residues are generated daily by agroindustrial activities around the world. Some of these materials have already been identified as promising sources of natural antioxidants. Thus, the aim of this study was to evaluate the profile of phenolic compounds, as well as, the antioxidant activity of seventeen residues from several agroindustrial sectors. The grape rachis and açaí seeds had higher phenolic compounds content. Through HPLC-DAD, eleven compounds from six different classes were identified. Gallic acid was found concentrated in cajá seed, procyanidin B1 in *Chenin Blanc* rachis, procyanidin B2 in cupuaçu shell, catechin in açaí seeds, epicatechin in cupuaçu seeds, and hesperidin in orange residues. Anthocyanins were found in red grape pomaces (myrtilin, peonidin and oenin) and açaí peel (kuromanin). The *Chenin Blanc* rachis showed the higher antioxidant activities, followed by other grape residues and açaí seeds. The orange water, *Syrah* pomace and *Chenin Blanc* rachis extracts protected the linseed oil of oxidation more than the synthetic antioxidants BHT and TBHQ, at the concentrations tested. Thus, the agroindustrial residues evaluated proved to be alternative promising sources of bioactive compounds with antioxidant activity.

Keywords: HPLC; Anthocyanins; Phenolic compounds; Natural antioxidants

### 3.1 Introdução

O setor agroindustrial brasileiro é de grande importância para a economia do país e, como resultado de suas atividades, são produzidas enormes quantidades e diversidade de resíduos sólidos, os quais são descartados ao meio ambiente, em sua maioria, sem tratamento adequado. Muitos desses materiais são fontes de compostos fenólicos e antioxidantes naturais (MELO et al., 2015; OLDONI et al., 2016). Antioxidante é “qualquer substância que retarda, previne ou remove dano oxidativo de uma molécula alvo” (HALLIWELL, 2007).

Alguns trabalhos têm mostrado que os resíduos de frutas e cereais apresentam maior concentração de antioxidantes que o próprio fruto. Por exemplo, em frutos do cerrado, o teor de ácido gálico na casca de pequi, semente de araticum e semente de cagaita foi sete vezes maior em relação à polpa (ROESLER et al., 2007). Da mesma forma, altos teores de compostos fenólicos também foram encontrados em resíduos de polpa de acerola e de goiaba (SOUSA et al., 2011).

Assim, verifica-se que estes compostos podem ser encontrados em diversos produtos naturais, incluindo fontes alimentares e os resíduos de seu processamento, e possuem ampla aplicação nos setores farmacêutico, cosmético e de alimentos.

Na indústria alimentícia, por exemplo, os lipídios são usados para fins tecnológicos e sensoriais, sendo a oxidação lipídica a maior causa de deterioração de alimentos processados, pois causa *off-flavors*, bem como perda de nutrientes e de compostos bioativos. Além disso, por ser uma reação em cadeia, a oxidação lipídica pode se desencadear até a formação de substâncias tóxicas, afetando a qualidade nutricional e sensorial dos alimentos (KUMAR et al., 2015).

Uma das alternativas mais convenientes para controlar os processos oxidativos em matrizes alimentares é o uso de antioxidantes. Dentre os antioxidantes mais utilizados pela indústria de alimentos destacam-se os sintéticos BHA (butilhidroxianisol), BHT (butilhidroxitolueno) e TBHQ (terc-butilhidroquinona) e entre os naturais, o ácido ascórbico, a vitamina E, o beta-caroteno e os compostos fenólicos (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Recentemente, o mercado consumidor tem criado demandas por produtos que relacionem qualidades nutricionais e sensoriais. Isto implica em desafios tecnológicos para a indústria de alimentos, sobretudo, diante dos métodos clássicos disponíveis para a estabilização oxidativa de lipídios em matrizes alimentares, como o uso de antioxidantes sintéticos e hidrogenação. No viés nutricional, a tendência de aumento da proporção de ácidos graxos poli-insaturados em relação aos saturados pela indústria de alimentos aumenta a

necessidade de uso de antioxidantes sintéticos, uma vez que ácidos graxos insaturados são mais susceptíveis à oxidação (WAHARO; MCCLEMENTS; DECKER, 2011).

O uso de antioxidantes sintéticos possui regulamentações específicas de acordo com cada país e também com o tipo de alimento a ser conservado. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o *Food and Drug Administration* (FDA), por exemplo, estabelecem limites máximos de uso de antioxidantes como o BHT, o BHA e o TBHQ. Já a União Européia e alguns outros países não permitiam o uso de TBHQ (SIKORSKI; KOLAKOWSKA, 2003), o qual teve suas doses de ingestão aceitáveis e limite máximo de uso estabelecidos somente após 2004 (EFSA, 2004).

Muitos estudos reavaliam a segurança dos antioxidantes sintéticos e revelam que eles podem ser tóxicos dependendo da dose e do tempo de exposição. Tanto o BHT quanto o BHA são conhecidos não somente pelos indícios de efeitos tóxicos e carcinogênicos em humanos, mas também por desencadear anormalidades nos sistemas enzimáticos (BAYDAR; OZKAN; YASAR, 2007). Atrelado a este fator, a crescente precaução dos consumidores quanto à segurança de aditivos alimentares aumenta a necessidade de identificação de novas alternativas provenientes de fontes naturais que representem segurança à saúde humana (MELO et al., 2011; PACKER et al., 2015).

Neste sentido, alguns estudos já têm demonstrado a eficácia de antioxidantes naturais, provenientes de resíduos agroindustriais, em comparação aos sintéticos (BAYDAR; OZKAN; YASAR, 2007; LAFKA; SINANOGLU; LAZOS, 2007). Assim, estes materiais poderiam ser reutilizados como substitutos aos antioxidantes sintéticos ou como novos ingredientes para a indústria farmacêutica e/ou de alimentos. Trabalhos sobre métodos de extração, atividade antioxidante em diferentes meios de reação e caracterização química de resíduos agroindustriais são importantes para promover o uso desses materiais como fontes de antioxidantes em larga escala. Ademais, a reutilização desses resíduos auxiliaria no decréscimo de material orgânico descartado no meio ambiente, bem como, aumentaria a taxa de utilização dos alimentos (MELO et al., 2015).

Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar a composição fenólica e a atividade antioxidante de dezessete resíduos oriundos de diferentes setores agroindustriais brasileiros no intuito de gerar conhecimento que possibilite identificar potenciais fontes de antioxidantes naturais ou moléculas de interesse para a indústria de alimentos.

## **3.2 Material e métodos**

### **3.2.1 Coleta e preparo dos extratos dos resíduos agroindustriais**

As amostras de resíduos vinícolas (bagaços e engaços das variedades *Chenin Blanc*, *Petit Verdot* e *Syrah*) foram fornecidas pela Embrapa Semi-Árido Uva e Vinho, Petrolina, PE. Os resíduos da indústria processadora de café (borra e casca) foram coletados na cidade de Cornélio Procópio, PR, e os da indústria processadora de laranja (água do processamento de laranja ou “água amarela” e bagaço), em Araras, SP. A coleta desses materiais ocorreu entre os meses de julho e outubro de 2012. Já as amostras de resíduos da indústria de polpas de frutas (semente e “fibra” de graviola, semente e casca de açaí, semente e casca de cupuaçu e semente de cajá) foram coletadas em uma indústria processadora localizada no município de Ipiauí, na Bahia, em março de 2013.

As amostras de resíduos foram então liofilizadas. Após essa etapa, os materiais foram triturados e armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$ , até o momento da extração.

Os extratos dos resíduos agroindustriais, obtidos de acordo com as condições otimizadas de extração (Capítulo 2, item 2.2.2), foram analisados quanto à composição fenólica e atividade antioxidante *in vitro* por diferentes métodos.

### **3.2.2 Composição fenólica dos extratos dos resíduos agroindustriais**

#### **3.2.2.1 Teor de compostos fenólicos totais**

A análise do teor de compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Al-Duais et al. (2006), com algumas modificações. Alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  do padrão ou amostra e 100  $\mu\text{L}$  da solução de Folin-Ciocalteu em água 10% foram pipetados em cada poço da microplaca. Após 5 minutos foram acrescentados 75  $\mu\text{L}$  da solução de carbonato de sódio em água 7,5%. O branco foi composto por água destilada no lugar da amostra. A leitura foi realizada a 740 nm após 40 minutos da reação, em uma leitora de microplacas (Molecular Devices). A curva de calibração foi construída utilizando ácido gálico nas concentrações de 20 a 120  $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados foram obtidos por meio do ajuste da curva de calibração e expressos como equivalentes ao ácido gálico (EAG).

#### **3.2.2.2 Determinação de ácidos fenólicos e flavonoides por HPLC-DAD**

A análise por HPLC em fase reversa para a avaliação de ácidos fenólicos e flavonoides dos resíduos foi feita injetando-se 20  $\mu\text{L}$  da amostra em um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (HPLC-DAD) e uma coluna de

fase reversa C<sub>18</sub> (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, 20% de B em 50 minutos, 45% de B em 70 minutos, 100% de B em 85 minutos, permanecendo até 95 minutos, 5% de B em 100 minutos. A coluna foi mantida a 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 (DAD), pela comparação do tempo de retenção e co-cromatografia de padrões. Neste trabalho foram usados os seguintes padrões autênticos de ácidos fenólicos e flavonoides (Sigma-Aldrich e Extrasynthese): ácido gálico, ácido caféico, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido trans-cinâmico, ácido *p*-cumárico, ácido siríngico, ácido vanílico, (-)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epicatequina galato, crisina, luteolina, mirecetina, polidatina, quercetina, quercetina-3-β-D-glucosídeo, rutina, hesperidina, hesperitina, procianidina B1, procianidina B2, resveratrol e vitexina.

O método utilizado foi validado para os seguintes parâmetros: linearidade, limites de detecção e quantificação, de acordo com Aragão et al. (2009).

### 3.2.2.3 Determinação de antocianinas por HPLC-DAD

Para a avaliação de antocianinas nos resíduos vinícolas e na casca de açaí, foram injetados 20 µL de cada extrato em coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm. A fase móvel utilizada foi água/ácido fórmico (10%, v/v) (solvente A) e metanol (100%) (solvente B), com vazão constante de 1 mL/min. O gradiente iniciou com 5% do solvente B até 60% de B em 20 minutos, 100% de B em 25 minutos, 5% de B em 38 minutos até 48 minutos. A coluna foi mantida a 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 (DAD), pela comparação do tempo de retenção e co-cromatografia de padrões. Neste trabalho, foram utilizados os seguintes padrões autênticos de antocianinas (Sigma-Aldrich): mirtilina, kuromanina, oenina, petunidina e peonidina.

O método utilizado foi validado para os seguintes parâmetros: linearidade, limites de detecção e quantificação, de acordo com Aragão et al. (2009).

### **3.2.3 Triagem dos resíduos agroindustriais com alto potencial antioxidante**

Para a triagem, os extratos foram avaliados quanto a atividade antioxidante, por meio dos seguintes métodos: capacidade de sequestro dos radicais livres DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>+</sup>, capacidade de absorção de radicais do oxigênio (ORAC), oxidação acoplada do sistema beta-caroteno/ácido linoléico e sistema de oxidação em óleo de linhaça.

#### **3.2.3.1 Atividade sequestrante do radical livre DPPH**

A análise do sequestro do radical livre DPPH foi realizado de acordo com o método descrito por Al-Duais et al. (2009), com algumas modificações. Alíquotas de 66 µL de padrão, controle ou amostra foram pipetados em cada poço da microplaca, em seguida, foram adicionados 134 µL da solução do radical livre DPPH 150 µM, em etanol PA. Após 45 minutos de reação, ao abrigo da luz, a leitura da absorbância foi realizada a 517 nm, em uma leitora de microplacas SpectraMax – M3 (Molecular Devices). O etanol foi utilizado como branco. A curva de calibração foi construída utilizando o Trolox como padrão, nas concentrações de 20 a 140 µM. Os resultados foram obtidos por meio do ajuste da curva e expressos em equivalentes ao Trolox.

#### **3.2.3.2 Atividade sequestrante do radical livre ABTS**

A atividade sequestrante do radical livre ABTS foi determinada de acordo com o método descrito por Al-Duais et al. (2009), com modificações. Em cada poço da microplaca foram pipetados 20 µL do padrão ou amostra e então adicionados 220 µL da solução do radical ABTS. Esse radical foi previamente preparado misturando-se 5mL da solução de ABTS 7 mM com 88 µL da solução de persulfato de potássio 140 mM, ambos em água. A mistura permaneceu ao abrigo da luz por pelo menos 16 horas e, então, sua absorbância foi ajustada para 0,7±0,01 nm com tampão fosfato de potássio 75 mM, pH 7,4, o qual também foi utilizado como branco na análise. Após 6 minutos de reação, a leitura foi realizada a 730 nm, em uma leitora de microplacas SpectraMax – M3 (Molecular Devices). A curva padrão foi construída utilizando o Trolox nas concentrações de 12,5 a 200 µM. Os resultados foram obtidos por meio do ajuste da curva de calibração e expressos em equivalentes ao Trolox.

#### **3.2.3.3 Capacidade sequestrante do radical peroxila (ORAC)**

O método de sequestro do radical peroxila (ORAC) foi realizado conforme descrito por Melo et al. (2015). Alíquotas de 30 µL do padrão, controle ou amostra foram pipetadas em cada poço da microplaca e logo após foram acrescentados 60 µL da solução de

fluoresceína 508,25 nM, preparada a partir da solução estoque 4,066 mM. Em seguida, foram acrescentados 110 µL da solução de AAPH 76 mM. Ambas as soluções foram preparadas em tampão fosfato de potássio 75 mM, pH7,4, que também foi utilizado como branco na análise. A reação foi incubada a 37°C e a leitura da fluorescência foi realizada a cada minuto, durante 2 horas, com comprimento de onda de excitação e emissão de 485 e 528nm, respectivamente, em uma leitora de microplacas (Molecular Devices). O padrão Trolox, nas concentrações de 12,5 a 400 µM, foi utilizado para a construção da curva de calibração por meio das Equações 1 e 2, abaixo:

$$AUC = 1 + \left( \frac{f_1+f_2+f_3+\dots+f_i}{f_0} \right) (1)$$

Onde AUC é a área abaixo da curva,  $f_0$  é a fluorescência relativa ao tempo 0 e  $f_i$ , a fluorescência relativa ao tempo  $i$ . A AUCnet foi calculada pela subtração da AUC do controle (AUCct) do valor da AUC da amostra ou padrão (AUCam ou AUCpd), de acordo com a Equação 2:

$$AUCnet = AUCam \text{ ou } pd - AUC \text{ ct} (2)$$

Os valores de AUCnet (x), obtidos na Equação 2, foram plotados com os valores das concentrações (y) do Trolox e, com o ajuste da curva, os resultados foram expressos em equivalentes ao Trolox.

#### **3.2.3.4 Autoxidação do sistema β-caroteno/ácido linoléico**

Esse método foi realizado conforme descrito por Mikami et al. (2009), com algumas modificações. Uma emulsão foi preparada pesando-se, em um Erlenmeyer, 10 mg de ácido linoléico, 50 mg de Tween 40 e à eles foi adicionado 1mL de uma solução com concentração de 0,22 mg de β-caroteno/mL de clorofórmio. O clorofórmio foi removido por corrente de gás nitrogênio e à massa residual foram adicionados 22,5 mL de água aquecida (70°C) e aerada por 1 hora, e 2,5 mL de tampão fosfato de potássio 75 mM pH 6,8, também aquecido. A mistura foi muito bem agitada. Uma curva padrão, com concentrações variando de 25 a 125 µM, foi construída utilizando Trolox. Em uma microplaca de 96 poços, foram pipetados 8 µL dos extratos ou padrão e 200 µL da emulsão de β-caroteno/ácido linoleico. A placa foi levada ao equipamento SpectraMax – M3 (Molecular Devices), mantido a 50°C, e as leituras foram

feitas a 470 nm, a cada minuto, durante 2 horas. O cálculo foi feito utilizando a diferença entre as absorvâncias obtidas nos tempos inicial ( $t = 5'$ ) e final ( $t = 120'$ ). A curva padrão foi construída plotando-se o delta de absorvância no eixo X e a concentração no eixo Y e por meio de seu ajuste, os resultados foram expressos em equivalentes ao Trolox.

### **3.2.3.5 Sistema de oxidação em óleo para avaliação de antioxidantes**

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos em matriz lipídica foi feita de acordo com Branco e Castro (2011), com modificações. Uma alíquota de cada extrato de resíduo agroindustrial, equivalente a 100 ppm de compostos fenólicos, foi aplicada em 1 grama de óleo de linhaça. A mistura foi homogeneizada e 0,5 g dessa mistura foi pesado em "vials", os quais foram fechados com atmosfera inerte pela adição de gás nitrogênio e armazenados em estufa a 40°C, ao abrigo da luz, por 8 dias. Um controle negativo foi feito substituindo-se o volume de extrato por igual volume de solvente. Controles positivos também foram conduzidos utilizando padrões sintéticos de antioxidantes, TBHQ e BHT, a 100 ppm. Ao final dos oito dias, a concentração de hidroperóxidos foi determinada.

#### **3.2.3.5.1 Determinação da concentração de hidroperóxidos**

A concentração de hidroperóxido foi determinada de acordo com Branco e Castro (2011). Amostras de óleo (0,2 g) foram misturadas com 1,5 mL de uma solução iso-octano/2-propanol (3:1, v/v). A mistura foi agitada por três vezes durante 10 segundos, com intervalos de 20 segundos, e uma alíquota de 200 µL foi adicionada a 2,8 mL de uma solução de metanol/1-butanol (2:1, v/v). O volume final foi 3 mL. Uma solução tiocianato/ferro foi preparada pela adição de 500 µL de 3,94 M da solução de tiocianato a 500 µL de 0,072 M de  $Fe^{2+}$ . A solução 0,072 M  $Fe^{2+}$  foi obtida a partir do sobrenadante de uma mistura de 1,5 mL de 0,144 M  $FeSO_4$  e 1,5 mL 0,132 M  $BaCl_2$  em 0,4 M HCl. A solução tiocianato/ferro (30 µL) foi adicionada à solução metanol/1-butanol (3 mL), misturada, incubada a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 20 minutos. Depois do período de incubação, as leituras de absorvância das amostras foram medidas a 510 nm usando espectrofotômetro. O conteúdo de hidroperóxidos foi determinado usando uma curva padrão preparada com concentrações conhecidas de hidroperóxido de cumeno. Os resultados foram expressos como gramas de peróxido equivalentes ao cumeno/g óleo de linhaça.

### 3.2.4 Análise estatística

Todas as medidas foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média±desvio padrão. Os dados foram analisados usando ANOVA ( $p<0,05$ ) e o teste de Tukey foi aplicado para a separação das médias.

### 3.3 Resultados e Discussão

Uma vez definidas as condições otimizadas de etanol e temperatura (Capítulo 2), as amostras foram extraídas e os extratos obtidos avaliados quanto ao perfil de compostos fenólicos e potencial antioxidante.

#### 3.3.1 Compostos fenólicos totais

Os teores de compostos fenólicos totais dos extratos de resíduos agroindustriais, expressos em equivalentes de ácido gálico, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Teor de compostos fenólicos totais dos extratos otimizados de 17 resíduos agroindustriais

Resíduos agroindustriais	Compostos fenólicos totais (mg/g) <sup>1</sup>
Água (Laranja)	14,97±0,6 <sup>fgh</sup>
Bagaço (Laranja)	8,07±0,5 <sup>g<sup>hi</sup></sup>
Bagaço uva branca ( <i>Chenin Blanc</i> )	20,17±0,6 <sup>f</sup>
Engaço uva branca ( <i>Chenin Blanc</i> )	124,96±6,4 <sup>a</sup>
Bagaço uva tinta ( <i>Petit Verdot</i> )	66,69±7,0 <sup>c</sup>
Engaço uva tinta ( <i>Petit Verdot</i> )	96,77±6,6 <sup>b</sup>
Bagaço uva tinta ( <i>Syrah</i> )	39,30±2,37 <sup>e</sup>
Engaço uva tinta ( <i>Syrah</i> )	50,63±2,11 <sup>d</sup>
Borra (Café)	6,96±0,6 <sup>hi</sup>
Casca (Café)	17,02±0,5 <sup>f<sup>g</sup></sup>
Semente Graviola	3,08±0,05 <sup>i</sup>
“Fibra” Graviola	12,37±0,84 <sup>fgh</sup>
Semente açaí	70,03±2,71 <sup>c</sup>
Casca açaí	14,42±0,68 <sup>fgh</sup>
Semente Cupuaçu	33,67±1,74 <sup>c</sup>
Casca Cupuaçu	20,04±0,76 <sup>f</sup>
Semente Cajá	8,71±0,40 <sup>ghi</sup>

Legenda:

<sup>1</sup>expressos como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de resíduo (liofilizado)

Resultados são as médias ± desvio padrão da triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa a  $p<0,05$  (Tukey)

Os resíduos vinícolas apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos totais, com destaque para o engaço da variedade *Chenin Blanc* (124,96 mg EAG/g). Bagaço de laranja, borra de café, semente de graviola e de cajá apresentaram as menores concentrações

desses compostos (8,07; 6,96; 3,08 e 8,71 mg EAG/g, respectivamente). De fato, resíduos da indústria vinícola são reconhecidamente ricos em compostos fenólicos, em especial, estilbenos e flavonoides, como as antocianinas e procianidinas (KATALINIC et al., 2010).

Entre os engaços estudados, o da variedade branca apresentou a maior concentração de compostos fenólicos, contudo, ao se analisar os bagaços, os das variedades tintas se destacaram. Esses resultados evidenciam diferenças qualitativas na composição desses resíduos tintos e brancos. Com relação aos bagaços tintos, a maior concentração de antocianinas parece ser o fator determinante para os maiores teores de compostos fenólicos. Além disso, diferenças no processamento desses bagaços também podem influir sobre os resultados, já que os bagaços tintos são gerados após o processo de fermentação, tendo parte de seus açúcares convertidos em etanol. Já o bagaço branco, que não é fermentado, contém maior razão de açúcares por massa de resíduo, o qual funciona como “diluidor” da concentração de compostos fenólicos.

Os teores de compostos fenólicos totais de vinhos tintos das variedades *Syrah*, *Cabernet Sauvignon* e *Merlot* variaram de 48 a 56 mg EAG/g de vinho seco (IVANOVA-PETROPULOS et al., 2015), valores estes equivalentes aos bagaços tintos *Syrah* e *Petit Verdot* estudados (39,3 e 66,7 mg/g) (Tabela 1), porém, menores do que os engaços *Chenin Blanc*, *Petit Verdot* e *Syrah*, os quais variaram de 50,6 a 124,9 mg EAG/g. Assim, embora uma quantidade de compostos fenólicos seja transferida para o vinho durante o processo de vinificação, um conteúdo considerável desses compostos ainda permanece nos bagaços e, de uma forma mais concentrada, nos engaços.

A água de laranja apresentou maior teor de compostos fenólicos totais (14,97 mg EAG/g) quando comparada ao bagaço de laranja (8,07 mg EAG/g). Essa água “amarela” pode ser considerada uma espécie de pré-extrato, já que a água é um bom solvente extrator. Aliado a isso, o bagaço de laranja possui alta concentração de pectina em sua composição, o que diminui a razão de compostos fenólicos por massa de resíduo.

Em relação ao resíduo do café, embora seja rico em ácido clorogênico (DUARTE; PEREIRA; FARAH, 2010), sua borra apresentou menor teor de compostos fenólicos totais (6,96 mg EAG/g) em relação à casca de café e aos demais resíduos estudados. Cabe lembrar, entretanto, que esse resíduo foi gerado posteriormente ao processo de extração para a produção de café solúvel, o que pode justificar, a princípio, esse teor baixo.

O extrato da semente de açaí apresentou teor de compostos fenólicos (70,03 mg EAG/g) quase cinco vezes maior do que a casca de açaí (14,42 mg EAG/g) e superior ao verificado para os bagaços de uva *Chenin Blanc* e *Syrah* (20,17 e 39,30 mg EAG/g,

respectivamente). A semente de açaí também mostrou possuir maior teor de compostos fenólicos totais do que a sua polpa (34,37 mg/g) (GORDON et al., 2012).

Com exceção da graviola, as outras sementes sempre mostraram maiores teores de compostos fenólicos do que os outros resíduos produzidos da mesma fruta.

### 3.3.2 Identificação e quantificação de compostos fenólicos em resíduos agroindustriais

Por meio da técnica HPLC-DAD foi possível a identificação e quantificação, nos extratos otimizados de resíduos agroindustriais, de 11 compostos fenólicos, distribuídos em seis diferentes classes: ácidos gálico, siríngico, vanílico (ácidos hidroxibenzoicos), *p*-cumárico (ácido hidroxicinâmico), procianidinas B1 e B2 (proantocianidinas), catequina, epicatequina, epicatequina galato (flavan-3-ols), quecertina 3-β-d-glicosídeo (flavonol) e hesperidina (flavanona). Esses resultados, bem como os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) para cada padrão, podem ser encontrados na Tabela 2. O teor de cada composto fenólico foi expresso em µg/mg do extrato liofilizado.

Epicatequina, ácido gálico, catequina e procianidina B1 foram os compostos de maior ocorrência entre os resíduos analisados. Epicatequina pôde ser identificada e quantificada em 12 dos 17 extratos, ácido gálico e catequina em oito e procianidina B1 em sete deles.

Elevadas concentrações de hesperidina foram encontradas na água e no bagaço de laranja. A hesperidina é uma flavanona glicosilada amplamente encontrada em citrus. Foi uma das flavanonas encontradas em maior abundância em suco de laranja conforme estudo realizado por Escudero-López et al. (2013), sendo essa a classe principal de polifenóis presentes em laranja. Hesperidina tem sido relatada por produzir efeitos benéficos no sistema vascular, possuir ação anti-inflamatória, analgésica, antiproliferativa, além de apresentar atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral e antioxidante (GARG et al., 2001).

Em relação aos resíduos da uva *Chenin Blanc*, foram identificados e quantificados ácido gálico (bagaço e engaço), procianidinas B1 (bagaço e engaço) e B2 (bagaço), catequina, epicatequina (bagaço e engaço), epicatequina galato e quecertina 3-β-d-glicosídeo (bagaço). Embora um maior número de polifenóis tenha sido identificado no bagaço, as concentrações dos compostos presentes no engaço foram três vezes maior para ácido gálico, vinte e oito vezes maior para procianidina B1 e dezessete vezes maior para catequina.

Tabela 2 – Quantificação dos compostos fenólicos nos extratos de resíduos agroindustriais, por HPLC-DAD

Resíduos agroindustriais	Compostos fenólicos ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )										
	Ácidos hidroxibenzóicos			Ácido hidroxicinâmico	Proantocianidinas		Flavan-3-ols			Flavonol	Flavanona
	Ácido gálico	Ácido siríngico	Ácido vanílico	Ácido <i>p</i> -cumárico	Procianidina B1	Procianidina B2	Catequina	Epicatequina	Epicatequina galato	Quercetina 3- $\beta$ - <i>d</i> -glicosídeo	Hesperidina
AL	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	14,76 $\pm$ 0,75
BL	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	14,77 $\pm$ 2,92
BC	0,05 $\pm$ 0,00	nd	nd	nd	0,21 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,10	0,32 $\pm$ 0,05	0,08 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,00	nd
EC	0,15 $\pm$ 0,02	nd	nd	nd	5,93 $\pm$ 0,58	nd	4,11 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,02	nd	nd	nd
BP	0,84 $\pm$ 0,04	0,13 $\pm$ 0,01	nd	nd	1,93 $\pm$ 0,06	1,89 $\pm$ 0,15	7,43 $\pm$ 0,40	5,81 $\pm$ 0,23	nd	nd	nd
EP	0,14 $\pm$ 0,01	nd	nd	nd	3,04 $\pm$ 0,15	nd	2,49 $\pm$ 0,04	0,04 $\pm$ 0,00	nd	nd	nd
BS	0,43 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,00	nd	nd	0,84 $\pm$ 0,06	0,77 $\pm$ 0,05	3,43 $\pm$ 0,26	3,11 $\pm$ 0,12	nd	0,44 $\pm$ 0,02	nd
ES	0,99 $\pm$ 0,00	nd	nd	nd	2,09 $\pm$ 0,02	nd	2,57 $\pm$ 0,07	0,24 $\pm$ 0,01	nd	nd	nd
BF	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
CC	0,08 $\pm$ 0,00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
SG	nd	nd	nd	0,04 $\pm$ 0,00	nd	nd	nd	0,81 $\pm$ 0,03	nd	nd	nd
FG	nd	nd	nd	0,07 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,01	nd	0,19 $\pm$ 0,04	nd	nd	nd
SA	nd	nd	nd	nd	nd	nd	12,54 $\pm$ 0,50	5,31 $\pm$ 0,27	nd	nd	nd
CA	nd	0,16 $\pm$ 0,10	0,15 $\pm$ 0,02	nd	nd	nd	nd	1,30 $\pm$ 0,06	nd	nd	nd
SC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	8,08 $\pm$ 0,13	nd	nd	nd
CP	nd	nd	nd	nd	nd	2,78 $\pm$ 0,34	nd	2,59 $\pm$ 0,28	nd	nd	nd
SJ	4,26 $\pm$ 0,47	nd	nd	nd	nd	nd	0,72 $\pm$ 0,00	nd	nd	nd	nd
Parâmetros de validação											
LOD ( $\mu\text{g}$ )	0,0052	0,00074	0,0061	0,002	0,0046	0,0059	0,038	0,0087	0,0032	0,0068	0,95
LOQ ( $\mu\text{g}$ )	0,016	0,00225	0,018	0,0061	0,014	0,018	0,11	0,026	0,0098	0,021	2,89
Linearidade ( $R^2$ )	0,997	0,998	0,999	0,999	1,000	0,999	0,983	0,999	0,999	0,999	0,992

Legenda:

LOD: Limite de detecção

LOQ: Limite de quantificação

AL: Água Laranja; BL: Bagaço Laranja; BC: Bagaço *Chenin Blanc*; EC: Engaço *Chenin Blanc*; BP: Bagaço *Petit Verdot*; EP: Engaço *Petit Verdot*; BS: Bagaço *Syrah*; ES: Engaço *Syrah*; BF: Borra Café; CC: Casca Café; SG: Semente Graviola; FG: Fibra Graviola; SA: Semente Açaí; CA: Casca Açaí; SC: Semente Cupuaçu; CP: Casca Cupuaçu; SJ: Semente Cajá

nd: não detectado

Nos resíduos de *Petit Verdot* e *Syrah* foram identificados e quantificados ácido gálico (bagaço e engaço), ácido siríngico (bagaço), procianidinas B1 (bagaço e engaço) e B2 (bagaço), catequina, epicatequina (bagaço e engaço) e quercetina 3- $\beta$ -d-glicosídeo (bagaço *Syrah*). Ao contrário do verificado para as amostras de *Chenin Blanc*, nos resíduos de uvas tintas, os bagaços apresentaram um maior número de compostos e em maior concentração quando comparados aos seus engaços, com exceção da procianidina B1.

Os resultados obtidos indicam que nos resíduos da variedade de uva branca, os compostos fenólicos concentram-se majoritariamente no engaço. A soma dos polifenóis identificados nos resíduos de *Chenin Blanc* foi de 1,14  $\mu\text{g}/\text{mg}$  no bagaço e 10,36  $\mu\text{g}/\text{mg}$  no engaço. Já nas variedades tintas, maior concentração de fenólicos foi encontrada nos bagaços. A soma dos compostos identificados nos resíduos de *Petit Verdot*, por exemplo, resultou em 18,03  $\mu\text{g}/\text{mg}$  para o bagaço e em 5,71  $\mu\text{g}/\text{mg}$  para o engaço. Já para os resíduos de *Syrah*, esses resultados foram de 9,06  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de bagaço e de 5,89  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de engaço.

Em extrato de uva da variedade *Muscadine*, Wang e colaboradores (2010) identificaram ácido elágico, ácido gálico, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, catequina, mirecetina, quercetina e kaempferol. Muitos desses compostos também foram identificados em bagaços tintos das variedades *Cabernet Sauvignon* e *Royal Rouge* (YI et al., 2009). Engaços da variedade *Merlot* foram estudados quanto a sua composição fenólica e apresentaram quantidades expressivas de quercetina-3-glicuronídeo, catequina, ácido cafeoiltartárico e astilbina (SOUQUET et al., 2000). Portanto, resíduos vinícolas se caracterizam, dessa forma, como importantes fontes de compostos fenólicos.

Para os resíduos de café, borra e casca, só foi possível a identificação do ácido gálico na casca. Entretanto, nos cromatogramas obtidos, foi observada a presença de um pico com intensidade elevada (maior na casca do que na borra) com tempo de retenção em torno dos 24 minutos, porém não foi identificado. Embora essa identificação não tenha sido possível, no estudo conduzido por Yen et al (2005), utilizando extrato aquoso de borra de café, foi possível verificar a presença dos ácidos fenólicos (ácido clorogênico e ácido caféico) e compostos não fenólicos (cafeína, trigonelina, ácido nicotínico e 5-(hidroximetil) furfuraldeído).

Nos resíduos de graviola, foram identificados e quantificados ácido *p*-cumárico (semente e fibra), procianidinas B1, B2 (fibra) e epicatequina (semente e fibra). Não há relatos sobre a composição fenólica de resíduos de graviola. Os estudos para essa fruta apresentam basicamente o teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de sua polpa, conforme os trabalhos realizados por Almeida et al. (2011) e Silva et al. (2014).

Nos resíduos provenientes do processamento de açaí, foi possível identificar compostos fenólicos na casca (ácido siríntrico, ácido vanílico e epicatequina) e semente (catequina e epicatequina), sendo a semente de açaí a maior fonte de catequina entre as amostras de resíduos analisadas (12,54 µg/mg). Polpas de açaí, em três estádios diferentes de maturação e desengorduras, foram submetidas a análise por HPLC-ESI-MS/MS, o que possibilitou a identificação de vinte e dois compostos fenólicos, dentre os quais, ácido siríntrico e vanílico (GORDON et al., 2012). Em outro estudo feito com polpa de açaí, além dos quatro compostos fenólicos encontrados nos resíduos analisados, mais dezesseis foram identificados, usando a mesma técnica (PACHECO-PALENCIA; DUNCAN; TALCOTT, 2009).

Nos resíduos de cupuaçu foram identificados e quantificados procianidina B2 (casca) e epicatequina (casca e semente). A semente apresentou três vezes mais epicatequina (8,08 µg/mg) do que a casca (2,59 µg/mg). Dois flavonoides glicosilados sulfatados e nove flavonoides já conhecidos, entre eles catequina, epicatequina, quercetina e kaempferol também foram identificados em semente de cupuaçu (YANG et al., 2003), o que torna este resíduo uma promissora fonte de antioxidantes naturais.

Na semente de cajá foi identificado somente o ácido gálico. No estudo feito por Silva et al. (2012), foi possível identificar ácido elágico e quercetina em extratos de folhas de cajazeira. Entretanto, não foram encontrados na literatura estudos com os resíduos de cajá. Os dados obtidos nesse trabalho mostram que a semente de cajá é uma rica fonte de ácido gálico (4,26 µg/mg), superando em mais de cinquenta vezes os teores encontrados para amostras como o bagaço de *Chenin Blanc* (0,05 µg/mg), por exemplo.

### **3.3.2.1 Identificação e quantificação de antocianinas em resíduos agroindustriais**

Antes da identificação das antocianinas pela técnica de HPLC-DAD foi feita a determinação dos teores totais de antocianinas monoméricas dos extratos de resíduos de uva e açaí, haja vista que os outros resíduos não são fontes destes flavonoides (Tabela 3).

Tabela 3 – Quantificação de antocianinas monoméricas totais em extratos de resíduos de uva e açaí

Resíduos agroindustriais	Antocianinas monoméricas totais ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )
EC	nd
BC	nd
EP	$0,22 \pm 0,01^c$
BP	$0,99 \pm 0,06^b$
ES	$0,09 \pm 0,00^d$
BS	$1,41 \pm 0,04^a$
CA	$1,02 \pm 0,03^b$

Legenda:

EC: Engaço *Chenin Blanc*; BC: Bagaço *Chenin Blanc*; EP: Engaço *Petit Verdot*; BP: Bagaço *Petit Verdot*; ES: Engaço *Syrah*; BS: Bagaço *Syrah*; CA: Casca Açaí

nd: não detectado

Resultados são as médias  $\pm$  desvio padrão da triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa a  $p < 0,05$  (Tukey)

Enquanto a transferência de outros compostos fenólicos para o vinho não é muito elevada, a extração de antocianinas de uvas durante a vinificação parece ser mais eficiente, pois baixa quantidade desses compostos fenólicos foram retidos nos bagaços (0,99 a 1,41  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) (Tabela 3). Vinhos tintos de *Syrah*, *Cabernet Sauvignon* e *Merlot* apresentaram um conteúdo de antocianinas totais variando de 19 a 22 mg/g de vinho seco (IVANOVA-PETROPULOS et al., 2015), enquanto que os bagaços tintos desse estudo retiveram apenas 0,99 a 1,41 mg/g do total de antocianinas.

Por outro lado, a transferência de antocianinas da casca para a polpa de açaí não parece ser alta. De acordo com Pacheco-Palencia, Hawken e Talcott (2007), a concentração de antocianinas na polpa de açaí foi de 0,7293  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , considerando a densidade de 1,0 para a polpa (PEREIRA; QUEIROZ; FIGUEIRÊDO, 2002). Entretanto, a casca de açaí analisada neste estudo apresentou uma concentração de 1,02  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , ou seja, em média 28,5% maior do que na polpa (Tabela 3).

A identificação e quantificação de antocianinas, por HPLC, foi realizada somente nas amostras de maior teor de antocianinas totais, ou seja, bagaços tintos (*Petit Verdot* e *Syrah*) e casca de açaí. Para a identificação das antocianinas nesses extratos foram utilizados os seguintes padrões: mirtilina (delfinidina-3-o-glicosídeo), kuromanina (cianidina-3-o-glicosídeo), peonidina (peonidina-3-o-glicosídeo), oenina (malvidina-3-o-glicosídeo) e petunidina (mirtilidina). Os teores das antocianinas identificadas, bem como os limites de detecção e quantificação podem ser encontrados na Tabela 4. Já os cromatogramas obtidos para as três amostras e a indicação das antocianinas identificadas podem ser vistos na Figura 1.

Tabela 4 – Quantificação de antocianinas nos extratos de bagaços de uva *Petit Verdot*, *Syrah* e casca de açaí, por HPLC-DAD

Resíduos agroindustriais	Antocianinas ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )			
	Mirtilina	Kuromanina	Peonidina	Oenina
BP	0,07 $\pm$ 0,00	nd	0,04 $\pm$ 0,00	1,66 $\pm$ 0,08
BS	0,05 $\pm$ 0,00	nd	0,44 $\pm$ 0,01	1,71 $\pm$ 0,07
CA	nd	1,90 $\pm$ 0,03	nd	nd
<b>Parâmetros de validação</b>				
LOD ( $\mu\text{g}$ )	0,0012	0,030	0,0012	0,0075
LOQ ( $\mu\text{g}$ )	0,0035	0,092	0,0035	0,023
Linearidade ( $R^2$ )	0,999	0,999	0,999	0,999

Legenda:

BP: Bagaço *Petit Verdot*; BS: Bagaço *Syrah*; CA: Casca Açaí

Mirtilina, Kuromanina e Peonidina analisados a 520nm; Oenina analisada a 530nm

LOD: Limite de detecção; LOQ: Limite de quantificação

nd: não detectado

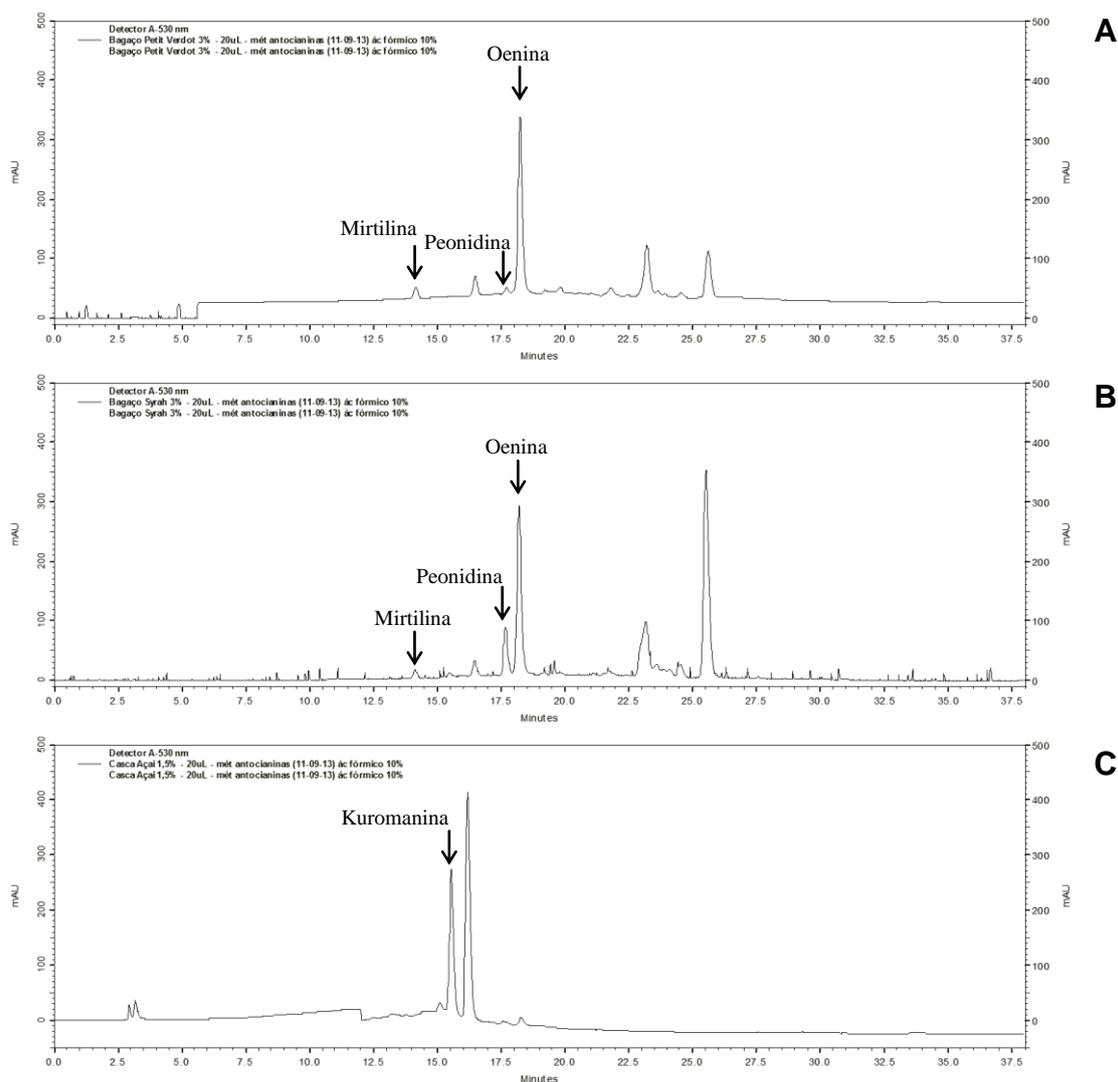


Figura 1 – Cromatogramas dos extratos de bagaço de *Petit Verdot* a 3% (A), bagaço de *Syrah* a 3% (B) e casca de açaí a 1,5% (C) obtidos no método para a identificação de antocianinas, analisados a 530 nm, com as antocianinas identificadas

Os resultados obtidos na quantificação de antocianinas por HPLC estão de acordo com o teor de antocianinas totais (Tabela 3), pois a soma das antocianinas identificadas mostrou o Bagaço *Syrah* como a amostra de maior concentração desses compostos, seguido pela casca de açaí e bagaço *Petit Verdot* (Tabela 4).

Nesses bagaços, três antocianinas puderam ser identificadas: mirtilina, peonidina e oenina. A oenina também foi a principal antocianina encontrada em bagaço da uva “Nerello Mascalese” (64,6 mg/kg), seguida pela peonidina e petunidina (AMICO et al., 2004).

As antocianinas delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina já foram identificadas em extratos de bagaço de uva da variedade “Muscadine” (WANG et al., 2010), “Nerello Mascalese” (AMICO et al., 2004), “Cabernet Mitos” (KAMMERER et al., 2005) e “Sunbelt” (MONRAD et al., 2010).

A identificação de antocianinas em polpa de açaí foi descrita por Rosso et al. (2008). Os autores encontraram a cianidina 3-glicosídeo e a cianidina 3-rutinosídeo como as antocianinas mais abundantes, o que corrobora com o achado para a casca de açaí onde a kuromanina (cianidina 3-glicosídeo) foi encontrada em alta concentração (1,9 µg/mg) (Tabela 4). De acordo com Gordon et al. (2012), a cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo também foram as antocianinas de maior concentração na polpa de açaí.

Portanto, bagaços de uvas tintas e casca de açaí, além de possuírem compostos fenólicos, também podem ser explorados como fontes de corantes naturais, como as antocianinas.

### **3.3.3 Triagem de resíduos agroindustriais de alto potencial antioxidante**

A atividade antioxidante dos extratos dos resíduos, preparados nas condições otimizadas de solvente e temperatura, está apresentada na Tabela 5.

Em todos os métodos de avaliação da capacidade antioxidante, o engaço de uva *Chenin Blanc* apresentou os melhores desempenhos, seguido pelos outros engaços e bagaços tintos (Tabela 5).

A capacidade antioxidante de cinco variedades de uva também foi avaliada por Ruberto et al. (2007) por meio do sequestro do radical livre DPPH e os valores encontrados, expressados como EC<sub>50</sub>, variaram de 14,45 a 38,93 µg/mL. Na análise pelo método de ABTS as mesmas amostras apresentaram atividades que variaram de 1,58 a 2,24 mmol TEAC/g. Outros estudos também mostraram elevadas atividades antioxidantes para extratos de bagaço de uva de diversas variedades, como os encontrados por Wang et al. (2010) para

“Muscadine”, Llobera e Cañellas (2007) para “Manto Negro” e Rubilar et al. (2007) para “Cabernet Sauvignon”.

No método de oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, o extrato de engaço de *Chenin Blanc* novamente demonstrou ser mais eficaz, promovendo maior proteção oxidativa do sistema emulsionado. Os demais engaços, seguidos dos bagaços tintos, também apresentaram boas atividades antioxidantes. Já a borra de café foi o resíduo que apresentou o menor desempenho. Os produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico (radicais peroxila), os quais são gerados pelo aquecimento e presença de oxigênio, causam o descolorimento (oxidação) do  $\beta$ -caroteno (KATALINIC et al., 2010; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Na presença de antioxidantes, a perda da coloração característica deste carotenoide é retardada. A ação desses compostos bioativos pode ser direcionada na prevenção ou diminuição da oxidação do ácido linoléico, do  $\beta$ -caroteno ou de ambos. Entretanto, mais estudos ainda são necessários para se elucidar os mecanismos de ação antioxidante dos extratos desses resíduos agroindustriais na emulsão.

Cascas de quatorze diferentes variedades de uva também foram eficientes inibidores da oxidação do ácido linoléico, impedindo assim a descoloração do  $\beta$ -caroteno, sendo que as de variedade tinta foram mais eficientes do que as brancas (KATALINIC et al., 2010).

Estes resultados sugerem que os resíduos da indústria vinícola são ativos na prevenção da oxidação em emulsões, a qual representa uma matriz mais aproximada das matrizes alimentares reais, caracterizadas por sua heterogeneidade.

Tabela 5 – Atividade antioxidante dos extratos dos resíduos agroindustriais pelos métodos de redução dos radicais livre DPPH e ABTS, oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)

Resíduos agroindustriais	Atividade antioxidante			
	DPPH ( $\mu\text{mol/g}$ ) <sup>2</sup>	ABTS ( $\mu\text{mol/g}$ ) <sup>2</sup>	$\beta$ -caroteno/ácido linoleico ( $\mu\text{mol/g}$ ) <sup>2</sup>	ORAC ( $\mu\text{mol/g}$ ) <sup>2</sup>
Água (Laranja)	28,78 $\pm$ 2,60 <sup>ij</sup>	239,07 $\pm$ 12,25 <sup>defg</sup>	51,78 $\pm$ 9,71 <sup>e</sup>	1814,60 $\pm$ 98,11 <sup>b</sup>
Bagaço (Laranja)	16,45 $\pm$ 0,29 <sup>j</sup>	123,00 $\pm$ 11,22 <sup>efg</sup>	34,34 $\pm$ 1,61 <sup>e</sup>	1015,42 $\pm$ 14,64 <sup>b</sup>
Bagaço uva branca ( <i>Chenin Blanc</i> )	191,32 $\pm$ 10,42 <sup>h</sup>	218,07 $\pm$ 16,93 <sup>defg</sup>	46,32 $\pm$ 8,47 <sup>e</sup>	739,44 $\pm$ 29,28 <sup>b</sup>
Engaço uva branca ( <i>Chenin Blanc</i> )	1086,65 $\pm$ 30,00 <sup>b</sup>	2419,91 $\pm$ 112,56 <sup>c</sup>	396,46 $\pm$ 4,23 <sup>b</sup>	3718,68 $\pm$ 97,29 <sup>b</sup>
Bagaço uva tinta ( <i>Petit Verdot</i> )	540,38 $\pm$ 8,75 <sup>d</sup>	626,35 $\pm$ 9,23 <sup>defg</sup>	294,55 $\pm$ 92,47 <sup>bc</sup>	2796,81 $\pm$ 75,21 <sup>b</sup>
Engaço uva tinta ( <i>Petit Verdot</i> )	685,14 $\pm$ 13,33 <sup>c</sup>	860,09 $\pm$ 14,07 <sup>d</sup>	323,50 $\pm$ 37,52 <sup>bc</sup>	2939,51 $\pm$ 268,67 <sup>b</sup>
Bagaço uva tinta ( <i>Syrah</i> )	310,03 $\pm$ 6,66 <sup>f</sup>	653,77 $\pm$ 33,65 <sup>defg</sup>	231,05 $\pm$ 9,83 <sup>cd</sup>	1362,92 $\pm$ 78,95 <sup>b</sup>
Engaço uva tinta ( <i>Syrah</i> )	473,45 $\pm$ 8,04 <sup>e</sup>	805,42 $\pm$ 31,02 <sup>def</sup>	304,86 $\pm$ 21,73 <sup>bc</sup>	2190,96 $\pm$ 139,81 <sup>b</sup>
Borra (Café)	24,32 $\pm$ 1,83 <sup>ij</sup>	78,08 $\pm$ 4,67 <sup>g</sup>	27,18 $\pm$ 11,44 <sup>e</sup>	336,47 $\pm$ 13,50 <sup>b</sup>
Casca (Café)	62,17 $\pm$ 1,33 <sup>ij</sup>	156,16 $\pm$ 7,07 <sup>efg</sup>	89,49 $\pm$ 26,80 <sup>e</sup>	902,61 $\pm$ 9,00 <sup>b</sup>
Semente Graviola	13,80 $\pm$ 0,85 <sup>j</sup>	32,45 $\pm$ 2,00 <sup>g</sup>	30,81 $\pm$ 0,86 <sup>e</sup>	373,06 $\pm$ 94,95 <sup>b</sup>
“Fibra” Graviola	51,99 $\pm$ 1,25 <sup>ij</sup>	106,38 $\pm$ 3,47 <sup>g</sup>	42,74 $\pm$ 7,55 <sup>e</sup>	203,91 $\pm$ 47,25 <sup>b</sup>
Semente Açaí	504,20 $\pm$ 44,70 <sup>de</sup>	806,50 $\pm$ 15,10 <sup>de</sup>	121,90 $\pm$ 27,65 <sup>de</sup>	1334,26 $\pm$ 119,56 <sup>b</sup>
Casca Açaí	86,34 $\pm$ 2,65 <sup>i</sup>	183,91 $\pm$ 11,55 <sup>defg</sup>	65,72 $\pm$ 2,62 <sup>e</sup>	735,44 $\pm$ 49,55 <sup>b</sup>
Semente Cupuaçu	261,02 $\pm$ 6,38 <sup>fg</sup>	359,61 $\pm$ 8,37 <sup>defg</sup>	86,73 $\pm$ 30,24 <sup>e</sup>	1214,69 $\pm$ 173,68 <sup>b</sup>
Casca Cupuaçu	168,38 $\pm$ 1,69 <sup>h</sup>	220,01 $\pm$ 6,33 <sup>defg</sup>	59,39 $\pm$ 5,23 <sup>e</sup>	571,44 $\pm$ 43,51 <sup>b</sup>
Semente Cajá	85,10 $\pm$ 5,85 <sup>i</sup>	121,78 $\pm$ 3,63 <sup>fg</sup>	65,18 $\pm$ 1,04 <sup>e</sup>	421,47 $\pm$ 60,44 <sup>b</sup>
BHT	227,36 $\pm$ 21,33 <sup>gh</sup>	10727,83 $\pm$ 861 <sup>a</sup>	2905,93 $\pm$ 146 <sup>a</sup>	874,95 $\pm$ 34,18 <sup>b</sup>
TBHQ	6763,50 $\pm$ 43,40 <sup>a</sup>	7236,30 $\pm$ 351 <sup>b</sup>	2837,58 $\pm$ 25,41 <sup>a</sup>	286207,51 $\pm$ 19330 <sup>a</sup>

Legenda:

<sup>1</sup>expressos como mg de equivalentes de ácido gálico por grama de resíduo (base seca)

<sup>2</sup>expressos como equivalentes de Trolox por grama de resíduo (base seca)

Resultados são as médias  $\pm$  desvio padrão da triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa a  $p < 0,05$  (Tukey)

Os resíduos vinícolas também apresentaram as maiores capacidades de absorção do radical oxigênio, a qual foi avaliada pelo método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), com destaque, mais uma vez, para o engaço de *Chenin Blanc* (3.718,68  $\mu\text{mol/g}$ ).

Para o resíduo de açaí a atividade antioxidante da semente foi maior do que a casca em todos os métodos testados. Atividade antioxidante equivalente ao Trolox e superior ao BHT foi encontrada em semente de açaí, de acordo com o trabalho desenvolvido por Rodrigues et al. (2006). Extrato de semente de açaí também apresentou maior potencial antioxidante do que o BHT nos ensaios realizados neste estudo, exceto para o sistema acoplado de beta-caroteno/ácido linoléico. A atividade antioxidante de semente de açaí pode ser em parte atribuída à sua composição em compostos fenólicos, já que apresenta alta concentração de catequina e epicatequina, como verificado neste trabalho, e também procianidinas poliméricas (RODRIGUES et al., 2006), tornando esta semente uma fonte potencial de antioxidantes naturais.

Assim como o verificado para os resíduos de açaí, a semente de cupuaçu também apresentou maior atividade antioxidante do que sua casca em todos os métodos de avaliação realizados. Esses resultados podem ser explicados pela diferença na composição fenólica da semente de cupuaçu que possui três vezes mais epicatequina do que a casca. De fato, os compostos presentes em semente de cupuaçu, entre eles, catequina, epicatequina, quercetina e kaempferol, possuem alta atividade antioxidante (YANG et al., 2003).

O extrato de semente de cajá, que contém o terceiro menor teor de compostos fenólicos totais, apresentou atividade antioxidante superior do que a exibida pelo extrato de fibra de graviola, a qual tem teor de compostos fenólicos maior (Tabela 1). Isso pode ser explicado, a priori, pela alta concentração de ácido gálico presente na semente de cajá que, ao contrário dos fenólicos identificados na fibra de graviola, apresenta maior resposta antioxidante nos métodos utilizados.

O menor teor de compostos fenólicos totais foi observado para o extrato da semente de graviola (3,08 mg/g), o qual apresentou concentração muito inferior ao da fibra (12,37 mg/g). Com relação à atividade antioxidante, a mesma tendência foi observada, exceto no método do ORAC, onde o extrato de semente de graviola superou a atividade da fibra. A maior concentração de epicatequina da semente de graviola em relação à fibra poderia explicar a maior resposta antioxidante pelo ORAC.

De modo geral, a atividade antioxidante de um composto irá depender tanto de sua concentração e de suas características estruturais, tais como quantidade e disposição de grupos químicos funcionais (-OH, por exemplo), quanto da composição do meio reacional (KUMAR

et al., 2015). Isso explica a variabilidade da atividade antioxidante dos resíduos agroindustriais diante dos diferentes métodos de avaliação empregados. No ensaio de sequestro de radicais livres DPPH, sete das dezessete amostras apresentaram maior atividade antioxidante do que o padrão sintético BHT, com destaque para o engaço *Chenin Blanc*, o engaço *Petit Verdot* e a semente de açaí. Já no método ABTS, todas as amostras foram menos eficazes do que BHT e TBHQ em reduzir o radical livre, entretanto, o extrato bruto de engaço *Chenin Blanc* alcançou aproximadamente a metade da ação antioxidante demonstrada pelo BHT, um composto puro. Em meio emulsionado, os antioxidantes sintéticos demonstraram as maiores atividades antioxidantes, contudo, dez dos dezessete resíduos agroindustriais apresentaram atividade antioxidante superior ao BHT na redução de radicais peroxila, produzidos no ensaio ORAC.

No ensaio de aplicação dos extratos dos resíduos em óleo de linhaça, a concentração de hidroperóxidos ao final dos oito dias revelou que todos os extratos, mesmo em sua forma bruta, demonstraram ter boa ação protetora contra a oxidação lipídica, equivalendo-se ou superando as atividades observadas para os antioxidantes sintéticos (Figura 2). O método empregado para essa avaliação, do tiocianato férrico, é capaz de medir os hidroperóxidos, os quais são os principais produtos primários do processo oxidativo e estão ligados à deterioração dos produtos a base de lipídios (KIOKIAS; VARZAKAS, 2014).

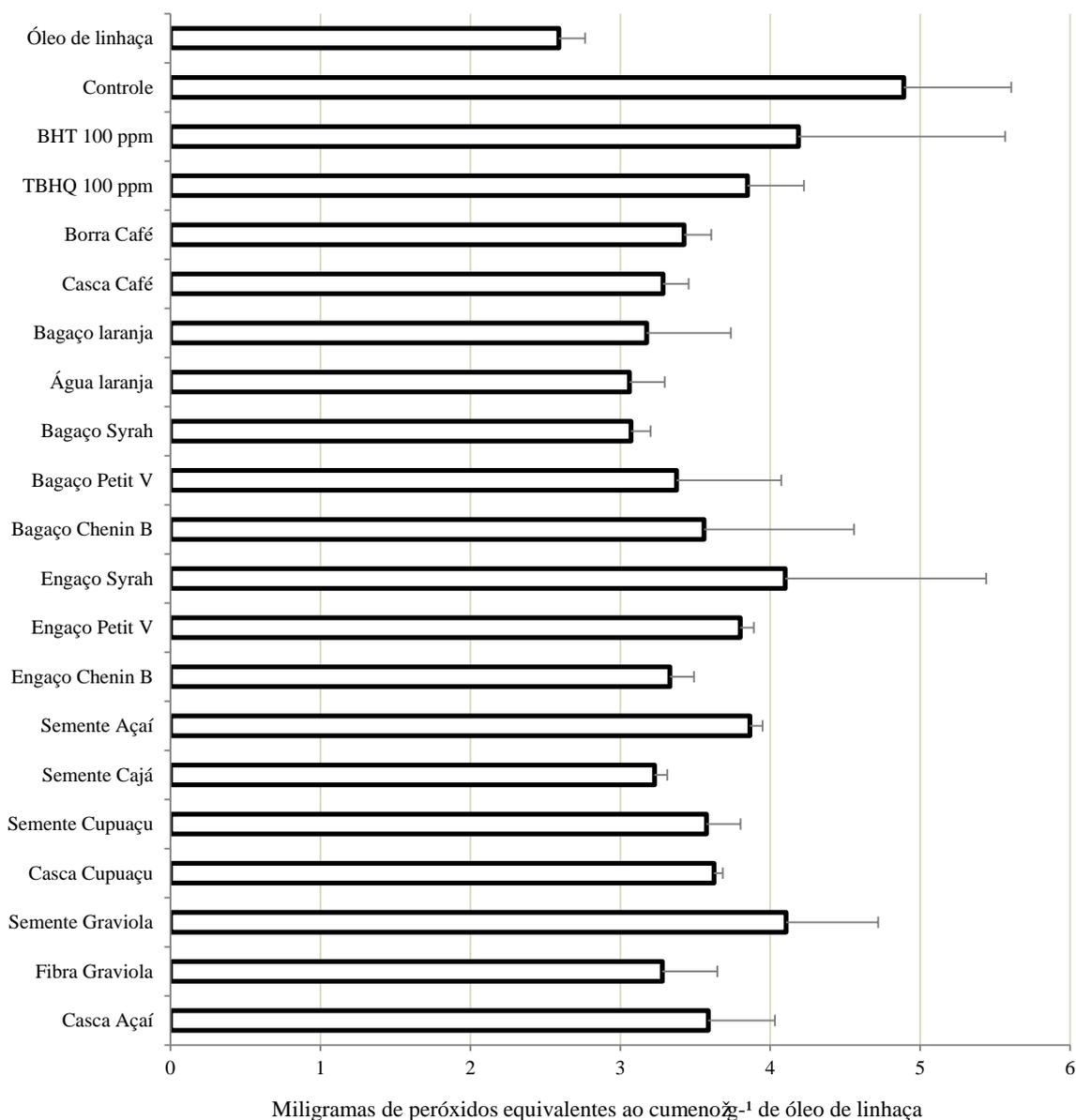


Figura 2– Teor de peróxidos (em miligramas) equivalentes ao cumeno por grama de óleo de linhaça adicionado dos extratos de resíduos agroindustriais ou antioxidantes sintéticos (TBHQ, BHT), a 100ppm

Os extratos de casca de café, resíduos de laranja (bagaço e água), bagaço *Syrah*, engaço *Chenin Blanc*, semente de cajá e fibra de graviola apresentaram-se como os melhores antioxidantes na prevenção da oxidação do óleo de linhaça, com valores de 3,29; 3,17; 3,06; 3,07; 3,33; 3,23; 3,28 mg de cumeno/g de óleo, respectivamente. Esses resultados ficaram abaixo do observado para os padrões de antioxidantes sintéticos BHT e TBHQ, aplicados ao óleo na mesma concentração, cujos valores foram de 4,19 e 3,85 mg de cumeno/g, significando, portanto, que esses extratos de resíduos agroindustriais foram capazes de proteger a matriz lipídica da oxidação.

Os engaços de *Syrah* e *Petit Verdot* e sementes de açaí e graviola, apresentaram as menores atividades antioxidantes, mas ainda assim, foram equivalentes aos resultados observados para os antioxidantes sintéticos. A concentração de hidroperóxidos do óleo de linhaça, não submetido à oxidação e sem antioxidantes, foi de 2,59, já o controle, oxidado e sem antioxidante, alcançou 4,89 mg de cumeno/g.

Estudo realizado por Kiokias e Varzakas (2014) revelou que quercetina apresentou atividade antioxidante em uma emulsão óleo em água de óleo de semente de algodão exposto a auto-oxidação térmica, enquanto que catequina e  $\beta$ -caroteno não exibiram proteção oxidativa.

Assim, as diferenças observadas entre os extratos de resíduos como antioxidantes de óleo de linhaça, podem ser devidas as suas composições fenólicas distintas e, conseqüentemente, aos seus diferentes modos de ação.

Antioxidantes podem agir em meio lipídico como primários, os quais são capazes de quebrar a reação em cadeia ao sequestrarem os radicais livres intermediários formados durante a propagação, e como antioxidantes secundários, ao prevenirem ou retardarem o processo oxidativo pela supressão dos iniciadores da oxidação ou pela regeneração dos antioxidantes primários (SHAHIDI; ZHONG, 2010).

Após análise de todos os resultados de atividade antioxidante, dois resíduos se destacaram, os quais foram: engaço de *Chenin Blanc*, por ter se destacado em todos os métodos de avaliação da atividade antioxidante, e a semente de açaí, que apesar de não ter apresentado os melhores resultados como antioxidante em matriz oleosa (óleo de linhaça), demonstrou alta capacidade antioxidante frente aos diversos meios reacionais testados. À isto, somaram-se as elevadas quantidades geradas desses resíduos pelas atividades agroindustriais. Estimativas apontam para a geração de 30% de resíduos vinícolas em relação ao montante de uvas processadas – cerca de 48 milhões de toneladas em todo o mundo. Já a semente de açaí, que tem uso atual como adubo orgânico ou em artesanatos, corresponde a cerca de 70% do açaí que é processado.

### 3.4 Conclusão

Os resíduos agroindustriais analisados possuem compostos fenólicos de grande potencial bioativo, especialmente os engaços de uvas e semente de açaí, os quais se apresentaram como alternativas promissoras e abundantes de compostos antioxidantes.

## Referências

- AL-DUAIS, M.; MÜLLER, L.; BÖHM, V.; JETSCHKE, G. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 228, n.5, p. 813–821, 2009.
- ALMEIDA, M.M.B.; SOUSA, P.H.M.; ARRIAGA, A.M.C; PRADO, G.M.; MAGALHÃES, C.E.C.; MAIA, G.A.; LEMOS, T.L.G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, Essex, v. 44, p. 2155-2159, 2011.
- AMICO, V.; NAPOLI, E. M.; RENDA, A.; RUBERTO, G.; 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.
- ARAGÃO, N.M.; VELOSO, M.C.C.; ANDRADE, J.B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n.9, p. 2476-2481, 2009.
- BAYDAR, N.G.; ÖZKAN, G.; YAŞAR, S. Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 9, p. 1131–1136, 2007.
- BRANCO, G.F.; CASTRO, I.A. Optimization of oil oxidation by response surface methodology and the application of this model to evaluate antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists’ Society**, Chicago, v. 88, p. 1747-1758, 2011.
- DUARTE, G.S.; PEREIRA, A.A.; FARAH, A. Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods. **Food Chemistry**, Barking, v. 118, p. 851-855, 2010.
- DUARTE-ALMEIDA, J.M.; DOS SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH<sup>•</sup>. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.2, p. 446-452, 2006.
- EFSA. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the commission related to tertiary-butylhydroquinone (TBHQ). **The EFSAJ Journal**, Parma, v. 84, p. 1–50, 2004.
- ESCUADERO-LÓPEZ, B.; CERRILLO, I.; HERRERO-MARTÍN, G.; HORNERO-MÉNDEZ, D.; GIL-IZQUIERDO, A.; MEDINA, S.; FERRERES, F.; BERNÁ, G.; MARTÍN, F.; FERNÁNDEZ-PÁCHON, M-S. Fermented Orange juice: source of higher carotenoid and flavanone contents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 61, p. 8773 – 8782, 2013.
- GARG, A; GARG, S; ZANEVELD, L.J.D; SINGLA A K. Chemistry and Pharmacology of The Citrus Bioflavonoid Hesperidin. **Phytotherapy Research**, London, v.15, p. 655–669, 2001.

- GORDON, A.; CRUZ, A.P.G.; CABRAL, L.M.C.; FREITAS, S.C.; TAXI, C.M.A.D.; DONANGELO, C.M.; MATTIETTO, R.A.; FRIEDRICH, M.; MATTA, V.M.; MARX, F. Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açaí fruits (*Euterpe oleraceae* Mart.) during ripening. **Food Chemistry**, Barking, v. 133, n. 2, p. 256–263, 2012.
- HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemistry Society Transactions**, London, v. 35, n.5, p. 1147-1150, 2007.
- IVANOVA-PETROPULOS, V.; RICCI, A.; NEDELKOVSKI, D.; DIMOVSKA, V.; PARPINELLO, G. P.; VERSARI, A. Targeted analysis of bioactive phenolic compounds and antioxidant activity of Macedonian red wines. **Food Chemistry**, Barking, v. 171, p. 412–420, 2015.
- KAMMERER, D.; KLJUSURIC, J.G.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Recovery of anthocyanins from grape pomace extracts (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Mitos) using a polymeric adsorber resin. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v.220, p. 431-437, Feb., 2005.
- KATALINIĆ, V.; MOŽINA, S.S.; SKROZA, D.; GENERALIĆ, I.; ABRAMOVIČ, H.; MILOŠ, M.; LJUBENKOV, I.; PISKERNIK, S.; PEZO, I.; TERPINC, P.; BOBAN, M. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). **Food Chemistry**, Barking, v. 119, n. 2, p. 715–723, 2010.
- KIOKIAS, S.; VARZAKAS, T. Activity of flavonoids and  $\beta$ -carotene during the auto-oxidative deterioration of model food oil-in water emulsions. **Food Chemistry**, Barking, v. 150, p. 280-286, 2014.
- KUMAR, Y.; YADAV, D. N.; AHMAD, T.; NARSAIAH, K. Recent trends in the use of natural antioxidants for meat and meat Products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 00, p. 1-17, 2015.
- 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.
- LLOBERA, A.; CAÑELLAS, J. Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. **Food Chemistry**, Barking, v. 101, p. 659-666, Jan., 2007.
- MELO, P.S.; BERGAMASCHI, K.B.; TIVERON, A.P.; MASSARIOLI, A.P.; OLDONI, T.L.C.; ZANUS, M.C.; PEREIRA, G.E.; ALENCAR, S.M. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 6, p. 1088–1093, 2011.
- MELO, P.S.; MASSARIOLI, A.P.; DENNY, C.; SANTOS L.F.; FRANCHIN, M.; PEREIRA, G.E.; VIEIRA, T.M.F.S.; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.M. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, Barking, v. 181, p. 160–169, 2015.

MIKAMI, I.; YAMAGUCHI, M.; SHINMOTO, I.; TSUSHIDA, T. Development and validation of a microplate-based  $\beta$ -carotene bleaching assay and comparison of antioxidant activity (AOA) in several crops measured by  $\beta$ -carotene bleaching, DPPH and ORAC assays. **Food Science and Technology Research**, Tsukuba, v. 15, n.2, p. 171-178, 2009.

MONRAD, J.K.; HOWARD, L.R.; KING, J.W.; SRINIVAS, K.; MAUROMOUSTAKOS, A. Subcritical solvent extraction of anthocyanins from dried red grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 7, p. 2862-2868, 2010.

OLDONI, T.L.C.; MELO, P.S.; MASSARIOLI, A.P.; MORENO, I.A.M.; BEZERRA, R. M.N.; ROSALEN, P.L.; SILVA, G.V.J.; NASCIMENTO, A.M.; ALENCAR, S.M. Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*) skin by combination of chromatography techniques. **Food Chemistry**, Barking, v. 192, p. 306–312, 2016.

PACHECO-PALENCIA, L.A.; DUNCAN, C.E.; TALCOTT, S.T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. **Food Chemistry**, Barking, v. 115, p. 1199-1205, 2009.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; HAWKEN, P.; TALCOTT, S.T. Phytochemical, antioxidant and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) as affected by clarification, ascorbic acid fortification and storage. **Food Research International**, Essex, v. 40, n. 1, p. 620-628, 2007.

PACKER, V.G.; MELO, P.S.; BERGAMASCHI, K.B.; SELANI, M.M.; VILLANUEVA, N.D.M.; ALENCAR, S.M.; CONTRERAS-CASTILLO, C.J. Chemical characterization, antioxidant activity and application of beetroot and guava residue extracts on the preservation of cooked chicken meat. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 52, n. 11, p. 7409-7416, 2015.

PEREIRA, E.A.; QUEIROZ, A.J.D.M.; FIGUEIRÊDO, R.M.F. Massa específica de polpa de açai em função do teor de sólidos totais e da temperatura. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 6, n. 3, p. 526–530, 2002.

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, n. 10, p. 4290–4302, 2005.

RODRIGUES, R.B.; LICHTENTHÄLER, R.; ZIMMERMANN, B.F.; PAPAGIANNPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; MARX, F.; MAIA, J.G. S.; ALMEIDA, O. Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) seeds and identification of their polyphenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 12, p. 4162–4167, 2006.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n.1, p.53-60, 2007.

ROSSO, V.V.; HILLEBRAND, S.; MONTILLA, E.C.; BOBBIO, F.O.; WINTERHALTER, P.; MERCADANTE, A.Z. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC–PDA–MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v.21, p.291–299, 2008.

- RUBERTO, G.; RENDA, A.; DAQUINO, C.; AMICO, V.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C.; TOMMASI, N. DE. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. **Food Chemistry**, Barking, v. 100, n. 1, p. 203–210, 2007.
- RUBILAR, M.; PINELO, M.; SHENE, C.; SINEIRO, J.; NUÑEZ, 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, n. 25, p. 10101–10109, 2007.
- SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. **Chemical Society Reviews**, London, v.39, p. 4067-4079, 2010.
- SIKORSKI, Z.E.; KOLAKOWSKA, A. **Chemical and Functional Properties of Food Lipids**. ISBN: 1-58716-105-2, 2003, 389 p.
- SILVA, A.R.A.; MORAIS, S.M.; MARQUES, M.M.M.; OLIVEIRA, D.F.; BARROS, C.C.; ALMEIDA, R.R.; VIEIRA, I.G.P.; GUEDES, M.I.F. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two Spondias species from Northeastern Brazil. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 50(6), p. 740-746, 2012.
- SILVA, L.M.R; FIGUEIREDO, E.A.T.; RICARDO, N.M.P.S.; VIEIRA, I.G.P.; FIGUEIREDO, R.W.; BRASIL, I.M.; GOMES, C.L. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, Barking, v. 143, p. 398-404, 2014.
- SOUQUET, J.; LABARBE, B.; LE GUERNEVÉ, C.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Phenolic Composition of Grape Stems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 1076–1080, 2000.
- SOUSA, M.S.B.; VIEIRA, L.M. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 14, n. 3, p. 202-210, 2011.
- WAHARO, T.; MCCLEMENTS, J.; DECKER, E.A. Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v.22, p. 3-13, 2011.
- WANG, X.; TONG, H.; CHEN, F.; GANGEMI, J. D. Chemical characterization and antioxidant evaluation of muscadine grape pomace extract. **Food Chemistry**, Barking, v. 123, n. 4, p. 1156–1162, 2010.
- YANG, H.; PROTIVA, P.; CUI, B.; MA, C.; BAGGETT, S.; HEQUET, V.; MORI, S.; WEINSTEIN, I.B.; KENNELLY, E.J. New bioactive polyphenols from *Theobroma grandiflorum* (“Cupuaçu”). **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 66, p. 1501-1504, 2003.
- YEN, W.-J.; WANG, B.-S.; CHANG, L.-W.; DUH, P.-D. Antioxidant Properties of Roasted Coffee Residues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 7, p. 2658–2663, 2005.

YI, C.; SHI, J.; KRAMER, J.; XUE, S.; JIANG, Y.; ZHANG, M.; MA, Y.; POHORLY, J. Fatty acid composition and phenolic antioxidants of winemaking pomace powder. **Food Chemistry**, Barking, v. 114, n. 2, p. 570–576, 2009.

#### 4 CONCENTRAÇÃO E FRACIONAMENTO BIOGUIADO PELA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE ENGAÇO *CHENIN BLANC* E SEMENTE DE AÇAÍ

##### Resumo

Os extratos de engaço de uva *Chenin Blanc* e semente de açaí, obtidos após processo de otimização por planejamento multivariado e método de superfície de resposta, foram submetidos à concentração e fracionamento bioguiado a fim de se obter extratos ricos em compostos fenólicos, bem como frações com elevada atividade antioxidante de potencial uso industrial. A concentração foi feita com resina Amberlite XAD<sup>®</sup>-2 e o extrato obtido foi fracionado em gel Sephadex LH-20. Ao final do processo, doze frações do engaço de uva e oito da semente de açaí foram produzidas. Os métodos de concentração e fracionamento aumentaram a atividade antioxidante, quando esta foi avaliada pelos métodos ABTS, ORAC, seqüestro de O<sub>2</sub><sup>-</sup> e ácido hipocloroso, bem como a concentração de polifenóis quando comparado com o extrato bruto. Compostos como procianidina B1, catequina, epicatequina e resveratrol, determinados pelas técnicas de HPLC-DAD e UHPLC-ESI-LTQ-MS, foram concentrados nas frações mais bioativas, sendo o resveratrol identificado pela primeira vez em semente de açaí. O método de fracionamento empregado também foi eficaz ao produzir uma fração altamente concentrada em catequina e epicatequina a partir de semente de açaí. Extratos brutos e concentrados de semente de açaí e engaço *Chenin Blanc* apresentaram atividade antiproliferativa e anti-inflamatória, a níveis não hepatotóxicos. Engaço *Chenin Blanc* e semente de açaí, portanto, apresentam potencial para serem aproveitados como matéria-prima para a produção de frações com elevada atividade antioxidante e ricas em fitoquímicos bioativos de interesse para as indústrias de cosméticos, farmacêutica e/ou de alimentos.

Palavras-chave: Resíduos agroindustriais; Compostos fenólicos; Amberlite XAD<sup>®</sup>-2; Sephadex LH-20; UHPLC-ESI-LTQ-MS; ROS

##### Abstract

The *Chenin Blanc* rachis and açaí seeds extracts, obtained after the optimization by response surface methodology, were subject to bioassay-guided concentration and fractionation aiming to obtain phenolic compounds-rich extracts, as well as, fractions with high antioxidant activity of potential industrial use. The concentration was made with Amberlite XAD<sup>®</sup>-2 resin and the extract produced was fractionated in Sephadex LH-20 gel. At the end of the process twelve fractions of grape rachis and eight of açaí seeds were produced. The concentration and fractionation method performed increased the antioxidant activity (ABTS, ORAC, O<sub>2</sub><sup>-</sup> and hypochlorous acid scavenging) and the polyphenols concentration when it was compared with the crude extract. Compounds like procyanidin B1, catechin, epicatechin and resveratrol, by HPLC-DAD and UHPLC-ESI-LTQ-MS, were concentrated in the most bioactive fractions and the resveratrol was identified in açaí seeds for the first time. The fractionating method performed also was effective to produce one fraction highly concentrated of catechin and epicatechin from açaí seeds. The *Chenin Blanc* rachis and açaí seeds crude and concentrated extracts showed antiproliferative and anti-inflammatory activities at not hepatotoxic levels. Therefore, *Chenin Blanc* rachis and açaí seeds can be harnessed as raw material for the production of fractions with high antioxidant activity and rich in bioactive phytochemicals of interest to cosmetic, pharmaceutical and food industries.

Keywords: Agroindustrial residues; Phenolic compounds; Amberlite XAD<sup>®</sup>-2; Sephadex LH-20; UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS; ROS

#### 4.1 Introdução

Compostos fenólicos, provenientes de fontes naturais, já demonstraram possuir ações benéficas à saúde ao serem ingeridos, por meio do consumo de vinhos, chá verde, frutas vermelhas, chocolate, etc (DIMITRIOS, 2006; MAKKRIS; KALLITHRAKA; KEFALAS, 2006; KHAN; MUKHTAR, 2007). A bioatividade atribuída a esses compostos é devida, principalmente, às suas atividades antioxidante (MELO et al., 2015), anti-proliferativa (RUDOLFOVÁ et al., 2014), anti-inflamatória (DENNY et al., 2014), entre outras.

Além disso, os compostos fenólicos são capazes de prevenir a peroxidação lipídica, ao serem adicionados em produtos alimentares, garantindo a conservação dos atributos de qualidade físico-química e sensorial de alimentos (SELANI et al., 2011; SHIRAHIGUE et al., 2011; PACKER et al., 2015).

Sabe-se, contudo, que os compostos de maior bioatividade em produtos naturais normalmente se encontram em pequenas concentrações em relação às outras substâncias presentes, como carboidratos e lipídios, por exemplo. Assim, métodos para a extração e produção de frações ricas em compostos bioativos são geralmente realizados e incluem técnicas de fracionamento bioguiado para a atividade biológica de interesse (OLDONI et al., 2016).

A técnica do fracionamento bioguiado em estudos com produtos naturais já tem sido empregada por vários pesquisadores, devido aos benefícios advindos de uma racionalização do processo de isolamento de substâncias biologicamente ativas a partir de extratos quimicamente complexos. Sua principal vantagem é que conforme as frações/subfrações são obtidas, estas podem ser submetidas a ensaios biológicos e/ou químicos para verificar onde a atividade biológica está concentrada e, desta forma, prosseguir o trabalho somente com as frações de interesse, para que a atividade não seja perdida durante o processo de fracionamento (OLDONI et al., 2011; YANG et al., 2011; SILVA et al., 2013; OLDONI et al., 2016).

Muitos compostos fenólicos com atividades biológicas, tais como catequina, epicatequina, ácido gálico, resveratrol e procianidinas poliméricas, já foram identificados em uva (REVILLA; RYAN, 2000; DI LECCE et al., 2014) e açaí (KANG et al., 2011). Os resíduos gerados do processamento dessas frutas são descartados, na maioria das vezes, no meio ambiente, contudo, muitos desses materiais possuem polifenóis bioativos, como já

demonstrado para resíduos vinícolas (KATALINIĆ et al., 2010; SOUQUET; MOUTOUNET, 2000; SPRANGER et al., 2008; WANG et al., 2010) e do processamento de polpa de açaí (RODRIGUES et al., 2006; WYCOFF et al., 2015).

Assim, o objetivo desse trabalho foi concentrar e fracionar bioguiadamente pela atividade antioxidante os extratos otimizados de engaço de uva *Chenin Blanc* e semente de açaí, caracterizar o perfil fenólico das frações ativas pelas técnicas de HPLC e UHPLC-ESI-LTQ-MS, bem como avaliar o potencial bioativo (atividade antiproliferativa e anti-inflamatória) dos extratos brutos e concentrados.

## **4.2 Material e métodos**

### **4.2.1 Concentração dos extratos brutos de engaço *Chenin Blanc* e semente de açaí por resina Amberlite XAD<sup>®</sup>-2**

Os extratos de resíduos de uva e açaí utilizados foram obtidos conforme as condições otimizadas de extração descritas no Capítulo 2, item 2.2.2. Primeiramente, o etanol foi evaporado a 50 °C e, em seguida, foi adicionada água de forma a restabelecer os volumes originais. Em seguida, 100 mL do extrato aquoso foi acidificado até pH 2 e então, adicionado à 100 g da resina Amberlite XAD<sup>®</sup>-2 (Supelco, Bellefonte, PA – poros de 9 nm e partícula de 0,3 - 1,2mm). A mistura permaneceu sob agitação, em temperatura ambiente, durante 15 minutos. Na sequência, a resina, contendo a amostra adsorvida, foi empacotada em uma coluna de vidro (25 x 2 cm). A coluna empacotada foi eluída com 500 mL de água ácida (pH 2), 300 mL de água destilada – para retirar o excesso de ácido da coluna – e 300 mL de metanol para eluição dos compostos adsorvidos. Em seguida, o metanol recolhido foi evaporado a 50 °C e, após isto, a amostra foi liofilizada. A água ácida também foi liofilizada e analisada. As amostras liofilizadas foram chamadas de extrato concentrado e fração aquosa.

### **4.2.2 Fracionamento dos extratos concentrados de engaço *Chenin Blanc* e semente de açaí em gel Sephadex LH-20**

Os extratos concentrados de engaço *Chenin Blanc* e semente de açaí obtidos pela resina XAD<sup>®</sup>-2 foram fracionados usando gel lipofílico Sephadex LH-20. O método foi realizado conforme descrito por Alencar (2002), com modificações. O gel lipofílico Sephadex LH-20 (7 g) foi misturado com metanol e colocado em uma coluna de vidro (30 x 1,5 cm d.i.) onde o empacotamento se deu apenas pela força da gravidade. Os extratos concentrados (100 mg) foram dissolvidos em metanol (2 mL) e aplicados no topo da coluna. Após a total penetração da amostra no gel, iniciou-se a eluição com metanol. A vazão da coluna foi de 24

gotas por minuto e as frações foram coletadas a cada 2 minutos para o extrato de engaçõ *Chenin Blanc*. Já para o extrato de semente de açaí, a vazão foi de 15 gotas por minuto e a coleta foi realizada com intervalo de 4 minutos. As frações obtidas foram avaliadas e monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) e o perfil cromatográfico de compostos fenólicos, bem como a quantificação dos compostos identificados, foram feitos por HPLC-DAD. A atividade antioxidante das frações foi avaliada por meio dos seguintes métodos: ABTS, ORAC, sequestros do ânion superóxido e ácido hipocloroso e *on-line* por HPLC-ABTS. Os extratos e as frações bioativas foram então analisadas em UHPLC-ESI-LTQ-MS.

### **4.2.3 Análises físico-químicas dos extratos brutos, concentrados e frações obtidas pela resina LH-20**

#### **4.2.3.1 Agrupamento de frações similares por cromatografia em camada delgada (CCD)**

As análises de cromatografia em camada delgada dos extratos brutos, concentrados e frações foram feitas em cromatofolhas de sílica gel 60 F254 (Merck Co.), conforme descrito por Alencar et al. (2007). Alíquotas de 10 µL foram aplicadas na placa, sendo a fase móvel utilizada acetato de etila:metanol:água (60:30:10, v/v/v). As cromatoplacas foram visualizadas sob luz ultravioleta, nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, antes da revelação com DPPH· e anisaldeído sulfúrico (100°C por 5 minutos) (TANAKA et al., 2005).

#### **4.2.3.2 Quantificação de compostos fenólicos nos extratos e frações pela técnica de HPLC-DAD**

A análise por HPLC em fase reversa para avaliação de ácidos fenólicos e flavonoides foi feita injetando-se 20 µL da amostra em um cromatógrafo líquido acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (DAD) e uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (250 x 4,6mm) 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, 20% de B em 50 minutos, 45% de B em 70 minutos, 100% de B em 85 minutos, permanecendo até 95 minutos, 5% de B em 100 minutos. A coluna foi mantida a 28°C. Neste trabalho foram usados os seguintes padrões autênticos de ácidos fenólicos e flavonoides, com origem comprovada e grau de pureza atestado (Sigma-Aldrich e Extrasynthese): ácido gálico, ácido caféico, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido trans-cinâmico, ácido *p*-cumárico, ácido siríngico, ácido vanílico, (-)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epicatequina galato, crisina, luteolina, mirecetina,

polidatina, quercetina, quercetina-3- $\beta$ -D-glucosídeo, rutina, hesperidina, hesperitina, procianidina B1, procianidina B2, resveratrol e vitexina.

#### **4.2.3.3 Avaliação do perfil fenólico dos extratos e frações por espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-ESI-LTQ-MS)**

A análise de espectrometria de massas do extrato bruto, concentrado e frações bioativas, previamente filtrados em filtro de membrana PTFE 0,22  $\mu$ m, foi realizada em um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC), equipado com uma bomba Accela 1250, um autoinjeter termostaticado Accela Open AS e um espectrômetro de massas de alta resolução LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha). A separação cromatográfica foi feita em uma coluna Agilent ODS-A (4,6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m). Alíquotas de 10  $\mu$ L dos extratos e frações de resíduos agroindustriais foram injetadas a um fluxo de 400  $\mu$ L/min. A fase móvel foi constituída de água/ácido fórmico (99,9/0,1, v/v) (A) e acetonitrila/ácido fórmico (99,9/0,1, v/v) (B), iniciando com 5% de B e alcançando 7% de B (7 minutos), 20% de B (50 min), 45% de B (70 minutos), 100% de B (85 minutos), mantendo a 100% por 10 minutos e decrescendo a 5% de B (100 min).

Um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) foi equipado com uma fonte de ionização por eletronebulização operando em modo de íon negativo (ESI-) para a aquisição do perfil de espectro de massa dos extratos e frações com uma resolução de 60.000. As condições de operação foram: voltagem da fonte, 3,1 kV; gás auxiliar, 20 (unidades arbitrárias); pressão do gás de nebulização, 60 psi; temperatura do capilar, 380°C. Inicialmente, os extratos foram analisados em modo “full scan” e, em seguida, os íons selecionados foram analisados pela aquisição do espectro de MS/MS ( $m/z$  100 a 900). As medidas de massa exata foram feitas usando Orbitrap-MS e a análise dos dados foi realizada usando o *software* Xcalibur. A identificação dos compostos foi feita pela comparação das massas acuradas, do espectro de massas MS/MS e fórmula molecular observada com aqueles disponíveis na literatura ou pela análise de padrões disponíveis (ácido gálico, procianidina B1, catequina, epicatequina e resveratrol).

#### **4.2.4 Atividade antioxidante dos extratos e frações de semente de açaí e engaço *Chenin Blanc***

A atividade antioxidante dos extratos brutos, concentrados, fração aquosa e frações obtidas da coluna LH-20 foi avaliada por meio dos métodos de sequestro do radical livre sintético ABTS e desativação de espécies reativas de oxigênio (radicais peroxila, superóxido e

ácido hipocloroso). Além destes, também foi realizada a análise da atividade *on-line*, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência.

#### 4.2.4.1 Atividade sequestrante do radical livre ABTS

A atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre ABTS foi determinada de acordo com Melo et al. (2015). Em cada poço da microplaca foram pipetados 20 µL do padrão ou amostra e, então, adicionados 220 µL da solução do radical ABTS. Esse radical foi previamente preparado misturando-se 5 mL da solução de ABTS 7 mM com 88 µL da solução de persulfato de potássio 140 mM, ambos em água. A mistura permaneceu ao abrigo de luz por pelo menos 16 horas e, então, sua absorbância foi ajustada para  $0,7 \pm 0,01$  nm com tampão fosfato de potássio 75 mM, pH 7,4, o qual também foi utilizado como branco na análise. Após 6 minutos de reação, a leitura foi realizada a 730 nm em uma leitora de microplacas (Molecular Devices). A curva padrão foi construída utilizando o Trolox nas concentrações de 12,5 a 200 µM. Os resultados foram obtidos por meio do ajuste da curva e expressos em equivalentes ao Trolox.

#### 4.2.4.2 Capacidade sequestrante do radical peroxila

O método de sequestro do radical peroxila (ORAC) foi realizado conforme descrito por Melo et al. (2015). Alíquotas de 30 µL do padrão, controle ou amostra foram pipetadas em cada poço da microplaca e logo após foram acrescentados 60 µL da solução de fluoresceína 508,25 nM, preparada a partir da solução estoque 4,066 mM. Em seguida, foram acrescentados 110 µL da solução de AAPH 76 mM. Ambas as soluções foram preparadas em tampão fosfato de potássio 75 mM, pH 7,4, que também foi utilizado como branco na análise. A reação foi incubada a 37°C e a leitura da fluorescência foi realizada a cada minuto, durante 2 horas, com comprimento de onda de excitação e emissão de 485 e 528 nm, respectivamente, em uma leitora de microplacas (Molecular Devices). O padrão Trolox, nas concentrações de 12,5 a 400 µM, foi utilizado para a construção da curva de calibração por meio das Equações 1 e 2, abaixo:

$$AUC = 1 + \left( \frac{f_1 + f_2 + f_3 + \dots + f_i}{f_0} \right) \quad \text{Equação 1}$$

Onde AUC é a área abaixo da curva,  $f_0$  é a fluorescência relativa ao tempo 0 e  $f_i$ , a fluorescência relativa ao tempo i. A AUCnet foi calculada pela subtração da AUC do controle

(AUC<sub>ct</sub>) do valor da AUC da amostra ou padrão (AUC<sub>am</sub> ou AUC<sub>pd</sub>), de acordo com a Equação 2:

$$AUC_{net} = AUC_{amoupd} - AUC_{ct} \quad \text{Equação 2}$$

Os valores de AUC<sub>net</sub> (x), obtidos na Equação 2, foram plotados com os valores das concentrações (y) do Trolox e, com o ajuste da curva, os resultados foram expressos em equivalentes ao Trolox.

#### 4.2.4.3 Capacidade sequestrante do radical ânion superóxido

A capacidade de sequestro do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), gerado pelo sistema NADPH/PMS, foi determinada de acordo com Chisté et al. (2011) e Gomes et al. (2007), com modificações. Para um volume final de 300  $\mu$ L, 166  $\mu$ M de NADH, 107,5  $\mu$ M de NBT, diferentes concentrações de extratos e 2,7  $\mu$ M de PMS foram adicionados e dissolvidos em tampão fosfato de potássio 19 mM (pH 7,4). O ensaio foi conduzido a 25°C e após 5 minutos a absorbância foi medida a 560 nm. Um controle foi preparado por meio da substituição do volume de amostra por tampão e um branco foi preparado para cada diluição de amostra substituindo o PMS e NADH por tampão. Os resultados foram expressos como EC<sub>50</sub>, ou seja, a quantidade (mg/mL) de extrato necessária para reduzir em 50% os radicais superóxido do meio reacional.

#### 4.2.4.4 Capacidade sequestrante do ácido hipocloroso

A capacidade sequestrante do ácido hipocloroso (HOCl) foi feito por meio do monitoramento dos efeitos dos extratos na oxidação de dihidrorodamina 123 (DHR) induzida por HOCl, de acordo com Chisté et al. (2011) e Gomes et al. (2007), com modificações. O HOCl foi preparado usando uma solução de NaOCl (1%) e ajustando o pH para 6,2 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 10%. A concentração dessa solução, diluída em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,4) foi medida a 235 nm, usando o coeficiente de absorção molar 100 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Uma solução estoque de DHR diluída em 1,15 mM de dimetilformamida foi usada para preparar as soluções de trabalho em tampão fosfato, imediatamente antes das análises. A mistura de reação consistiu dos extratos em diferentes concentrações, 100  $\mu$ L de tampão fosfato (pH 7,4), 1,25  $\mu$ M de DHR e 5  $\mu$ M de HOCl, em um volume final de 300  $\mu$ L. O ensaio foi conduzido a 37°C em uma leitora de microplacas e a fluorescência foi medida imediatamente usando comprimento de emissão de 528 $\pm$ 20 nm e excitação de 485 $\pm$ 20 nm. Os resultados foram expressos como EC<sub>50</sub> (mg/mL) de extrato.

#### 4.2.4.5 Determinação da atividade antioxidante *on-line* por HPLC-ABTS

O método *on-line* para a análise de compostos que possuem a habilidade de sequestro de radicais livres foi primeiramente proposto por Koleva et al. (2000) e Koleva et al. (2001). A análise por HPLC-ABTS *on-line* foi realizada utilizando a solução metanólica do radical livre ABTS que reagiu com os compostos separados da amostra, pós coluna durante aproximadamente 1 min. A vazão do reagente ABTS foi de 0,8 mL/min e a intensidade de cor foi detectada por meio de picos negativos a 734 nm, de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 1.

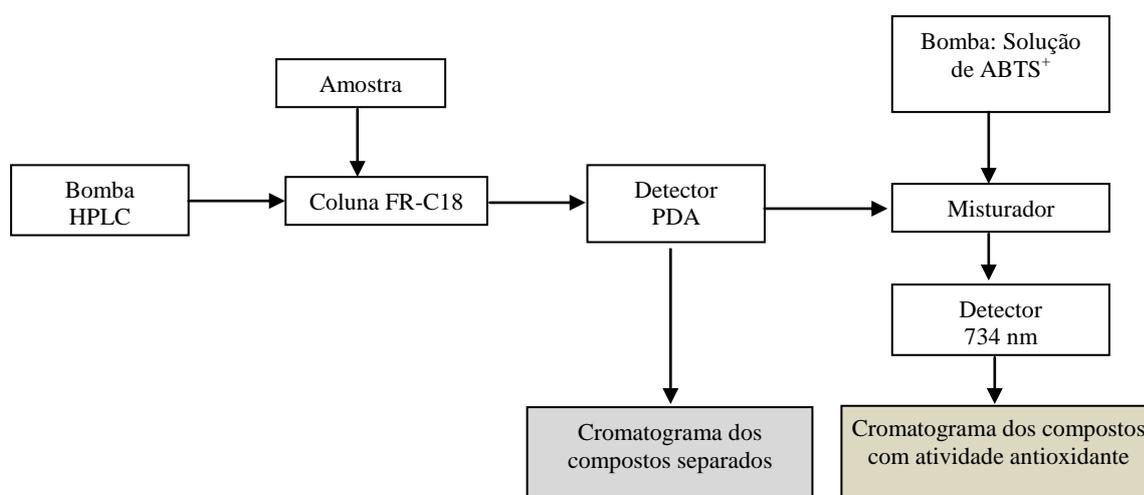


Figura 1 – Esquema da instrumentação para a análise da atividade antioxidante *on-line* por HPLC-ABTS

#### 4.2.5 Atividade anti-inflamatória

Células RAW 264.7 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, glutamina e antibióticos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, com ar umidificado. A densidade de  $5 \times 10^5$  células/mL foi usada e a proporção de células mortas foi menor que 5%. Células foram semeadas em placas de 96 poços numa concentração de 150.000 células por poço. Após o período de incubação, as células foram tratadas com os extratos por 1 hora. Dexametasona (50 µM) foi usada como controle positivo e as células foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) (1 µg/mL) por 18 horas. A avaliação do efeito das amostras na ausência de LPS também foi realizada, a fim de se observar se outros compostos utilizados no ensaio possuíam influência sobre os níveis basais de óxido nítrico. Para o controle negativo, LPS não foi utilizado. Amostras e LPS foram dissolvidos em DMEM. A determinação do óxido nítrico foi feita com o kit “Griess Reagent System” (Promega). Cem microlitros do sobrenadante da cultura celular foram transferidos, em duplicata, para placas e misturados com as soluções do kit, por 5-10 minutos, à temperatura

ambiente. O nitrito produzido foi determinado a 515 nm em um leitor de microplacas e os resultados foram obtidos pela construção de uma curva padrão (CORRÊA et al., 2015).

#### **4.2.6 Citotoxicidade em linhagens celulares tumorais humanas**

Quatro linhagens celulares tumorais humanas foram utilizadas: MCF-7 (carcinoma de mama), NCI-H460 (câncer de pulmão de células não-pequenas), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma de células hepáticas). As células foram mantidas como culturas celulares aderentes em meio RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino inativado e 2 mM de glutamina a 37°C em uma incubadora de ar umidificado contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Cada linhagem celular foi inoculada a uma densidade apropriada ( $7,5 \times 10^3$  células/poço para MCF-7 e NCI-H460 ou  $1,0 \times 10^4$  células/poço para HeLa e HepG2) em placas de 96 poços. O ensaio de sulforodamina B foi realizado de acordo com o protocolo previamente descrito por Barros et al. (2013). Elipticina foi usada como controle positivo e os resultados foram expressos em µg por mL, ou seja, como GI<sub>50</sub> (concentração de amostra capaz de inibir 50% do crescimento celular).

#### **4.2.7 Hepatotoxicidade (células PLP2)**

Uma cultura de célula foi preparada a partir de fígado suíno fresco, de acordo com procedimento descrito por Abreu et al. (2011). O cultivo celular foi monitorado a cada dois ou três dias usando um microscópio de contraste de fase. Antes da confluência celular ser atingida, as células foram subcultivadas e inoculadas em placas de 96 poços a uma densidade de  $1,0 \times 10^4$  células/poço, em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino inativado, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Elipticina foi usada como controle positivo e os resultados foram expressos em µg por mL, ou seja, como GI<sub>50</sub> (concentração de amostra capaz de inibir 50% do crescimento celular).

#### **4.2.8 Análise estatística**

As medidas foram obtidas em triplicata e os resultados foram expressos como média±desvio padrão. Os dados foram analisados usando ANOVA ( $p < 0,05$ ) e, quando apresentada diferença estatística, o teste de Tukey foi aplicado para verificar as diferenças entre as médias.

### 4.3 Resultados e Discussão

Os resíduos selecionados na etapa de triagem – engaço *Chenin Blanc* e semente de açaí – tiveram seus extratos brutos concentrados em resina Amberlite XAD<sup>®</sup>-2, procedimento que permitiu aumento da atividade antioxidante. A partir dos extratos concentrados foi realizado o fracionamento em gel Sephadex LH-20 a fim de serem produzidas frações semi-purificadas e de elevada atividade.

O gel Sephadex LH-20 é composto de dextranas hidroxipropiladas interligadas que formam uma rede polissacarídica com características anfipáticas. O principal mecanismo de separação é o de exclusão por tamanho – substâncias de pequeno peso molecular permeiam mais profundamente na rede de gel e demoram mais tempo para percorrer a coluna do que moléculas de maior tamanho. Além disso, dependendo da fase móvel utilizada, o meio também pode promover a separação dos componentes das amostras por partição – mecanismo onde a diferença de interação do analito entre as fases móvel e estacionária dita a separação dos componentes da amostra (GE HEALTHCARE, 2007).

O fracionamento do engaço *Chenin Blanc* e semente de açaí foi bioguiado em função da atividade antioxidante por meio dos métodos de sequestro do radical livre ABTS e do radical peroxila (ORAC). As frações mais bioativas foram então submetidas aos ensaios de sequestro de outras espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido e hipocloroso). As frações selecionadas também foram analisadas quanto à atividade antioxidante *on-line*, por HPLC-ABTS. Além disso, os extratos bruto e concentrado, juntamente com as frações de maior bioatividade, tiveram a sua composição fenólica avaliada por espectrometria de alta resolução (UHPLC-ESI-LTQ-MS). Por último, extratos brutos e concentrados tiveram seu potencial bioativo avaliado (atividades anti-inflamatória e antiproliferativa).

#### 4.3.1 Concentração dos extratos de engaço de *Chenin Blanc* e semente de açaí em resina Amberlite XAD<sup>®</sup>-2

Os extratos concentrados e as frações aquosas, bem como os extratos brutos, foram avaliados pela técnica de cromatografia em camada delgada e atividade antioxidante (ABTS, ORAC e HPLC-ABTS). Optou-se também por incluir a fração aquosa da XAD<sup>®</sup>-2 nestas análises para se monitorar o processo de concentração de bioativos.

##### 4.3.1.1 Engaço *Chenin Blanc*

A partir de dez gramas de engaço de *Chenin Blanc* liofilizado foi possível obter 162,6 mg de extrato metanólico proveniente da resina XAD<sup>®</sup>-2. O extrato bruto, concentrado e a

fração aquosa liofilizados foram aplicados em cromatofolhas de camada delgada, as quais foram analisadas por irradiação a 366nm (Figura 2-A), 254nm (Figura 2-B) e então reveladas com anisaldeído sulfúrico (Figura 2-C) e com o radical livre DPPH (Figura 2-D).

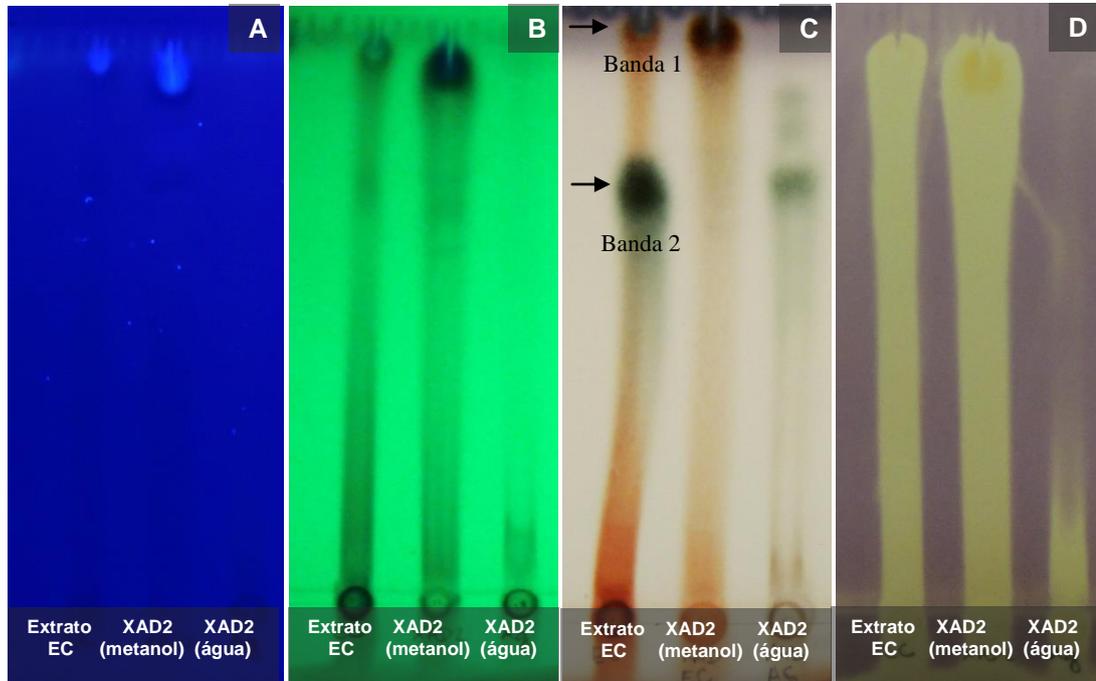


Figura 2 – Cromatografia em camada delgada dos extratos brutos, concentrados por XAD<sup>®</sup>-2 e da fração aquosa do engaço *Chenin Blanc*. Cromatofolha irradiada a 366 nm (A), a 254 nm (B), revelada com anisaldeído sulfúrico (C) e com DPPH (D) a luz ambiente

Foi possível observar que houve a concentração da banda 1 na fração XAD<sup>®</sup>-2 (metanol) em relação ao extrato bruto quando revelado com anisaldeído. A banda 2 também pôde ser encontrada na fração aquosa (Figura 2-C). Quando revelada com DPPH, verificou-se que tanto o extrato bruto quanto o concentrado (XAD<sup>®</sup>-2) apresentaram atividade antioxidante, com intensificação dessa atividade na fração metanólica.

A atividade antioxidante avaliada pelos métodos ORAC e ABTS dos extratos brutos, concentrados e fração aquosa estão mostrados na Figura 3.

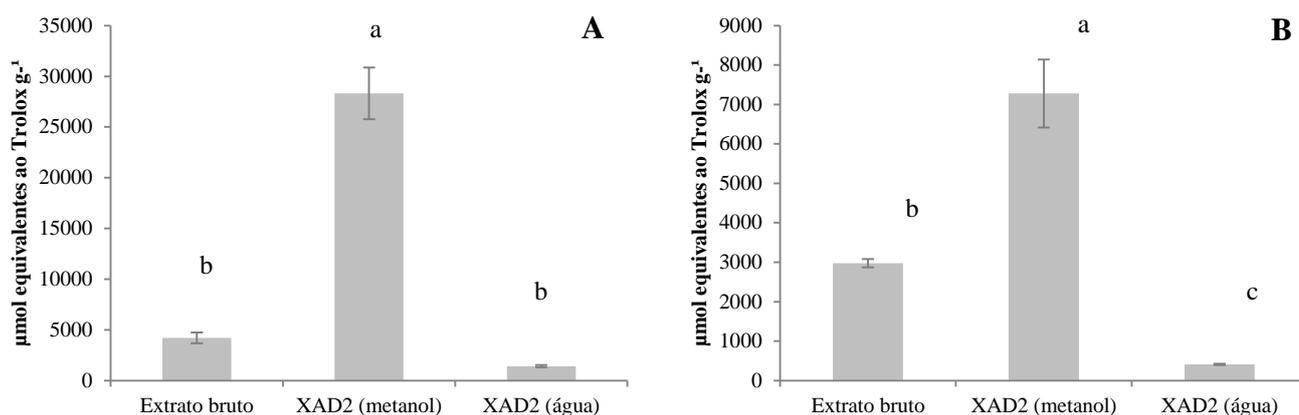


Figura 3 – Atividades antioxidantes dos extratos bruto e concentrado (fração obtida pela resina XAD<sup>®</sup>-2) e fração aquosa do engaço *Chenin Blanc*, avaliadas pelos métodos ORAC (A) e ABTS (B),  $p < 0,05$

Tanto no método ORAC quanto no ABTS, a atividade antioxidante concentrou-se na fração metanólica da XAD<sup>®</sup>-2 (extrato concentrado), a qual alcançou 28.314,89  $\mu\text{mol/g}$  de equivalentes ao Trolox no ORAC, frente a somente 4.200,23  $\mu\text{mol/g}$  encontrados para o extrato bruto de engaço de *Chenin Blanc* e 1.420,36  $\mu\text{mol/g}$  para a fração aquosa. No sequestro do radical ABTS essa tendência também foi mantida: 7.277,40; 2.977,74; 412,19  $\mu\text{mol/g}$  para extrato concentrado, extrato bruto e fração aquosa de engaço de *Chenin Blanc*, respectivamente.

Isso evidencia que provavelmente a banda 1, concentrada no extrato da XAD<sup>®</sup>-2, de coloração marrom-avermelhada, seja um dos principais responsáveis pela atividade antioxidante desse resíduo.

A avaliação da contribuição individual dos constituintes químicos do extrato de engaço para a sua atividade antioxidante foi feita *on-line* por meio da técnica HPLC-ABTS. Os cromatogramas estão mostrados na Figura 4. O cromatograma (A) corresponde aos compostos do engaço de *Chenin Blanc* separados na coluna cromatográfica C-18 e detectados a 280 nm. O cromatograma (B), com picos negativos, refere-se à queda na absorvância inicial do radical ABTS ao reagir com cada pico que saiu da coluna cromatográfica, indicando, portanto, a atividade antioxidante de cada composto químico da amostra. Dessa maneira, quanto maior a intensidade do pico negativo, maior é a capacidade de um determinado composto em reduzir o radical ABTS e, por conseguinte, maior sua atividade antioxidante. Essa atividade pode ser mensurada pela integração das áreas desses picos e das áreas dos picos de uma curva-padrão usando Trolox, por exemplo. Foram marcados somente os picos majoritários e/ou com atividade antioxidante.

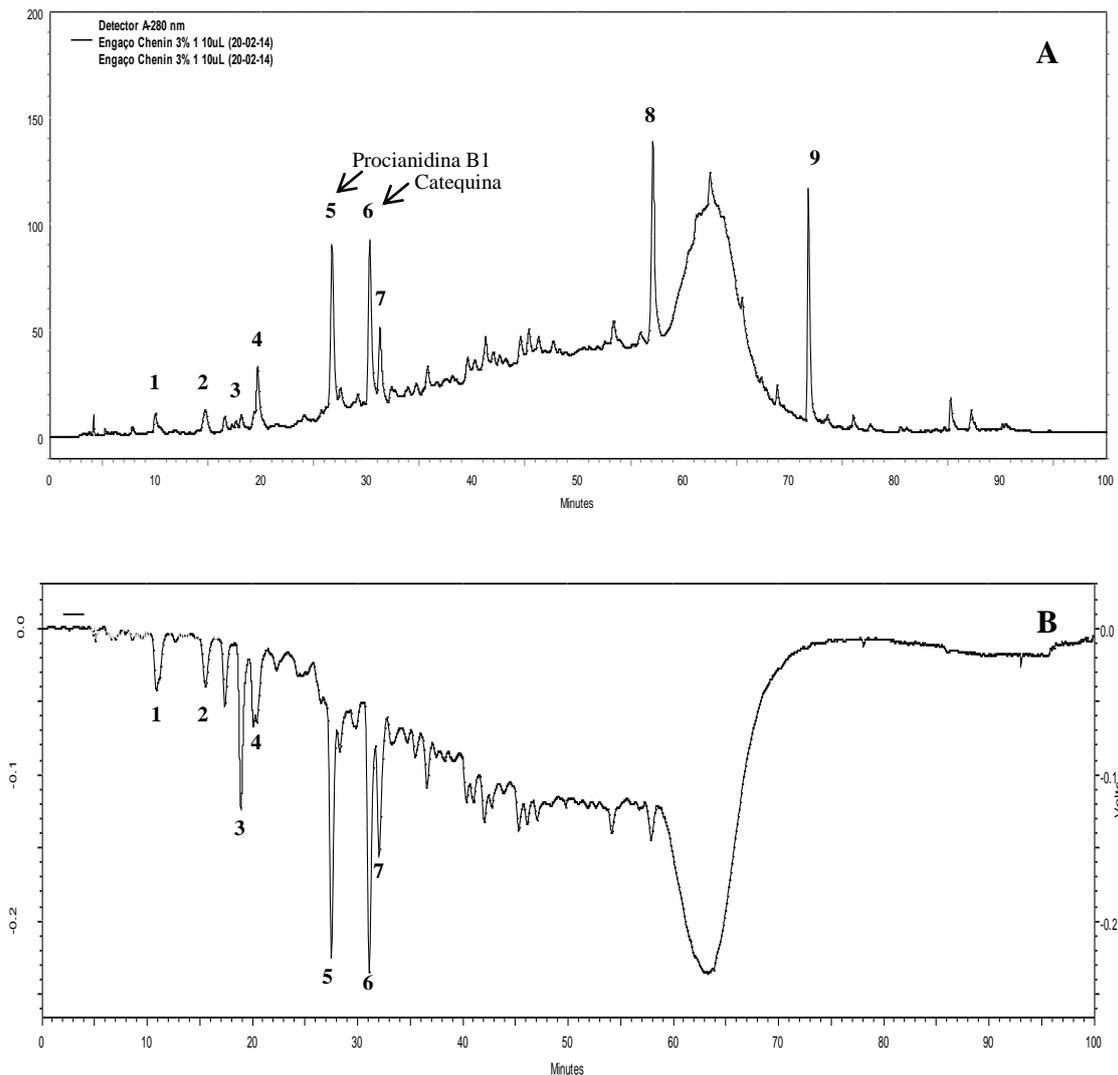


Figura 4 – Cromatogramas dos compostos do extrato bruto do engaço *Chenin Blanc* (3%), a 280 nm (A) e de sua respectiva atividade antioxidante, por HPLC-ABTS, a 734 nm (B). Picos numerados referem-se aos picos majoritários e/ou com atividade antioxidante

Embora tenha sido empregado o mesmo método utilizado no HPLC para a determinação de compostos fenólicos, houve um ajuste na vazão da fase móvel no método HPLC-ABTS, a qual passou de 1 mL/minuto para 0,8 mL/minuto. Assim, os tempos de retenção dos compostos identificados sofreram pequena alteração. Apesar disso, pode-se identificar os picos 5 e 6 como a procianidina B1 e a catequina, respectivamente. Pôde-se verificar ainda que esses são os dois compostos de maior atividade antioxidante dentre todos os demais constituintes químicos do engaço.

O extrato concentrado (fração metanólica XAD<sup>®</sup>-2) também foi submetido a essa técnica e os cromatogramas podem ser vistos na Figura 5.

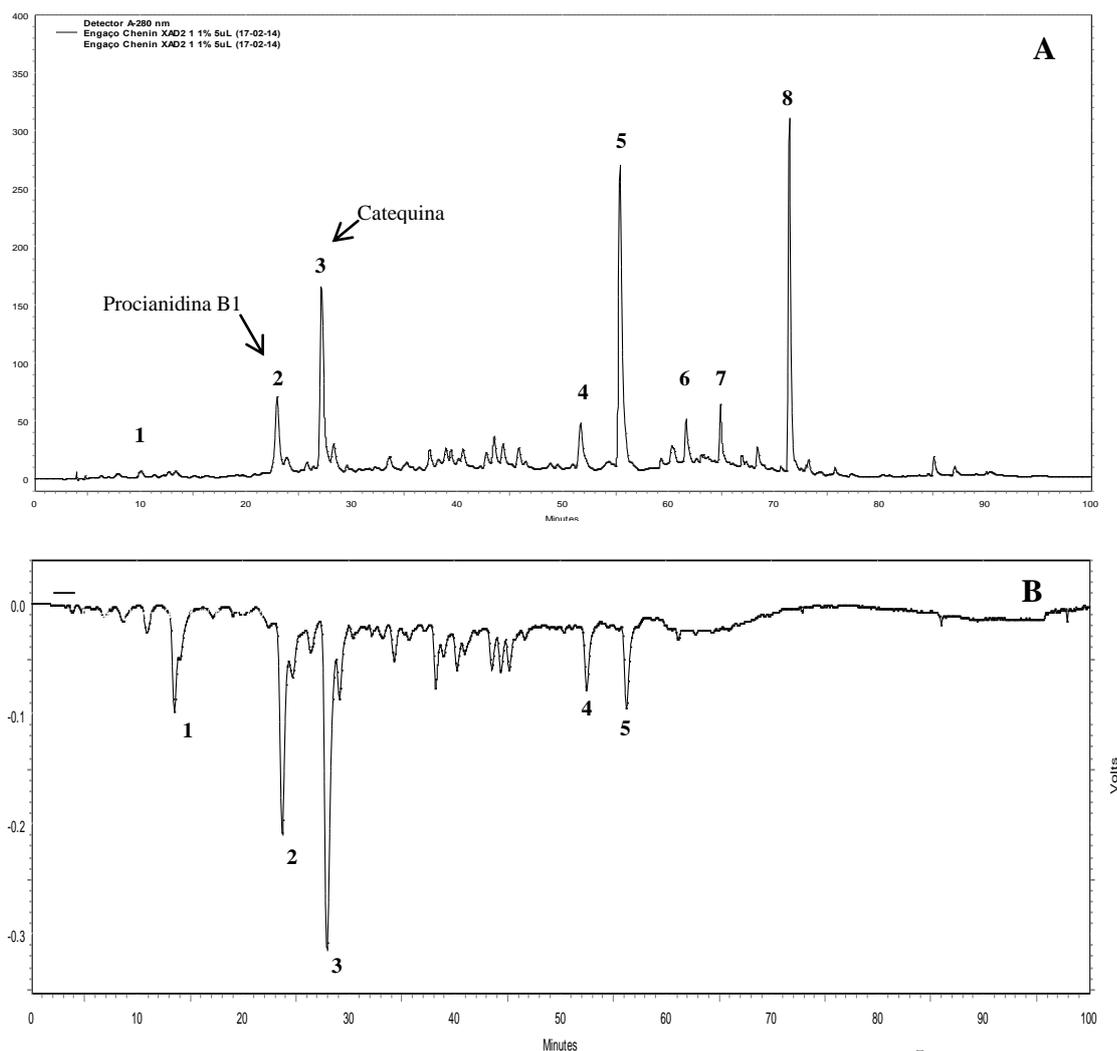


Figura 5 – Cromatogramas dos compostos da fração metanólica XAD<sup>®</sup>-2 do engaço *Chenin Blanc* (1%), a 280 nm (A) e de sua respectiva atividade antioxidante, por HPLC-ABTS, a 734 nm (B). Picos numerados referem-se aos picos majoritários e/ou com atividade antioxidante

Pode-se notar uma purificação da fração em relação ao extrato bruto do engaço de *Chenin Blanc*, com aumento da intensidade de sinal dos picos, indicando que o processo de concentração foi eficaz. Novamente, nota-se a presença dos picos (2 e 3), cujos prováveis compostos são a procianidina B1 e a catequina, os quais apresentaram as maiores atividades antioxidantes.

#### 4.3.1.2 Semente de açaí

A partir de dez gramas de semente de açaí liofilizada foi possível obter 106 mg de extrato metanólico proveniente da resina XAD<sup>®</sup>-2. O extrato bruto, concentrado e fração aquosa liofilizadas foram aplicadas em cromatofolhas de camada delgada, as quais foram

analisadas por irradiação a 366 nm (Figura 6-A), a 254 nm (Figura 6-B), e então reveladas com anisaldeído sulfúrico (Figura 6-C) e com o radical livre DPPH (Figura 6-D).

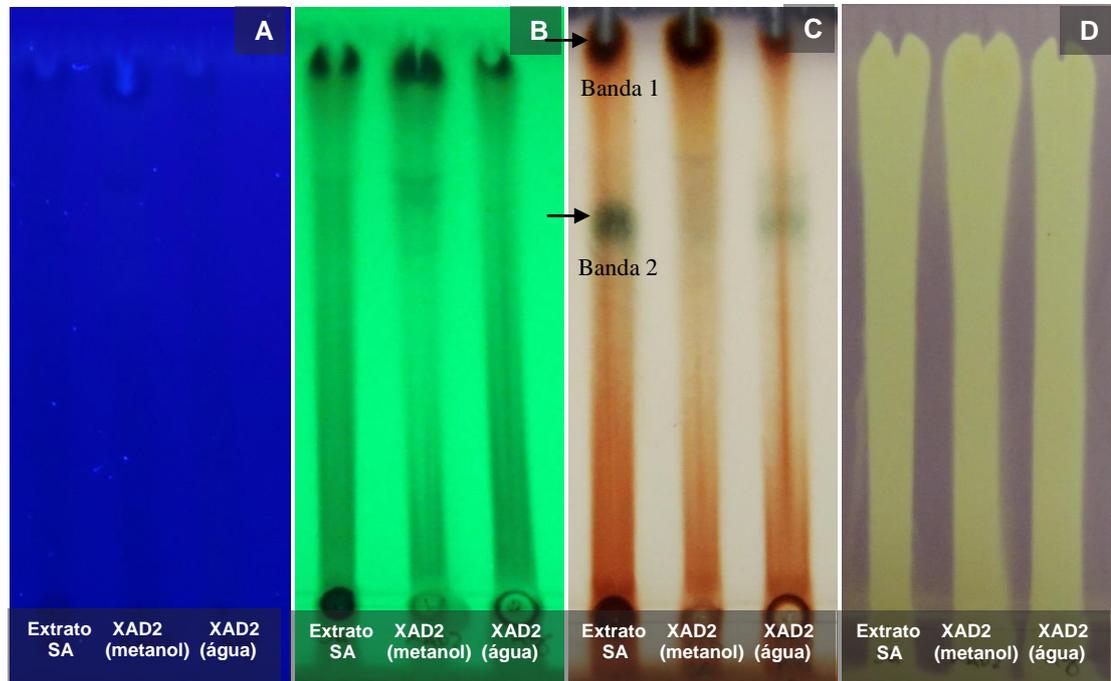


Figura 6 – Cromatografia em camada delgada dos extratos brutos, concentrados por XAD<sup>®</sup>-2 e da fração aquosa da semente de açai. Cromatofolha irradiada a 366 nm (A), a 254 nm (B), revelada com anisaldeído sulfúrico (C) e com DPPH (D) a luz ambiente

Foi possível observar que o perfil químico da semente de açai, após a análise das cromatoplacas, foi muito semelhante ao do engaço *Chenin Blanc*, apesar de serem resíduos provenientes de duas espécies vegetais totalmente diferentes, porém com elevada atividade antioxidante.

Pôde-se observar a ocorrência de duas bandas principais com concentração da banda 1 na fração metanol da XAD<sup>®</sup>-2 e da banda 2 na fração aquosa, quando a cromatoplaca foi revelada com anisaldeído. Quando a placa foi revelada com o radical livre DPPH, se observou que tanto o extrato bruto quanto o concentrado e fração aquosa apresentaram atividade antioxidante. Dessa maneira, procedeu-se a avaliação desta atividade por outros métodos, conforme ilustrado na Figura 7.

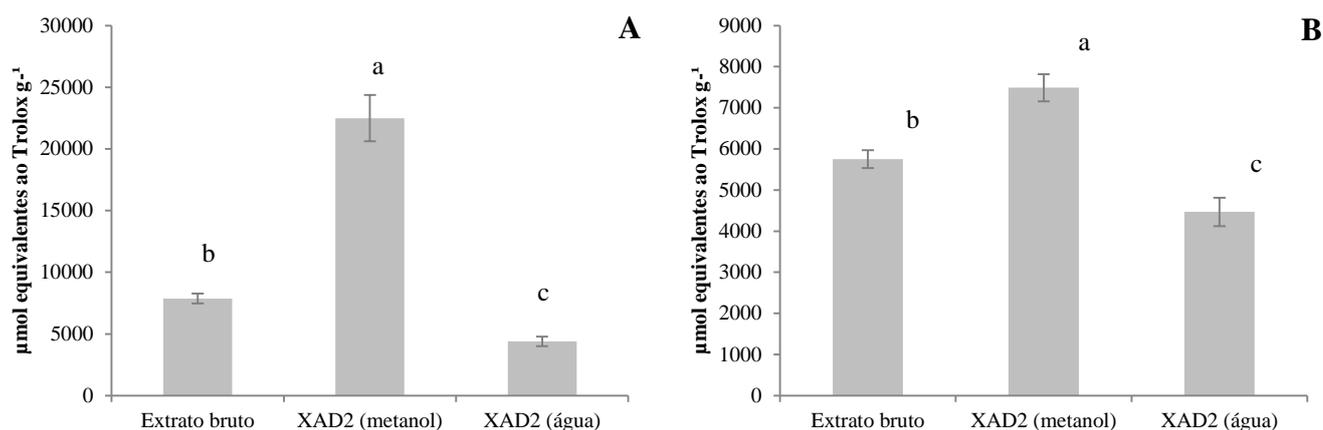


Figura 7 – Atividades antioxidantes dos extratos bruto e concentrado (XAD<sup>®</sup>-2) e fração aquosa da semente de açaí, avaliada pelos métodos ORAC (A) e ABTS (B),  $p < 0,05$

Tanto no método do ORAC quanto no ABTS, a atividade antioxidante foi significativamente maior no extrato concentrado (XAD<sup>®</sup>-2), o qual alcançou 22.497,93 μmol/g de equivalentes ao Trolox no método ORAC, frente a 7.868,77 μmol/g encontrados para o extrato bruto e 4.385,46 μmol/g para a fração aquosa. No sequestro do radical ABTS essa tendência também foi encontrada, porém com menor diferença de atividade entre as amostras. Os resultados obtidos foram: 7487,50; 5751,06; 4466,61 μmol/g para o extrato concentrado (XAD<sup>®</sup>-2), extrato bruto de semente de açaí e fração aquosa (XAD<sup>®</sup>-2), respectivamente.

Novamente, a banda 1 mostrada na Figura 6(C), de coloração marrom-avermelhada, parece ter papel importante na atividade antioxidante da semente de açaí, já que ela se mostrou presente em maior concentração no extrato concentrado do que no extrato bruto e na fração aquosa.

A avaliação da contribuição individual dos constituintes químicos do extrato de semente de açaí para a sua atividade antioxidante foi realizada de forma *on-line* por meio da técnica de HPLC-ABTS. Os cromatogramas obtidos podem ser visualizados na Figura 8.

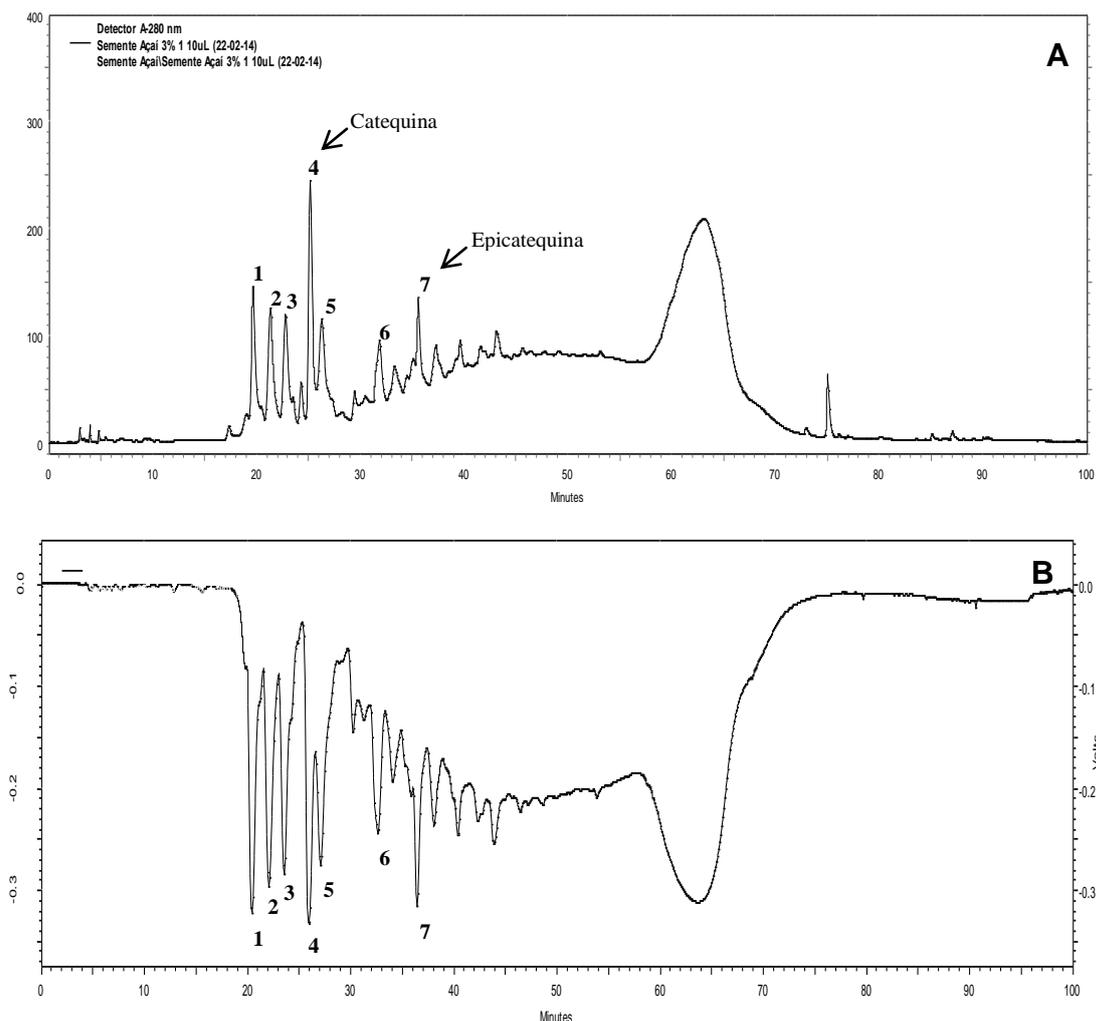


Figura 8 – Cromatogramas dos compostos do extrato bruto da semente de açai (3%), a 280 nm (A) e de sua respectiva atividade antioxidante, por HPLC-ABTS, a 734 nm (B). Picos numerados referem-se aos picos majoritários e/ou com atividade antioxidante

Ao contrário do verificado para o engaço de *Chenin Blanc*, na semente de açai todos os picos majoritários do extrato apresentaram atividade antioxidante frente ao radical ABTS, com destaque para os picos 1, 4 e 7. Como somente catequina e epicatequina (picos 4 e 7, respectivamente) puderam ser identificadas, estudos mais aprofundados são necessários para a elucidação dos outros compostos com atividade antioxidante.

O extrato concentrado também foi analisado por essa técnica e os cromatogramas podem ser vistos na Figura 9.

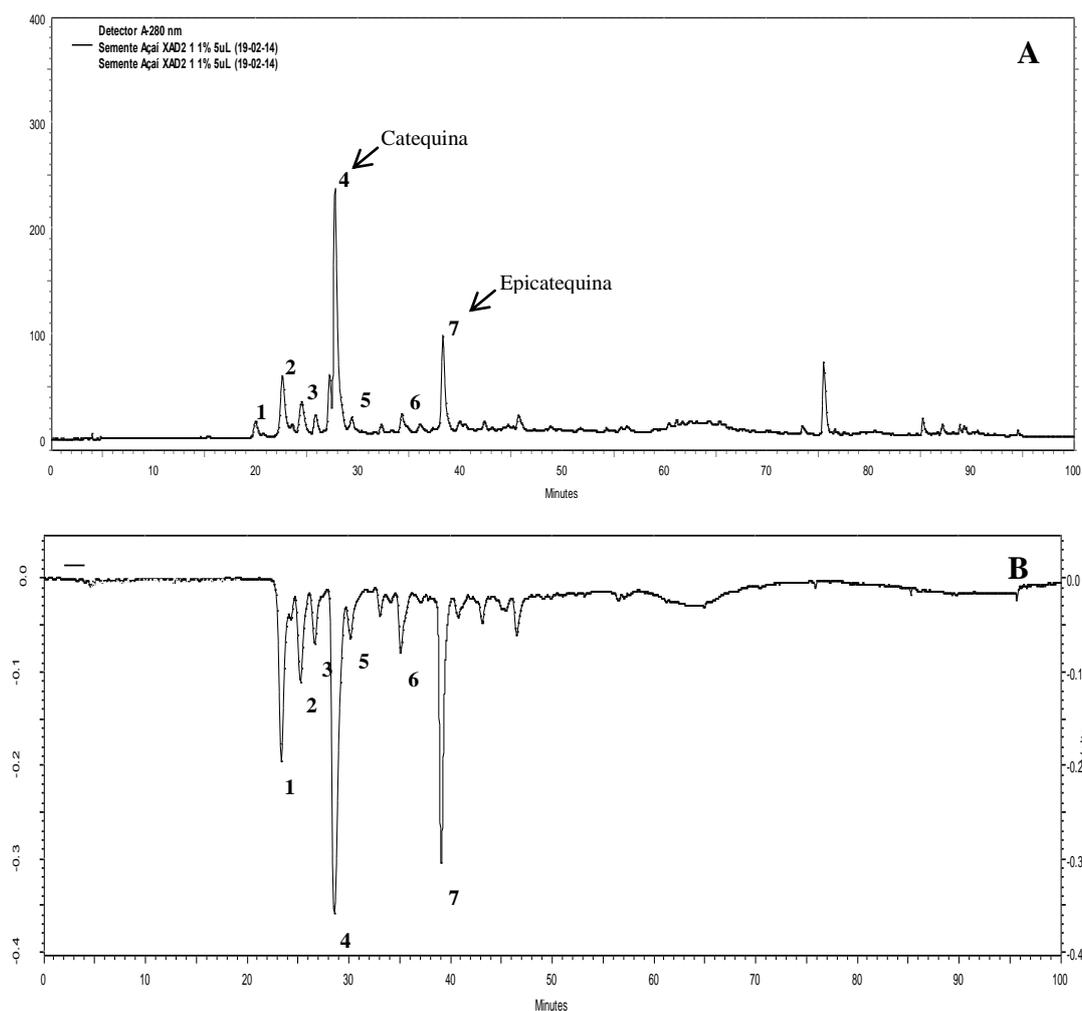


Figura 9 – Cromatogramas dos compostos da fração metanólica XAD<sup>®</sup>-2 da semente de açai (1%), a 280 nm (A) e de sua respectiva atividade antioxidante, por HPLC-ABTS, a 734 nm (B). Picos numerados referem-se aos picos majoritários e/ou com atividade antioxidante

Pôde-se notar que houve uma purificação da fração metanólica XAD<sup>®</sup>-2 (extrato concentrado) em relação ao extrato bruto da semente de açai, com uma expressiva eliminação de interferentes. Também foi possível observar que embora tenha havido concentração dos picos 4 e 7, os picos 1, 2, 3, 5 e 6 tiveram seus teores diminuídos quando comparado ao extrato bruto (Figura 8). Esse fato pode explicar a alta atividade da fração aquosa da semente de açai quando analisado pelo método do ABTS (Figura 7).

#### 4.3.2 Fracionamento dos extratos concentrados por gel Sephadex LH-20

##### 4.3.2.1 Engaço de uva *Chenin Blanc*

O extrato concentrado (XAD<sup>®</sup>-2) do engaço *Chenin Blanc* foi fracionado em coluna de gel Sephadex LH-20. A Figura 10 ilustra a eluição e a separação do extrato concentrado em bandas de diferentes colorações.

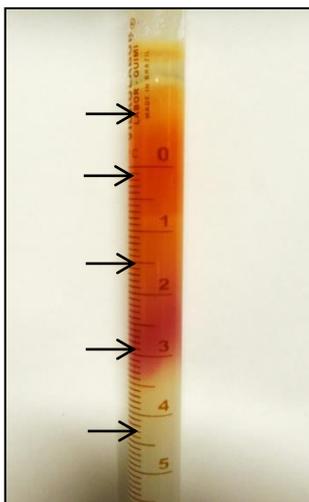


Figura 10 – Extrato concentrado (XAD<sup>®</sup>-2) do engaço *Chenin Blanc* sendo eluído com metanol em coluna de gel Sephadex LH-20. Setas indicam a separação do extrato em bandas de diferentes colorações

A quantidade de 100 mg de extrato concentrado foi utilizada para cada coluna, sendo a eluição feita com metanol. A coleta das frações iniciou-se a partir da primeira banda fluorescente (365 nm) e continuou a intervalos de dois minutos, numa vazão de 24 gotas/minuto (vazão máxima da coluna), até a total eluição da amostra. Ao final, foi possível coletar 121 frações (120 mais 1 fração final de coleta estendida para limpeza da coluna), as quais foram cromatografadas em placas de CCD, analisadas sob luz UV (366 e 254 nm) e então reveladas com anisaldeído sulfúrico a 100°C (Figuras 11 a 13).

O fracionamento do extrato concentrado pela LH-20 possibilitou a separação de diferentes compostos. As primeiras frações obtidas (1 a 19), compostas de substâncias de maior peso molecular, apresentaram composição mais heterogênea em relação às seguintes, devido ao maior número de bandas, colorações e fatores de retenção ( $R_f$ ) observados. Também nessas frações observou-se maior emissão de fluorescência, tanto antes quanto após a revelação com anisaldeído sulfúrico e analisadas sob luz UV (366 nm) (Figuras 11A e 13). Entre as frações 20 e 38, compostas de substâncias de peso molecular intermediário, notaram-se bandas de intensa coloração amarela e vermelha que foram diminuindo de intensidade nas frações seguintes (Figura 12).

Dessa maneira, a partir da análise do perfil cromatográfico em CCD, as frações foram agrupadas em doze frações de acordo com semelhanças na coloração, fluorescência e/ou  $R_f$ , como descrito a seguir: Fr 1 (1 a 5); Fr 2 (6 a 9); Fr 3 (10 a 14); Fr 4 (15 a 17); Fr 5 (18 a 25); Fr 6 (26 a 32); Fr 7 (33 a 46); Fr 8 (47 a 52); Fr 9 (53 a 74); Fr 10 (75); Fr 11 (76 a 120); Fr 12 (>120) (Figura 12).

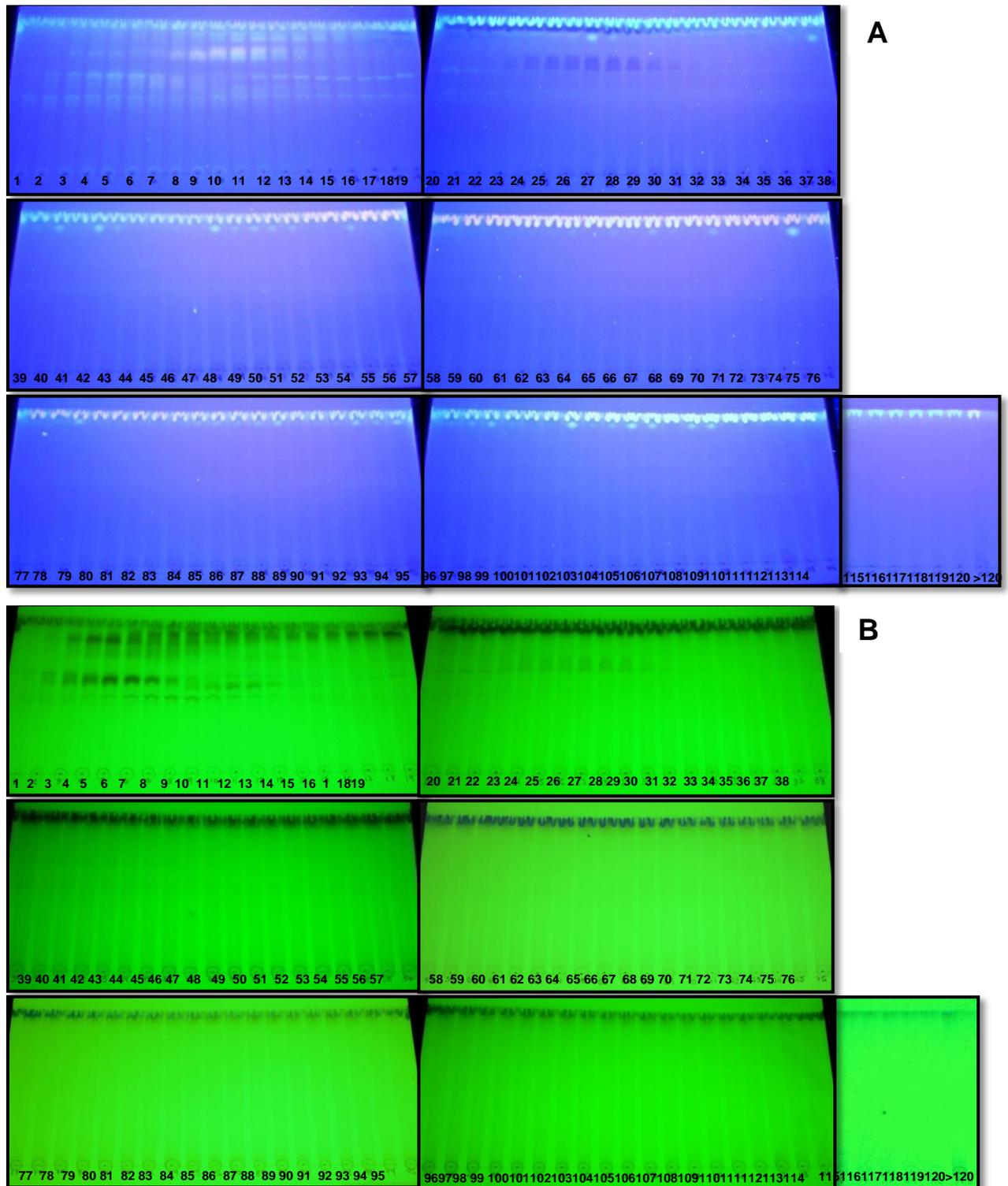


Figura 11 – Cromatografia em camada delgada, das frações 1 a >120 do extrato concentrado de engaço *Chenin Blanc*, obtidas na coluna de gel Sephadex LH-20. Cromatofolhas eluídas em acetato de etila:metanol:água (60:30:10, v/v/v) e irradiadas a 366 (A) e 254 nm (B)

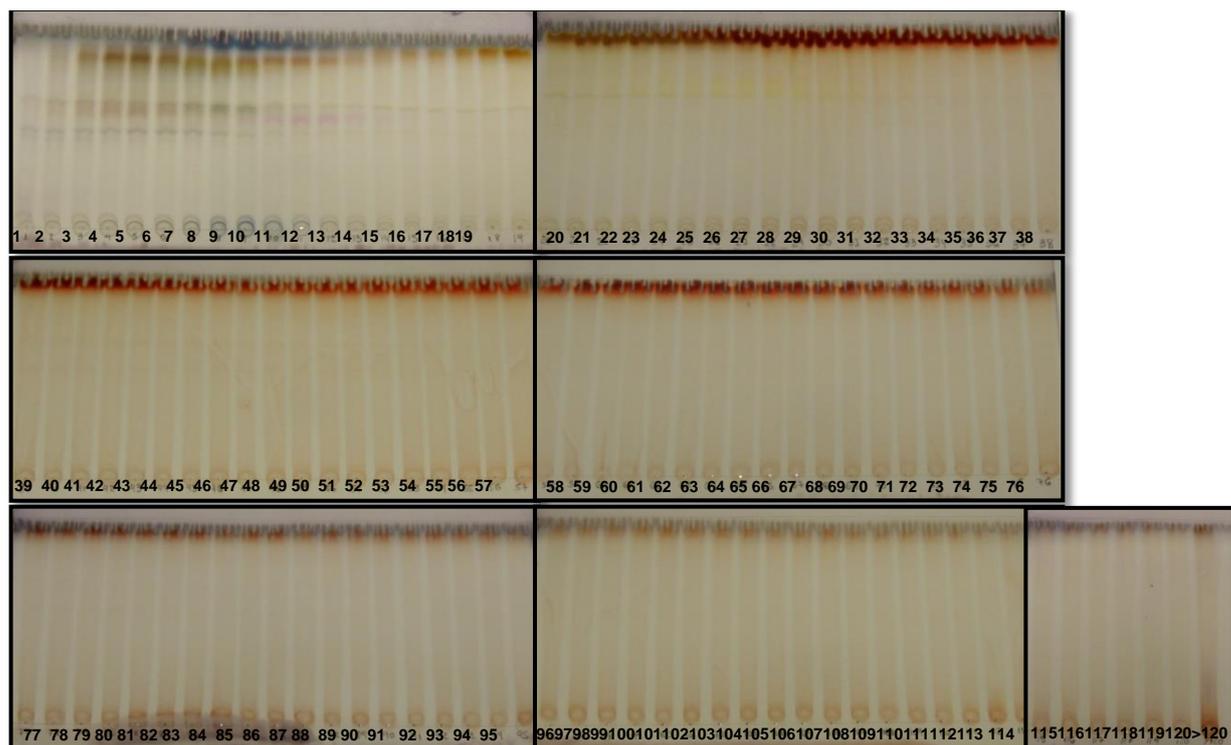


Figura 12 – Cromatografia em camada delgada, das frações 1 a >120 do extrato concentrado de engaço *Chenin Blanc*, obtidas na coluna de gel Sephadex LH-20. Cromatofolhas eluídas em acetato de etila:metanol:água (60:30:10, v/v/v) e reveladas com anisaldeído sulfúrico a 100°C

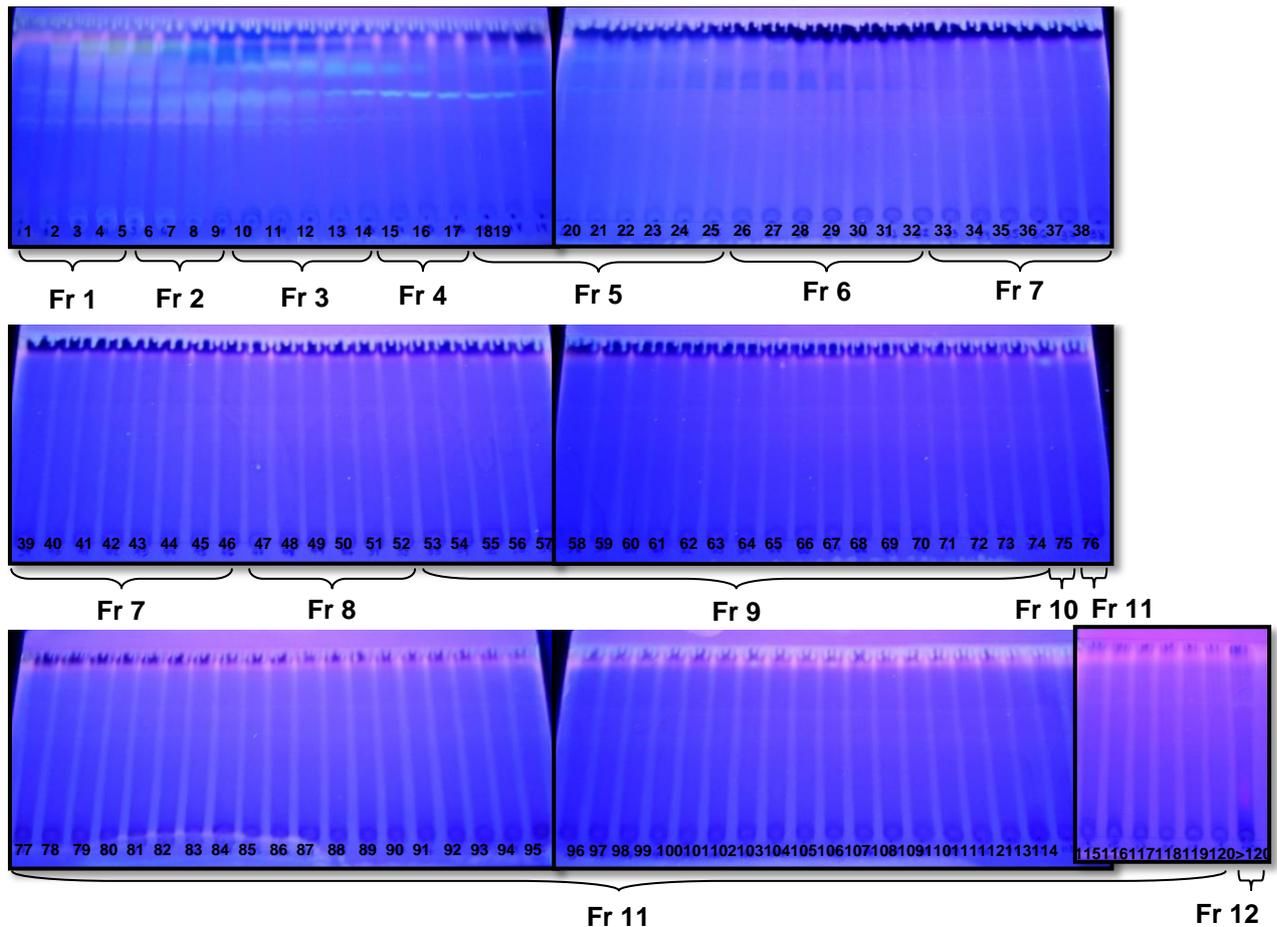


Figura 13 – Cromatografia em camada delgada, das frações 1 a >120 do extrato concentrado de engaço *Chenin Blanc*, obtidas na coluna de gel Sephadex LH-20. Cromatofolhas eluídas em acetato de etila:metanol:água (60:30:10, v/v/v), reveladas com anisaldeído sulfúrico a 100°C e irradiadas a 366 nm

#### 4.3.2.2 Semente de açaí

Da mesma maneira que o engaço de uva, o extrato concentrado de semente de açaí foi fracionado em coluna aberta de gel Sephadex LH-20. A Figura 14 ilustra a separação dos constituintes da amostra em bandas de diferentes colorações, as quais estão indicadas pelas setas.

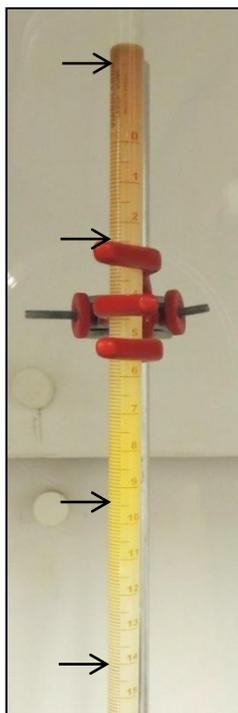


Figura 14 – Extrato concentrado (XAD<sup>®</sup>-2) de semente de açaí sendo eluído com metanol em coluna de gel Sephadex LH-20. Setas indicam a separação do extrato em bandas de diferentes colorações

A massa de 100 mg de extrato de semente de açaí concentrado foi adicionada à coluna de gel. A coleta das frações iniciou-se com a primeira banda fluorescente branca e seguiu a cada 4 minutos numa vazão de 15 gotas/minuto (vazão máxima da coluna). O tempo de coleta foi dobrado em relação ao do engajo, pois a vazão da coluna foi mais lenta. A coleta continuou até a total eluição da amostra, que ao final, rendeu 61 frações (60 mais 1 fração de coleta estendida para a limpeza da coluna), as quais foram cromatografadas em placas de CCD, analisadas sob luz UV (366 e 254 nm) e então reveladas com anisaldeído sulfúrico a 100°C (Figuras 15 a 17).

A análise do perfil cromatográfico das frações de semente de açaí possibilitou a visualização de compostos de diferentes polaridades, estando os mais polares nas frações iniciais, principalmente entre a 4<sup>a</sup> e a 13<sup>a</sup>, nas quais observou-se compostos com  $R_f$ s menores. Entre as frações 14 e 23, uma banda de elevado  $R_f$  e coloração amarela foi observada. Nas frações subsequentes, um menor número de compostos diferentes pôde ser visualizado, especialmente a partir da fração 25, onde uma banda marrom intensa, de peso molecular intermediário, foi observada no topo da placa. A intensidade dessa banda é diminuída nas frações que se seguiram.

Assim, a partir da análise do perfil cromatográfico em CCD, as frações foram agrupadas de acordo com semelhanças na coloração, fluorescência e/ou  $R_f$  em oito frações, como proposto a seguir: Fr 1 (1 a 3); Fr 2 (4 a 6); Fr 3 (7 a 11); Fr 4 (12 a 19); Fr 5 (20 a 24); Fr 6 (25 a 31); Fr 7 (32 a 43); Fr 8 (44 a 61).

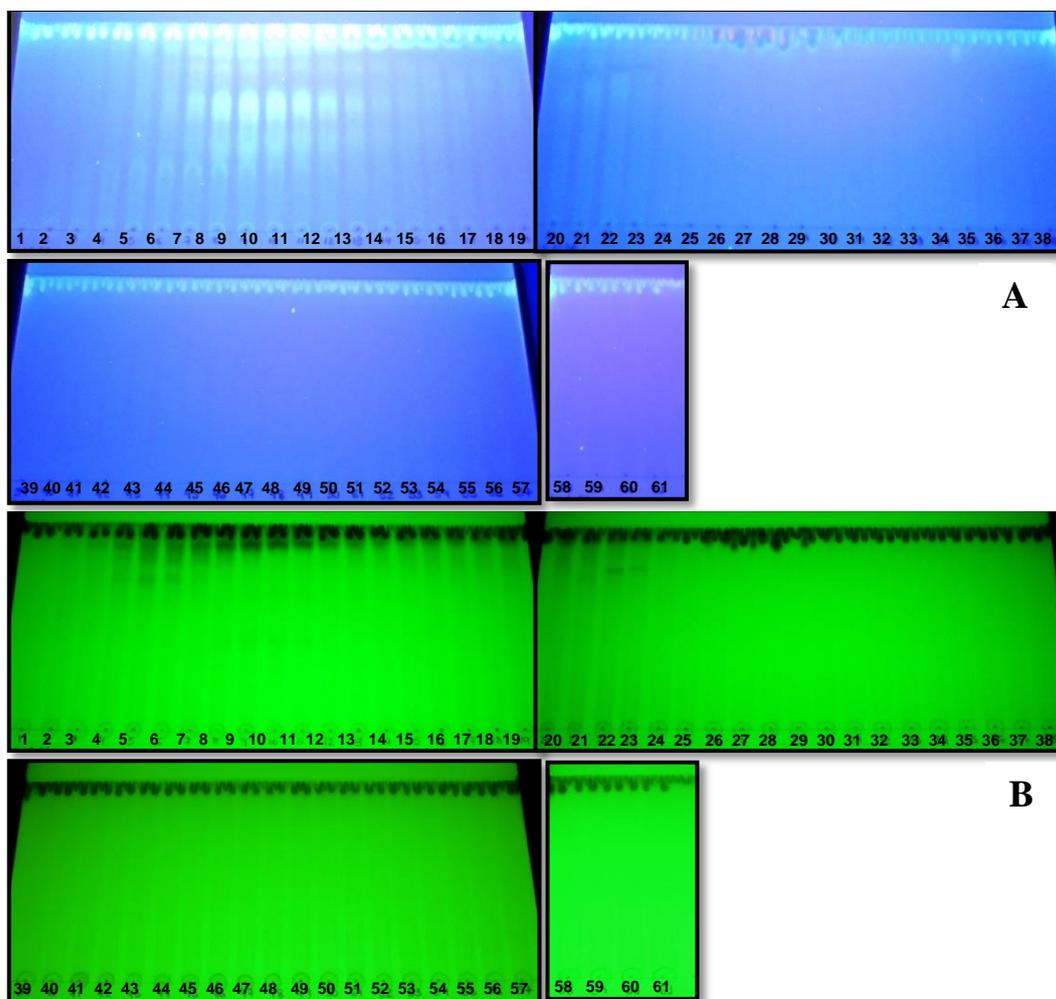


Figura 15 – Cromatografia em camada delgada, das frações 1 a 61 do extrato concentrado de semente de açaí, obtidas na coluna de gel Sephadex LH-20. Cromatofolhas eluídas em acetato de etila:metanol:água (60:30:10, v/v/v) e irradiadas a 366 (A) e 254 nm (B)

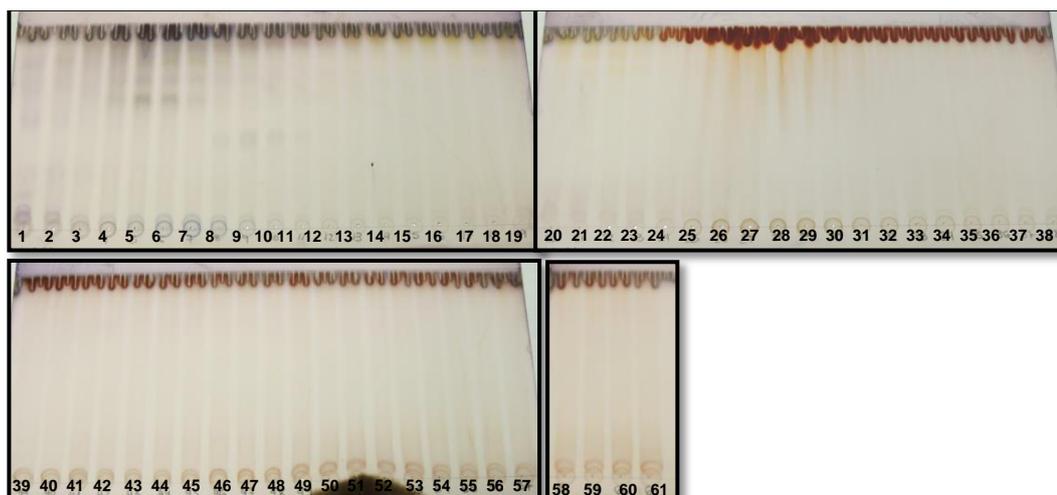


Figura 16 – Cromatografia em camada delgada, das frações 1 a 61 do extrato concentrado de semente de açaí, obtidas na coluna de gel Sephadex LH-20. Cromatofolhas eluídas em acetato de etila:metanol:água (60:30:10, v/v/v) e reveladas com anisaldeído sulfúrico a 100 °C

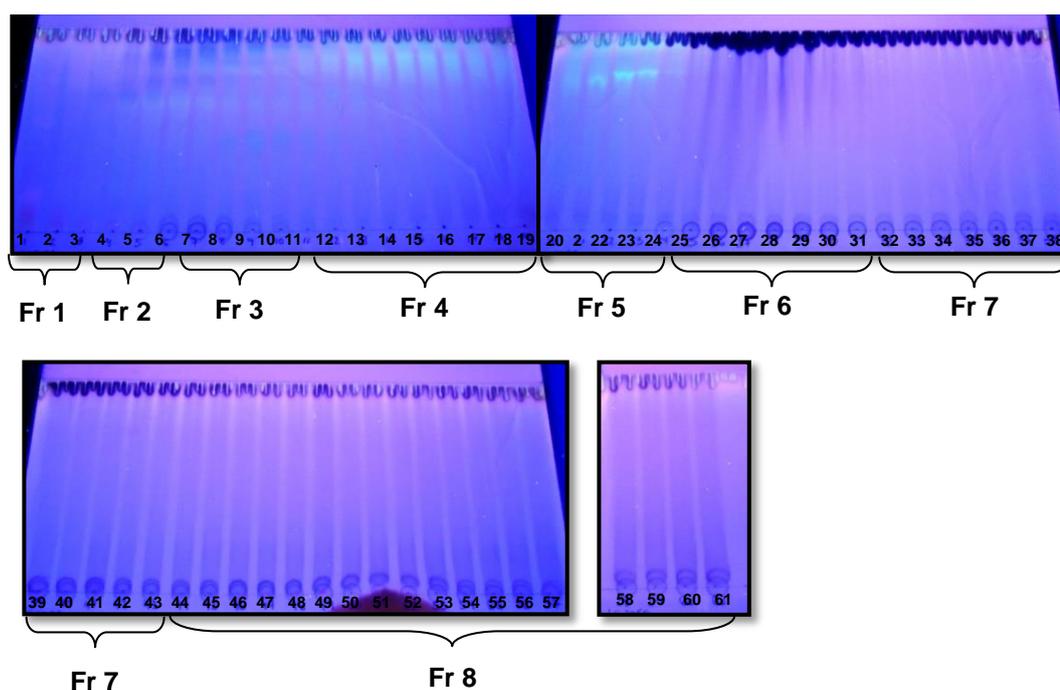


Figura 17 – Cromatografia em camada delgada, das frações 1 a 61 do extrato concentrado de semente de açaí, obtidas na coluna de gel Sephadex LH-20. Cromatofolhas eluídas em acetato de etila:metanol:água (60:30:10, v/v/v), reveladas com anisaldeído sulfúrico a 100 °C e irradiadas a 366 nm

A tabela 1 apresenta o rendimento para o fracionamento do engaço *Chenin Blanc* e semente de açaí.

Tabela 1 – Rendimento para os processos de liofilização, extração, concentração com XAD<sup>®</sup>-2 e fracionamento por LH-20 do engaço *Chenin Blanc* e semente de açaí

Etapa	Engaço <i>Chenin Blanc</i> – frações	Rendimentos por etapa <sup>b</sup>			Projeção de rendimentos <sup>c</sup>	
		Utilizado <sup>a</sup> (g)	Obtido (g)	Rendimento (%)	Obtido (g)	Rendimento (%)
1	Engaço pré-liofilização	1000	1000 <sup>(1)</sup>	100	1000	100
2	Engaço liofilizado	1000 <sup>(1)</sup>	338 <sup>(2)</sup>	33,8	338	33,8
3	Extrato bruto liofilizado	300 <sup>(2)</sup>	78,51 <sup>(3)</sup>	26,17	88,45	8,845
4	Extrato XAD <sup>®</sup> -2 liofilizado	70 <sup>(3)</sup>	2,07 <sup>(4)</sup>	2,96	2,61	0,261
5	LH-20 Fr 1	0,1 <sup>(4)</sup>	0,005	5	0,13	0,013
5	LH-20 Fr 2	0,1 <sup>(4)</sup>	0,0081	8,1	0,21	0,021
5	LH-20 Fr 3	0,1 <sup>(4)</sup>	0,0057	5,7	0,15	0,015
5	LH-20 Fr 4	0,1 <sup>(4)</sup>	0,0026	2,6	0,067	0,0067
5	LH-20 Fr 5	0,1 <sup>(4)</sup>	0,0106	<b>10,6</b>	0,28	0,028
5	LH-20 Fr 6	0,1 <sup>(4)</sup>	0,0146	<b>14,6</b>	0,38	0,038
5	LH-20 Fr 7	0,1 <sup>(4)</sup>	0,0128	<b>12,8</b>	0,33	0,033
5	LH-20 Fr 8	0,1 <sup>(4)</sup>	0,0039	3,9	0,10	0,010
5	LH-20 Fr 9	0,1 <sup>(4)</sup>	0,0149	<b>14,9</b>	0,39	0,039
5	LH-20 Fr 10	0,1 <sup>(4)</sup>	0,0012	1,2	0,031	0,0031
5	LH-20 Fr 11	0,1 <sup>(4)</sup>	0,0094	9,4	0,24	0,024
5	LH-20 Fr 12	0,1 <sup>(4)</sup>	0,0089	8,9	0,23	0,023
Etapa	Semente de açaí - frações					
1	S. açaí pré-liofilização	1000	1000 <sup>(1)</sup>	100	1000	100
2	S. açaí liofilizado	1000 <sup>(1)</sup>	580,8 <sup>(2)</sup>	55,08	580,8	55,08
3	Extrato bruto liofilizado	500 <sup>(2)</sup>	42,93 <sup>(3)</sup>	8,59	49,89	4,989
4	Extrato XAD <sup>®</sup> -2 liofilizado	40 <sup>(3)</sup>	2,87 <sup>(4)</sup>	7,17	3,58	0,358
5	LH-20 Fr 1	0,1 <sup>(4)</sup>	0,0056	5,6	0,20	0,020
5	LH-20 Fr 2	0,1 <sup>(4)</sup>	0,0097	9,7	0,35	0,035
5	LH-20 Fr 3	0,1 <sup>(4)</sup>	0,0110	11	0,39	0,039
5	LH-20 Fr 4	0,1 <sup>(4)</sup>	0,0106	<b>10,6</b>	0,38	0,038
5	LH-20 Fr 5	0,1 <sup>(4)</sup>	0,0038	3,8	0,14	0,014
5	LH-20 Fr 6	0,1 <sup>(4)</sup>	0,0415	<b>41,5</b>	1,49	0,149
5	LH-20 Fr 7	0,1 <sup>(4)</sup>	0,0105	<b>10,5</b>	0,38	0,038
5	LH-20 Fr 8	0,1 <sup>(4)</sup>	0,0117	<b>11,7</b>	0,42	0,042

<sup>a</sup> os números entre parênteses representam a etapa da qual originou-se o material utilizado e destinou-se o material obtido

<sup>b</sup> massas obtidas (g) e percentuais de rendimento em relação à massa empregada em cada etapa

<sup>c</sup> projeção de massas obtidas (g) e percentuais de rendimento em relação à massa inicial do engaço *Chenin Blanc* e da semente de açaí *in natura* (1000 g)

Os dados são apresentados na Tabela 1 de duas maneiras diferentes. A primeira delas apresenta o rendimento por etapa e leva em conta somente a massa empregada em determinada fase do fracionamento. Já a projeção de rendimentos estima, considerando-se a ausência de perdas durante o processo, o rendimento de cada fração em relação à massa inicial de engaço *Chenin Blanc* ou semente de açaí.

O rendimento cai ao passo que os resíduos agroindustriais são fracionados, principalmente na etapa de concentração para o engaço, na produção do extrato bruto para a semente de açaí e na obtenção das frações por LH-20 para ambas as amostras.

Embora haja maior rendimento na produção de extrato bruto de engaço *Chenin Blanc* em relação à semente de açaí, durante a etapa de concentração, o rendimento é menor para o

engajo, o que é devido ao maior teor de açúcares deste, os quais são eliminados na fração aquosa da XAD<sup>®</sup>-2.

De acordo com os dados de projeção, a partir de um quilo de engajo *Chenin Blanc* seria possível obter 2,61 gramas do extrato concentrado e frações com rendimento variando de 31 a 390 mg/kg, sendo as frações 9, 6, 7 e 5 as de maior rendimento. Já a partir de um quilo de semente de açaí seria possível produzir 3,58 gramas do extrato concentrado e frações rendendo de 14 a 1490 mg/kg, tendo os maiores rendimentos as frações 6, 8, 4 e 7.

#### **4.3.3 Avaliação do perfil cromatográfico das frações Sephadex LH-20 do engajo *Chenin Blanc* e semente de açaí por HPLC-DAD**

As 12 frações agrupadas do engajo *Chenin Blanc* e 8 da semente de açaí, obtidas por Sephadex LH-20, foram cromatografadas em um HPLC-DAD para a avaliação do perfil de compostos fenólicos. Os cromatogramas obtidos de cada fração podem ser vistos nas Figuras 18 e 19.

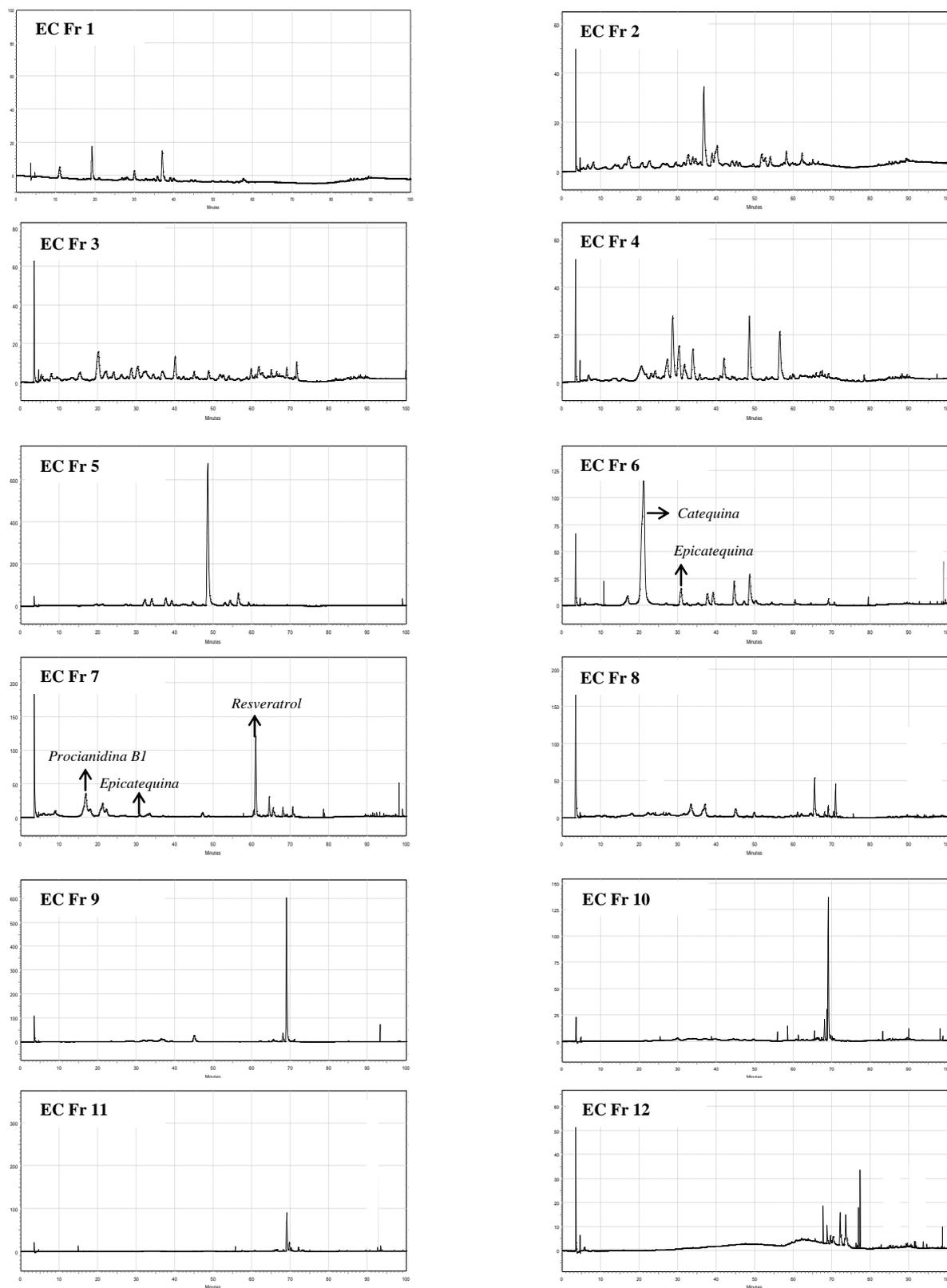


Figura 18 – Cromatogramas das doze frações agrupadas de engaço *Chenin Blanc* obtidas na coluna de gel Sephadex LH-20, a 280 nm, e a indicação dos compostos identificados por HPLC-DAD

As doze frações LH-20 de engaço *Chenin Blanc*, analisadas a 280 nm, apresentaram grande número de compostos químicos diferentes. As frações 1 a 4 se mostraram mais heterogêneas, com compostos abrangendo ampla faixa de polaridade, como já indicado na CCD. Nenhum composto pôde ser identificado nessas frações com base nos padrões utilizados.

A fração 5 apresentou um composto majoritário em 48 min, de polaridade intermediária, não identificado. Na fração 6 esse composto diminui de intensidade e catequina e epicatequina foram identificadas, sendo catequina o pico principal.

Ácido gálico, catequina, epicatequina e quercetina, antioxidantes conhecidos, já foram relatados em bagaço de uva (AMICO et al., 2004; RUBERTO et al., 2007; WANG et al., 2010), sementes (SPRANGER et al., 2008) e engaço (MAKRIS; BOSKOU; ANDRIKOPOULOS, 2007).

A fração 7 apresentou traços de epicatequina, bem como procianidina B1 e resveratrol, sendo este último, o composto predominante nessa fração.

Catequina, epicatequina e procianidina B1 já haviam sido identificados e quantificados no extrato bruto de engaço *Chenin Blanc*. Contudo, nota-se que o processo de concentração e fracionamento de fenólicos possibilitou o aumento do teor de resveratrol, o qual não havia sido possível identificar no extrato bruto anteriormente.

Resveratrol é um composto fenólico, da classe dos estilbenos, naturalmente encontrado em pequenas quantidades em alguns alimentos como uvas, vinhos, amendoim, pistache, raiz de ruibarbo, mirtilo, entre outros. Apesar de sua baixa biodisponibilidade, possui ampla ação terapêutica, prevenindo ou diminuindo a incidência de câncer, doenças cardiovasculares, isquemia, diabetes e aumentando a resistência ao estresse. Apresenta ainda atividades antioxidante e anti-inflamatória (BAUR; SINCLAIR, 2006; SMOLIGA; BAUR; HAUSENBLAS, 2011; VANG et al., 2011). Apesar do resveratrol ser encontrado em alguns tipos de alimentos, o vinho tinto tornou-se sua principal fonte de consumo, devido à sua maior dispersão na cultura alimentar em geral (VANG et al., 2011). Nota-se contudo, que boa parte do resveratrol, encontrado em uvas viníferas, está presente nas partes não comestíveis. O engaço, por exemplo, pode servir para a extração dessa e de outras moléculas bioativas, as quais poderiam ser usadas na fortificação de alimentos ou na formulação de suplementos antioxidantes para a elaboração de alimentos funcionais.

A partir da fração 8, nota-se a presença de compostos de menor polaridade, já que apresentaram maiores tempos de retenção. Na fração 9 há a ocorrência de um composto majoritário em 69 min, o qual se repete, em menor intensidade, nas frações 10 e 11.

A Figura 19 ilustra os cromatogramas das frações Sephadex LH-20 de semente de açaí obtidos após a análise por HPLC-DAD.

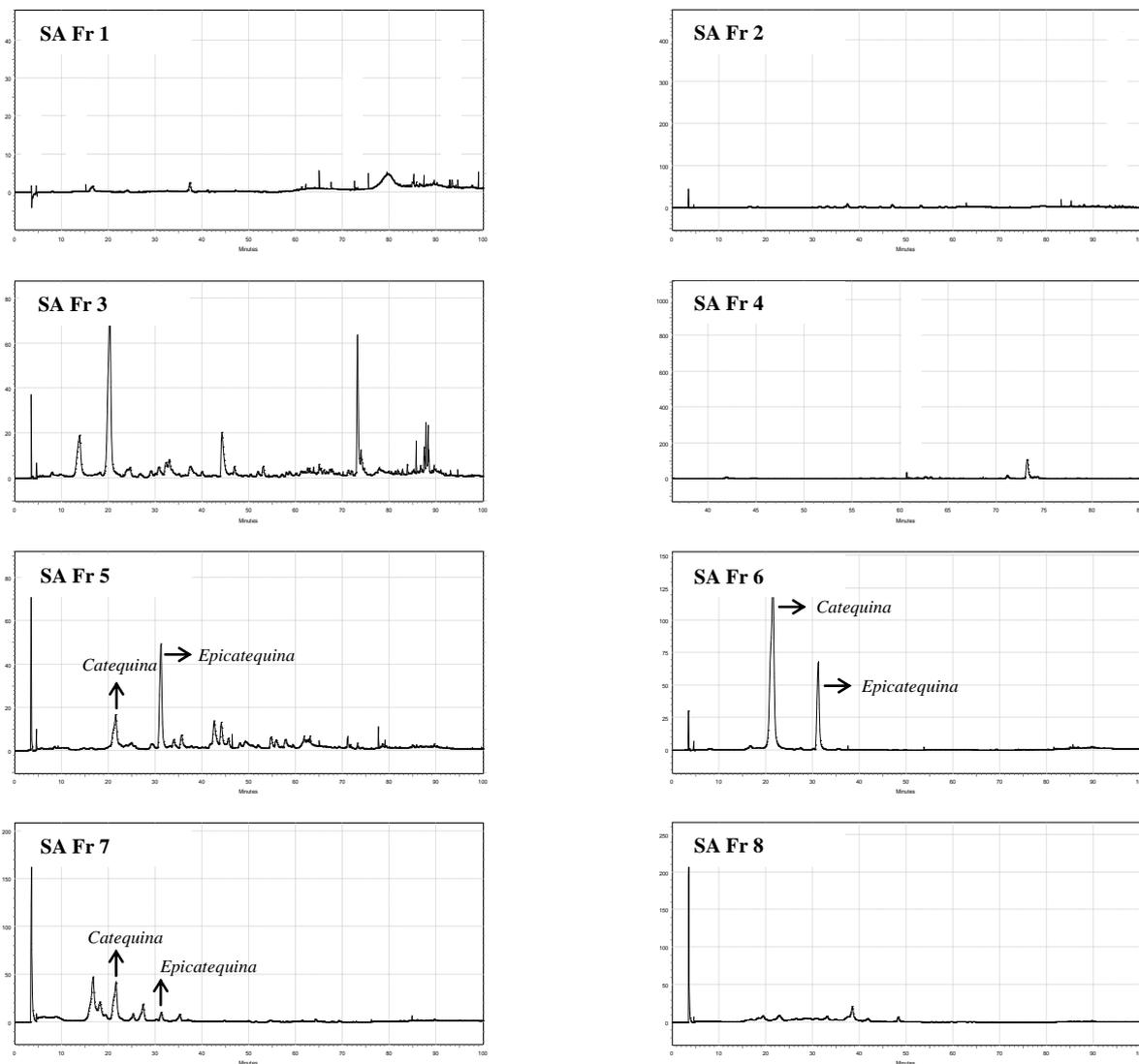


Figura 19 – Cromatogramas das doze frações agrupadas de semente de açaí obtidas na coluna de gel Sephadex LH-20, a 280 nm, e a indicação dos compostos identificados por HPLC-DAD

As frações 1 e 2 apresentaram baixa intensidade de compostos quando analisados a 280 nm. Já a fração 3 apresentou-se mais complexa, com substâncias de maior peso molecular e diferentes polaridades. A maior heterogeneidade dessa fração em relação às demais foi também evidenciada por CCD, onde maior número de bandas de diferentes  $R_f$ s foi observado. A fração 4 apresentou um composto de baixa intensidade em 73 min. Nenhum dos compostos das frações 1 a 4 puderam ser identificados com os padrões utilizados.

Na fração 5, catequina e epicatequina foram identificadas. Essas moléculas foram encontradas, em maior concentração e pureza, na fração 6. A fração 7 concentrou um grupo de compostos de maior polaridade onde os flavonoides supracitados também foram identificados. A maior concentração de catequina coincide com a maior intensidade da banda marrom/vermelha na fração 6 observada na CCD (Figura 6-C). Composta majoritariamente desses dois compostos, de certa forma purificados, a fração 6 é também a de maior rendimento dentre as oito frações obtidas, alcançando 1,49 g de catequina/epicatequina por quilo de semente de açaí fresca (Tabela 1). A fração 8 apresentou menor concentração de compostos, com predominância de um pico em 38 min, o qual não foi identificado.

Encontrados em uvas (YILMAZ; TOLEDO, 2004), vinhos (THIMOTHE et al., 2007), chás (KHAN; MUKHTAR, 2007; ZAVERI, 2006), chocolate (LANGER et al., 2011), porém ausentes em polpa de açaí (GORDON et al., 2012), os flavanois catequina e epicatequina possuem atividade antioxidante e o consumo de alimentos fontes dessas moléculas bioativas está associado à prevenção ou diminuição do risco de doenças cardiovasculares (de PASCUAL-TERESA; MORENO; GARCÍA-VIGUERA, 2010).

#### **4.3.4 Atividade antioxidante do extrato bruto, concentrado e frações da Sephadex LH-20 do engaço *Chenin Blanc* e semente de açaí**

Após a análise do perfil químico de cada uma das doze frações do engaço *Chenin Blanc*, estas foram avaliadas quanto ao potencial antioxidante contra o radical livre ABTS e sequestro do radical peroxila (ORAC), de modo a se identificar as frações de maior atividade. Sequencialmente, as frações selecionadas foram submetidas aos testes de capacidade de desativação de espécies reativas de oxigênio ( $O_2^{\cdot -}$  e HOCl). As frações mais bioativas também tiveram a atividade antioxidante avaliada *on-line* pela técnica de HPLC-ABTS.

##### **4.3.4.1 Atividade antioxidante pelos métodos de sequestro do radical livre ABTS e desativação do radical peroxila (ORAC)**

A análise por meio do método do sequestro do radical livre ABTS mostrou um aumento da atividade antioxidante à medida que as etapas do fracionamento avançaram (Figura 20). É possível observar um significativo aumento da atividade antioxidante na etapa de concentração do extrato bruto, a qual é potencializada nas frações purificadas 7, 6, 9 e 8, indicando que o método de fracionamento adotado foi eficaz, pois possibilitou a produção de frações de elevada atividade antioxidante. As frações 6 e 7 apresentaram capacidade de sequestro do radical livre ABTS quatro vezes maior do que o extrato bruto.

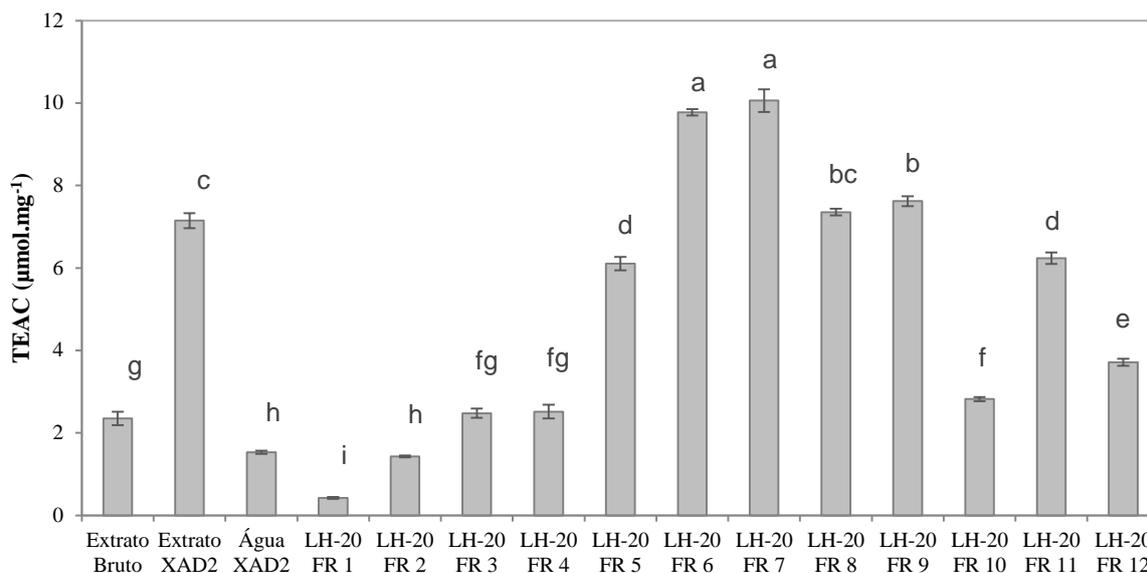


Figura 20 – Atividade antioxidante dos extratos bruto, concentrado e das doze frações do engaço *Chenin Blanc* medida pelo método de sequestro do ABTS e expressada como equivalentes ao Trolox - TEAC (μmol/mg). Resultados são médias de triplicatas. Desvio padrão é indicado pelas barras de erro,  $p < 0,05$

As capacidades antioxidantes observadas para os extratos e frações de engaço *Chenin Blanc* foram superiores às verificadas para dezoito frutas tropicais, incluindo acerola (0,953), camu-camu (1,24) e jaticaba (0,317 μmol/mg) (RUFINO et al., 2010).

A mesma tendência foi observada quando os extratos e frações foram submetidos à análise de desativação de radicais peroxila.

A purificação com resina Amberlite XAD<sup>®</sup>-2 foi capaz de aumentar em mais de cinco vezes a capacidade do extrato do engaço *Chenin Blanc* em desativar radicais peroxila. O fracionamento com gel Sephadex LH-20 permitiu a obtenção de frações quase dez vezes mais bioativas do que o extrato bruto e a atividade da fração 7, onde o resveratrol está concentrado, foi quase dobrada em relação à do extrato concentrado (Figura 21). Resveratrol demonstrou o maior valor ORAC quando comparado ao de flavanóis e ácidos fenólicos (YILMAZ; TOLEDO, 2004), o que pode explicar a maior capacidade de sequestro de radicais peroxila exibida pela fração 7 onde esse estilbeno está presente.

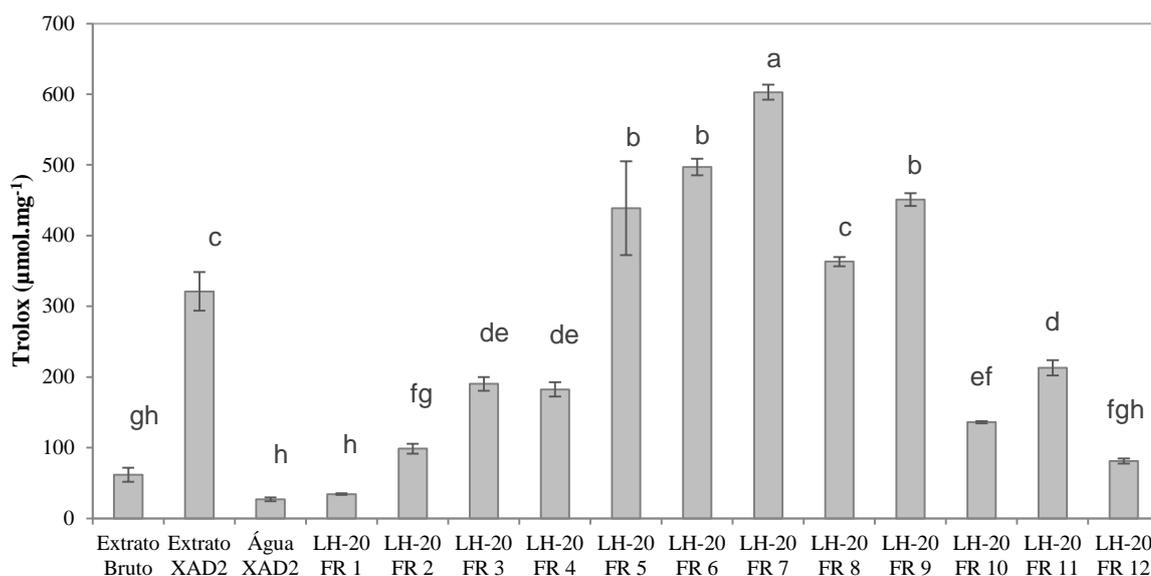


Figura 21 – Atividade antioxidante dos extratos bruto, concentrado e das doze frações de engaço *Chenin Blanc* avaliada pelo método ORAC (equivalentes ao Trolox; µmol/mg). Resultados são médias de triplicatas. Desvio padrão é indicado pelas barras de erro,  $p < 0,05$

Estudos epidemiológicos sugerem que a ingestão de uma dieta com mais de 10.000 equivalentes ao Trolox diariamente, está relacionada às menores incidências de hipertensão, infartos e câncer endometrial (PRIOR, 2015). Essa porção poderia ser alcançada com a ingestão de aproximadamente 17 mg da fração 7.

Em ambos os métodos avaliados, foi observada que a atividade antioxidante é baixa nas primeiras frações, apresenta ascendência nas frações seguintes, com ápice nas frações 6 – 7, e assume tendência descendente a partir de então.

A concentração do extrato bruto da semente de açaí com a resina Amberlite XAD<sup>®</sup>-2 não resultou em aumento significativo da atividade antioxidante pelo método do ABTS. Pode-se notar que parte da atividade antioxidante do extrato bruto permaneceu na fração aquosa após o processo de concentração, embora em menor proporção em relação ao extrato concentrado. O fracionamento, contudo, produziu frações com capacidade de redução do radical ABTS de 5 a 50% maiores do que a exibida pelos extratos bruto e concentrado (Figura 22).

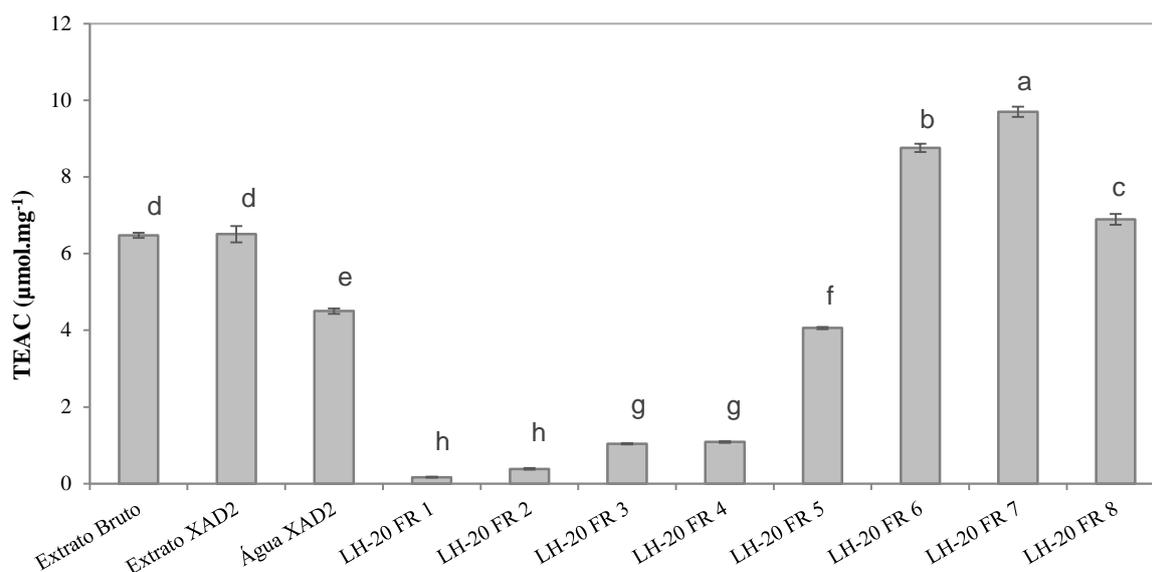


Figura 22 – Atividade antioxidante medida pelo método ABTS e expressa como equivalentes ao Trolox - TEAC ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ) dos extratos bruto, concentrado e das oito frações de semente de açaí. Resultados são médias de triplicatas. Desvio padrão é indicado pelas barras de erro,  $p < 0,05$

A capacidade sequestrante do radical ABTS dos extratos e frações da semente de açaí foram superiores ao já relatado para o açaí (0,0645), caju (0,0794), umbu (0,077) e uvaia (0,182  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ) (RUFINO et al., 2010).

Embora parte dos compostos com atividade antioxidante tenha ficado na fração aquosa durante a concentração do extrato, de modo geral, o uso da resina Amberlite XAD<sup>®</sup>-2 foi eficaz na produção de um extrato com elevada atividade antioxidante.

Em contrapartida, a atividade antioxidante do extrato concentrado frente a desativação de radicais peroxila mostrou-se quase quatro vezes maior do que o extrato bruto e a fração aquosa. Ademais, o fracionamento com Sephadex LH-20 produziu frações (6 e 7) com atividade antioxidante quase sete vezes maior do que o extrato bruto de semente de açaí e quase o dobro da verificada para o concentrado (Figura 23).

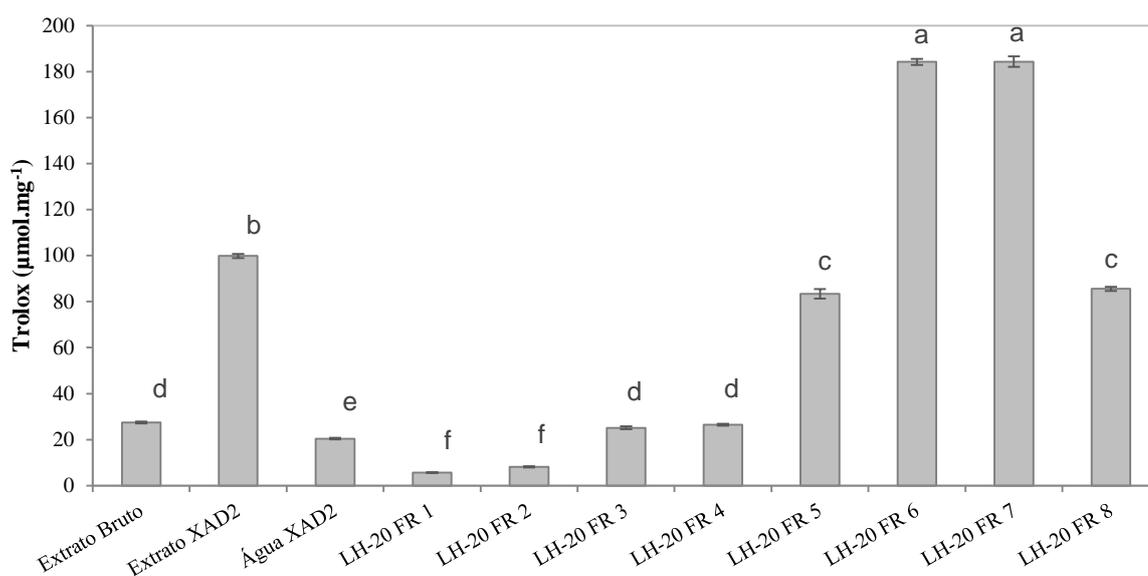


Figura 23 – Atividade antioxidante medida pelo método ORAC e expressa como equivalentes ao Trolox ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ) dos extratos bruto, concentrado e das oito frações de semente de açaí. Resultados são médias de triplicatas. Desvio padrão é indicado pelas barras de erro,  $p < 0,05$

O valor ORAC apresentado pelos extratos e frações mais ativas da semente de açaí foi superior ao verificado para isovitexina e velutina – compostos isolados da polpa de açaí. A atividade das frações 6 e 7, foi oito e quatorze vezes maior, respectivamente, do que a atividade encontrada para esses compostos em estudo feito por Kang et al. (2011). Cabe lembrar ainda que essas frações, principalmente a 6, concentram os flavanois catequina e epicatequina. Catequina possui o dobro da capacidade de sequestro de radicais peroxila em comparação à epicatequina (YILMAZ; TOLEDO, 2004) e isso pode explicar a maior atividade antioxidante da fração 6 em relação à 5, onde a razão catequina/epicatequina é menor.

De modo geral, tanto as frações LH-20 mais ativas do engaço *Chenin Blanc* quanto as da semente de açaí demonstraram capacidade antioxidante muito superior do que a verificada para os antioxidantes sintéticos BHT e TBHQ (Tabela 5, Capítulo 3). A atividade antioxidante da fração 7 do engaço ( $602.800 \mu\text{mol}/\text{g}$ ), por exemplo, foi quase setecentas vezes maior do que a do BHT ( $874 \mu\text{mol}/\text{g}$ ) e mais que o dobro da apresentada pelo TBHQ ( $286.207 \mu\text{mol}/\text{g}$ ) em desativar os radicais peroxila no método ORAC. Já a fração 7 da semente de açaí ( $184.328 \mu\text{mol}/\text{g}$ ) foi duzentas vezes mais eficaz em reduzir esses radicais. No ensaio do sequestro do ABTS, as duas frações foram equivalentes à atividade antioxidante verificada para o BHT ( $10.727 \mu\text{mol}/\text{g}$ ) e superior à do TBHQ ( $7.236 \mu\text{mol}/\text{g}$ ). Isso demonstra o elevado potencial destes resíduos como fontes naturais de antioxidantes.

#### 4.3.4.2 Capacidade de sequestro do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e do ácido hipocloroso (HOCl) das frações bioativas selecionadas de engaço *Chenin Blanc* e semente de açaí

Diante dos resultados da atividade antioxidante das doze frações de engaço *Chenin Blanc*, foram selecionadas as de maior atividade – 5, 6, 7, 8 e 9 – para serem avaliadas, juntamente com os extratos brutos e concentrados, quanto à capacidade de desativação das espécies reativas de oxigênio: ânion superóxido e ácido hipocloroso (Tabela 2). Essas espécies são geradas em sistemas biológicos e participam da peroxidação lipídica e estresse oxidativo (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Tabela 2 – Capacidade de desativação do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e ácido hipocloroso (HOCl) dos extratos bruto, concentrado e frações bioativas de engaço *Chenin Blanc*

Extratos e frações bioativas	Ânion superóxido EC <sub>50</sub> (mg/mL)	Ácido hipocloroso EC <sub>50</sub> (mg/mL)
Bruto	0,173±0,05075 <sup>a</sup>	0,02103±0,00132 <sup>a</sup>
Concentrado XAD <sup>®</sup> -2	0,084±0,00081 <sup>bc</sup>	0,0062±0,00012 <sup>b</sup>
5	0,125±0,00849 <sup>ab</sup>	0,0049±9,4x10 <sup>-5b</sup>
6	0,162±0,0043 <sup>a</sup>	<b>0,0022±3,1x10<sup>-5c</sup></b>
7	<b>0,070±0,002<sup>c</sup></b>	<b>0,0027±3,9x10<sup>-5c</sup></b>
8	<b>0,046±0,00072<sup>c</sup></b>	0,0050±5,3x10 <sup>-5b</sup>
9	<b>0,044±0,00032<sup>c</sup></b>	0,0059±0,0003 <sup>b</sup>

Resultados são médias de triplicatas ± desvio padrão,  $p < 0,05$

O radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) é espontaneamente produzido *in vivo* na cadeia respiratória, sendo transformado em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD). Peróxido de hidrogênio, por sua vez, pode interagir com íons metálicos de transição para gerar o radical hidroxila ( $HO\cdot$ ), o qual é altamente oxidante e pode causar sérios danos às estruturas biológicas, principalmente com ácidos graxos poli-insaturados, gerando assim radicais peroxila ( $ROO\cdot$ ) (GOMES et al., 2007).

O ácido hipocloroso (HOCl) é uma espécie reativa, altamente oxidante, produzida naturalmente no interior de neutrófilos por meio da enzima mieloperoxidase que catalisa a oxidação de íons cloreto pelo peróxido de hidrogênio, formando HOCl. Funciona como mecanismo de defesa contra micro-organismos fagocitados pelos neutrófilos, porém, em excesso, pode provocar sérios danos aos tecidos (HALLIWELL et al., 1995; ALVES et al., 2010).

Os resultados desses ensaios estão apresentados como EC<sub>50</sub>, ou seja, a quantidade de amostra necessária para a desativação de 50% das espécies reativas presentes no meio.

Todos os extratos e frações do engaço *Chenin Blanc* testados demonstraram capacidade antioxidante superior à exibida pelo ácido ascórbico (0,25 mg/mL) e BHT (0,83 mg/mL) em desativar  $O_2^{\cdot-}$  de acordo com Kong et al.(2012).

As frações 9, 8 e 7 demonstraram as maiores capacidades de desativar o ânion superóxido, pois apresentaram os menores valores de  $EC_{50}$  (Tabela 2). As frações 8 e 9 foram quase quatro vezes mais potentes do que o extrato bruto e duas vezes mais do que o extrato concentrado.

Contudo, as frações 5 e 6 apresentaram atividade antioxidante equivalente a do extrato bruto e quase a metade da desempenhada pelo extrato concentrado. As diferenças na composição química dessas frações indicam que catequina e epicatequina, presentes majoritariamente na fração 6, não possuem elevada atividade antioxidante diante do ânion superóxido, ao passo que, procianidina B1 e resveratrol, constituintes da fração 7, bem como outros compostos não identificados, são mais eficazes na desativação dessa espécie reativa.

Os padrões catequina e epicatequina foram testados contra o  $O_2^{\cdot-}$  e apresentaram valores de  $EC_{50}$  de 0,090 e 0,227 mg/mL, respectivamente. Embora catequina apresente boa capacidade de desativação, na fração 6, esta encontra-se na presença de outros compostos de menor atividade, como a epicatequina, por exemplo.

Por outro lado, a fração 6 foi a mais ativa na desativação do ácido hipocloroso e juntamente com a 7, foram nove e sete vezes mais potentes do que o extrato bruto, respectivamente. Novamente, a concentração do extrato com a resina Amberlite XAD<sup>®</sup>-2 provou ser eficiente, pois produziu um extrato três vezes mais ativo na desativação de HOCl. Nesse ensaio, todas as frações testadas apresentaram maior atividade antioxidante do que os extratos bruto e concentrado.

Os padrões catequina, epicatequina e procianidina B1 apresentaram valores de  $EC_{50}$  de 0,00050; 0,00081 e 0,00062 mg/mL, o que pode explicar a maior atividade da fração 6 nesse ensaio, onde a catequina está concentrada.

Os extratos e frações testados foram mais eficazes na desativação do radical hipocloroso do que o padrão Trolox (0,134 mg/mL) (RODRIGUES; MARIUTTI; MERCADANTE, 2013), bem como o extrato de *Pedilanthus tithymaloides* (0,113 mg/mL), um arbusto com diversas substâncias com atividades biológicas (ABREU et al., 2006).

A Figura 24 ilustra a atividade antioxidante dos extratos e frações de engaço *Chenin Blanc* frente a  $O_2^{\cdot-}$  e HOCl, tornando evidente a atividade seletiva desempenhada pela fração 6, como forte inativador para o HOCl e fraco para o  $O_2^{\cdot-}$ .

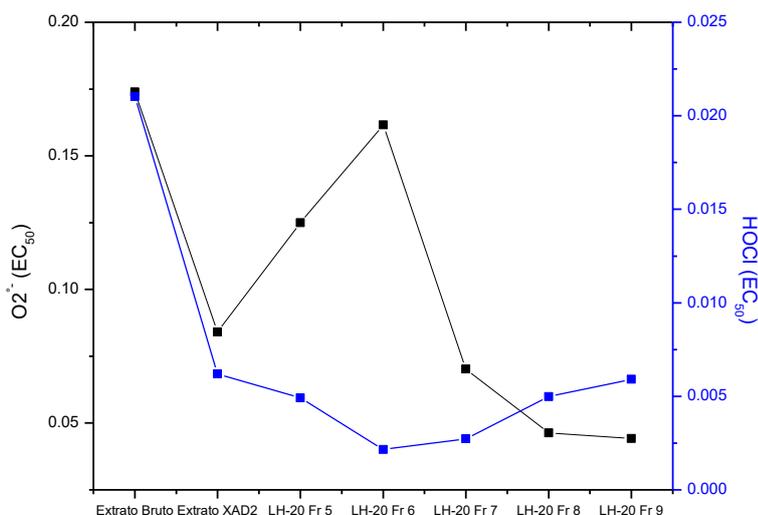


Figura 24 – Atividades antioxidantes, expressas como EC<sub>50</sub>, dos extratos e frações de engaço *Chenin Blanc* nos ensaios de sequestro do ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e radical hipocloroso (HOCl)

Após as oito frações da semente de açaí terem sido avaliadas pelos métodos de sequestro do radical livre ABTS e sequestro dos radicais peroxila (ORAC), as frações 5, 6, 7 e 8, de maior atividade, foram então selecionadas e testadas como antioxidantes naturais frente às espécies reativas de oxigênio: ânion superóxido e ácido hipocloroso (Tabela 3).

Tabela 3 – Capacidade de desativação do ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e ácido hipocloroso (HOCl) dos extratos bruto, concentrado e das frações bioativas da semente de açaí

Extratos e frações bioativas	Ânion superóxido EC <sub>50</sub> (mg/mL)	Ácido hipocloroso EC <sub>50</sub> (mg/mL)
Bruto	0,0792±0,00618 <sup>d</sup>	0,0075±0,00011 <sup>a</sup>
Concentrado XAD <sup>®</sup> -2	0,0854±0,00172 <sup>d</sup>	0,0030±0,00008 <sup>d</sup>
5	0,4106±0,01552 <sup>b</sup>	0,0051±0,00009 <sup>b</sup>
6	0,5700±0,00430 <sup>a</sup>	<b>0,0020±0,00010<sup>e</sup></b>
7	0,1202±0,00303 <sup>c</sup>	<b>0,0014±0,00006<sup>f</sup></b>
8	<b>0,0549±0,00162<sup>e</sup></b>	0,0045±0,00003 <sup>c</sup>

Resultados são médias de triplicatas ± desvio padrão,  $p < 0,05$

Como observado para o ensaio de sequestro do radical livre ABTS, diante do ânion superóxido o extrato concentrado também não apresentou maior capacidade de desativação dessa espécie reativa quando comparado ao extrato bruto. Além disso, quando testadas individualmente, as frações 5, 6 e 7 perderam muita atividade em comparação às suas misturas – extratos bruto e concentrado. A atividade antioxidante concentrou-se na fração 8, a

qual apresentou cerca de 40% maior poder de desativação do ânion superóxido quando comparado ao dos extratos. Nenhum constituinte dessa fração pôde ser identificado.

A capacidade demonstrada pela fração 8 foi superior à exibida pelo extrato de *Pedilanthus tithymaloides* (0,143 mg/mL) e Trolox (0,519 mg/mL) segundo o estudo realizado por Abreu et al. (2006). Os extratos e a fração 8 apresentaram potencial equivalente ao extrato de casca de araçá vermelho (0,084 mg/mL) (RIBEIRO et al., 2014).

Quando testadas como desativadores do ácido hipocloroso, as frações 6 e 7 apresentaram as maiores capacidades. Nesse ensaio, o extrato concentrado demonstrou o dobro da atividade antioxidante quando comparado ao bruto. Apesar de todas as frações testadas terem capacidade de desativação maior do que a verificada para o extrato bruto, somente nas frações 6 e 7 é que essa atividade foi maior do que a do concentrado. A fração 7 foi duas vezes mais potente do que o extrato concentrado e quatro vezes mais potente do que o bruto. Nas frações mais ativas foram identificados catequina e epicatequina, presentes em maior concentração na fração 6. Contudo, a alta atividade antioxidante verificada para a fração 7 sugere a participação de outros compostos como desativadores de HOCl.

As atividades antioxidantes exibidas pelas frações 6 e 7 da semente de açaí foram cerca de dez vezes maiores do que a relatada para o extrato de Mana-cubiu (0,013 mg/mL) (RODRIGUES; MARIUTTI; MERCADANTE, 2013), extrato de murici (0,010 mg/mL) e cem vezes superior ao Trolox (0,134 mg/mL) (MARIUTTI et al., 2014). Além disso, o resultado encontrado para a fração 7 equipara-se à capacidade antioxidante do ácido gálico em sequestrar HOCl (0,0011 mg/mL) (RIBEIRO et al., 2014).

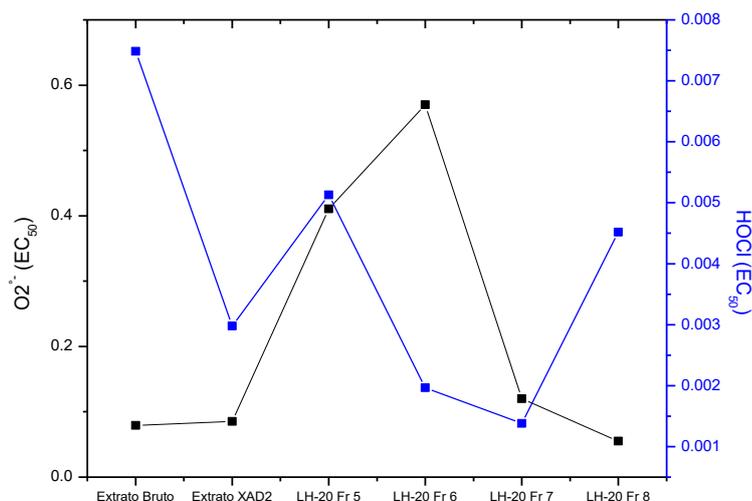


Figura 25 – Atividades antioxidantes, expressas como EC<sub>50</sub>, dos extratos e frações de semente de açaí, quanto a capacidade de sequestro do ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e radical hipocloroso (HOCl)

De modo geral, o extrato bruto de semente de açaí mostrou ser eficiente na desativação de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e pouco eficaz em sequestrar o HOCl (Figura 25). Já tendência inversa foi observada para a fração 6. Esses resultados indicam a ação seletiva dos extratos/frações diante das diferentes espécies reativas de oxigênio. A fração 5 apresentou menor atividade antioxidante do que o extrato concentrado para ambas as espécies reativas.

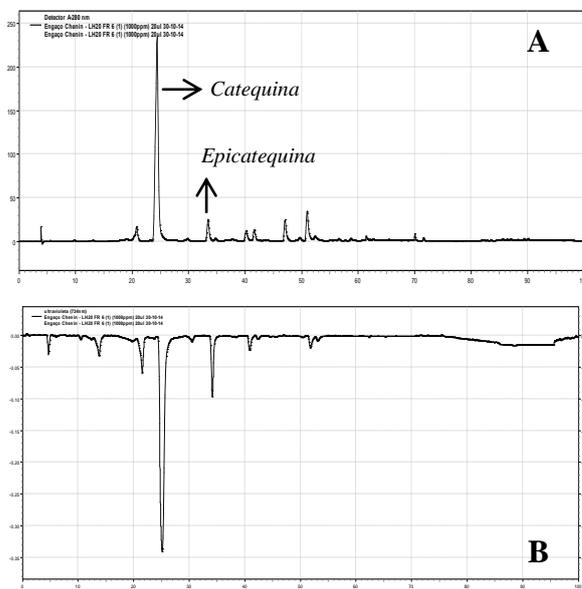
#### 4.3.4.3 Atividade antioxidante *on-line* das frações bioativas de engaçó *Chenin Blanc* e semente de açaí por HPLC-ABTS

As frações 6, 7, 8 e 9 do engaçó *Chenin Blanc*, com as maiores atividades pelos métodos de sequestro do ânion superóxido e ácido hipocloroso, foram submetidas ao HPLC-ABTS, a fim de se verificar a contribuição individual de cada um de seus constituintes na capacidade de redução do radical livre ABTS. Os cromatogramas obtidos para cada fração podem ser visualizados na Figura 26. O cromatograma (A) corresponde aos compostos químicos das frações separados na coluna cromatográfica C-18 e detectados a 280 nm. O cromatograma (B), com picos negativos, refere-se à queda na absorbância inicial do radical ABTS ao reagir com cada pico que saiu da coluna cromatográfica, indicando, portanto, a atividade antioxidante de cada composto químico da amostra.

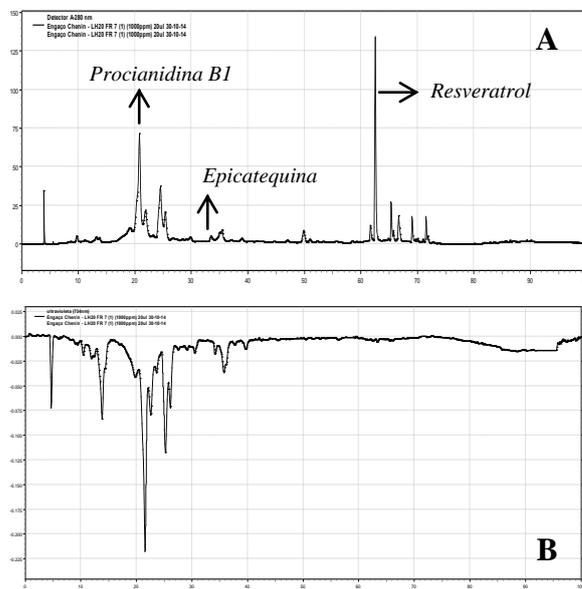
Embora tenha sido empregado o mesmo método utilizado na técnica de HPLC-DAD analítico para a determinação de compostos fenólicos, houve um ajuste na vazão da fase

móvel no método HPLC-ABTS, a qual passou de 1 mL/minuto para 0,8 mL/minuto. Assim, os tempos de retenção dos compostos identificados sofreram pequena alteração.

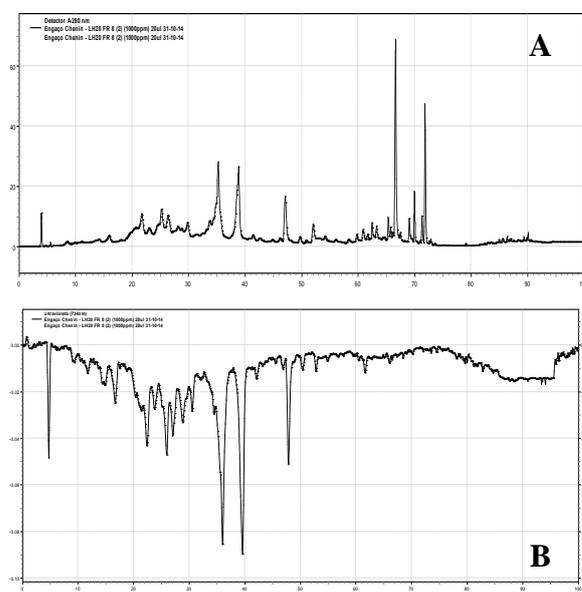
FR 6



FR 7



FR 8



FR 9

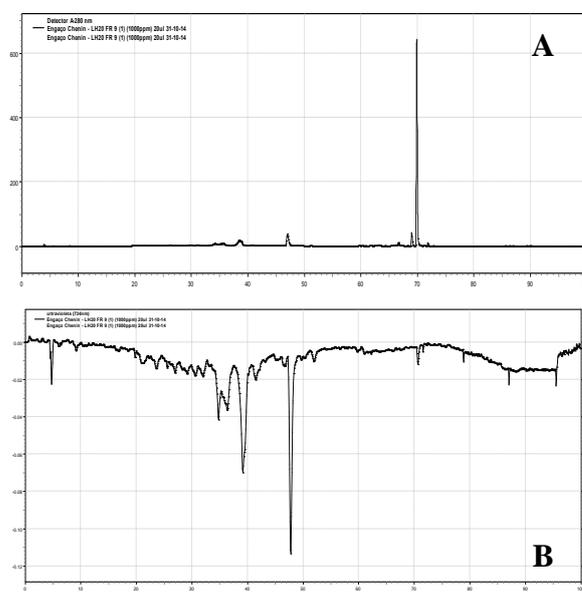


Figura 26 – Cromatogramas das frações de maior bioatividade (LH-20) de engajo *Chenin Blanc* a 280 nm (A) e atividade antioxidante de seus constituintes pela redução do radical livre ABTS, monitorada a 734 nm (picos negativos) (B)

Na fração 6 foi possível verificar elevada atividade antioxidante relativa dos picos referentes à catequina e epicatequina. Esse resultado concorda com o já observado para a atividade antioxidante dessa fração no ensaio de sequestro do radical ABTS. Verifica-se ainda

que a atividade antioxidante global da fração 6 deve-se majoritariamente à catequina, a qual encontra-se em maior concentração.

Na fração 7, se observou atividade antioxidante somente nos compostos iniciais do cromatograma, entre eles, os compostos fenólicos— procianidina B1 e epicatequina – além de outros não identificados. Embora o resveratrol seja a substância predominante dessa fração, nenhuma atividade antioxidante foi constatada nesse método, apesar desse composto possuir atividades biológicas reconhecidas (BAUR; SINCLAIR, 2006; SMOLIGA; BAUR; HAUSENBLAS, 2011) e a fração 7 ter apresentado elevada atividade global no ensaio *in vitro*. Esse resultado pode sugerir tanto um efeito antioxidante sinérgico entre os compostos quanto a influência do pH do meio reacional na atividade do resveratrol, já que o ensaio *in vitro* é realizado em meio tamponado a pH 7,4 e as fases móveis utilizadas no método cromatográfico são acidificadas com ácido fórmico alcançando o pH 2,6. Meios ácidos favorecem a isomerização de *cis*-resveratrol para *trans*, o qual é mais estável (TRELA; WATERHOUSE, 1996; ZUPANČIČ; LAVRIČ; KRISTL, 2015). Menor atividade antioxidante do resveratrol contra o radical livre DPPH, porém, foi encontrada em meios ácidos quando comparada aos básicos (BIÇER et al., 2014), podendo explicar assim a não detecção de atividade antioxidante dessa molécula no método HPLC-ABTS. Outra hipótese a ser considerada inclui a influência do solvente no qual a amostra é dissolvida, que neste caso é majoritariamente a fase móvel usada no método cromatográfico (metanol e acetonitrila), já que uma atividade antioxidante solvente-dependente foi observada para  $\beta$ -caroteno e ácido ascórbico, sendo o valor TEAC deste último menor quando dissolvido em metanol do que em água (KOLEVA et al., 2001).

A fração 8 apresentou quatro compostos, não identificados, de maior atividade antioxidante, em 4, 35, 39 e 47 minutos. Já na fração 9 o composto referente ao pico em 57 minutos, seguido pelo composto em 38 minutos, ambos não identificados, mostraram-se como os mais ativos.

Os picos majoritários presentes entre 65 e 75 min (fração 8) e em 70 min (fração 9) não demonstraram capacidade de sequestrar o radical livre ABTS por HPLC.

As frações 6, 7 e 8 da semente de açaí, de maior atividade nos ensaios anteriores, foram selecionadas para análise *on-line* da atividade antioxidante de seus constituintes por HPLC-ABTS (Figura 27).

A fração 6 da semente de açaí, se mostrou bastante purificada, apresentando majoritariamente catequina e epicatequina em sua composição. A atividade antioxidante, frente ao radical livre ABTS, não foi observada para nenhum outro componente, exceto para

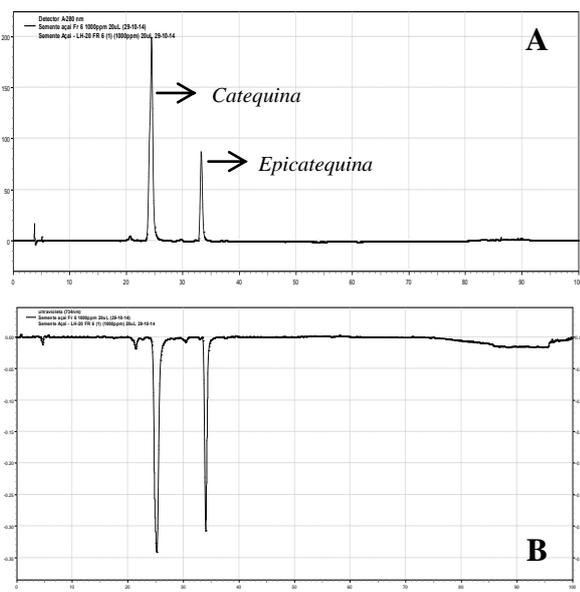
os flavonoides mencionados. Dessa forma, a atividade antioxidante desempenhada por essa fração nos métodos anteriores é devida a esses dois compostos e/ou ao efeito sinérgico proveniente da mistura desses. Além disso, nota-se que o processo de concentração/fracionamento utilizado foi eficaz para a obtenção de uma fração rica e altamente enriquecida em catequina e epicatequina a partir de semente de açaí.

O mesmo método de concentração/fracionamento adotado neste trabalho também foi eficaz ao render uma fração rica em proantocianidinas A1 e A2, a partir de película de amendoim (OLDONI et al., 2016).

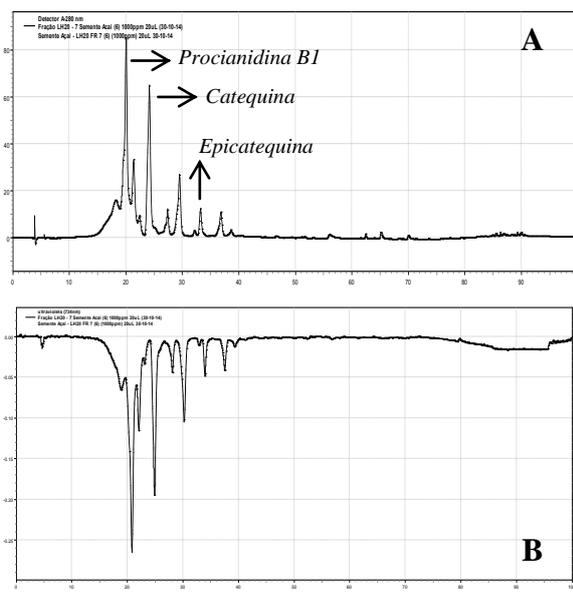
Novamente, na fração 7, catequina e epicatequina estão presentes, porém em menor concentração em relação à fração 6. O composto de maior atividade antioxidante, entretanto, não pôde ser identificado ( $t_R=20$  min), o qual pode ter sido o responsável, sobretudo, pelo melhor desempenho dessa fração em sequestrar ânions superóxido quando comparada à fração 6. De forma geral, a maior complexidade da fração 7, com diferentes compostos antioxidantes agindo isolada ou conjuntamente, resultou em uma fração de atividade antioxidante elevada e de ação abrangente.

A fração 8 apresentou uma complexa mistura de compostos com atividades antioxidantes distintas, sendo o composto com  $t_R=40$  min o de maior ação antioxidante quando submetido à reação com o radical livre ABTS. Nenhum componente dessa fração, entretanto, pôde ser identificado por HPLC-DAD.

## FR 6



## FR 7



## FR 8

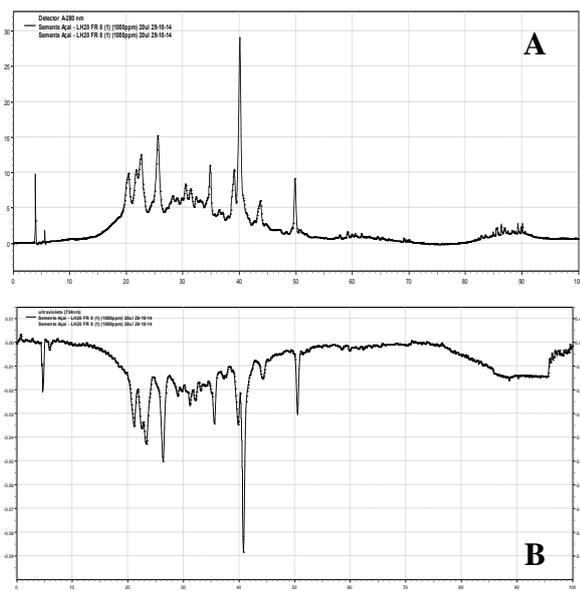


Figura 27 – Cromatogramas das frações de maior bioatividade (LH-20) de semente de açaí a 280 nm (A) e atividade antioxidante de seus constituintes pela redução do radical livre ABTS, monitorada a 734 nm (picos negativos) (B)

#### 4.3.5 Avaliação do perfil de compostos fenólicos dos extratos brutos, concentrados e frações bioativas de engaço *Chenin Blanc* e semente de açaí por espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-ESI-LTQ-MS)

Os extratos e frações de engaço *Chenin Blanc* e semente de açaí foram submetidos à análise de espectrometria de massas de alta resolução a fim de se elucidar os demais compostos presentes nessas amostras e que não foram identificados pela técnica de HPLC-

DAD. Os cromatogramas obtidos com a indicação dos principais compostos identificados podem ser vistos nas figuras 28 e 29.

A tabela 4 apresenta 32 compostos identificados no extrato bruto de engaço *Chenin Blanc*, dos quais, 24 foram encontrados também no extrato concentrado. Nas frações 6, 7, 8 e 9 foram identificados 19, 20, 23 e 13 compostos, respectivamente. Já na semente de açaí foi possível identificar 58 polifenóis no extrato bruto e 34 remanescentes no concentrado. O número de compostos identificados nas frações bioativas 6, 7 e 8 da semente de açaí foi 24, 17 e 23, respectivamente (Tabela 5). Embora alguns compostos tenham se perdido durante a etapa de concentração do extrato bruto, o teor dos demais compostos foi aumentado, o que contribuiu para a maior atividade antioxidante verificada para os extratos concentrados.

No extrato bruto de engaço *Chenin Blanc*, procianidina dímera tipo B ( $m/z$  577) e catequina ( $m/z$  289) foram os compostos fenólicos majoritários identificados. No extrato concentrado, por sua vez, observou-se um aumento da intensidade do sinal desses compostos fenólicos, além de epicatequina ( $m/z$  289), epicatequina-*O*-galato ( $m/z$  441) e resveratrol ( $m/z$  227) (Figura 28 A-B). Nas frações de engaço *Chenin Blanc* (Figura 28 C-F) esses compostos foram também identificados e encontraram-se presentes majoritariamente em determinadas frações. A fração 6, por exemplo, concentrou principalmente catequina, já a 7 procianidina B1. Na fração 9 foi identificada epicatequina-*O*-galato e outro composto não identificado em  $tR=70$  minutos, o qual não apresentou atividade antioxidante contra o radical livre ABTS, como visto anteriormente (item 4.3.4.3). Além desses compostos, epicatequina, polidatina (*piceid acid*) e resveratrol foram identificados em maior intensidade nas frações de engaço *Chenin Blanc*, quando comparado com o extrato bruto o que explica a maior atividade antioxidante observada para essas frações (Figura 28 A-F).

A maioria dos compostos identificados em engaço *Chenin Blanc* já foi encontrada em vinho tinto (VALLVERDÚ-QUERALT et al., 2015), indicando que embora uma grande quantidade de fitoquímicos com propriedades bioativas esteja presente no vinho, ainda muitos polifenóis são descartados diariamente ao redor do mundo durante os processos de vinificação.

No extrato bruto de semente de açaí, três isômeros de procianidina dímera tipo B, catequina, epicatequina e procianidina trímera tipo B ( $m/z$  865) foram os compostos fenólicos majoritários identificados. No extrato purificado foi observado aumento na intensidade do sinal de quatro isômeros de procianidina dímera tipo B, além de catequina e epicatequina (Figura 29 A-B). Muitos desses compostos já foram identificados em suco de açaí (DIAS et al., 2013), mas nas sementes foram encontrados diferentes compostos como o resveratrol –

relatado em semente de açaí pela primeira vez. Resveratrol já havia sido identificado em polpa/casca de açaí, em baixa concentração (SCHAUSS et al., 2006), como também verificado nas sementes.

Extratos de semente de açaí foram revelados como fontes ricas e diversas de procianidinas poliméricas, como já observado para a polpa de açaí (SCHAUSS et al., 2006). No extrato bruto foram identificados doze isômeros de procianidina trímica tipo B e seis isômeros de procianidina dímera tipo B, enquanto que no extrato concentrado quatro e seis procianidinas foram identificadas, respectivamente. Embora em menor número, as procianidinas estão presentes em maior concentração no extrato concentrado do que no bruto (Figura 29 A-B). Na fração 6, catequina e epicatequina demonstraram ser os compostos predominantes e, embora tenham sido identificados outros polifenóis nessa fração, os flavonóis apresentam-se altamente concentrados em relação aos demais, caracterizando a fração 6 como rica em catequina e epicatequina com alto grau de pureza. Já na fração 7, os dímeros de procianidina tipo B foram concentrados e apresentaram-se de forma majoritária. Catequina e epicatequina também foram identificadas. Na fração 8, algumas procianidinas poliméricas se destacaram (Figura 29 C-E).

Procianidinas possuem elevada atividade antioxidante e podem ter contribuído, juntamente com catequina e epicatequina, para a atividade antioxidante global observada para os extratos de semente de açaí. As sementes representam cerca de 90% do fruto do açaí e considerando a produção brasileira, foram geradas em 2011, cerca de 193 mil toneladas de sementes, que foram descartadas, em sua maioria, ao meio ambiente.

Mesmo com a perda de alguns polifenóis durante o processo de concentração com a resina XAD<sup>®</sup>-2, o aumento da concentração de alguns compostos resultou em maior atividade antioxidante. Além da concentração, o perfil de compostos fenólicos em cada extrato pode influenciar a resposta antioxidante. De fato, o potencial antioxidante de compostos fenólicos irá depender de sua estrutura e grupos funcionais disponíveis os quais irão determinar sua habilidade em doar um hidrogênio ou elétron, quelar metais, entre outros mecanismos para evitar a oxidação. Dessa forma, o número e arranjo dos grupos hidroxila livres, a estrutura orto-3,4-dihidroxi (em flavonoides) para a deslocalização de elétrons, moléculas poliméricas, como as procianidinas que contêm mais grupos -OH, contribuem para aumentar a atividade antioxidante. Por outro lado, a glicosilação diminui a disponibilidade de grupos funcionais, reduzindo o potencial antioxidante (FERNANDEZ-PANCHON et al., 2008; KUMAR et al., 2015).



Tabela 4 – Compostos identificados em engaçó *Chenin Blanc* (extratos bruto, concentrado e frações) por UHPLC-ESI-LTQ-MS/MS

Compostos		tr (min)	[M-H] <sup>-</sup>	MS/MS íons	Erro (ppm)	Massa molecular	Fórmula molecular
<b>EXTRATO BRUTO</b>							
1	Gallic acid *	8,59	169	125 (100)	0,93333	170,01425	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>
2	Procyanidin trimer type B (isomer 1)	10,52	865	695 (100), 575 (30), 577 (30), 739 (15)	-0,62328	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
3	Protocatechuic acid- <i>O</i> -hexoside	10,95	315	153 (100), 109 (10)	0,15660	316,07216	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>
4	Protocatechuic acid	12,72	153	138 (100), 109 (45)	0,10583	154,01933	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
5	Caffeic acid (isomer 1)	17,27	179	135 (100)	0,71753	180,03498	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
6	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid (isomer 1)	21,44	137	93 (100)	1,53502	138,02442	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
7	<b>Procyanidin dimer type B (isomer 1) *</b>	23,81	577	425 (100), 407 (53), 451 (51), 289 (35), 559 (15)	1,02721	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
8	Procyanidin dimer type B (isomer 2)	24,37	577	425 (100), 407 (53), 451 (51), 289 (35), 559 (15)	0,39267	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
9	Coumaric acid (isomer 1)	25,18	163	119 (100)	-0,36105	164,04007	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
10	Caffeic acid (isomer 2)	27,29	179	135 (100), 164 (90)	4,55277	180,03498	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
11	<b>Catechin *</b>	27,68	289	245 (100), 205 (40), 179 (15)	3,11674	290,07176	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
12	Procyanidin trimer type B (isomer 2)	27,76	865	695 (100), 577 (55), 739 (50), 407 (25), 847 (20), 287 (20)	2,69231	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
13	Procyanidin trimer type B (isomer 3)	28,88	865	695 (100), 577 (50), 739 (50), 407 (30), 847 (20), 287 (20)	2,05741	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
14	Procyanidin dimer type B (isomer 3)	32,28	577	425 (100), 407 (53), 451 (51), 289 (35), 559 (15)	1,13296	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
15	Procyanidin dimer type B (isomer 4)	33,39	577	425 (100), 407 (53), 451 (51), 289 (35), 559 (15)	0,81570	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
16	Epicatechin *	35,97	289	245 (100), 205 (40), 179 (15)	-0,15595	290,07176	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
17	Procyanidin trimer type B (isomer 4)	38,55	865	695 (100), 577 (45), 739 (35), 407 (25), 847 (20), 287 (20)	0,15271	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
18	Procyanidin trimer type B (isomer 5)	39,45	865	695 (100), 739 (45), 577 (40), 407 (15), 847 (15), 287 (15)	-0,12947	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
19	Procyanidin dimer type B (isomer 5)	41,73	577	425 (100), 407 (53), 451 (51), 289 (35), 559 (15)	-0,66488	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
20	Coumaric acid (isomer 2)	41,82	163	119 (100)	1,22997	164,04007	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
21	Myricetin- <i>O</i> -hexoside	47,67	479	316 (100), 317 (50)	-0,41227	480,08311	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>
22	Resveratrol (isomer 1)	49,73	227	185 (100), 157 (40)	-1,48793	228,07137	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>
23	Piceid acid (isomer 1)	49,86	389	227 (100)	-1,05759	390,12419	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>
24	Epicatechin- <i>O</i> -gallate	49,90	441	289 (100), 169 (25), 331 (20)	-0,80023	442,08272	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>
25	Quercetin	54,29	301	179 (100), 151 (90), 301 (35)	-0,62817	302,03538	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>
26	Quercetin- <i>O</i> -hexoside	55,40	463	301 (100)	-0,07318	464,08820	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>
27	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid (isomer 2)	57,90	137	93 (100)	-0,02399	138,02442	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
28	Naringenin (isomer 1)	58,84	271	151 (100), 177 (20)	0,52978	272,06120	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
29	Piceid acid (isomer 2)	60,09	389	227 (100)	0,35409	390,12419	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>
30	Quercetin- <i>O</i> -rhamanoside	60,73	447	301 (100), 285 (30), 284 (20)	-0,39240	448,09328	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>
31	Resveratrol (isomer 2) *	64,09	227	185 (100), 227 (85), 183 (45), 159 (30), 143 (15)	1,53598	228,07137	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>
32	Naringenin (isomer 2)	71,18	271	151 (100), 271 (30), 225 (15), 177 (15)	1,20529	272,06120	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
<b>EXTRATO PURIFICADO (XAD®-2)</b>							
1	Gallic acid *	8,72	169	125 (100)	-0,15004	170,01425	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>
2	Procyanidin trimer type B (isomer 1)	10,48	865	695 (100), 575 (30), 577 (30), 739 (15)	-0,76437	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
3	<b>Protocatechuic acid-<i>O</i>-hexoside</b>	10,91	315	153 (100), 109 (10)	-1,00571	316,07216	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>
4	Caffeic acid (isomer 1)	15,17	179	135 (100)	-0,56089	180,03498	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
5	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid (isomer 1)	21,62	137	93 (100)	0,19872	138,02442	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
6	<b>Procyanidin dimer type B (isomer 1) *</b>	23,64	577	425 (100), 407 (53), 451 (51), 289 (35), 559 (15)	1,02721	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>

(continua)

Tabela 4 – Compostos identificados em engaçõ *Chenin Blanc* (extratos bruto, concentrado e frações) por UHPLC-ESI-LTQ-MS/MS

		(continuaçõ)					
Compostos	tr (min)	[M-H] <sup>+</sup>	MS/MS íons	Erro (ppm)	Massa molecular	Fórmula molecular	
7	Coumaric acid (isomer 1)	25,40	163	119 (100)	0,94920	164,04007	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
8	Caffeic acid (isomer 2)	27,20	179	135 (100), 164 (90)	0,63231	180,03498	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
9	<b>Catechin *</b>	27,22	289	245 (100), 205 (40), 179 (15)	0,16076	290,07176	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
10	Procyanidin dimer type B (isomer 4)	33,40	577	425 (100), 407 (53), 451 (51), 289 (35), 559 (15)	-0,77063	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
11	<b>Epicatechin *</b>	35,89	289	245 (100), 205 (40), 179 (15)	-0,36709	290,07176	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
12	Procyanidin trimer type B (isomer 4)	38,55	865	695 (100), 577 (45), 739 (35), 407 (25), 847 (20), 287 (20)	-0,55274	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
13	Procyanidin trimer type B (isomer 5)	39,29	865	695 (100), 739 (45), 577 (40), 407 (15), 847 (15), 287 (15)	-1,04655	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
14	Procyanidin dimer type B (isomer 5)	41,61	577	425 (100), 407 (53), 451 (51), 289 (35), 559 (15)	-0,34761	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
15	Coumaric acid (isomer 2)	41,62	163	119 (100)	0,01331	164,04007	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
16	Myricetin- <i>O</i> -hexoside	47,75	479	316 (100), 317 (50)	-0,53967	480,08311	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>
17	Resveratrol (isomer 1)	49,69	227	185 (100), 157 (40)	0,59521	228,07137	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>
18	Piceid acid (isomer 1)	49,56	389	227 (100)	-0,11647	390,12419	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>
19	<b>Epicatechin-<i>O</i>-gallate</b>	49,73	441	289 (100), 169 (25), 331 (20)	-0,03916	442,08272	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>
20	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid (isomer 2)	57,34	137	93 (100)	0,53280	138,02442	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
21	Naringenin (isomer 1)	58,89	271	151 (100), 177 (20)	0,51548	272,06120	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
22	Piceid acid (isomer 2)	59,92	389	227 (100)	-0,66546	390,12419	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>
23	Quercetin- <i>O</i> -rhamanoside	60,57	447	301 (100), 285 (30), 284 (20)	0,56321	448,09328	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>
24	<b>Resveratrol (isomer 2)*</b>	64,05	227	185 (100), 227 (85), 183 (45), 159 (30), 143 (15)	1,19999	228,07137	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>
<b>FRAÇÃO 6</b>							
1	Procyanidin trimer type B (isomer 1)	11,64	865	695 (100), 575 (30), 577 (30), 739 (15)	-3,37454	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
2	Caffeic acid (isomer 1)	15,77	179	135 (100)	-4,22571	180,03498	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
3	<b>Procyanidin dimer type B (isomer 1) *</b>	23,21	577	425 (100), 407 (53), 451 (51), 289 (35), 559 (15)	2,19051	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
4	<b>Catechin *</b>	26,65	289	245 (100), 205 (40), 179 (15)	1,84989	290,07176	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
5	Caffeic acid (isomer 2)	26,78	179	135 (100), 164 (90)	2,76300	180,03498	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
6	Procyanidin trimer type B (isomer 2)	27,38	865	695 (100), 577 (55), 739 (50), 407 (25), 847 (20), 287 (20)	2,05741	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
7	Procyanidin dimer type B (isomer 3)	31,63	577	425 (100), 407 (53), 451 (51), 289 (35), 559 (15)	-4,68361	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
8	<b>Epicatechin *</b>	35,07	289	245 (100), 205 (40), 179 (15)	-2,79523	290,07176	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
9	Procyanidin trimer type B (isomer 5)	38,64	865	695 (100), 577 (45), 739 (35), 407 (25), 847 (20), 287 (20)	-2,66909	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
10	Myricetin- <i>O</i> -hexoside	47,15	479	316 (100), 317 (50)	-2,76917	480,08311	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>
11	<b>Piceid acid (isomer 1)</b>	49,00	389	227 (100)	-2,86140	390,12419	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>
12	Resveratrol (isomer 1) *	49,00	227	185 (100), 157 (40)	-2,83190	228,07137	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>
13	Quercetin	53,21	301	179 (100), 151 (90), 301 (35)	-2,95982	302,03538	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>
14	Quercetin- <i>O</i> -hexoside	54,37	463	301 (100)	-2,64329	464,08820	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>
15	Naringenin (isomer 1)	57,94	271	151 (100), 177 (20)	-3,18556	272,06120	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
16	Piceid acid (isomer 2)	59,40	389	227 (100)	0,74622	390,12419	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>
17	Quercetin- <i>O</i> -rhamanoside	59,88	447	301 (100), 285 (30), 284 (20)	0,42669	448,09328	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>
18	Resveratrol (isomer 2) *	63,02	227	185 (100), 227 (85), 183 (45), 159 (30), 143 (15)	0,79680	228,07137	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>
19	Naringenin (isomer 4)	70,07	271	151 (100), 271 (30), 225 (15), 177 (15)	0,41719	272,06120	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
<b>FRAÇÃO 7</b>							
1	Gallic acid *	8,55	169	125 (100)	-1,77510	170,01425	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>

Tabela 4 – Compostos identificados em engaçó *Chenin Blanc* (extratos bruto, concentrado e frações) por UHPLC-ESI-LTQ-MS/MS

		(continuação)					
Compostos	tr (min)	[M-H] <sup>+</sup>	MS/MS íons	Erro (ppm)	Massa molecular	Fórmula molecular	
2	Procyanidin trimer type B (isomer 1)	10,31	865	695 (100), 575 (30), 577 (30), 739 (15)	-2,73963	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
3	Protocatechuic acid- <i>O</i> -hexoside	10,78	315	153 (100), 109 (10)	-3,52406	316,07216	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>
4	Caffeic acid (isomer 1)	14,83	179	135 (100)	-2,00977	180,03498	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
5	<b>Procyanidin dimer type B (isomer 1) *</b>	23,12	577	425 (100), 407 (53), 451 (51), 289 (35), 559 (15)	-1,19366	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
6	<b>Procyanidin dimer type B (isomer 2) *</b>	23,81	577	425 (100), 407 (53), 451 (51), 289 (35), 559 (15)	-1,19366	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
7	Caffeic acid (isomer 2)	26,56	179	135 (100), 164 (90)	-1,41317	180,03498	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
8	<b>Catechin *</b>	26,60	289	245 (100), 205 (40), 179 (15)	-2,47852	290,07176	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
9	Procyanidin trimer type B (isomer 2)	27,25	865	695 (100), 577 (55), 739 (50), 407 (25), 847 (20), 287 (20)	-2,45745	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
10	Procyanidin dimer type B (isomer 3)	31,59	577	425 (100), 407 (53), 451 (51), 289 (35), 559 (15)	-2,35697	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
11	<b>Epicatechin *</b>	35,24	289	245 (100), 205 (40), 179 (15)	-2,90081	290,07176	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
12	Procyanidin trimer type B (isomer 5)	38,90	865	695 (100), 577 (50), 739 (50), 407 (30), 847 (20), 287 (20)	-2,38691	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
13	Procyanidin dimer type B (isomer 5)	41,09	577	425 (100), 407 (53), 451 (51), 289 (35), 559 (15)	-3,20302	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
14	Myricetin- <i>O</i> -hexoside	47,24	479	316 (100), 317 (50)	-2,25957	480,08311	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>
15	Piceid acid (isomer 1)	49,09	389	227 (100)	-2,54769	390,12419	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>
16	Epicatechin- <i>O</i> -gallate	49,17	441	289 (100), 169 (25), 331 (20)	-1,76886	442,08272	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>
17	Quercetin- <i>O</i> -hexoside	54,85	463	301 (100)	-1,91838	464,08820	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>
18	Quercetin- <i>O</i> -rhamanoside	60,14	447	301 (100), 285 (30), 284 (20)	-2,71317	448,09328	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>
19	<b>Resveratrol (isomer 2)</b>	63,40	227	185 (100), 227 (85), 183 (45), 159 (30), 143 (15)	-1,35354	228,07137	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>
20	Naringenin (isomer 2)	70,41	271	151 (100), 271 (30), 225 (15), 177 (15)	-2,17228	272,06120	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
<b>FRAÇÃO 8</b>							
1	Gallic acid *	8,55	169	125 (100)	-2,67792	170,01425	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>
2	Procyanidin trimer type B (isomer 1)	10,44	865	695 (100), 575 (30), 577 (30), 739 (15)	-2,88072	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
3	Protocatechuic acid- <i>O</i> -hexoside	10,74	315	153 (100), 109 (10)	-2,84604	316,07216	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>
4	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid (isomer 1)	21,02	137	93 (100)	-2,36252	138,02442	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
5	<b>Procyanidin dimer type B (isomer 2) *</b>	23,94	577	425 (100), 407 (53), 451 (51), 289 (35), 559 (15)	-1,82819	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
6	Procyanidin trimer type B (isomer 2)	25,19	865	695 (100), 577 (55), 739 (50), 407 (25), 847 (20), 287 (20)	-3,16290	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
7	<b>Catechin *</b>	26,86	289	245 (100), 205 (40), 179 (15)	-2,68966	290,07176	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
8	Caffeic acid (isomer 2)	26,90	179	135 (100), 164 (90)	-1,58362	180,03498	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
9	Procyanidin trimer type B (isomer 2)	27,46	865	695 (100), 577 (55), 739 (50), 407 (25), 847 (20), 287 (20)	-3,09236	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
10	Procyanidin trimer type B (isomer 3)	28,62	865	695 (100), 577 (50), 739 (50), 407 (30), 847 (20), 287 (20)	-2,10473	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
11	Procyanidin dimer type B (isomer 3)	29,74	577	425 (100), 407 (53), 451 (51), 289 (35), 559 (15)	-1,19366	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
12	Epicatechin *	35,24	289	245 (100), 205 (40), 179 (15)	-2,68966	290,07176	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
13	Procyanidin trimer type B (isomer 4)	38,04	865	695 (100), 739 (45), 577 (40), 407 (15), 847 (15), 287 (15)	-3,02181	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
14	<b>Procyanidin dimer type B (isomer 5) *</b>	41,18	577	425 (100), 407 (53), 451 (51), 289 (35), 559 (15)	1,97900	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
15	Myricetin- <i>O</i> -hexoside	47,15	479	316 (100), 317 (50)	2,51792	480,08311	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>
16	Piceid acid (isomer 1)	49,04	389	227 (100)	-1,92028	390,12419	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>
17	Epicatechin- <i>O</i> -gallate	49,22	441	289 (100), 169 (25), 331 (20)	-1,97643	442,08272	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>
18	Quercetin	53,52	301	179 (100), 151 (90), 301 (35)	-2,25018	302,03538	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>
19	Quercetin- <i>O</i> -hexoside	54,63	463	301 (100)	-1,72068	464,08820	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>
20	Piceid acid (isomer 2)	59,71	389	227 (100)	-1,05759	390,12419	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>

Tabela 4 – Compostos identificados em engaçó *Chenin Blanc* (extratos bruto, concentrado e frações) por UHPLC-ESI-LTQ-MS/MS

		(conclusão)					
Compostos	tr (min)	[M-H] <sup>-</sup>	MS/MS íons	Erro (ppm)	Massa molecular	Fórmula molecular	
21	Quercetin- <i>O</i> -rhamanoside	60,09	447	301 (100), 285 (30), 284 (20)	-2,50840	448,09328	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>
<b>22</b>	<b>Resveratrol (isomer 2)</b>	63,49	227	185 (100), 227 (85), 183 (45), 159 (30), 143 (15)	-0,74875	228,07137	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>
23	Naringenin (isomer 4)	70,50	271	151 (100), 271 (30), 225 (15), 177 (15)	-1,94711	272,06120	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
<b>FRAÇÃO 9</b>							
1	Gallic acid *	8,55	169	125 (100)	-1,41398	170,01425	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>
2	Procyanidin dimer type B (isomer 1) *	24,33	577	425 (100), 407 (53), 451 (51), 289 (35), 559 (15)	-0,24186	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
3	Procyanidin trimer type B (isomer 2)	26,69	865	695 (100), 577 (50), 739 (50), 407 (30), 847 (20), 287 (20)	-1,68146	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
4	Catechin *	27,16	289	245 (100), 205 (40), 179 (15)	-2,16180	290,07176	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
5	Procyanidin trimer type B (isomer 3)	28,93	865	695 (100), 577 (45), 739 (35), 407 (25), 847 (20), 287 (20)	-2,59854	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
6	Procyanidin dimer type B (isomer 4)	33,31	577	425 (100), 407 (53), 451 (51), 289 (35), 559 (15)	-1,61668	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
7	Epicatechin *	35,80	289	245 (100), 205 (40), 179 (15)	-1,95066	290,07176	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
8	Procyanidin trimer type B (isomer 5)	38,38	865	695 (100), 739 (45), 577 (40), 407 (15), 847 (15), 287 (15)	-1,68146	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
9	Procyanidin dimer type B (isomer 5)	41,65	577	425 (100), 407 (53), 451 (51), 289 (35), 559 (15)	-2,35697	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
<b>10</b>	<b>Epicatechin-<i>O</i>-gallate</b>	49,52	441	289 (100), 169 (25), 331 (20)	-1,63048	442,08272	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>
11	Quercetin	52,31	301	179 (100), 151 (90), 301 (35)	0,18283	302,03538	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>
12	Quercetin- <i>O</i> -hexoside	56,31	463	301 (100)	0,58583	464,0882	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>
13	Resveratrol (isomer 2)	63,79	227	185 (100), 227 (85), 183 (45), 159 (30), 143 (15)	-1,08474	228,07137	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>

\* Identificação também foi realizada pela análise de padrões

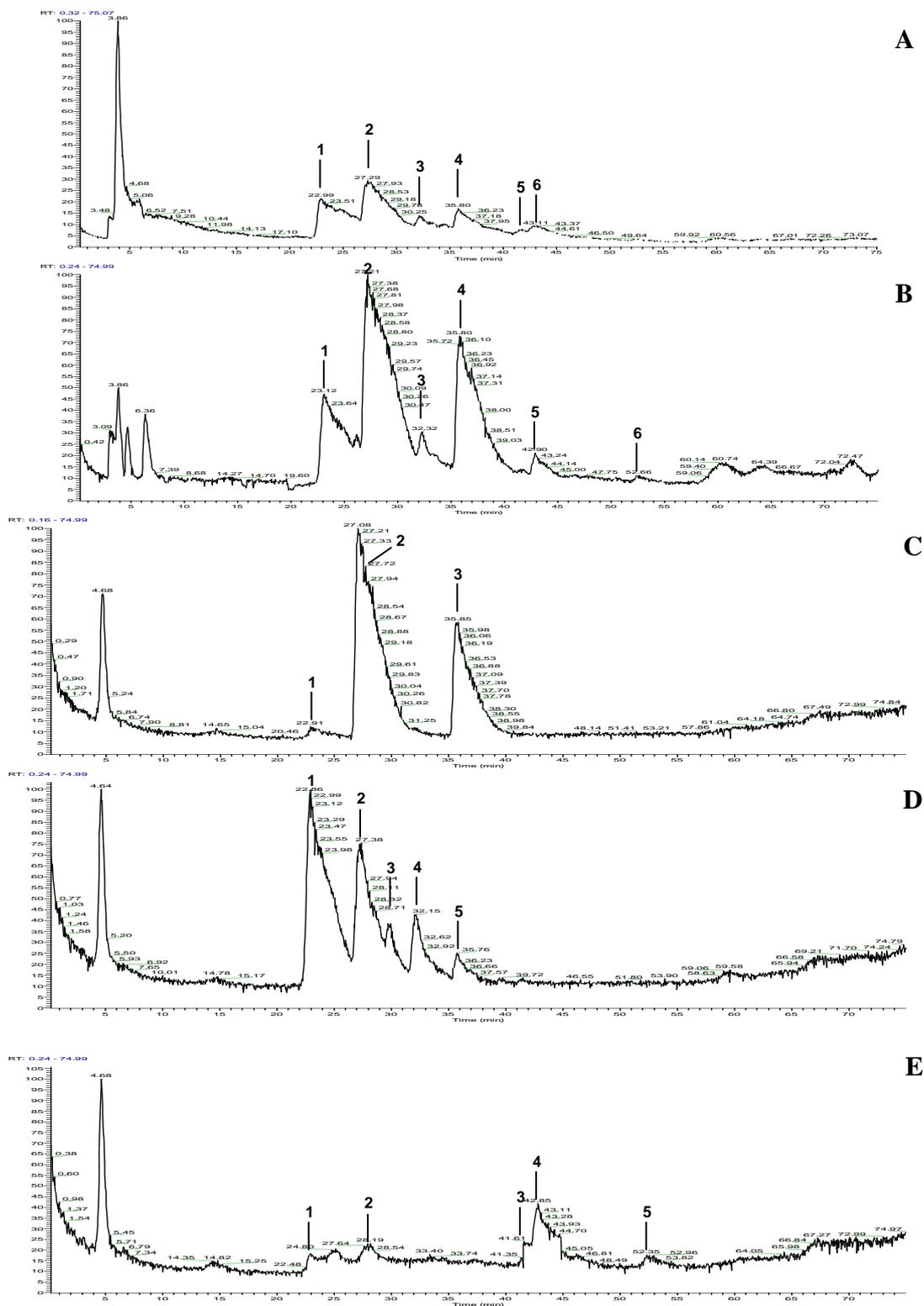


Figura 29 – Cromatogramas dos extratos bruto (A), concentrado (B) e frações bioativas, 6 (C), 7 (D) e 8 (E) de semente de açai obtidos por UHPLC-ESI-LTQ-MS. A indicação dos compostos majoritários identificados estão marcados em negrito na Tabela 5

Tabela 5 – Compostos identificados em semente de açaí (extratos bruto, concentrado e frações) por UHPLC-ESI-LTQ-MS/MS

(continua)

Compostos	tr (min)	[M-H]	MS/MS íons	Erro (ppm)	Massa molecular	Fórmula Molecular	
<b>EXTRATO BRUTO</b>							
1	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid (isomer 1)	9,23	137	93 (100)	0,42144	138,02442	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
2	Procyanidin trimer type B (isomer 1)	10,39	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	0,01162	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
3	Vanillic acid (isomer 1)	11,81	167	152 (100), 123 (95)	-0,69253	168,03498	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
4	Vanillic acid (isomer 2)	13,19	167	152 (100), 123 (95)	0,22098	168,03498	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
5	Procyanidin trimer type B (isomer 2)	13,40	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-0,05893	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
6	Procyanidin trimer type B (isomer 3)	18,69	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-2,95127	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
7	Coumaric acid	20,50	163	119 (100)	0,01331	164,04007	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
8	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid (isomer 2)	21,40	137	93 (100)	0,64416	138,02442	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
9	<b>Procyanidin dimer type B (isomer 1) *</b>	22,95	577	425 (100), 407 (53), 451 (45), 289 (35), 559 (15)	0,39267	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
10	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid (isomer 3)	23,29	137	93 (100)	0,64416	138,02442	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
11	Protocatechuic acid (isomer 1)	24,08	153	109 (100)	1,70132	154,01933	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
12	Procyanidin trimer type B (isomer 4)	23,94	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	0,29380	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
13	Ferulic acid	26,08	193	149 (100), 178 (65), 134 (20)	0,61467	194,05063	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>
14	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid (isomer 4)	27,20	137	93 (100)	1,08959	138,02442	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
15	<b>Catechin *</b>	27,20	289	245 (100), 205 (40), 179 (15)	0,37190	290,07176	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
16	Procyanidin trimer type B (isomer 5)	28,06	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-0,34110	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
17	Caffeic acid (isomer 1)	28,49	179	135 (100), 164 (80)	0,80276	180,03498	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
18	(+)-dihydrokaempferol (isomer 1)	28,66	287	259 (100), 243 (45), 125 (43)	1,41862	288,05611	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
19	Procyanidin dimer type B (isomer 2)	29,82	577	425 (100), 407 (60), 451 (58), 289 (40), 559 (20)	0,70994	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
20	Procyanidin trimer type B (isomer 6)	29,95	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-0,83492	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
21	Procyanidin trimer type B (isomer 7)	31,20	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-2,03418	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
22	Procyanidin trimer type B (isomer 8)	32,02	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-4,07999	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
23	<b>Procyanidin dimer type B (isomer 3)</b>	32,19	577	425 (100), 407 (50), 451 (45), 289 (30), 559 (15)	-0,13610	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
24	Vanillic acid (isomer 3)	33,44	167	123 (100)	-0,05308	168,03498	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
26	Eriodictyol- <i>O</i> -hexoside (isomer 1)	35,37	449	287 (100), 259 (30), 269 (28)	-0,37849	450,10893	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>
27	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid (isomer 5)	35,76	137	93 (100), 96 (98)	0,75551	138,02442	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
28	<b>Epicatechin *</b>	35,80	289	245 (100), 205 (40), 179 (15)	0,26633	290,07176	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
29	(+)-dihydrokaempferol (isomer 2)	36,75	287	259 (100), 243 (50), 125 (45)	0,46181	288,05611	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
30	Caffeic acid (isomer 2)	36,83	179	135 (100), 164 (60)	-0,04952	180,03498	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
31	Procyanidin trimer type B (isomer 9)	37,35	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-1,61091	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
32	Protocatechuic acid (isomer 2)	38,12	153	109 (100)	-0,09360	154,01933	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
33	(+)-dihydrokaempferol (isomer 3)	39,11	287	125 (100), 259 (50), 243 (20)	-0,49500	288,05611	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
34	Procyanidin trimer type B (isomer 10)	39,58	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-0,90546	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
35	<b>Procyanidin trimer type B (isomer 11)</b>	41,52	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-1,82255	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
36	Procyanidin dimer type B (isomer 4)	41,78	577	425 (100), 407 (75), 451 (65), 289 (45), 559 (25)	-0,43241	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
37	<b>Procyanidin dimer type B (isomer 5)</b>	42,76	577	425 (100), 407 (70), 451 (75), 289 (45), 559 (20)	-1,08790	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
38	Procyanidin trimer type B (isomer 12)	42,89	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-1,89309	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
39	Apigenin 6,8-di- <i>C</i> -hexoside (isomer 1)	45,82	593	473 (100), 431 (80), 311 (75)	-1,04449	594,15119	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>
40	Apigenin 6- <i>C</i> -pentoside-8- <i>C</i> -hexoside	46,50	563	443 (100), 473 (80), 503 (30), 383 (28)	-0,87348	564,14063	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>

Tabela 5 – Compostos identificados em semente de açaí (extratos bruto, concentrado e frações) por UHPLC-ESI-LTQ-MS/MS

							(continuação)
Compostos	tr (min)	[M-H]-	MS/MS íons	Erro (ppm)	Massa molecular	Fórmula Molecular	
41 Taxifolin deoxyhexose (isomer 2)	46,59	449	269 (100), 151 (10)	-0,51439	450,10893	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	
42 Vanillic acid (isomer 4)	47,67	167	123 (100)	0,40368	168,03498	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	
43 Chrysoeriol	48,14	299	284 (100)	-0,78127	300,05611	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	
44 Apigenin 6,8-di- <i>C</i> -hexoside (isomer 2)	49,43	593	413 (100), 473 (95)	-0,01549	594,15119	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	
45 Procyanidin dimer type B (isomer 6)	52,35	577	425 (100), 407 (60), 451 (70), 289 (40), 559 (20)	-0,66488	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	
46 Rutin	52,65	609	301 (100)	-2,18746	610,14611	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	
47 Vitexin	54,20	431	311 (100), 341 (25), 413 (10)	-0,52294	432,09837	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	
48 Protocatechuic acid (isomer 3)	54,97	153	109 (100)	0,00612	154,01933	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	
49 Quercetin- <i>O</i> -hexoside (isomer 1)	55,23	463	301 (100)	0,45403	464,08820	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	
50 Naringenin (isomer 1)	58,97	271	151 (100), 177 (20), 225 (15), 271 (15)	-0,93384	272,06120	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	
51 Scoparin	59,70	461	299 (100), 341 (85), 371 (20)	-0,96428	462,10893	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	
52 Isovitexin	60,26	431	269 (100), 311 (40), 341 (5), 413 (5)	-0,31057	432,09837	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	
53 (+)-dihydrokaempferol (isomer 4)	60,39	287	259 (100), 243 (20), 125 (15)	-0,70762	288,05611	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	
54 Eriodictyol- <i>O</i> -hexoside (isomer 2)	60,61	449	287 (100)	-0,51439	450,10893	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	
55 Quercetin- <i>O</i> -hexoside (isomer 2)	62,80	463	301 (100)	-1,45708	464,08820	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	
56 Kaempferol 3- <i>O</i> -glucoside	63,36	447	285 (100), 314 (40)	-1,07498	448,09328	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	
57 Resveratrol *	63,96	227	185 (100)	-1,08474	228,07137	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	
58 Naringenin (isomer 2)	71,09	271	151 (100), 177 (20), 225 (5), 271 (5)	-0,37091	272,06120	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	
<b>EXTRATO PURIFICADO (XAD<sup>®</sup>-2)</b>							
1 Vanillic acid (isomer 1)	11,68	167	152 (100), 123 (95)	0,03828	168,03498	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	
2 Vanillic acid (isomer 2)	13,36	167	152 (100), 123 (95)	0,31233	168,03498	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	
3 Coumaric acid	20,80	163	119 (100)	-0,36105	164,04007	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	
4 <i>p</i> -hydroxybenzoic acid (isomer 2)	21,70	137	93 (100)	-0,02399	138,02442	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	
5 <b>Procyanidin dimer type B (isomer 1) *</b>	23,08	577	425 (100), 407 (53), 451 (45), 289 (35), 559 (15)	0,92145	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	
6 Procyanidin trimer type B (isomer 4)	24,02	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	0,08216	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	
7 Ferulic acid	26,30	193	149 (100), 178 (65), 134 (20)	0,45659	194,05063	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	
8 <i>p</i> -hydroxybenzoic acid (isomer 4)	27,08	137	93 (100)	1,53502	138,02442	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	
9 <b>Catechin *</b>	27,25	289	245 (100), 205 (40), 179 (15)	0,58304	290,07176	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	
10 Caffeic acid (isomer 1)	28,37	179	135 (100), 164 (80)	1,48458	180,03498	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	
11 Procyanidin dimer type B (isomer 2)	29,87	577	425 (100), 407 (60), 451 (58), 289 (40), 559 (20)	-0,24186	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	
12 <b>Procyanidin dimer type B (isomer 3)</b>	32,24	577	425 (100), 407 (50), 451 (45), 289 (30), 559 (15)	-0,03035	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	
13 Eriodictyol- <i>O</i> -hexoside (isomer 1)	35,33	449	287 (100), 259 (30), 269 (28)	-0,65029	450,10893	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	
14 <i>p</i> -hydroxybenzoic acid (isomer 5)	35,98	137	93 (100), 96 (98)	0,53280	138,02442	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	
15 <b>Epicatechin *</b>	35,98	289	245 (100), 205 (40), 179 (15)	0,16076	290,07176	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	
16 Caffeic acid (isomer 2)	35,89	179	135 (100), 164 (60)	-0,13475	180,03498	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	
17 Procyanidin trimer type B (isomer 9)	37,52	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-1,18764	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	
18 Procyanidin trimer type B (isomer 10)	39,63	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-1,18764	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	
19 Procyanidin trimer type B (isomer 11)	41,52	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-1,82255	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	
20 Procyanidin dimer type B (isomer 4)	41,69	577	425 (100), 407 (75), 451 (65), 289 (45), 559 (25)	-2,14546	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	
21 <b>Procyanidin dimer type B (isomer 5)</b>	42,85	577	425 (100), 407 (70), 451 (75), 289 (45), 559 (20)	-0,13610	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	

Tabela 5 – Compostos identificados em semente de açaí (extratos bruto, concentrado e frações) por UHPLC-ESI-LTQ-MS/MS

								(continuação)
Compostos	tr (min)	[M-H] <sup>-</sup>	MS/MS íons	Erro (ppm)	Massa molecular	Fórmula Molecular		
22 Apigenin 6- <i>C</i> -pentoside-8- <i>C</i> -hexoside	46,59	563	443 (100), 473 (80), 503 (30), 383 (28)	-0,43994	564,14063	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>		
23 Taxifolin deoxyhexose (isomer 2)	46,94	449	269 (100), 151 (10)	-0,51439	450,10893	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		
24 Vanillic acid (isomer 4)	47,75	167	123 (100)	0,49503	168,03498	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>		
26 Apigenin 6,8-di- <i>C</i> -hexoside (isomer 2)	49,30	593	413 (100), 473 (95)	-0,01549	594,15119	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>		
<b>27 Procyanidin dimer type B (isomer 6)</b>	52,48	577	425 (100), 407 (60), 451 (70), 289 (40), 559 (20)	-1,29941	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>		
28 Rutin	52,91	609	301 (100)	-1,18548	610,14611	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>		
29 Vitexin	54,42	431	311 (100), 341 (25), 413 (10)	-1,23084	432,09837	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>		
30 Quercetin- <i>O</i> -hexoside (isomer 1)	55,23	463	301 (100)	0,45403	464,08820	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>		
31 (+)-dihydrokaempferol (isomer 4)	60,14	287	259 (100), 243 (20), 125 (15)	-0,70762	288,05611	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>		
32 Kaempferol 3- <i>O</i> -glucoside	63,36	447	285 (100), 314 (40)	-0,80195	448,09328	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>		
33 Resveratrol *	64,05	227	185 (35), 143 (33)	-1,62233	228,07137	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>		
34 Naringenin (isomer 2)	70,93	271	151 (100), 177 (20), 225 (5), 271 (5)	-1,83452	272,06120	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>		
<b>FRAÇÃO 6</b>								
1 Procyanidin trimer type B (isomer 1)	10,31	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	0,08216	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>		
<b>2 Procyanidin dimer type B (isomer 1) *</b>	23,12	577	425 (100), 407 (53), 451 (45), 289 (35), 559 (15)	-0,98215	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>		
3 Procyanidin trimer type B (isomer 4)	23,94	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-1,61091	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>		
4 <i>p</i> -hydroxybenzoic acid (isomer 4)	27,08	137	93 (100)	0,97823	138,02442	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>		
<b>5 Catechin *</b>	27,08	289	245 (100), 205 (40), 179 (15)	0,26633	290,07176	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>		
6 (+)-dihydrokaempferol (isomer 1)	28,32	287	259 (100), 243 (45), 125 (43)	1,20600	288,05611	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>		
7 Procyanidin dimer type B (isomer 2)	29,87	577	425 (100), 407 (60), 451 (58), 289 (40), 559 (20)	-1,93395	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>		
8 Procyanidin dimer type B (isomer 3)	32,11	577	425 (100), 407 (50), 451 (45), 289 (30), 559 (15)	-0,66488	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>		
9 <i>p</i> -hydroxybenzoic acid (isomer 5)	35,59	137	93 (100)	0,31008	138,02442	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>		
10 Caffeic acid (isomer 2)	35,63	179	135 (100), 164 (60)	-0,56089	180,03498	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>		
<b>11 Epicatechin *</b>	35,72	289	245 (100), 205 (40), 179 (15)	-0,78938	290,07176	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>		
12 (+)-dihydrokaempferol (isomer 2)	36,53	287	259 (100), 243 (50), 125 (45)	-0,17606	288,05611	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>		
13 Procyanidin trimer type B (isomer 10)	39,54	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-1,46982	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>		
14 Vanillic acid (isomer 4)	47,15	167	152 (100), 123 (95)	-1,60604	168,03498	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>		
15 Rutin	52,44	609	301 (100)	-1,28568	610,14611	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>		
16 Vitexin	53,82	431	311 (100), 341 (25), 413 (10)	-2,64666	432,09837	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>		
17 Quercetin- <i>O</i> -hexoside (isomer 1)	54,89	463	301 (100)	-0,99578	464,08820	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>		
18 (+)-dihydrokaempferol (isomer 4)	59,92	287	125 (100), 259 (50), 243 (20)	-1,77075	288,05611	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>		
19 Scoparin	60,18	461	299 (100), 341 (85), 371 (20)	-1,16283	462,10893	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		
20 Isovitexin	60,22	431	269 (100), 311 (40), 341 (5), 413 (5)	-1,58480	432,09837	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>		
21 Eriodictyol- <i>O</i> -hexoside (isomer 2)	60,87	449	287 (100), 259 (30), 269 (28)	-2,41703	450,10893	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		
22 Kaempferol 3- <i>O</i> -glucoside	63,32	447	285 (100), 314 (40)	-1,75756	448,09328	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>		
23 Quercetin- <i>O</i> -hexoside (isomer 2)	64,26	463	301 (100)	-1,39118	464,08820	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>		
24 Naringenin (isomer 2)	70,97	271	151 (100), 177 (20), 225 (15), 271 (15)	-1,15901	272,06120	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>		
<b>FRAÇÃO 7</b>								
<b>1 Procyanidin dimer type B (isomer 1) *</b>	22,99	577	425 (100), 407 (53), 451 (45), 289 (35), 559 (15)	-0,24186	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>		
2 Procyanidin trimer type B (isomer 4)	23,98	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-1,04655	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>		

Tabela 5 – Compostos identificados em semente de açaí (extratos bruto, concentrado e frações) por UHPLC-ESI-LTQ-MS/MS

							(conclusão)
Compostos	tr (min)	[M-H]-	MS/MS íons	Erro (ppm)	Massa molecular	Fórmula Molecular	
3 Caffeic acid (isomer 1)	27,16	179	135 (100), 164 (80)	0,03571	180,03498	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	
<b>4 Catechin *</b>	27,29	289	245 (100), 205 (40), 179 (15)	-0,26152	290,07176	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	
5 <i>p</i> -hydroxybenzoic acid (isomer 4)	27,46	137	93 (100)	0,08737	138,02442	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	
6 (+)-dihydrokaempferol (isomer 1)	28,11	287	259 (100), 243 (45), 125 (43)	-0,28237	288,05611	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	
<b>7 Procyanidin dimer type B (isomer 2)</b>	29,91	577	425 (100), 407 (60), 451 (58), 289 (40), 559 (20)	-0,77063	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	
<b>8 Procyanidin dimer type B (isomer 3)</b>	32,15	577	425 (100), 407 (50), 451 (45), 289 (30), 559 (15)	-0,87639	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	
<b>9 Epicatechin *</b>	35,72	289	245 (100), 205 (40), 179 (15)	-1,10609	290,07176	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	
10 Caffeic acid (isomer 2)	35,85	179	135 (100), 164 (60)	-1,24271	180,03498	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	
11 (+)-dihydrokaempferol (isomer 2)	36,36	287	259 (100), 243 (50), 125 (45)	-1,55812	288,05611	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	
12 Procyanidin trimer type B (isomer 10)	39,54	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-1,54037	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	
13 (+)-dihydrokaempferol (isomer 4)	60,22	287	125 (100), 259 (50), 243 (20)	-1,55812	288,05611	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	
14 Eriodictyol- <i>O</i> -hexoside (isomer 2)	60,82	449	287 (100), 259 (30), 269 (28)	-1,32981	450,10893	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	
15 Kaempferol 3- <i>O</i> -glucoside	63,36	447	285 (100), 314 (40)	-1,48453	448,09328	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	
16 Resveratrol *	64,00	227	185 (100)	-1,35354	228,07137	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	
17 Naringenin (isomer 2)	70,71	271	151 (100), 177 (20), 225 (15), 271 (15)	-0,70866	272,06120	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	
<b>FRAÇÃO 8</b>							
<b>1 Procyanidin dimer type B (isomer 1) *</b>	22,95	577	425 (100), 407 (53), 451 (45), 289 (35), 559 (15)	-1,51092	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	
2 Procyanidin trimer type B (isomer 4)	23,94	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-1,25819	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	
3 Catechin *	27,33	289	245 (100), 205 (40), 179 (15)	-1,00052	290,07176	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	
<b>4 Procyanidin trimer type B (isomer 5)</b>	28,19	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-2,17527	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	
5 (+)-dihydrokaempferol (isomer 1)	28,54	287	259 (100), 243 (45), 125 (43)	-1,45181	288,05611	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	
6 Procyanidin dimer type B (isomer 2)	29,96	577	425 (100), 407 (60), 451 (58), 289 (40), 559 (20)	-0,34761	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	
7 Procyanidin trimer type B (isomer 6)	30,13	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-1,82255	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	
8 Procyanidin trimer type B (isomer 7)	31,25	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-1,89309	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	
9 Procyanidin dimer type B (isomer 4)	32,11	577	425 (100), 407 (50), 451 (45), 289 (30), 559 (15)	-0,55912	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	
10 Procyanidin trimer type B (isomer 8)	32,28	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-2,10473	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	
11 Epicatechin *	35,98	289	245 (100), 205 (40), 179 (15)	-1,21166	290,07176	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	
12 Procyanidin trimer type B (isomer 9)	37,22	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-0,83492	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	
13 Procyanidin trimer type B (isomer 10)	39,33	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-1,04655	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	
14 Procyanidin trimer type B (isomer 11)	41,44	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	-0,69383	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	
<b>15 Procyanidin dimer type B (isomer 4)</b>	41,74	577	425 (100), 407 (75), 451 (65), 289 (45), 559 (25)	3,98834	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	
<b>16 Procyanidin dimer type B (isomer 5)</b>	42,85	577	425 (100), 407 (70), 451 (75), 289 (45), 559 (20)	3,35381	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	
17 Procyanidin trimer type B (isomer 12)	43,03	865	695 (100), 739 (55), 577 (50), 407 (35), 287 (20), 847 (15)	2,90394	866,19854	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	
<b>18 Procyanidin dimer type B (isomer 6)</b>	52,44	577	425 (100), 407 (60), 451 (70), 289 (40), 559 (20)	-0,77063	578,13515	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	
19 Naringenin (isomer 1)	58,24	271	151 (100), 177 (20), 225 (15), 271 (15)	-0,70866	272,06120	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	
20 Quercetin- <i>O</i> -hexoside (isomer 2)	62,8	463	301 (100)	0,32223	464,08820	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	
21 Kaempferol 3- <i>O</i> -glucoside	63,66	447	285 (100), 314 (40)	-1,34801	448,09328	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	
22 Resveratrol *	63,92	227	185 (100)	-1,08474	228,07137	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	
23 Naringenin (isomer 2)	71,18	271	151 (100), 177 (20), 225 (5), 271 (5)	-1,27159	272,06120	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	

\* Identificação também foi realizada pela análise de padrões

#### 4.3.6 Quantificação dos principais compostos fenólicos identificados nos extratos e frações de engaço *Chenin Blanc* e semente de açaí por HPLC-DAD

Após a identificação e confirmação dos compostos fenólicos presentes nos extratos e frações de engaço *Chenin Blanc* e semente de açaí, por HPLC-DAD e UHPLC-ESI-LTQ-MS, os compostos majoritários foram quantificados e estão apresentados nas tabelas 6 (engaço) e 7 (semente).

Tabela 6 – Quantificação dos compostos fenólicos identificados no extrato bruto, concentrado e frações bioativas de engaço *Chenin Blanc*, por HPLC-DAD

Engaço <i>Chenin Blanc</i>	Compostos fenólicos ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )				
	Ácido gálico	Procianid. B1	Catequina	Epicatequina	Resveratrol
Bruto	0,15 $\pm$ 0,03	5,93 $\pm$ 0,58	4,11 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,02	nd
Concentrado XAD <sup>®</sup> -2	nd	12,55 $\pm$ 0,30	88,54 $\pm$ 0,98	7,20 $\pm$ 0,20	5,99 $\pm$ 0,12
Fração 6	nd	27,42 $\pm$ 5,89	376,23 $\pm$ 16,97	27,40 $\pm$ 0,95	nd
Fração 7	nd	165,52 $\pm$ 32,26	nd	2,46 $\pm$ 0,12	16,73 $\pm$ 0,60
Fração 8	nd	nd	nd	nd	nd
Fração 9	nd	nd	nd	nd	nd
Parâmetros de validação					
LOD ( $\mu\text{g}$ )	0,0052	0,0046	0,038	0,0087	0,012
LOQ ( $\mu\text{g}$ )	0,016	0,014	0,11	0,026	0,036
Linearidade (R <sup>2</sup> )	0,997	1,000	0,983	0,999	0,999

Legenda:

nd: não detectado; LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação

Resultados são médias de triplicatas  $\pm$  desvio padrão,  $p < 0,05$

No engaço, nota-se que o ácido gálico foi perdido durante o processo de concentração, já que não foi possível quantificá-lo nas frações seguintes (Tabela 6). A procianidina B1, por outro lado, foi concentrada na medida em que o fracionamento prosseguiu. A fração 7 concentrou em mais de seis vezes o teor de procianidina B1 encontrada na fração 6 que, por sua vez, apresentou o dobro do presente no extrato concentrado. Com o avançar do fracionamento, foi possível concentrar, na fração 7, quase vinte e oito vezes mais procianidina B1 do que o extrato original. A mesma tendência foi observada para a catequina, que se concentrou na fração 6. Para esse composto, o maior rendimento se deu durante a etapa de concentração com a XAD<sup>®</sup>-2, a qual permitiu aumentar em mais de vinte vezes o teor de catequina em relação ao extrato bruto. O teor de catequina foi ainda aumentado em quatro vezes na fração 6 em relação ao extrato concentrado alcançando, assim, um acréscimo de mais de noventa vezes em relação ao extrato bruto. A etapa de concentração também foi eficaz ao produzir um extrato com mais de quarenta vezes o teor inicial de epicatequina, a qual se apresentou em maior concentração também na fração 6, mas decresceu na fração 7. A fração 6 possui cento e sessenta vezes mais epicatequina do que o extrato bruto. Resveratrol

também foi identificado e quantificado no extrato concentrado e teve seu teor quase triplicado na fração 7.

Ao considerarmos a projeção de rendimento do extrato bruto (88,45 g), por exemplo, (Tabela 1, Capítulo 4) se teria cerca de 520 miligramas de procianidina B1, 360 miligramas de catequina e 15 miligramas de epicatequina, por quilo de engaço fresco. Levando em conta o montante de resíduos vinícolas gerados anualmente ao redor do mundo, cerca de 48 milhões de toneladas, teríamos 25 mil toneladas de procianidina B1, 17 mil toneladas de catequina e 700 toneladas de epicatequina que são descartadas.

Tabela 7 – Quantificação dos compostos fenólicos identificados no extrato bruto, concentrado e frações bioativas de semente de açaí, por HPLC-DAD

Semente de açaí	Compostos fenólicos ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )		
	Procianidina B1	Catequina	Epicatequina
Bruto	19,55 $\pm$ 1,88	12,54 $\pm$ 0,50	5,31 $\pm$ 0,27
Concentrado XAD <sup>®</sup> -2	45,37 $\pm$ 0,64	139,48 $\pm$ 1,38	40,46 $\pm$ 0,63
Fração 5	nd	23,57 $\pm$ 4,70	82,07 $\pm$ 2,93
Fração 6	5,50 $\pm$ 0,69	348,23 $\pm$ 29,36	113,31 $\pm$ 5,33
Fração 7	113,15 $\pm$ 13,17	86,09 $\pm$ 6,67	12,09 $\pm$ 0,53
Fração 8	nd	nd	nd
Parâmetros de validação			
LOD ( $\mu\text{g}$ )	0,0046	0,038	0,0087
LOQ ( $\mu\text{g}$ )	0,014	0,11	0,026
Linearidade ( $R^2$ )	1,000	0,983	0,999

Legenda:

nd: não detectado; LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação

Resultados são médias de triplicatas  $\pm$  desvio padrão,  $p < 0,05$

O processo de concentração do extrato da semente de açaí dobrou o teor de procianidina B1 e promoveu o aumento de onze vezes o teor de catequina, a qual se apresentou quase trinta vezes mais concentrada na fração 6 em relação ao extrato original (Tabela 7). A mesma tendência foi observada para a epicatequina. A purificação com XAD<sup>®</sup>-2 resultou em aumento de mais de sete vezes a concentração desse composto, o qual esteve quinze e vinte e uma vezes mais concentrado nas frações 5 e 6, respectivamente, em relação ao extrato bruto. Na fração 6, onde catequina e epicatequina foram isoladas, apenas pequena quantidade de procianidina B1 pôde ser quantificada, provavelmente proveniente da fração 7, na qual esse composto se concentrou em mais de cinco vezes em relação ao extrato bruto.

Considerando a produção brasileira de açaí e o percentual estimado de geração de resíduos durante o processamento, cerca de 90% (WYCOFF et al., 2015), se teria aproximadamente 193 mil toneladas de sementes acumuladas em 2011 e, com elas, 120 toneladas de catequina e 50 de epicatequina, as quais são inutilizadas.

Na sequência, um fluxograma geral do processo de obtenção das frações purificadas do engaço *Chenin Blanc* e semente de açaí está apresentado (Figura 30). Este fluxograma sumariza os ensaios químicos e de atividade antioxidante realizados ao longo da etapa deste estudo.

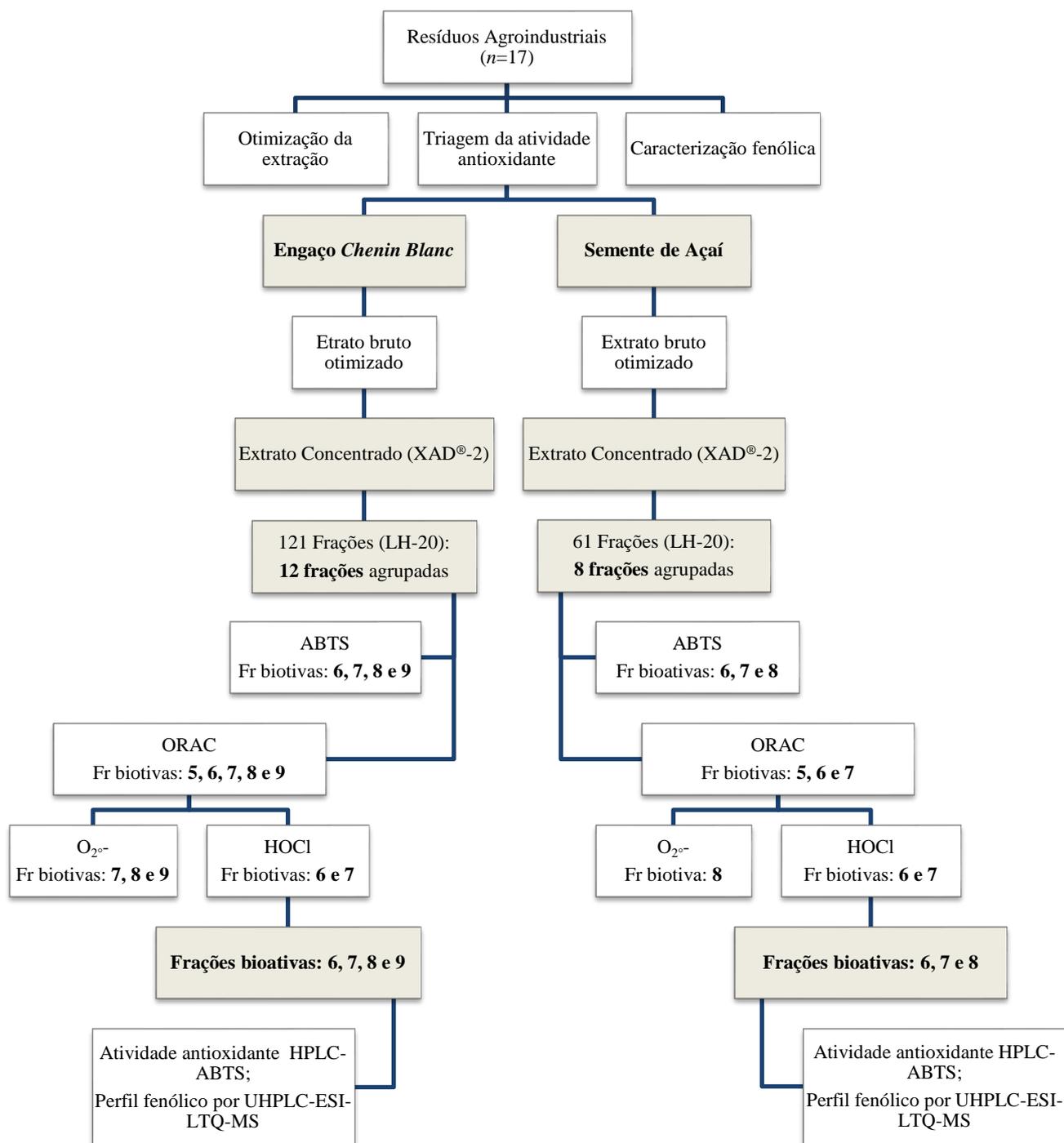


Figura 30 – Fluxograma do processo de fracionamento do engaço *Chenin Blanc* e semente de açaí indicando as frações de maior bioatividade em cada ensaio de medida da atividade antioxidante

#### **4.3.7 Atividade antiproliferativa, hepatotoxicidade e atividade anti-inflamatória de extratos brutos e concentrados de engaço *Chenin Blanc* e semente de açaí**

A bioatividade de extratos brutos e concentrados (XAD<sup>®</sup>-2) foi também avaliada. As frações não foram submetidas a esse ensaio devido a quantidade limitada de material disponível. Quatro linhagens tumorais humanas foram avaliadas: MCF-7 (carcinoma de mama), NCI-H460 (câncer de pulmão de células não-pequenas), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma de células hepáticas).

Os extratos da semente de açaí mostraram maior efeito inibitório do crescimento das diferentes linhagens celulares tumorais humanas do que o apresentado pelos extratos de engaço *Chenin Blanc* (Tabela 8). O extrato bruto de semente de açaí foi mais efetivo do que o extrato concentrado na inibição do crescimento celular, enquanto que para o engaço, o extrato concentrado apresentou os melhores resultados. A atividade antiproliferativa apresentada pelos extratos de engaço e açaí foi maior do que a observada para erva-mate (SOUZA et al., 2015), erva de Santa Maria – *Chenopodium ambrosioides* (BARROS et al., 2013) e cereja (BASTOS et al., 2015). Extrato bruto da semente de açaí se mostrou um forte inibidor de HepG2, responsável por carcinoma hepatocelular (8,54 µg/mL) ao se aproximar da inibição de crescimento celular apresentada pela elipticina, composto com reconhecida atividade antiproliferativa.

Além disso, as amostras demonstraram atividade inibitória seletiva ao passo que nenhuma delas mostrou toxicidade a células hepáticas não-tumorais, indicando que as doses que apresentaram atividade antiproliferativa poderiam ser utilizadas sem causar hepatotoxicidade.

A maior diversidade de procianidinas poliméricas no extrato bruto em relação ao extrato concentrado de semente de açaí pode ter contribuído para a sua maior atividade antiproliferativa. Alguns compostos fenólicos foram perdidos durante a etapa de concentração (algumas procianidinas), embora outros tiveram o seu teor aumentado. Segundo Jara-Palacios et al. (2015), a ação complementar advinda da combinação de compostos fenólicos encontrados em bagaço de uva resultou em aumento da atividade antiproliferativa contra linhagem celular de câncer colorectal. Assim, o maior número de isômeros de procianidinas encontrado no extrato bruto pode ter atuado conjuntamente com os outros polifenóis, principalmente catequina e epicatequina, como inibidores da proliferação celular das linhagens tumorais, resultando na maior atividade antiproliferativa observada para o extrato bruto. Dessa forma, as interações moleculares (sinergismos ou antagonismos) entre os

compostos constituintes das amostras podem implicar tanto em aumento quanto diminuição das suas atividades bioativas.

Já para o engaço, ao contrário, a maior atividade foi observada para o extrato concentrado. A prevalência de catequina e a concentração de resveratrol no extrato concentrado podem ter contribuído para a sua melhor resposta antiproliferativa em relação ao extrato bruto. O resveratrol vem sendo amplamente estudado e tem apresentado efeitos preventivos contra vários tipos de células tumorais (VANG et al., 2014). Embora seu mecanismo de ação não esteja completamente elucidado, seu efeito na inibição celular ocorre através de múltiplos mecanismos, incluindo pró-apoptótico, antiproliferativo, anti-inflamatório e antiangiogênico (SINGH; NDIAYE; AHMAD, 2015).

Os extratos também apresentaram atividade anti-inflamatória numa dose inferior à de toxicidade, com destaque para os extratos concentrados da semente de açaí e engaço *Chenin Blanc* (17,62 e 21,47 µg/mL, respectivamente), os quais se aproximaram da atividade da dexametasona (15,70 µg/mL), um medicamento corticoide utilizado comercialmente como anti-inflamatório. A atividade anti-inflamatória dos extratos foi ainda superior à observada para cogumelo (CÔRREA et al., 2015) e equivalente à erva mate (28 µg/mL) (SOUZA et al., 2015), exceto a do extrato bruto de engaço. A maior concentração de resveratrol no extrato concentrado de engaço *Chenin Blanc* pode ter contribuído para o aumento da atividade anti-inflamatória observada, já que o resveratrol possui ação moduladora sobre processos inflamatórios, os quais se constituem como um dos mecanismos de proliferação de células tumorais (SINGH; NDIAYE; AHMAD, 2015). A supressão de processos inflamatórios, como o observado para os extratos concentrados, assim, é um dos mecanismos de inibição do desenvolvimento celular tumoral.

Certamente, a composição química complexa desses extratos permite uma vasta associação de fatores que convergem para as respostas bioativas observadas. A presença de um grupo éster, por exemplo, aumentou a citotoxicidade de compostos em estudo feito por Heleno et al. (2015). Além disso, algumas conformações moleculares estruturais de compostos fenólicos possuem influência sobre a atividade antiproliferativa. Entre eles, destacam-se a dupla ligação entre os carbonos C2-C3, a unidade orto-catecol, em flavonoides, e o número e posição dos grupos hidroxila no anel aromático (KAWAII et al., 1999; YÁÑEZ et al., 2004).

Tabela 8 – Atividade antiproliferativa, hepatotoxicidade e atividade anti-inflamatória de extratos brutos e concentrados de engaço *Chenin Blanc* e semente de açaí

Amostras/Padrões	Atividade antiproliferativa (GI <sub>50</sub> µg/mL)				Hepatotoxicidade (GI <sub>50</sub> µg/mL)	Atividade anti-inflamatória (EC <sub>50</sub> µg/mL)
	MCF-7 (carcinoma de mama)	NCI-H460 (câncer de pulmão de células não-pequenas)	HeLa (carcinoma cervical)	HepG2 (carcinoma de células hepáticas)	Células PLP2	Produção de óxido nítrico (NO)
EB <i>Chenin Blanc</i>	192,4±16,04	207,54±13,05	168,82±12,50	137,16±13,64	>400	184,41±12,37
EC <i>Chenin Blanc</i>	78,5±6,07	128,2±4,16	60,48 ± 2,17	76,67±4,02	280,07±7,85	21,47±2,08
EB S. Açaí	42,1±0,35	19,95±2,25	15,28 ± 0,26	8,54±0,02	120,16±7,36	52,68±3,23
EC S. Açaí	91,14±4,07	106,14±3,01	75,55 ± 7,37	79,97±2,50	194,00±9,69	17,62±0,73
Elipticina	0,91±0,04	1,03±0,09	1,91±0,06	1,14±0,21	3,22±0,67	-
Dexametasona	-	-	-	-	-	15,70±1,1

Legenda: EB = extrato bruto; EC = extrato concentrado (XAD<sup>®</sup>-2)

#### 4.4 Conclusão

Os métodos de concentração e fracionamento bioguiado empregados para engaçõ *Chenin Blanc* e semente de açaí foram eficazes ao produzirem frações com maior pureza e elevada atividade bioativa. O uso desses métodos possibilitou também o enriquecimento de uma fração com catequina e epicatequina a partir de semente de açaí. Os principais compostos identificados em engaçõ *Chenin Blanc* foram procianidina B1, catequina, epicatequina e resveratrol. Semente de açaí também foi revelada pela primeira vez como fonte de resveratrol, além de ser uma rica fonte de procianidinas poliméricas. Frações onde catequina, epicatequina e procianidina B1 estavam concentradas foram as de maior atividade antioxidante. As frações bioativas apresentaram atividade seletiva de desativação de espécies reativas de oxigênio e atividade antioxidante muito superior a desempenhada pelos antioxidantes sintéticos BHT e TBHQ. Extratos brutos e concentrados de semente de açaí e engaçõ *Chenin Blanc* possuem ainda atividade antiproliferativa, em linhagens tumorais humanas, e anti-inflamatória reduzindo os níveis de NO em cultura de célula. Além disso, os extratos apresentaram baixa hepatotoxicidade *in vitro*. Assim, grandes quantidades de fitoquímicos bioativos são descartadas juntamente com os resíduos do processamento vinícola e de polpa de açaí, os quais poderiam ser extraídos e concentrados para a produção de extratos de elevada atividade antioxidante. Esses extratos poderiam ser usados como aditivos ou novos ingredientes na indústria de alimentos, farmacêutica e/ou cosmética, substituindo substâncias sintéticas usualmente empregadas.

#### Referências

- ABREU, P.; MATTHEW, S.; GONZÁLEZ, T.; COSTA, D.; SEGUNDO, M.A.; FERNANDES, E. Anti-inflammatory and antioxidant activity of a medicinal tincture from *Pedilanthus tithymaloides*. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 78, n.14, p. 1578–1585, 2006.
- ABREU, R.M.V.; FERREIRA, I.C.F.R.; CALHELHA, R.C.; LIMA, R.T.; VASCONCELOS, M.H.; ADEGA, F.; CHAVES, R.; QUEIROZ, M-J.R.P. Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno[3,2-b]pyridine-2- carboxylate derivatives: *In vitro* evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 46, p. 5800 – 5806, 2011.
- 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. 120p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

ALENCAR, S.M.; CADORIN, T.L.; CASTRO, M.L.; RIBEIRO, I.S.; 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**, Limerick, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n.10, p. 2202–2210, 2010.

AMICO, V.; NAPOLI, E.M.; RENDA, A.; RUBERTO, G.; 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.

BARROS, L.; PEREIRA, E.; CALHELHA, R.C.; DUEÑAS, M.; CARVALHO, A.M.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I.C.F.R. Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Functional Foods**, London, v. 5, p. 1732-1740, 2013.

BASTOS, C.; BARROS, L.; DUEÑAS, M.; CALHELHA, R.C.; QUEIROZ, M.J.R.P.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I.C.F.R. Chemical characterisation and bioactive properties of *Prunus avium* L.: The widely studied fruits and the unexplored stems. **Food Chemistry**, Barking, v. 173, p. 1045-1053, 2015

BAUR, J.A; SINCLAIR, D.A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nature Reviews. Drug Discovery**, London, v. 5, n. 6, p. 493–506, 2006.

BIÇER, E.; ÖZDEMİR, S.; GÜDER, A.; KORKMAZ, H. Investigation of the interaction of resveratrol with free radical diphenylpicrylhydrazyl at different pHs by cyclic voltammetry: Correlation between antioxidant activity and association complex constant. **Russian Journal of Electrochemistry**, New York, v. 50, n. 12, p. 1170–1176, 2014.

CHISTÉ, R.C.; MERCADANTE, A.Z.; GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J.L.F.D. C.; BRAGAGNOLO, N. *In vitro* scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, Barking, v. 127, n. 2, p. 419–426, 2011.

CORRÊA, R.C.G.; SOUZA, A.H.P.; CALHELHA, R.C.; BARROS, L.; GLAMOCLIJA, J.; SOKOVIC, M.; PERALTA, R.M.; BRACHT, A.; FERREIRA, I.C.F.R. Bioactive formulations prepared from fruiting bodies and submerged culture mycelia of the Brazilian edible mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* Singer. **Food and Function**, Cambridge, v. 6, p. 2155-2164, 2015.

DENNY, C.; LAZARINI, J.G.; FRANCHIN, M.; MELO, P.S.; PEREIRA, G.E.; MASSARIOLI, A.P.; MORENO, I.A.M.; PASCHOAL, J.A.R.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L. Bioprospection of Petit Verdot grape pomace as a source of anti-inflammatory compounds. **Journal of Functional Foods**, London, v. 8, p. 292-300, 2014.

DI LECCE, G.; ARRANZ, S.; JÁUREGUI, O.; TRESSERRA-RIMBAU, A.; QUIFER-RADA, P.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Phenolic profiling of the skin, pulp and seeds of Albariño grapes using hybrid quadrupole time-of-flight and triple-quadrupole mass spectrometry. **Food Chemistry**, Barking, v. 145, p. 874–882, 2014.

DIAS, A.L.S.; ROZET, E.; LARONDELLE, Y.; HUBERT, P.; ROGEZ, H.; QUETIN-LECLERCQ, J. Development and validation of an UHPLC-LTQ-Orbitrap MS method for non-anthocyanin flavonoids quantification in *Euterpe oleracea* juice. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 405, n. 28, p. 9235–9249, 2013.

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 17, n. 9, p. 505–512, 2006.

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, n. 7, p. 649–671, 2008.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; SILVA, A.M.S.; SANTOS, C.M.M.; PINTO, D.C.G.A.; CAVALEIRO, J.A.S.; LIMA, J.L.F.C. 2-Styrylchromones: Novel strong scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, England, v. 15, n. 18, p. 6027–6036, 2007.

GORDON, A.; CRUZ, A.P.G.; CABRAL, L.M.C.; FREITAS, S.C.; TAXI, C.M.A.D.; DONANGELO, C.M.; MATTIETTO, R.A.; FRIEDRICH, M.; MATTA, V.M.; MARX, F. Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açai fruits (*Euterpe oleraceae* Mart.) during ripening. **Food Chemistry**, Barking, v. 133, n. 2, p. 256–263, 2012.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 33, n. 7, p. 601–617, 1995.

HEALTHCARE, G. E. (2007). **Sephadex LH-20.8** p. Disponível em: <[https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1314716762536/litdoc18110722AB\\_20110830184615.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314716762536/litdoc18110722AB_20110830184615.pdf)>. Acesso em: 03 ago 2013.

HELENO, S.A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M.J.R.P.; FERREIRA, I.C.F.R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. **Food Chemistry**, Barking, v. 173, p. 501-513, 2015.

JARA-PALACIOS, M.J.; HERNANZ, D.; CIFUENTES-GOMEZ, T.; ESCUDERO-GILETE, M.L.; HEREDIA, F.J.; SPENCER, J.P.E. Assessment of white grape pomace from winemaking as source of bioactive compounds, and its antiproliferative activity. **Food Chemistry**, Barking, v. 183, p. 78-82, 2015.

KANG, J.; XIE, C.; LI, Z.; NAGARAJAN, S.; SCHAUSS, A. G.; WU, T.; WU, X. Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Chemistry**, Barking, v. 128, n. 1, p. 152–157, 2011.

KATALINIĆ, V.; MOŽINA, S.S.; SKROZA, D.; GENERALIĆ, I.; ABRAMOVIĆ, H.; MILOŠ, M.; LJUBENKOV, I.; PISKERNIK, S.; PEZO, I.; TERPINC, P.; BOBAN, M. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). **Food Chemistry**, Barking, v. 119, n. 2, p. 715–723, 2010.

KAWAIL, S.; TOMONO, Y.; KATASE, E.; OGAWA, K.; YANO, M. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokio, v. 63, n. 5, p. 896-899, 1999.

KHAN, N.; MUKHTAR, H. Tea polyphenols for health promotion. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 81, n. 7, p. 519–533, 2007.

KOLEVA, I. I.; NIEDERLÄNDER, H.A. G.; VAN BEEK, T. A. Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates. **Analytical Chemistry**, Washington DC, v. 73, n. 14, p. 3373–3381, 2001.

KOLEVA, I. I.; NIEDERLANDER, H.A.G.; van BEEK, T.A. An on-line HPLC method for detection of radical scavenging compounds in complex mixtures. **Analytical Chemistry**, Washington DC, v. 72, p. 2323-2328, 2000.

KONG, K.W.; MAT-JUNIT, S.; AMINUDIN, N.; ISMAIL, A.; ABDUL-AZIZ, A. Antioxidant activities and polyphenolics from the shoots of *Barringtonia racemosa* (L.) Spreng in a polar to apolar medium system. **Food Chemistry**, Barking, v. 134, n. 1, p. 324–332, 2012.

KUMAR, Y.; YADAV, D.N.; AHMAD, T.; NARSAIAH, K. Recent trends in the use of natural antioxidants for meat and meat Products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 00, p. 1-17, 2015.

LANGER, S.; MARSHALL, L.J.; DAY, A.J.; MORGAN, M.R.A. Flavanols and methylxanthines in commercially available dark chocolate: A study of the correlation with nonfat cocoa solids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 15, p. 8435–8441, 2011.

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, n. 2, p. 125–132, 2007.

MAKRIS, D.P.; KALLITHRAKA, S.; KEFALAS, P. Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 5, p. 396–404, 2006.

MARIUTTI, L.R.B.; RODRIGUES, E.; CHISTÉ, R.C.; FERNANDES, E.; MERCADANTE, A.Z. The Amazonian fruit *Byrsonima crassifolia* effectively scavenges reactive oxygen and nitrogen species and protects human erythrocytes against oxidative damage. **Food Research International**, Essex, v. 64, p. 618–625, 2014.

MELO, P.S.; MASSARIOLI, A.P.; DENNY, C.; SANTOS L.F.; FRANCHIN, M.; PEREIRA, G.E.; VIEIRA, T.M.F.S.; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.M. DE. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, Barking, v. 181, p. 160–169, 2015.

OLDONI, T.L.C.; CABRAL, I. S.R.; D'ARCE, M.AB.R.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, M.; NASCIMENTO, A.M.; ALENCAR, S.M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, New York, v. 77, n. 2, p. 208–213, 2011.

OLDONI, T.L.C.; MELO, P.S.; MASSARIOLI, A.P.; MORENO, I.A.M.; BEZERRA, R. M.N.; ROSALEN, P.L.; SILVA, G.V.J.; NASCIMENTO, A.M.; ALENCAR, S.M. Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*) skin by combination of chromatography techniques. **Food Chemistry**, Barking, v. 192, p. 306–312, 2016.

PACKER, V.G.; MELO, P.S.; BERGAMASCHI, K.B.; SELANI, M.M.; VILLANUEVA, N.D.M.; ALENCAR, S.M.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. Chemical characterization, antioxidant activity and application of beetroot and guava residue extracts on the preservation of cooked chicken meat. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 52, n. 11, p. 7409-7416, 2015.

PASCUAL-TERESA, S.; MORENO, D.A.; GARCÍA-VIGUERA, C. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 11, n. 4, p. 1679–1703, 2010.

PRIOR, R.L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. **Journal of Functional Foods**, London, v. 18, p. 797-810, 2015.

REVILLA, E.; RYAN, J.M. Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 881, n. 1/2, p. 461–469, 2000.

RIBEIRO, A.B.; CHISTÉ, R.C.; FREITAS, M.; SILVA, A.F.; VISENTAINER, J.V.; FERNANDES, E. *Psidium cattleianum* fruit extracts are efficient in vitro scavengers of physiologically relevant reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, Barking, v. 165, p. 140–148, 2014.

RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L.R.B.; MERCADANTE, A.Z. Carotenoids and phenolic compounds from *Solanum sessiliflorum*, an unexploited amazonian fruit, and their scavenging capacities against reactive oxygen and nitrogen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 61, n. 12, p. 3022–3029, 2013.

RODRIGUES, R.B.; LICHTENTHÄLER, R.; ZIMMERMANN, B.F.; PAPAGIANNPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; MARX, F.; MAIA, J.G.S.; ALMEIDA, O. Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) seeds and identification of their polyphenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 12, p. 4162–4167, 2006.

RUBERTO, G.; RENDA, A.; DAQUINO, C.; AMICO, V.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C.; TOMMASI, N. DE. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. **Food Chemistry**, Barking, v. 100, n. 1, p. 203–210, 2007.

RUDOLFOVÁ, P.; HANUSOVÁ, V.; SKÁLOVÁ, L.; BÁRTÍKOVÁ, H.; MATOUSKOVÁ, P.; BOUSOVÁ, I. Effect of selected catechins on doxorubicin antiproliferative efficacy and hepatotoxicity in vitro. **Acta Pharmaceutica**, Zagreb, v. 64, p. 199-209, 2014.

RUFINO, M.D.S.M.; ALVES, R.E.; DE BRITO, E.S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, Barking, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, London, v. 8, n. 3, p. 121–137, 2002.

SCHAUSS, A.G.S.; WU, X.; PRIOR, R.L.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D.; KABABICK, J.P. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai), **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 8598–8603, 2006.

SELANI, M.M.; CONTRERAS-CASTILLO, C.J.; SHIRAHIGUE, L.D.; GALLO, C.R.; PLATA-OVIEDO, M.; MONTES-VILLANUEVA, N.D. Wine industry residues extracts as natural antioxidants in raw and cooked chicken meat during frozen storage. **Meat Science**, Barking, v. 88, n. 3, p. 397–403, 2011.

SHIRAHIGUE, L.D.; CONTRERAS-CASTILLO, C.J.; SELANI, M.M.; NADAI, A.P.; MOURÃO, G.B.; GALLO, C.R. Winery grape-residue extract: Effects on quality and sensory attributes of cooked chicken meat. **Food Science and Biotechnology**, Seoul, v. 20, n. 5, p. 1257–1264, 2011.

SINGH, C.K.; NDIAYE, M.A.; AHMAD, N. Resveratrol and cancer: challenges for clinical translation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1852, p. 1178–1185, 2015.

SMOLIGA, J.M.; BAUR, J.A.; HAUSENBLAS, H.A. Resveratrol and health – a comprehensive review of human clinical trials. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 55, n. 8, p. 1129–1141, 2011.

SOUQUET, J.; LABARBE, B.; LE GUERNEVÉ, C.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Phenolic Composition of Grape Stems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 1076–1080, 2000.

SOUZA, A.H.P.; CORRÊA, R.C.G.; BARROS, L.; CALHELHA, R.C.; SANTOS-BUELGA, C.; PERALTA, R.M.; BRACHT, A.; MATSUSHITA, M.; FERREIRA, I.C.F. R. Phytochemicals and bioactive properties of *Ilex paraguariensis*: An in-vitro comparative study between the whole plant, leaves and stems. **Food Research International**, Essex, v. 78, p. 286–294, 2015.

SPRANGER, I.; SUN, B.; MATEUS, A.M.; FREITAS, V. DE; RICARDO-DA-SILVA, J. M. Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds. **Food Chemistry**, Barking, v. 108, n. 2, p. 519–532, 2008.

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

- THIMOTHE, J.; BONSI, I.A.; PADILLA-ZAKOUR, O.I.; KOO, H. Chemical characterization of red wine grape (*Vitis vinifera* and *Vitis* interspecific hybrids) and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 25, p. 10200–10207, 2007.
- TRELA, B.; WATERHOUSE, A. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 5, p. 1253–1257, 1996.
- VALLVERDÚ-QUERALT, A.; BOIX, N.; PIQUÉ, E.; GÓMEZ-CATALAN, J.; MEDINA-REMON, A.; SASOT, G.; MERCADER-MARTÍ, M.; LLOBET, J.M.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Identification of phenolic compounds in red wine extract samples and zebrafish embryos by HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. **Food Chemistry**, Barking, v. 181, p. 146–151, 2015.
- VANG, O.; AHMAD, N.; BAILE, C.A.; BAUR, J.A.; BROWN, K.; CSISZAR, A.; DAS, D. K.; DELMAS, D.; GOTTFRIED, C.; LIN, H.Y.; MA, Q.Y.; MUKHOPADHYAY, P.; NALINI, N.; PEZZUTO, J.M.; RICHARD, T.; SHUKLA, Y.; SURH, Y. J.; SZEKERES, T.; SZKUDELSKI, T.; WALLE, T.; WU, J. M. What is new for an old molecule? systematic review and recommendations on the use of resveratrol. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 6, p. 1-11, 2011.
- WANG, X.; TONG, H.; CHEN, F.; GANGEMI, J.D. Chemical characterization and antioxidant evaluation of muscadine grape pomace extract. **Food Chemistry**, Barking, v. 123, n. 4, p. 1156–1162, 2010.
- WYCOFF, W.; LUO, R.; SCHAUSS, A.G.; NEAL-KABABICK, J.; SABAA-SRUR, A. U. O.; MAIA, J. G. S.; TRAN, K.; RICHARDS, K. M.; SMITH, R. E. Chemical and nutritional analysis of seeds from purple and white açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 41, p. 181–187, 2015.
- YÁÑEZ, J.; VICENTE, V.; ALCARAZ, M.; CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; CANTERAS, M.; TERUEL, J.A.L. Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. **Nutrition and Cancer**, Hillsdale, v. 49, n. 2, p. 191-199, 2004.
- YANG, S.Z.; PENG, L.T.; SU, X.J.; CHEN, F.; CHENG, Y.J.; FAN, G.; PAN, S.Y. Bioassay-guided isolation and identification of antifungal components from propolis against *Penicillium italicum*. **Food Chemistry**, Barking, v. 127, n. 1, p. 210–215, 2011.
- YILMAZ, Y.; TOLEDO, R.T. Major Flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 2, p. 255–260, 2004.
- ZAVERI, N. T. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 78, n. 18, p. 2073–2080, 2006.
- ZUPANČIČ, Š.; LAVRIČ, Z.; KRISTL, J. Stability and solubility of *trans*-resveratrol are strongly influenced by pH and temperature. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 93, p. 196–204, 2015.



## 5 AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE SEMENTE DE AÇAÍ E ENGAÇO DE UVA *CHENIN BLANC* ASSOCIADOS COM ALFA-TOCOFEROL NA INIBIÇÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM ÓLEO DE SOJA E SISTEMAS COLOIDAIIS

### Resumo

Extratos de semente de açaí e engaço de uva *Chenin Blanc* em associação com alfa-tocoferol foram avaliados como antioxidantes em três diferentes sistemas lipídicos: óleo bruto, lipossomos e emulsão óleo/água. Extratos hidrofílicos brutos e concentrados de semente de açaí e engaço *Chenin Blanc* apresentaram atividade pró-oxidante e dependente da concentração, devido a baixa solubilidade e por terem sido substratos oxidáveis em meio apolar. Entretanto, esses extratos foram capazes de proteger a suspensão de lipossomos e a emulsão óleo/água da oxidação lipídica. Elevada razão de antioxidantes hidrofílicos/lipofílicos produziu efeitos sinérgicos nos sistemas lipídicos heterogêneos, devido a alta solubilidade dos extratos na fase aquosa e do alfa-tocoferol na fase lipídica. Além disso, alfa-tocoferol pode ter interrompido a propagação da reação em cadeia na oxidação do ácido linoléico, atuado como regenerador dos antioxidantes hidrofílicos e/ou por ter sido regenerado por eles. Assim, os extratos de semente de açaí e engaço *Chenin Blanc* têm potencial para serem aplicados como antioxidantes, puros ou em combinação com alfa-tocoferol, em alimentos ricos em lipídios, principalmente em produtos cárneos e emulsões.

Palavras-chave: ESR; Peroxidação lipídica; Lipossomos; Metamioglobina; Consumo de oxigênio; *Euterpe oleracea*; *Vitis vinifera*

### Abstract

Açaí seed and grape rachis extracts in associations with  $\alpha$ -tocopherol were evaluate as antioxidants in three lipid systems: bulk oil, liposome and oil/water emulsion. Hydrophilic açaí seed and grape rachis crude and concentrated extracts had a concentration-dependent prooxidant activity in soybean oil, due their poor solubility and role as oxidizable substrates in nonpolar medium. These extracts, however, were able to protect liposome suspension and oil/water emulsion from peroxidation. High ratio of hydrophilic/lipophilic antioxidants culminated in synergistic effects in heterogeneous systems, due the high solubility of extracts in the water-phase and of alpha-tocopherol in the lipid-phase. Also, alpha-tocopherol could be acted as chain-breaker of the propagation step of the linoleic acid oxidation, as regenerator of hydrophilic antioxidants and/or for being regenerated by them. Therefore, açaí seed and grape rachis extracts have potential to be applied as antioxidants, pure or in combination with alpha-tocopherol, in lipid-rich food, mainly meat products and emulsions.

Keywords: ESR; Lipid peroxidation; Liposome; Metmyoglobin; Oxygen consumption; *Euterpe oleracea*; *Vitis vinifera*

## 5.1 Introdução

Os requerimentos dos consumidores por alimentos bem preservados e saudáveis vêm crescendo de forma significativa. Associado a isso, o setor agroindustrial tem focado em novas tecnologias para atender as expectativas do mercado consumidor, ao mesmo tempo em que procura formas de reduzir perdas econômicas e o impacto ambiental produzido pela geração de resíduos agroindustriais (MELO et al., 2011).

A utilização de resíduos agroindustriais é importante não somente devido à grande quantidade de resíduos gerados, os quais poderiam ser reaproveitados, mas também pela enorme diversidade desses materiais que são produzidos juntamente com as atividades agroindustriais ao redor do mundo. Isso é especialmente importante no Brasil, que possui sua economia fortemente baseada no agronegócio. Somente o agronegócio representou, em 2013, cerca de 22% do Produto Interno Bruto (PIB) do País (CEPEA, 2016).

Entre os resíduos produzidos no Brasil, semente de açaí e engaço de uva são materiais interessantes devido à grande quantidade gerada e aos poucos estudos disponíveis na literatura.

A palmeira de açaí cresce na região amazônica e o consumo e comercialização de sua polpa têm se expandido em todo o mundo, principalmente devido às suas propriedades funcionais como antioxidante (HOGAN et al., 2010), anti-inflamatório (KANG et al., 2011), antienvhecimento (POULOSE et al., 2012) e antiproliferativo (HOGAN et al., 2010), o que confere ao açaí a denominação de “superfruta” (YAMAGUCHI et al., 2015). A polpa de açaí é usada para preparar bebidas energéticas e a produção brasileira, em 2014, foi de 198 mil toneladas (IBGE, 2015), dando a essa espécie um alto potencial econômico. Aliado ao aumento da produção de açaí e seu processamento, resíduos orgânicos são também gerados, representados principalmente por sementes e casca, os quais representam cerca de 70% do fruto (TEIXEIRA; SOCIAL; OLIVEIRA, 2005).

Nas indústrias vinícolas a geração de resíduos agroindustriais também é alta. Resíduos sólidos representam cerca de 30% do volume de uvas processadas (MAKRIS; BOSKOU; ANDRIKOPOULOS, 2007) e, embora existam muitos estudos acerca das sementes e bagaços de uva, pesquisas sobre os engaços são escassas. De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) (2015), a produção mundial de uvas, em 2013, foi de 77 milhões de toneladas.

Muitos desses resíduos agroindustriais são fontes de fitoquímicos com atividade antioxidante (MELO et al., 2015). Os antioxidantes têm sido estudados pelos seus benefícios à saúde humana, contribuindo para a prevenção de doenças cardiovasculares (VINSON et al.,

1995), processos anti-inflamatórios (HOGAN et al., 2010), doenças neurodegenerativas (JEONG et al., 2011) e câncer (CHOUDHURY et al., 2010).

Antioxidantes naturais também têm potencial para serem aplicados em sistemas alimentares para prevenir a oxidação lipídica (YIN et al., 2012), como substitutos de antioxidantes sintéticos. Hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA) e terc butil hidroquinona (TBHQ) são moléculas sintéticas usadas pela indústria para prevenir/retardar processos oxidativos em alimentos ricos em gordura, assegurando assim a qualidade nutricional e sensorial do produto alimentício. Entretanto, o uso desses antioxidantes sintéticos é controlado devido à impasses sobre suas doses de segurança e evidências de toxicidade, o que pode causar efeitos adversos à saúde humana (THOO et al., 2013).

Resíduos agroindustriais podem conter muitas moléculas com diferentes mecanismos antioxidantes, os quais, quando adicionados em alimentos ricos em lipídios, podem interagir com outros antioxidantes intrínsecos presentes nesses alimentos. Em muitos casos, a resposta antioxidante dada por essas combinações tem sido mais pronunciada do que a soma das respostas individuais. O termo sinergismo entre antioxidantes é empregado nesse caso. A interação oposta também pode ocorrer e é chamada de antagonismo (YIN et al., 2012).

Assim, a utilização de resíduos agroindustriais para a produção de antioxidantes naturais pode provocar um impacto direto na indústria agroalimentar pelo desenvolvimento de novos e efetivos produtos visando a substituição de aditivos alimentares sintéticos. Associado a isso, esse reaproveitamento poderia diminuir a disposição dos resíduos ao ambiente, aumentando a eficiência produtiva industrial. Ao encontrar novos usos para esses materiais, espera-se transformar os resíduos agroindustriais em subprodutos da indústria.

Nesse estudo, a interação antioxidante (sinergismo, aditivo ou antagonismo) entre os extratos brutos e concentrados de semente de açaí e engaço de uva *Chenin Blanc* com o alfa-tocoferol contra a oxidação lipídica foi investigada. Três sistemas lipídicos foram estudados usando os seguintes métodos: (I) Ressonância de Spin Eletrônico (ESR), monitorando o período de indução em óleo de soja, (II) o consumo de oxigênio em uma emulsão óleo/água de ácido linoléico com oxidação induzida por mioglobina e (III) a formação de dienos conjugados em suspensão de lipossomos.

## 5.2 Material e métodos

### 5.2.1 Coleta e preparo das amostras de semente de açai e engaço *Chenin Blanc*

As sementes de açai (*Euterpe oleracea*) foram coletadas em uma agroindústria localizada em Ipiaú, Bahia, Brasil. O resíduo vinícola (engaço) de uva branca da variedade *Chenin Blanc* (*Vitis vinifera*) foi obtido em Petrolina, Pernambuco, Brasil.

As amostras destes resíduos foram congeladas, liofilizadas, moídas e armazenadas a -18°C até a sua utilização.

### 5.2.2 Extração e concentração dos extratos da semente de açai e do engaço de uva *Chenin Blanc* em resina Amberlite XAD<sup>®</sup>-2

Os resíduos agroindustriais semente de açai e engaço *Chenin Blanc* foram extraídos conforme condições de solvente e temperatura previamente otimizadas. Os extratos brutos foram preparados por meio da mistura de 100 mL de etanol:água (57:43, v/v) com 10 g de cada resíduo liofilizado e moído. Essas misturas foram mantidas a 96°C em um banho aquecido, para o engaço, e a temperatura ambiente para a semente de açai, durante 20 minutos. Na sequência, as misturas permaneceram durante 15 minutos em banho ultrassônico e foram centrifugadas a 5000xg por 15 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados, o etanol foi evaporado e o extrato concentrado foi congelado, liofilizado e estocado a -18°C.

Para a produção dos extratos concentrados em fenólicos, o mesmo procedimento de extração foi realizado, e após a filtração, o etanol foi evaporado a 50°C e água foi adicionada de forma a restabelecer os volumes de extrato originais. Em seguida, 100 mL do extrato aquoso foi acidificado até pH 2 e adicionado à 100 g de resina Amberlite XAD<sup>®</sup>-2 (Supelco, Bellefonte, PA – poros de 9 nm e partícula de 0,3 - 1,2 mm). A mistura permaneceu sob agitação, em temperatura ambiente, durante 15 minutos. Depois disso, a resina, contendo a amostra adsorvida, foi empacotada em uma coluna de vidro (25 x 2 cm). A coluna foi então eluída com 500 mL de água ácida (pH 2), 300 mL de água destilada e 300 mL de metanol para eluição da fração de interesse – com teor reduzido de carboidratos e concentrada em compostos fenólicos. A fração metanólica foi evaporada a 50°C e, após isto, liofilizada.

### 5.2.3 Teor de compostos fenólicos totais

A análise do teor de compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Slinkard e Singleton (1977). Alíquotas de 1,5 mL da solução padrão (ácido gálico) ou extratos de resíduos agroindustriais e 125 µL do

reagente de Folin-Ciocalteu foram pipetados em cubetas e, após 5 minutos, 375  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de carbonato de sódio (20%) foram adicionados.

O controle foi feito substituindo a amostra por água destilada. Após 2 horas de reação, a absorbância foi medida a 765 nm em um espectrofotômetro UV-visível (UVmini-1240, Shimadzu). O conteúdo de compostos fenólicos totais foi calculado a partir de uma curva-padrão usando ácido gálico nas concentrações de 2,5 a 12,5  $\mu\text{g/ml}$ .

Os resultados foram expressos como mg de equivalentes ao ácido gálico (EAG) por grama de resíduo liofilizado.

#### 5.2.4 Purificação e caracterização do óleo de soja

Óleo de soja bruto foi purificado usando uma coluna cromatográfica de alumina de acordo com procedimento descrito por Fuster et al. (1998), de forma a se obter o óleo livre de suas substâncias inerentes naturais como tocoferóis, peróxidos e traços de metais. Uma coluna de vidro (29/32; 60 cm x 2.5 i.d.) foi empacotada com aproximadamente 180 g de alumina ativa. A coluna foi previamente condicionada com hexano (180 mL) e protegida da luz. Um volume de 180 mL de uma mistura de óleo e hexano (1:1) foi à ela adicionada e a eluição se deu com hexano. Os componentes não triglicéridicos da amostra foram adsorvidos pela alumina e a mistura triacilglicerol+hexano, incolor, foi coletada em frasco protegido da luz. O hexano foi evaporado em rotavapor a 45°C e o óleo purificado foi armazenado protegido da luz, com atmosfera de nitrogênio e congelado, para evitar a oxidação.

O perfil de ácido graxo do óleo de soja foi determinado por cromatografia gasosa após derivatização do óleo para a formação de ésteres metílicos de ácidos graxos. Um cromatógrafo gasoso (HP 6890), com injetor “split”, operando com uma razão de “split” de 1:25, a 250 °C, uma coluna Omegawax (30 m x 0.32 mm i.d. x 0.25  $\mu\text{m}$ , Supelco) e um detector por ionização de chama a 300 °C foram usados. As análises foram realizadas usando hidrogênio (1 mL/min) como gás de arraste, com a seguinte programação de temperatura: 50 °C por 1 min; 15 °C  $\text{min}^{-1}$  até 180 °C; 3°C  $\text{min}^{-1}$  até 240°C mantido por 10 min.

O óleo de soja purificado apresentou o mesmo perfil de ácidos graxos quando comparado ao óleo não purificado (C16:0 – 10,7%; C17:0 – 0,1%; C18:0 – 4,4%; C18:1 – 24%; C18:2 – 53,8%; C18:3 – 6,7%; C22:5 – 0,1%).

#### 5.2.5 Espectroscopia de Ressonância de Spin Eletrônico (ESR) em óleo de soja

A medida dos primeiros radicais livres formados durante os estágios iniciais da oxidação lipídica do óleo de soja foi conduzida usando o método de *spin-trapping* de acordo

com Velasco, Andersen e Skibsted (2004). Diferentes concentrações de antioxidantes (0,25, 0,5 and 1,0  $\mu\text{mol/g}$  de óleo, usando o peso molecular do alfa-tocoferol e do ácido gálico para os extratos) foram adicionadas ao óleo purificado.

Cada amostra contendo o *spin trap* *N*-terc-butil- $\alpha$ -fenilnitrona (PBN) na concentração de  $1,00 \pm 0,05$  mg/g de óleo foi colocada em tubos para ESR (4 mm i.d., Wilmad Glass Buena, NJ, USA), aquecidos em banho de água a  $60 \pm 0,1^\circ\text{C}$  e protegidos da luz. Os tubos foram retirados do banho a intervalos de 10 min e imediatamente colocados no ressoador do espectrômetro ESR (Jeol Jes-FR30 Free Radical Monitor, Tokyo, Japan) para serem analisadas em tempo real. Os parâmetros aplicados foram: campo central, 3360 G; varredura de campo, 50 G; tempo de varredura, 2 min; potência das micro-ondas, 16 mW; e amplitude de modulação, 1 G. A formação de adutos entre os radicais livres e o PBN foi quantificada pela amplitude de pico a pico da segunda linha do sinal do ESR. Os períodos de indução (IP) foram determinados como as intersecções entre as regressões lineares da intensidade dos adutos versus o tempo, em minutos, durante o período inicial de lento aumento e as regressões lineares durante o período subsequente de rápido aumento da intensidade de sinal.

Os efeitos de interação foram identificados por razão diferencial (Equação 1). Resultados positivos indicam sinergismo; resultados negativos indicam antagonismo e zero significa um efeito aditivo.

$$(\text{IP mistura de antioxidantes } 1+2) \div (\text{IP antioxidante } 1 + \text{IP antioxidante } 2) - 1 \quad (\text{Eq. } 1)$$

### 5.2.6 Peroxidação de lipossomos

Lipossomos foram preparados de acordo com o método descrito por Roberts e Gordon (2003), com modificações. Fosfatidilcolina de soja (PM=900), 0,75 mmol/L, dissolvida em clorofórmio (1 mL) foi misturada com 0,5 mL de hexano. Um volume de 10  $\mu\text{L}$  de alfa-tocoferol ou extratos foram adicionados antes ou após a evaporação com corrente de gás  $\text{N}_2$ , respectivamente. Então, 5 mL de tampão fosfato de sódio, 0,01 M, pH 7,4, foi adicionado para hidratar o resíduo e as misturas foram agitadas por 10 min e sonicadas por 30 s em banho ultrassônico. As concentrações finais de antioxidantes na suspensão de lipossomos foram 0,25, 0,5 and 1,0% relativo a fração lipídica. Lipossomos unilamelares foram preparados pela passagem da suspensão 21 vezes através de uma dupla camada de membrana de policarbonato com tamanho de poro de 100 nm, usando o aparato para a extrusão de pequenos volumes Avestin Liposofast Basic (Avestin Inc., Ottawa, Canada).

A suspensão unilamelar (2 mL) foi transferida para cubetas de quartzo, previamente aquecidas por 10 min a 37°C e a peroxidação lipídica foi iniciada pela adição de 20 µL de 75 mM de AAPH, dissolvido em tampão fosfato de sódio (pH 7,4). Uma amostra sem fosfatidilcolina e antioxidantes foi usada como branco. A peroxidação dos lipossomos foi monitorada espectrofotometricamente a 234 nm durante 900 min pela formação de dienos conjugados. A absorbância foi medida a cada 10 min contra a do branco.

O período de indução (IP, em min) foi determinado como o tempo decorrido até o ponto onde a tangente da fase de propagação e a tangente da fase lag interceptam (BECKER; NTOUMA; SKIBSTED, 2007). Os efeitos de interação foram identificados por razão diferencial (Equação 1). Resultados positivos indicam sinergismo; resultados negativos indicam antagonismo e zero significa um efeito aditivo.

### **5.2.7 Consumo de oxigênio em emulsão de metil linoleato**

O método de determinação do consumo de oxigênio foi realizado de acordo com Hu e Skibsted (2002). Uma solução metanólica composta por metil linoleato (250 µL de 28,2 mM) e Tween 20 (60 µL de 0,04 g/mL) foi evaporada usando fluxo de gás nitrogênio e, subsequentemente, uma alíquota de 2,5 mL de tampão fosfato de sódio (5 mM; pH 6,8) saturado de oxigênio foi adicionada. O antioxidante lipofílico (alfa-tocoferol) e hidrofílicos (extratos) foram adicionados (10 µL) à mistura de metil linoleato – Tween 20 antes da evaporação, para alfa-tocoferol, e após a evaporação, para os extratos. A análise se iniciou com 25 µL de 0,2 mM de metamioglobina (MMb), dissolvida em tampão fosfato 5 mM e 70 µL da emulsão foi imediatamente injetada à célula de medição termostaticada (25 °C), sem “headspace” (Chemiware, VibyJ., Denmark). O consumo de oxigênio foi medido por um eletrodo Clark conectado a um analisador multicanal (Unisense Picoammeter PA2000, Unisense Aps, Århus, Denmark). Uma calibração de dois pontos: água saturada de N<sub>2</sub> (água a 25°C, adicionada de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> para remoção do oxigênio residual) e água saturada de ar (25°C), foi utilizada para calibrar o sistema. As concentrações finais dos reagentes nesse ensaio foram: 2,7 mM de metil linoleato, 2 µM de MMb, 0,8 mM de Tween 20 e 0,8, 1,75, 3,5, e 7 µM de antioxidantes em relação à fração lipídica.

### **5.2.8 Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de, ao menos, duplicatas. A análise de variância (ANOVA) foi usada para avaliar os níveis de significância a  $p < 0,05$ . Para determinar a diferença das médias, os testes Tukey e t-Student foram usados.

### 5.3 Resultados e discussão

#### 5.3.1 Teor de compostos fenólicos totais

O extrato bruto de semente de açaí apresentou mais do que o dobro do conteúdo de compostos fenólicos quando comparado com o extrato bruto do engaço *Chenin Blanc* (Tabela 1). O método de concentração usando a resina Amberlite XAD<sup>®</sup>-2 foi eficiente, já que a recuperação de compostos fenólicos nos extratos concentrados foi maior do que o conteúdo de seus extratos brutos. Amberlite XAD<sup>®</sup>-2 é uma resina hidrofóbica de copolímero de poliestireno interligado (SPECIFICATION, 1997) e foi usada nesse estudo para concentrar compostos fenólicos nos extratos pela eliminação de açúcares.

Tabela 1 – Conteúdo de compostos fenólicos totais (mg/g) dos extratos brutos e concentrados de semente de açaí e engaço *Chenin Blanc*

Resíduos agroindustriais	Extrato bruto	Extrato concentrado
Semente de açaí	490,99±0,08 <sup>c</sup>	618,20±3,45 <sup>a</sup>
Engaço <i>Chenin Blanc</i>	207,30±0,49 <sup>d</sup>	528,18±0,84 <sup>b</sup>

Valores são média de triplicatas ± desvio padrão e estão expressos como mg de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato liofilizado. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Os teores de compostos fenólicos totais dos extratos de semente de açaí e engaço *Chenin Blanc* foram maiores do que os encontrados para polpa de açaí (GORDON et al., 2012; KANG et al., 2012) e uvas (THIMOTHE et al., 2007), sugerindo que grande porção desses fitoquímicos estão presentes em partes não comestíveis dessas frutas, as quais são descartadas como resíduos durante o processamento.

#### 5.3.2 ESR em óleo de soja: monitoramento da formação dos primeiros radicais livres

A soja é a principal fonte de proteína para a alimentação animal, bem como, a segunda principal fonte de óleo vegetal no mundo, sendo a primeira no Brasil, onde o óleo de soja corresponde a 86% do total de óleo consumido (NUNES, 2007). Composto por mais de 80% de ácidos graxos insaturados, o óleo de soja deve ser preservado da oxidação lipídica, o que é feito por meio da adição de antioxidantes.

A capacidade antioxidante de extratos de engaço *Chenin Blanc* e semente de açaí foi avaliada em óleo de soja pela detecção dos primeiros radicais livres formados durante os estágios iniciais de oxidação, por espectroscopia ESR. Uma vez que os radicais livres são espécies muito reativas, com um tempo de vida curto, foi necessário usar a técnica de “spin trapping”. Nessa técnica, substâncias químicas reagem covalentemente com o radical para

formar adutos, que são radicais mais estáveis e, portanto, passíveis de serem detectados por ESR (VELASCO; ANDERSEN; SKIBSTED, 2004).

Nesse estudo, PBN foi usado como trapeador de spin e a atividade antioxidante dos extratos foi determinada como a resistência de formação de radicais livres no óleo de soja purificado. A atividade antioxidante foi expressa como período de indução (IP) – o período de tempo onde a formação de adutos passa de lento a um ponto onde se inicia um rápido aumento da intensidade de sinal, sob aquecimento a 60°C.

Os extratos brutos e concentrados de semente de açaí e engaço *Chenin Blanc* foram adicionados ao óleo nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1 µmol de antioxidantes equivalente ao ácido gálico por grama de óleo de soja purificado. O óleo sem antioxidantes teve um IP de 20,66±0,2 min e o alfa-tocoferol a 0,05 µmol/g estendeu a fase lag por 76,02 ± 2,75 min (Figura 1-A).

De acordo com Rhodes, Tran e Morris (2004), DMSO, como solvente, PBN e os extratos antioxidantes podem agir como sequestradores competitivos dos radicais livres lipídicos. Assim, em condições ideais, um aumento da concentração do antioxidante no meio reacional reduziria a intensidade do sinal dos adutos formados por PBN-radical proporcionalmente. Entretanto, uma tendência inversa para os extratos de semente de açaí e engaço *Chenin Blanc* foi observada.

Ao aumentar as concentrações de extratos de semente de açaí e engaço *Chenin Blanc*, houve diminuição do IP. Para os extratos brutos, um aumento dependente de concentração foi observado entre 0,25 e 0,50 com decréscimo a 1 µmol/g, enquanto que para o extrato concentrado de engaço *Chenin Blanc*, baixa variação no IP foi observada. Para o extrato concentrado de semente de açaí, um decréscimo dependente de concentração foi encontrado. A atividade antioxidante dos extratos de engaço *Chenin Blanc* foi, portanto, não dependente da concentração e os extratos de semente de açaí apresentaram atividade pro-oxidante no óleo de soja, a qual se mostrou proporcional ao aumento da concentração (Figura 1-A).

Uma atividade pro-oxidante dependente de concentração também já foi observada por outros autores (PROCHÁZKOVÁ;C 2011). Rhodes, Tran e Morris (2004), por exemplo, encontraram atividade pro-oxidante para catequina a baixas concentrações, mas atividade antioxidante foi observada quando a concentração foi aumentada. O efeito pro-oxidante observado nos extratos de semente de açaí sugerem que, além do óleo de soja, muitas moléculas presentes nas amostras analisadas também agiram como substrato para ser oxidado ou como oxidantes, contribuindo para a formação de adutos e para o aumento da intensidade

de sinal. Além disso, a composição heterogênea de antioxidantes presentes nos extratos podem ter influído negativamente sobre esse resultado.

Devido às propriedades hidrofílicas dos extratos, uma dispersão de partículas dessas soluções polares deve ter se formado no óleo, guiando para o interior das gotículas a parte glicerídica (hidrofílica) e expondo as cadeias de ácidos graxos (hidrofóbico) a oxidação. Ao mesmo tempo, essa estrutura pode ter contribuído para limitar a ação antioxidante dos extratos hidrofílicos. Por outro lado, a alta solubilidade do alfa-tocoferol no óleo foi capaz de aumentar a dispersão dessa molécula e, conseqüentemente, promover maior proteção antioxidante do óleo do que os extratos.

De acordo com esses resultados, a menor concentração dos extratos (0,25  $\mu\text{mol/g}$ ) foi misturada com alfa-tocoferol (0,05  $\mu\text{mol/g}$ ) a fim de obter o efeito antioxidante dessas combinações (Figura 1-B).

Os períodos de indução das combinações foram todos menores do que a soma dos IP individuais de cada antioxidante, representando assim, um efeito antagônico, o qual está ilustrado pela linha de razão diferencial negativa na Figura 1-B. Além de que os extratos podem ter sido oxidados, o antagonismo também indica claramente que não houve relação de regeneração entre os antioxidantes, um fato também observado por Becker, Ntouma e Skibsted (2007), com muitos flavonoides e alfa-tocoferol em óleo bruto.

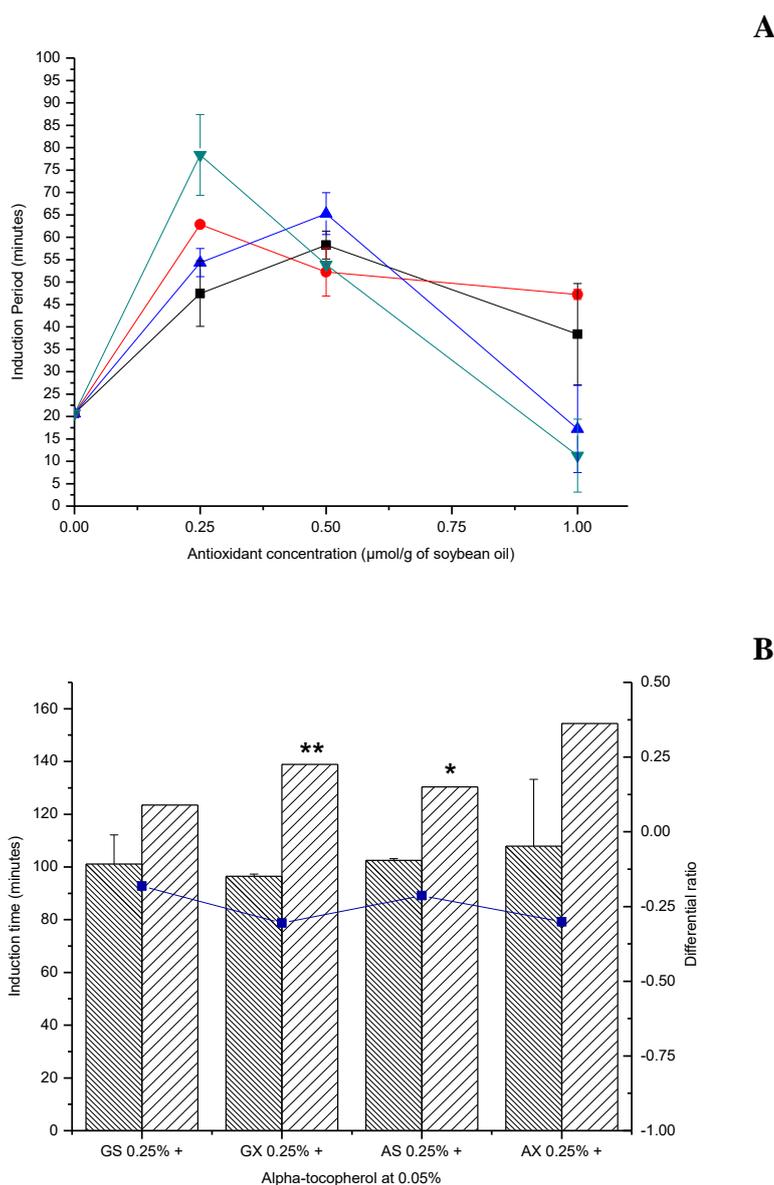


Figura 1 – ESR. (A) Períodos de indução (IP) dos extratos de engaço *Chenin Blanc* bruto (■) e concentrado (●), semente de açai bruto (▲) e concentrado (▼) a 0,25, 0,5 e 1  $\mu\text{mol}$  de antioxidantes equivalentes ao ácido gálico e alfa-tocoferol a 0,05  $\mu\text{mol}$  por grama da fração lipídica (óleo de soja). Um controle, sem antioxidantes, teve um IP de 20,66 minutos. (B) Períodos de indução das combinações de alfa-tocoferol a 0,05  $\mu\text{mol/g}$  combinado com extratos de engaço *Chenin Blanc* (GS = extrato bruto; GX = extrato concentrado) e semente de açai (AS = extrato bruto; AX = extrato concentrado) a 0,25  $\mu\text{mol/g}$  de antioxidantes relativo ao óleo de soja (colunas a esquerda) foram comparados com a soma dos IP individuais (colunas a direita). Uma razão diferencial entre as combinações e a soma dos IP individuais são representados pela linha. Desvio padrão ( $n=2$ ) está indicado pelas barras de erro. Os símbolos representam diferença estatística aos níveis de  $p<0,01$  (\*\*) e  $p<0,05$  (\*), teste t-Student

### 5.3.3 Peroxidação de lipossomos: monitoramento da formação de dienos conjugados

Lipossomos são vesículas formadas por uma bicamada lipídica, mais frequentemente formada por fosfolípidios, e foram obtidas, nesse estudo, a partir de fosfatidilcolina de soja. Essas vesículas possuem um centro hidrofílico o qual é recoberto por uma membrana hidrofóbica. Devido a sua característica anfipática, os lipossomos simulam membranas celulares (ÇELIK; GÖKMEN; SKIBSTED, 2015) e podem ser usados para o estudo de dispersão de drogas, moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas, antioxidantes, suplementos alimentares, cosméticos, entre outros.

A oxidação dos lipossomos, adicionados dos extratos de semente de açaí e engaço *Chenin Blanc*, foi iniciada pelo AAPH, que ao ser decomposto a 37°C, produz radicais peroxila (WERBER et al., 2011). Essas moléculas iniciam a oxidação de cadeias de ácidos graxos insaturados pela depleção de um átomo de hidrogênio, produzindo dienos conjugados (hidroperóxidos e alcoóis), os quais podem ser medidos a 234 nm (GOUPY et al., 2007).

Os extratos brutos e concentrados de semente de açaí e engaço *Chenin Blanc* e alfa-tocoferol foram adicionados à suspensão de lipossomos a 0,25, 0,50 e 1% de antioxidante relativo à fração lipídica.

Para todas as amostras, um aumento do IP dependente de concentração foi observado, assim, a maior concentração (1%) apresentou a maior atividade antioxidante, pois foi capaz de estender o período de indução por um tempo maior. Para o extrato bruto de engaço *Chenin Blanc* a 0,25%, nenhum IP foi detectado. À concentração de 1%, a atividade antioxidante das amostras analisadas, em ordem decrescente, foi: extrato concentrado de semente de açaí > extrato concentrado de engaço *Chenin Blanc* > extrato bruto de semente de açaí > extrato bruto de engaço *Chenin Blanc* (Figura2-A).

Os extratos concentrados estenderam o IP por maior tempo em comparação aos padrões catequina e epicatequina. Além disso, esses extratos foram mais efetivos em proteger a fração lipídica de uma suspensão de lipossomos da oxidação quando comparado com extrato de chá verde, de acordo com os resultados obtidos por Yin et al. (2012).

A fim de avaliar os efeitos de interação entre os antioxidantes, as combinações de 1% dos extratos com 0,25% de alfa-tocoferol e a proporção inversa foram analisadas. Nas combinações onde os antioxidantes hidrofílicos, representados pelos extratos de semente de açaí e engaço *Chenin Blanc*, estavam em maior concentração do que o hidrofóbico (alfa-tocoferol), um aumento no período de indução foi observado. O IP das combinações das amostras a 1% + alfa-tocoferol a 0,25% foi maior do que a soma dos IP de cada antioxidante

individualmente, representando portanto, uma interação sinérgica, a qual está ilustrada pela linha de razão diferencial positiva (Figura 2-B).

Por outro lado, quando o alfa-tocoferol estava em maior concentração do que os extratos, os IP's das combinações foram menores do que a soma dos IP's individuais, resultando em uma razão diferencial negativa, ou seja, uma interação antagônica.

Esses resultados sugerem que existe uma interação positiva entre os antioxidantes hidrofóbicos e hidrofílicos, mas uma menor concentração de antioxidante hidrofóbico é necessária quando em associação com um antioxidante hidrofílico. Isso pode ser explicado pela localização dessas moléculas na suspensão de lipossomos. Os extratos de semente de açaí e engajo *Chenin Blanc* se dispersam por toda a suspensão e podem estar presentes no interior dos lipossomos, enquanto que o alfa-tocoferol é guiado a se manter entre a bicamada hidrofóbica. Isso é devido aos seus diferentes coeficientes de partição, que é maior para o alfa-tocoferol, indicando sua maior hidrofobicidade, determinando, dessa maneira, a disponibilidade desses compostos no meio. Assim, o alfa-tocoferol localiza-se na bicamada lipídica atuando diretamente na redução de radicais peroxila produzidos pelo AAPH (NEUNERT et al., 2015). O conhecimento sobre o coeficiente de partição é essencial para compreender a resposta antioxidante de compostos individuais ou em combinação, pois afeta a interação destes com as biomembranas e, como consequência, influencia diretamente a atividade antioxidante desempenhada por esses compostos (LIAO; YIN, 2000).

Além disso, uma elevada concentração de extratos associado ao alfa-tocoferol é capaz de aumentar a proteção oxidativa do substrato lipídico mais do que a proporção inversa, pois, em suspensão de lipossomos, antioxidantes hidrofílicos possuem maior movimento dinâmico, enquanto que os antioxidantes hidrofóbicos mantêm-se estáticos na bicamada lipídica, agindo localmente. Por outro lado, Neunert et al. (2015) sugerem que a proximidade entre as moléculas antioxidantes é fundamental para a ocorrência de interação sinérgica.

Becker, Ntouma e Skibsted (2007) também concluíram que flavonoides possuem alta atividade antioxidante em suspensão de lipossomos, porque eles agem próximos da superfície da membrana, impedindo o ataque de radicais peroxila, formados na fase aquosa, aos lipídios. O alfa-tocoferol, por sua vez, age como antioxidante na bicamada lipídica. Embora o mecanismo de interação desses antioxidantes hidrofílicos e hidrofóbicos permaneça não totalmente esclarecido, Yin et al. (2012) sugerem que a localização, barreiras físicas e a regeneração de antioxidantes são alguns dos aspectos envolvidos no mecanismo antioxidante nesses sistemas lipídicos.

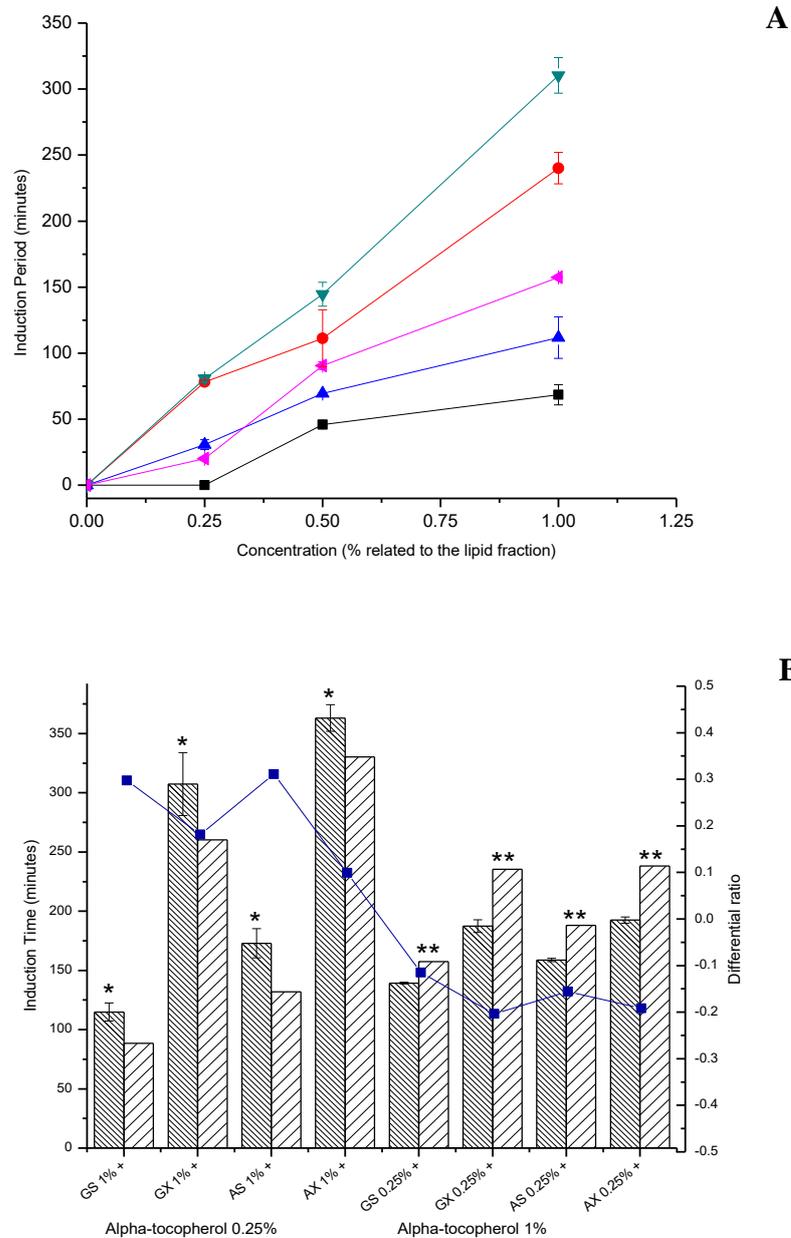


Figura 2 – Peroxidação de lipossomos. (A) Períodos de indução (IP) dos extratos de engaço *Chenin Blanc* bruto (■), concentrado (●), semente de açaí bruto (▲), concentrado (▼) e alfa-tocoferol (◆) a 0,25, 0,5 e 1% de antioxidantes relativos a fração lipídica. Um controle, sem antioxidantes, não apresentou IP detectável. (B) Períodos de indução das combinações de alfa-tocoferol e extratos de engaço *Chenin Blanc* (GS = extrato bruto; GX = extrato concentrado) e semente de açaí (AS = extrato bruto; AX = extrato concentrado) a 0,25 e 1% de antioxidantes (colunas a esquerda) foram comparados com a soma dos IP individuais (colunas a direita). A razão diferencial entre as combinações e a soma dos IP individuais são representados pela linha. Desvio padrão ( $n=4$ ) está indicado pelas barras de erro. Os símbolos representam diferença estatística aos níveis de  $p<0,01$  (\*\*) e  $p<0,05$  (\*), teste t-Student

### 5.3.4 Consumo de oxigênio em uma emulsão de metil linoleato

Um ensaio de oxidação de ácido graxo insaturado, induzida por metamioglobina, foi realizado para avaliar a capacidade dos extratos de semente de açaí e engaço *Chenin Blanc*, alfa-tocoferol e suas combinações em proteger o metil linoleato contra a oxidação em uma emulsão óleo/água.

A concentração de oxigênio de uma emulsão saturada de ar contendo o ácido graxo insaturado metil linoleato foi imediatamente monitorada durante o tempo após a oxidação induzida por metamioglobina. A metamioglobina, em um ambiente de elevada concentração de ácidos graxos, é desnaturada expondo, assim, seu grupo heme, o qual possibilita a ocorrência do mecanismo de peroxidação induzida por hematina (BARON; SKIBSTED; ANDERSEN, 1997; BARON; SKIBSTED; ANDERSEN, 2002). Metamioglobina ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ) é a forma oxidada da mioglobina ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ) e a hematina ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ) é a fração heme da metamioglobina (GOUPY et al., 2007). Uma oxidação dependente da razão da concentração entre ácidos graxos/mioglobina é uma reação particularmente importante na carne vermelha, seus produtos derivados e alimentos onde essas moléculas estão presentes, com predominância dos lipídios. Essa condição pode promover a diminuição da estabilidade oxidativa, bem como, comprometer a qualidade nutricional e sensorial desses produtos.

Uma vez que a metamioglobina é desnaturada e o grupo heme (Hm) exposto ao ambiente rico em ácido linoléico, a peroxidação mediada por metamioglobina é iniciada (GOUPY et al., 2007). Primeiramente, o domínio  $\text{HmFe}^{\text{III}}$  é oxidado por um hidroperóxido formando ferrilmioglobina ( $\text{HmFe}^{\text{IV}}$ ), o qual tem sido relatado como um potente iniciador de peroxidação (BARON; ANDERSEN, 2002), pois é capaz de abstrair átomos de hidrogênio de uma cadeia de ácido graxo insaturado para se regenerar a  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Nessa reação de redução, radicais peroxila ( $\text{LOO}\cdot$ ) são formados e reagem com um novo ácido graxo insaturado e moléculas de oxigênio para produzir hidroperóxidos ( $\text{LOOH}$ ) e  $\text{LOO}\cdot$ , caracterizando a fase de propagação. Durante essa etapa, um grande número de  $\text{LOOH}$  e  $\text{LOO}\cdot$  é produzido e a depleção de  $\text{O}_2$  está relacionada ao progresso da peroxidação do ácido linoléico induzida por metamioglobina na emulsão. Radicais peroxila podem também reagir entre si para formar produtos não radicalares na fase de terminação. Assim, antioxidantes podem diminuir a taxa de reação da oxidação lipídica, estendendo a vida útil de alimentos ricos em lipídios.

Algumas hipóteses para o mecanismo de ação antioxidante em uma reação de oxidação mediada por metamioglobina podem ser: 1) bloqueio da oxidação do ferro do grupo heme da metamioglobina (fase de iniciação) – quercetina, por exemplo, possui propriedades

quelantes e estabilizantes de ferro (PROCHÁZKOVÁ; BOUSOVA; WILHELMOVÁ, 2011); 2) doação de próton aos metil linoleatos, impedindo sua oxidação (fase de iniciação); 3) doação de elétrons aos radicais peroxila (fase de propagação); 4) antioxidantes regenerando os radicais alfa-tocoferil e/ou o alfa-tocoferol regenerando os radicais antioxidantes.

Extratos de semente de açaí e engaço *Chenin Blanc* e alfa-tocoferol foram adicionados como antioxidantes, em diferentes concentrações, à emulsão de metil linoleato. O tempo decorrido (em segundos) para a total extinção do O<sub>2</sub> na emulsão permitiu observar aumento dependente da concentração para todas as amostras analisadas. Tanto o extrato concentrado de semente de açaí quanto o de engaço retardaram por um longo período de tempo a reação de oxidação em cadeia, pois o consumo de O<sub>2</sub> foi mais lento do que o observado para os extratos brutos e alfa-tocoferol, principalmente na concentração mais alta (Figura 3-A).

Quando combinados, uma interação sinérgica foi observada com os extratos que estavam em maior concentração do que o alfa-tocoferol. Entretanto, o aumento da proporção de alfa-tocoferol em relação aos extratos promoveu interação antagônica, o qual está indicado pela linha negativa de razão diferencial (Figura 3-B).

Esses resultados sugerem que os extratos hidrofílicos de semente de açaí e engaço *Chenin Blanc* são antioxidantes mais eficientes na fase de iniciação, protegendo tanto a fração ferro-heme quanto o ácido linoléico da oxidação. Por outro lado, o antioxidante lipofílico alfa-tocoferol é reconhecido como um antioxidante de quebra da reação em cadeia (GOUPY et al., 2007), agindo principalmente nos hidroperóxidos e radicais peroxila, inibindo, assim, a fase de propagação.

Em ambos os casos, o rápido aumento da produção de radicais livres durante a fase de propagação é retardada quando comparada com o controle, sem proteção antioxidante. Entretanto, para uma maior concentração de antioxidantes hidrofílicos, uma menor concentração de antioxidante lipofílico é necessária, porque, com a forte ação antioxidante na fase de iniciação, a fase de propagação é limitada e controlada pelo alfa-tocoferol, o qual, por sua vez, pode estar presente em menor concentração em relação aos antioxidantes hidrofílicos. Além disso, o alfa-tocoferol pode ter agido como regenerador dos extratos de semente de açaí e engaço *Chenin Blanc*, o que explicaria a elevada interação positiva observada com as combinações onde os antioxidantes hidrofílicos estão em maior concentração. De fato, o alfa-tocoferol foi capaz de regenerar alguns produtos da oxidação da quercetina, além de desempenhar sua atividade redutora, explicando a interação sinérgica com esse flavonoide (GOUPY et al., 2007). Por outro lado, baixa concentração de antioxidantes hidrofílicos permitiu elevada atividade oxidativa na fase de iniciação e,

consequentemente, a fase de propagação é acelerada produzindo um grande número de radicais lipídicos que excedem a capacidade do alfa-tocoferol em reduzi-los e de regenerar os antioxidantes hidrofílicos. Assim, esses antioxidantes podem ser oxidados e contribuir para o aumento dos radicais livres no ambiente de reação, o que pode explicar a interação antagônica quando a razão de antioxidantes hidrofílicos/lipofílicos é baixa.

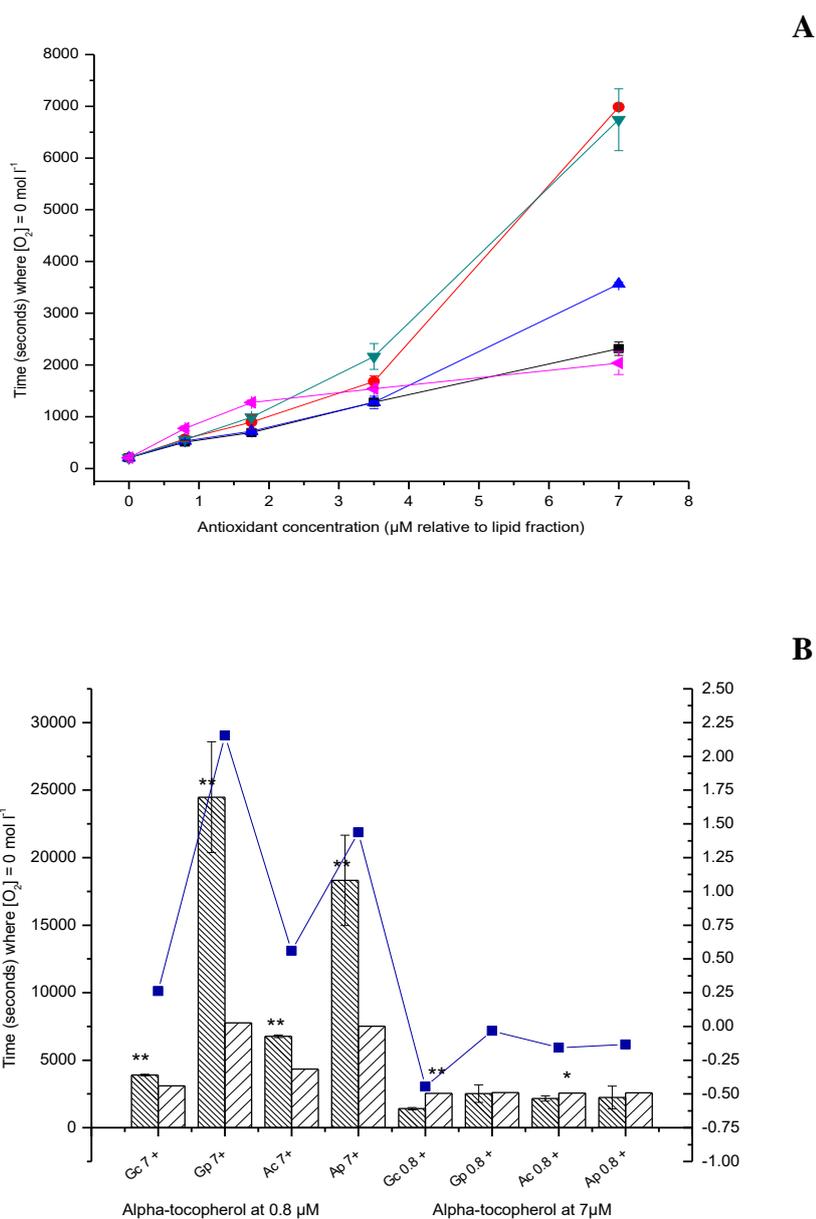


Figura 3 – Consumo de oxigênio em emulsão óleo/água. (A) Extratos de engaço *Chenin Blanc* bruto (■), concentrado (●), semente de açaí bruto (▲), concentrado (▼) e alfa-tocoferol (◆) a 0,80, 1,75, 3,5 e 7  $\mu\text{M}$  de antioxidantes relativos a fração lipídica. (A) T0% = tempo decorrido (em segundos) para a concentração de  $\text{O}_2$  ir de  $2,6 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  (100%) a zero  $\text{mol l}^{-1}$  (0%) durante a peroxidação do ácido linoléico induzida por metamioglobina em uma emulsão adicionada de diferentes antioxidantes. (B) T0% das combinações de alfa-tocoferol com extratos de engaço *Chenin Blanc* (Gc = extrato bruto; Gp = extrato concentrado) e semente de açaí (Ac = extrato bruto; Ap = extrato concentrado) a 0,8 e 7  $\mu\text{M}$  de antioxidantes (colunas a esquerda) foram comparados com a soma dos T0% individuais (colunas a direita) A razão diferencial entre as combinações e a soma dos T0% individuais são representados pela linha. Desvio padrão ( $n=3$ ) está indicado pelas barras de erro. Os símbolos representam diferença estatística aos níveis de  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,05$  (\*), teste t-Student

## 5.4 Conclusão

Extratos hidrofílicos de semente de açaí e engaço *Chenin Blanc* não são capazes de prevenir a formação dos primeiros radicais livres em óleo bruto de soja, devido à baixa solubilidade e dispersão limitada desses extratos nesse meio. Além disso, eles podem ter agido como substratos oxidáveis, promovendo uma atividade pro-oxidante. Antioxidantes lipofílicos, como alfa-tocoferol, por sua vez, são eficientes, já que são altamente solúveis no óleo puro.

Por outro lado, os extratos de resíduos agroindustriais foram efetivos em sistemas lipídicos coloidais, como protetores de lipossomos e ácidos graxos insaturados da oxidação. Em ambos os casos, combinações com alta razão de antioxidantes hidrofílicos/lipofílicos culminaram em efeitos sinérgicos. Essa interação positiva pode ser devida à alta solubilidade dos extratos na fase aquosa, combinado com a ação do alfa-tocoferol como antioxidante na bicamada lipídica dos lipossomos, à inibição da reação em cadeia na etapa de propagação da oxidação do ácido linoléico mediada por metamioglobina e/ou à ação do alfa-tocoferol como regenerador de antioxidantes hidrofílicos ou sendo regenerado por eles na suspensão de lipossomos e emulsão de ácido graxo insaturado.

Portanto, os extratos de semente de açaí e engaço *Chenin Blanc*, principalmente os concentrados, podem ser associados com alfa-tocoferol para agir como fortes antioxidantes naturais em alimentos ricos em lipídios, como produtos cárneos e emulsões. O uso desses resíduos agroindustriais é factível, uma vez que eles são fontes abundantes de antioxidantes.

## Referências

BARON, C.P.; ANDERSEN, H.J. Myoglobin-induced lipid oxidation. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 14, p. 3887–3897, 2002.

BARON, C.P.; SKIBSTED, L.H.; ANDERSEN, H.J. Concentration effects in myoglobin-catalyzed peroxidation of linoleate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 4, p. 883–888, 2002.

BARON, C.P.; SKIBSTED, L.H.; ANDERSEN, H. J. Prooxidative activity of myoglobin species in linoleic acid emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 5, p. 1704–1710, 1997.

BECKER, E. M.; NTOUMA, G.; SKIBSTED, L.H. Synergism and antagonism between quercetin and other chain-breaking antioxidants in lipid systems of increasing structural organisation. **Food Chemistry**, Barking, v. 103, n. 4, p. 1288–1296, 2007.

ÇELIK, E.E.; GÖKMEN, V.; SKIBSTED, L.H. Synergism between soluble and dietary fiber bound antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 63, n. 8, p. 2338–2343, 2015.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA (CEPEA). **PIB do Agronegócio – dados de 1994 a 2013**. Piracicaba, 2016. Disponível em: <<http://cepea.esalq.usp.br/pib/>>. Acesso em: 26 jan. 2016.

CHOUHDURY, D.; DAS, A.; BHATTACHARYA, A.; CHAKRABARTI, G. Aqueous extract of ginger shows antiproliferative activity through disruption of microtubule network of cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 10, p. 2872–2880, 2010.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT**. 2015. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>>. Acesso em: 26 jun. 2015.

FUSTER, M.D.; LAMPI, A.-M.; HOPIA, A.; KAMAL-ELDIN, A. Effects of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherols on the autoxidation of purified sunflower triacylglycerols. **Lipids**, Champaign, v. 33, n. 7, p. 715–722, 1998.

GORDON, A.; CRUZ, A.P.G.; CABRAL, L.M.C.; FREITAS, S.C.; TAXI, C M.A.D.; DONANGELO, C M.; MATTIETTO, R.A.; FRIEDRICH, M.; MATTA, V.M.; MARX, F. Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açaí fruits (*Euterpe oleracea* Mart.) during ripening. **Food Chemistry**, Barking, v. 133, n. 2, p. 256–263, 2012.

GOUPY, P.; VULCAIN, E.; CARIS-VEYRAT, C.; DANGLES, O. Dietary antioxidants as inhibitors of the heme-induced peroxidation of linoleic acid: Mechanism of action and synergism. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 43, n. 6, p. 933–946, 2007.

HOGAN, S.; CANNING, C.; SUN, S.; SUN, X.; ZHOU, K. Effects of grape pomace antioxidant extract on oxidative stress and inflammation in diet induced obese mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 21, p. 11250–11256, 2010.

HU, M.; SKIBSTED, L.H. Antioxidative capacity of rhizome extract and rhizome knot extract of edible lotus (*Nelumbo nuficera*). **Food Chemistry**, Barking, v. 76, n. 3, p. 327–333, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção da extração vegetal e da silvicultura 2014**. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2014/default\\_xls.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2014/default_xls.shtm)>. Acesso em: 18 set. 2015.

JEONG, C.H.; KWAK, J.H.; KIM, J.H.; CHOI, G.N.; KIM, D.O.; HEO, H.J. Neuronal cell protective and antioxidant effects of phenolics obtained from *Zanthoxylum piperitum* leaf using in vitro model system. **Food Chemistry**, Barking, v. 125, n. 2, p. 417–422, 2011.

KANG, J.; THAKALI, K.M.; XIE, C.; KONDO, M.; TONG, Y.; OU, B.; JENSEN, G.; MEDINA, M.B.; SCHAUSS, A. G.; WU, X. Bioactivities of açaí (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. **Food Chemistry**, Barking, v. 133, n. 3, p. 671–677, 2012.

KANG, J.; XIE, C.; LI, Z.; NAGARAJAN, S.; SCHAUSS, A.G.; WU, T.; WU, X. Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Chemistry**, Barking, v. 128, n. 1, p. 152–157, 2011.

LIAO, K.; YIN, M. Individual and combined antioxidant effects of seven phenolic agents in human erythrocyte membrane ghosts and phosphatidylcholine liposome systems: importance of the partition coefficient. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 2266 – 2270, 2000.

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, n. 2, p. 125–132, 2007.

MELO, P.S.; BERGAMASCHI, K.B.; TIVERON, A.P.; MASSARIOLI, A.P.; OLDONI, T.L.C.; ZANUS, M.C.; PEREIRA, G.E.; ALENCAR, S.M. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 6, p. 1088–1093, 2011.

MELO, P.S.; MASSARIOLI, A.P.; DENNY, C.; SANTOS L. F.; FRANCHIN, M.; PEREIRA, G.E.; VIEIRA, T.M.F.S.; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.M. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, Barking, v. 181, p. 160–169, 2015.

NEUNERT, G.; GÓRNAŚ, P.; DWIECKI, K.; SIGER, A.; POLEWSKI, K. Synergistic and antagonistic effects between alpha-tocopherol and phenolic acids in liposome system: spectroscopic study. **European Food Research and Technology**, Berlim, v. 241, n. 6, p. 749–757, 2015.

NUNES, S.P. **Produção e consumo de óleos vegetais no Brasil**. DESER–Boletim Eletrônico, n. 159, 10 p., 2007. Disponível em: <[http://www.deser.org.br/documentos/doc/Produção e consumo de óleos vegetais.pdf](http://www.deser.org.br/documentos/doc/Produção_e_consumo_de_óleos_vegetais.pdf)>. Acesso em: 05 jun. 2015.

POULOSE, S.M.; FISHER, D.R.; LARSON, J.; BIELINSKI, D.F.; RIMANDO, A.M.; CAREY, A.N.; SCHAUSS, A.G.; SHUKITT-HALE, B. Anthocyanin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, n. 4, p. 1084–1093, 2012.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, Milano, v. 82, n. 4, p. 513–523, 2011.

RHODES, C.J.; TRAN, T.T.; MORRIS, H. A determination of antioxidant efficiencies using ESR and computational methods. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Kidlington, v. 60, n. 6, p. 1401–1410, 2004.

ROBERTS, W.G.; GORDON, M.H. Determination of the total antioxidant activity of fruits and vegetables by a liposome assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 1486–1493, 2003.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V.L. Total phenolic analysis – automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 28, n. 1, p. 49-55, 1977.

- SPECIFICATION, P. **Amberlite XAD-2 Polymeric Adsorbent**. Supelco, 2 p., 1997. Disponível em: <[https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Product\\_Information\\_Sheet/4802.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Product_Information_Sheet/4802.pdf)>. Acesso em: 13 ago. 2013.
- TEIXEIRA, L.B.; GERMANO, V.L.C.; OLIVEIRA, R.F.; JÚNIOR, J.F. **Processos de compostagem usando resíduos das agroindústrias de açaí e de palmito do açaizeiro.**, 2005.6 p. (EMBRAPA – Circular Técnica, 41).
- THIMOTHE, J.; BONSI, I.A.; PADILLA-ZAKOUR, O.I.; KOO, H. Chemical characterization of red wine grape (*Vitis vinifera* and *Vitis interspecific hybrids*) and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 25, p. 10200–10207, 2007.
- THOO, Y.Y.; ABAS, F.; LAI, O.M.; HO, C.W.; YIN, J.; HEDEGAARD, R.V.; SKIBSTED, L.H.; TAN, C.P. Antioxidant synergism between ethanolic *Centella asiatica* extracts and  $\alpha$ -tocopherol in model systems. **Food Chemistry**, Barking, v. 138, n. 2/3, p. 1215–1219, 2013.
- VELASCO, J.; ANDERSEN, M.L.; SKIBSTED, L.H. Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the Rancimat method and differential scanning calorimetry. **Food Chemistry**, Barking, v. 85, n. 4, p. 623–632, 2004.
- VINSON, J.A.; DABBAGH, Y.A.; SERRY, M.M.; JANG, J. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 43, n. 11, p. 2800–2802, 1995.
- WERBER, J.; WANG, J.Y.; MILLIGAN, M.; LI, X.; JI, J. A. Analysis of 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride degradation and hydrolysis in aqueous solutions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, DC, v. 100, n. 8, p. 3307–3315, 2011.
- YAMAGUCHI, K.K.D.L.; PEREIRA, L.F.R.; LAMARÃO, C.V.; LIMA, E.S.; VEIGA-JUNIOR, V.F. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, Barking, v. 179, p. 137–151, 2015.
- YIN, J.; BECKER, E.M.; ANDERSEN, M.L.; SKIBSTED, L.H. Green tea extract as food antioxidant. Synergism and antagonism with  $\alpha$ -tocopherol in vegetable oils and their colloidal systems. **Food Chemistry**, Barking, v. 135, n. 4, p. 2195–2202, 2012.

## 6 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo comprovou nossa tese de que muitos resíduos agroindustriais são fontes de fitoquímicos bioativos com potencial de aplicação industrial, tais como os antioxidantes.

Por meio do ensaio para a otimização do processo de extração foi possível determinar quatro diferentes condições para os resíduos analisados as quais incluem, de forma geral, elevada temperatura (96 °C), exceto para semente de açaí (ambiente), e proporções intermediárias de etanol (43 – 57%), exceto para a borra de café (96%). O emprego das condições otimizadas permitiu a combinação da produção de extratos de elevada atividade antioxidante e um uso mais eficiente dos recursos energéticos.

A análise do perfil fenólico dos extratos otimizados dos resíduos agroindustriais mostrou que muitos antioxidantes naturais tais como catequina, epicatequina, procianidinas, resveratrol, ácido gálico, quercetina, antocianinas, entre outras moléculas de interesse tecnológico, estão presentes em quantidades consideráveis nesses materiais, os quais são descartados diariamente. Além disso, pela primeira vez foi relatada a presença de resveratrol em semente de açaí.

Engaço de uva da variedade *Chenin Blanc* e semente de açaí foram os resíduos selecionados para o processo de concentração de fenólicos e fracionamento bioaguado por apresentarem as maiores atividades antioxidantes dentre os resíduos analisados. O método de concentração/fracionamento empregado se mostrou eficaz, pois foi capaz de produzir frações com elevada atividade bioativa (antioxidante, antiproliferativa e anti-inflamatória), inclusive com a produção de uma fração da semente de açaí altamente enriquecida com os flavonoides catequina e epicatequina. Dentre os extratos e as frações mais bioativas, se verificou ação seletiva contra espécies reativas de oxigênio e linhagens celulares tumorais humanas, o que possibilita o uso de certas frações para aplicações específicas, principalmente na área farmacêutica. Além disso, algumas frações apresentaram atividade antioxidante muito superior à demonstrada pelos antioxidantes sintéticos BHT e TBHQ, comumente utilizados industrialmente, o que reforça a possibilidade de substituição dos antioxidantes sintéticos pelos naturais.

A aplicação dos extratos brutos e concentrados de engaço *Chenin Blanc* e semente de açaí em matrizes lipídicas mostrou que o coeficiente de partição influencia diretamente o desempenho da atividade antioxidante de extratos hidrofílicos em meios hidrofóbicos. Assim, uma atividade pro-oxidante dos extratos foi observada em óleo de soja puro, enquanto que elevada atividade antioxidante foi verificada em meios lipídicos heterogêneos, como uma

suspensão de lipossomos e emulsão óleo/água, nos quais os antioxidantes hidrofílicos dos extratos possuem uma maior dispersão. Quando os extratos foram associados com alfa-tocoferol, uma interação sinérgica foi observada, devido à ação cooperativa desse antioxidante hidrofóbico com os hidrofílicos dos extratos. Os extratos de resíduos analisados poderiam ser utilizados, dessa forma, para manter a estabilidade oxidativa de produtos cárneos e emulsões.

Assim, este trabalho mostrou que resíduos agroindustriais podem ser explorados como matéria-prima para a produção de compostos bioativos naturais de potencial aplicação na indústria de alimentos, farmacêutica e/ou cosmética, substituindo, por exemplo, os antioxidantes sintéticos comumente utilizados. Ao serem reinseridos na indústria, contribuiriam para a diminuição do impacto ambiental causado pelo descarte ao meio ambiente e para a agregação de valor a esses materiais, transformando-os, assim, em coprodutos das atividades agroindustriais.

**ANEXOS**



## ANEXO A

Food Chemistry 181 (2015) 160–169



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

## Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species



Priscilla Siqueira Melo<sup>a</sup>, Adna Prado Massarioli<sup>a</sup>, Carina Denny<sup>b</sup>, Luciana Ferracini dos Santos<sup>c</sup>, Marcelo Franchin<sup>b</sup>, Giuliano Elias Pereira<sup>d</sup>, Thais Maria Ferreira de Souza Vieira<sup>a</sup>, Pedro Luiz Rosalen<sup>b</sup>, Severino Matias de Alencar<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Agri-food Industry, Food and Nutrition, 'Luiz de Queiroz' College of Agriculture, University of São Paulo, Pádua Dias Avenue, P.O. Box. 9, 13418-900 Piracicaba, SP, Brazil

<sup>b</sup> Piracicaba Dental School, Department of Physiological Sciences, University of Campinas, 901, Limeira Avenue, 13414-903 Piracicaba, SP, Brazil

<sup>c</sup> Herminio Ometto University Center, 500, Dr. Maximiliano Baruto, 13607-339 Araras, SP, Brazil

<sup>d</sup> Brazilian Agricultural Research Corporation – Embrapa Grape & Wine/Tropical Semi-arid, BR 428, Km 152, P.O. Box 23, 56302-970 Petrolina, PE, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 October 2014

Received in revised form 14 February 2015

Accepted 17 February 2015

Available online 24 February 2015

#### Chemical compounds studied in this article:

Catechin (PubChem CID: 73160)

Procyanidin B1 (PubChem CID: 11250133)

Epicatechin (PubChem CID: 72276)

Procyanidin B2 (PubChem CID: 122738)

Gallic acid (PubChem CID: 370)

Malvidin-3-glucoside (PubChem CID: 443652)

*Keywords:*

### ABSTRACT

Nearly 20 million tons of winery by-products, with many biological activities, are discarded each year in the world. The extraction of bioactive compounds from Chenin Blanc, Petit Verdot, and Syrah grape by-products, produced in the semi-arid region in Brazil, was optimized by a Central Composite Rotatable Design. The phenolic compounds profile, antioxidant capacity against synthetic free radicals (DPPH and ABTS), reactive oxygen species (ROS; peroxy radical, superoxide radical, hypochlorous acid), cytotoxicity assay (MTT) and quantification of TNF- $\alpha$  production in RAW 264.7 cells were conducted. Gallic acid, syringic acid, procyanidins B1 and B2, catechin, epicatechin, epicatechin gallate, quercetin 3- $\beta$ -D-glucoside, delphinidin 3-glucoside, peonidin 3-O-glucoside, and malvidin 3-glucoside were the main phenolic compounds identified. In general, rachis showed higher antioxidant capacity than pomace extract, especially for Chenin Blanc. All extracts showed low cytotoxicity against RAW 264.7 cells and Petit Verdot pomace suppressed TNF- $\alpha$  liberation *in vitro*. Therefore, these winery by-products can be considered good sources of bioactive compounds, with great potential for application in the food and pharmaceutical industries.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.